UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE

IMMUNOTECH-BECKMAN COULTER

ECOLE DOCTORALE 62 – SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Unité de Recherche et Développement Life Sciences

Unité de recherche UMR_S 1263 – C2VN

Thèse présentée pour obtenir le grade universitaire de docteur

Discipline : Biologie-Santé
Spécialité : Immunologie

Pénélope Bourgoin

Recherche de nouveaux tests rapides en cytométrie en flux pour l'établissement de diagnostics « aux lits des patients » : application à la discrimination des infections bactériennes et/ou virales en vue de réduire l'usage inutile des antibiotiques.

Soutenue le 13/02/2020 devant le jury :

Mikaël ROUSSEL	CHU Rennes	Rapporteur
Jacques LEVRAUT	CHU Nice	Rapporteur
Marie LOOSVELD	CHU Marseille	Examinateur
Philippe NAQUET	CIML Marseille	Examinateur
Fabrice MALERGUE	Immunotech Marseille	Directeur en entreprise
Pierre-Emmanuel MORANGE	CHU Marseille	Directeur de thèse

Numéro national de thèse/suffixe local : CIFRE n°2016/1368

Résumé

Les maladies infectieuses sont des pathologies dont le diagnostic étiologique est souvent complexe. Le clinicien doit baser son diagnostic sur ses observations cliniques et les relier aux mesures biologiques du patient. Plusieurs groupes recherchent activement de nouveaux marqueurs biologiques pour préciser ce diagnostic. C'est dans cette optique que la cytométrie en flux a été utilisée et optimisée pour comparer l'expression de nouveaux biomarqueurs sur les cellules du sang des patients infectés ou des sujets sains. La caractérisation des mécanismes d'expression des marqueurs montre que l'expression du CD64 sur les neutrophiles est amplifiée chez les patients infectés par une bactérie via l'interféron γ, alors que l'expression du CD169 sur les monocytes est amplifiée chez les patients infectés par un virus via la famille des interférons de type I (α, β, ω). De plus, l'expression de l'HLA-DR sur les monocytes semble aider à l'identification étiologique de l'infection. Les travaux suggèrent que le dosage de ces trois biomarqueurs par la technique de cytométrie en flux optimisée pourrait être un candidat intéressant dans les études sur le diagnostic des infections bactériennes et virales.

Mots clés : *cytométrie en flux, immunologie, pathologies infectieuses, diagnostic au lit du patient.*

Abstract

Infectious diseases are pathologies whose etiological diagnosis is often complex. The clinician must base his diagnosis on his clinical observations and link them to the patient's biological measurements. Several groups are actively seeking new biomarkers to clarify this diagnosis. It is for this purpose that flow cytometry has been used and optimized to compare the expression of new biomarkers on blood cells of infected patients or healthy subjects. Characterization of the expression mechanisms of the markers shows that the expression of CD64 on neutrophils is amplified in patients infected by a bacterium via interferon γ, whereas the expression of CD169 on monocytes is amplified in patients infected with a virus via the type I interferon family (α, β, ω). In addition, the expression of HLA-DR on monocytes seems to help the etiological identification of the infection. The work suggests that the assay of these three biomarkers combined into an optimized flow cytometry technique could be an interesting candidate in studies on the diagnosis of bacterial and viral infections.

Keywords : *flow cytometry, immunology, infectious diseases, point-of-care diagnosis.*

Remerciements

Je tenais tout d'abord à remercier l'entreprise Immunotech - Beckman Coulter de m'avoir accueillie au sein de ses locaux pour réaliser mes trois années de thèse, et plus particulièrement les docteurs Jean-Marc Busnel et Raphaëlle Sulpicy, directeurs de la Recherche et du Développement du département Life Sciences, qui m'ont offert la possibilité et la grande opportunité d'effectuer ma thèse dans leur laboratoire. Ils ont su me montrer une direction exemplaire de leurs employés et de leurs projets, ainsi qu'une rigueur édifiante dans la gestion de leur département.

Je remercie ensuite tout particulièrement mon promoteur, le docteur Fabrice Malergue, qui a supervisé mon travail pendant toute la durée de la thèse. Sa pédagogie et son dynamisme ont permis de perfectionner mes connaissances et de réaliser mon projet dans les meilleures conditions. Il a su m'accorder une entière confiance et m'a ainsi donné une grande assurance. Également, il a su m'aider à développer de nombreuses collaborations, ce qui a constitué pour moi une très grande satisfaction.

Je remercie également mon directeur de thèse, le Pr. Pierre-Emmanuel Morange, qui m'a accordé sa confiance et son soutien sans faille pendant les trois années de la thèse. Son savoir et son partage de ses connaissances m'ont été précieux pour suivre le sujet de ma thèse avec la plus grande clarté.

Je tiens à remercier le reste de l'équipe Innovation à laquelle j'ai appartenue, dont notamment les docteurs Andreas van Agthoven et Rihane Arif, ainsi que Madame Inès Ait Belkacem. Ils ont constitué pour moi une aide indispensable dans la conduite de ma thèse, que j'ai appréciée et dont je suis très reconnaissante.

Je souhaite également remercier l'ensemble des membres du département de Recherche et de Développement de Life Sciences. Particulièrement, je remercierai Mesdames Rose Jean et Sandra Bourdet, et Messieurs Frédéric Monsonis et Sylvain Monseaux, pour leurs attentions et soutiens quotidiens. Tous les membres ont su répondre à mes questions, être disponibles pour moi et me donner des conseils avisés lors de ma thèse. Je les remercie pour les très bonnes conditions qu'ils ont créées pour que mon projet se réalise au mieux et pour l'attention qu'ils m'ont apportée. Ils ont été de réels partenaires de thèse, avec qui j'ai pu échanger quotidiennement et librement. Je les remercie pour l'amitié que j'ai pu développer avec eux et le soutien sans faille qu'ils m'ont apporté.

Enfin, je remercierai mes proches, à l'origine de ce projet mais aussi du soutien nécessaire qu'ils m'ont apporté pour qu'il aboutisse. Je les remercie de cette fierté extraordinaire et de cet amour incroyable dont ils ont su faire preuve tout au long de ma thèse pour me permettre de la concrétiser.

Table des matières

Résumé **3**
Abstract **5**
Remerciements **7**
Table des matières **9**
Liste des tableaux **11**
Liste des figures **13**
Liste des abréviations **15**
Introduction **19**
1. Généralités **21**
1.1. Les maladies infectieuses chez l'Homme et leurs enjeux 23
1.1.1. Définition et épidémiologie des infections 23
1.1.2. Enjeux liés à la prévention des infections 26
1.1.3. Enjeux liés à la prise en charge clinique des infections 27
1.1.4. Enjeux liés au traitement des infections 31
1.1.5. Solutions actuelles pour le diagnostic des infections 34
Conclusion 1.1 38
1.2. La réponse immunitaire aux infections chez l'Homme 39
1.2.1. Généralités sur le système immunitaire de l'Homme 39
1.2.2. Le système immunitaire dirigé contre les bactéries extracellulaires 42
1.2.3. Le système immunitaire dirigé contre les bactéries intracellulaires 47
1.2.4. Le système immunitaire dirigé contre les virus 48
1.2.5. Le système immunitaire dirigé contre les autres types de micro-organismes 50
Conclusion 1.2 54
1.3. Les biomarqueurs cellulaires de la réponse immunitaire infectieuse 55
1.3.1. Biomarqueurs cellulaires de la réponse infectieuse décrits dans la littérature 55
1.3.2. Biomarqueur de l'immunité antibactérienne, le CD64 56
1.3.3. Biomarqueur de l'immunité antivirale, le CD169 59
1.3.4. Biomarqueur de la transition entre immunités innée et adaptative, l'HLA-DR 62
Conclusion 1.3 66
1.4. La cytométrie en flux «au lit du patient» 67
1.4.1. Principe de la cytométrie en flux 67
1.4.2. Enjeux liés au prélèvement de l'échantillon 68
1.4.3. Enjeux liés à la préparation de l'échantillon 69
1.4.4. Enjeux liés à la lecture de l'échantillon 70
1.4.5. Enjeux liés à l'analyse de l'échantillon 72

1.4.6. Besoins techniques d'un outil «au lit du patient» 73
Conclusion 1.4 76
1.5. Problématique du sujet de thèse 77
2. Résultats de la recherche 79
2.1. Mise au point d'une technique de cytométrie en flux « au lit du patient » 81
2.1.1. Faisabilité du protocole « au lit du patient » 81
2.1.2. Caractérisation des réactifs 87
2.1.3. Validation technique de la procédure 106
2.1.4. Application de la procédure : exemple pour le sepsis 108
Conclusion 2.1 126
2.2. Etude biologique des marqueurs cellulaires CD64 et CD169 129
2.2.1. Rôle des interférons de type I et II dans les expressions des biomarqueurs 129
2.2.2. Rôle des interférons de type III dans les expressions des biomarqueurs 161
2.2.3. Le modèle de la tolérance à l'endotoxine 164
Conclusion 2.2 172
2.3. Evaluation des performances cliniques du nouveau test diagnostic 175
2.3.1. Détermination des valeurs de référence du test 175
2.3.2. Détermination des valeurs de décision du test 178
2.3.3. Validation des valeurs de décision du test 196
Conclusion 2.3 222
2.4. Etudes de validation du test en clinique 225
2.4.1. La période hivernale en service d'Urgences adultes 225
2.4.2. Le sepsis bactérien en réanimation 250
2.4.3. Le diagnostic infectieux en pédiatrie 256
2.4.4. Les tueurs infectieux : VIH et tuberculose 259
Conclusion 2.4 275
3. Discussion des résultats 277
3.1. Implémentation du test en routine clinique 279
3.2. Perspectives autour de la technique de cytométrie en flux 287
3.3. La complexité des pathologies infectieuses. 295
3.4. La problématique mondiale des antibiotiques. 300
Conclusion 303
Bibliographie 305
ANNEXE 323
A. Annexe 1 : Etude d'échantillons congelés 325

Liste des tableaux

Tableau 1 : Diversité et épidémiologie des maladies infectieuses.
Tableau 2 : Mesures préventives pour limiter la transmission des maladies infectieuses.
Tableau 3 : Classification du sepsis.
Tableau 4 : Exemples de marqueurs solubles de l'hôte.
Tableau 5 : Acteurs de la réponse immunitaire.
Tableau 6 : Exemples de bactéries extracellulaires.
Tableau 7 : Récepteurs transmembranaires de reconnaissance des bactéries extracellulaires.
Tableau 8 : Sous-unités de neutrophiles.
Tableau 9 : Récepteurs cytosoliques de reconnaissance des bactéries intracellulaires.
Tableau 10 : Infections causées par les pathogènes fongiques communs.
Tableau 11 : Exemples de pathologies causées par des vers.
Tableau 12 : Marqueurs cellulaires de surface évalués pour le diagnostic infectieux.
Tableau 13 : Profil cible du test « au lit du patient » pour identifier l'étiologie d'une infection.
Tableau 14 : Associations anticorps-fluorochromes dirigées contre les CD64, CD169 et HLA-DR.
Tableau 15 : Doses optimales des CD64-conjugués.
Tableau 16 : Doses optimales des CD169-conjugués.
Tableau 17 : Doses optimales des HLA-DR-conjugués.
Tableau 18 : Influence du réactif de lyse sur l'expression des biomarqueurs.
Tableau 19 : Comparaison des proportions de marqueurs leucocytaires communs en fonction de la méthode de collection du sang.
Tableau 20 : Comparaison des ratios de MFI de marqueurs leucocytaires communs en fonction de la méthode de collection du sang.
Tableau 21 : Comparaison des MFI de biomarqueurs infectieux en fonction de la méthode de collection du sang.
Tableau 22 : Evaluation de la répétabilité du test.
Tableau 23 : Intervalles de référence des biomarqueurs nCD64 et mCD169.
Tableau 24 : Table de contingence du CD64.
Tableau 25 : Table de contingence du CD169.
Tableau 26 : Table de contingence de la CRP.
Tableau 27 : Limites de décision médicale des marqueurs CD169 et CD64.
Tableau 28 : Intervalles de référence des biomarqueurs nCD64 et mCD169 en pédiatrie.
Tableau 29 : Synthèse des pathogènes détectés par les CD64 et CD169.
Tableau 30 : Evaluation globale des performances du test.

Liste des figures

Figure 1 : Démarche clinique diagnostique en cas de pathologies fébriles.
Figure 2 : Le développement de l'antibiorésistance.
Figure 3 : Tendances des ventes d'antibiotiques Carpabénèmes pour les bactéries à Gram négatif.
Figure 4 : Mécanismes de l'immunité innée et adaptative.
Figure 5 : Reconnaissance de l'infection par le système immunitaire.
Figure 6 : Sous-unités de monocytes chez l'homme.
Figure 7 : Activités antivirales des interférons de type I.
Figure 8 : Modulation de la réponse inflammatoire contre les pathogènes par les récepteurs activateurs ITAM.
Figure 9 : Phagocytose des microbes dépendant des anticorps.
Figure 10 : Reconnaissance cis et trans des ligands des Siglecs.
Figure 11 : Siglec-1 et le virus du VIH-1.
Figure 12 : Gènes du locus du CMH.
Figure 13 : Structure des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et de classe II.
Figure 14 : Voies d'apprêtement intracellulaire des antigènes protéiques.
Figure 15 : Caractérisation cellulaire par cytométrie en flux.
Figure 16 : Protocole de préparation d'un échantillon de sang total pour analyse en cytométrie en flux.
Figure 17 : Principe d'un analyseur en cytométrie en flux.
Figure 18 : Histogrammes mono et bi-paramétriques de cytométrie en flux.
Figure 19 : Un nouveau marquage extracellulaire en une étape pour la cytométrie en flux : preuve de concept sur des marqueurs liés au sepsis.
Figure 20 : Comparaison du protocole de cytométrie en flux avant et après optimisation.
Figure 21 : Spectres d'excitation et d'émission des fluorochromes actuels.
Figure 22 : Courbes dose-réponses des CD64-conjugués.
Figure 23 : Courbes de stabilité des CD64-conjugués.
Figure 24 : Images de cytométrie du CD64-PBE.
Figure 25 : Courbes dose-réponses des CD169-conjugués.
Figure 26 : Courbes de stabilité des CD169-conjugués.
Figure 27 : Images de cytométrie du CD169-PE.
Figure 28 : Courbes dose-réponses des HLA-DR-conjugués.
Figure 29 : Courbes de stabilité des HLA-DR-conjugués.
Figure 30 : Images de cytométrie de l'HLA-DR-APC.
Figure 31 : Application de la technique de séchage au mélange final.
Figure 32 : Influence de l'anticoagulant sanguin sur l'expression des biomarqueurs.

Figure 33 : Influence de la collection du sang sur les proportions de cellules leucocytaires.
Figure 34 : Etude de validation de concept : surveillance de l'HLA-DR au lit du patient avec de la cytométrie en flux au plus proche de ses soins.
Figure 35 : Stabilité du stockage du réactif de lyse.
Figure 36 : Protocole final de cytométrie en flux « au lit du patient ».
Figure 37 : Rôle des interférons dans les expressions du CD64 et du CD169 dans le sang total : pertinence dans l'équilibre entre les réponses immunitaires bactériennes et virales.
Figure 38 : Expressions des CD64 et CD169 avec les IFN III.
Figure 39 : Phosphorylation de STAT1 et STAT2 dans les monocytes et les pDCs avec les IFN III.
Figure 40 : Expressions du CD64 et du CD169 en réponse au LPS.
Figure 41 : Modèle de la tolérance à l'endotoxine avec des PBMC.
Figure 42 : Modèle de la tolérance à l'endotoxine en sang total.
Figure 43 : Rôle des interférons dans la tolérance à l'endotoxine.
Figure 44 : Synergie entre interférons et LPS dans la tolérance à l'endotoxine.
Figure 45 : Synthèse du rôle des interférons dans les expressions du CD64 et du CD169.
Figure 46 : Implication du CD169 dans la tolérance à l'endotoxine.
Figure 47 : Valeurs de référence des biomarqueurs nCD64 et mCD169 en cytométrie en flux « au lit du patient ».
Figure 48 : Evaluation de recherche clinique par cytométrie en flux de biomarqueurs pour la stratification infectieuse en service d'Urgences.
Figure 49 : Evaluation par cytométrie en flux de biomarqueurs liés aux infections chez des patients fébriles en service d'Urgences.
Figure 50 : Diagnostic de l'étiologie infectieuse par les marqueurs CD64 et CD169.
Figure 51 : La cytométrie en flux pour l'évaluation au lit du patient de biomarqueurs liés aux infections : une étude de faisabilité dans les configurations des Urgences.
Figure 52 : Biomarqueurs infectieux chez des patients sepsis.
Figure 53 : Suivi clinique des patients sepsis. Evaluation des moyennes d'intensité de
Figure 54 : Valeurs de référence des biomarqueurs nCD64 et mCD169 en pédiatrie.
Figure 55 : Siglec-1 sur les monocytes (CD169), FcγRI sur les neutrophiles (CD64), et CD38 et CD69 sur les lymphocytes, au cours d'infections bactériennes et virales aigües ou chroniques.
Figure 56 : Biomarqueurs infectieux chez des sujets atteints de tuberculose.
Figure 57 : Cartographie de la chaîne clinique des soins reçus dans un service d'Urgences.
Figure 58 : Etude de l'environnement géographique d'un service d'Urgences.
Figure 59 : Processus de validation d'un test délocalisé.
Figure 60 : Portoir de contrôle du temps d'incubation.
Figure 61 : Dispositif de quantification du sang capillaire.
Figure 62 : Réactif de lyse dans le test final.
Figure 63 : Cytomètres en flux.
Figure 64 : Tests d'identification des pathogènes.
Figure 65 : Tests infectieux basés sur des biomarqueurs de l'hôte.

Liste des abréviations

ADCC	Cytotoxicité Dépendante des Anticorps
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AF	Alexa Fluor
AIM	*Apoptosis Inhibitor of Macrophages*
ANP	*Atrial Natriuretic Peptide*
APC	Allophycocyanine
ARN	Acide Ribonucléique
BCR	Récepteur des Cellules B
BNP	*Brain Natriuretic Peptide*
Ca^{2+}	Ions Calcium
CDS	*Cytosolic DNA Sensor*
cGAS	*Cyclic GMP-AMP Synthase*
CLR	*C-Type Lectin Receptor*
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMV	*Core Membrane Vesicle*
CMV	Cytomégalovirus
COFRAC	Comité Français d'Accréditation
CPA	Cellules Présentatrices d'Antigènes
CRP	Protéine C-Réactive
CT	*Cycle Time*
CTL	Lymphocytes T Cytotoxiques
CV	Coefficient de variation
Cy	Cyanine
DAMP	*Damage Associated Molecular Pattern*
DCs	Cellules Dendritiques
DMI	Direction des Maladies Infectieuses
EBV	*Epstein-Barr Virus*
EEQ	Evaluation Externe de la Qualité
EFS	Etablissement Français du Sang
EHPAD	Etablissement pour l'Hébergement de Personnes Âgées Dépendantes
ELAM-1	*Endothelial Leucocyte Adhesion Molecule-1*
ET	Tolérance à l'Endotoxine
FA	Formaldéhyde
Fc	Fragment cristallisable
FcγR	Récepteur à la partie Fc-*gamma* des Immunoglobulines
FcR	Récepteur à la partie Fc
FITC	Fluorescéine Isothyocyanate
FS	*Forward Scatter*
G+/G-	Gram Positif/Gram Négatif
Gal-9	Galectine-9
G(M)-CSF	Facteur Stimulant les Colonies de Granulocytes (et de Macrophages)
HLA	Antigène Leucocytaire Humain

HNL	*Human Neutrophil Lipocalin*
HSV	*Herpès Simplex Virus*
HV	*Healthy Volunteers*
I	Inflammatoire
IFCC-LM	Fédération Internationale de Chimie Clinique et de Médecine de Laboratoire
IFN	Interféron
IFN I/II/III	Interféron de type I/II/III
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukines
ILC	Cellules Lymphoïdes Innées
IP-10	*Interferon γ-Inducible Protein-10*
IRF	*Interferon Regulatory Factor*
ITAM	Motif d'Activation des récepteurs Immuns basé sur la Tyrosine
ITIM	Motif d'Inhibition des récepteurs Immuns basé sur la Tyrosine
J	Jour
JAK/STAT	*Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transduction*
K^+	Ions Potassium
LPS	Lipopolysaccharide
lbHLA-DR	HLA-DR sur les lymphocytes B
LT	Lymphotoxine
M	Mécanique
MAPK	*Mitogen Activated Protein Kinase*
mCD35	CD35 sur les monocytes
mCD55	CD55 sur les monocytes
mCD64	CD64 sur les monocytes
mCD169	CD169 sur les monocytes
MCP	*Monocyte chemotactic protein*
MDSC	*Myeloid-Derived Suppressor Cells*
MIF	*Macrophage migration inhibitory factor*
MIP	*Macrophage inflammatory protein*
mTNFα	TNFα sur les monocytes
MFI	Moyenne d'Intensité de Fluorescence
mHLA-DR	HLA-DR sur les monocytes
MxA	*Myxovirus Resistance Protein A*
nCD64	CD64 sur les neutrophiles
NET	*Neutrophil Extracellular Trap*
NF-κB	*Nuclear Factor κB*
NH_4Cl	Chlorure d'Ammonium
NK	Cellules Tueuses Naturelles
NLR	*NOD-Like Receptor*
NOD	*Nucleotide-binding Oligomerization Domain*
NVA	Valeur Non Ajoutée
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OMV	*Outer Membrane Vesicle*
Op	Opérateur
ORL	Oto-Rhino-Laryngologie
PAMP	*Pathogen Associated Molecular Pattern*

PBE	Pacific Blue
PBMC	Cellules Sanguines Périphériques Mononucléées
PC	Phyco-Erythrine-Cyanine
PCR	Réaction en Chaîne de la Polymérase
PCT	Procalcitonine
pDCs	Cellules Dendritiques Plasmacytoïdes
PDR	*Pan-Drug-Resistant*
PE	Phyco-Erythrine
PerCp	Péridinnine-Chlorophylle
PI3K/AKT	*Phosphoinositide 3-Kinase*
PLA2-II	*Phospholipase A2*
PMN	Polymorphonucléaire
PMT	Photomultiplicateur
PRR	*Pattern Recognition Receptor*
pSTAT	*Phosphorylated Signal Transducer and Activator of Transduction*
R	Resistant
RBC	*Red Blood Cells*
rHLA-ABC	Ratio HLA-ABC des monocytes/neutrophiles
ROS	*Radical Oxygen Species*
RSV	Virus Respiratoire Syncytial
RT-PCR	*Reverse Transcriptase – PCR*
SAPS	*Simplified Acute Physiology Score*
Se	Sensibilité
SI	*Staining Index*
SIDA	Syndrome de l'Immunodéficience Acquise
Siglec	*Sialic acid binding Immunoglobulin-like Lectins*
SIRS	Syndrome de Réponse Inflammatoire Systémique
SOFA	*Sequential Organ Failure Assessment*
Sp	Spécificité
SS	*Side Scatter*
SS	*Signal Sequence*
TAP	Transporteur associé à l'Apprêtement de l'Antigène
TB	Tuberculose
TCR	Récepteur des Cellules T
TGFβ	Facteur de Croissance Tumorale β
Th	*T helper*
TLR	*Toll-Like Receptor*
TNFα	Facteur de Nécrose Tumorale α
TRAIL	*Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis-Inducing Ligand*
VA	Valeur Ajoutée
VCAM	*Vascular Cell Adhesion Molecule*
VEGF	*Vascular Endothelial Growth Factor*
VHB	Virus de l'Hépatite B
VHC	Virus de l'Hépatite C
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
vWF	*von Willebrand Factor*
WBC	*White Blood Cells*
WIP	*Work-In Process*

XDR *Extensively Drug-Resistant*

Introduction

Les infections sont des pathologies complexes de l'être humain car leur étiologie est souvent difficile à diagnostiquer. Elles résultent de bactéries, virus, champignons ou parasites qui pénètrent dans l'organisme et colonisent l'hôte. Les deux types d'infections les plus fréquents sont les infections bactériennes et les infections virales.

Lorsqu'un être humain est infecté par l'un ou l'autre de ces deux pathogènes, il lui est vital d'être correctement pris en charge par le personnel médical pour initier un traitement rapidement et/ou être isolé. En effet, les deux différences majeures entre les deux types d'infections est que, d'une part, l'usage des antibiotiques est nécessaire pour éradiquer une infection bactérienne alors qu'il est inutile voire dangereux en cas d'infection virale, et, d'autre part, l'isolement requis d'une personne infectée par une bactérie ou un virus n'est pas le même. Il apparaît nécessaire de savoir déterminer l'étiologie d'une infection.

Le personnel médical est formé à reconnaître une infection sur les symptômes cliniques du patient. Cependant, dans certains cas, son diagnostic se doit d'être complété par les résultats des tests de laboratoire. Ces tests se basent ou bien sur l'identification précise du pathogène bactérien ou viral dans l'hôte, ou bien sur la reconnaissance de marqueurs spécifiques des réponses exprimées par l'organisme face à ces pathogènes. Les tests de référence restent la culture d'échantillons biologiques (sang, urines, etc.) pour l'isolement des bactéries, et la Réaction en Chaîne de la Polymérase (PCR) essentiellement pour la détection des virus. Les dosages de marqueurs de la réponse de l'hôte, comme la Protéine C-Réactive (CRP) ou de la Procalcitonine (PCT), sont également de plus en plus utilisés pour conforter les diagnostics médicaux.

Ces tests présentent de bonnes performances de détection et constituent une réelle aide diagnostique, mais leur temps d'éxécution est souvent trop long par rapport à la prise de décision qu'il convient d'avoir pour un patient infectieux. Ce temps perdu résulte d'une part dans dans le temps même de procédure des tests, et d'autre part, dans le fait que la réalisation de ces tests nécessite généralement de délocaliser l'échantillon du patient à tester vers un laboratoire d'analyses. Des tests plus rapides et réalisés au lit du patient seraient préférables.

La cytométrie en flux est une technique utilisée pour le diagnostic de nombreuses pathologies en raison de ses très bonnes performances de détection, mais ses procédures sont encore complexes à mettre en œuvre.

La problématique du travail de la thèse est donc de savoir s'il est possible de discriminer les infections bactériennes et les infections virales par un test de cytométrie en flux aussi, voire plus performant, mais surtout plus rapide et non délocalisé (« au lit du patient ») que les tests existants.

Mon travail de thèse a donc été scindé en trois parties majeures : tout d'abord, il était nécessaire d'optimiser la procédure de cytométrie en flux utilisée pour la rendre plus rapide et plus accessible dans des situations de soins « d'urgence », ensuite il convenait d'étudier les marqueurs à utiliser pour discriminer précisément les infections bactériennes des infections virales grâce à la cytométrie en flux, et enfin leurs performances ont été évaluées dans une diversité de cas pathologiques infectieux qu'il peut exister en clinique.

1. Généralités

1.1. Les maladies infectieuses chez l'Homme et leurs enjeux

1.1.1. Définition et épidémiologie des infections

L'infectiologie est un domaine vaste qui regroupe l'ensemble des disciplines médicales consacrées à l'étude des maladies infectieuses. Toute infection est provoquée par un germe ou agent infectieux, qui peut être une bactérie, un virus, un champignon ou un parasite. La pénétration et le développement de ce micro-organisme dans un être vivant provoque des lésions, en se multipliant, éventuellement en sécrétant des toxines, voire en se propageant par voie sanguine [1].

Les pathologies infectieuses recouvrent un large spectre de pathologies bénignes, telles que l'angine, les gastro-entérites ou la varicelle, mais également très graves, comme le sida, le paludisme, la tuberculose ou les virus hémorragiques, qui peuvent toucher tous les organes ou systèmes de l'organisme [2]. Une liste non-exhaustive d'exemples de ces pathologies est donnée en tableau 1.

Tableau 1 : Diversité et épidémiologie des maladies infectieuses. *Définition clinique, germe infectieux, épidémiologie (nombre de cas, nombre de décès), et perspectives de recherche d'exemples de maladies infectieuses (Adapté de* [3]*) – ORL : Oto-Rhino-Laryngologie ; RSV : Virus Respiratoire Syncytial ; VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine ; SIDA : Syndrome de l'Immunodéficience Acquise.*

Infection	Présentation clinique	Germe principal	Incidence	Mortalité	Axes de recherche
Exemples de maladies infectieuses à transmission respiratoire					
Infections respiratoires et de la sphère ORL (pneumonie, otite, bronchite)	Maladies invasives bénignes du nez et du pharynx, et grave du sang et des méninges	*Streptococcus pneumoniae,* rhinovirus, RSV, et autres	20 millions de cas par an en France	3 millions de décès par an dans le monde	Epidémiologie, diminution des coûts, tests de diagnostic rapide
Grippe	Maladie infectieuse virale attaquant le système respiratoire	Virus de la grippe	2,5 millions de cas en France par an	4 000-6 000 décès par an	Vaccins, antiviraux, compréhension des mécanismes de propagation
Tuberculose	Maladie infectieuse majoritairement pulmonaire en recrudescence en France	*Mycobacterium tuberculosis*	10,4 millions de cas dans le monde en 2016 4 741 cas en France en 2015	1,7 millions de décès en 2016 dans le monde	Nouvelles thérapies pour les formes résistantes, diminution des coûts, diagnostic

Méningite	Inflammation des tissus entourant le système nerveux central, liée à une infection le plus souvent virale (70-80% des cas) mais plus sévère si bactérienne, donc avec une prise en charge différente	*Neisseria meningitidis*	469 infections invasives à méningocoque en France en 2015	5 à 15% des cas de méningites sont mortels	Traitements antibiotiques pour lutter plus efficacement contre les formes liées aux bactéries
Légionellose	Affection pulmonaire pouvant être fatale, apparaissant en majorité chez les patients immuno-fragilisés	*Legionella pneumophila*	400 cas par an	5 à 15% des cas peuvent être mortels	Systèmes de prévention (hygiène, surveillance, éducation)
Exemples de maladies infectieuses à transmission orale					
Infection entéro-hémorragique	Infection urinaire, intra-abdominal ou méningite, avec toxine provoquant nausées, fièvre, vomissements, crampes d'estomac et diarrhées pouvant être fatales	*Escherichia coli*	Plusieurs milliers de personnes en 2011 en Europe	2,5 millions de décès par an dans le monde	Identification des facteurs de virulence, tests de détection rapide
Campylobactériose	Infection des intestins et parfois du sang	*Campylobacter*	7 500 cas par an	2 à 3% des cas sont mortels	Prévention, diagnostic
Salmonellose	Infection bactérienne responsable de fièvre thyphoïde, de toxi-infection alimentaire et de gastro-entérite	*Salmonella*	1 500 cas par an	Mortalité plus élevée chez les nourrissons, les personnes âgées ou immuno-déprimées	Epidémiologie, diagnostic, traitement
Shighellose	Maladie diarrhéique	*Shighella*	150 cas par an	Plusieurs centaines de décès par an dans le monde	Epidémiologie, vaccin, diagnostic
Listériose	Maladie septicémique des voies nerveuses et/ou génitales	*Listeria monocytogenes*	350 cas en France en 2015	30 à 40% des cas sont mortels	Compréhension des mécanismes de l'infection, prise en charge clinique, facteurs pronostics

Exemples de maladies infectieuses à transmission sexuelle ou par du sang contaminé					
Hépatite B	Infection virale majeure, aigüe dans 90-98% des cas (symptômes inaperçus) et chronique dans 10% des cas (forme grave), qui touche le foie (cirrhose, cancer) et se transmet via les liquides et sécrétions de l'organisme	Virus de l'Hépatite B	33 962 en France en 2016	887 000 dans le monde en 2015	Nouveaux traitements notamment pour les formes résistantes, diagnostic plus précoce
Hépatite C		Virus de l'Hépatite C	170 millions de personnes touchées dans le monde 360 000 en France	2 700 décès par an en France	
Sida	Dernier stade de l'infection due au VIH, découvert en 1983	Virus de l'Immuno-déficience Humaine	36,7 millions de cas dans le monde 170 000 en France	32 millions dans le monde depuis le début de l'épidémie 1-3 millions par an dans le monde	Eradiquer l'infection (même si dépistage précoce et traitements mis au point pour mieux contrôler l'infection)
Chlamydiose	Infection sexuellement transmissible des voies génitales et parfois respiratoires	*Chlamydia thrachomatis*	357 millions de cas par an dans le monde	Graves conséquences sur la santé reproductive	Dépistage, traitement, prévention
Gonorrhée	Infection sexuellement transmissible des voies génitales et urinaires	*Neisseria gonorrhoeae*			
Syphilis	Infection sexuellement transmissible des voies génitales, puis cutanée, voire nerveuse et viscérale	*Treponema pallidum*			
Exemples de maladies infectieuses à transmission zoonotique					
Paludisme	Maladie parasitaire transmise par un moustique, fréquente dans certaines zones du globe (90% des cas en Afrique), sévère voire mortelle	*Plasmodium falciparum*	216 millions de cas en 2016 dans le monde	1 million de décès par an dans le monde	Prévention, prise en charge, traitement

Borréliose ou **Maladie de Lyme**	Maladie transmise par les tiques	*Borrelia burgdorferi*	Environ 50 000 cas par an en France	Graves séquelles neurologiques mais peu de décès recensés	Diagnostic, traitement
Exemples de maladies infectieuses à transmission par les soins					
Infections nosocomiales	Infections contractées durant un séjour en établissement de santé, colonisant les voies urinaires et respiratoires	*Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*	1,4 million de cas dans le monde 1 patient sur 20 touché en France	4 000 décès par an en France	Molécules innovantes pour les germes résistants aux antibiotiques
Infections des plaies chirurgicales	Infections de la peau, des tissus mous, du sang ou même des os	*Staphylococcus aureus*	30-50% des individus sains en sont porteurs Environ 200 cas en France en 2009	Evolution possible en choc toxique mortel dans moins de 10% des cas	Traitement et vaccination contre les formes résistantes aux antibiotiques

L'enjeu de la thèse est de tenter de discriminer l'étiologie bactérienne ou virale pour la majorité de ces pathologies infectieuses, pour répondre à leurs enjeux problématiques que sont leur prévention, leur prise en charge clinique, et leur traitement.

1.1.2. Enjeux liés à la prévention des infections

De nombreuses infections sont provoquées par des micro-organismes qui sont présents chez la plupart des personnes sans causer de maladie. Ils deviennent pathogènes lorsqu'ils se trouvent à un endroit du corps où ils ne devraient pas être présents, ou en nombre anormalement élevé lors d'une baisse des défenses immunitaires. Il peut aussi s'agir d'un sous-type qui rend systématiquement malade, comme par exemple les souches entéro-hémorragiques de la bactérie *Escherichia coli*. Les micro-organismes peuvent se transmettre directement ou indirectement entre personnes, ou bien depuis les animaux [4]. La manière de lutter pour la prévention de ces maladies passe par la limitation de leur transmission, entre individus ou via les soins reçus en structure médicale [5].

La stratégie de prévention est inéquitable car tous les pays ne possèdent pas les mêmes couvertures sanitaires. Ces obstacles sociaux, juridiques et économiques restent les raisons majeures pour lesquelles ces pathologies ne bénéficient pas partout des mêmes progrès pour prévenir leurs transmissions. La surveillance et l'alerte en matière de maladies infectieuses est coordonnée en France par la Direction des Maladies Infectieuses (DMI). Elle est en charge de leurs surveillances, préventions, et contrôles. Elle intervient en appui des autorités sanitaires et des agences de santé publique, nationales et internationales [6].

Le plan d'action mondial de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) propose des stratégies plus globales, pour tenter, d'ici 2030, de mettre fin aux épidémies infectieuses [7] (Tableau 2).

Tableau 2 : Mesures préventives pour limiter la transmission des maladies infectieuses. *Exemples non exhaustifs d'interventions mises en place pour réduire les infections dans des unités de soins de médecine d'urgence (Adapté de* [5]*).*

Interventions	Mesures pratiques
Précautions standards	Hygiène des mains
	Vaccination du personnel
	Triage des patients avec des outils diagnostiques
Précautions environnementales	Port d'équipements de protection (masques)
	Nettoyage et désinfection de l'environnement
	Isolement des patients infectés
Précautions médicales	Education du personnel
	Utilisation limitée de dispositifs médicaux standardisés (cathéters, sondes urinaires, ventilation mécanique)

En plus de mettre en place de solides systèmes de financement de la santé, cela implique donc de constituer une main-d'œuvre qualifiée et d'investir dans les efforts visant à améliorer la qualité des traitements, des produits diagnostiques et des outils de prévention (hygiène, isolement, vaccination, contrôle environnemental, contrôle des dispositifs médicaux) [5]. Cela implique de garantir un approvisionnement suffisant en produits de santé financièrement abordables, sûrs et efficaces, et de les employer pour le triage des patients [7].

On remarque que le triage des patients à l'aide d'outils diagnostiques est au cœur du dispositif. Dans le cadre de la thèse, l'outil diagnostique à fournir doit donc s'ancrer dans ces objectifs de santé mondiale de coût, disponibilité, rapidité et précision.

1.1.3. Enjeux liés à la prise en charge clinique des infections

La présentation clinique la plus commune d'une infection est systémique : la fièvre, c'est-à-dire une température corporelle supérieure à 38°C. Certains patients infectés peuvent, à l'inverse, être plutôt en situation d'hypothermie (température corporelle inférieure à 36,5°C) comme c'est le cas lors de graves septicémies [8].

La plupart des maladies infectieuses augmentent le pouls proportionnellement à l'importance de la fièvre (bradycardie relative). Une hypotension peut être plutôt le résultat d'un choc septique ou d'un choc toxique. Des altérations de la conscience peuvent aussi survenir en cas d'infection sévère, et peuvent entraîner de l'anxiété, un syndrome confusionnel, voire des convulsions ou un coma.

Le plus souvent, la pathologie s'accompagne de manifestations locales qui peuvent se développer dans de multiples organes, notamment aux niveaux :

- Respiratoires : toux, crachats, dyspnée, détresse respiratoire aigüe ;
- Digestifs : diarrhées, vomissements, douleurs abdominales, dysfonctionnements hépatiques, ulcères ;
- Neurologiques : céphalées, méningites ;
- Cutanés : lésions, rougeurs ;
- Urinaires : brûlures mictionnelles, insuffisance rénale aigüe.

Certaines de ces manifestations, si elles se généralisent, peuvent mettre en jeu le pronostic vital du patient, comme en cas de sepsis ou choc septique. Le sepsis est la complication la plus courante des maladies infectieuses, car il s'agit de la réponse immunitaire disproportionnée de l'organisme au processus infectieux, pouvant conduire à une immunodépression, de multiples défaillances d'organes, voire à la mort du patient [9,10]. La sévérité de la pathologie infectieuse et son évolution en sepsis dépend de nombreux facteurs, allant de la nature du pathogène responsable de l'infection à l'état du système immunitaire de l'hôte [11]. Il existe d'ailleurs une classification de l'évolution en sepsis en fonction de la sévérité de l'infection (tableau 3).

Tableau 3 : Classification du sepsis. Différents stades d'évolution des pathologies infectieuses en états de sepsis (Tiré de [11]).

Classification	Paramètres
Syndrome de Réponse Inflammatoire Systémique (SIRS)	Température corporelle >38°C ou <36°C Fréquence respiratoire ≥90 battements par minute Respirations ≥ 20/minute (ou Pression artérielle en CO_2 <32 mmHg) Compte de leucocytes ≥ 12 000/µL ou ≤ 4 000/µL ou >10% de cellules immatures
Sepsis	Au moins deux critères SIRS associés à un point d'appel infectieux suspecté
Sepsis sévère	Sepsis avec dysfonctionnement organique aigu
Choc septique	Sepsis avec hypotension ou hypoxie tissulaire, persistante ou réfractaire, malgré une réanimation hydrique appropriée
Syndrome de dysfonctionnements organiques multiples	Présence de dysfonctionnement organique dans un patient malade aigu tel que l'homéostasie ne peut être maintenue sans intervention médicale

Le sepsis et ses différents stades restent plus souvent associées à des maladies systémiques résultants de la colonisation d'un pathogène bactérien [9]. Sa détection avec des outils diagnostiques et son traitement avec des antibiotiques sont des éléments clés pour réduire considérablement la mortalité liée au sepsis.

La résolution d'une pathologie infectieuse et éviter son évolution en état de sepsis dépend donc d'un traitement efficace de l'infection sous-jacente et de l'orientation du patient vers un service adapté. Une thérapie est adaptée lorsqu'elle est débutée précocement et qu'elle tient compte de l'étiologie virale, bactérienne ou autre de l'infection. Néanmoins, les données de la littérature rapportent la complexité de l'orientation diagnostique pour identifier la cause d'une infection et donc des délais de mise en œuvre des traitements spécifiques [12] (Figure 1).

Des éléments diagnostiques sont donc nécessaires le plus rapidement possible, comme a pu le rapporté P. Ray et ses collaborateurs, puisque l'erreur diagnostique s'avère lié à une surmortalité au sein des patients [13]. L'intégration de la démarche clinique s'avère évidemment essentielle dans l'identification de l'étiologie infectieuse [14], mais malheureusement souvent non suffisante : « *Malheureusement, les signes des maladies infectieuses sont presque tous les mêmes : fièvre, maux de tête, agitation ou stupeur, éruption. Seuls leur groupement, leur succession, une observation minutieuse ont pu, après de longs tâtonnements, permettre d'établir des tableaux symptomatiques particuliers et les distinguer entre eux* » (Charles Nicolle, bactériologiste français, 1933 – [15]). Des tests biologiques complémentaires sont donc proposés et nécessaires depuis des décennies pour supporter ou orienter cette démarche clinique.

La mise en œuvre rapide d'investigations cliniques et de tests diagnostiques pour identifier les causes de l'infection des patients conduit nécessairement à de meilleures qualité des soins et orientation du traitement.

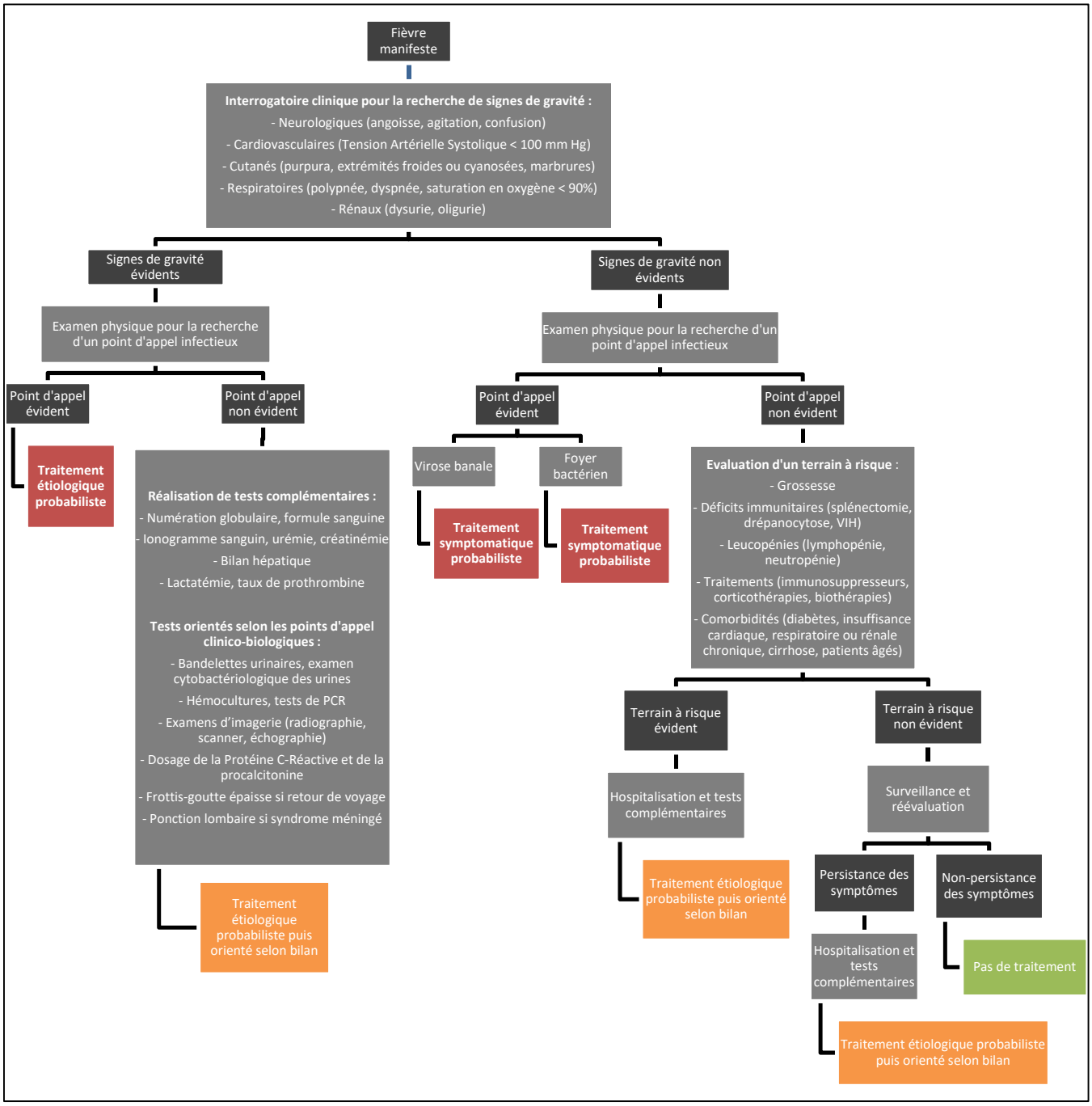


Figure 1 : Démarche clinique diagnostique en cas de pathologies fébriles. *Arbre décisionnel non-exhaustif du diagnostic d'un patient fébrile, établi suite à un interrogatoire rigoureux, un examen physique complet, et éventuellement des tests complémentaires. Ce diagnostic oriente les soins du patient et son traitement, trop souvent probabiliste (en rouge), ou corrigé seulement après les résultats des tests (en orange). Les cas où un patient ne reçoit finalement aucun traitement (en vert) sont rares car doivent avoir été examinés pendant plusieurs jours et démontré une absence totale de persistance de symptômes infectieux (Adapté de* [16]*) – PCR : Réaction en Chaîne de la Polymérase ; VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine.*

1.1.4. Enjeux liés au traitement des infections

Les antibiotiques ont constitué un miracle moderne de la médecine pour le traitement des infections bactériennes, qui représentaient encore seulement au siècle dernier une menace mortelle considérable [17]. Il existe de nombreux antibiotiques différents, qui ont chacun un mécanisme d'action spécifique. Ils agissent ainsi sur un certain type de bactérie, dans un certain environnement. La prescription d'antibiotiques est nécessairement faite par un médecin et repose sur un diagnostic précis pour identifier le germe impliqué et le traitement le plus adapté.

En référence à la pénicilline qu'il a découverte en 1928, et qui a été dévoilée au public en 1943, Fleming avertissait cependant en 1946 que [18] : « *Le public demandera [des antibiotiques et] … alors commencera … une ère d'usage abusif. Les micro-organismes seront éduqués à résister à la pénicilline … [et dans ces cas] les personnes qui contracteront une septicémie ou une pneumonie ne seront plus sauvées par la pénicilline. Dans ces cas, le personnel qui se sera amusé avec ce traitement à la pénicilline sera responsable moralement de la mort de ces hommes qui succomberont à leur infection par des micro-organismes résistants à la pénicilline*». Cette problématique, soulevée par Flemming, est aujourd'hui considérée comme une crise mondiale (Figure 2).

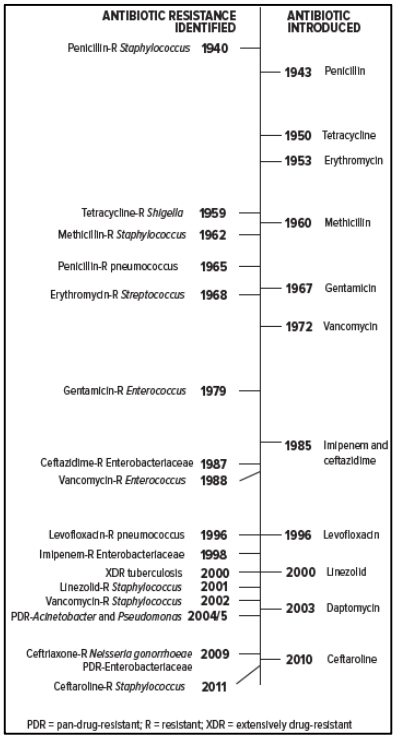


Figure 2 : Le développement de l'antibiorésistance. *Succession des étapes clés de mise en place de l'antibiorésistance (« Antibiotic Resistance Identified ») en fonction des molécules d'antibiotiques mises et utilisées sur le marché (« Antibiotic Introduced ») (Tiré de* [17]*).*

Actuellement, les infections bactériennes sont redevenues une menace incurable, du fait que les micro-organismes sont devenus résistants au fur et à mesure que les molécules d'antibiotiques ont été introduites. Aussi, de nouvelles molécules, qui pourraient pallier à cette antibiorésistance des micro-organismes, ne sont pas introduites sur le marché en raison des réglementations et des enjeux économiques que demande leur développement [17].

L'utilisation inappropriée des antibiotiques en traitement des infections virales, fongiques ou parasitaires contribue aussi à cet enjeu majeur de santé publique qu'est l'antibiorésistance. Le traitement est inutile car les virus utilisent la machinerie des cellules de l'hôte pour se développer, et les parasites et les champignons ont une machinerie propre, totalement différente de celle des bactéries. Leur utilisation dans ces pathologies contribue à faire émerger des souches de bactéries résistantes en exerçant une pression de sélection forte sur les micro-organismes résidents [19]. L'antibiorésistance est ainsi le résultat d'une utilisation des antibiotiques trop fréquente, mal dosée, mal suivie, ou simplement inutile, depuis leur introduction dans les pays industrialisés il y a plus de 80 ans.

Dans les pays en voie de développement, c'est l'accès non-contrôlé aux antibiotiques qui a fait émerger la problématique de l'antibiorésistance. Cette résistance liée à un mauvais emploi des antibiotiques est ainsi une problématique mondiale, d'autant plus que les germes résistants se disséminent très rapidement dans le monde entier.

On notera enfin que l'antibiorésistance mondiale est accrue à cause de l'emploi de plusieurs antibiotiques dans l'élevage, qui devient de ce fait source de contamination alimentaire et source supplémentaire de pollution environnementale, laquelle est donc à son tour source de contamination orale ou cutanée pour les individus humains.

Un patient résistant aux antibiotiques a une durée de sa pathologie infectieuse significativement plus longue, un taux de mortalité significativement plus élevé, des coûts de traitement plus élevés, et une impossibilité à recevoir des soins classiques pour prévenir son infection ; par exemple il devient très difficile de faire une procédure de chirurgie, de transplantation ou de chimiothérapie chez un patient résistant. Environ 25 000 personnes meurent chaque année en Europe de pathologies résistantes aux antibiotiques. En 2005 aux Etats-Unis, près de 94 000 infections résistantes ont été recensées et ont requis une hospitalisation, provoquant plus de 19 000 morts [20].

Malgré cette problématique, la consommation mondiale d'antibiotiques reste en hausse (figure 3), et leur production continue à s'élèver à près de 100 000 à 200 000 tonnes chaque année.

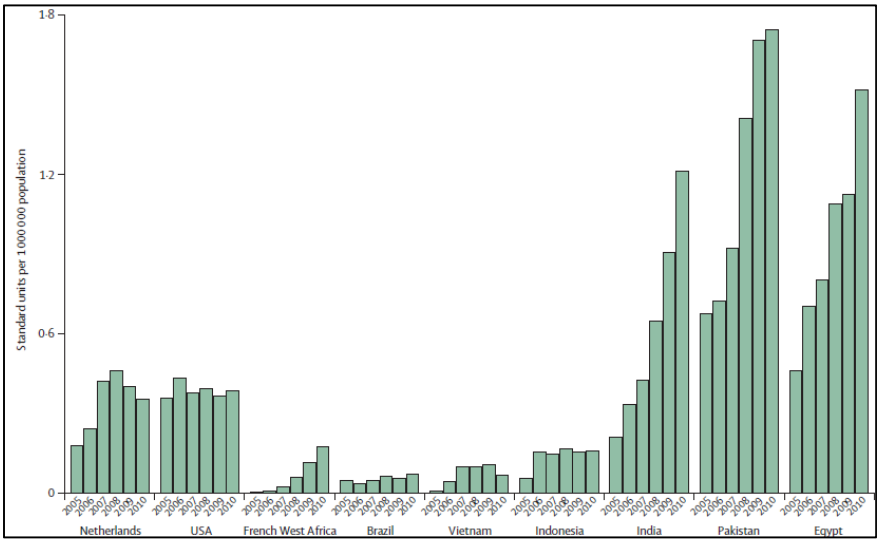


Figure 3 : Tendances des ventes d'antibiotiques Carpabénèmes pour les bactéries à Gram négatif. *Données de 2005 à 2010 pour les Pays-Bas, les Etats-Unis, Afrique de l'Ouest Française, le Brésil, le Vietnam, l'Indonésie, l'Inde, le Pakistan et l'Egypte (Adapté de* [20]*).*

La France, par exemple, avait l'un des plus forts taux de consommation en Europe en 2002, avec une dose d'antibiotiques quotidienne de 36,5 pour 1 000 habitants. La prescription d'antibiotiques a cependant diminué de 21% entre 2000 et 2009 après adoption d'un programme national ambitieux [18]. En effet, les pays qui ont tenté d'adopter des stratégies nationales ont réussi à contrôler les résistances aux antibiotiques. Ces stratégies incluent notamment, mais ne sont pas restreintes à [20] :

- Des infrastructures de santé et un système de santé accessibles à tous ;
- Une publicité limitée sur les médicaments ;
- La surveillance de la prise d'antibiotiques par l'Homme, mais aussi par les animaux ;
- Une politique standardisée pour le contrôle de l'infection avec suffisamment de ressources médicales ;
- Des programmes d'intendance dans les établissements de santé ;
- L'isolement et la décontamination des patients atteints de micro-organismes résistants.

Aux Etats-Unis, par exemple, où l'adoption de ces mesures reste encore inefficace, le contrôle de l'usage des antibiotiques sauverait potentiellement 18 000 vies et 1,8 milliard de dollars par an [18].

Au final, l'antibiorésistance est un phénomène naturel et inévitable, mais son développement mondial est accru par une mauvaise utilisation des antibiotiques. Cette situation n'est pas irréversible, et un meilleur diagnostic peut participer à son amélioration. L'utilisation du dosage de la procalcitonine pour guider l'antibiothérapie a permis, par exemple, de réduire l'utilisation totale des antibiotiques de 51% sur une cohorte de près de 1 500 patients, sans en affecter leur état de santé final [18].

L'identification de l'origine de l'infection est donc essentielle pour réduire l'usage d'antibiotiques inutile pour le patient et dangereux pour la société.

1.1.5. Solutions actuelles pour le diagnostic des infections

Pour diagnostiquer une maladie infectieuse, il est possible de chercher à détecter ou bien l'agent pathogène lui-même, ou bien l'un des acteurs de la réponse immunitaire de l'hôte face à cet agent.

Identification directe des pathogènes

La culture bactérienne, les méthodes immunologiques basées sur la reconnaissance d'antigènes, et les tests moléculaires de multiplexage sont les tests traditionnels spécifiques pour identifier l'agent infectieux.

La culture microbiologique peut s'appliquer à des échantillons infectieux divers que sont le sang, les urines, le pus, les liquides de ponction, les expectorations et les selles. La plupart des espèces se cultive en 18 à 24 heures, mais certaines espèces peuvent se développer sur des temps beaucoup plus longs (pour *Mycobacterium tuberculosis,* temps moyen de 21 jours).

Dans le cas de la reconnaissance d'antigènes, par exemple de streptocoques, les méthodes immunologiques peuvent être immuno-chromatographiques (Streptotest : sensibilité de 86% et spécificité de 96%), optiques (sensibilité de 67% et spécificité de 90%) ou bien basées sur des enzymes (sensibilité de 86% et spécificité de 92%) [21].

Enfin, parmi les tests de multiplexage, le Panel Respiratoire BIOFIRE FILMARRAY, par exemple, est capable de détecter simultanément par PCR en 1h près de 18 virus et 4 bactéries responsables d'infections respiratoires, avec une sensibilité de 95% et une spécificité de 99% [22].

Ils sont cependant limités par leur long temps de réponse, leur coût qui augmente proportionnellement avec le nombre de cibles à détecter, leur accès au site infectieux (par exemple, trois tests FILMARRAY différents sont utilisés pour les prélèvements pulmonaire, sanguin ou urinaire), et la grande diversité de l'univers microbiologique en constante évolution [23–25]. De plus, cet isolement du pathogène par culture, antigénurie ou PCR est incapable de discriminer entre un état de colonisation ou un état local de l'infection [21]. Enfin, l'adoption par le personnel de santé reste un écueil notable [26]: le Streptotest est disponible gratuitement depuis des années pour les médecins, mais son utilisation reste controversée. Le gouvernement a donc décidé d'autoriser les pharmaciens à réaliser ce test à partir de 2020.

Pour contourner ces limites et/ou complémenter ces approches, l'évaluation de biomarqueurs de l'hôte s'est avérée être utile, d'autant plus que leur niveau d'expression reflète de manière simple et objective l'activité de la pathologie infectieuse. Plusieurs biomarqueurs sont aujourd'hui fréquemment évalués, d'autant plus qu'ils témoignent non seulement de l'infection mais aussi de sa résolution. Certains marqueurs de l'hôte, avec des performances intéressantes pour le diagnostic infectieux et/ou du sepsis, sont recensés en Tableau 4.

Tableau 4 : Exemples de marqueurs solubles de l'hôte. *Exemples non exhaustifs de biomarqueurs de l'hôte utilisés pour le diagnostic infectieux et/ou du sepsis (Adapté de* [27,28]*) – WBC : White Blood Cells ; PMN : Polymorphonuclear Cells ; RBC : Red Blood Cells ; ROS : Radical Oxygen Species ; PCT : Procalcitonin ; CRP : C-Reactive Protein ; MxA : Myxovirus Resistance Protein A ; HNL : Human Neutrophil Lipocalin ; PLA2-II : Phospholipase A2 ; IL : Interleukines ; IFN : Interferon ; IP-10 : Interferon γ - Inducible Protein-10 ; MIF : Macrophage migration inhibitory factor ; MIP : Macrophage inflammatory protein ; MCP : Monocyte chemotactic protein ; TNF : Tumor Necrosis Factor, TRAIL : Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis-Inducing Ligand ; G-CSF : Granulocyte Colony-Stimulating Factor ; GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor ; VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor ; ELAM-1 : Endothelial Leucocyte Adhesion Molecule-1 ; VCAM : Vascular Cell Adhesion Molecule ; vWF : von Willebrand Factor ; ANP : Atrial Natriuretic Peptide ; BNP : Brain Natriuretic Peptide.*

Catégorie de biomarqueurs	Biomarqueurs d'intérêt
Biomarqueurs hématologiques	Compte de cellules (WBC, PMN, Lymphocytes, RBC, Plaquettes) Hématocrite, Hémoglobine Sédimentation des éryhtrocytes
Biomarqueurs de l'activité métabolique	Glucose, Lactates ROS Urée Cholestérol
Biomarqueurs de la réponse inflammatoire	Inflammation (PCT, CRP, Néoptérine, Calprotectine) Marqueurs du complément (C3, C4, C5a) Réponse antimicrobienne (MxA, HNL) Homéostasie (Lactoferrine, Ferritine) Lipides (PLA2-II)
Cytokines	Interleukines (IL-6, IL-8, IL-10) Interférons (IFNα, IFNγ) Chémokines (IP-10) Protéines monocytaires (MIF, MIP, MCP) Facteurs de nécrose (TNF, TRAIL) Facteurs de croissance (G-CSF, GM-CSF, VEGF)
Biomarqueurs vasculaires	Antithrombine Protéines C et S ELAM-1, L-sélectine Adrénomedulline, pro-adrénomedulline Copeptine VCAM, vWF
Biomarqueurs de dysfonctionnement organique	ANP, BNP

Biomarqueurs de l'hôte utilisés en routine

Les biomarqueurs de l'hôte le plus souvent évalués sont le nombre de cellules sanguines blanches (White Blood Cells - WBC), le nombre de polymorphonucléaires (PMN), le niveau de Protéine C-Réactive et le niveau de Procalcitonine.

Le compte de cellules blanches est un marqueur qui a de hautes valeurs de sensibilité (72,7%) et spécificité (83,2%), pour un seuil supérieur à 15 000 cellules/µL, pour identifier les patients présentant une infection [24]. Le compte de PMN est un marqueur qui a de meilleurs performances de discrimination à un seuil supérieur à 10 000 cellules/µL (sensibilité : 56,6 – 79,7% ; spécificité : 89,6 – 96,3%) [24] et qui corrèle même fortement avec le diagnostic d'un sepsis lors de son apparition [29].

Cependant, même si ces marqueurs hématologiques sont utilisés en routine pour aider au diagnostic infectieux, leurs performances restent affectées négativement par la variabilité inter-patient, dont notamment le début et le type des symptômes, et le type de pathogènes [30].

D'autres marqueurs d'inflammation solubles qui améliorent significativement le diagnostic infectieux sont la PCT à un seuil supérieur à 0,5 ng/mL et la CRP à un seuil supérieur à 40 mg/L [23,24,31,32]. Leurs niveaux ont été démontrés comme statistiquement différents entre les patients avec et les patients sans infection bactérienne, respectivement avec des valeurs pour la PCT de sensibilité à 38-97% et de spécificité à 31-100% [33–37], et pour la CRP de sensibilité à 61,2-100% et de spécificité à 26-100% [38–41].

Une riche littérature scientifique porte ainsi sur l'intérêt de la Procalcitonine pour le diagnostic infectieux et ce biomarqueur est l'un des plus répandus. Cependant, sa positivité peut orienter vers un syndrome infectieux bactérien ou fongique (donc manque de spécificité) et il ne répond que par sa négativité à la possibilité d'une infection virale [42]. De plus, La PCT est spécifique des cas de sepsis ou sepsis sévères systémiques, et n'est que peu révélatrice des infections bactériennes localisées [43]. Ainsi malgré son intérêt et sa généralisation dans la détection précoce des syndromes infectieux, un manque de spécificité est rapporté au sein de la littérature [44].

La CRP présente les mêmes limitations avec une spécificité plus basse encore. En effet, la CRP est un marqueur très sensible de l'inflammation, qui manque donc de spécificité, et a donc une utilité limitée dans les cas infectieux [45]. Même, il a été montré que la plupart des virus pouvait faire augmenter la CRP [21].

La combinaison de ces deux biomarqueurs a également été étudiée en pédiatrie avec des résultats non concluants [46]. Leur capacité diagnostique est ainsi régulièrement remise en cause, comme dans le cas de détection de pneumopathie chez les patients admis en service d'urgence [47].

Enfin, d'autres marqueurs métaboliques, tels que le glucose ou les lactates, sont aussi largement utilisés, mais leurs plus faibles performances de discrimination font qu'ils sont considérés plutôt en complément d'autres marqueurs [27].

Biomarqueurs de l'hôte au stade de la recherche

Des équipes scientifiques ont donc fait l'effort de se concentrer sur la recherche de nouveaux biomarqueurs de l'hôte.

Des marqueurs solubles plus fréquemment mesurés maintenant sont par exemple les cytokines comme l'interleukine (IL)-6 (spécificité : 82,3-97,1% ; sensibilité : 50-64,3%) et l'IL-8 (spécificité : 67,2-94% ; sensibilité : 82,5-100%) [30,48]. L'IP-10 (*Interferon γ - Inducible Protein-10*) et le TRAIL (*Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis-Inducing Ligand*) sont aussi des protéines solubles qui, combinées avec la CRP, ont démontré une capacité à distinguer les infections bactériennes et virales avec une sensibilité de 93,8% et une spécificité de 89,8% [23,24,30,31]. La protéine soluble MxA (*Myxovirus Resistance Protein A*), dérivée des interférons (IFN) α et β, a été étudiée dans les cas d'infections virales et a montré des valeurs de sensibilité à 80-87% et de spécificité à 83-93% lorsqu'elle était associée avec la CRP [21,49]. L'HNL (*Human Neutrophil Lipocalin*) est titrée dans le sang total pour donner une discrimination plus précoce que la CRP et la PCT et avec des valeurs de sensibilité et spécificité supérieures à 90% [50,51]. Enfin, des signatures de transcription ou des biomarqueurs vasculaires sont encore à l'étude [27].

De nombreux autres biomarqueurs sont donc constamment évalués sans qu'un consensus se dégage quant à un apport significatif dans les processus de triage initiaux des patients infectés [52]. Notamment, l'association de la mesure de plusieurs biomarqueurs de façon simultanée implique des techniques de mesure différentes et un temps de rendu des résultats qui ne sont pas souvent compatibles avec les nécessités de ce triage [31]. Leurs valeurs prédictives négatives paraissent souvent intéressantes, mais leur manque de spécificité ne permet pas toujours une orientation diagnostique correcte de ces patients [53]. De plus, certaines voies prometteuses, comme l'HNL, restent mono paramétriques pour les infections bactériennes, comme le sont la PCT ou la CRP [50,51].

Une revue générale et complète sur ce sujet de recherche précise qu'il persiste de nombreuses incertitudes quant à l'intérêt et la fiabilité de nombreux biomarqueurs, et qu'il y a définitivement un manque de tests de diagnostic étiologique. Ce manque a été reconnu en médecine comme un besoin urgent à résoudre, encouragé régulièrement par des appels d'offre européens et nord-américains [54].

Les biomarqueurs cellulaires « non-solubles » de l'hôte, qui, même s'ils sont moins fréquemment étudiés, semblent présenter des performances intéressantes pour discriminer les étiologies infectieuses [27].

Il existe donc toujours une recherche intense de biomarqueurs pour le triage en médecine infectieuse. Ces recherches sont toutes encore à un stade développement, et malgré tous ces efforts, il n'y a pas encore de solution validée.

Conclusion 1.1

Les maladies infectieuses sont des pathologies complexes qui posent des enjeux importants de santé publique, pour leur prévention, leur prise en charge clinique, et leurs traitements avec recours possible aux antibiotiques. La problématique mondiale d'émergence de résistances demande d'avoir recours à des méthodes de diagnostic de plus en plus fiables et précises pour identifier le pathogène responsable de l'infection, et ce afin d'orienter au mieux le triage, le soin et le traitement de ces patients. Dans le cadre de la thèse, nous avons donc choisi d'étudier des biomarqueurs de diagnostic « non-solubles », présents à la surface des cellules de la réponse immunitaire anti-infectieuse. Notre hypothèse était qu'étant des témoins directs de la défense du système contre les micro-organismes, leurs performances diagnostiques seraient supérieures à celles des tests et dosages déjà étudiés en routine clinique.

1.2. La réponse immunitaire aux infections chez l'Homme

1.2.1. Généralités sur le système immunitaire de l'Homme

Au cours des cinquante dernières années, les concepts de base de l'immunologie ont très fortement évolué, en passant d'une immunologie essentiellement basée sur la discrimination du soi et du non-soi, à une reconnaissance du danger initiée par les cellules de l'immunité innée et permettant l'activation de l'immunité adaptative face à une multitude d'antigènes [55]. Un organisme aussi diversifié que l'Homme possède un système de défense pour lutter contre les agresseurs potentiels ou de se protéger contre un agresseur qui vient de l'intérieur. La lutte pour la survie de l'espèce a conduit à une sélection des mécanismes de protection les mieux adaptés. Les régulations et mécanismes effecteurs du système immunitaire, impliqués dans la lutte contre les pathologies infectieuses, sont développés en fonction des agents responsables de ces pathologies : bactéries, virus, champignons, vers, eucaryotes unicellulaires. On estime à 1400 espèces le nombre d'espèces pathogènes pour l'Homme, nécessitant la spécialisation et la plasticité du système immunitaire, sachant que n'est même pas prise en compte la multitude d'espèces qui est correctement et silencieusement contenu par le système immunitaire.

Lors d'un événement infectieux, les micro-organismes sont d'abord arrêtés par les barrières naturelles de l'organisme (peau, muqueuses). En cas de franchissement de ces barrières, deux stratégies distinctes mais interdépendantes sont mises en place chez l'Homme (Tableau 5).

Tableau 5 : Acteurs de la réponse immunitaire. *Acteurs cellulaires et moléculaires des réponses immunitaires innées et adaptatives mises en place par l'organisme en réponse à une infection (Adapté de* [55]*) – NK : Natural Killer ; PRR : Pattern Recognition Receptor ; BCR : B cell Receptor ; TCR : T cell Receptor ; CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité.*

Acteurs immunitaires	Immunité innée	Immunité adaptative
Cellules impliquées	Phagocytes *(Monocytes/Macrophages, Neutrophiles, Cellules Dendritiques)* Cellules cytotoxiques *(Cellules NK)* Cellules épithéliales non-immunitaires	Lymphocytes B *(Immunité à médiation humorale)* Lymphocytes T *(Immunité à médiation humorale et cellulaire)*
Récepteurs membranaires	PRR	BCR, TCR, CMH
Molécules sécrétées	Complément Cytokines Médiateurs solubles de l'inflammation	Anticorps Cytokines

La première stratégie fait référence au fait que tous les individus sains disposent d'une immunité naturelle qui est prête à bloquer l'entrée des micro-organismes et à éliminer rapidement ceux qui auraient réussi à envahir les tissus [56]. Cette défense est liée à l'expression de gènes codant pour des récepteurs appelés « PRR » (*Pattern Recognition Receptors*), capables de reconnaître de manière spécifique un nombre déterminé de motifs moléculaires conservés des micro-organismes (*Pathogen Associated Molecular Pattern - PAMP*) ou de motifs liés à un stress cellulaire (*Damage Associated Molecular Pattern - DAMP*) ; il s'agit du principe de reconnaissance de l'immunité innée [55].

La seconde est une immunité acquise, qui requiert l'expansion et la différenciation de lymphocytes en réaction aux agents pathogènes, avant de pouvoir assurer une défense efficace [56]. Ce système est plus tardif, mais plus spécialisé et puissant car il génère aléatoirement une variété considérable de récepteurs, permettant de reconnaître un panel quasi-infini de ligands microbiens. Ce sont les récepteurs de l'immunité adaptative.

La première ligne de défense à la suite d'un événement infectieux reste le système immunitaire inné. L'immunité naturelle est constituée par les barrières épithéliales, des cellules spécialisées et des antibiotiques naturellement produits par les épithéliums. Leur fonction est d'empêcher les micro-organismes de traverser les épithéliums [56]. S'ils arrivent à pénétrer les tissus et la circulation, ils sont attaqués par les phagocytes (neutrophiles et macrophages), les cellules lymphoïdes innées (ILC) dont les cellules tueuses naturelles (*Natural Killer - NK*) et des protéines plasmatiques, telles que les protéines du système du complément. Ces mécanismes assurent une défense précoce de l'organisme contre les agents infectieux (figure 4).

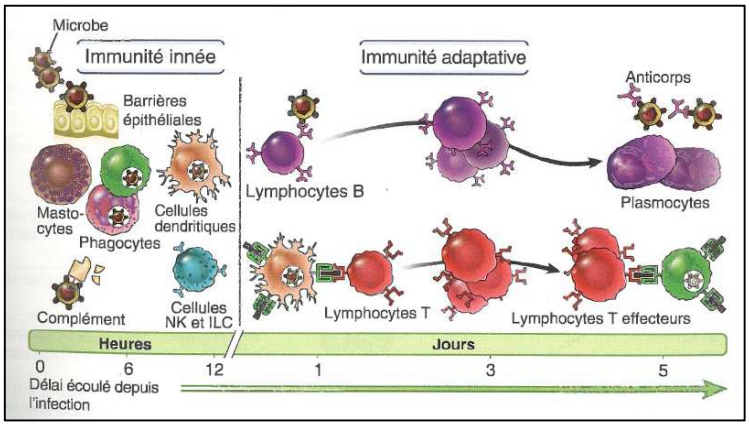


Figure 4 : Mécanismes de l'immunité innée et adaptative. *Les mécanismes de l'immunité naturelle assurent la défense initiale contre les infections : les barrières épithéliales empêchent les infections, tandis que les phagocytes, les cellules NK (Natural Killer), d'autres cellules lymphoïdes innées (ILC) et le système du complément éliminent les microbes. Les réponses immunitaires adaptatives se développent plus tardivement, et sont assurés par les lymphocytes et leurs produits. Les cinétiques des réponses immunitaires naturelles et adaptatives sont des approximations et peuvent varier en fonction des infections (Tiré de* [56]*).*

Les cellules du système immunitaire inné colonisent tous les tissus pour maintenir un état de préparation. La reconnaissance des PAMP ou DAMP microbiens par les récepteurs PRR des cellules innées, conduit à l'expression des mêmes voies de signalisation chez l'hôte, quel que soit le micro-organisme, pour participer au déclenchement des processus de l'inflammation et l'initiation de la réponse adaptative (Figure 5).

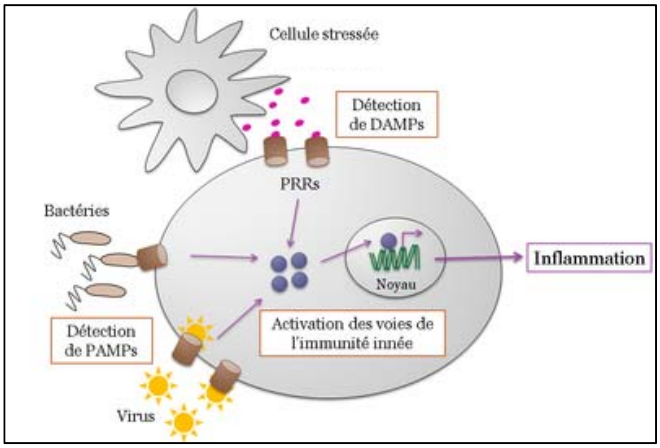


Figure 5 : Reconnaissance de l'infection par le système immunitaire. *Vue simplifiée de l'interaction entre les PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern) des micro-organismes (bactéries ou virus) ou les DAMP (Damage Associated Molecular Pattern) des cellules infectées (« stréssées »), avec les PRR (Pattern Recognition Receptor) des cellules immunitaires innées de l'hôte, pour le déclenchement de la réponse immunitaire anti-infectieuse (Tiré de* [57]*).*

De nombreux PRR convergent vers l'activation de facteurs de transcription de 2 familles : IRF (*Interferon Regulatory Factor*) et NF-κB (*Nuclear Factor-kappa B*) [55]. Les IRF permettent l'expression des interférons de type I (IFN I), importants pour la réponse anti-virale. L'activation de la voie NF-KB induit l'expression de cytokines pro-inflammatoires, permettant le recrutement et l'activation d'effecteurs cellulaires (phagocytes, mastocytes, lymphocytes), et de molécules de co-stimulation, aidant les cellules dendritiques à initier une réponse adaptative. Les cellules dendritiques transportent en effet des micro-organismes entiers ou fragmentés, ou d'autres sources d'antigènes, qu'elles vont présenter à leurs surfaces directement aux lymphocytes B, ou internalisés et associés sous forme de peptides aux complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) pour les lymphocytes T.

Des différences restent néanmoins observables selon la nature du micro-organisme causal (virus, bactérie, parasites), sa localisation (intracellulaire, extracellulaire) et son mode de transmission (verticale, entre espèces ; horizontale, entre individus ; par voie aérienne ; par piqûre ; etc.).

Dans le cadre de la thèse, il est important de comprendre les mécanismes effecteurs du système immunitaire pour identifier des acteurs impliqués dans les réponses immunitaires antibactérienne et antivirale. La thèse se concentre seulement sur la réponse induite par les cellules immunitaires innées, constituant la première ligne précoce de défense du système immunitaire contre les micro-organismes. Plus particulièrement, il a été important de se concentrer sur l'étude de biomarqueurs cellulaires exprimés par ces cellules immunitaires naturelles, et d'en étudier les différences selon le pathogène mis en cause.

1.2.2. Le système immunitaire dirigé contre les bactéries extracellulaires

Les bactéries extracellulaires sont des pathogènes pouvant provoquer une inflammation locale (au niveau respiratoire, digestif ou des méninges) ou systémique, néfaste pour l'organisme. Les symptômes associés à ce type de pathogènes sont liés à leur production de toxines puissantes, dont les effets sont liés directement à l'activité des toxines produites, et indirectement, à l'inflammation forte associée. Une liste non exhaustive de bactéries extracellulaires est donnée en tableau 6.

Tableau 6 : Exemples de bactéries extracellulaires. *Le germe infectieux, sa localisation, sa voie de transmission, sa toxine produite et ses effets dans l'organisme sont détaillés pour chaque exemple de pathogènes (Adapté de* [55]).

Infection	Germe infectieux	Localisation	Transmission	Toxine	Effets
Choléra	*Vibrio cholerae*	Intestins	Orale	Toxine cholérique	Hyper activation des entérocytes perte des nutriments, diarrhées, sévère déshydratation
Diphtérie	*Corynebacterium diphteriae*	Muqueuses, peau, cœur, système nerveux périphérique	Homme	Toxine diphtérique	Inhibition du processus de traduction, ulcère des amygdales, aphonie, mort par suffocation
Botulisme	*Clostridium botulinum*	Intestins	Orale	Toxine botulinique	Perturbation de la transmission des signaux neuronaux
Coqueluche	*Bordetella pertussis*	Tractus respiratoire	Respiratoire	Toxine pertussique	Destruction des cellules ciliées, accumulation de mucus, inflammation locale, augmentation du nombre de lymphocytes
Méningite	*Neisseria meningitidis*	Méninges enveloppant le cerveau et la moelle épinière	Homme	Endotoxine	Inflammation du cerveau

Les bactéries extracellulaires portent des PAMP conservés qui sont détectés par des PRR de surface transmembranaires des cellules immunitaires innées (tableau 7).

Tableau 7 : **Récepteurs transmembranaires de reconnaissance des bactéries extracellulaires.** *Localisation, famille et type de récepteurs impliqués dans la reconnaissance d'un ligand de bactérie extracellulaire (Adapté de* [55]*) – TLR : Toll Like Receptor ; CLR : C-Type Lectin Receptor ; PRR : Pattern Recognition Receptor ; PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern ; ADN : Acide Désoxyribonucléique.*

Localisation	Famille de récepteurs	Récepteur (PRR)	Ligand (PAMP)
Membrane plasmique	TLR	TLR2	Lipoprotéines, peptidoglycanes, glycolipides
		TLR4	Lipopolysaccharide
		TLR5	Flagelline
	CLR	Mincle	Lipide bactérien
		Dectine-1, Dectine-2	Peptidoglycanes
Endosome	TLR	TLR9	ADN bactérien

L'une des stratégies d'évasion des bactéries extracellulaires consiste à empêcher leur reconnaissance en dissimulant leurs PAMP ou en les modifiant [55]. Par exemple, elles se couvrent de molécules de l'hôte, sécrètent une capsule épaisse de sucres, produisent des hydrolases dégradant leurs peptidoglycanes, ou modifient la nature de leur lipopolysaccharide (LPS).

La reconnaissance des bactéries extracellulaires par le système immunitaire inné, et notamment par les monocytes/macrophages, entraîne classiquement le recrutement et l'activation des neutrophiles et une réponse de type T *helper* (Th) 17 [55].

Les monocytes patrouillent dans les vaisseaux sanguins. Leur nombre est compris entre 100 et 1 000 par µL de sang [56]. Au cours de l'inflammation, les monocytes peuvent être recrutés dans les tissus et s'y différencier en macrophages. Les macrophages sont les phagocytes résidents dans les tissus, qui jouent un rôle important dans les premiers stades de destruction des bactéries.

Par exemple, le Récepteur *Toll-Like* (TLR)4 des macrophages reconnaît le LPS de la bactérie *Vibrio cholerae*. Cette reconnaissance induit la sécrétion de Facteur de Nécrose Tumorale (TNF)α, la production d'oxyde d'azote, et le recrutement de neutrophiles pour la destruction des bactéries. De manière intéressante, en parallèle, cette réponse importante est inhibée par les effets pathogènes de la toxine de *Vibrio cholerae* elle-même, qui diminue la production du TNFα et de l'oxyde d'azote par les macrophages, et augmente à l'inverse la production d'IL-10 pour contrecarrer la réponse de l'hôte.

Ces cellules tissulaires sont des sentinelles, détectant une perturbation de l'intégrité cellulaire, et répondant par phagocytose de l'élément perturbant l'intégrité tissulaire, par production de cytokines pro-inflammatoires et par initiation des réponses adaptatives [55]. Les macrophages peuvent survivre dans ces sites durant de longues périodes. Les monocytes et les macrophages sont importants car ce sont des cellules phagocytaires de la lignée myéloïde, pouvant induire ou moduler l'inflammation ou sa résolution, et présenter l'antigène dans certaines circonstances.

Il existe justement trois classes de monocytes, qui diffèrent dans leurs fonctions cellulaires et homéostatiques, et notamment car ils expriment différents marqueurs en surface : les monocytes classiques portent le CD14 mais pas le CD16 ($CD14^+$ $CD16^-$), les monocytes intermédiaires expriment le CD14 et le CD16 ($CD14^+$ $CD16^+$), et les monocytes non classiques expriment moins fortement le CD14 mais expriment toujours le CD16 ($CD14^{dim}$ $CD16^+$) (figure 6) [58]. En fait, les monocytes intermédiaires et non-classiques proviennent de la différenciation des monocytes classiques, qui sont les premiers produits après la pénétration d'un pathogène.

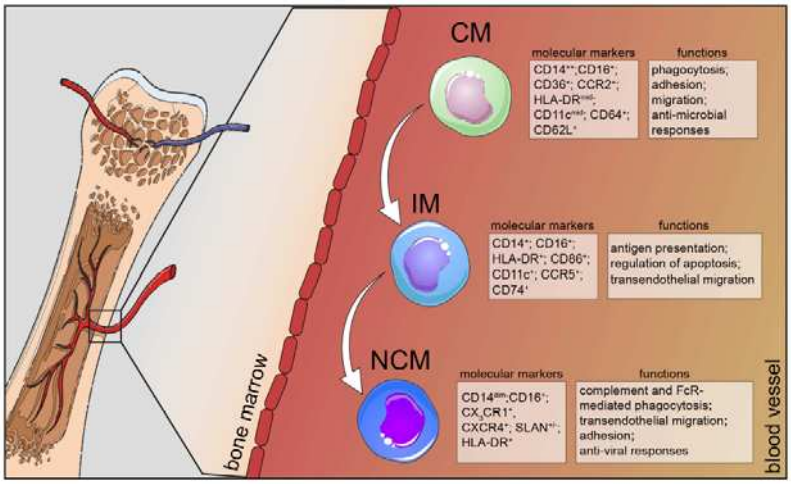


Figure 6 : Sous-unités de monocytes chez l'homme. Les monocytes matures présents dans la moelle osseuse (« *bone marrow* ») sont relargués dans la circulation sanguine (« *blood vessel* ») sous forme de monocytes classiques ($CD14^+$ $CD16^-$) (CM). Progressivement, ils donnent naissance à des monocytes non-classiques ($CD14^{dim}$ $CD16^+$) (NCM) via une étape intermédiaire en monocytes $CD14^+$ $CD16^+$ (IM). Les trois classes de monocytes diffèrent entre elles par les marqueurs qu'ils expriment (« *molecular markers* ») et les processus anti-microbiens auxquels ils prennent part (« *functions* ») (Tiré de [58]).

Les monocytes classiques sont spécialisés pour la reconnaissance du pathogène, la migration et la phagocytose, les monocytes intermédiaires pour la présentation d'antigènes, la sécrétion de cytokines et la différenciation, et les monocytes non-classiques pour l'adhésion et la phagocytose médiée via les récepteurs aux fragments cristallisables des anticorps (*Fragment cristallizable Receptor* - FcR) [58].

Plus précisément, les monocytes classiques jouent un rôle clé dans la réponse inflammatoire car ils ont l'abilité à se différencier en macrophages ou en cellules dendritiques, dérivés de monocytes. Les monocytes intermédiaires jouent un rôle clé pour les infections sytémiques et la défense rapide contre les micro-organismes car ils ont les niveaux les plus élevés de molécules de présentation et sécrètent des quantités importantes de cytokines. Enfin, les monocytes non-classiques sont favorables à l'adhésion des neutrophiles au site endothélial de l'infection, et certaines de leurs sous-unités sont aussi connues pour être des monocytes surexprimant les molécules de classe II après une infection virale.

Les monocytes et macrophages induisent le recrutement des neutrophiles, ou polymorphonucléaires (PMN). Il existe différentes classes de neutrophiles, avec une large variété de fonctions et de marqueurs de surface (tableau 8).

Tableau 8 : Sous-unités de neutrophiles. Différentes classes de neutrophiles, avec leurs marqueurs de surface et fonctions associés (Tiré de [59]).

Neutrophil subset	Immunophenotype	Functional properties
Mature/classic	HNA-1 (FcγRIIIb, CD16)	
	HNA-2 (CD177)	
	HNA-3 (CTL2)	
	HNA-4 (CD11b/CD18; Mac-1, CR3)	
	HNA-5 (CD11a/CD18)	
Long-living	HLA-DR, CD80, CD49d	IL-8, IL-1Ra, IL-1-β
Aged	$CD62L^{low}CXCR4^{high}CD11B^{high}CD49^{high}$	Phagocytosis, NETosis
N_{BR}		BAFF, APRIL
TCR^+	TCRαβ	IL-8 inhibition of apoptosis
PMN-I	TLR2/TLR4/TLR5/TLR8	IL-12, CCL3
	$CD49d^+CD11b^-$	
PMN-II	TLR2/TLR4/TLR7/TLR9	IL-10, CCL2
	$CD49d^-CD11b^+$	
PMN-N	TLR2/TLR4/TLR9	
	$CD49d^-CD11b^-$	
$mPR3^+$	$mPR3^{high}$	Outbreak or progression of chronic inflammatory
	$mPR3^+CD177^+$	Wegener's granulomatosis
CD177	High, low, negative expression	
LDNs	CD66b, $CD11b^+CD16^+$ and/or $CD11b^{low/-}CD16^{low/-}$	
LDNs/G-MDSCs	$CD66b^+CD15^+CD14^{-/dim}CD33^{dim}HLA\text{-}DR^-$	Immunosuppressive
LDGs	$CD15^+/CD14^{low}$, $CD10^+/CD14^{low}$, $CD16^{high}/CD86^-$	IFN-γ, TNF-α pro-inflammatory
Bone marrow-derived immature neutrophils	$CD10^{low/-}CD16^{low}$	
MDSCs	$CD11c^{low/hi}/CD62L^{dim}/CD11b^{low/hi}/CD16^{low/hi}$	Inhibition of T lymphocytes proliferation
MDSCs in cancer	$CD14^+$ $CD33^+$ HLA-DR^-	Inhibition of T lymphocytes function
N1	$CD11b^+Ly6G^+$	Anti-neoplastic activity
		CCL-3, CXCL9, CXCL10
		IL-12, TNF-α, GM-CSF
N2		Pro-neoplastic properties
		VEGF, MMP-9
Proangiogenic	$CXCR4^{high}/VEGFR1^{high}$	MMP-9

Les neutrophiles représentent près de 95% des granulocytes, et sont les leucocytes les plus nombreux du sang, leur nombre étant compris entre 4 000 et 10 000 par µL [56]. Ce sont des cellules circulantes à l'état basal, recrutées les premières sur un site d'inflammation. En réaction aux infections, leur production peut d'ailleurs augmenter rapidement et leur nombre peut atteindre 20 000 par µL de sang.

La première fonction des neutrophiles reste la phagocytose. Cette fonction est initiée par la reconnaissance d'une particule bactérienne grâce à un récepteur situé à la surface de la cellule phagocytaire. Les particules bactériennes reconnues le sont souvent via des opsonines, qui peuvent être ou bien des anticorps, ou bien des facteurs du complément, qui sont fixés sur l'élément à phagocyter. Les récepteurs des cellules innées impliqués sont donc surtout les récepteurs fixant des facteurs du complément ou bien des récepteurs fixant la partie constante des anticorps, les FcR.

La durée de vie des neutrophiles est cependant courte (1 à 5 jours) par rapport aux macrophages résidents, car leur activité est intense lorsqu'ils sont activés : en plus de leur activité phagocytaire, ils libèrent des granules, contenant notamment des peptides antimicrobiens, du lysozyme et des protéases, qui fusionnent avec les éléments phagocytés. L'activation des neutrophiles conduit aussi à la synthèse de dérivés oxygénés (*Radical Oxygen Species - ROS*). Enfin, un mécanisme d'expulsion de leur chromatine, appelé « NET » (*Neutrophil Extracellular Trap*), permet la neutralisation et la dégradation de micro-organismes contre lesquels la phagocytose est inefficace.

Enfin, il est important de noter que dans certaines pathologies infectieuses, notamment chroniques, la différenciation des cellules myéloïdes immatures de la moelle osseuse en monocytes ou en neutrophiles est altérée par l'environnement cellulaire, dont notamment la présence de certaines cytokines, et produit un sous-type cellulaire appelé les cellules myéloïdes régulatrices (*Myeloid-Derived Suppressor Cells* – MDSC), aux propriétés immunosuppressives [60]. Elles sont définies comme des MDSC monocytiques (M-MDSC) exprimant les marqueurs CD33 et CD14, mais un niveau bas d'HLA-DR, ou comme des MDSC granulocytiques (PMN-MDSC), $CD11b^{+}$ $CD14^{-}$ $CD33^{+}$ $CD15^{+}$. Les M-MDSC sont distinguées facilement des monocytes par leur expression faible de l'HLA-DR, alors que les PMN-MDSC sont différenciées difficilement des neutrophiles, par gradient de densité seulement.

Ces cellules sont décrites majoritairement car elles infiltrent les tissus, notamment les sites d'infection, où elles inhibent l'activité des lymphocytes T et NK, favorisant alors le développement des micro-organismes. Leur accumulation semble nécessiter deux types de signaux : une première catégorie de signaux activateurs de l'expansion des cellules myéloïdes immatures et de l'inhibition de leur différenciation, et une seconde catégorie de signaux responsables de leur activation pathologique. Ces signaux sont majoritairement exprimés en conditions de stress chronique, faisant que les MDSC restent dans un état d'activité fonctionnel différent des monocytes ou des neutrophiles dans la phase aigüe des infections.

Dans le cadre de la thèse, nous nous intéresserons aux populations de monocytes et aux neutrophiles, acteurs en phase aigüe des infections, et dans leur globalité, sans distinction de leurs sous-unités. Particulièrement, les neutrophiles sont l'une des premières lignes de défense face aux bactéries extracellulaires ; la thèse s'intéressera donc à l'étude de leurs biomarqueurs de surface. Notamment, les FcR étant des récepteurs de reconnaissance directe des particules bactériennes, nous étudierons précisément l'un d'eux, le CD64.

1.2.3. Le système immunitaire dirigé contre les bactéries intracellulaires

Les bactéries intracellulaires infectent les cellules hôtes et persistent à l'intérieur de celles-ci pour se protéger de l'effet des réponses immunitaires, échapper au stress du milieu extracellulaire et avoir un accès privilégié aux nutriments.

Il s'agit par exemple de la lèpre ou de la tuberculose (TB). Certaines bactéries intracellulaires sont capables de survivre dans le cytosol de la cellule, d'autres se développent à l'intérieur de vésicules après internalisation. La reconnaissance des PAMP des bactéries intracellulaires se fait alors grâce aux PRR de l'immunité innée localisés intracellulairement dans le cytosol (Tableau 9).

Tableau 9 : Récepteurs cytosoliques de reconnaissance des bactéries intracellulaires. *Localisation, famille et type de récepteurs impliqués dans la reconnaissance d'un ligand de bactérie extracellulaire (Adapté de* [55]*) – NLR : NOD-Like Receptor ; CDS : Cytosolic DNA Sensor ; NOD : Nucleotide-binding Oligomerization Domain ; AIM : Apoptosis Inhibitor of Macrophages ; cGAS : Cyclic GMP-AMP Synthase ; OMV : Outer Membrane Vesicle ; SS : Signal Sequence ; LPS : Lipopolysaccharide ; CMV : Core Membrane Vesicle ; K+ : Potassium ; ADN : Acide Désoxyribonucléique*.

Localisation	Famille de récepteurs	Récepteur (PRR)	Ligand (PAMP)
Cytosol	NLR	NOD1, NOD2	Peptidoglycanes via OMV ou SS
		NLRC4	Flagelline via SS
		NLRP3	Activation indirecte via LPS des CMV, toxines formant des pores K+
		NLRP1	Clivage par toxine d'anthrax
	CDS	AIM2	ADN bactérien
		cGAS	ADN bactérien

Toute reconnaissance des motifs bactériens intracellulaires entraîne une mobilisation des mécanismes de défense intrinsèques, comme l'autophagie, aboutissant à la destruction directe du pathogène par les macrophages, et une forte sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et d'interférons [55].

L'autophagie est la formation de vésicules à double membrane, dans le cytoplasme, qui, à terme, fusionneront avec les lysosomes pour l'élimination de la bactérie. L'activité autophagique est augmentée en présence d'IFNγ, cytokine protectrice dans les infections par les pathogènes intracellulaires [55]. La réponse de type Th1 est donc une aide pour induire la mort du pathogène, grâce à leur production d'IFNγ, activant les macrophages, et à leur induction de la différenciation des lymphocytes T CD8+ en cellules cytotoxiques pouvant lyser les cellules infectées. Le stress cellulaire peut également entraîner la génération d'espèces réactives de l'oxygène.

L'étude du CD64, pour la thèse, exprimé en réponse aux bactéries extracellulaires, semble être adéquat aussi pour les bactéries intracellulaires. En effet, l'expression du CD64 est favorisée par la sécrétion d'IFNγ, présent en grande quantité pour la destruction des bactéries intracellulaires. Le rôle des PRR étant moins clair dans le cas des bactéries intracellulaires, on ne sait pas si ce FcR va répondre de manière aussi directe qu'aux bactéries extracellulaires, mais on fait l'hypothèse qu'il répondra au moins indirectement après sécrétion d'IFNγ dans le milieu.

1.2.4. Le système immunitaire dirigé contre les virus

Les virus sont des agents infectieux plus petits que les bactéries, d'un diamètre de 20 à 300 nm pour la plupart d'entre eux. Le premier virus affectant l'Homme a été décrit en 1901 et était celui de la fièvre jaune. Les particules virales sont composées d'une capside protéique, enveloppées ou non d'une membrane, contenant des acides nucléiques (Acide Ribonucléique – ARN ou Acide Désoxyribonucléique – ADN), supports de l'information génétique.

Les virus sont des pathogènes intracellulaires obligatoires car ils doivent infecter une cellule hôte pour se répliquer. Ils peuvent être cytolytiques (grippe, poliomyélite, rougeole), provoquant rapidement la mort des cellules qu'ils infectent, ou latents (papillomavirus, famille des virus herpès – HSV, Epstein-Barr Virus – EBV, Cytomégalovirus – CMV), persistant dans la cellule hôte [55].

Toute cellule de l'organisme peut potentiellement détecter sa propre infection par un virus puisque les virus peuvent infecter tous les types cellulaires de l'organisme. Leurs cibles cellulaires, leurs modes d'infection et de réplication sont variés et les réponses immunitaires mises en place sont donc elles-mêmes très diverses. La défense antivirale reste assurée majoritairement par les interférons de type I et les cellules NK.

Les composants de surface des particules virales ou les molécules sécrétées par les cellules infectées sont détectés par des TLR de la membrane plasmique des cellules de l'hôte. Par exemple, le TLR2 reconnaît les glycoprotéines de surface du CMV, de l'HSV et du virus de l'Hépatite C (VHC), et le TLR4 reconnaît les PAMP du virus Ebola et du virus de la Grippe [55].

L'activation de ces récepteurs par des protéines de surface des particules virales permet la production de cytokines pro-inflammatoires ainsi que d'IFN I (surtout dans le cas de TLR4). Il est également intéressant de noter que les cellules NK peuvent détecter des PAMP viraux, via leur récepteur NKp44, favorisant alors l'activité cytotoxique des cellules NK et leur production de cytokines telles que l'IFNγ.

Les TLR3, TLR7 et TLR9, localisés sur la membrane des endosomes, peuvent aussi détecter les acides nucléiques viraux après capture des particules virales du milieu extracellulaire dans le milieu intracellulaire [55].

Par exemple, le TLR3 reconnaît l'ARN double brin du rotavirus et de la dengue, les TLR7 et TLR8 reconnaissent l'ARN simple brin des virus influenza, sendai, cocksakie, coronavirus, et flavivirus, et le TLR9 reconnaît l'ADN double brin des CMV, HSV et poxvirus. Particulièrement, TLR9 est exprimé par plusieurs cellules immunitaires (macrophages, cellules dendritiques (DCs) conventionnelles, lymphocytes B) mais plus fortement par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs), spécialisées dans la production d'IFN I. L'expression de TLR7 est également remarquable dans ce dernier type cellulaire.

En réponse à l'activation de leurs PRR, les cellules hôtes peuvent sécréter des IFN I, perturbant la réplication des virus et leur pouvoir infectieux (figure 7).

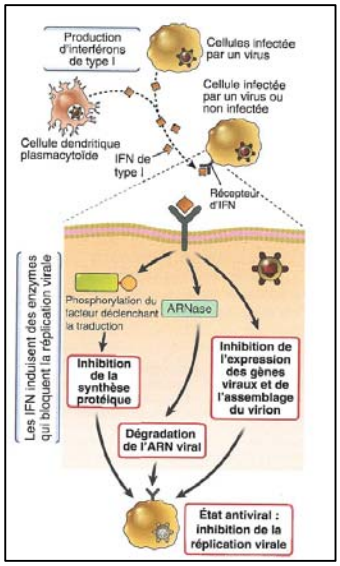


Figure 7 : Activités antivirales des interférons de type I. *Les interférons (IFN) de type I sont produits par des cellules dendritiques plasmacytoïdes et des cellules infectées par un virus en réponse à une signalisation intracellulaire des TLR (Toll Like Receptor) et d'autres détecteurs d'acides nucléiques viraux. Les IFN I se lient à des récepteurs sur les cellules infectées et non infectées, et activent les voies de signalisation qui induisent l'expression de diverses enzymes qui bloquent des étapes de la réplication virale : inhibition de la traduction des protéines virales, dégradation croissante de l'Acide Ribonucléique (ARN) viral, inhibition de l'expression des gènes viraux et de l'assemblage du virion (Tiré de* [56]*).*

Les IFN I augmentent également la sensibilité des cellules infectées à la lyse par des lymphocytes T cytotoxiques (CTL). Leur action est conjointe aux cellules NK. En effet, les cellules NK exercent une action cytotoxique immédiate contre les cellules infectées par un virus, en sécrétant de l'interféron de type II (IFN II). Dans le cas de latence, cette production d'IFNγ des cellules NK, et la sécrétion d'IL-12 par les cellules dendritiques matures, car ayant déjà reconnu les PAMP viraux via leurs PRR, vont favoriser la polarisation Th1 des lymphocytes T naïfs. L'activation des cellules Th1 permet la différenciation de lymphocytes T cytotoxiques dirigés contre les antigènes viraux présentés par le Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I. Cette action conjointe des CTL avec les cellules NK induira l'apoptose des cellules infectées, notamment par des virus latents où peu de particules virales sont détectables [55].

Plus généralement, l'IFNγ va aussi induire la sécrétion préférentielle d'anticorps neutralisants par des lymphocytes B activés conjointement à la réponse Th1. La reconnaissance d'épitopes viraux à la surface des cellules infectées peut induire une cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC) par les cellules NK.

La réponse antivirale est concentrée sur une réponse principale forte de sécrétion d'IFN de type I. Dans le cadre de la thèse, nous nous sommes donc intéressées à un marqueur exprimé sur les monocytes en réponse à la sécrétion d'IFN I, le CD169. L'hypothèse est que son expression sera bien induite lorsque les virus seront détectés par les TLR qui déclencheront une réponse interféron de type I, mais que de possibles interférences peuvent exister si la production est moindre ou si la réponse des cellules NK est plutôt favorisée et produit alors de l'IFNγ.

1.2.5. Le système immunitaire dirigé contre les autres types de micro-organismes

Champignons

Chez l'Homme, les infections fongiques sont souvent opportunistes, et touchent le plus souvent des patients immunodéprimés. Les dommages tissulaires causés par les mycètes provoquent une inflammation, qui, en recrutant des leucocytes, peut causer une hyper-inflammation plus néfaste que bénéfique pour l'hôte. La majorité des pathogènes fongiques humains sont des Ascomycètes (*Candida, Aspergillus, Pneumocystis*, les dermatophytes) et des Basidiomycètes (*Cryptococcus*), mais on en trouve parmi les Microsporidies et les Mucorales. Des exemples de mycètes sont donnés en tableau 10.

Tableau 10 : **Infections causées par les pathogènes fongiques communs.** *Espèces de Mycètes les plus communément retrouvées chez l'Homme, avec leurs infections associées, souvent développées chez les patients immunodéprimés (Adapté de* [55]*).*

Espèce de Mycète	Type d'infection
Candida albicans	Candidose vulvovaginale Candidose orale Candidose disséminée
Aspergillus fumigatus	Aspergillose pulmonaire
Pneumocystis carinii	Pneumonie
Cryptococcus neoformans	Infection pulmonaire Méningite

Les lectines de type C (CLR) représentent la famille de PRR reconnaissant leurs sucres présents en surface. Ils induisent leur phagocytose, une activité microbicide et l'induction de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8 et le TNFα, qui vont provoquer un recrutement de neutrophiles. La formation de NET, et la production de ROS et d'oxyde d'azote vont permettre l'élimination du pathogène. Des TLR et PRR intracellulaires détectent aussi les mycètes et induisent leur opsonisation, grâce au système du complément, à la CRP, à la *Mannose Binding Lectin* ou encore aux anticorps.

La réponse adaptative est d'abord de type Th17 au niveau local, puis de type Th1 lorsqu'elle est élargie à d'autres organes que les muqueuses ou la peau. L'IFNγ joue alors un rôle fongicide important.

Lors d'infection par champignons, la production d'IFNγ peut donc induire l'expression du CD64 sur les neutrophiles recrutés. Il conviendra donc, pour la thèse, de faire attention à ces cas où le marqueur pourrait être faussement positif d'une infection bactérienne.

Vers parasites

Les infections par les vers, ou helminthiases, induisent des dysfonctionnements organiques par obstruction ou déstructuration du tissu sur lequel ils se développent. La durée de l'infection peut mener à une inflammation chronique avec perte de fonctions irréversible. Des exemples de vers sont donnés en tableau 11.

Tableau 11 : **Exemples de pathologies causées par des vers.** *Espèce du vers, infection associée, voie de transmission et mécanismes physiopathologiques provoquées (mécaniques (M) ou inflammatoires (I)) (Adapté de* [55]*).*

Vers	Maladie	Transmission	Mécanismes physiopathologiques
Ascaris	Ascaridiose	Ingestion	(M) Blocage des voies digestives
Echinococcus	Echinococcose	Ingestion	(M) Pression sur les tissus par des kystes (cerveau, foie, poumons)
Ankylostomes	Ankylostomiase	Ingestion, cutanée	(M) Blocage des voies digestives, pertes de sang
Schistosomes	Schistosomiase, Bilharziose	Cutanée	(M,I) Blocage du flux sanguin hépatique, fibrose hépatique
Nématodes	Filariose lymphatique, onchocercose	Piqûre d'insecte	(M,I) Blocage du drainage lymphatique, fibrose cutanée
Trichuris	Trichuriose	Ingestion	(I) Inflammation et atrophie des villosités intestinales
Strongyloides	Anguillulose, strongyloïdose	Ingestion	(I) Inflammation et atrophie des villosités intestinales

La détection initiale des vers par l'immunité innée reste souvent énigmatique, car la nature de leurs PAMP est controversée, ainsi que celle des PRR stimulés. Ils sont davantage détectés par leur capacité à causer des dommages (DAMP produits) et à activer des récepteurs de l'hôte. La réponse induite est majoritairement de type Th2 car les cellules épithéliales sécrètent des cytokines telles que l'IL-1α ou l'IL-33, mais les mécanismes sous-jacents ne sont pas encore compris, d'autant plus que la grande taille des vers limite l'efficacité de la phagocytose.

En cas d'infection par des vers, il semblerait qu'il n'y ait pas d'interférence de la réponse immunitaire avec celle que l'on pourrait avoir en réponse à une bactérie ou à un virus.

Autres parasites

Une grande variété d'eucaryotes unicellulaires parasites d'animaux existe. Outre les Mycètes unicellulaires, on retrouve les Excavés (Leischmanies, Trypanosomes, *Giardia*, *Trichomonas*), les Apicomplexes (*Plasmodium*, Toxoplasmes, Cryptosporidies) et les Amoebozoaires (Amibes). Ces parasites utilisent divers moyens de reproduction (asexué, sexué), de locomotion (flagelles, cils, pseudopodes) et de source d'énergie (hétérotrophie, autotrophie).

La diversité génétique, morphologique et de localisation de ces micro-organismes pose un défi au système immunitaire. La réponse cellulaire de type Th1 est efficace pour lutter contre les parasites intracellulaires. La réponse humorale de type Th2 est primordiale dans la lutte contre les parasites extracellulaires. Les neutrophiles sont les premiers phagocytes mobilisés pour limiter la multiplication des parasites. Les macrophages interviennent ensuite pour leur destruction, via la production de TNFα, d'IFNγ et d'IFN I pour favoriser la phagocytose. Les lymphocytes T cytotoxiques peuvent aussi tuer les cellules infectées [55].

Lors d'infection par parasites, la production d'IFN I peut donc induire l'expression du CD169 sur les monocytes recrutés, et celle d'IFNγ, l'expression du CD64 sur les neutrophiles, mais leurs quantités respectives et la temporalité de leurs expressions ne sont pas claires. Il conviendra donc pour notre étude de faire attention à ces cas où les marqueurs pourraient être faussement positifs d'une infection virale ou bactérienne.

Conclusion 1.2

Les processus immunitaires mis en place par l'organisme humain en réponse à une infection diffèrent selon les micro-organismes. Les cellules immunes innées constituent toujours une première ligne de défense, notamment les monocytes/macrophages et les neutrophiles. L'hypothèse faite dans la thèse est que l'étude de leurs biomarqueurs de surface semble donc pertinente pour discriminer les infections bactériennes des infections virales. Il faut cependant rappeler la problématique des biomarqueurs de l'hôte : les pathogènes connus sont pathogènes justement parce qu'ils détournent ou biaisent une ou deux voies de réponse du système immunitaire. La difficulté est donc de trouver les biomarqueurs les moins souvent affectés dans leur activation « normale » par ces pathogènes.

1.3. Les biomarqueurs cellulaires de la réponse immunitaire infectieuse

1.3.1. Biomarqueurs cellulaires de la réponse infectieuse décrits dans la littérature

L'équipe de Kapasi [27] s'est intéressée à recenser tous les biomarqueurs qui pouvaient présenter un intérêt à discriminer une cause bactérienne d'une pathologie fébrile aigüe, d'une cause non-bactérienne, en se basant justement sur le fait que chaque pathogène emprunte une voie d'activation différente lorsqu'il infecte l'organisme humain [30]. Ils ont ainsi analysé 193 citations bibliographiques, parmi lesquelles ils ont retenu 112 biomarqueurs de l'hôte dans près de 60 études.

Parmi tous les marqueurs potentiels, ils ont bien sûr identifié des marqueurs classiques hématologiques (WBC, PMN), inflammatoires (PCT, CRP,) des cytokines (IL-6, IL-8, TRAIL, IP-10, IFN), d'activité métabolique (Glucose, Lactates) ou autres (MxA), mais surtout des marqueurs cellulaires de l'infection. Les marqueurs cellulaires cités comme ayant des différences significatives d'expression dans le cas d'infections, étaient les CD64, Gal-9 (Galectine-9), CD35, CD55, CD32, Antigène Leucocytaire Humain (HLA)-ABC (ou CMH I), CD88, CD14, CD46, CD59, HLA-DR (ou CMH II), TLR2 et TLR4 (tableau 12).

Tableau 12 : Marqueurs cellulaires de surface évalués pour le diagnostic infectieux. *Recensement des biomarqueurs présentant un intérêt pour discriminer les infections d'origine bactérienne ou non-bactérienne (a), les infections d'origine bactérienne ou virale (b), ou les infections d'origine bactérienne ou fongique (c). Les valeurs non reportées sont indiquées par « -/- » (Tiré de* [27]*).*

Biomarker (sample type)	No. Studies	Study Size Range	B vs. NonB[a]	B vs. V[b]	B vs. F[c]	Cut-off Range	% Sensitivity Range (No. studies)	% Specificity Range (No. studies)	Quality Score (%)	No. Ctrs.	Ref.
CD64 (blood)	3	57–1921	2/2	1/1	0	1800 molecules/cell; 1.64 index	71–96 blood (3)	87–95.2 blood (3)	42.3–65.4	3	[32, 43, 68]
Gal-9 (blood)	1	63	0	1/1	0	>64.5 pg/ml	81.4 blood (1)	75 blood (1)	30.8	1	[35]
CD35 (blood)	3	47–286	0	3/3	0	≥1.5 index	67.5–81 blood (3)	68.9–77 blood (3)	46.2–65.4	2	[29, 32, 37]
CD55 (blood)	1	286	0	1/1	0	≥1.25 index	81 blood (1)	77 blood (1)	61.5	1	[37]
CD32 (blood)	1	286	0	1/1	0	≥92 to 110,000 molecules/cell	71.4–77.9 blood (1)	72.1–82.0 blood (1)	61.5	1	[29]
MHC1 (blood)	1	286	0	1/1	0	≥0.345 ratio	76 blood (1)	91 blood (1)	61.5	1	[29]
CD88 (blood)	1	286	0	1/1	0	≥81,804 molecules/cell	65.3 blood (1)	68.9 blood (1)	61.5	1	[29]
CD14 (blood)	1	81	0	1/1	0	-/-	-/-	-/-	42.3	1	[33]
CD46 (blood)	1	286	0	1/1	0	-/-	-/-	-/-	61.5	1	[37]
CD59 (blood)	1	286	0	1/1	0	-/-	-/-	-/-	61.5	1	[37]
HLA-DR (blood)	1	81	0	0/1	0	-/-	-/-	-/-	42.3	1	[33]
TLR2 (blood)	1	81	0	0/1	0	-/-	-/-	-/-	42.3	1	[33]
TLR4 (blood)	1	81	0	0/1	0	-/-	-/-	-/-	42.3	1	[33]

CD, Cluster of differentiation; Ctrs, Countries; Gal-9, Galectin 9; HLA-DR, Human leukocyte antigen DR protein complex; MHC1, Major histocompatibility complex class I; TLR, Toll-like receptor

La concentration du biomarqueur Gal-9 dans le sérum a été montrée comme augmentée en réponse au Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH), de la dengue et influenza [61]. Mokuda et son équipe ont montré que le CD35 dépendait du facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF) et du TNFα [62], et Nuutila et son équipe ont confirmé que « *son augmentation et celle du CD55 sur les monocytes et neutrophiles pouvaient être des marqueurs infectieux potentiels* » [63]. L'équipe de Nuutila a également démontré que le CD35 associé en score avec les CD32, CD88 et l'HLA-ABC présentaient une sensibilité de 91% et une spécificité de 92% pour identifier les infections bactériennes [63], que « *l'augmentation du CD46 sur les monocytes était indicateur d'une infection virale* » et que le CD59 sur les monocytes et neutrophiles, était indicateur d'un état infectieux général [38]. Le TLR2, le TLR4 et le CD14 semblent être exprimés fortement sur les monocytes en cas d'infections bactériennes, et plus faiblement sur les neutrophiles [64].

Bien sûr, d'autres marqueurs cellulaires que ceux recensés par l'équipe de Kapasi ont déjà été évalués, mais ces résultats restent plus préliminaires. Par exemple, le CD31 et le CD62L, exprimés sur les neutrophiles, semblent avoir une expression diminuée en cas de Virus Respiratoire Syncytial (RSV), alors que le CD11b, le CD18 et le CD54 semblent être à l'inverse augmentés sur ces mêmes patients [65].

Finalement, le CD64 présente les meilleures performances à identifier les patients atteints d'infection bactérienne. Le HLA-DR ressort moins nettement de cette étude, mais reste un marqueur de choix pour le suivi du sepsis [66]. Et, bien que non identifié dans la méta-analyse de Kapasi, le CD169 est un marqueur cellulaire dont l'expression sur les monocytes a été récemment retrouvée augmentée en cas d'infection virale.

L'objectif principal de mon projet portera sur l'étude de ces trois derniers biomarqueurs de surface, mais traitera en objectif secondaire les autres marqueurs cellulaires potentiels. Le plus pertinent et le plus fréquemment utilisé reste le CD64 pour identifier les infections bactériennes ; moins connu, le CD169 doit être mieux caractérisé comme indicateur d'une infection virale. L'HLA-DR, et potentiellement d'autres biomarqueurs de surface, seraient utilisés pour renforcer ou compléter le diagnostic donné par les deux premiers.

1.3.2. Biomarqueur de l'immunité antibactérienne, le CD64

Le CD64, aussi connu comme étant le récepteur-I de haute affinité au fragment cristallisable-gamma des immunoglobulines (FcγRI), est distribué à la surface des cellules de la lignée myéloïde, dont les macrophages, les monocytes, les éosinophiles et les cellules dendritiques, pour fournir une première ligne de reconnaissance et de défense contre les micro-organismes [67,68]. Il n'a presque pas d'expression sur les neutrophiles en conditions physiologiques, mais, en cas d'infection bactérienne, l'activation du système immunitaire induit le relargage de cytokines pro-inflammatoires, dont l'IFNγ, qui induit fortement l'expression du CD64 sur les neutrophiles (nCD64) [62,69,70].

Son nom est dérivé de sa liaison spécifique à la partie Fc (Fragment cristallisable) des anticorps attachés aux cellules infectées ou de la surface des pathogènes les envahissant. Il existe plusieurs types de récepteurs Fc, qui sont classés en fonction du type d'anticorps qu'ils reconnaissent : les récepteurs Fc-*gamma* sont ceux qui se lient le plus communément à la classe des immunoglobulines (Ig)G.

L'ensemble des FcγR appartient à la superfamille des immunoglobulines, qui comprend plusieurs membres : FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32), FcγRIIB (CD32), FcγRIIIA (CD16a) et FcγRIIIB (CD16b). Ces récepteurs diffèrent dans leurs affinités pour les anticorps en raison de leur différente structure moléculaire. Le CD64, ou FcγRI, se lie à une IgG plus fortement que le CD32 (FcγRII) ou le CD16 (FcγRIII), avec une affinité proche de 10−9 M (Kd), car il possède une partie extracellulaire composé de trois domaines de type immunoglobuline, soit un de plus que FcγRII ou FcγRIII. Cette propriété permet à FcγRI de se lier à une molécule isolée d'IgG (ou monomère), bien que tous les récepteurs Fcγ doivent quand même se lier à plusieurs molécules d'IgG au sein d'un complexe immunitaire pour être activés.

L'interaction de la partie Fc de l'anticorps antimicrobien avec le FcγRI active la cellule qui le possède [71], en générant des signaux via une sous-unité Fcγ, caractéristique de l'important motif d'activation appelé Motif d'activation des récepteurs immuns basé sur la tyrosine (ITAM). Un ITAM est une séquence spécifique d'acides aminés apparaissant deux fois de façon rapprochée dans la queue intracellulaire d'un récepteur. Lorsque des groupes phosphate sont ajoutés aux résidus tyrosine de l'ITAM ou de ses sous-unités, par des enzymes appelées tyrosine kinases, une cascade de signalisation est générée à l'intérieur de la cellule (figure 8).

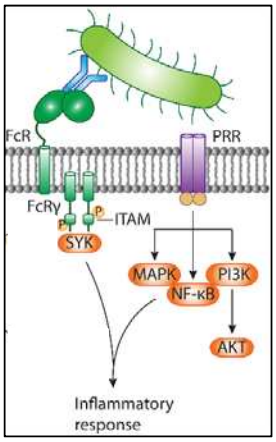


Figure 8 : Modulation de la réponse inflammatoire contre les pathogènes par les récepteurs activateurs ITAM. *Le pathogène (ici une bactérie) opsonisé avec des anticorps est reconnu par les récepteurs de surface aux fragments Fc (FcR). Ces récepteurs contiennent dans leur domaine intracellulaire des motifs d'activation des récepteurs immuns basés sur la tyrosine (ITAM). La phosphorylation de ces motifs, par des enzymes tyrosine kinases, telles que SYK, induit une cascade de signalisation activatrice d'une réponse inflammatoire, concomitante aux signaux d'activation déclenchés par la reconnaissance des motifs microbiens par les PRR de surface (voies MAPK – Mitogen Activated Protein Kinase, NF-κB – Nuclear Factor κB, et PI3K/AKT – Phosphoinositide 3-Kinase) (Tiré de* [72]*).*

Cette réaction de phosphorylation déclenche la fonction la plus commune de ces cellules, qui reste leur processus de phagocytose [73] : l'agent pathogène est englouti par les phagocytes par un processus actif impliquant la liaison puis la libération du complexe région Fc/récepteur Fc, jusqu'à ce que la membrane cellulaire du phagocyte recouvre entièrement l'agent pathogène. Le micro-organisme est ensuite détruit [74] (figure 9).

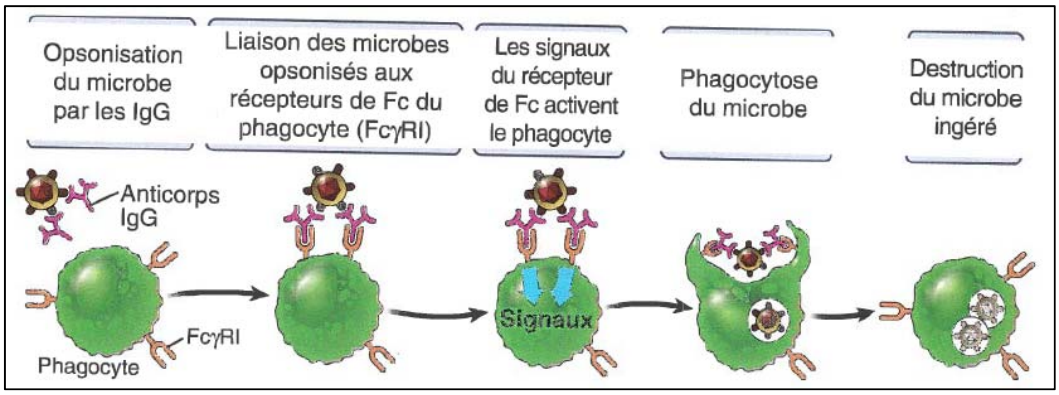


Figure 9 : Phagocytose des microbes dépendant des anticorps. *Les anticorps de certaines sous classes d'immunoglobulines G (IgG) se lient aux micro-organismes et sont ensuite reconnus par les récepteurs de fragment cristallisable (FcR) sur les phagocytes. Les signaux provenant des FcR déclenchent la phagocytose des microbes opsonisés et activent les phagocytes afin qu'ils détruisent les microbes (Tiré de* [56]*).*

Ainsi, le CD64, constitutivement exprimé à la surface des monocytes et des autres celllules myéloïdes, est également exprimé par un autre type de phagocytes en cas d'infection bactérienne : les neutrophiles. Cette expression joue un rôle clé dans la réponse immunitaire antibactérienne par la phagocytose des bactéries, mais aussi dans la disparition des complexes immuns, la présentation d'antigènes et le relargage de cytokines [75].

L'augmentation du nCD64 a d'ailleurs été proposée comme un marqueur d'infection bactérienne avec des performances supérieures, avec 87-95,2% de spécificité et 71-96% de sensibilité [35,62,76–78]. Son expression sur les neutrophiles corrèle même encore plus fortement lors d'un diagnostic de sepsis ou d'infection bactérienne aigüe, avec 100% de sensibilité et 93% de spécificité [29,79,80]. Ces performances sont meilleures que celles retrouvées pour la CRP ou la PCT [79]. De plus, à l'inverse de la CRP, le CD64 n'est pas détecté sur les neutrophiles en cas d'état inflammatoire d'origine non infectieuse [80]. Aussi, le CD64 est détecté dans des cas d'infections locales, puisque les neutrophiles sont retrouvés dans la circulation sanguine pour leur recrutement vers les sites d'infection locaux, alors que la PCT n'est exprimé qu'en cas d'infection systémique [81]. Enfin, l'expression du CD64 sur les neutrophiles, étant l'une des premières réponses du système immunitaire innée face à une infection, est même indiquée comme étant un marqueur sensible précoce d'infections bactériennes néonatales [44,82].

Le CD64 regroupe des propriétés fonctionnelles largement démontrées dans les cas d'infections bactériennes, et qui renforcent son intérêt à être appliqué en clinique pour différencier une infection d'origine bactérienne d'une infection d'origine non-bactérienne.

1.3.3. Biomarqueur de l'immunité antivirale, le CD169

Le marqueur de surface CD169 (ou Siglec-1 ou Sn) est une sialoadhésine, membre de la famille des Siglecs (*sialic acid binding Immunoglobulin-like Lectins*), peu fréquemment évaluée dans des contextes cliniques, mais qui joue pourtant un rôle clé lors d'infections virales [83,84].

Ces protéines de surface des cellules immunitaires sont des lectines, c'est-à-dire des récepteurs qui se lient spécifiquement et de façon réversible à certains glucides, avec une affinité proche de 10^{-6} à 10^{-7} mol/L (Kd). Les Siglecs sont les lectines de type I, une famille de lectines reconnaissant spécifiquement l'acide sialique [85]. Cela est possible car les Siglecs appartiennent à la superfamille des immunoglobulines et sont donc repliés de la même manière que les immunoglobulines : ils sont organisés en récepteurs transmembranaires de 2 à 17 domaines Ig extracellulaires de type C2, sans activité de fixation, terminés par un domaine terminal V-*set* où se situe leur site de fixation aux acides sialiques [86]. Ce site actif contient un résidu arginine chargé positivement, qui va se lier par un pont salin stable à l'un des nombreux groupes carboxyliques de l'acide sialique à lier [87]. Cette interaction du récepteur avec le glucide va activer d'importantes fonctions d'adhésion et de signalisation cellulaires.

Il est identifié 14 Siglecs chez l'Homme et 9 chez la souris [88], dont les fonctions et le modes d'action varient selon les interactions récepteurs-ligands [89].

Tout d'abord, la fonction de chaque Siglec est fortement liée à sa taille : la plupart des Siglecs sont courts et ne peuvent pas s'étendre loin de la membrane cellulaire sur laquelle ils sont ancrés. Cela les empêche de se lier aux résidus d'acides sialiques des glucides d'autres cellules, et ils ne peuvent donc se lier qu'à des *cis*-ligands, c'est-à-dire des résidus se trouvant sur la même cellule qu'eux (figure 10b). Le CD169 est la seule protéine étendue, faite de 17 domaines d'immunoglobulines, capable de se lier à des *trans*-ligands (figure 10a).

Particulièrement, le CD169, a été le premier Siglec à être décrit en 1986 comme étant un récepteur d'adhésion présent sur les macrophages, reconnaissant les acides sialiques exposés sur les glycolipides des membranes virales [90]. Il se lie à eux pour capturer et internaliser les virus par endocytose [86], et participe ou bien à leurs destruction ou bien à améliorer leurs transmissions et leurs pathogénicités [91,92] (figure 11).

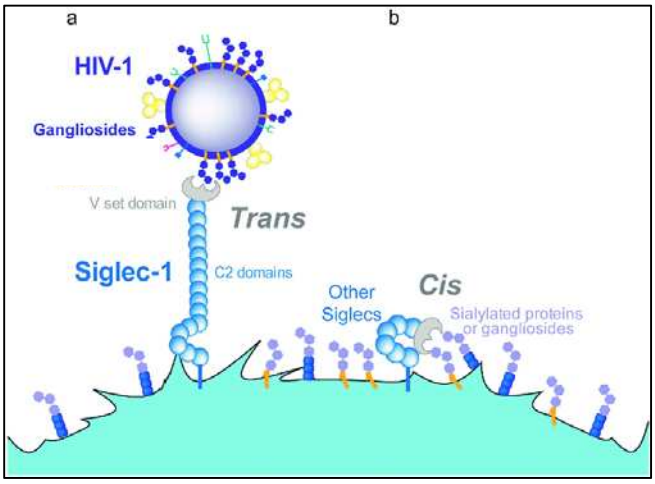


Figure 10 : Reconnaissance cis et trans des ligands des Siglecs. *a) Siglec-1 s'étend depuis la membrane cellulaire de 17 domaines immunoglobulines C2, terminés par un domaine V-set, lui permettant de reconnaître et lier les acides sialiques de différents ligands, dont par exemple ceux des gangliosides de la membrane virale du Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH)-1. b) Les autres membres de la famille Siglec sont faits d'un nombre moins important de domaines C2, les laissant interagir seulement avec des ligands sialylés exposés sur la membrane de la même cellule qu'eux (Tiré de* [93]*).*

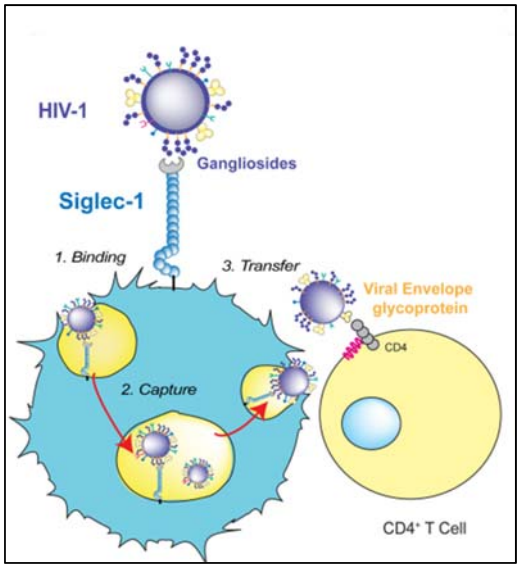


Figure 11 : Siglec-1 et le virus du VIH-1. *Le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH)-1 est lié au Siglec-1 via les gangliosides de sa membrane virale. Lié au Siglec-1, le virus est capturé par endocytose dans un compartiment de stockage intracellulaire, jusqu'à ce qu'il soit relâché pour infecter des lymphocytes T CD4+, via les glycoprotéines de leurs enveloppes virales (Tiré de* [93]*).*

Ensuite, pour favoriser ses interactions avec ses *trans*-ligands de cellule à cellule, en addition de sa taille inhabituelle, Siglec-1 est dépourvu de motifs de signalisation intracellulaires [88], ce qui est en contraste avec les autres Siglecs. En effet, la plupart des Siglecs sont plutôt des récepteurs inhibiteurs des cellules immunitaires innées, qui possèdent des Motifs d'inhibition des récepteurs immuns basé sur la tyrosine (ITIM) dans leurs régions cytoplasmiques [88]. De la même façon qu'un ITAM, un ITIM est une séquence spécifique d'acides aminés apparaissant dans la queue intracellulaire d'un récepteur. Lorsque des groupes phosphates sont ajoutés aux résidus tyrosine de l'ITIM, par des enzymes appelées tyrosine kinases, telles que SHP-1 ou SHP2, une cascade de signalisation inhibitrice est générée à l'intérieur de la cellule. L'interaction de ces Siglecs inhibiteurs avec les résidus sialiques en *cis* régulent donc l'inflammation causée par la reconnaissance des PRR de leurs cellules avec les DAMP et les PAMP microbiens, maintenant ainsi une tolérance immunitaire générale, en modulant l'activité des cellules immunitaires.

Il est pensé que cette évolution provient de mécanismes de sélection en réponse aux pathogènes [86]. En effet, c'est grâce à leurs enveloppes d'acides sialiques que les pathogènes, tels que virus, bactéries, champignons ou parasites eucaryotes, ont pu identifier, cibler et fixer certains sucres spécifiques de la surface des cellules hôtes, tels que les lectines, pour coloniser et infecter les cellules. L'exploitation du système des Siglecs leur permet ainsi d'altérer et d'échapper à la réponse du système immunitaire dirigée contre eux, plutôt à leur avantage mais parfois à leur détriment [94,95].

De nombreuses pathologies sont d'ailleurs liées à cette interaction spontanée entre les acides sialiques pathogènes et les récepteurs Siglecs des cellules immunitaires : des cancers [96], des infections par le virus VIH-1 [97] ou encore par les Streptocoques de Groupe B [98,99]. Les Siglecs y ont un rôle majeur de modulation de la réponse immunitaire.

Particulièrement, quelques études ont commencé à rapporter l'intérêt du CD169 en conditions pathogéniques. Majoritairement décrit comme un marqueur des macrophages résidents, non exprimé en conditions physiologiques, son expression à la surface des cellules myéloïdes semble se faire après le relargage de molécules antivirales ; plus particulièrement, il a été observé *in-vitro* que son expression était doublée sur les monocytes après stimulation par l'IFNα [91,100]. *In-vivo*, l'augmentation de l'expression du CD169 sur les monocytes (mCD169) a été observée après la reconnaissance de pathogènes enveloppés d'acides sialiques, tels que le rhinovirus, le virus reproducteur et respiratoire porcin, l'EBV, et le virus de l'immunodéficience humaine, et particulièrement, son expression corrélait avec la charge virale du VIH [92,100–103]. Une recherche bibliographique plus extensive a permis de lister d'autres pathologies virales où le CD169 a pu être détecté (dengue, zika, lassa, marburg, CMV, et RSV) [104–116]. Deux groupes de recherche ont montré que le CD169 représentait le récepteur majeur aux glucides de ces virus, favorisant leur endocytose puis leur dissémination [84,117].

Il est important de noter que l'expression du CD169 a été également observée dans diverses maladies inflammatoires, telles que la sclérose multiple, l'athérosclérose, l'arthrite rhumatoïde et le lupus érythémateux systémique. Ces maladies sont connues pour impliquer une production des IFN de type I, ce qui fait sens. Si le CD169 s'avère utile à détecter les infections virales, il faudra comparer son niveau d'expression à celui observé dans les pathologies auto-immunes ou autres interféronopathies, et voir si cela peut interférer avec l'interprétation du test. Il est possible que le tableau clinique, et/ou l'historique connu du patient suffise à éviter au clinicien de se méprendre.

A notre connaissance, l'expression du marqueur CD169 sur les monocytes n'a jamais été évaluée seule ou en combinaison avec un autre biomarqueur pour discriminer les infections virales humaines des infections non-virales.

L'expression du CD169 a ainsi été décrite comme dépendante des interférons de type I, connus pour leur implication dans la réponse immunitaire anti-virale, et comme une réponse à certains virus, mais il n'a été que peu étudié dans des modèles d'infections humaines. Ce biomarqueur représente donc une opportunité à étudier pour discriminer les infections d'origine virale des infections d'origine non-virale.

1.3.4. Biomarqueur de la transition entre immunités innée et adaptative, l'HLA-DR

L'HLA-DR est un récepteur de surface cellulaire du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, aussi appelé Antigène Leucocytaire Humain. Chez tous les mammifères, le locus du CMH, ou HLA, est polygénique, c'est-à-dire qu'il comprend deux ensembles de gènes situés sur le même chromosome : ceux des CMH de classe I et ceux des CMH de classe II [55]. Chez l'Homme, ces gènes sont hautement polymorphes (de nombreuses variantes de ces gènes existent), car le locus du CMH I comprend trois gènes appelés A, B et C, et le locus du CMH II comprend 3 paires de gènes, DP, DQ, et DR (figure 12). Le locus du CMH comprend aussi d'autres gènes non polymorphes, qui codent par exemple des protéines participant à la présentation des antigènes [56].

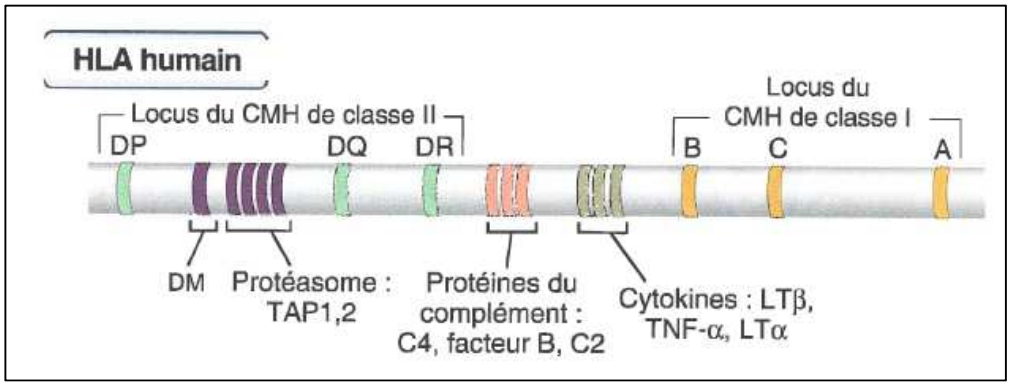


Figure 12 : Gènes du locus du CMH. *Ce schéma du Complexe Majeur d'Histocompatibilité Humain (CMH) humain (dénommé Antigène Leucocytaire Humain - HLA) illustre les principaux gènes codant les molécules participant aux réponses immunitaires. La taille des gènes et les distances qui les séparent ne sont pas représentées à l'échelle. Les locus de classe II sont montrés comme des blocs uniques, mais chacun comprend au moins deux gènes codant respectivement les chaînes α et β. Les produits de certains gènes (DM, composants de protéasome, TAP : transporteur associé à l'apprêtement de l'antigène) sont impliqués dans l'apprêtement antigénique. Le locus du CMH contient également des gènes qui codent des molécules autres que des molécules présentatrices de peptides, notamment certaines protéines du complément et des cytokines (LT : lymphotoxine, TNF : facteur de nécrose tumorale) (Tiré de* [56]*).*

Les molécules du CMH I sont exprimées à la surface de toutes les cellules nucléées de l'organisme, alors que les molécules du CMH II sont restreintes aux cellules présentatrices de l'antigène (CPA) professionnelles (cellules dendritiques, monocytes/macrophages et lymphocytes B) [55]. Les cellules présentatrices d'antigène sont situées dans les épithéliums cutanés, intestinaux et respiratoires, voies de pénétration les plus fréquentes des micro-organismes. Certaines sont parfois détectées dans la circulation ou dans les organes internes comme le foie ou les organes lymphoïdes car leur fonction physiologique est de capturer les antigènes microbiens et les transporter vers les tissus lymphoïdes périphériques pour les présenter aux lymphocytes T [56]. Leurs rôles sont moins clairs pour la présentation d'antigène aux lymphocytes B. Les CPA possèdent en plus la capacité à produire des protéines de surface ou des protéines sécrétées, qui contribuent, avec l'antigène présenté, à la stimulation de la prolifération et de la différenciation des lymphocytes T, alors naïfs, en cellules effectrices. Elles sont donc à l'interface entre immunité innée et immunité adaptative.

Les molécules du CMH I et II sont des protéines membranaires des CPA. Elles contiennent chacune un site de liaison au peptide en forme de sillon à leur extrémité aminoterminale (figure 13).

a b

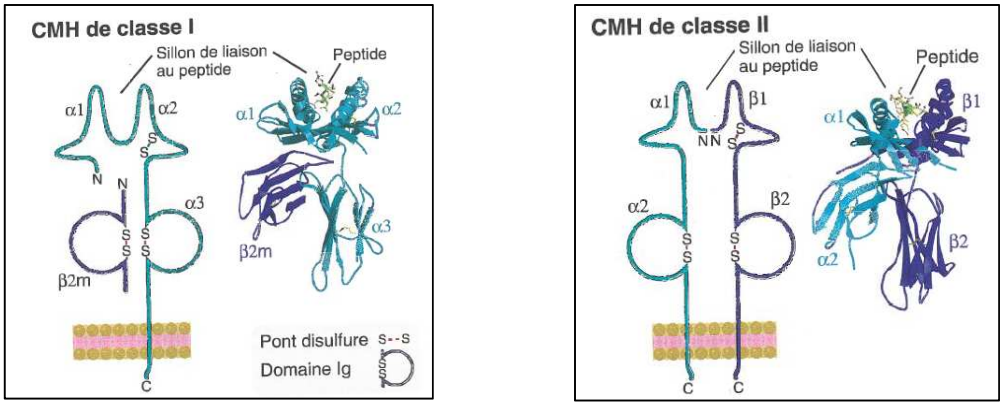


Figure 13 : Structure des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et de classe II. *Les schémas (à gauche) et les modèles (à droite), des structures cristallines des molécules du CMH a) de classe I et b) de classe II, montrent les domaines des molécules et leurs similitudes fondamentales. Les deux types de molécules du CMH contiennent des sillons de liaison au peptide et des parties invariantes qui se lient au CD8 (domaine α3 de classe I) ou au CD4 (domaine β2 de classe II) (Tiré de* [56]*).*

Particulièrement, chaque molécule du CMH de classe II, dont l'HLA-DR, est composée de deux chaînes transmembranaires, dénommées α et β, chacune divisée en deux domaines extracellulaires (α1 et α2, et β1 et β2), alors que chaque molécule du CMH de classe I n'est composée que d'une chaîne α, divisée en trois domaines extracellulaires (α1, α2 et α3) [56]. Les sillons formés par ces chaînes ont donc une taille qui fait que le CMH I présente des peptides courts (8 à 9 acides aminés) alors que le CMH II présente des peptides plus longs (10 à 30 acides aminés) [55]. Les planchers de ces sillons sont les régions qui se lient aux peptides microbiens pour les présenter aux lymphocytes T, tandis que les parois de ces sillons sont les régions de contact avec les récepteurs des lymphocytes T. Chaque molécule du CMH ne peut présenter qu'un peptide à la fois, car elle ne possède qu'un sillon, mais chacune est capable de présenter de nombreux peptides différents [56].

Les molécules du CMH sont nouvellement synthétisées de manière permanente, pour s'apprêter à accueillir des peptides. Cependant, seuls les peptides qui proviennent de microbes se trouvant à l'intérieur des cellules ne sont présentés, car les molécules du CMH se chargent en peptide au cours de leur biosynthèse, de leur assemblage et de leur transport à l'intérieur des cellules (Figure 14). Le CMH I présente plutôt les protéines cytosoliques du soi, d'origine virale, ou issues de bactéries intracellulaires (antigènes endogènes), dont la digestion est fortement sous la dépendance de l'IFNγ. Le CMH II présente plutôt les fragments de micro-organismes extracellulaires phagocytés dans des vésicules intracellulaires (antigènes exogènes). Le mécanisme de présentation croisée rend quand même possible la capacité de présentation d'antigènes exogènes par le CMH I et la présentation d'antigènes endogènes par le CMH II [55].

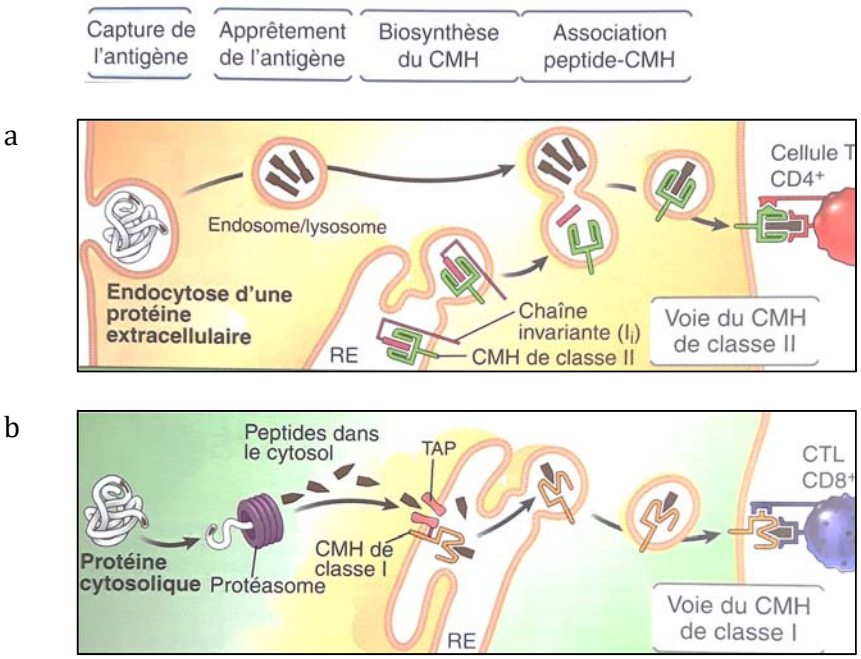


Figure 14 : Voies d'apprêtement intracellulaire des antigènes protéiques. *a) La voie des molécules du CMH II des cellules présentatrices d'antigènes convertit les antigènes protéiques endocytés dans des vésicules en peptides qui se lient aux molécules du CMH II pour être reconnus par les lymphocytes T CD4+. b) La voie des molécules du CMH I convertit les protéines se trouvant dans le cytosol en peptides qui se lient aux molécules du CMH I afin qu'ils soient reconnus par les lymphocytes T CD8+ (Tiré de* [56]*) – CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité.*

Finalement, seules les molécules du CMH chargées d'un peptide sont exprimées à la surface cellulaire pour être reconnue par les lymphocytes T. On estime qu'à partir de l'introduction du pathogène dans un site quelconque de l'organisme, la réponse des lymphocytes T à la présentation de l'antigène microbien par les CPA a lieu dans un délai de 12 à 18 heures, mais que les peptides liés aux molécules du CMH, et présentés à la surface cellulaire, y restent liés durant une période pouvant durer plusieurs jours pour certains peptides [56].

L'abondance des molécules du CMH à la surface des cellules reste ainsi un témoin de la réponse immunitaire à une stimulation infectieuse. L'expression relative de l'HLA-DR à la surface des monocytes (mHLA-DR) est donc étudiée depuis plusieurs années.

Son augmentation à la surface des monocytes a été décrite dans les cas de VIH [118]. A l'inverse, sa diminution à la surface des monocytes a été publiée comme étant le meilleur marqueur pour l'identification et le suivi des altérations immunitaires des sujets gravement malades, tels que ceux en état de sepsis [119,120]. Il représente même le seul marqueur disponible pour différencier des états de chocs septiques d'autres complications graves lors de l'admission du patient [121].

En effet, il est le reflet direct de l'état du système immunitaire en donnant le statut fonctionnel des monocytes. Sa mesure par cytométrie en flux est une information importante en termes de prédiction de la mortalité et de l'évaluation de risques secondaires chez les patients [122]. Cela représente ainsi une aide clinique cruciale pour le soin de ces sujets et leurs prises en charge [123].

L'HLA-DR est un marqueur important de la réponse immunitaire infectieuse. Il est une protéine clé du lien entre les systèmes immunitaires innés et adaptatifs. L'évaluation de son expression sur les monocytes a été largement démontrée comme pertinente dans des altérations immunitaires cliniques graves comme le sepsis. Il apparaît donc comme un marqueur de choix pour renforcer la discrimination des infections bactériennes et virales donnée par les marqueurs CD64 et CD169.

Conclusion 1.3

Les marqueurs de surface des cellules immunitaires innées constituent des marqueurs de choix pour identifier l'étiologie des infections, puisque le système immunitaire témoigne directement de ce qu'il se produit au niveau cellulaire pour la reconnaissance et l'élimination des pathogènes. Parmi eux, le CD64 et le CD169 sont respectivement exprimés sur deux populations innées importantes de la réponse infectieuse, que sont les neutrophiles et les monocytes, et leur production dépend notamment des facteurs anti-infectieux que sont les interférons. L'étude précise de leurs voies d'expression *in-vivo* et des pathologies qu'ils détectent ainsi *in-vitro* permettront d'étudier leur pertinence à discriminer les infections bactériennes des infections virales. L'HLA-DR sera étudié secondairement pour son rôle de soutien au diagnostic. L'hypothèse de la thèse est que la cytométrie de flux pourrait s'imposer comme une technique de choix car elle permet l'identification simultanée de plusieurs biomarqueurs sur des sous-types cellulaires distincts. Ce point est d'autant plus essentiel que certains des biomarqueurs étudiés sont naturellement exprimés sur d'autres cellules du sang (CD64 sur monocytes – mCD64, HLA-DR sur lymphocytes B et cellules dendritiques), rendant impossible la mesure de leur activation en sang total, par exemple en *Reverse Transcriptase* (RT)-PCR ou protéomique.

1.4. La cytométrie en flux «au lit du patient»

1.4.1. Principe de la cytométrie en flux

L'analyse cellulaire par cytométrie en flux est devenue, lors de ces dernières années, un outil essentiel de biologie clinique [124,125]. Son utilité et sa fiabilité sont reconnues aujourd'hui pour de nombreuses applications dans des domaines variés de la médecine. Son apport majeur reste de pouvoir aborder les populations cellulaires dans leur grande diversité et complexité (figure 15):

- Description morphologique et quantitative des populations normales du sang ou autres échantillons (taille, granularité) ;
- Analyse des antigènes de différenciation leucocytaire (expression quantitative d'un marqueur) ;
- Etude fonctionnelle de la naissance, de la vie et de la mort cellulaires (marquage de la viabilité, étude du cycle cellulaire);
- Description des mécanismes de signalisation cellulaire et de différentes fonctions cellulaires ;
- Diagnostic et surveillance des immunopathologies (déficits immunitaires, maladies auto-immunes, immunologie des greffes/transplantations, maladies lympho-prolifératives, hypersensibilités, maladies hématologiques, cancers) et de leurs immunothérapies.

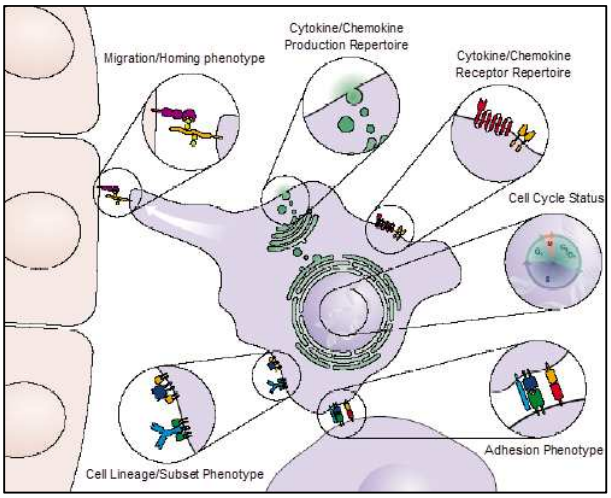


Figure 15 : Caractérisation cellulaire par cytométrie en flux. *La cytométrie en flux est capable, entre autres, de caractériser : une lignée ou un sous-type cellulaire, le statut d'un cycle cellulaire, la production et l'expression de récepteurs et médiateurs cellulaires, ou des phénotypes de migration et/ou d'adhésion (Adapté de* [56]*).*

La cytométrie (de « *cyto* » : cellule et « *métrie* » : mesure) consiste en l'analyse objective, quantitative et multiparamétrique de particules en suspension (cellules, levures, bactéries ou constituants cellulaires) dans un mélange de plusieurs éléments. En cytométrie en flux, tout composant peut être analysé tant qu'il peut être marqué par un composé couplé à un marqueur fluorescent et détecté par un faisceau laser [126]. En effet, la cytométrie en flux combine le principe de détection de la fluorescence à des moyens fluidiques, optiques et informatiques, qui lui permettent l'analyse simultanée de plus d'une dizaine de paramètres, à très grande vitesse (de 500 à 10 000 cellules par seconde) [127].

La cytométrie en flux est une technique puissante d'analyse cellulaire, qui réunit les cinq caractéristiques essentielles d'une technique analytique : l'analyse quantitative, la sensibilité de détection, la vitesse d'acquisition, l'analyse simultanée de plusieurs paramètres, et le tri des cellules. La cytométrie en flux est donc une méthode complète, utile dans le cadre de la thèse, pour explorer l'activité cellulaire du système immunitaire au cours des pathologies infectieuses.

1.4.2. Enjeux liés au prélèvement de l'échantillon

Le prélèvement de sang est considéré comme un acte modérément invasif, qui est universellement pratiqué. Cependant il requiert un personnel qualifié, du matériel (aiguille, tube de collection avec anticoagulant pour la cytométrie en flux), et implique le prélèvement d'au moins 4 millilitres (sauf tubes spéciaux pour nourrissons).

Une alternative est la prise de sang au bout du doigt, après piqûre à l'aide d'une lancette, qui est considérée comme un acte très peu invasif, et qui est universellement pratiquée par les diabétiques. Il ne nécessite pas de personnel qualifié, le matériel est très économique, et le prélèvement ne représente que quelques microlitres. En revanche, le test doit être pratiqué immédiatement car le sang n'est pas anti-coagulé.

Pour tous ces avantages, cette dernière méthode est aussi utilisée chez les nouveaux-nés (test de Güthrie), où la goutte de sang est ensuite déposée et séchée sur un papier buvard (*Dried Blood Spots*), afin d'analyses métaboliques et parfois génomiques.

Idéalement, un test « au lit du patient » devrait pouvoir utiliser un échantillon de sang pris au bout du doigt (il serait même intéressant de pouvoir analyser les cellules sanguines séchées sur un Dry Blood Spot). Il faudra cependant être attentif à ce que le sang capillaire donne la même information que le sang veineux, sachant que leur composition peut être légèrement différente.

1.4.3. Enjeux liés à la préparation de l'échantillon

Tout échantillon biologique peut être considéré, mais la reconnaissance des populations du sang total est la plus répandue car la plus adaptée à la routine et aux grandes séries d'échantillons [124,128]. En effet, travailler avec d'autres échantillons, comme les Cellules Sanguines Périphériques Mononuclées (PBMC) par exemple, est plus long car cela implique de les isoler préalablement d'un échantillon sanguin total, et de les dénombrer pour en optimiser la préparation et l'analyse.

Pour simplifier les procédures de routine dans les laboratoires, les tests sont donc préférentiellement développés pour des échantillons de sang total (figure 16). Seuls les réactifs utilisés nécessitent alors d'être adaptés, sans que cela ne modifie les caractéristiques structurelle et fonctionnelle des cellules :

- D'une part, l'utilisation de sang total implique une « lyse » des globules rouges, avec un produit de lyse ajouté à une étape déterminée. Ce peut être par exemple du chlorure d'ammonium, un choc osmotique, un choc acide, des détergents, ou d'autres réactifs aminés cycliques, qui, en contact avec les globules rouges, deviennent hautement lytiques pour ces cellules ;
- D'autre part, les antigènes des globules blancs restants sont reconnus par des anticorps dirigés spécifiquement contre eux et couplés à des molécules fluorescentes, les fluorochromes ; c'est l'étape de « marquage ». Il peut arriver que le marquage reconnaisse des antigènes de surface des globules blancs, ou bien des antigènes intracellulaires, nécessitant ainsi que les globules blancs soient également perméabilisés ;
- Parfois, des étapes intermédiaires et finales de lavage de l'échantillon sont réalisées pour avoir une analyse de qualité.



Figure 16 : Protocole de préparation d'un échantillon de sang total pour analyse en cytométrie en flux. *Exemple d'un protocole de préparation pour réaliser un marquage d'antigènes extracellulaires avec les étapes conventionnelles de marquage, lyse et lavage, et leurs temps d'incubation (en minutes).*

Le protocole standard de préparation des cellules pour un marquage extracellulaire est constitué de 3 étapes, dont une étape de lavage. Il se réalise en 35 minutes à 50 minutes, et requiert d'être manipulé dans un laboratoire spécialisé, avec du matériel spécifique et par un personnel qualifié. Egalement, même si le sang total reste un échantillon plus simple à analyser, le prélèvement de sang veineux reste une étape préalable sensible car demandant un personnel médical formé et du matériel précis à disposition.

Même si la cytométrie de flux s'avère être une technique de choix pour l'analyse des marqueurs de la thèse, son protocole de préparation de l'échantillon n'est pas adéquat. L'un des objectifs de la thèse doit être en effet de simplifier au maximum cette étape de collection et de préparation de l'échantillon, et d'en optimiser chacun des réactifs, pour se rapprocher d'une procédure facilement réalisable au lit du patient. La procédure qui sera optimisée sera celle de préparation d'un échantillon de sang total pour un marquage de ses antigènes extracellulaires, car l'on va chercher à détecter les marqueurs CD64, CD169 et HLA-DR exprimés à la surface des cellules immunitaires.

1.4.4. Enjeux liés à la lecture de l'échantillon

Préparé, l'échantillon est analysé par un appareil appelé cytomètre en flux (figure 17). Pour fonctionner, un cytomètre en flux combine trois systèmes techniques : fluidique, optique et électronique.

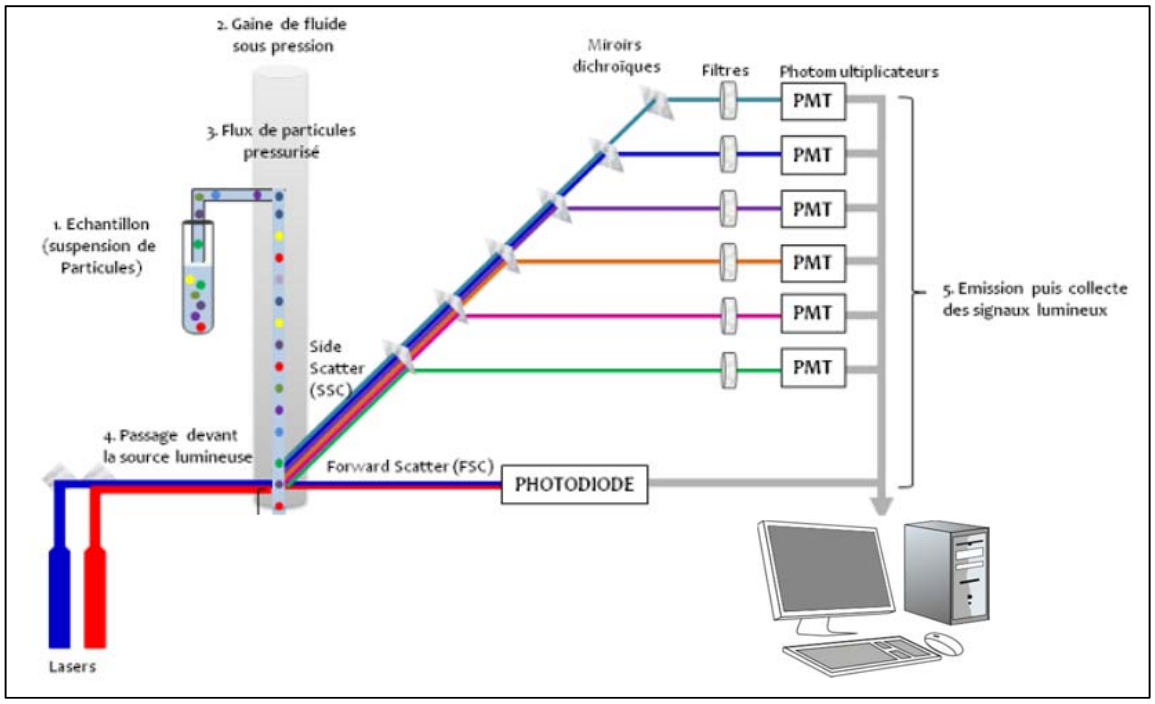


Figure 17 : Principe d'un analyseur en cytométrie en flux. *1) L'échantillon à analyser est une suspension hétérogène de particules. 2) Le liquide de gaine permet d'aligner les cellules de l'échantillon. 3) Le flux de particules sous pression passe alors devant la cellule de mesure. 4) Les lasers sont des sources lumineuses qui vont exciter les particules qui passent une à une. 5) La lumière diffusée va être recueillie dans différents canaux et puis convertie en signal électrique par des systèmes électroniques. Le traitement informatique va associer ces signaux à des caractéristiques cellulaires (Adapté de* [56]*).*

Le système de distribution de l'échantillon du cytomètre en flux est un système de fluides sous pression qui va aspirer puis injecter les cellules au cœur d'un étroit flux laminaire. Ce liquide entraineur, en s'écoulant dans une buse conique décroissante, oriente les cellules et les aligne les unes derrière les autres dans un fin capillaire [129]. Ce centrage hydrodynamique permet de diriger l'échantillon préparé dans une cellule de mesure devant un faisceau laser étroit [124], généralement ou bien d'argon, émettant à 488 nm, ou bien d'Hélium-Néon, émettant à 633 nm, ou bien ultra-violet, émettant à 405 nm. Les cellules, ou autres particules en suspension marquées par un ou plusieurs fluorochromes, traversent la cellule de mesure une à une à très grande vitesse, où elles sont excitées par le ou les lasers de l'appareil.

Chaque cellule engendre alors des signaux lumineux qui vont être corrélés à ses caractéristiques cellulaires. D'une part, les cytomètres classiques réceptionnent la lumière diffusée orthogonalement au faisceau incident (S*ide Scatter* - SS) et la lumière diffusée en avant par la particule (*Forward Scatter* - FS). Le FS est corrélé à la taille de la particule qui passe dans le faisceau de lumière et le SS correspond à la complexité de la particule (granulosité, présence d'organites pour les cellules). D'autre part, la lumière émise par le fluorochrome excité est aussi recueillie orthogonalement au faisceau incident. Ces différents signaux optiques émis par la cellule sont sélectionnés par différents circuits optiques (ou canaux), grâce à une alternance de miroirs dichroïques et de filtres.

Toutes les longueurs d'ondes réémises sont recueillies par des photomultiplicateurs (PMT) qui augmentent et collectent les signaux lumineux avec une très grande sensibilité, permettant ensuite l'enregistrement par l'ordinateur de l'intensité de chaque signal pour un évènement.

Il est facile de comprendre que les 3 systèmes qui composent le cytomètre en flux impactent directement sur la sensibilité et la vitesse d'analyse des résultats, puisque c'est cette succession d'étapes, associée au choix des meilleurs fluorochromes, qui permet une étude précise des caractéristiques cellulaires. Cependant, l'assemblage des systèmes fluidiques, optiques et électroniques rend les cytomètres en flux massifs et complexes de maintenance.

La cytométrie en flux requiert l'utilisation d'un appareil hautement résolutif et puissant, mais dont l'utilisation reste complexe. Dans le cas d'une machine utilisable « au lit du patient », il est important de pouvoir simplifier les composantes du cytomètre en flux pour gagner en facilité d'utilisation et en taille, mais sans en perdre la robustesse et le pouvoir analytique. Bien que cette simplification ne soit pas le travail principal de la thèse, le choix des meilleurs conjugués anticorps-fluorochromes reste obligatoire pour maximiser le potentiel de détection de l'appareil.

1.4.5. Enjeux liés à l'analyse de l'échantillon

Les valeurs numériques issues des cytomètres en flux sont stockées par l'informatique dans des supports divers, pour permettre à l'utilisateur d'analyser le résultat de son étude. Après sélection des sous-populations à l'aide de « fenêtres » (ou « *gates* »), des logiciels spécialisés et appropriés présentent les résultats sous deux formes (figure 18) :

- les histogrammes monoparamétriques, où le nombre de cellules est exprimé en fonction de l'intensité du signal observé pour un fluorochrome ;
- les histogrammes biparamétriques, présentant deux signaux simultanément.

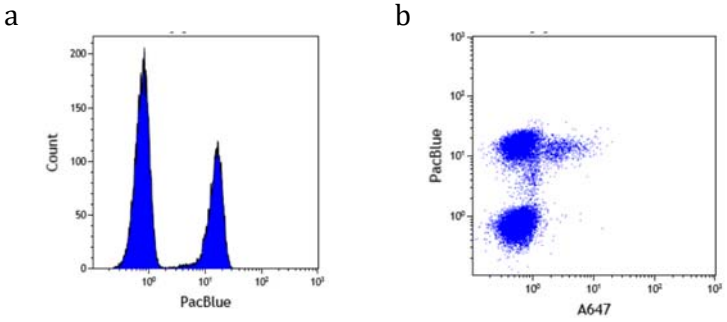


Figure 18 : Histogrammes mono et bi-paramétriques de cytométrie en flux. *a) Histogramme monoparamétrique exprimant le nombre de cellules comptées en fonction de leur intensité de signal en fluorochrome Pacific Blue. Deux populations sont distinguées : la population « positive » pour le marqueur, dont le signal est fort (autour de 10^1) et la population « négative » dont le signal est faible (autour de 10^0). b) Histogramme biparamétrique corrélant les signaux en Pacific Blue et en Alexa Fluor 647 (A647). On retrouve les informations de l'histogramme monoparamétrique (deux populations en Pacific Blue), mais des informations supplémentaires sont données sur ces mêmes cellules selon si elles expriment ou non en plus le fluorochrome Alexa Fluor 647. Quatre populations sont donc distinguées sur ce type d'histogramme : la population « double-positive », la « positive-négative », la « négative-positive » et la « double-négative ».*

L'analyse permet de récupérer des statistiques concernant chacune des populations cellulaires, tels que le pourcentage de cellules et leur moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) [129]. Cette analyse est manuelle, et nécessite l'intervention d'un opérateur pour sélectionner les résultats à lire sur les populations d'intérêt.

Dans le cadre de la thèse, l'enjeu sera de réussir à automatiser l'analyse des résultats des histogrammes de cytométrie en flux, pour collecter le signal spécifique de fluorescence émis par les cellules en cas d'infections et alors reconnues par les anticorps couplés à un fluorochrome. Dans le cas d'un test « au lit du patient », l'opérateur ne doit pas avoir à faire d'analyse manuelle, mais l'appareil doit être capable de la faire automatiquement en fonction des niveaux des marqueurs.

1.4.6. Besoins techniques d'un outil «au lit du patient»

L'utilisation d'outils pour le diagnostic étiologique des pathologies infectieuses a permis de mieux appréhender ces maladies cliniquement et ainsi réduire les proportions de patients traités de manière empirique avec des antibiotiques. L'association mondiale de la santé a reconnu l'importance voire l'obligation de se baser sur des tests diagnostiques « au lit du patient » pour déterminer la prise en charge et le traitement des patients fébriles [54,130]. Leur développement a été souligné comme un besoin majeur de santé par le président des Etats-Unis, car la mortalité et la morbidité de ces pathologies fébriles restent encore considérables chaque année dans le monde.

Pour améliorer le diagnostic d'un patient présentant de la fièvre, un consortium d'experts de diagnostic et de santé mondiale s'est réuni pour déterminer un consensus sur les caractéristiques que doit avoir un test « au lit du patient » pour discriminer l'étiologie d'une infection [130]. Différents niveaux de priorité (haute, moyenne, basse, très basse) et d'acceptabilité (minimale/acceptable ou idéale/désirée) ont été accordés à chacune des 35 caractéristiques définies (tableau 13).

Tableau 13 : Profil cible du test « au lit du patient » pour identifier l'étiologie d'une infection. *Caractéristiques acceptables et désirées définies par le consensus pour a) les exigences scientifiques du test, et b) les exigences techniques du test (Tiré de* [130]*).*

a

Characteristic	Acceptable ("must have")	Desired ("would like")	Reference
Goal	Rapid, biomarker-based testing to differentiate between bacterial and non-bacterial infections to guide antimicrobial treatment.[a]		Expert consensus
Target population	Children with non-severe, non-malarial acute fever presenting at health facilities. [b,c,d]	Total febrile population (including neonates) presenting with fever. [b,c,d]	[4,35]
Target level of health system	Level 1, passive case finding	Level 0	[37]
Target user	Healthcare worker	Trained lay person	[38]
Price of individual test (Ex works)	5 USD [e]	<1 USD [e]	Expert consensus
Analytical sensitivity/Limit of detection	Limit of detection should be such that it allows clinically relevant performance as defined below		Expert consensus
Diagnostic sensitivity to differentiate between bacterial and non-bacterial infections	≥90%	≥95%	Expert consensus
Diagnostic specificity to differentiate between bacterial and non-bacterial infections	≥80%	≥90%	Expert consensus

[a] Biomarker: nucleic acid, proteins or any other analytes that is found to be able to differentiate between bacterial and non-bacterial infections

[b] Non-severe: definition according to IMCI guidelines[34]

[c] Acute fever: less than 14 days

[d] Fever: >37.5°C at presentation or within last 48h

[e] Ex works as defined by Incoterms 2010 standards

b

Characteristic	Acceptable ("must have")	Desired ("would like")	Reference
Multiplexing	≥1 analyte	≥1 analyte plus pathogen specific testing (priority: malaria)	Expert consensus
Ease of test performance	≤2 timed steps during assay performance	No timed step during the assay performance	Expert consensus
Sample type	Capillary blood or urine	Capillary blood or any less invasive sample than blood, like: Saliva	Expert consensus
Volume	- Capillary blood: - patients > 6 years[41] - 100µL (~ 4 drops); - pediatric patients 2–6 years[41]– 50–100µL (~2 drops); - Saliva: < 0.5mL - Urine: ~1mL of urine	- Capillary blood: 25µL (~1 drop) for all age groups - Saliva: <0.5mL for saliva	Expert consensus
Sample collection	Transfer and quantification device included in the test		Industry standard
Additional sample preparation	1 sample-processing steps	None required	Expert consensus
Kit configuration	No additional reagents outside of the kit required (including gloves)		Industry standard
Process control	Internal control to provide test validity and acceptance		Expert consensus
Batch/Quality control	Positive and negative controls required to monitor the quality of kit		Expert consensus
Reagent preparation	- Minimal of one additional step to prepare prior to use - No (precise) measuring required.	No additional reagents required, everything is provided ready-to-use	[32]
Time to result (per sample)	<2 hours	<10min	Expert consensus, Ivanova *et. al*. in preparation
Hands on time	Total hands-on-time should be <5 min	Total hands on time should be <1 min	Expert consensus
Sample throughput	Ability to test individual samples or multiple samples if needed (no need for batching)		Expert consensus
Result stability	≥15 min	≥1 hour	Industry standard
Assay type	Qualitative	Quantitative	Expert consensus
Biosafety	No need for a biosafety cabinet; basic safety procedures need to be followed		[42]
Waste disposal	Biohazard waste	- Testing device - Compostable plastics for minimal environmental impact	[42]
Storage conditions and Self-life	- 12 month at fluctuating temperature (0–40°C) - ≤90% relative humidity - No controlled temperature required	- 24 month at fluctuating temperature (0–50°C) - ≤90% relative humidity - No controlled temperature required	Expert consensus
Operation conditions	- Between 5°C—40°C - ≤90% humidity	- Between 5°C—45°C - ≤90% humidity	Expert consensus
Shipping conditions	Shipping without cold chain; should tolerate stress during transport (<72h at +50°C)		Expert consensus
Training requirements[a]	<2 days including proficiency panel	<0.5 day including proficiency panel	[32]
Equipment (instrument external to test)	Small, robust, dust-resistant, portable or hand-held integrated instrument that must operate on battery	Reusable instrumentation not required	Expert consensus
Power supply	Battery or solar powered	None required	[32]
Water supply	No external water required		Industry standard
External maintenance	- Preventative maintenance at 2 year or >4000 samples; simple with only minimal expertise - Maintenance alert should be included.	None required	Industry standard
Calibration	Remote calibration or auto-calibration	No calibration required	Industry standard
Data output	Qualitative	Non-ambiguous results displayed (e.g. bacterial/non-bacterial–yes or no)	Expert consensus
Data interpretation[b]	Minimal interpretation required	No interpretation required	Expert consensus
Connectivity	Not required	Wireless connectivity	Isaak *et. al*. in preparation
Reproducibility	>95% standard deviation between repeats		[43]

[a] Training to use the test, not including clinical/treatment implications and consequences.

[b] Interpretation of the test result, not the clinical/treatment conseque

De manière idéale, le test doit convenir pour des patients de tout âge, dont les nouveau-nés, et doit pouvoir être effectué par un personnel même non-formé. Le résultat doit être donné avec une haute sensibilité (> 90%) pour détecter précocement les besoins thérapeutiques et ainsi en améliorer les résultats. Ce besoin doit être combiné avec une spécificité décente (> 80%) pour limiter quand même le nombre de faux positifs ; cela constituerait déjà une amélioration considérable par rapport à la situation actuelle, où, par exemple, en Asie du Sud Est, 38% des patients fébriles reçoivent des antibiotiques, toutes étiologies infectieuses confondues, et en Afrique, jusqu'à 50 à 80% [130].

D’un point-de-vue technique, obtenir du sang veineux pourrait s’avérer compliqué pour tester des enfants, alors que réaliser le test à partir de sang capillaire permettrait de gagner en facilité de collection et de réduire l’invasivité de la procédure. De même, idéalement, le temps entre ce prélèvement de l’échantillon et le résultat final, qui englobe donc la préparation de l’échantillon, sa lecture et son analyse, ne doit pas dépasser le temps d’une consultation (entre 15 minutes et 2h maximum selon les établissements médicaux). De plus, pour pouvoir multiplier le nombre de tests réalisés en situation de crise, le temps de travail nécessaire à la réalisation ne doit pas dépasser 5 minutes.

Bien entendu, le développement d’un outil « au lit du patient » pour discriminer les différentes étiologies d’une infection ne doit pas se faire au détriment de tests identifiant précisément le pathogène ou de marqueurs témoins de la sévérité de l’infection.

Un outil « au lit du patient » pour discriminer les infections bactériennes et virales doit donc combiner des exigences scientifiques, pour rendre un résultat précis, avec des exigences techniques, de facilité, rapidité, reproductibilité et standardisation d’emploi. Dans le cadre de la thèse, la technique de cytométrie en flux devra être optimisé selon ces axes de développement.

Conclusion 1.4

La cytométrie en flux est un outil d'analyse très puissant et rapide, qui comporte de nombreuses applications cliniques. En effet, il est possible d'étudier des populations cellulaires variées du sang, grâce à la disponibilité d'anticorps dirigés contre les marqueurs de surface et les protéines intracellulaires des leucocytes. Ainsi, la cytométrie en flux est un outil intéressant dans le but de détecter des anomalies d'expression de biomarqueurs immunologiques chez les patients infectés. Le diagnostic précis de l'étiologie infectieuse est toutefois un enjeu critique de santé mondiale, où l'une des solutions reste le développement de nouveaux outils « au lit du patient ». L'hypothèse de la thèse est qu'il est possible d'optimiser la technique de cytométrie en flux courante en une méthode « au lit du patient ».

1.5. Problématique du sujet de thèse

La complexité clinique des maladies infectieuses réside dans la détermination du pathogène responsable de l'infection, due, d'une part, à la difficulté de différencier des tableaux cliniques ressemblants, et, d'autre part et principalement, aux manques des techniques actuelles. La prise en charge et le traitement des patients infectés posent donc un enjeu majeur de santé publique puisqu'ils dépendent directement de ce diagnostic étiologique. Notamment, ils s'inscrivent dans la problématique mondiale de lutte contre l'émergence d'antibiorésistances face à l'utilisation inappropriée des antibiotiques.

Face à ce contexte, il apparaît nécessaire de trouver un test spécifique qui serait applicable au diagnostic de l'étiologie des infections bactériennes et virales. Le travail préliminaire suggère que de nouveaux marqueurs biologiques, les CD64, CD169 et HLA-DR, mesurables grâce à une nouvelle technique robuste de cytométrie en flux, pourraient faciliter le diagnostic des infections bactériennes et virales.

La problématique de la thèse, comme annoncé en introduction, est donc de savoir s'il est possible de discriminer les infections bactériennes et les infections virales par un test de cytométrie en flux aussi, voire plus performant, mais surtout plus rapide et non délocalisé (« au lit du patient ») que les tests existants.

Les objectifs de la thèse sont donc les suivants :

- *Mettre au point une technique de cytométrie en flux « au lit du patient », avec des étapes et des réactifs bien caractérisés, et une facilité d'utilisation et une robustesse démontrées, s'approchant des critères consensuels publiés ;*
- *Evaluer les voies d'activation et les rôles des biomarqueurs CD64 et CD169 dans la réponse anti-infectieuse ;*
- *Appliquer et valider la méthode de cytométrie en flux « au lit du patient » pour la mesure des biomarqueurs CD64, CD169, HLA-DR et autres, dans des cohortes cliniques de patients infectés.*

2. Résultats de la recherche

2.1. Mise au point d'une technique de cytométrie en flux « au lit du patient »

2.1.1. Faisabilité du protocole « au lit du patient »

La cytométrie en flux s'impose comme la technique de choix pour l'analyse des phénotypes et des fonctions cellulaires. Cependant, elle peut s'avérer problématique dans certaines configurations des environnements cliniques.

L'objectif du travail a été de standardiser et rendre utilisable « au lit du patient » le protocole de marquage extracellulaire standard de cytométrie en flux.

L'hypothèse faite est que l'on peut combiner toutes les étapes du protocole standard en une seule étape unique, grâce à l'utilisation d'une lyse innovante, n'abîmant pas les leucocytes, stable à température ambiante, et permettant donc de réaliser simultanément l'étape de marquage et l'étape de lyse des globules rouges. De plus, la réduction des volumes de réactifs et des temps d'incubation, le séchage des anticorps conjugués, la suppression du pipetage et la conservation des réactifs à température ambiante, permettraient de rendre la cytométrie en flux plus adéquate à l'environnement clinique infectieux.

Cette étude a fait l'objet d'une première publication, dans la revue *Journal of Immunological Methods*, intitulée : « **Un nouveau marquage extracellulaire en une étape pour la cytométrie en flux : preuve de concept sur des marqueurs liés au sepsis** » (figure 19).

Journal of Immunological Methods 470 (2019) 59–63

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Immunological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jim

Technical Note

A novel one-step extracellular staining for flow cytometry: Proof-of-concept on sepsis-related biomarkers

Pénélope Bourgoin[a], Jack Hayman[b], Thomas Rimmelé[c], Fabienne Venet[b], Fabrice Malergue[a,*], Guillaume Monneret[b]

[a] Department of Research and Development, Beckman Coulter-Immunotech, Marseille, France
[b] Hospices Civils de Lyon, Edouard Herriot Hospital, Immunology Laboratory, Lyon, France
[c] Hospices Civils de Lyon, Edouard Herriot Hospital, Surgical Intensive Care Unit, Lyon, France

ARTICLE INFO

Keywords:
One-step protocol
Whole blood analysis
Flow cytometry
Sepsis
CD64
HLA-DR

ABSTRACT

Background: Flow cytometry is a powerful analytical technique. However, it requires time-consuming, multi-step sample procedure. A new protocol was developed to perform extracellular staining and red blood cell lysis in one step, using dry antibodies. Common markers of white blood cells as well as sepsis biomarkers were tested as a model for modulated antigen expression.

Methods: Peripheral blood was stained using the reference and the one-step methods. Recruitment and staining of CD3-, CD4-, CD8-, CD14-, and CD15-positive cells were analyzed. Then, protocol modifications were tested for optimization. Finally, the one-step method was evaluated on subjects in septic conditions, by measuring expressions of CD64 and of HLA-DR.

Results: No statistical differences were observed between methods when comparing the proportions of cells. The procedure was optimized by decreasing blood volume from 100 µL to 5 µL, lysis from 1 mL to 500 µL, and time from 30 to 15 min. In the blood samples from septic subjects, an increase of CD64 on neutrophils and a decrease of HLA-DR on monocytes were observed.

Conclusions: The one-step method, described here-in, enables an accurate, streamlined flow cytometry sample preparation protocol. The simplified phenotyping procedure reduces training requirements and could help overcome logistic constraints in many flow cytometry applications.

1. Introduction

Many research fields increasingly use flow cytometry for its diversity of applications (Baumgarth and Roederer, 2000). However, this powerful cellular analysis technique requires time-consuming sample preparation with inherent sources of human variability, even for the comparably simple protocol of extracellular staining. To date, the vast majority of sample preparation for a whole blood extracellular staining consists of three steps according to the manufacturer's recommendations: first, staining of the white blood cells (WBC) with antibodies, then another incubation for lysis of red blood cells (RBC) with an appropriate buffer, and finally an optional washing step to reduce non-specific fluorescence. In addition, several milliliters of anti-coagulated blood need to be sampled, frequently with subsequent transportation of tubes to a central laboratory, consuming hours or days.

In this study, combining extracellular staining and RBC lysis in a "one-pot" procedure was evaluated, without a subsequent washing step, to address the previously mentioned issues.

2. Material and methods

2.1. Comparison between reference and one-step protocols

For the preliminary evaluation at Immunotech (Marseille, France), EDTA blood samples from five healthy volunteers from the Saint Joseph Hospital (Marseille, France) were tested upon informed consent according to the reagent manufacturer's instructions, all from Beckman Coulter (Brea, California, USA): 100 µL of blood was stained and incubated 15 min at room temperature in the dark with anti-CD3-Allophycocyanin (APC) (clone UCHT1), anti-CD4-Phycoerythrin (PE)

Abbreviations: APC, Allophycocyanin; FITC, Fluorescein Isothiocyanate; HV, Healthy Volunteers; KO, Krome Orange; MFI, Mean of Fluorescence Intensity; mHLA-DR, HLA-DR on monocytes; nCD64, CD64 on neutrophils; Opt., Optimization; PE, Phycoerythrin; PBE, Pacific Blue; RBC, Red Blood Cells; WBC, White Blood Cells

* Corresponding author at: Address: 130 Avenue de Lattre de Tassigny, 13009 Marseille, France.
E-mail address: fmalergue@beckman.com (F. Malergue).

https://doi.org/10.1016/j.jim.2019.05.001
Received 30 January 2019; Received in revised form 25 March 2019; Accepted 8 May 2019
Available online 10 May 2019
0022-1759/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

(clone 13B8.2), anti-CD8-Krome Orange (KO) (clone B9.11), anti-CD14-Pacific Blue (PBE) (clone RMO52) and anti-CD15-Fluorescein Isothiocyanate (FITC) (clone 80H5), at their recommended doses. Then, RBC were removed using 1 mL of Versalyse lysing solution, incubating for 15 min at room temperature.

In the one-step procedure, 100 µL of the same whole blood samples were diluted with the same antibody mix and 1 mL of Versalyse, and incubated for 30 min in the dark. Procedure modifications were also evaluated: antibodies were diluted with either 500 µL or 1 mL of Versalyse, and either 5, 50 or 100 µL of whole blood were treated. The samples were incubated for 15 or 30 min in the dark.

2.2. One-step method for CD64 and HLA-DR assessment on sepsis samples

Anti-CD64-PBE (clone 22) or anti-HLA-DR-PBE (clone Immu-357) were carefully titrated in the one-step method Optimization 3, then separately converted into a “glassified” layer at the bottom of each testing tube, using a drying process, called DURA Innovations technology (Beckman Coulter Inc.) (Correia et al., 2018; Pitoiset et al., 2018), to reduce sources of human error and variability.

First, levels of nCD64 and mHLA-DR in this dried formulation were compared between the reference method and the optimized one-step technique at Immunotech on 5 healthy volunteers from the Saint Joseph Hospital (Marseille, France).

Then, for the application of the method at Edouard Herriot Hospital Immunology Laboratory (Lyon, France), leftover EDTA blood samples from 11 subjects with septic conditions, admitted to the surgical Intensive Care Unit in Edouard Herriot Hospital (Lyon, France), were collected within 24 h after admission. The results presented herein belong to the IMMUNOSEPSIS study (registered as NCT02803346 at ClinicalTrials.gov). As a control group, 11 healthy volunteers were included in the study upon informed consent.

When needed, 500 µL of Versalyse and 5 µL of whole blood were added to the DURA tubes, and the samples were incubated for 15 min in the dark.

2.3. Flow cytometric data acquisition and statistical analysis

Data were collected on a 3-laser, 10-color Navios flow cytometer and analyzed using Kaluza Software version 2.1 (Beckman Coulter Inc.). Comparison of quantitative variables was performed using a paired Student *t*-test, and by Anova for more than two groups. Correlations were evaluated using the Pearson's correlation coefficient. The statistical analyzes were performed using Jump software.

3. Results

Leucocytes subsets have been compared between one-step and reference two-step techniques: CD3+ lymphocytes, CD3+ CD4+ lymphocytes, CD3+ CD8+ lymphocytes, CD14+ monocytes and CD15+ neutrophils. Representative plots are shown in Fig. 1 and detailed statistics are given in Supplementary Table 1. No statistical differences between percentages and numbers of positive-gated cells were observed, meaning that results obtained with the reference and one-step methods were equivalent.

Then, antibody concentration was doubled by decreasing blood volume from 100 µL to 50 µL and lysis volume from 1 mL to 500 µL, but retained 30 min of incubation time (optimization 1). Because the new method combines lysis and staining steps, total experiment time was decreased from 30 min to 15 while keeping a two-fold antibody concentration (optimization 2). The protocol was also tested on a whole blood volume of 5 µL (close to that of a finger-stick), keeping the antibodies concentrated two-fold and reducing incubation time to 15 min (optimization 3). The main parameters of variation between the three methods are summarized in Table 1.

Comparing these three incremental optimizations with the one-step method previously assessed, no statistical differences between the percentages of positive-gated cells were observed, meaning that all methods offer equivalent staining results (Table 2). Numbers of cells are given for more informations.

The signal-to-noise ratios for each marker were calculated for each technique and detailed statistics are given in Supplementary Fig. 1.

The optimized one-step technique 3 (5 µL of blood in 500 µL of Versalyse within 15 min) was finally combined with DURA technology to provide a ready-to-use tube, stable at room temperature. The expressions of CD64 on neutrophils (nCD64) and of HLA-DR on monocytes (mHLA-DR) were first compared between the reference and the optimized one-step method 3, and then studied in 11 subjects in septic shock conditions (3 females / 8 males). Briefly, at onset of shock, the mean age was 72 years, mean Simplified Acute Physiology Score (SAPS) II was 59, and the mean Sequential Organ Failure Assessment score was 11. Four patients (36%) died within 28 days. Flow cytometry results are presented in Fig. 2.

When compared to reference protocol, nCD64 and mHLA-DR levels obtained with the one-step method are not significantly different.

When evaluated in blood from subjects under sepsis conditions, nCD64 level showed a significant increase ($p < .001$) while mHLA-DR expression was significantly decreased (p: 0.005) as compared to healthy volunteers.

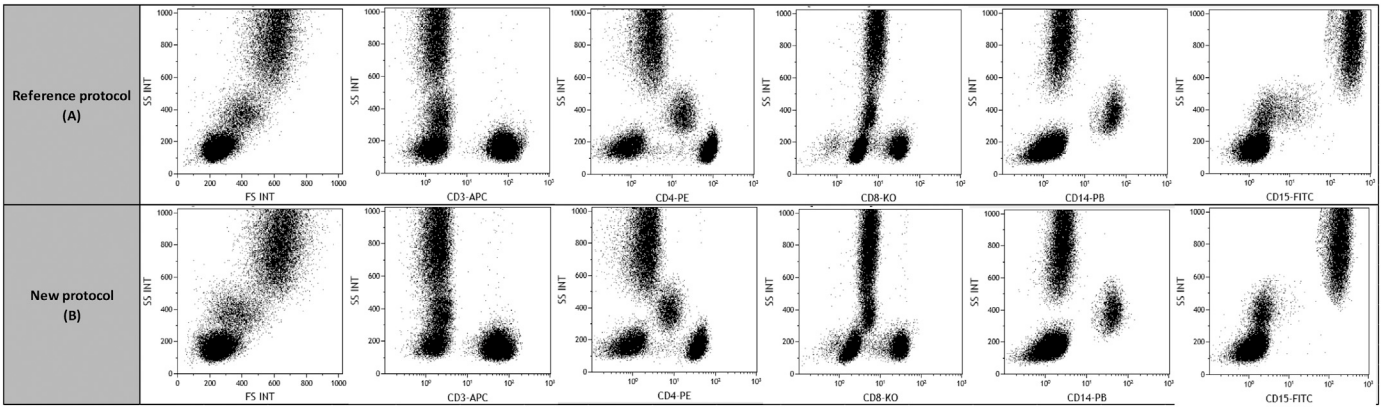


Fig. 1. Analysis of common markers. Representation of the expressions of CD3, CD4, CD8, CD14 and CD15 on leucocytes. Comparison is done between (A) reference protocol and (B) new one-step protocol.

Table 1
Optimizations of the one-step method. Variation parameters are recapitulated for each of the three optimizations (Opt.) in comparison to the one-step method, including lysis volume, blood volume and time of incubation.

	One-step method	One-step method Opt.1	One-step method Opt.2	One-step method Opt.3
Lysis volume (μL)	1000	500	500	500
Blood volume (μL)	100	50	50	5
Time of incubation (minutes)	30	30	15	15

4. Discussion

The study presents a novel one-step method of extracellular staining for flow cytometry. To our knowledge, this is the first time a technique combining WBC staining and RBC lysis has been reported. The aim of the study was to achieve a simpler and faster protocol that may help to democratize use of flow cytometry.

Some authors have already tried to solve the question of having only one step, proposing to remove the lysis step, but necessitating a dedicated flow cytometer (Petriz et al., 2018). The new technique achieved a 15 min one-step sample preparation that reduces overall time required by half, while keeping the important step of lysis, offering a faster extracellular staining protocol for flow cytometry, applicable on any instrument. Some authors have pointed out that cell biology or integrity may be impacted (Breslin et al., 2013); here, the lysis used in the one-step procedure has components that are specifically cleaved by an enzyme uniquely present in RBC membranes, thus that does not affect WBC. Cells of interest are maintained at neutral pH and isotonic conditions.

A good correlation is observed between the percentages of leucocyte subsets gated as positive by the new method and by all of its modifications (increasing antibody concentration, decreasing incubation time and decreasing blood volume), when compared to the traditional reference procedure. No differences in cell numbers were also observed, except, logically, in the procedure using less blood. As expected, signal-to-noise ratios obtained with the tested conjugates show some significant differences between methods, since it depends on each antibody's affinities and concentration. Indeed, in the preliminary evaluation, doses of each antibody were based on manufacturer's recommendations, in order not to introduce a bias between the different methods, but obviously a titration of each antibody in the chosen method could improve the signal-to-noise ratio. This was applied in the second phase of the study to maximize the discrimination of CD64 and HLA-DR antibodies.

Finally, in a proof-of-concept preliminary study, the new optimized method was evaluated with two established biomarkers in the sepsis field and exhibited the expected results: nCD64 level increases in subjects in septic conditions or acute infections (Jämsä et al., 2018), and diminished mHLA-DR is a reliable indicator in research for identifying immunosuppression (Demaret et al., 2013; Monneret and Venet, 2014). Despite an abundant literature, their measurements by flow cytometry do not appear as popular as it should. The new method described here could help fulfill requirements for quantifying such biomarkers with flow cytometry (Dittrich et al., 2016). For instance, using as little as 5 μL of blood could allow use of capillary blood from a fingerstick, reducing the material needed for sampling, and may eliminate time required to transport blood to the laboratory, in case a point-of-care flow cytometer would be available. Using Versalyse and dried conjugates enables room-temperature storage and removes the need for pipetting.

By nature, a proof-of-concept study has limitations: only CD64 and HLA-DR biomarkers were measured; other markers should be assessed

Table 2
Percentages and numbers of positive cells. Mean on five healthy donors of the percentages and numbers of positive gated cells for the one-step method and the three optimizations. Results are presented as mean and Inter Quartile Range between brackets. *P*-values are calculated using ANOVA test, and are considered statistically significant if < 0.05.

	One-step method	One-step method Opt.1	One-step method Opt.2	One-step method Opt.3	ANOVA p-value
CD3+ lymphocytes					
%	30,98 [18,74-49,21]	31,38 [18,78-49,45]	30,66 [18,29-48,4]	29,68 [16,67-46,04]	0,9967
Number	*14,791 [6602–22,390]*	*14,617,2 [6439–22,597]*	*14,226,8 [6237–21,636]*	*1884,8 [813–2781]*	
Among CD3+ cells					
CD4 + CD3+					
%	59,07 [31,37-82,19]	58,7 [30,69-89,39]	58,8 [31,68-82,83]	58,28 [32,11-81,43]	0,9999
Number	*8368,6 [4100–11,608]*	*8213,8 [3845–11,480]*	*7983 [3972–10,991]*	*1050,6 [553–1503]*	
CD8 + CD3+					
%	37,29 [14,87-64,5]	37,93 [15–65,3]	37,46 [14,46-63,81]	38,41 [16,36-63,88]	0,9997
Number	*5875 [982–10,155]*	*5904,2 [966–10,498]*	*5695,4 [902–9840]*	*769,8 [133–1265]*	
CD14+ monocytes					
%	6,42 [3,95-7,72]	6,32 [4,18-7,51]	6,34 [3,84-7,78]	6,53 [4,65-7,68]	0,9955
Number	*3171,4 [1392–4466]*	*3025,4 [1435–4235]*	*3045 [1308–4229]*	*424,4 [227–582]*	
CD15+ neutrophils					
%	48,5 [34,8-60,0]	48,57 [34,61-60,83]	48,62 [35,2-60,59]	49,81 [35,89-60,07]	0,9978
Number	*23,523,8 [15570–33,400]*	*23,060,8 [14435–34,875]*	*23,150,4 [14548–34,988]*	*3262,8 [1941–5032]*	

(A)	Reference method	One-step method	Mean difference	Paired p-value
nCD64 MFI	0,71	0,64	0,078	**0,0897**
	[0,62-0,8]	*[0,52-0,78]*		
mHLA-DR MFI	7,08	6,99	0,092	**0,6154**
	[5,58-8,91]	*[5,43-8,78]*		

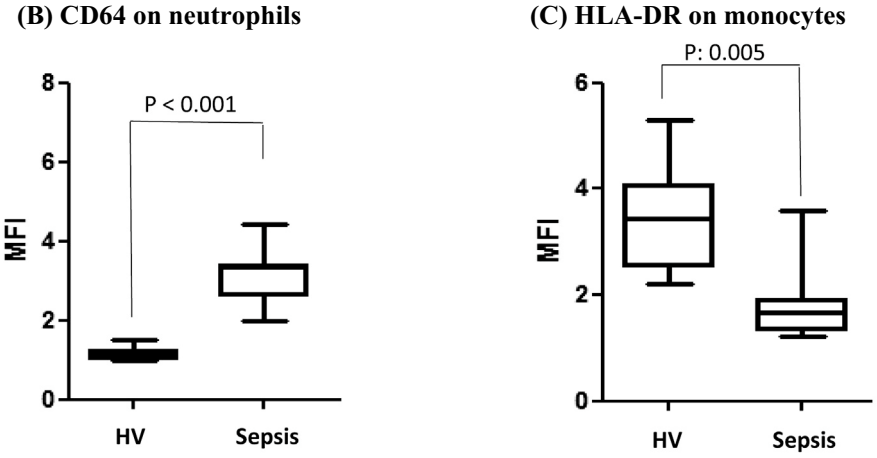


Fig. 2. CD64 and HLA-DR measurements with the optimized one-step method. (A) nCD64 and mHLA-DR MFI comparison on five healthy donors for the optimized one-step method 3 and the reference method. Results are presented as mean and Inter Quartile Range between brackets, with associated mean difference. *P*-values are calculated using a paired Student *t*-test, and are considered statistically significant if < 0.05. (B, C) Comparison of the MFI of nCD64 (B) and mHLA-DR (C) on 11 blood samples from healthy volunteers (HV) and 11 blood samples from subjects in septic conditions (Sepsis). P-values are calculated using a paired Student t-test, and are considered statistically significant if < 0.05.

to underline the global value of the concept. Also, results were reported in a small group of patients; larger studies are needed to assess whether nCD64 and mHLA-DR provide similar expressions when obtained with a one-step protocol.

5. Conclusion

In this study, the easiest protocol of extracellular staining was simplified by simultaneously performing WBC staining and RBC lysis. The method is promising for the cell subsets considered, because it saves time and work while offering discriminative performances similar to the traditional reference protocol. The proof-of-concept of measuring nCD64 and mHLA-DR in subjects in septic conditions has been made. The optimizations achieved suggest potential value of considering this one-step concept for flow cytometric point-of-care applications.

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.jim.2019.05.001.

Acknowledgements

The authors would like to thank the technician team of the Edouard Herriot Hospital laboratory for their assistance in blood sampling.

Funding

This work was partially supported by Beckman Coulter through donations of laboratory supplies and participation of the two employees mentioned. This private company had no role in the study design, or collection and interpretation of data. Beckman Coulter and the Beckman Coulter product and service marks mentioned herein are trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States and other countries. All other trademarks are the property of their respective owners.

Declaration of interest

Fabrice Malergue and Pénélope Bourgoin are Beckman Coulter employees. Pénélope Bourgoin is also recipient of a CIFRE PhD grant n° 2016 / 1368 from the ANRT (National Agency for Research and Technology, FRANCE).

They provided critical advice on setup of the assay and instruments and in manuscript preparation.

References

Baumgarth, N., Roederer, M., 2000. A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. J. Immunol. Methods 243, 77–97. https://doi.org/10.1016/S0022-1759(00)00229-5.

Breslin, W.L., Strohacker, K., Carpenter, K.C., Haviland, D.L., McFarlin, B.K., 2013. Mouse blood monocytes: Standardizing their identification and analysis using CD115. J. Immunol. Methods 390, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.jim.2011.03.005.

Correia, R.P., Rajab, A., Bento, L.C., Alexandre, A.M., Vaz, A.C., Schimidell, D., Pedro, E.C., Perin, F.S., Nozawa, S.T., Barroso, R.S., Bacal, N.S., 2018. A ten-color tube with dried antibody reagents for the screening of hematological malignancies. Int. J. Lab. Hematol. 40, 136–143. https://doi.org/10.1111/ijlh.12753.

Demaret, J., Walencik, A., Jacob, M.-C., Timsit, J.-F., Venet, F., Lepape, A., Monneret, G., 2013. Inter-laboratory assessment of flow cytometric monocyte HLA-DR expression in clinical samples. Cytometry B Clin. Cytom. 84B, 59–62. https://doi.org/10.1002/cyto.b.21043.

Dittrich, S., Tadesse, B.T., Moussy, F., Chua, A., Zorzet, A., Tängdén, T., Dolinger, D.L., Page, A.-L., Crump, J.A., D'Acremont, V., Bassat, Q., Lubell, Y., Newton, P.N., Heinrich, N., Rodwell, T.J., González, I.J., 2016. Target product profile for a diagnostic assay to differentiate between bacterial and non-bacterial infections and reduce antimicrobial overuse in resource-limited settings: an expert consensus. Plos One 11, e0161721. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161721.

Jämsä, J., Ala-Kokko, T., Huotari, V., Ohtonen, P., Savolainen, E.-R., Syrjälä, H., 2018. Neutrophil CD64, C-reactive protein, and procalcitonin in the identification of sepsis in the ICU — Post-test probabilities. J. Crit. Care 43, 139–142. https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2017.08.038.

Monneret, G., Venet, F., 2014. Monocyte HLA-DR in sepsis: shall we stop following the flow? Crit. Care 18, 102. https://doi.org/10.1186/cc13179.

Petriz, J., Bradford, J.A., Ward, M.D., 2018. No lyse no wash flow cytometry for maximizing minimal sample preparation. Methods 134–135, 149–163. https://doi.org/

10.1016/j.ymeth.2017.12.012.
Pitoiset, F., Cassard, L., El Soufi, K., Boedec, L., Gérard, J., Roux, A., Klatzmann, D., Chaput, N., Rosenzwajg, M., 2018. Deep phenotyping of immune cell populations by optimized and standardized flow cytometry analyses: deep Immunophenotyping for clinical studies. Cytometry A 93, 793–802. https://doi.org/10.1002/cyto.a.23570.

Figure 19 : Un nouveau marquage extracellulaire en une étape pour la cytométrie en flux : preuve de concept sur des marqueurs liés au sepsis. *Publication acceptée dans la revue Journal of Immunological Methods, portant sur les travaux d'optimisation de la cytométrie en flux* [131].

Ces travaux décrivent la mise au point d'une nouvelle technique de cytométrie en flux en une étape pour la détection de marqueurs leucocytaires de surface.

La première étape a été de combiner toutes les étapes de la procédure standard de préparation de l'échantillon pour un marquage extracellulaire, en une seule étape, tout en conservant les mêmes volumes de réactifs et les mêmes temps d'incubation. Le premier résultat important est que les nombres et les proportions de cellules leucocytaires communes (lymphocytes, monocytes, neutrophiles) sont les mêmes entre les deux méthodes de préparation. Grâce à la nouvelle méthode, la procédure de préparation de l'échantillon ne se fait plus qu'en une seule étape.

La seconde étape a été d'optimiser progressivement le volume du réactif de lyse, celui de l'échantillon de sang, et le temps de la procédure. Le résultat est que par rapport à la procédure de référence, le volume de lyse a été diminué par 2, celui de l'échantillon de sang par 20, et le temps de la procédure par 2, toujours sans que cela n'affecte les proportions de cellules leucocytaires. Grâce à la nouvelle méthode, la procédure de préparation de l'échantillon dure moins de 5 minutes et donne le résultat en moins de 20 minutes. Aussi, il est possible d'en imaginer son utilisation « au lit du patient », car le volume de sang nécessaire n'est plus que de 5 µL, soit l'équivalent d'une goutte de sang prise au bout du doigt. Enfin, l'optimisation du volume de réactif de lyse, à un faible volume de 500 µL, laisse aussi imaginer qu'il serait possible de ne plus pipeter le réactif mais de l'ajouter sous forme de dose unitisée prête-à-l'emploi.

L'ensemble des optimisations apportées est synthétisé en figure 20.

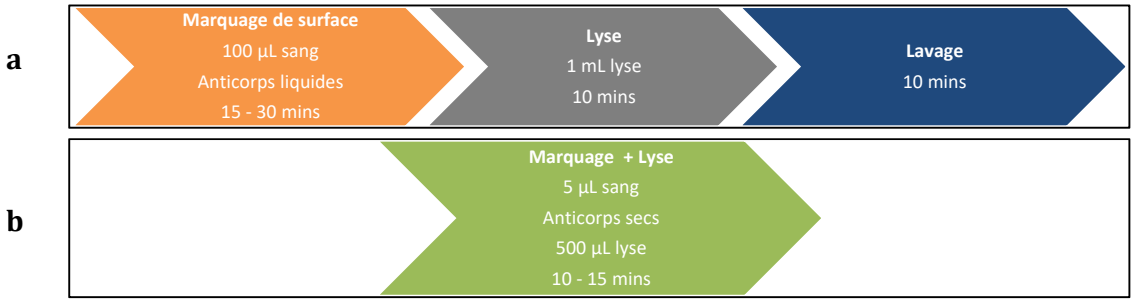


Figure 20 : Protocole de cytométrie en flux avant et après optimisation. *Protocole de préparation a) standard ou b) optimisé, pour réaliser un marquage d'antigènes extracellulaires avec les étapes conventionnelles de marquage, lyse et lavage, regroupées ou non. Les différentes proportions des réactifs (en µL ou mL), leurs formats (liquide ou sec), et leurs temps d'incubation (en minutes) sont indiqués pour chaque étape.*

La troisième étape a été de valider cette nouvelle technique sur la mesure de l'intensité de marqueurs cellulaires de sepsis, le CD64 et l'HLA-DR. L'optimisation importante est que le panel d'anticorps conjugués utilisé pour détecter ces marqueurs a été séché en un seul tube prêt-à-l'emploi. Le résultat est que les intensités de fluorescence des marqueurs sont les mêmes entre la nouvelle technique de cytométrie en flux et la technique de référence, et que la nouvelle technique de cytométrie est capable de détecter des variations de ces niveaux d'intensité dans des échantillons cliniques, conformément à ce qui serait attendu. Grâce à la nouvelle méthode, où les anticorps conjugués sont sous format sec, et en prenant en compte les optimisations précédentes, la préparation de l'échantillon ne nécessite plus de matériel adapté car toute étape de pipetage est retirée. L'utilisation de la technique de séchage permet ainsi d'avoir un format d'anticorps plus facile à manipuler en routine clinique et avec une reproductibilité améliorée. Les tubes secs sont d'autant plus intéressants qu'ils sont stables pour une conservation à température ambiante.

Ainsi, ce travail a permis de standardiser et rendre utilisable « au lit du patient » une technique de cytométrie en flux pour la détection de marqueurs extracellulaires, avec notamment une attention portée sur la préparation de l'échantillon et la manipulation des réactifs. Cette procédure de cytométrie en flux « au lit du patient » combine des anticorps secs avec 500 µL de lyse Versalyse et 5 µL de sang total veineux, qui incubent 10 à 15 minutes à température ambiante avant d'être analysés en 2 minutes au cytomètre en flux. Deux limites se dégagent : la première concerne la caractérisation précise des réactifs, et notamment des anticorps conjugués utilisés. L'utilisation de la nouvelle technique requiert une caractérisation précise de la quantité des anticorps conjugués. C'est pourquoi un travail séparé non publié est abordé dans la partie suivante, où une attention particulière est portée au choix de chaque association spécificité-fluorochrome et à l'optimisation de leur quantité dans cette nouvelle procédure pour offrir les meilleures performances de détection des marqueurs CD64, CD169 et HLA-DR. La seconde limite porte sur la robustesse du nouveau protocole. En effet, les travaux n'ont pas évalué la précision de la technique, alors qu'il est important d'estimer la reproductibilité des mesures données, et de la situer par rapport aux tests existants sur le marché pour le diagnostic « au lit du patient ». Une troisième partie abordera donc ces problématiques de validation du protocole.

2.1.2. Caractérisation des réactifs

Les anticorps conjugués, le réactif de lyse et l'échantillon de sang sont les trois réactifs nécessaires pour la faisabilité de la procédure de cytométrie en flux mise au point.

Les anticorps conjugués

Dans le contexte du diagnostic infectieux, les biomarqueurs d'intérêt, pour lesquels la procédure va être appliquée, sont le CD64 sur les neutrophiles (nCD64), le CD169 sur les monocytes (mCD169) et l'HLA-DR sur les monocytes (mHLA-DR). Leurs détections optimales avec le protocole de marquage extracellulaire optimisé passent par la sélection et la caractérisation des meilleures associations anticorps-fluorochromes dirigés contre eux.

La problématique du choix des fluorochromes doit tenir compte de [124] :

- Leurs natures : les fluorochromes sont des molécules, de tailles et natures chimiques diverses, qui ont la propriété d'absorber une radiation de longueur d'onde donnée (excitation par une source lumineuse) et de réemettre, après un bref intervalle de temps, une radiation de longueur d'onde plus élevée [127]. En cytométrie en flux, on peut retrouver des petites molécules chimiques (la Fluorescéine Isothiocyanate – FITC, les Cyanines – Cy5, Cy5.5 et Cy7, et les Alexa Fluor – AF488, AF647, AF700 et AF750) ou des protéines (la Phyco-Erythrine – PE, l'Allophycocyanine – APC, et la Péridinnine-Chlorophylle – PerCp). Les tandems sont des fluorochromes qui associent les petites molécules chimiques aux protéines pour élargir la gamme de fluorochromes utilisable avec un seul laser, telles que les Phyco-Erythrine-Cyanines (PC5, PC5.5 et PC7) par exemple [132]. Leurs propriétés physico-chimiques impactent directement sur les performances de fluorescence (« brillance » du conjugué à discriminer les populations spécifiques positives, et « bruit de fond » des populations non spécifiques).

- Leur détection sur le cytomètre en flux : les fluorochromes sont caractérisés par leurs spectres d'excitation et d'émission (figure 21).

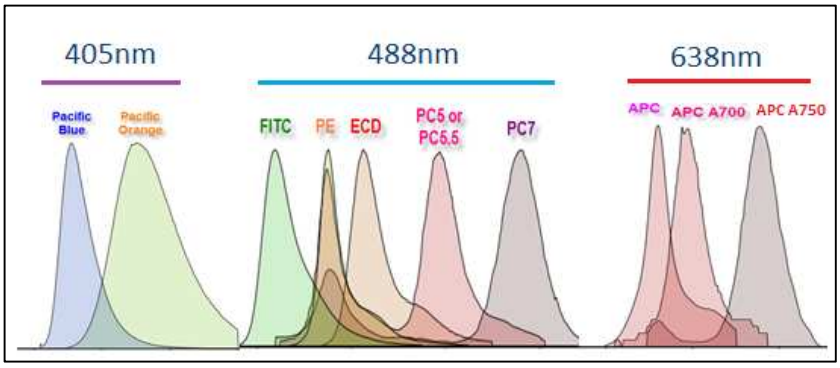


Figure 21 : Spectres d'excitation et d'émission des fluorochromes actuels. *Chaque fluorochrome est caractérisé selon sa source lumineuse d'excitation (405 nm en violet, 488 nm en bleu ou 638 nm en rouge) et selon son spectre d'émission.*

Bien que les cytomètres actuels possèdent, pour la majorité d'entre eux, les trois types de sources lumineuses, le choix des fluorochromes peut être limité tout d'abord par la disponibilité des lasers de l'appareil. Ensuite, plusieurs fluorochromes de natures différentes peuvent être excités par une même source lumineuse et alors avoir des spectres d'émission très proches. Le choix de fluorochromes dont les spectres se chevauchent n'est pas recommandé pour pouvoir s'affranchir d'analyses complexes utilisant des « compensations » pour ajuster les intensités de fluorescence émises réellement par chaque fluorochrome.

- Rapidité et stabilité du marquage : Le protocole optimisé a un temps d'incubation court de 10 à 15 minutes au terme duquel il est nécessaire que chaque anticorps conjugué ait saturé sa cible ; il faut donc l'introduire en quantité suffisante. De même, ce marquage doit rester stable dans le temps car après un prélèvement, l'échantillon testé n'est pas toujours analysé sur le cytomètre en flux.

L'objectif a donc été de déterminer pour chaque biomarqueur d'intérêt (CD64, CD169, HLA-DR) l'anticorps conjugué au fluorochrome ayant les meilleures performances dans la méthode optimisée à une étape.

L'hypothèse est que la conjugaison de chaque anticorps à la multitude de fluorochromes disponibles, la détermination de leurs quantités optimales, et leur sélection par rapport aux lasers disponibles et aux autres anticorps conjugués, devraient permettre de déterminer la meilleure combinaison.

Certains clones conjugués existaient déjà sous forme commerciale, les autres ont dû être générés chimiquement et contrôlés selon les procédures confidentielles de Beckman Coulter (tableau 14).

Tableau 14 : Associations anticorps-fluorochromes dirigées contre les CD64, CD169 et HLA-DR. *Les spécificités 22 (CD64), 7-239 (CD169) et Immu-57 (HLA-DR), couplées aux fluorochromes AF488, FITC, PE, AF647, APC et PBE ont constitué un total de 16 associations (deux associations ont été « non évaluées »). Ces anticorps conjugués ont été étudiés ou bien en utilisant des conjugués déjà existants (« conjugué commercial » - Beckman Coulter Inc.) ou bien en générant de nouveaux conjugués (« conjugué généré » - selon les procédures internes confidentielles de Beckman Coulter Inc.).*

Fluorochrome	CD64 (clone 22)	CD169 (clone 7-239)	HLA-DR (clone Immu-57)
AF488	Conjugué généré	Conjugué généré	Non évalué
FITC	Conjugué commercial	Conjugué généré	Conjugué commercial
PE	Conjugué commercial	Conjugué généré	Conjugué commercial
AF647	Conjugué généré	Conjugué généré	Non évalué
APC	Conjugué généré	Conjugué généré	Conjugué commercial
PBE	Conjugué commercial	Conjugué généré	Conjugué commercial

Les résultats sont présentés par spécificité.

Pour la détection du CD64 sur les neutrophiles, la spécificité CD64 (clone 22) a été testée en association avec les AF488, FITC, PE, AF647, APC et Pacific Blue (PBE). Les courbes de dose-réponse de chacun des conjugués CD64 ont été établies (figure 22).

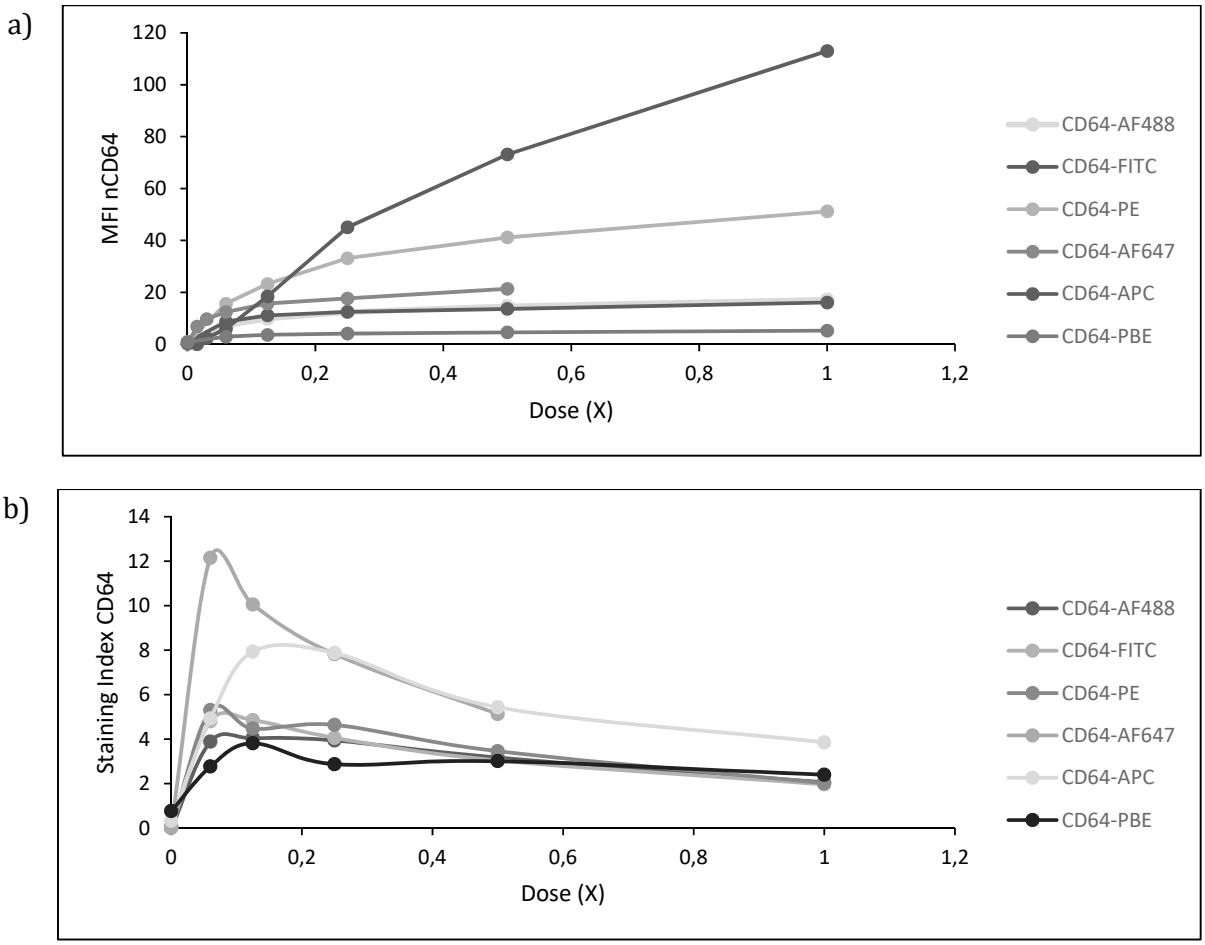


Figure 22 : Courbes dose-réponses des CD64-conjugués. *Le sang d'un donneur sain a été stimulé 24h avec de l'IFNγ pour simuler une infection bactérienne, puis a été marqué par des doses croissantes de chaque conjugué CD64, avec la procédure de cytométrie en flux « au lit du patient ». Chaque association spécificités-fluorochromes est comparée en évaluant a) la moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) du CD64 sur les neutrophiles (nCD64) ou b) le staining index du CD64 (calcul entre la MFI du nCD64 et la MFI du CD64 sur les lymphocytes), en fonction de la dose du conjugué (en X).*

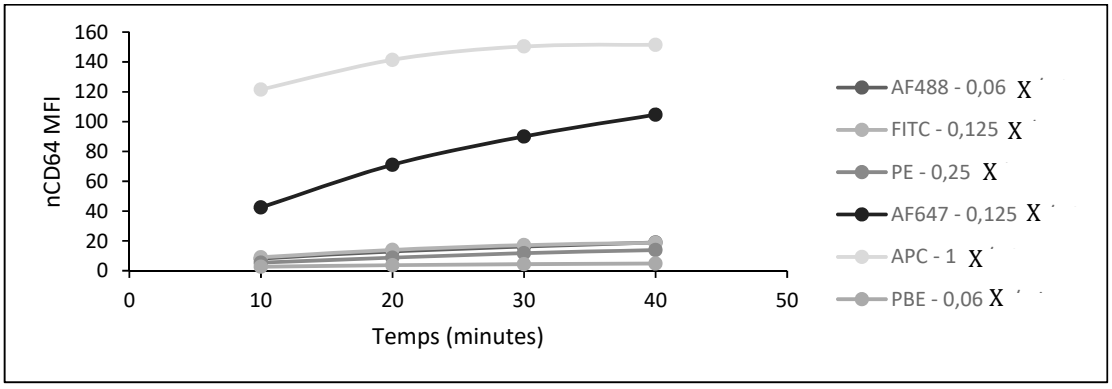
Ces courbes permettent de déterminer, pour chaque association du CD64, la dose qui maximise sa brillance (saturation de l'intensité de fluorescence) tout en gardant une discrimination spécifique (staining index élevé) (tableau 15).

Tableau 15 : Doses optimales des CD64-conjugués. *Détermination des doses de saturation optimales (en X) de chaque association anticorps-fluorochrome pour maximiser la brillance (en Moyenne d'Intensité de Fluorescence – MFI) et la discrimination (en Staining Index – SI). Les associations sont la spécificité CD64 avec les fluorochromes AF488, FITC, PE, AF647, APC et PBE.*

CD64	AF488	FITC	PE	AF647	APC	PBE
Dose optimale (X)	0,06	0,125	0,25	0,125	1	0,06
MFI à cette dose	7,13	11,12	33,14	15,67	113,025	2,9
SI à cette dose	3,88	4,85	4,63	10,05	3,85	2,77

Ces résultats montrent que le conjugué anticorps-fluorochrome ayant une brillance supérieure (MFI à sa dose optimale) est l'APC ; cependant, la dose n'est pas saturante et génère déjà énormément de bruit de fond, donc l'association ne peut pas être sélectionnée. Le conjugué ayant une discrimination supérieure (SI à sa dose optimale) est l'AF647, mais sa brillance et sa discrimination sont équivalentes à celles des autres conjugués.

En plus de leurs brillances et discriminations, l'objectif est donc de les discriminer en fonction de leur stabilité. Cela signifie qu'à leurs doses optimales, chaque association anticorps-fluorochrome doit avoir une variation minimale de l'intensité de marquage au cours du temps (figure 23), car une variation des valeurs serait susceptible de modifier le diagnostic donné au patient.



CD64	AF488 - 0,06 X	FITC - 0,125 X	PE - 0,25 X	AF647 - 0,125 X	APC - 1 X	PBE - 0,06 X
CV (%)	33%	29%	37%	35%	10%	24%

Figure 23 : Courbes de stabilité des CD64-conjugués. *Le sang d'un donneur sain a été stimulé 24h avec de l'IFNγ pour simuler une infection bactérienne, puis a été marqué par les doses optimales de chaque conjugué CD64, avec la procédure de cytométrie en flux « au lit du patient ». La moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) du CD64 sur les neutrophiles (nCD64) a été analysée après 10, 20, 30 ou 40 minutes d'incubation. La moyenne et la déviation standard de ces MFI ont été calculées par association, pour apprécier le coefficient de variation (CV) de chacun dans le temps.*

Ces résultats montrent que la PE a le coefficient de variation dans le temps le plus important (37% d'écart en 30 minutes) ; il en est de même pour l'AF647 (35% d'écart en 30 minutes). Parmi les associations restantes, à brillances avec des ordres de grandeur équivalents, celle qui offre la meilleure stabilité est le PBE.

Il est donc démontré, en se basant sur les résultats de brillance, de discrimination et de stabilité, que la mesure optimale du CD64 sur les neutrophiles est donnée par le conjugué CD64-PBE. Un exemple de marquage est montré en figure 24.

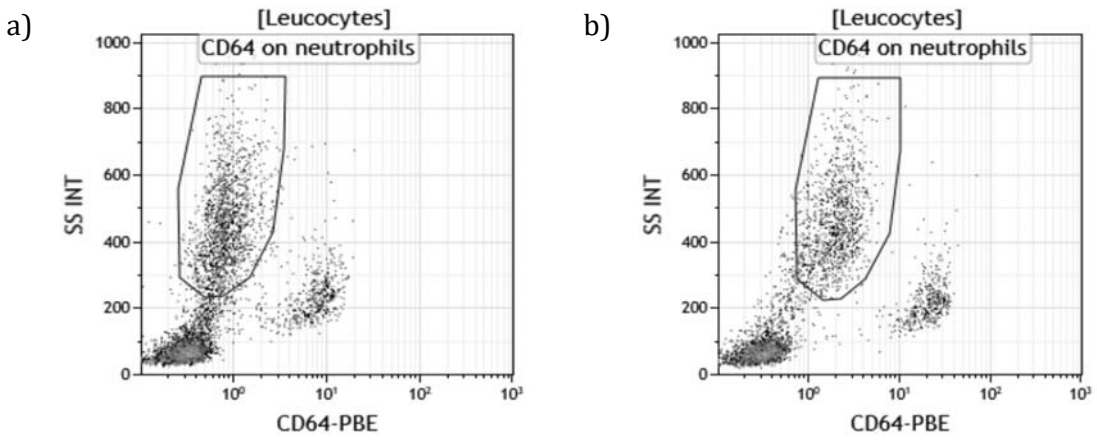


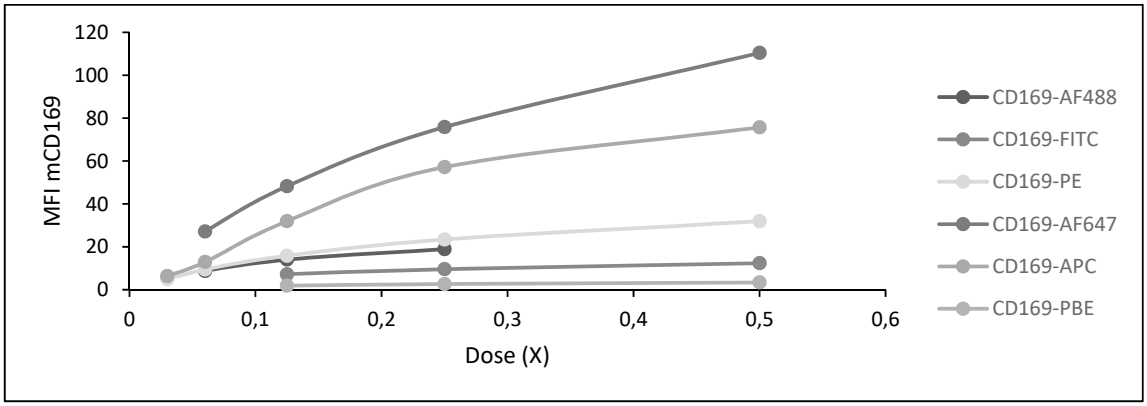
Figure 24 : Images de cytométrie du CD64-PBE. *Le sang d'un donneur sain (a) et le sang d'un donneur activé avec de l'IFNγ (b) ont été marqués avec le conjugué CD64-PBE à sa dose optimale, dans la procédure de cytométrie en flux « au lit du patient ».*

Ces images montrent que le conjugué CD64-PBE marque bien la différence d'expression du CD64 sur les neutrophiles entre un donneur sain (MFI : 0.9) et un donneur infecté par une bactérie (MFI : 2.5).

Pour la détection du CD169 sur les monocytes, la spécificité CD169 (clone 7-239) a été testée en association avec les AF488, FITC, PE, AF647, APC et PBE.

Ces conjugués ont été évalués en terme de brillance et de discrimination (figure 25).

a)



b)

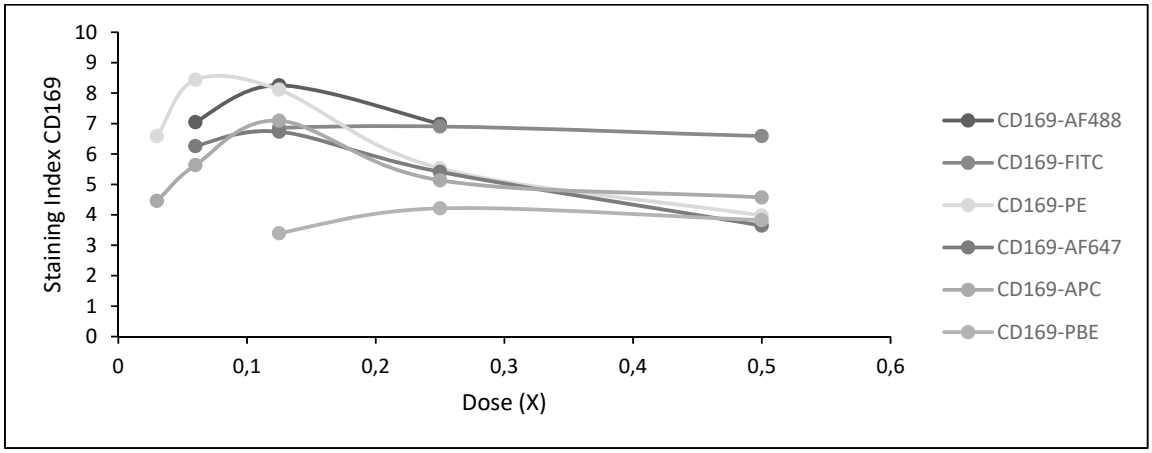


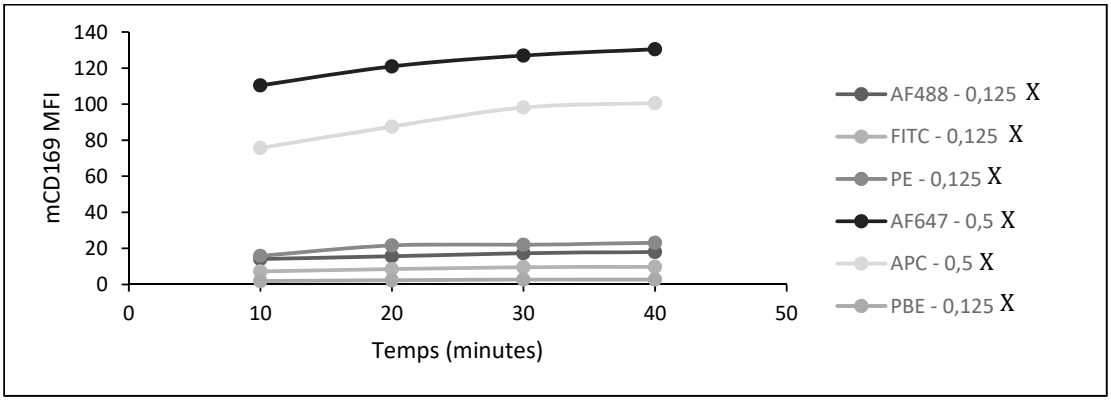
Figure 25 : Courbes dose-réponses des CD169-conjugués. *Le sang d'un donneur sain a été stimulé 24h avec de l'IFNα pour simuler une infection virale, puis a été marqué par des doses croissantes de chaque conjugué CD169, avec la procédure de cytométrie en flux « au lit du patient ». Chaque association spécificités-fluorochromes est comparée en évaluant a) la moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) du CD169 sur les monocytes (mCD169) ou b) le staining index du CD169 (calcul entre la MFI du mCD169 et la MFI du CD169 sur les lymphocytes), en fonction de la dose du conjugué (en X).*

Les doses optimales de chaque association sont présentées en tableau 16.

Tableau 16 : Doses optimales des CD169-conjugués. *Détermination des doses de saturation optimales (en X) de chaque association anticorps-fluorochrome pour maximiser la brillance (en Moyenne d'Intensité de Fluorescence – MFI) et la discrimination (en Staining Index – SI). Les associations sont la spécificité CD169 avec les fluorochromes AF488, FITC, PE, AF647, APC et PBE.*

CD169	AF488	FITC	PE	AF647	APC	PBE
Dose optimale (X)	0,125	0,125	0,125	0,5	0,5	0,125
MFI à cette dose	14,07	7,23	15,86	110,41	75,69	1,89
SI à cette dose	7,05	6,86	8,11	5,14	3,40	7,05

Les conjugués ayant les meilleures brillances sont l'AF647 et l'APC. Cependant, leurs doses de saturation sont très élevées pour obtenir ces MFI, ce qui pourraient avoir un impact sur le prix final du test. Les deux conjugués ne sont donc pas retenus. Le conjugué ayant une discrimination inférieure est le PBE, ce qui pourrait impacter la détection infectieuse ; ce conjugué n'est donc pas retenu non plus. Les associations restantes ont des ordres de grandeur de brillance et de discrimination équivalentes. Elles ont donc été discriminées en fonction de leurs stabilités (figure 26).



CD169	AF488 - 0,125 X	FITC - 0,125 X	PE - 0,125 X	AF647 - 0,5 X	APC - 0,5 X	PBE - 0,125 X
CV (%)	11%	13%	16%	7%	13%	16%

Figure 26 : Courbes de stabilité des CD169-conjugués. *Le sang d'un donneur sain a été stimulé 24h avec de l'IFNα pour simuler une infection virale, puis a été marqué par les doses optimales de chaque conjugué CD169, avec la procédure de cytométrie en flux « au lit du patient ». La moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) du CD169 sur les monocytes (mCD169) a été analysée après 10, 20, 30 ou 40 minutes d'incubation. La moyenne et la déviation standard de ces MFI ont été calculées par association, pour apprécier le coefficient de variation (CV) de chacun dans le temps.*

Ces résultats montrent que les associations restantes (AF488, FITC, PE) ont des stabilités équivalents (11 à 16% d'écart); on choisit donc l'association la plus brillante, à savoir celle avec la PE. Il est important de noter que, même s'il n'y a pas eu d'interférence pour le choix final, l'association avec le PBE n'aurait quand même pas pu être sélectionnée pour ne pas avoir dans le mélange final deux conjugués dont la fluorescence est lue dans le même canal.

Il reste donc démontré que la mesure optimale du CD169 sur les monocytes est donnée par le conjugué CD169-PE. Un exemple de marquage est montré en figure 27.

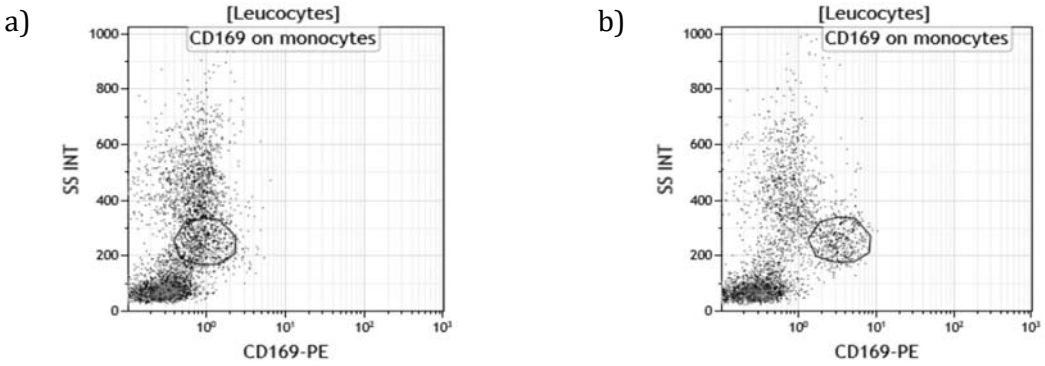


Figure 27 : Images de cytométrie du CD169-PE. *Le sang d'un donneur sain (a) et le sang d'un donneur activé avec de l'IFNα (b) ont été marqués avec le conjugué CD169-PE à sa dose optimale, dans la procédure de cytométrie en flux « au lit du patient ».*

Ces images montrent que le conjugué CD169-PE marque bien la différence d'expression du CD169 sur les monocytes entre un donneur sain (MFI : 1) et un donneur infecté par un virus (MFI : 8).

Enfin, pour la détection de l'HLA-DR sur les monocytes, la spécificité HLA-DR (clone Immu 357) a été testée en association avec les FITC, PE, APC et PBE. Ces conjugués ont été évalués en terme de brillance et de discrimination (figure 28).

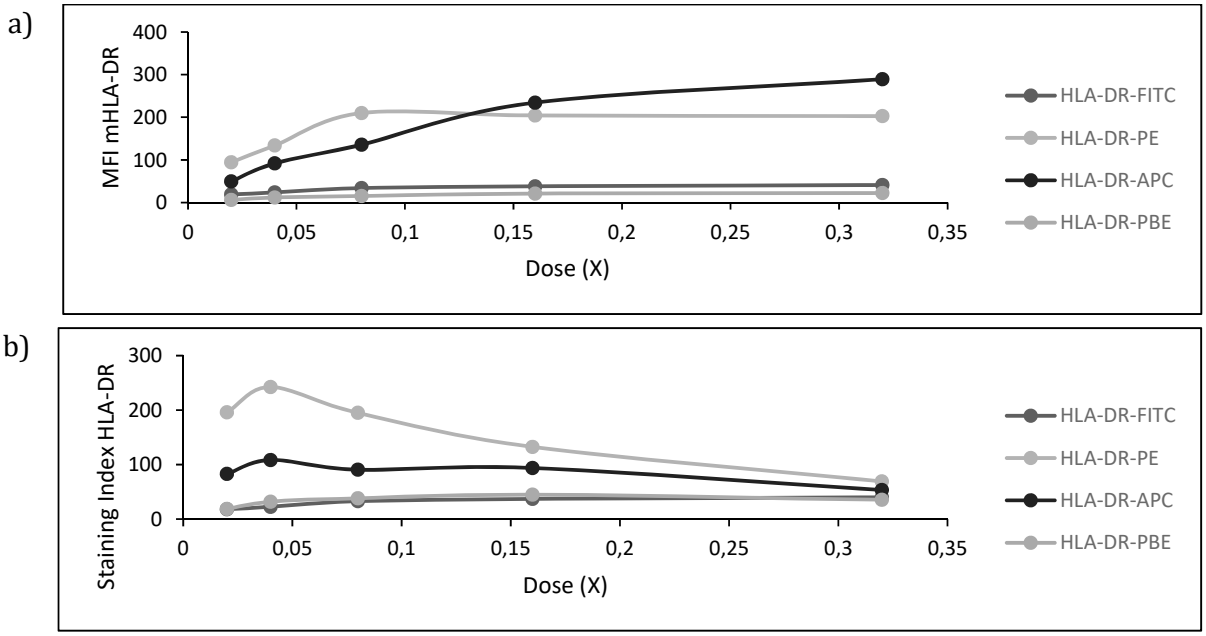


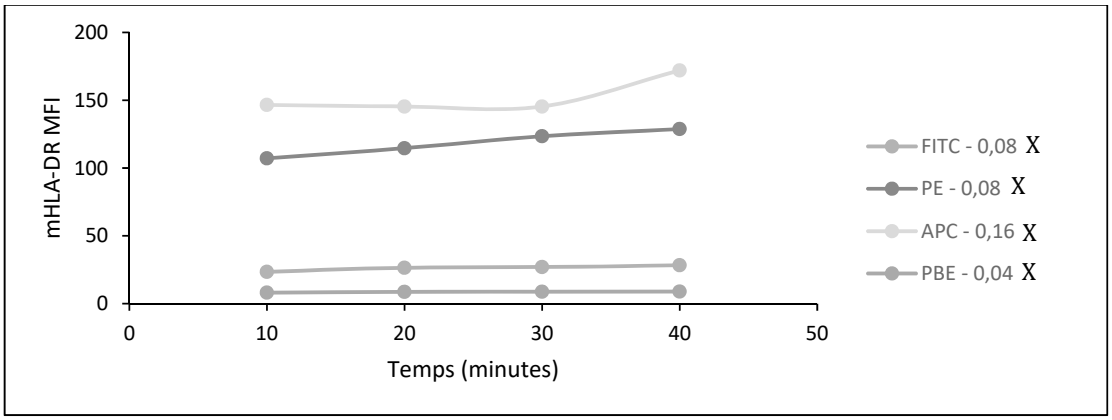
Figure 28 : Courbes dose-réponses des HLA-DR-conjugués. *Le sang d'un donneur sain a été marqué par des doses croissantes de chaque conjugué HLA-DR, avec la procédure de cytométrie en flux « au lit du patient ». Chaque association spécificités-fluorochromes est comparée en évaluant a) la moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) de l'HLA-DR sur les monocytes (mHLA-DR) ou b) le staining index de l'HLA-DR (calcul entre la MFI du mHLA-DR et la MFI de l'HLA-DR sur les neutrophiles), en fonction de la dose du conjugué (en X).*

Les doses optimales de chaque association sont présentées en tableau 17.

Tableau 17 : Doses optimales des HLA-DR-conjugués. *Détermination des doses de saturation optimales (en X) de chaque association anticorps-fluorochrome pour maximiser la brillance (en Moyenne d'Intensité de Fluorescence – MFI) et la discrimination (en Staining Index – SI). Les associations sont la spécificité HLA-DR avec les fluorochromes FITC, PE, APC et PBE.*

HLA-DR	AF488	FITC	PE	AF647	APC	PBE
Dose optimale (X)	-	0,08	0,08	-	0,16	0,04
MFI à cette dose	-	33,93	209,83	-	234,24	11,88
SI à cette dose	-	32,93	195,10	-	93,83	32,00

Les conjugués ayant les meilleures brillances et discriminations sont l'APC et la PE. Ils ont donc été discriminés en fonction de leurs stabilités (figure 29).



HLA-DR	FITC - 0,08 X	PE - 0,08 X	APC - 0,16 X	PBE - 0,04 X
CV (%)	8%	8%	9%	4%

Figure 29 : Courbes de stabilité des HLA-DR-conjugués. *Le sang d'un donneur sain a été marqué par les doses optimales de chaque conjugué HLA-DR, avec la procédure de cytométrie en flux « au lit du patient ». La moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) de l'HLA-DR sur les monocytes (mHLA-DR) a été analysée après 10, 20, 30 ou 40 minutes d'incubation. La moyenne et la déviation standard de ces MFI ont été calculées par association, pour apprécier le coefficient de variation (CV) de chacun dans le temps.*

Les stabilités des conjugués PE et APC sont équivalentes (8 à 9% d'écart en 30 minutes). Cependant, l'association avec la PE (et avec le PBE s'il avait été retenu) est dès lors à exclure pour ne pas avoir dans le mélange final des conjugués excités par les mêmes sources lumineuses, ce qui complexifierait l'analyse et pourrait interférer avec le diagnostic donné. Ce choix a aussi été guidé par la disponibilité quasi-systématique dans les laboratoires de cytomètres 3-lasers, permettant d'éviter les compensations avec ce type de panels.

La meilleure association restante pour la mesure optimale de l'HLA-DR sur les monocytes est donc le conjugué HLA-DR-APC. Un exemple de marquage est montré en figure 30.

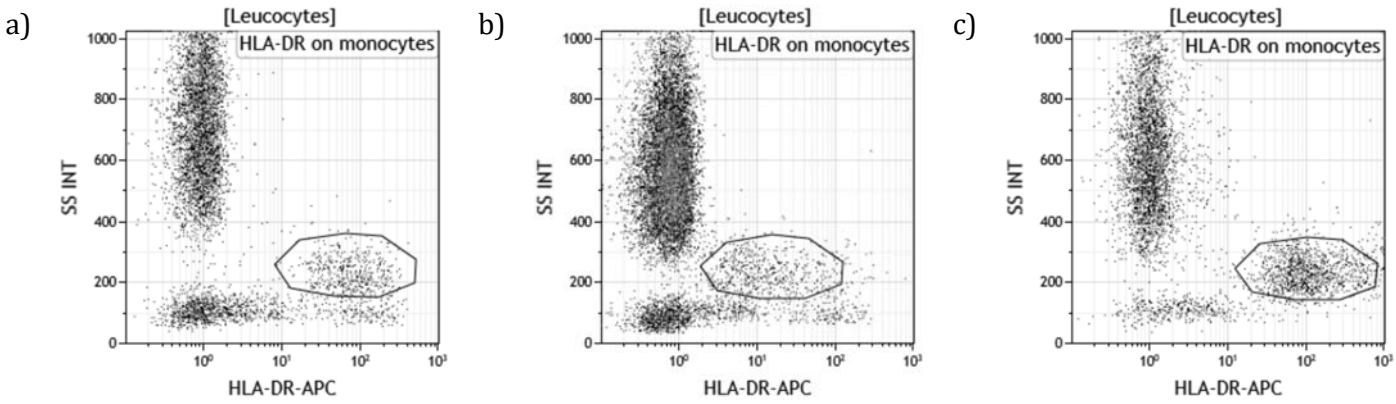


Figure 30 : Images de cytométrie de l'HLA-DR-APC. *Le sang d'un donneur sain (a), le sang d'un donneur activé avec de l'IFNγ (b), et le sang d'un donneur activé avec de l'IFNα (c) ont été marqués avec le conjugué HLA-DR-APC à sa dose optimale, dans la procédure de cytométrie en flux « au lit du patient ».*

Ces images montrent que le conjugué HLA-DR-APC marque bien la différence d'expression de l'HLA-DR sur les monocytes entre un donneur sain (MFI : 90), un donneur infecté par une bactérie (MFI : 20) et un donneur infecté par un virus (MFI : 150).

Ainsi, le mélange d'anticorps final est composé de CD64-PBE (à 0,06 X), CD169-PE (à 0,125 X) et HLA-DR-APC (à 0,16 X). Dans le test final, ces anticorps doivent être séchés en une dose prête-à-l'emploi pour éviter à l'utilisateur de devoir préparer lui-même son cocktail sous format liquide, ce qui est une perte de temps, un besoin de matériel supplémentaire, un risque d'erreurs, et une augmentation des déchets [133–138]. La technique de séchage a donc été appliquée à ce mélange et les performances de chaque anticorps sous format sec ont été vérifiées indépendemment par rapport à leur format liquide (figure 31).

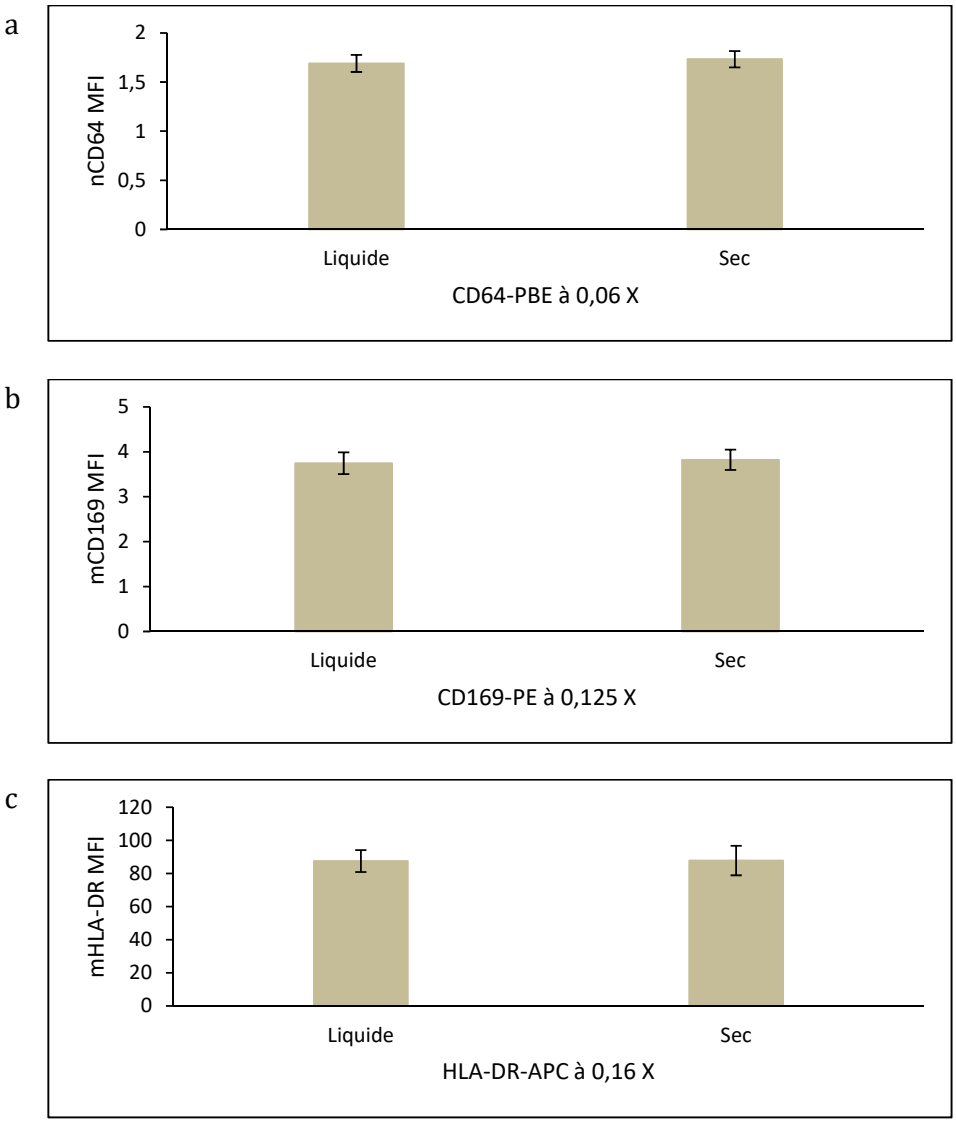


Figure 31 : Application de la technique de séchage au mélange final. *Evaluation des moyennes d'intensité de fluorescence (MFI) des a) CD64 sur les neutrophiles (nCD64), b) CD169 sur les monocytes (mCD169) et c) HLA-DR sur les monocytes (mHLA-DR) après détection respective avec le protocole de cytométrie en flux « au lit du patient » par les anticorps CD64-PBE, CD169-PE ou HLA-DR-APC, sous format liquide ou sec, à leurs doses optimales (en X). Les résultats sont présentés comme la moyenne ± l'écart-type de 4 donneurs.*

Les résultats sont acceptables si et seulement si, pour un biomarqueur d'intérêt, le rapport entre la MFI de son format sec et la MFI de son format liquide est compris entre 75 et 125%. Les trois biomarqueurs du mélange satisfont ces critères (rapport CD64 sec/CD64 liquide = 103% ; rapport CD169 sec/CD169 liquide = 102% ; rapport HLA-DR sec/HLA-DR liquide = 100%).

Ainsi, la conjugaison de chaque spécificité à la multitude de fluorochromes possibles, la détermination de leurs quantités optimales et de leurs stabilités dans la procédure de cytométrie en flux, et leur sélection par rapport aux lasers disponibles et aux autres anticorps conjugués, ont permis de caractériser les meilleures associations d'anticorps-fluorochromes. Le mélange d'anticorps optimal, pour la détection simultanée des biomarqueurs infectieux d'intérêt avec la procédure de cytométrie en flux « au lit du patient », est donc : le CD64-PBE, le CD169-PE et l'HLA-DR-APC. Dans le test final, ce mélange est sous format sec prêt-à-l'emploi. L'application de la technique de séchage n'a pas d'impact sur les résultats des CD64, CD169 et HLA-DR ; ce format est toutefois très avantageux pour l'optimisation de la procédure en technique « standardisée » et « au lit du patient », et son utilisation a été démontrée avec 12 mois de stabilité.

Le réactif de lyse

Le réactif de lyse est le réactif ajouté sur les anticorps séchés pour les remettre en suspension pour réaliser le test. L'étape de lyse est nécessaire dans un protocole de marquage extracellulaire car elle permet la destruction des globules rouges jusqu'à l'état de débris, tout en conservant une morphologie optimale des leucocytes pour leur analyse en cytométrie en flux et leur distinction des débris érythrocytaires. La lyse des érythrocytes se base sur le principe général de faire passer une quantité de matériel par la membrane à partir de l'extérieur de l'érythrocyte. Pendant ce passage, l'état de la membrane se dégrade, soit par le gonflement de la cellule, soit par dissolution.

L'un des réactifs de lyse les plus efficaces, et donc des plus utilisés en laboratoire, est la lyse au chlorure d'ammonium (NH_4Cl) [139]. Son fonctionnement dépend du passage de NH_3 et de CO_2 au travers de la membrane, qui se reconvertissent à l'intérieur de la cellule en NH_4^+ et HCO_3^- au contact de l'anhydrase carbonique naturellement présente en grande quantité. L'alcalinisation du mélange provoque la dégradation des érythrocytes. La limite est que les leucocytes aussi peuvent perdre rapidement leur viabilité avec ce processus de lyse. En raison de ces conditions toxiques, la lecture doit être effectuée rapidement, habituellement 1 à 2 heures après la réalisation de la préparation. De plus, l'utilisation de chlorure d'ammonium est incompatible avec l'aldéhyde formique, utiilsé comme fixateur des préparations, ce qui renforce l'instabilité de l'échantillon préparé ou oblige à réaliser un lavage avant de fixer.

Il est donc actuellement plus souhaitable d'utiliser un réactif de lyse sans toxicité pour les leucocytes, et compatible éventuellement avec l'utilisation d'un fixateur, pour envisager d'effectuer la lecture cytométrique longtemps après la réalisation de la préparation. Dans le protocole optimisé, le produit de lyse utilisé est le réactif Versalyse (Beckman Coulter Inc.), dont le principal composant est une amine cyclique. Au contact de l'anhydrase carbonique des globules rouges, l'amine se transforme en un composé hautement lytique pour les globules rouges, mais non toxique pour les globules blancs et compatible avec l'aldéhyde formique. Normalement, l'utilisation d'une amine cyclique à titre d'agent de lyse donne des résultats comparables au chlorure d'ammonium.

L'objectif du travail a donc été de vérifier les expressions des biomarqueurs en Versalyse ou en chlorure d'ammonium. Les résultats sont présentés en tableau 18.

Tableau 18 : Influence du réactif de lyse sur l'expression des biomarqueurs. *Evaluation des moyennes d'intensité de fluorescence (MFI) du CD64 sur les neutrophiles (nCD64) et du CD169 sur les monocytes (mCD169), de 3 donneurs selon la procédure de cytométrie en flux « au lit du patient », avec la lyse au chlorure d'ammonium (NH4Cl) ou la lyse Versalyse. Le marquage se fait avec les anticorps CD64-PBE et CD169-PE à leurs doses optimales. Les résultats sont représentés par les moyennes ± les écart-types des MFI des marqueurs. Un test ANOVA permet d'apprécier les différences significatives entre les échantillons si la valeur-p est inférieure à 0,05.*

Biomarqueur	MFI si lyse NH4Cl	MFI si lyse Versalyse	*Valeur-p*
nCD64	3.38 ± 0.86	3.26 ± 0.86	0.928
mCD169	3.15 ± 0.62	3.23 ± 0.62	0.932

Les résultats de ces travaux montrent que les expressions des marqueurs nCD64 (*p: 0.928*) et mCD169 (*p: 0.932*) ne sont significativement pas différentes dans les mêmes échantillons lysés au chlorure d'ammonium ou à la Versalyse.

Ainsi, il est démontré que la Versalyse peut rester le réactif de lyse de choix pour les échantillons sanguins évalués avec la procédure de cytométrie en flux optimisée. Dans les cas particuliers où la lecture cytométrique se ferait longtemps après la réalisation de la préparation, et puisque cette lyse est compatible avec de l'aldéhyde formique, la lyse Versalyse a été évaluée en association avec du fixateur (étude du paragraphe 2.1.4), démontrant des performances équivalentes et une stabilité à un mois à température ambiante.

L'échantillon de sang

Aux anticorps secs et à la lyse sont ajoutés 5 µL de l'échantillon de sang à tester. L'échantillon de sang évalué dans la procédure est un échantillon de sang total veineux, anti-coagulé avec de l'EDTA. Le choix de réaliser le diagnostic à partir d'un échantillon de sang total est un avantage car il ne requiert pas de préparation de l'échantillon en amont pour extraire des cellules d'intérêt. Deux problématiques se posent toutefois.

La première problématique concerne le principe anti-coagulant qui recouvre les parois des tubes dans lesquels sont collectés ces échantillons de sang total. Les deux anti-coagulants les plus courants sont l'EDTA ou l'héparine.

L'utilisation de l'EDTA est souvent remise en cause pour les méthodes de détection des cytokines, contrairement à l'héparine, plus adaptée physiologiquement, car l'EDTA est chélateur du calcium (Ca^{2+}) extracellulaire [140], empêchant l'activation de certaines cellules et l'accumulation des protéines intracellulaires [141]. De plus, le calcium est impliqué dans diverses voies de transduction de signaux [142]. Toutefois, le sang total EDTA est recommandé car il reste l'anticoagulant de choix pour l'investigation des paramètres hématologiques [143], puisque la morphologie cellulaire est mieux préservée.

Le premier objectif a donc été de comparer l'expression des biomarqueurs dans le sang total de 3 donneurs, anti-coagulés ou bien avec de l'EDTA ou bien avec de l'héparine. Les résultats sont présentés en figure 32.

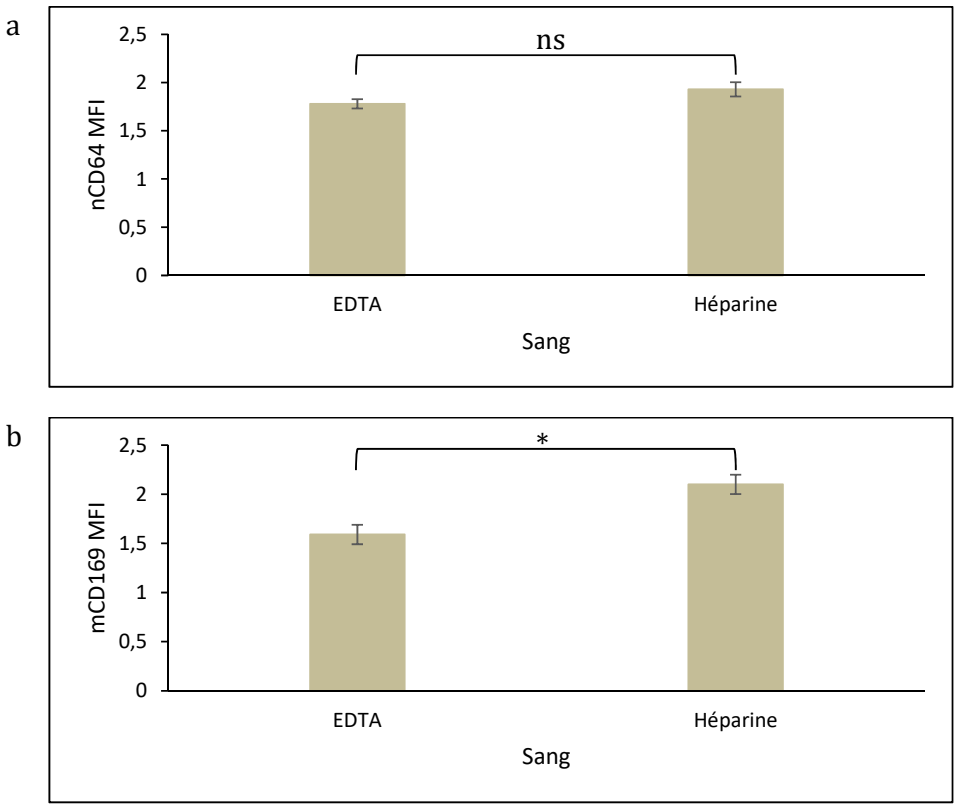


Figure 32 : Influence de l'anticoagulant sanguin sur l'expression des biomarqueurs. *Evaluation des moyennes d'intensité de fluorescence (MFI) a) du CD64 sur les neutrophiles (nCD64) et b) du CD169 sur les monocytes (mCD169), dans les échantillons de sang total veineux, anti-coagulés à l'EDTA ou à l'héparine, de 3 donneurs selon la procédure de cytométrie en flux en une étape. Les résultats sont représentés par les moyennes ± les écart-types des MFI des marqueurs. Un test ANOVA permet d'apprécier les différences significatives entre les échantillons si la valeur-p est inférieure à 0,05 (*) (ns : p > 0,05).*

Les résultats de ces travaux montrent que l'expressions du marqueur nCD64 n'est significativement pas différente dans les mêmes échantillons de sang veineux anti-coagulés à l'EDTA (MFI de 1,78 ± 0,05) ou à l'héparine (MFI de 1,93 ± 0,07) (*p: 0,215*). En revanche, l'expression du marqueur mCD169 est significativement différente dans les mêmes échantillons de sang veineux anti-coagulés à l'EDTA (MFI de 1,59 ± 1,00) ou à l'héparine (MFI de 2,1 ± 1,00) (*p: 0,034*).

L'augmentation de l'expression du mCD169 en sang anti-coagulé à l'héparine peut venir du fait que cet anticoagulant soit parfois contaminé avec des résidus viraux. En effet, l'héparine est un anti-coagulant exclusivement fabriqué à partir de muqueuse intestinale d'origine porcine [144]. Pour répondre aux besoins du marché, ces porcs proviennent à 55-60% de République Populaire de Chine. Seulement, cette région a connu en 2008 une épidémie porcine chinoise qui a eu un grave impact sur la production mondiale d'héparine. Aucune non-conformité majeure en inspection n'a été relevée depuis cette crise de 2008, mais un procédé d'inactivation virale de l'héparine brute est maintenant classiquement réalisé par un traitement en milieu oxydant. Cet ajout d'étapes, avant la purification de l'héparine, crée une dispersion des opérateurs qui rend plus difficile leur suivi et leur contrôle. La majeure partie des opérateurs ne sera donc jamais inspectée même dans le cadre d'un effort coordonné des autorités. La qualité de l'héparine tient donc d'une sécurité virale difficilement maîtrisable.

Il est ainsi démontré que l'EDTA reste le principe anti-coagulant de choix pour les échantillons veineux, d'autant plus lorsqu'ils sont évalués pour la mesure de biomarqueurs d'infections bactériennes et virales, avec cette procédure de cytométrie en flux optimisée.

La seconde problématique des échantillons de sang concerne le principe de collection de l'échantillon de sang. La faisabilité de la procédure est démontrée sur du sang total veineux. Le sang total veineux est difficile à collecter car il requiert du matériel spécifique et un personnel médical qualifié. L'optimisation de la procédure a permis de rendre nécessaires seulement 5 µL de sang pour faire un marquage extracellulaire adéquat. L'éventualité de prélever une goutte de sang capillaire, représentant le même volume que les 5 µL nécessaires, doit donc être considérée. D'une part, la collection du sang capillaire se fait à l'aide d'un dispositif unitisée, simple d'emploi et jetable, qui n'est pas invasif car seulement la pointe d'une petite aiguille vient percer le bout du doigt du patient. D'autre part, la composition du sang capillaire est proche de celle du sang veineux [145].

Le second objectif est donc de comparer les proportions et les expressions de biomarqueurs cellulaires dans le même sang total veineux ou capillaire.

L'hypothèse est que si les proportions leucocytaires communes (obtenues avec des marqueurs CD3, CD4, CD8, CD14 et CD15) et les intensités de fluorescence du CD64 et du CD169 ne diffèrent pas pour un même donneur, que son échantillon de sang total soit prélevé classiquement (sang veineux) ou au bout du doigt (sang capillaire), alors le sang capillaire sera une optimisation éventuelle de choix pour les échantillons traités avec ce protocole de cytométrie en flux.

La première partie des résultats est présentée en figure 33, et montre les proportions de cellules leucocytaires entre un échantillon de sang veineux et un même échantillon de sang capillaire.

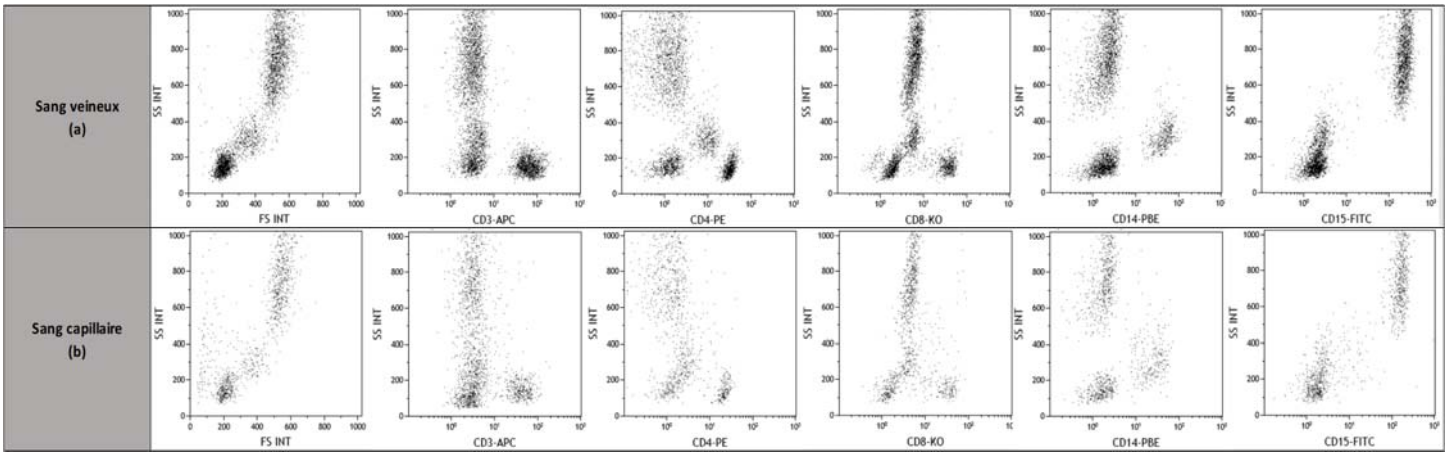


Figure 33 : Influence de la collection du sang sur les proportions de cellules leucocytaires. *Images de cytométrie d'un donneur dont a) le sang prélevé est veineux, ou dont b) le sang prélevé est capillaire. Ces échantillons de sang sont marqués avec la procédure de cytométrie en flux « au lit du patient » et les anticorps CD3-APC, CD4-PE, CD8-KO, CD14-PBE et CD15-FITC. La première colonne montre les morphologies (granularité vs taille) des trois types leucocytaires importants : lymphocytes, monocytes et granulocytes. La deuxième colonne montre les proportions de lymphocytes T CD3+, et parmi eux, les troisièmes et quatrièmes colonnes montrent les proportions respectives de lymphocytes T CD4+ et T CD8+. Les cinquièmes et sixièmes colonnes montrent les proportions respectives des monocytes CD14+ et des neutrophiles CD15+.*

Une analyse statistique a permis de comparer avec précision ces proportions (tableau 19).

Tableau 19 : Comparaison des proportions de marqueurs leucocytaires communs en fonction de la méthode de collection du sang. *Evaluation des proportions (%) des lymphocytes T CD3+, lymphocytes T CD3+ CD4+, lymphocytes T CD3+ CD8+, monocytes CD14+, et neutrophiles CD15+ dans le sang veineux EDTA ou dans le sang capillaire d'un seul même donneur de sang marqué 10 fois avec la procédure de cytométrie en flux « au lit du patient ». Les résultats sont présentés comme les moyennes et valeurs interquartiles de ces 10 mesures indépendantes. Un test ANOVA permet d'apprécier les différences significatives entre les échantillons si la valeur-p est inférieure à 0,05.*

	Sang veineux		Sang capillaire		*valeur-p*
	Moyenne	**Interquartiles**	**Moyenne**	**Interquartiles**	
% Lymphocytes CD3+	35,24	[35,51-37,23]	35,86	[35,03-36,77]	0,156
Parmi les cellules CD3+					
%CD4+CD3+	51,98	[49,24-54,53]	54,34	[41,86-64,93]	0,281
%CD8+CD3+	41,54	[38,82-43,64]	39,29	[30,50-46,81]	0,181
% Monocytes CD14+	13,24	[12,03-14,19]	12,79	[11,54-14,25]	0,149
% Neutrophils CD15+	50,96	[49,74-52,08]	52,45	[47,12-54,93]	0,074

L'analyse statistique révèle que les lymphocytes T CD3+ (*p : 0,156*), les lymphocytes T CD3+ CD4+ (*p : 0,281*), les lymphocytes T CD3+ CD8+ (*p : 0,181*), les monocytes CD14+ (*p : 0,149),* et les neutrophiles CD15+ (*p : 0,074*) ont des proportions significativement équivalentes dans un sang veineux et dans un sang capillaire d'un même donneur.

Une analyse statistique a permis de comparer également les intensités de fluorescence de ces marqueurs pour valider la comparaison (tableau 20).

Tableau 20 : Comparaison des ratios de MFI de marqueurs leucocytaires communs en fonction de la méthode de collection du sang. *Evaluation des ratios des moyennes d'intensité de fluorescence (MFI) (discrimination des populations positives des populations négatives) des lymphocytes T CD3+, lymphocytes T CD3+ CD4+, lymphocytes T CD3+ CD8+, monocytes CD14+, et neutrophiles CD15+ dans le sang veineux EDTA ou dans le sang capillaire d'un seul même donneur de sang marqué 10 fois avec la procédure de cytométrie en flux « au lit du patient ». Les résultats sont présentés comme les moyennes et valeurs interquartiles de ces 10 mesures indépendantes. Un test ANOVA permet d'apprécier les différences significatives entre les échantillons si la valeur-p est inférieure à 0,05.*

	Sang veineux		Sang capillaire		*valeur-p*
	Moyenne	**Interquartiles**	**Moyenne**	**Interquartiles**	
MFI ratio : CD3+ versus CD3-	19,59	[13,10-24,66]	19,65	[14,68-24,34]	0,961
MFI ratio : CD4+ versus CD4-	22,50	[13,71-29,59]	24,14	[15,17-30,87]	0,501
MFI ratio : CD8+ versus CD8-	20,54	[16,16-25,49]	19,40	[15,37-23,81]	0,440
MFI ratio : CD14+ versus CD14-	29,06	[25,04-30,60]	28,11	[24,95-30,71]	0,945
MFI ratio : CD15+ versus CD15-	162,02	[130,37-180,41]	147,44	[122,57-166,75]	0,586

L'analyse statistique révèle que les lymphocytes T CD3+ (*p : 0,961*), les lymphocytes T CD3+ CD4+ (*p : 0,501*), les lymphocytes T CD3+ CD8+ (*p : 0,440*), les monocytes CD14+ (*p : 0,945*), et les neutrophiles CD15+ (*p : 0,586*) ont des ratios d'intensité de fluorescence significativement équivalents dans un sang veineux et dans un sang capillaire d'un même donneur.

La première partie des résultats semble donc valider que l'utilisation de sang veineux ou capillaire est équivalente. La seconde partie des résultats compare donc les intensités de fluorescence des biomarqueurs infectieux d'intérêt, le nCD64 et le mCD169, entre un échantillon de sang veineux et un même échantillon de sang capillaire (tableau 21).

Tableau 21 : Comparaison des MFI de biomarqueurs infectieux en fonction de la méthode de collection du sang. *Evaluation des moyennes d'intensité de fluorescence (MFI) du CD64 sur les neutrophiles (nCD64) et du CD169 sur les monocytes (mCD169), dans le sang veineux EDTA ou dans le sang capillaire d'un donneur. Chaque échantillon de sang a été marqué 10 fois. Les résultats sont présentés comme les moyennes et valeurs interquartiles de ces 10 mesures indépendantes. Un test ANOVA permet d'apprécier les différences significatives entre les échantillons si la valeur-p est inférieure à 0,05.*

	Sang veineux		**Sang capillaire**		***valeur-p***
	Moyenne	**Interquartiles**	**Moyenne**	**Interquartiles**	
MFI nCD64	0,68	[0,65-0,74]	0,70	[0,67-0,72]	0,133
MFI mCD169	0,67	[0,63-0,69]	0,66	[0,57-0,75]	0,929

Les résultats de ces travaux montrent que les expressions des marqueurs nCD64 (*p : 0,133*) et mCD169 (*p : 0,929*) ne sont significativement pas différentes dans les mêmes échantillons de sang total veineux ou capillaires.

Il est ainsi démontré que le sang capillaire et le sang veineux ont les mêmes expressions basales de CD64 et CD169. Surtout, ces premiers essais sur sang capillaire ont confirmé l'absence de problème de coagulation dans le tube test. Il semble que la dilution du sang et la composition de la lyse empêchent ce phénomène.

Ainsi, il est démontré que dans les cas où un échantillon de sang total veineux est prélevé, il est préférable qu'il soit anti-coagulé avec de l'EDTA plutôt qu'avec de l'héparine pour être testé avec la procédure de cytométrie en flux « au lit du patient ». Cela permet de conserver une meilleure morphologie cellulaire, de collecter des résultats non biaisés par une éventuelle contamination virale, et d'analyser potentiellement le sang jusqu'à 24 heures après sa collection (temps moyen de stabilité d'un échantillon de sang total veineux anti-coagulé à l'EDTA). L'optimisation de la procédure permet de considérer l'utilisation de sang capillaire plutôt que de sang veineux. Cela résoud les problèmatiques liées à l'agent anti-coagulant, et rend davantage utilisable « au lit du patient » la procédure de cytométrie en flux. Toutefois, en lien avec les problématiques éthiques de prélèvement de sang capillaire, seul un patient a pu servir à réaliser la comparaison du sang veineux et du sang capillaire car le prélévement n'était pas un acte médical supplémentaire. Il conviendra de renforcer ces données avec une étude sur davantage de patients (étude du paragraphe 2.1.4).

2.1.3. Validation technique de la procédure

La procédure finale de cytométrie en flux « au lit du patient » pour la discrimination des infections est une technique où les anticorps d'intérêt (CD64-PBE et CD169-PE) sont séchés à leurs doses optimales en mélange, puis resuspendus en solution par 500 µL de solution de lyse Versalyse. 5µL de sang veineux EDTA ou une goutte de sang capillaire du patient à tester sont ajoutés au mélange, et laissés en incubation 10 à 15 minutes à température ambiante. L'analyse au cytomètre en flux en 2 minutes permet de connaître les moyennes d'intensité de fluorescence du CD64 sur les neutrophiles et du CD169 sur les monocytes.

Chaque réactif ayant été optimisé, il est important de déterminer la précision avec laquelle les valeurs sont mesurées pour valider la technique. Cela passe par la détermination de la répétabilité du test. Cette valeur représente la capacité du test à donner le même résultat lors d'essais répétés chez le même sujet et se mesurent par la proportion de cas concordants. Elle peut dépendre de l'instrument de mesure (dispersion des résultats), de l'observateur (interprétation des résultats) ou des conditions d'observation (génération des résultats). La répétabilité est l'accord des résultats obtenus successivement avec la même méthode dans les mêmes conditions (même opérateur, même appareil de mesure, même laboratoire, répétitions sur une courte durée) [146]. Elle s'exprime généralement à l'aide des caractéristiques de dispersion des résultats (écart-type, coefficient de variation - CV).

L'objectif du travail a été de déterminer la répétabilité de la technique à mesurer les proportions de cellules leucocytaires communes (lymphocytes, monocytes, granulocytes) puis à estimer les valeurs des marqueurs infectieux (CD64 et CD169).

L'hypothèse est que leurs mesures dans un même échantillon marqué 1 fois mais analysé 5 fois au cytomètre, ou marqué 5 fois et analysé 1 fois chacun au cytomètre, doit être donnée avec moins de 5% de variation (ou plus de 95% de répétabilité) pour valider la répétabilité de la technique.

Les résultats sont présentés en tableau 22.

Les résultats montrent que quelle que soit la sous-population leucocytaire ou le biomarqueur infectieux considéré, la technique de cytométrie en flux « au lit du patient » estime sa proportion ou son intensité de fluorescence avec un coefficient de variation inférieur ou égal à 5%, soit une répétabilité supérieure à 95%. Cette répétabilité est la même entre un échantillon de sang veineux et un échantillon de sang capillaire.

Tableau 22 : Evaluation de la répétabilité du test. *Evaluation des proportions (%) des lymphocytes T CD3+, lymphocytes T CD3+ CD4+, lymphocytes T CD3+ CD8+, monocytes CD14+, et neutrophiles CD15+, et de la moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) du CD64 sur les neutrophiles (nCD64) et du CD169 sur les monocytes (mCD169). a) Le sang veineux EDTA ou b) dans le sang capillaire d'un seul même donneur, a été marqué 5 fois et analysé 1 fois chacun au cytomètre, ou marqué 1 fois mais lu 5 fois au cytomètre, selon la procédure de cytométrie en flux « au lit du patient ». Les résultats sont présentés comme les moyennes ± les écart-types de ces mesures indépendantes. Le Coefficient de Variation (CV) (%) est calculé comme le rapport de l'écart-type sur la moyenne.*

a)	**% Lymphocytes CD3+**	**% Lymphocytes CD4+**	**% Lymphocytes CD8+**	**% Monocytes CD14+**	**% Neutrophiles CD15+**	**nCD64 MFI**	**mCD169 MFI**
5 marquages lus 1 fois	36,41 ± 0,65	52,19 ± 2,2	41,06 ± 1,87	12,87 ± 0,5	51,2 ± 0,59	0,69 ± 0,03	0,67 ± 0,02
CV (%)	2%	4%	5%	4%	1%	5%	3%
1 marquage lu 5 fois	36,28 ± 0,48	52,44 ± 1,31	42,1 ± 1,26	13,31 ± 0,72	50,61 ± 0,4	0,66 ± 0,02	0,67 ± 0,01
CV (%)	1%	3%	3%	5%	1%	3%	2%

b)	**% Lymphocytes CD3+**	**% Lymphocytes CD4+**	**% Lymphocytes CD8+**	**% Monocytes CD14+**	**% Neutrophiles CD15+**	**nCD64 MFI**	**mCD169 MFI**
5 marquages lus 1 fois	35,88 ± 0,44	57,11 ± 1,11	37,22 ± 1,4	12,63 ± 0,38	52,91 ± 1,68	0,69 ± 0,02	0,62 ± 0,03
CV (%)	1%	2%	4%	3%	3%	3%	5%
1 marquage lu 5 fois	36,18 ± 0,7	57,39 ± 1	36,62 ± 1,01	13,44 ± 0,53	53,8 ± 0,98	0,7 ± 0,03	0,64 ± 0,03
CV (%)	2%	2%	3%	4%	2%	4%	5%

Ainsi, l'estimation de la répétabilité du test a permis de valider la technique de cytométrie en flux « au lit du patient ». Cette étape de validation est indispensable avant que le test ne soit utilisé, car il est destiné à mesurer des données biologiques utilisées dans le cadre du suivi médical d'un patient [147]*. Il s'agit d'apprécier la qualité de la méthode de mesure, et d'avoir confiance dans les valeurs fournies par la méthode de mesure. Les résultats ont montré que la répétabilité du test avait un coefficient de variation inférieur ou égal à 5%, ce qui est équivalent à la répétabilité de tests de référence tels que la PCT* [148]*. Des critères de validation supplémentaires qui auraient pu être établis sont celui de la reproductibilité des valeurs dans des laboratoires différents ou de la concordance des valeurs fournies par la méthode par rapport à une valeur de référence (PCT, CRP). Ces critères sont plus difficiles à évaluer, et seront donc étudiés davantage dans l'évaluation clinique du test, où ses performances diagnostiques seront comparées à celles des tests de référence de CRP et PCT. Ces critères sont plutôt étudiés dans les cas où la méthode évaluée vise à remplacer les méthodes de référence plutôt qu'à les complémenter.*

2.1.4. Application de la procédure : exemple pour le sepsis

Parmi les marqueurs, la mesure du marqueur mHLA-DR est particulièrement connue car elle représente le meilleur marqueur des altérations immunitaires survenant chez des patients gravement malades comme ceux en état de sepsis [119]. Sa mesure est faite grâce à la cytométrie en flux depuis des années pour détecter ou suivre un patient en état de choc septique. Cependant, comme toute mesure faite par cytométrie en flux, elle est complexe et peu adaptée dans ces configurations médicales d'urgence, ce qui a empêché la généralisation de l'utilisation de ce marqueur en routine. De plus, l'expression de l'HLA-DR à la surface des monocytes augmente fortement en quelques heures dans le tube de prélèvement anti-coagulé. Cela oblige à conserver l'échantillon à +04°C et à l'analyser dans les 2 heures suivant le prélèvement, sans que cela ne bloque entièrement le phénomène.

L'objectif du travail a donc été d'appliquer la nouvelle méthode de cytométrie en flux « au lit du patient » à la mesure du mHLA-DR.

L'hypothèse est que cette nouvelle méthode pourrait permettre non seulement de simplifier la mesure, mais aussi de bloquer la montée de l'HLA-DR puisque le marquage de l'échantillon est fait immédiatement, les monocytes ne se retrouvant plus activés dans le sang total mais dilués dans la solution de lyse.

Ces deux axes font l'objet d'un second travail technique qui sera soumis à la revue *Clinical Immunology*, intitulé : « **Etude de validation de concept : surveillance de l'HLA-DR au lit du patient avec de la cytométrie en flux au plus proche de ses soins** » (figure 34).

Proof-of-concept study: HLA-DR bedside monitoring with point-of-care flow cytometry

Pénélope Bourgoin[a,b], Pierre-Emmanuel Morange[b], Fabrice Malergue[a], Guillaume Monneret[c]

[a] Department of Research and Development, Beckman Coulter-Immunotech, Marseille FRANCE.
[b] C2VN INSERM-INRAE, Aix-Marseille University, Marseille FRANCE.
[c] Hospices Civils de Lyon, Edouard Herriot Hospital, Immunology Laboratory, Lyon FRANCE.

Corresponding author. Correspondence and requests for materials should be addressed to Fabrice Malergue (email: fmalergue@beckman.com; phone: +33 638 290 051; address: 130 Avenue de Lattre de Tassigny, 13009 Marseille, FRANCE).

Abbreviations. ABC : Antibodies Bound per Cell ; APC : Allophycocyanin ; CV : Coefficient of Variation ; FA: Formaldehyde ; KO : Krome Orange ; MFI : Median of Fluorescence Intensity ; mHLA-DR : HLA-DR on monocytes ; MHCII : Class II Major Histocompatibility Complex ; PE : Phycoerythrin ; PerCP-Cy5.5 : Peridinin-chlorophyll proteins-Cyanine 5.5 ; SAPS : Simplified Acute Physiology Score ; SOFA : Sequential Organ Failure Assessment.

ABSTRACT.

Background: Decreased expression of Human Leukocyte Antigen-DR on monocytes (mHLA-DR) is recognized as the best marker for the monitoring of immune alterations in critically ill subjects such as sepsis. Its measurement has been established for years by flow cytometry, but could be biased due to the required multi-step procedure and the mHLA-DR natural rise that occurs in the next hours of the blood sampling. The goal of this study is to achieve a complete alternative flow cytometry solution for assessing a correct mHLA-DR level in blood samples of critically ill subjects.

Methods: A novel simplified one-step flow cytometry procedure has been first applied to measure mHLA-DR levels in 30 subjects under healthy and sepsis conditions, and compared to the reference technique. Then, the procedure has been optimized to further avoid the mHLA-DR natural rise's issue and re-evaluated on 20 subjects. Finally, the technique has been applied on a few subjects in point-of-care settings, by collecting capillary blood from fingerprick, and results were compared with those obtained from venous blood samples.

Results: Strong correlation was observed between methods when comparing the mHLA-DR staining, but the natural mHLA-DR rise still occurred in the test tube. After evaluation of several blocking agents, the procedure was optimized by adding a low dose formaldehyde in the lysis reagent. Another clinical evaluation showed that this optimized procedure strongly correlated to the standard one. Then the fingerprick and venous puncture were shown to provide comparable results for this measurement.

Conclusions: The one-step method, used there-in, enables an accurate point-of-care flow cytometry measurement of mHLA-DR in critically ill subjects. It further overcomes blood sampling constraints, blood tube storage (cold), rapid transportation to the laboratory (<2h), and eliminates most of the workflow error sources in the flow cytometry laboratory.

Keywords. One-step protocol, Point-of-Care, Flow Cytometry, Sepsis, HLA-DR monitoring.

1. INTRODUCTION.

Severe septic conditions are a clinical state that presents life-threatening clinical and biological symptoms including multiple organ dysfunctions, where subjects could die of immunosuppression after the first critical pro-inflammatory phase of their syndromes (Hotchkiss et al., 2013). This failure of the immune system results in the subjects' inability, on the one hand, to fight their primary infections, and on the other hand, to resist to secondary infections. Initiating an immunostimulatory therapy to these particular immunosuppressed subjects is urgently needed for achieving their recovery without complications (Venet et al., 2013).

For years, decreased expression of Human Leukocyte Antigen-DR on monocytes (mHLA-DR) has been increasingly published as the best marker for the identification and the monitoring of immune alterations in critically ill subjects, such as those in septic conditions (Guillaume Monneret et al., 2019; Remy et al., 2018b). It represents the single biomarker available to differentiate septic shock from other complications at patient admission (Machowicz et al., 2017). Indeed, it accurately reflects subjects' immune system through reflecting the status of monocytes functionality. Its measurement by flow cytometry provides valuable information in terms of mortality prediction or evaluation of risk for secondary infections (Monneret and Venet, 2014), and represents thus a crucial clinical help regarding subjects' care and management at the intensive care units (Remy et al., 2018a).

Actually, flow cytometry is the method of choice for mHLA-DR measurement since it allows to focus on monocytes, while many other blood cells could also express high levels of the biomarker. But mHLA-DR is a tricky molecule that naturally rises on monocytes in the sampling tube, necessitating a rapid testing (<2h at RT, or <4h if stored at +04°C). (Finck M-E. et al., 2003). A standardized flow cytometry protocol has been developed and the pre-analytical requirements are published (Docke, 2005; Monneret G. et al., 2002). The robustness of the protocol has been extensively demonstrated (Demaret et al., 2013). Still, flow cytometry is a complex and time-consuming technique limited to dedicated laboratories (Baumgarth and Roederer, 2000), poorly fitting with emergency needs. Further, the strict pre-analytical requirements to measure mHLA-DR, poorly adapted to most central labs organization (with no 24/24 activity), have prevented the technique to be broadly adopted for the management of ICU patients.

Removing these roadblocks implies making the procedure applicable directly at the point-of-care, and/or adding an internal stabilizing agent for the mHLA-DR biomarker, allowing for a delayed testing (at least 24h).

The second option seems difficult to implement, since adding a stabilizing agent at the time of blood sampling, if successful, would require to manufacture dedicated blood collection tubes. In contrast, a recently published flow cytometry procedure (Bourgoin et al., 2019) could reduce logistic constraints of mHLA-DR monitoring, by allowing both rapid and point-of-care testing of the subjects. Only 5-10 µL of venous or capillary blood, was directly incubated in a RBC lysis buffer, together with the staining antibodies, and the tube can be analyzed by a flow cytometer within a short time, without any other manipulation.

The hypothesis made is that the immediate dilution of a capillary blood drop into this "lyse & stain" buffer, should measure the exact, actual level of HLA-DR present in the subject. Furthermore it could avoid the natural mHLA-DR rise, in case the test tube cannot be readily analyzed.

If mHLA-DR is still rising in this new method, and if the test tube cannot be analyzed rapidly we then made the hypothesis that addition of inhibitive substances in the procedure reagents could block the mHLA-DR natural rise in the tube. HLA-DR is the Class II Major Histocompatibility Complex (MHCII), a cell surface receptor that is first produced inside the cells in granules and then up-regulated after signaling at the surface of the monocytes by granules exocytosis (Fumeaux and Pugin, 2002). Substances potentially blocking this natural rise could thus be a Golgi blocker (Brefeldin A) acting on granules production (Yu et al., 2018), metabolism or cellular functions blockers (Azide, Cold) acting on the cells pathways (Bowler et al., 2006), cytoskeleton blockers (Cytochalasine D, Colchicine) acting on granules exocytosis (Schliwa M., 1982; Wangping et al., 2014), or a general fixative such as formaldehyde (FA) (Paavilainen et al., 2010).

2. MATERIAL AND METHODS.

2.1. Standard flow cytometry procedure

The standard procedure, currently used as reference in routine, has been extensively described by Demaret et al. in 2013 (Demaret et al., 2013). Briefly, 50 µL of whole EDTA blood is first stained at room temperature during 30 minutes in the dark with 20 µL of QuantiBrite HLA-DR/Monocyte mixture, composed by QuantiBrite anti-HLA-DR-PE (clone L243) and anti-monocytes CD14-PerCP-Cy5.5 (clone MUP9). Then, samples are lysed during 15 minutes using 450 µL of FACS Lysing Solution (Beckton Dickinson Inc., Franklin Lakes, NJ, USA) and finally, washed once before acquisition on the flow cytometer.

2.2. New point-of-care flow cytometry procedure

The new point-of-care procedure has been described by Bourgoin et al. (Bourgoin et al., 2019) in 2019 and slightly adapted here: briefly 10 µL of whole blood is simultaneously lysed and stained at room temperature during 30 minutes in the dark, using respectively 500 µL of Versalyse lysing solution (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) and a custom mixture of dried conjugates (Beckman Coulter Inc.), composed by anti-HLA-DR-PE (clone Immu357), anti-CD14-APC (clone RMO52) and anti-CD45-Krome Orange (KO) (clone J33). The lysis buffer is first added to the tube, what allows to dissolve the dried antibodies, then blood is added, either pipetted from an anti-coagulated regular collection tube, or from a fingerprick droplet whenever mentioned. After incubation and/or storage, the tube is directly analyzed on the flow cytometer.

2.3.Procedure stabilization over time

The comparison was made without supplementing reagents or by adding to the lysing solution either brefeldin A (10 µg/mL, from Sigma-Aldrich Co., Saint-Louis, MO, USA), or azide (0.05% or 0.09%, from Sigma-Aldrich Co.), or cytochalasine D (10 µg/mL, from Sigma-Aldrich Co.), or colchicine (10 µg/mL, from Sigma-Aldrich Co.), or formaldehyde (0.0125% or 0.025% or 0.05%, Beckman Coulter Inc.). Tubes were also simply kept without additional reagents between +02 to +08°C, as recommended for regular collection tubes (Ayala et al., 2008).

2.4.Study samples

Immunotech evaluations were conducted on leftover EDTA blood samples from healthy volunteers, obtained from the Saint Joseph Hospital (Marseille, France) and tested upon informed consent. Edouard Herriot evaluations were conducted on leftover EDTA blood samples from subjects with septic conditions, admitted to the surgical Intensive Care Unit in Edouard Herriot Hospital (Lyon, France) and collected within 24 hours after admission. All testing by flow

cytometry were made within the recommended two hours after blood collection. The results presented herein belong to the IMMUNOSEPSIS study (registered as NCT02803346 at ClinicalTrials.gov). The 37 subjects in septic shock conditions, used for the comparison, are 16 females / 21 males, at onset of shock. The mean age was 70 (±13) years, the mean Simplified Acute Physiology Score (SAPS) II was 61 (±18), and the mean Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score was 9.5 (±3). 12 subjects (33%) died within 28 days. As a control group, healthy volunteers were also included in the study upon informed consent.

2.5. Flow cytometry and statistical analyzes

All data were collected on 3-laser, 10-color Navios flow cytometers and analyzed using Kaluza Software version 2.1 (Beckman Coulter Inc.). Leucocytes were first gated out from other cells on the basis of their CD45 expression (in the new one-step method only). Monocytes were then gated out on the basis of their high CD14 expression. mHLA-DR expression was finally measured on their surface on a mono-parametric histogram. Compensation between the fluorescence channels PerCP-Cy5.5 and PE was made according to the Quantibrite instructions, whereas no compensation was required in the new one-step method since the dyes do not overlap. Results are given as Median of Fluorescence Intensity (MFI) related to the entire monocyte population, or when needed, are transformed in number of Antibodies Bound per Cell (ABC) thanks to calibrated Quantibrite PE-beads (Beckton Dickinson Inc.).

Comparisons of quantitative variables were performed using paired Tukey or Dunnett's control or Student's t test, and by Anova for more than two groups. Correlations were evaluated using the Pearson's correlation coefficient. The statistical analyzes were performed using Jump software version 10 (SAS institute Inc., Cary, NC, USA). All p-values are considered statistically significant under 0.05.

3. RESULTS.

3.1. Comparison between standard and point-of-care methods

Since the quantification of a biomarker requires the use of saturating amount of antibody, several concentrations of anti-HLA-DR-PE antibody have been statistically compared within the new one-step procedure to evaluate its saturating dose (figure 1).

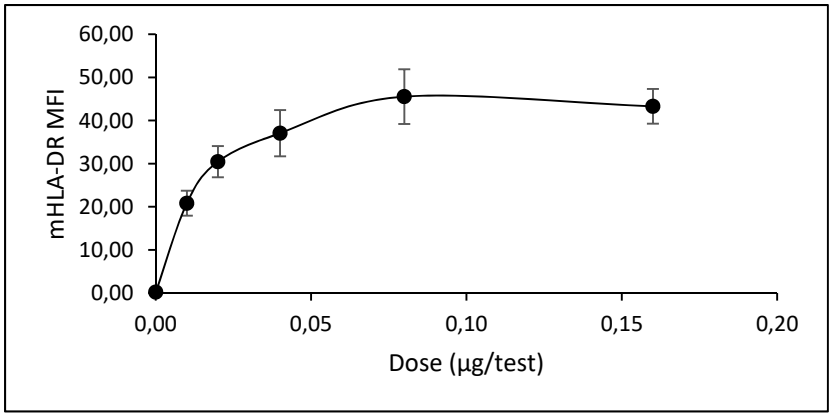


Figure 1. Anti-HLA-DR-PE concentration impact on mHLA-DR MFI. *8 donors have been processed within the new one-step procedure, with different doses of anti-HLA-DR-PE. Results are expressed as averages ± standard deviations of Median of Fluorescence Intensities (MFI) of mHLA-DR. Comparison has been made using a paired Tukey test.*

mHLA-DR values are significantly different between doses of 0.01 µg/test (20.8 ± 5.8; $p < 0.01$) and 0.02 µg/test (30.5 ± 7.2; $p < 0.05$) when compared to 0.16 µg/test (43.3 ± 8.1), while they are not for 0.04 µg/test (37.1 ± 10.8; p: 0.6799) and 0.08 µg/test (45.5 ± 12.7; p: 0.9944) doses.

Best saturating average dose was thus achieved for an anti-HLA-DR-PE antibody dose at 0.08 µg/test, what allowed the comparison between the standard and the new one-step procedure (figure 2).

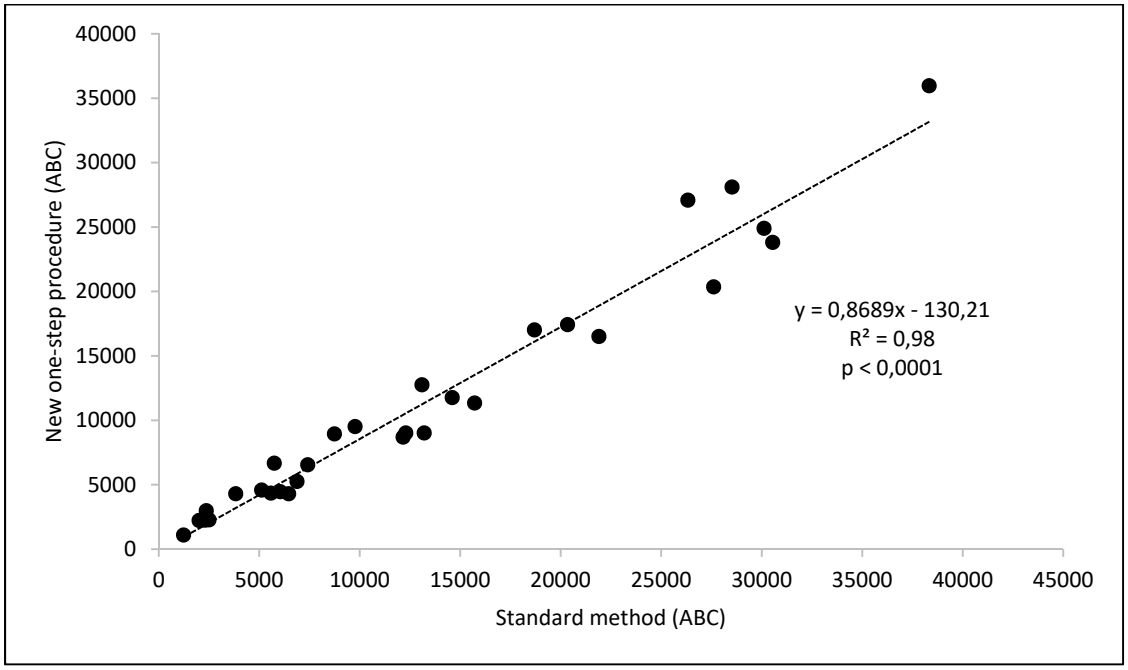


Figure 2. Comparison between standard and one-step methods. *24 subjects with sepsis conditions and 6 healthy volunteers have been processed within the standard and the one-step procedure, respectively with and without a final wash step. Results are expressed as Antibody Bounds per Cell (ABC) mHLA-DR, based on the reference Quantibrite PE beads. Comparison between methods has been established using the Pearson correlation coefficient, and model's square dot fit line and equation are indicated on the graph.*

Strong correlation was achieved (R^2: 0.98; $p < 0.0001$), meaning that both procedures offer similar performances for mHLA-DR measurement, even if the one-step method does not include a final wash step.

3.2. Stabilization of the mHLA-DR within the one-step method

Finck et al. revealed a concern about the mHLA-DR natural rise within the blood tube after its collection (Finck M-E. et al., 2003). In the new one-step method, practitioners would test the subjects' blood directly by putting it in the reaction tube, what hopefully could counteract this phenomenon. Unfortunately, the mHLA-DR rise occurs also in these conditions (figure 3).

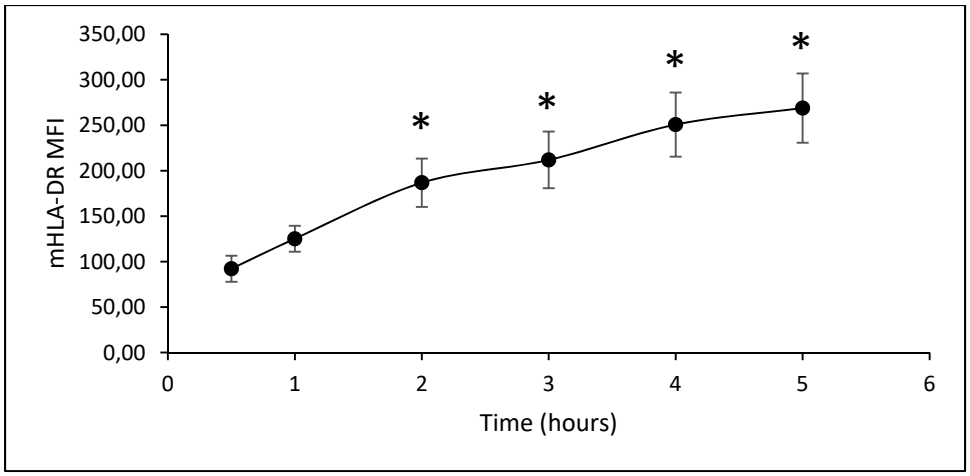


Figure 3. Evolution of mHLA-DR level in reaction tubes with time after blood collection. *13 donors have been processed within the one-step method. Level of mHLA-DR has been measured after either 30 minutes of incubation in the reaction tube (reference time), or after reaction tubes storage during 1 or 2 or 3 or 4 or 5 hours at room temperature. Results are expressed as averages ± standard deviations of the Median of Fluorescence Intensities (MFI) of mHLA-DR. Comparison has been made using a Dunnett's control test.*

mHLA-DR level at 30 minutes (92.2 ± 28.5) is significantly equivalent to that obtained after 1 hour of processing (125.2 ±53.0; p: 0.5732), but is dramatically increased in those obtained within or within more than 2 hours (2 hours: 186.8 ± 62.3; 3 hours: 211.9 ± 70.5; 4 hours: 250.7 ± 76.2; 5 hours: 268.9 ± 66.5; all $p < 0.01$).

Addition of stabilizing reagents within the reaction tubes has been tested to try overcome this mHLA-DR natural rise over time (figure 4).

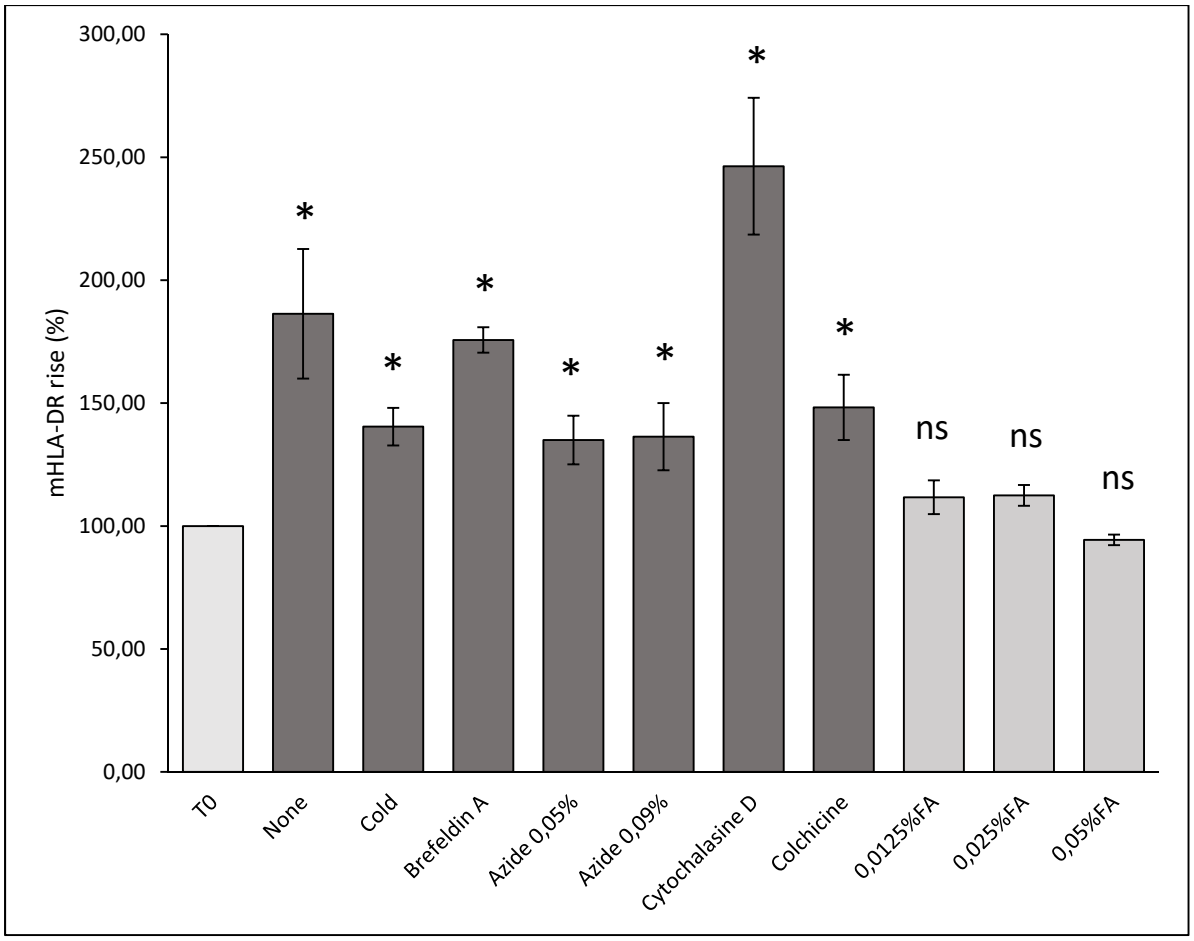
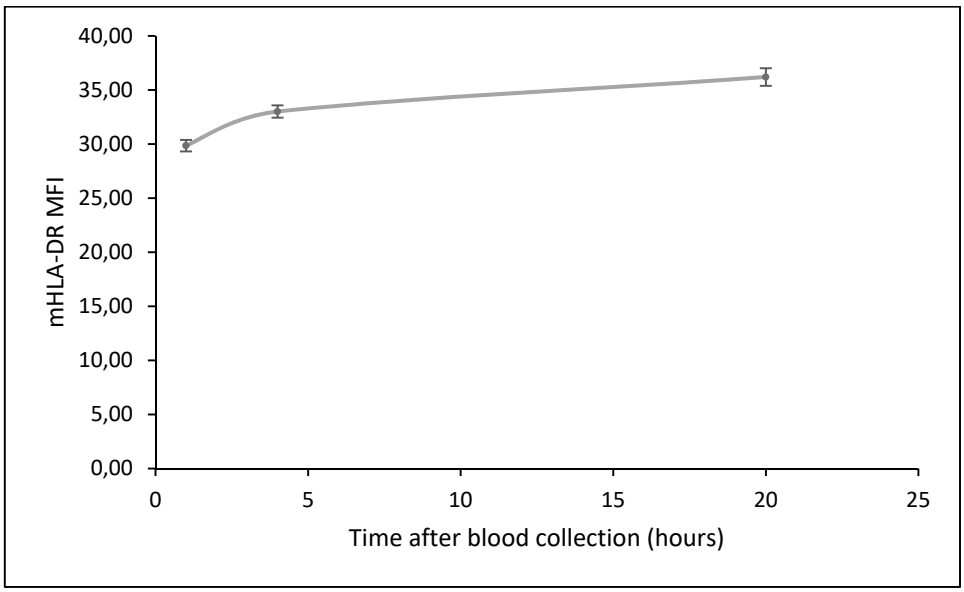


Figure 4. mHLA-DR level over time in the presence of various stabilizing reagents. *10 donors have been processed within the one-step procedure with various stabilizing reagents added in lysing solution : none, cold, brefeldin A, azide 0.05%, azide 0.09%, cytochalasine D, colchicine, 0.0125% formaldehyde (FA), 0.025% FA and 0.05% FA. Level of HLA-DR has been measured after either 1 hour of incubation in the reaction tube (reference value), or 4 hours. Results are expressed as percentage averages ± standard deviations of increase of Median of Fluorescence Intensities (MFI) of mHLA-DR. Comparison between 1 and 4 hours has been made using a Student's t test.*

As previously found, the expression of mHLA-DR in the reaction tubes increases two-fold (+ 86 ± 53 %) when analyzed at 4 hours of incubation compared to 1 hour of incubation ($p < 0.001$). When tubes were kept in cold conditions, the expression of mHLA-DR in the reaction tubes increases of + 40 ± 15 % (p: 0.0231). Increases are also shown when brefeldin A (+ 76 ± 10 %; p: 0.0020) or azide at 0.05% (+ 35 ± 20 %; p: 0.0061) are added. Even a higher azide concentration at 0.09% is not sufficient (+ 36 ± 27 %; p: 0.0404). Cytochalasine D and colchicine have also no stabilizing effects, with respective increases of + 46 ± 56 % ($p < 0.001$) and + 48 ± 27 % (p: 0.0071). However, the expressions of mHLA-DR in the reaction tubes are significantly equivalent between 1 to 4 hours of incubation for all tested doses of formaldehyde, respectively evaluated at 0.0125% (+ 12 ± 14 %; p: 0.6197), 0.025% (+ 12 ± 8 %; p: 0.3533) and 0.05% (- 6 ± 4 %; p: 0.0061), meaning that formaldehyde at low dose seems to inhibits mHLA-DR natural rise in reaction tubes during time, without affecting cell staining.

Since a test tube could require a delayed analysis (in case the flow cytometer or the lab would be unavailable), we checked if the tubes (with the low dose formaldehyde added) could be stored up to 20h between +02 to +08°C. Simultaneously, a repeatability evaluation was conducted (figure 5).



Time (hours)	1	4	20	ANOVA p-value
mHLA-DR MFI	29,8 ± 1,1	33 ± 1,1	36,2 ± 1,6	**p < 0,001***
CV (%)	3,6	3,5	4,5	

Figure 5. Staining repeatability of mHLA-DR measurement within the stabilized one-step procedure. *1 donor has been processed within the one-step procedure with formaldehyde 0.025% addition and storage between +02 to +08°C (after 1 hour staining at RT): 1 sample has been stained in 10 different tubes and each has been analyzed once. mHLA-DR has been measured after either 1 or 4 or 20 hours of incubation in the reaction tube (staining stability). Results are expressed as averages ± standard deviations of Median of Fluorescence Intensities (MFI), with respective calculated coefficients of variation (CV). Comparison has been made using an ANOVA test.*

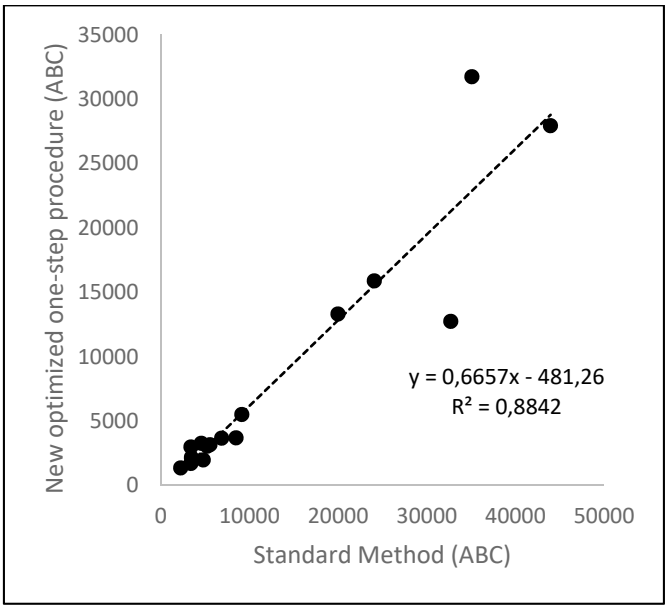
At each time point, CV ranged from 3.5 to 4.5 %. Such CV < 5% are very satisfactory for such a manual immunological method. Regarding staining stability, despite the association of low dose formaldehyde and cold storage, a slight increase of mHLA-DR MFI still occurred (+11% between 1 to 4 hours, and +21% between 1 to 20 hours), similarly as observed in the previous experiment with addition of 0,025% FA (Figure 4).

The cytometer precision of the mHLA-DR measurement was also evaluated by analyzing ten times the same sample after 2 hours of incubation, producing a CV of 4.2% (not shown). All these results indicate a good reliability of the mHLA-DR measure within the optimized one-step procedure.

3.3.Clinical performances of the optimized one-step method

The new optimized method (with formaldehyde) has been evaluated again in clinical settings, and provided again a very good correlation with the standard method. Then, when storing the stained tubes at 4°C for 4 to 24 hours for a delayed analysis, it was possible to confirm that the mHLA-DR natural rise was almost completely blocked (figure 6).

(A)



(B)

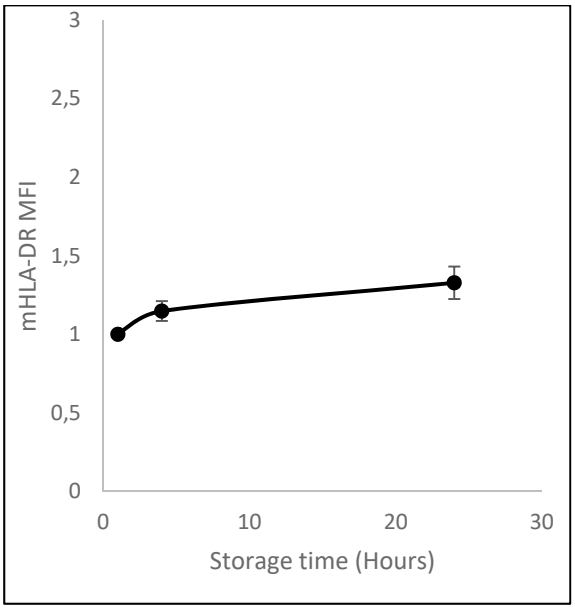


Figure 6. Comparison between standard and one-step methods. (A) *13 subjects with sepsis conditions and 3 healthy volunteers have been processed within the standard and the optimized one-step procedure. Results are expressed as Antibody Bounds per Cell (ABC) mHLA-DR, based on the reference Quantibrite PE beads. Comparison between methods has been established using the Pearson correlation coefficient, and model's square dot fit line and equation are indicated on the graph. (B) The same test tubes have been stored at 4°C and reanalyzed 4 and 24 hours later. Mean +/- SD are indicated.*

Among 16 subjects, the mHLA-DR rise was 15% (+/- 12%) after 4h storage, and 33% (+/- 21%) after 24h storage, in line with the previous experiment (figure 5).

3.4.Combination of the optimized one-step method with the fingerprick sampling

The new optimized method has been evaluated to check if it was applicable to a capillary blood sampling; a representative staining is presented in figure 7**.** It indicates that the staining and the leucocytes proportions were similar, and the mHLA-DR was equivalent. Interestingly, the absence of anticoagulant did not induce more aggregates that could interfere with the flow cytometry analysis.

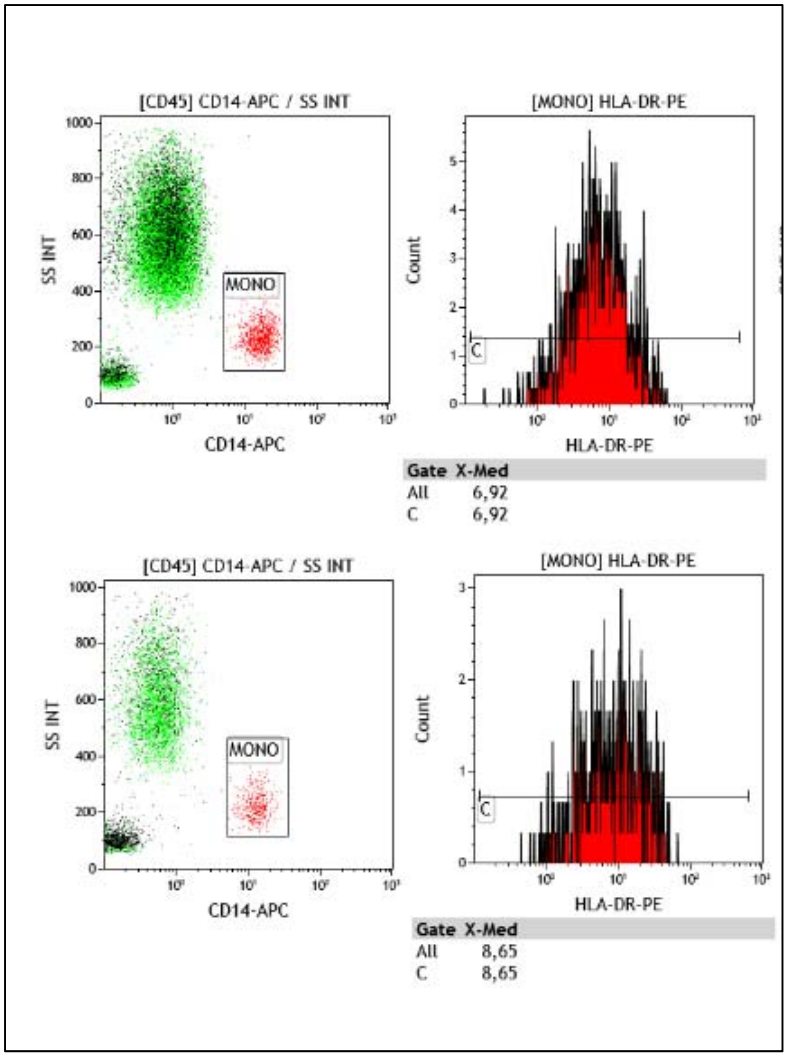


Figure 7. Comparison between a regular EDTA blood sample (A), and a fingerprick sample (B). *Both samples from the same donor have been analyzed with the optimized one-step method, Following a CD45 gating, CD14+ monocytes are gated, and mHLA-DR measured.*

4. DISCUSSION

Immunosuppression in sepsis has a central role (Hall et al., 2011). However, as there is no clinical sign of immunosuppression, there exists an urgent need for rapid, sensitive and specific biomarker of robustness of subjects' immune status (Venet et al., 2013). HLA-DR on monocytes is considered as the best surrogate marker of immune failure, useful both for identifying subjects who would be appropriate candidates for immunotherapy, and for monitoring responsiveness to treatment (Wolk, 2000). This ability to assess patient immune status should contribute to the success of future immune targeted clinical trials based on the inclusion of appropriately stratified subjects. Flow cytometry procedure for measuring its expression has already been established for years and inter-laboratory experiments demonstrated its robustness, even for multicentric evaluations (Demaret et al., 2013; Docke, 2005; Monneret et al., 2010).

However, even if flow cytometry is demonstrated to be a powerful analytical technique, its use for mHLA-DR level determination does not appear as popular as it should as it remains extremely dependent on the analytical procedure: on the one hand, the procedure is time-consuming whereas the measure is often required in emergency situations, and on the other hand, the elapsed time between blood collection and the sample staining constitutes a critical step (Monneret G. et al., 2002). Both drawbacks constituted the rational for the study: the aim was to propose a proof-of-concept for monitoring mHLA-DR level with a new bedside flow cytometry procedure.

Some teams have already tried to solve these two drawbacks. For instance, Cajander et al. (Cajander et al., 2013) developed a molecular biology-based tool to circumvent and give alternatives to flow cytometry for identifying subjects with sepsis-induced immunosuppression. However, their new approach was difficult to introduce in a routine use, and flow cytometry remained a gold standard technique for mHLA-DR measurement.

The procedure proposed therein is a new alternative for assessing mHLA-DR level in sepsis subjects with a bedside protocol recently described by Bourgoin et al. (Bourgoin et al., 2019). In comparison to standard flow cytometry procedure, first, it requires less blood, allowing the collection of capillary blood instead of venous blood, and reducing or even removing the material needed for sampling and the time required to transport blood to the laboratory, in case a point-of-care flow cytometer would be available. Moreover, the procedure uses ready-to-use and dried reagents that enable room-temperature storage and removes the need for pipetting. Furthermore, the proposed combination of markers is compensation-free on the current 3-laser flow cytometers. The new method described here is thus an easier, faster and with less risk of variability protocol, which fits to requirements established for quantifying and monitoring such an important biomarker with flow cytometry (Dittrich et al., 2016).

In this study, the main result was that the expression of mHLA-DR given within this protocol was demonstrated to be strongly correlated to the level measured with the current routine method, even if the new procedure was performed without a final washing step. However, ABC levels were not equivalent between methods, as shown in correlation equations' curves: values obtained within the one-step were systematically lower (0.7-0.8 fold) than those obtained within standard method, despite the use of saturating doses of antibodies. This is not really a surprise since 2 different anti-HLA-DR-PE antibodies clones were compared, and such differences among clones have already been reported. This phenomenon could be related to the way antibodies are conjugated at a 1:1 ratio, to different valence of these clones and/or to different accessibilities on the monocyte surface. The difference is not huge, but this will need to be addressed in future developments and clinical evaluations.

The secondary goal of the study was to avoid the necessary pre-analytical requirements for mHLA-DR measurements: bias is systematically introduced in mHLA-DR monitoring if blood samples are processed after 2 hours of the blood collection without storage at +04°C (Finck M-E. et al., 2003). Furthermore, in the study, cold storage had only limited efficiency when used alone. Using as little as 5-10µL of blood within the new bedside procedure could allow the use of capillary blood from a fingerstick, removing any issues regarding the blood collection tubes. However, the study demonstrated that the natural increase of mHLA-DR that normally occurs in the blood tube happens also in the reaction tube. This is mainly due to the continuous production of mHLA-DR by cells (Fumeaux and Pugin, 2002; Hotchkiss et al., 2013). The addition of a low dose of formaldehyde, in addition to a cold storage, was demonstrated in this study to have a significant

impact to stabilize this production and inhibits the rise of mHLA-DR expression after blood processing.

Other stabilizing reagents were tested with surprisingly less significant stabilizing effects. HLA-DR is produced into intracellular granules, which are ready to be expressed at the surface of the cells. First, brefeldin A, a Golgi apparatus' blocker, might have been more effective upstream of this production than on proteins already synthetized (Yu et al., 2018). Then, when testing azide or cold as inhibitors of cellular fonctions or metabolism, a retarder effect seems to be observed on the granules exocytosis but does not prevent it. Finally, even more specific cytoskeleton blockers, such as cytochalasine D or colchicine, did not succeed in limiting surface expression of HLA-DR granules. Only formaldehyde seems to have a "freezing" effect on the cells.

Within the new one-step method proposed in the study, low dose formaldehyde could have been added either to the antibodies mixture or to the lysing solution. Its addition with the antibodies could have impact on their activity (Paavilainen et al., 2010), and this reagent is hardly and even non-drying. That is why the best option was to add it to the lysing solution, for which a stabilizing effect on mHLA-DR level was observed even after at least 30 days preparation (not shown). Several FA dilutions were tested to avoid any deleterious impact on the antibody recognition of their target (MFI decreased with 0.05% FA) but a too low FA dose was ineffective for stabilizing mHLA-DR level (MFI increased with 0.0125% FA). That's why 0.025% FA was a good compromise and the dose chosen in the optimized method. This final procedure produced a very good accuracy of less than 5% of variability.

The method could finally be re-evaluated in the clinical context, with the expected similar results as the standard method. Of course the study has some limitations, the number of subjects tested was low and the fingerprick methodology has to be optimized.

5. CONCLUSION.

In this study, a new easy protocol of extracellular staining was applied to the monitoring of mHLA-DR in subjects with sepsis. The proof-of-concept was promising, because it saves time and work while offering expression levels of the biomarker similar to the standard reference protocol currently used in clinical routine. The optimizations achieved, toward avoiding pre-analytical requirements, suggest an additional value of considering this one-step concept as an alternative for flow cytometry bedside monitoring of mHLA-DR.

ACKNOWLEDGEMENTS.

The authors would like to thank the technician team of the Edouard Herriot Hospital laboratory for their assistance in blood sampling and testing.

FUNDING.

This work was partially supported by Beckman Coulter through donations of laboratory supplies and participation of the two employees mentioned. This private company had no role in the study design, or collection and interpretation of data. Beckman Coulter and the Beckman Coulter product and service marks mentioned herein are trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States and other countries. All other trademarks are the property of their respective owners.

DECLARATION OF INTEREST.

Fabrice Malergue and Pénélope Bourgoin are Beckman Coulter employees. Pénélope Bourgoin is recipient of a CIFRE PhD grant from the ANRT (National Agency for Research and Technology).

They provided critical advice on setup of the assay and instruments and in manuscript preparation.

REFERENCES.

Ayala, A., Perl, M., Venet, F., Lomas-Neira, J., Swan, R., Chung, C.-S., 2008. Apoptosis in Sepsis: Mechanisms, Clinical Impact and Potential Therapeutic Targets. Curr. Pharm. Des. 14, 1853–1859. https://doi.org/10.2174/138161208784980617

Baumgarth, N., Roederer, M., 2000. A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. J. Immunol. Methods 243, 77–97. https://doi.org/10.1016/S0022-1759(00)00229-5

Bourgoin, P., Hayman, J., Rimmelé, T., Venet, F., Malergue, F., Monneret, G., 2019. A novel one-step extracellular staining for flow cytometry: Proof-of-concept on sepsis-related biomarkers. J. Immunol. Methods 470, 59–63. https://doi.org/10.1016/j.jim.2019.05.001

Bowler, M.W., Montgomery, M.G., Leslie, A.G.W., Walker, J.E., 2006. How azide inhibits ATP hydrolysis by the F-ATPases. Proc. Natl. Acad. Sci. 103, 8646–8649. https://doi.org/10.1073/pnas.0602915103

Cajander, S., Bäckman, A., Tina, E., Strålin, K., Söderquist, B., Källman, J., 2013. Preliminary results in quantitation of HLA-DRA by real-time PCR: a promising approach to identify immunosuppression in sepsis. Crit. Care 17, R223. https://doi.org/10.1186/cc13046

Demaret, J., Walencik, A., Jacob, M.-C., Timsit, J.-F., Venet, F., Lepape, A., Monneret, G., 2013. Inter-laboratory assessment of flow cytometric monocyte HLA-DR expression in clinical samples. Cytometry B Clin. Cytom. 84B, 59–62. https://doi.org/10.1002/cyto.b.21043

Dittrich, S., Tadesse, B.T., Moussy, F., Chua, A., Zorzet, A., Tängdén, T., Dolinger, D.L., Page, A.-L., Crump, J.A., D'Acremont, V., Bassat, Q., Lubell, Y., Newton, P.N., Heinrich, N., Rodwell, T.J., González, I.J., 2016. Target Product Profile for a Diagnostic Assay to Differentiate between Bacterial and Non-Bacterial Infections and Reduce Antimicrobial Overuse in Resource-Limited Settings: An Expert Consensus. PLOS ONE 11, e0161721. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161721

Docke, W.-D., 2005. Monitoring Temporary Immunodepression by Flow Cytometric Measurement of Monocytic HLA-DR Expression: A Multicenter Standardized Study. Clin. Chem. 51, 2341–2347. https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.052639

Finck M-E., Elmenkouri N., Debard A-L., Bohé J., Lepape A., Bienvenu J., Monneret G., 2003. Standardisation de la mesure de l'antigène HLA-DR monocytaire par cytométrie en flux : résultats préliminaires et application dans le suivi des chocs septiques. Ann Biol Clin 61, 441–448.

Fumeaux, T., Pugin, J., 2002. Role of Interleukin-10 in the Intracellular Sequestration of Human Leukocyte Antigen-DR in Monocytes during Septic Shock. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 166, 1475–1482. https://doi.org/10.1164/rccm.200203-217OC

Guillaume Monneret, Morgane Gossez, Nima Aghaeepour, Brice Gaudilliere, Fabienne Venet, 2019. How clinical flow cytometry rebooted sepsis immunology. Cytometry A. https://doi.org/10.1002/cyto.a.23749

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 Med. 37, 525–532. https://doi.org/10.1007/s00134-010-2088-x

Hotchkiss, R.S., Monneret, G., Payen, D., 2013. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. Lancet Infect. Dis. 13, 260–268. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70001-X

Knight, R.R., Kronenberg, D., Zhao, M., Huang, G.C., Eichmann, M., Bulek, A., Wooldridge, L., Cole, D.K., Sewell, A.K., Peakman, M., Skowera, A., 2013. Human β-Cell Killing by Autoreactive Preproinsulin-Specific CD8 T Cells Is Predominantly Granule-Mediated With the Potency Dependent Upon T-Cell Receptor Avidity. Diabetes 62, 205–213. https://doi.org/10.2337/db12-0315

Lorentz, A., Baumann, A., Vitte, J., Blank, U., 2012. The SNARE Machinery in Mast Cell Secretion. Front. Immunol. 3. https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00143

Machowicz, R., Janka, G., Wiktor-Jedrzejczak, W., 2017. Similar but not the same: Differential diagnosis of HLH and sepsis. Crit. Rev. Oncol. Hematol. 114, 1–12. https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.03.023

Monneret G., Elmenkouri N., Bohe J., Debard A.L., Gutowski MC., Bienvenu J., Lepape A., 2002. Analytical requirements for measuring monocytic human lymphocyte antigen DR by flow cytometry: application to the monitoring of patients with septic shock. Clin. Chem. 48, 1589–1592.

Monneret, G., Venet, F., 2014. Monocyte HLA-DR in sepsis: shall we stop following the flow? Crit. Care 18, 102. https://doi.org/10.1186/cc13179

Monneret, G., Venet, F., Meisel, C., Schefold, J.C., 2010. Assessment of monocytic HLA-DR expression in ICU patients: analytical issues for multicentric flow cytometry studies. Crit. Care 14, 432. https://doi.org/10.1186/cc9184

Paavilainen, L., Edvinsson, Å., Asplund, A., Hober, S., Kampf, C., Pontén, F., Wester, K., 2010. The Impact of Tissue Fixatives on Morphology and Antibody-based Protein Profiling in Tissues and Cells. J. Histochem. Cytochem. 58, 237–246. https://doi.org/10.1369/jhc.2009.954321

Remy, S., Gossez, M., Belot, A., Hayman, J., Portefaix, A., Venet, F., Javouhey, E., Monneret, G., 2018a. Massive increase in monocyte HLA-DR expression can be used to discriminate between septic shock and hemophagocytic lymphohistiocytosis-induced shock. Crit. Care 22. https://doi.org/10.1186/s13054-018-2146-2

Remy, S., Kolev-Descamps, K., Gossez, M., Venet, F., Demaret, J., Javouhey, E., Monneret, G., 2018b. Occurrence of marked sepsis-induced immunosuppression in pediatric septic shock: a pilot study. Ann. Intensive Care 8. https://doi.org/10.1186/s13613-018-0382-x

Schliwa M., 1982. Action of cytochalasin D on cytoskeletal networks. J. Cell Biol. 92, 79–91.

Venet, F., Lukaszewicz, A.-C., Payen, D., Hotchkiss, R., Monneret, G., 2013. Monitoring the immune response in sepsis: a rational approach to administration of immunoadjuvant therapies. Curr. Opin. Immunol. 25, 477–483. https://doi.org/10.1016/j.coi.2013.05.006

Wangping, D., Lei, Wei, Xiaoming, C., Heng, G., Lei, Wang, Yongzhuang, H., Xiaochun, W., 2014. Effect of the disruption of three cytoskeleton components on chondrocyte metabolism in rabbit knee cartilage. Chin. Med. J. (Engl.) 7.

Wolk, K., 2000. Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance 96, 6.

Yu, R.-Y., Xing, L., Cui, P.-F., Qiao, J.-B., He, Y.-J., Chang, X., Zhou, T.-J., Jin, Q.-R., Jiang, H.-L., Xiao, Y., 2018. Regulating the Golgi apparatus by co-delivery of a COX-2 inhibitor and Brefeldin A for suppression of tumor metastasis. Biomater. Sci. 6, 2144–2155. https://doi.org/10.1039/C8BM00381E

Figure 34 : Etude de validation de concept : surveillance de l'HLA-DR au lit du patient avec de la cytométrie en flux au plus proche de ses soins. *Publication en cours de soumission dans la revue Clinical Immunology, portant sur les travaux de validation et d'optimisation finale de la technique de cytométrie en flux « au lit du patient ».*

Les résultats de ces travaux sont la validation technique de la nouvelle méthode de cytométrie en flux en une étape pour la détection de marqueurs leucocytaires de surface, comme l'HLA-DR sur les monocytes.

La première étape a montré que la nouvelle méthode de cytométrie en flux « au lit du patient » est comparable à la méthode de référence de cytométrie en flux pour la mesure de l'HLA-DR chez les patients atteints de sepsis.

La deuxième étape a été d'ajouter une faible dose (0,025%) de formaldéhyde (FA) au réactif de lyse pour les cas où l'échantillon préparé ne serait pas lu instantanément mais plusieurs heures après.

La stabilité intrinsèque de la lyse Versalyse 0,025% FA, à conserver son effet stabilisateur sur la mesure du mHLA-DR, a été caractérisée en dehors de l'étude (figure 35) : elle est d'au moins 30 jours.

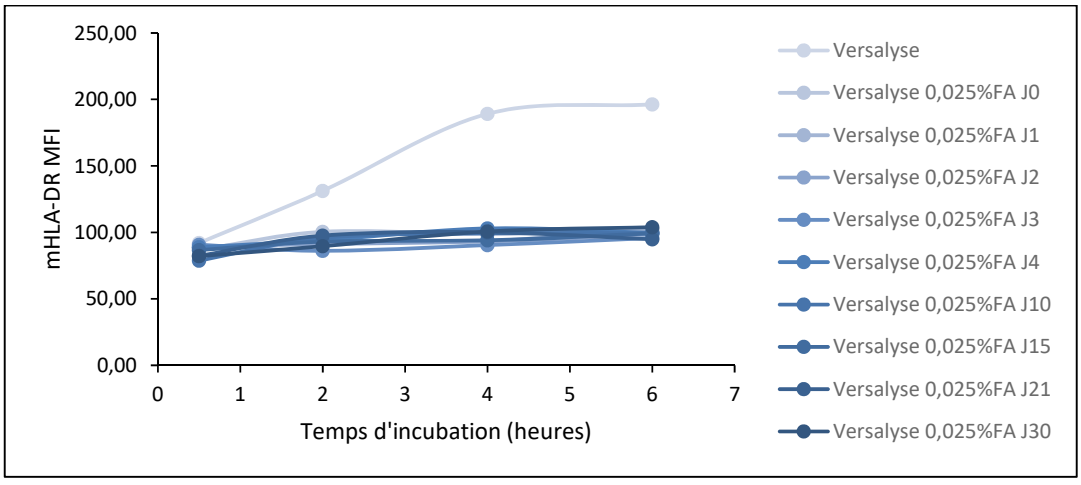


Figure 35 : Stabilité du stockage du réactif de lyse. *3 donneurs ont été testés avec la procédure de cytométrie en flux « au lit du patient » en utilisant ou bien de la lyse Versalyse sans formaldéhyde (FA) fraîche (présentée mais non inclus dans la comparaison statistique) ou bien de la lyse Versalyse 0.025% FA préparée depuis 0 à 30 jours. Les moyennes de la médiane d'intensité de fluorescence (MFI) de l'HLA-DR sur les monocytes (mHLA-DR) ont été mesurées après 30 minutes ou 2 ou 4 ou 6 heures d'incubation pour chaque solution de lyse.*

Dans les cas où un temps plus long est nécessaire avant analyse (jusqu'à 24 heures), l'étude recommandait de combiner cette lyse Versalyse 0,025% FA avec la mise entre +02 et +08°C du tube en attente d'analyse.

Cette double optimisation de la technique limite la montée du mHLA-DR à environ 10% en 4 heures, et 20% en 20 heures, avec moins de 5% de variabilité quel que soit le moment où elle est mesurée.

La troisième étape de l'étude a montré à nouveau une bonne corrélation avec la méthode de référence, et confirmé, en conditions cliniques, que la montée du mHLA-DR était en moyenne de 15% sur 4 heures et de 25% sur 24 heures.

Une dernière étape a continué de valider de manière préliminaire l'utilisation du sang capillaire par rapport au sang veineux.

Ainsi, l'application de la technique de cytométrie en flux « au lit du patient » à la mesure du mHLA-DR chez les patients en état de sepsis permet de proposer une nouvelle méthode plus simple, plus rapide, et en une seule étape, sans lavage, et analysée sans compensations, mais avec des performances de détection équivalentes.

La compréhension des problématiques rencontrées pour cette mesure du mHLA-DR d'urgence a permis d'optimiser davantage les réactifs de la procédure pour la discrimination des infections bactériennes et virales : la lyse en utilisation combinée avec du formaldéhyde et le sang en utilisation capillaire. Cette étude ouvre tout-de-même la possibilité d'applications nombreuses pour lesquelles cette nouvelle technique de cytométrie en flux « au lit du patient » constituerait un réel avantage.

Conclusion 2.1

Le premier objectif de la thèse était la mise au point d'une technique de cytométrie en flux utilisable « au lit du patient », avec des étapes et des réactifs bien caractérisés, et une facilité d'utilisation et une robustesse démontrées.

Les travaux de standardisation et de simplification du protocole constituent déjà des avancées avantageuses par rapport aux outils existants pour les tests « au lit du patient » (figure 36).

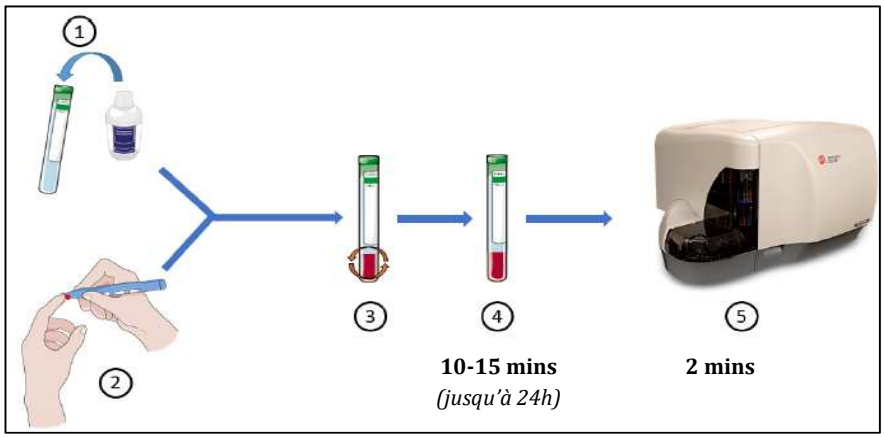


Figure 36 : Protocole final de cytométrie en flux « au lit du patient ». *1) En amont de la réalisation du test, la solution de lyse est ajoutée sur le mélange d'anticorps secs. 2) Une goutte de sang capillaire du patient est collectée au bout de son doigt de manière peu invasive. 3) La goutte de sang est ajoutée au mélange de lyse et d'anticorps. 4) Une incubation minimale de 10 à 15 minutes est nécessaire (mais peut durer jusqu'à 24 heures). 5) A l'issue de l'incubation, le tube est analysé au cytomètre en 2 minutes.*

Un travail important a été fait sur ce protocole, en réduisant son nombre d'étapes et son temps d'incubation, par rapport à une procédure traditionnelle de cytométrie en flux, mais notamment sur ses réactifs et leurs volumes. Les anticorps en format sec sont prêts-à-l'emploi à leurs doses optimales pour la discrimination des infections bactériennes et virales : CD64-PBE, CD169-PE, et HLA-DR-APC.

Le réactif de lyse Versalyse est utilisé en combinaison avec du formaldéhyde car ils sont compatibles et permettent de stabiliser tout échantillon qui aurait été testé mais dont l'analyse serait retardée. En développement, il restera à ce que le volume de lyse nécessaire pour un test soit unitisé en un flacon prêt-à-l'emploi.

Enfin, il a été démontré que la technique était applicable aussi bien à un échantillon de sang veineux qu'à un échantillon de sang capillaire, sans en affecter les performances de répétabilité et reproductibilité du test. La démonstration a été renforcée par l'étude d'application de la méthode à la mesure précise du mHLA-DR chez les patients sepsis, mais nécessite davantage de donneurs testés. Notamment, des travaux cliniques devront être menés avec des échantillons sanguins capillaires.

En revanche, bien que la technique soit optimisée, la configuration de l'instrument reste non-optimale pour un test à réaliser « au lit du patient ». La procédure est en effet démontrée sur un cytomètre en flux Navios (Beckman Coulter Inc.). Un effort doit être fait sur le paramétrage de la machine (calibration des réglages), l'automatisation de l'utilisation de la machine (« presse-bouton »), et de l'acquisition et l'analyse des résultats (pas de logiciel intermédiaire), ainsi que la physionomie de l'instrument pour pouvoir l'utiliser au plus près de l'endroit des soins (utilisation d'un cytomètre en flux Cytoflex (Beckman Coulter Inc.) par exemple). Cet aspect n'est pas abordé dans la thèse, qui reste concentrée sur l'optimisation des réactifs et de leur procédure d'utilisation, mais sera un point clé du développement du test.

Il est important de noter que dans les parties suivantes 2.2 et 2.3, la technique de cytométrie en flux « au lit du patient », utilisée pour l'exploration biologique des biomarqueurs et la démonstration de la validation clinique du test, est la procédure telle que définie à l'issue de la première publication, sans optimisation. En revanche, lors des études cliniques suivantes, de la partie 2.4, la procédure de cytométrie en flux « au lit du patient » utilisée est la technique dont les réactifs sont optimisés.

Après le développement d'une nouvelle procédure « au lit du patient », il convient d'étudier les voies biologiques des marqueurs sélectionnés pour confirmer leur intérêt à discriminer les infections bactériennes et virales.

2.2. Etude biologique des marqueurs cellulaires CD64 et CD169

2.2.1. Rôle des interférons de type I et II dans les expressions des biomarqueurs

Selon la FDA et le NIH, un biomarqueur est un marqueur biologique mesuré pour donner une indication des processus biologiques normaux, pathogènes, ou de réaction à une intervention médicale. Les clusters CD64 et CD169 sont des biomarqueurs de surface cellulaires, qui, lorsqu'ils sont respectivement exprimés et mesurés sur les neutrophiles ou les monocytes, sont indicateurs respectivement d'une infection par une bactérie ou par un virus. Si les mécanismes qui conduisent à leurs expressions sont bien décrits, alors ils sont d'autant plus intéressants à intégrer dans un outil de diagnostic car leur compréhension est prédictive [149] :

- De la survenue et de l'évolution de la maladie ;
- De l'efficacité d'un traitement ;
- Des signes de risques associés à la maladie ou au traitement.

D'une part, le déchiffrage des voies d'activation des biomarqueurs permet de comprendre les circonstances dans lesquelles ils sont activés, les acteurs responsables de leurs expressions, et les délais avec lesquels ils vont être exprimés par les cellules leucocytaires. D'autre part, la compréhension de leurs mécanismes d'expression va présenter un intérêt pour prédire leur comportement lorsqu'ils vont être intégrés dans un test de diagnostic infectieux. Les biomarqueurs vont être des éléments-clés pour diagnostiquer la maladie infectieuse, mais aussi mesurer la réponse du patient au processus pathogène, ou les surveiller après traitement.

L'objectif du travail a donc été de comprendre les mécanismes cellulaires conduisant à l'expression des biomarqueurs CD64 et CD169 sur les neutrophiles et les monocytes, respectivement, lors des processus infectieux.

L'hypothèse est que ces deux biomarqueurs sont exprimés en réponse à une bactérie ou à un virus par l'intermédiaire d'acteurs produits lors de la réponse immunitaire anti-infectieuse : les interférons.

Le déchiffrage des mécanismes cellulaires, qui conduisent à l'expression du CD64 sur les neutrophiles et du CD169 sur les monocytes, a fait l'objet d'une troisième publication, acceptée dans la revue *Immunity, Inflammation and Diseases*, intitulée : « **Rôle des interférons dans les expressions du CD64 et du CD169 dans le sang total : pertinence dans l'équilibre entre les réponses immunitaires bactériennes et virales**» (figure 37).

Role of the interferons in CD64 and CD169 expressions in whole blood: relevance in the balance between viral- or bacterial-oriented immune responses

Pénélope Bourgoin[1,2], Géraldine Biéchelé[1], Inès Ait Belkacem[1,3], Pierre-Emmanuel Morange[2,4], Fabrice Malergue[1]

[1] Department of Research and Development, Immunotech-Beckman Coulter, Marseille FRANCE.

[2] C2VN INSERM-INRA, Aix-Marseille University, Marseille FRANCE.

[3] UMR 7280, Marseille-Luminy Immunology Center (CIML), Marseille, FRANCE.

[4] Hematology Laboratory, La Timone Hospital, APHM, Marseille, FRANCE.

Email addresses.

Pénélope Bourgoin : pbourgoin01@beckman.com

Géraldine Biéchelé : gbiechele@beckman.com

Inès Ait Belkacem : iaitbelkacem@beckman.com

Pierre-Emmanuel Morange : pierre.morange@ap-hm.fr

Fabrice Malergue : fmalergue@beckman.com

Running title. Interferons in CD64 and CD169 pathways.

ABSTRACT.

Introduction: CD64 expression increases on neutrophils during bacterial infections. Recently an increase in CD169 expression has been discovered on monocytes during viral infections. Generally, interferons α (IFNα) and γ (IFNγ) are key drivers of the infectious host immune response. The purpose of this study was to explore if a link exists between these interferons and both biomarkers.

Methods: Whole blood samples from healthy volunteers were stimulated with either interferons, interleukins, or infectious extracts, to mimic an infectious state. Expressions of CD64 and CD169 were assessed in these samples by multiple flow cytometry methods, over precise kinetics.

Results: The expression of CD64 was statistically higher in samples stimulated with IFNγ, and CD169 in those stimulated with IFNα (and all other Type I interferons). Surface expressions are directly induced by their respective interferons via JAK/STAT pathways within 6 to 8 hours of incubation. Mixing both types of interferons seemed to indicate that they partially inhibit each other.

Conclusions: The induction of CD169 on monocytes and CD164 on neutrophils by type I and type II interferons confirms the relevance of these markers for assessing between a viral- versus bacterial-oriented immune response.

Keywords. Interferons, CD64, CD169, Flow Cytometry, Pathways.

1. INTRODUCTION.

To survive in its living environment, the human body is protected from infectious agents, their toxins, and the damage they can cause, by a set of effector cells and molecules. The innate immune system is an early but less-specific biological mechanism that avoids the development of pathogenic organisms [1]. Myeloid cells, such as monocytes and macrophages, neutrophils, or dendritic cells (DCs), have pattern recognition receptors (PRR) to immediately identify the pathogen-associated or damage-associated molecular patterns (PAMP or DAMP) from microorganisms. The binding of PAMP or DAMP to the PRR triggers a robust inflammatory response that leads to activation of different signaling cascades depending on the nature of the infectious agent. Thus, among other things, it activates the production of antibacterial or antiviral mediators, such as interferon (IFN), as well as the expression of various molecules on the surface of the immune cells [2]. Particularly, the secretion of type I interferons (IFN I) has been suggested as a specific cellular response of viral infections and includes the IFN-α family plus IFN-β, IFN-ω, IFN-κ and IFN-ε. By contrast, only the unique type II IFN (IFN II), the IFN-γ, mainly contributes to the clearance of bacterial infections [3].

If IFN I and IFN II are clear signatures associated to viral and bacterial infections, their short life in the body fluids does not allow a robust differentiation [4]. Thus, it appears that it would be useful to study molecules that are more stably expressed downstream of interferon activation.

CD64, also known as the high-affinity immunoglobulin fragment crystallizable-gamma receptor 1 (FcγR1), is mainly distributed on the surface of cells of myeloid lineage such as macrophages, monocytes, and dendritic cells, for providing a first line of recognition and defense against invading microorganisms [5]. It has almost no expression on neutrophils under healthy homeostasis.

Upon bacterial infection, the activation of the immune system releases pro-inflammatory cytokines, including IFNγ, that highly induce the expression of CD64 on neutrophils (nCD64) [6–8].

Interestingly, recent works have identified sialoadhesin CD169 (Sn or Siglec-1), a member of the sialic acid binding immunoglobulin-like lectins (SIGLEC) family, as having a role during viral infections [9,10]. CD169 has been shown to be expressed on the surface of DCs and monocytes after antiviral molecule release, and, more particularly, a two-fold elevated up-regulation of CD169 on monocytes (mCD169) was observed *in vitro* when induced by IFNα [11,12].

Thus, the combinatorial detection of CD64 and CD169, respectively, on the surface of neutrophils and monocytes, could be a specific measure for the distinction between the different causes of infections. The main goal of the study was to understand the link that exists between both biomarkers and interferons produced in response to infections. The main hypothesis was that the understanding of this functional link could help demonstrate the relevance of using these biomarkers for discriminating between bacterial and viral infections.

2. RESULTS.

2.1. CD169 and CD64 expressions are induced by interferon stimuli

The first part of the study was to quantify and statistically compare CD169 and CD64 expressions on monocytes and neutrophils, respectively, when whole blood is co-incubated *in vitro* with several activators. Since most of them are known to induce multiple responses and the release of other soluble mediators, a short incubation time was chosen to limit the risk of measuring indirect effects. At 3 and 5 hours, no specific effects were detected (except LPS non-specific early response), whereas the first significant changes were observed at 7 hours (figure 1). All detailed values are given in supplementary table 1.

After 7 hours of incubation, mCD169 expression was significantly increased in whole blood activated by IFNα1 (1.6 ± 0.5, p: 0.0063 ; n = 3), in comparison to a non-activated whole blood (MFI normalized at 1), whereas it was unchanged when incubated with other activators (IL-2: 1.2 ± 0.1, p: 0.8825 ; IL-6: 0.9 ± 0.1, p: 0.9999 ; IL-12: 0.9 ± 0.1, p: 0.9875 ; IL-18: 0.9 ± 0.3, p: 0.9991 ; IL-12+IL-18: 0.9 ± 0.1, p: 0.9826 ; Poly IC: 1.1 ± 0.2, p: 0.9755 ; LPS: 1.4 ± 0.2, p: 0.0885 ; IFNγ: 1.0 ± 0.2, p: 1.0000).

Conversely, nCD64 expression was significantly increased in whole blood activated by IFNγ (1.8 ± 0.3, p: 0.0023; n = 3), in comparison to a non-activated whole blood (MFI normalized at 1), whereas it was unchanged when incubated with other activators (IL-2: 1.0 ± 0.1, p: 1.0000 ; IL-6: 0.9 ± 0.1, p: 1.0000 ; IL-12: 0.9 ± 0.1, p: 0.2668 ; IL-18: 1.0 ± 0.1, p: 1.0000 ; IL-12+IL-18: 1.2 ± 0.1, p: 0.6686 ; Poly IC: 1.0 ± 0.1, p: 1.0000 ; LPS: 1.0 ± 0.2, p: 0.4913 ; IFNα1: 1.3 ± 0.2, p: 0.3785).

After 24 hours of incubation, most activators induced increased (but non-significant) responses, indicating they had effect on the blood samples, but probably via later, indirect pathways. Therefore, the results of this screening indicate that interferons have earlier, more direct and more persistent potential implications in biomarker expression.

Dose-response curves for IFNα1 and IFNγ were then established to determine the optimum dose to maximize mCD169 and nCD64 expression, respectively (figure 2). A longer incubation time was applied to increase the observed effects (15 versus 7 hours). Results showed the dose of IFNα1 that maximizes mCD169 expression was 3 ng/mL, whereas the dose of IFNγ that maximizes nCD64 expression was 30 ng/mL. Both doses are similar to what could be released physiologically in human body after bacterial or viral infections [13].

In addition, examples of mCD169 and nCD64 cytometry plots, without and following stimulation by these optimum interferon doses, were compared to biomarker expressions in healthy, viral- or bacterial-infected subjects (figure 3). Main result is that IFNα1 and IFNγ, at their optimal doses, induce expression of CD169 on monocytes and of CD64 on neutrophils, respectively, at levels similar to what happens physiologically during the course of a viral or a bacterial infection. The plots also show that keeping whole blood of a healthy volunteer in a water-bath at 37°C for 15 hours induces no non-specific activation of either biomarker, and that no other cellular subsets are activated by either interferon, except CD64 on monocytes (mCD64), which increased similar to CD64 on neutrophils following IFNγ stimulation. This study, however, focused only on nCD64 increase, as it has been demonstrated in many studies to be more accurate than mCD64 [14].

2.2.CD169 expression is induced by interferon type I and CD64 expression is induced by interferon type II

Based on the previously determined doses, a larger spectrum of each interferon family was tested: IFNα1 belongs to the IFN I family which includes 13 subtypes of IFNα (only 1-12 were tested), plus IFNβ and IFNω, whereas IFNγ is the unique IFN II (figure 4). The longer incubation time was kept (15 versus 7 hours). Detailed values are given in supplementary table 2.

Interestingly, mCD169 expression was again significantly increased in whole blood activated by IFNα1 (5.2 ± 1.3, p: 0.0005; n = 4), in comparison to a non-activated whole blood (MFI normalized at 1), but also by all IFNα subtypes (IFNα2: 4.7 ± 1.2, p: 0.0030 ; IFNα3: 5.0 ± 1.3, p: 0.0010 ; IFNα4: 5.1 ± 1.4, p: 0.0006 ; IFNα5: 4.8 ± 1.4, p: 0.0020 ; IFNα6: 5.0 ± 1.3, p: 0.0010 ; IFNα7: 6.2 ± 1.8, $p < 0.0001$; IFNα8: 5.9 ± 1.6, $p < 0.0001$; IFNα9: 5.7 ± 1.7, $p < 0.0001$; IFNα10: 5.9 ± 1.4, $p < 0.0001$; IFNα11: 4.4 ± 1.0, p: 0.0157 ; IFNα12: 5.0 ± 1.2, p: 0.0022) and by others in the IFN I family (IFNβ: 4.8 ± 1.3, p: 0.0021 ; IFNω: 5.7 ± 1.2, $p < 0.0001$). mCD169 expression, however, remained low when incubated with IFN II (2.5 ± 0.5, p: 0.6065).

Conversely, nCD64 expression was again significantly increased in whole blood activated by IFNγ (2.9 ± 0.8, $p < 0.0001$; n = 4), in comparison to non-activated whole blood (MFI normalized at 1), but not when incubated with the IFN I family (IFNα1: 1.5 ± 0.2, p: 0.1035 ; IFNα2: 1.5 ± 0.1, p: 0.1897 ; IFNα3: 1.5 ± 0.2, p: 0.1672 ; IFNα4: 1.4 ± 0.2, p: 0.2710 ; IFNα5: 1.4 ± 0.2, p: 0.2589 ; IFNα6: 1.4 ± 0.2, p: 0.3376 ; IFNα7: 1.5 ± 0.2, p: 0.0952 ; IFNα8: 1.6 ± 0.3, p: 0.0616 ; IFNα9: 1.5 ± 0.3, p: 0.0826 ; IFNα10: 1.6 ± 0.1, p: 0.1183 ; IFNα11: 1.3 ± 0.2, p: 0.6275 ; IFNα12: 1.5 ± 0.2, p: 0.2034 ; IFNβ: 1.5 ± 0.2, p: 0.1094 ; IFNω: 1.6 ± 0.3, p: 0.1264).

These results indicate that all IFN I had a direct influence on expression of CD169 on monocytes, and that IFN II is involved in CD64 expression on neutrophils.

2.3. CD169 and CD64 biomarkers have rapid expression kinetics after interferon stimuli

In a second part of the study, precise kinetics of both biomarkers were studied. In preparation for the study, the hypothesis that the response amplitude might depend on the blood volume incubated was tested (supplementary figure 1). After comparing several interferon-activated blood volumes, results showed that these long-term activations by interferon should be done in a minimal whole blood volume of 300 µL, otherwise mean level of quantification could be lowered. This could be explained by the fact that a small volume in 5 mL closed tubes is unable to equilibrate with the air above it (C02 and/or humidity), which changes the cellular environment too much (pH and/or osmolality) for a proper activation of these markers. Having this new information, CD64 and CD169 biomarker kinetics were established by activating with interferon an amount of blood from 300 to 500 µL (figure 5). Detailed values are given in supplementary table 3.

As previously found, mCD169 was specifically induced on monocyte surfaces after IFN I stimulation ($p < 0.0001$) but not after IFN II (p: 0.1706) or no activation (p: 0.1299). When statistically comparing incubation time, results showed that expression of mCD169 was significantly increased by IFN I after 8 hours of incubation (8h: 2.9 ± 0.3 ; 10h: 3.8 ± 0.3 ;12h: 4.98 ± 0.2 – all $p < 0.001$ – $n = 4$) in comparison to 2 hours (1.5 ± 0.1) or 4 (1.5 ± 0.2) or 6 (1.9 ± 0.1).

In the same way, nCD64 was induced on neutrophil surface after IFN II stimulation ($p < 0.0001$) but not after IFN I (p: 0.2456) or no activation (p: 0.3776). When statistically comparing incubation time, results showed that expression of nCD64 was significantly increased by IFN II after 6 hours of incubation (6h: 1.3 ± 0.1; 8h: 1.8 ± 0.1; 10h: 2.3 ± 0.1; 12h: 2.8 ± 0.1 – all $p < 0.001$ – $n = 4$) in comparison to 2 hours (1.1 ± 0.1) or 4 (1.2 ± 0.1).

Biomarker expression is observed as early as 6 hours, which does not exclude that their expression might be indirectly associated to IFN stimuli through various signaling cascades.

2.4. CD169 and CD64 biomarkers have direct expression kinetics after interferon stimuli

It has been described that many cytokines are released within 2 to 4 hours post-stimulation [15]. The IFNs were thus evaluated to understand if they directly or indirectly activate the expression of CD64 and CD169 (figure 6). Detailed values are given in supplementary table 4, and results are supported by flow cytometry plots presented in figure 7.

The hypothesis was tested by using Brefeldin A, a Golgi apparatus blocker that acts by blocking exocytosis of molecules, preventing both the secretion of soluble proteins (such as cytokines) and also the surface expression of *de-novo* synthetized proteins (such as CD64 and CD169). If interferons directly activate the cells to produce the biomarkers, then Brefeldin A would prevent their expression at the surface, and they would remain intracellular. However, if interferons activate intermediary actors that produce intermediary molecules that would finally stimulate the cells to express the biomarkers, then Brefeldin A would cause intracellular retention of the first intermediary molecules, and there would be no activation of the final cell to either intracellularly produce or extracellularly express the biomarkers.

When quantifying extracellular expression of mCD169 and nCD64 without Brefeldin A (figures 6A1 and 6B1), results show significant increases after IFN I ($p < 0.0001$) or IFN II (p: 0.0002) stimulations, respectively. On flow cytometry plots (figures 7A1 and 7B1), CD169 and CD64 extracellular expressions are also increased on monocytes and neutrophils, respectively.

If Brefeldin A is added (figures 6A2 and 6B2), blocking of surface expression occurs as expected, as no significant changes in the expressions were observed (mCD169 – p: 0.3478; nCD64 – p: 0.8226; n = 8). On flow cytometry plots (figures 7A2 and 7B2), when Brefeldin A is added, CD169 and CD64 extracellular expressions are decreased on monocytes and neutrophils, respectively, to same levels as negative subsets.

However, when Brefeldin A is added and the intracellular expression of both biomarkers are assessed (figures 6A3 and 6B3), significant intracellular increases are observed of mCD169 after IFN I stimulation (p: 0.0010; n = 8) and of nCD64 after IFN II stimulation (p: 0.0149; n = 8). On flow cytometry plots (figures 7A3 and 7B3), both biomarkers are also increased.

These results confirm that rapid kinetics of biomarker expressions are observed because of direct activation of the monocytes or neutrophils by the interferons.

2.5. Interferons type I and 2 play specific and independent roles in CD169 and CD64 expression

The third part of the study was to decipher the cellular actors involved in the expression of both CD169 and CD64 biomarkers and which pathways they activate. Four cellular actors of the innate immune system were considered to have potential implications in these activations: monocytes, neutrophils, and both special myeloid (mDCs) and plasmacytoid (pDCs) subtypes of dendritic cells (figure 8).

Intracellular expressions of both phosphorylated STAT1 and STAT2 were assessed in the four cellular types to study actors and pathways involved when whole blood is co-incubated with interferons (figure 9). Detailed values are given in supplementary table 5, and results are supported by flow cytometry plots presented in figure 10.

In comparison to non-activated whole blood (MFI normalized at 1), pSTAT1 and pSTAT2 expressions were significantly increased in monocytes (pSTAT1: 14.3 ± 5.4; p: 0.0112 – pSTAT2: 5.3 ± 2.7; p: 0.0332 – n = 3), neutrophils (pSTAT1: 5.3 ± 0.6; p: 0.0049 – pSTAT2: 1.4 ± 0.2; p: 0.0354 – n = 3), mDCs (pSTAT1: 15.3 ± 5.7; p: 0.0294 – pSTAT2: 3.4 ± 0.9; p: 0.0044 – n = 3) and pDCs (pSTAT1: 15.5 ± 7.6; p: 0.0159 – pSTAT2: 3.5 ± 1.4; p: 0.0246 – n = 3) when blood is incubated with IFNα.

Conversely, only pSTAT1 expression is significantly increased in monocytes (12.8 ± 3.6; p: 0.0191; n = 3), neutrophils (6.3 ± 0.7; p: 0.0017; n = 3) and mDCs (14.4 ± 6.6; p: 0.0387; n = 3) when blood is incubated with IFNγ.

These results confirm that IFNα triggers a double activation of pSTAT1 and pSTAT2 resulting in CD169 expression on monocytes, whereas IFNγ triggers a unique pSTAT1 activation resulting in CD64 expression on neutrophils.

Finally, independence of both activation pathways was further deciphered by studying effects of combined interferons on biomarker expressions (figure 11). Detailed values are given in supplementary table 6.

When IFNα and IFNγ are concomitantly activating the blood, it seems that IFNγ inhibits the IFNα-induced mCD169 level because a slight (but non-significant) decrease is observed with the IFNα + IFNγ combination (3.4 ± 0.9; p: 0.1154; n = 6) in comparison to IFNα alone (4.4 ± 1.2).

Conversely, it seems that IFNα inhibits the IFNγ-induced nCD64 level because a slight (but non-significant) decrease is observed with the IFNα + IFNγ combination (1.5 ± 0.6; p: 0.1355; n = 6) in comparison to IFNγ alone (2.4 ± 1.1).

These preliminary results indicate that expression of both biomarkers relies on specific and independent activation pathways, depending on the interferon produced and the cell type.

3. DISCUSSION.

The clinical distinction between viral and bacterial infections is an important issue for practitioners [16], as discrimination is often hard to establish based on clinical signs or currently measured biomarkers. Unfortunately, biomarkers are not currently combined into an application that is sensitive and specific enough for routine diagnosis. Therefore, when in doubt, antibiotic treatments are frequently prescribed, contributing to the dangerous rise of antibiotic resistance [17]. The purpose of the study was to decipher pathways of two cell surface receptors described in infections, CD64 expressed on neutrophils and CD169 expressed on monocytes, and further establish their link with interferon, a main actor in antiviral or antibacterial responses.

CD64 plays a key role in bacterial phagocytosis, clearance of immune complexes, antigen presentation, and cytokine release [18]. Increased neutrophil CD64 expression has been proposed as a biomarker of bacterial infection with superior performance [6,19–23] and even more strongly with sepsis diagnosis or acute infections [24–26]. Conversely, CD169 is an endocytic receptor that recognizes sialylated molecules exposed on virus membrane gangliosides, binds to them to capture and internalize the virus, and either participates in its clearance or enhances its transmission and infectivity [11,27]. CD169 is mostly described as a resident macrophage marker, and is not expressed in blood under healthy homeostasis. Only a few reports have pointed out its expression on monocytes upon diverse pathogenic processes, including rhinovirus infection, porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection and in certain inflammatory diseases such as multiple sclerosis, atherosclerosis, rheumatoid arthritis, and systemic lupus erythematosus, all being known to involve IFN I production, and in patients with viral infections such as Epstein–Barr virus associated enteritis and Human Immunodeficiency Virus (HIV) infection. Moreover, upregulated expression of CD169 in monocytes in HIV-1-infected patients is associated with high viral loads [12,27–29].

Rationale for the study was that immune system status is a reliable indicator of what happens at a cellular level for the recognition, elimination and defense from what is foreign [1]. On one hand, anatomical barriers, such as skin, mucous membranes, gastric acidity or any epithelium, are interesting because they represent the first defense against infectious agents. On the other hand, when a microorganism crosses one of these barriers, the cellular response induced by the innate immune system involves powerful actors, among them interferon, which is identified as acting primarily against pathogens. It was thus interesting to explore the functional link between interferon and both biomarkers.

In addition to interferon, several classes of activators were tested. However, only interferon was demonstrated to significantly induce direct mCD169 and nCD64 expressions after 7 hours of incubation. Particularly it was demonstrated that CD169 was increased on monocytes after IFN I stimulation, and CD64 was increased on neutrophils after IFN II stimulation. Interferons are described as three distinct classes (type I, II and III) [30]. All act through the same mechanisms of action by the activation of IFN-stimulated genes and microRNAs, but are distinguished by their differing receptors, structural features and biological activities according to the kind of infection that occurs in the human body.

Interferon type I is principally described in viral infections to have immunomodulatory, antiproliferative and antiviral functions after being secreted by almost all cell types [4]. Some teams [31] have further demonstrated that, among IFN I, some subtypes could be more or less effective, but no differences were observed in the present study. Interferon type II is found in bacterial infections. Initially, only CD4+ T helper cells, CD8+ cytotoxic lymphocytes and natural killer cells were believed to exclusively produce IFNγ, but there is now evidence that other cells, such as B cells, natural killer T cells and professional antigen-presenting cells also secrete IFNγ [32].

The role of IFN III was not investigated in this study as it has not been correlated to biomarker expression. Type III IFN are a family of 3 proteins named IFNλ1, λ2 and λ3. These proteins were previously known as IL-29, IL-28A and IL-28B respectively [30]. The IFNλ3 gene is transcribed in the opposite direction of the IFNλ1 and IFNλ2 genes, but all act like IFN I by activating the Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transduction (JAK/STAT) pathway. As it also stimulates in turn the phosphorylation of STAT1 and STAT2, an hypothesis needs to be investigated about the potential role of IFN III in mCD169 expression.

All other potential activators evaluated had no significant direct impact on either biomarker expression. However, the stimulation of whole blood by bacterial components such as lipopolysaccharide is normally known to induce CD64 expression on the surface of neutrophils [6,8]. Also, certain Toll-Like Receptor ligands, such as Poly IC, are described to induce CD169 expression on the surface of monocytes [33]. And finally, interleukins are sometimes related to interferon production [3]. Later time points did show some of these expected effects, but this could be explained by multiple indirect pathways, and deserves further investigation.

Precise kinetics were established. Results obtained strongly correlated with the literature. Indeed, it is demonstrated that nCD64 up-regulation is elevated to 3 times the normal level after IFNγ stimulation and occurs within the short time scale of 6 hours for cell surface expression [8]. Also, detectable mRNA increases by northern blot analysis in 1 to 3 hours [22]. In parallel, CD169 protein expression, and also mRNA, are demonstrated to be significantly increased after viral infection *in vivo* [28]. To our knowledge, this is the first time its expression was demonstrated to be directly induced by interferon. This was expected, as monocytes and neutrophils are known to have interferon receptors on their surfaces that in turn activate the JAK/STAT pathways. IFN I and IFN II seem to have cross-inhibitory effects on each other regarding induction of CD169 or CD64, respectively, reflecting the immune system orientation in response to a virus or bacteria.

Finally, the assessment of the biomarkers was made according to a newly described procedure of flow cytometry [34]. Indeed, one of the prerequisites was that the biomarkers chosen could be easily quantified when further applied in a clinical context. That was a major issue with interferon, as titration relies on complex techniques with often biased or difficult measurements [4]. As immediate

downstream events, CD64 and CD169 expression are supposed to parallel the levels of IFNs, with the advantage of being easily measured in whole blood, with a one-step sample preparation procedure, and levels assessed in 15 minutes, all advantages for practitioners. It could even be further applied at the patient's bedside.

Of course, the study has some limitations. First, activators have all been titrated in preparation of the study to maximize their effects, and have doses close to what happens physiologically. Further, several whole blood volumes have been tested to best mimic what happens *in-vivo* when activators are put in contact with host cells. Despite this, a cellular environment is hardly reproducible because of the large spectrum of interactions that could exist or the diversity of factors impacting on pathways, even more in the case of such complex pathologies that are infections. Moreover, pathogens involved *in-vivo* could sometimes deflect the cellular machinery leading to a different or inexistent host response with interferons. Finally, CD169 and CD64 levels have only been quantified by flow cytometry, whereas it would have been interesting to measure it with other techniques, knowing for instance that the biomarkers mRNA levels also correlate with interferon activation. These results should be investigated further.

CONCLUSION.

The goal of the study was to try to understand the kinetics of CD169 expression on monocytes and CD64 expression on neutrophils during the course of a viral and a bacterial infection, as they have not been well studied to date. The functional link between markers and interferon were explored to help identify the potential relevance of using them in a clinical context. In response to a bacterial infection, IFNγ directly induces, in 6 hours, nCD64 expression via pSTAT1, whereas in the case of a viral infection, IFNα directly induces, in 8 hours, mCD169 expression via pSTAT1 and pSTAT2. Both biomarkers were further demonstrated to be independently activated by interferon, preventing false results from interactions, and to be rapidly expressed, due to direct and easily detectable pathways established in response by the host in the first hours of the infection.

4. MATERIAL AND METHODS.

4.1. Study samples and activation testing

Immunotech evaluations were conducted on leftover heparin blood samples from healthy volunteers, obtained from the Saint Joseph Hospital (Marseille, France) and tested after informed consent and hospital Ethical Committee approval.

Samples were activated either with type I interferons (IFNα1 – Alpha A (2a), IFNα2 – Alpha B2 (8), IFNα3 – Alpha C (10), IFNα4 – Alpha D (1 [Val(114)]), IFNα5 – Alpha F (21), IFNα6 – Alpha G (5), IFNα7 – Alpha H2 (14), IFNα8 – Alpha I (17), IFNα9 – Alpha J1 (7), IFNα10 – Alpha K (6), IFNα11 – Alpha 4b (4), IFNα12 – Alpha WA (16), IFNβ, and IFNω), used at 3 ng/mL, or with IFNγ, used at 30 ng/mL, all from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA).

For comparison, whole blood was also activated with interleukins (IL) (IL-2, IL-6, IL-12 and IL-18), used at 1000 U/mL, from R&D Systems, or infectious extracts, such as polyinosinic-polycytidylic acid (Poly IC) or lipopolysaccharide (LPS), from *Escherichia coli* O127:B8, both at 10 µg/mL, from Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA).

All activations were made in closed tubes in a water bath at 37°C. When needed, samples were also co-incubated with Brefeldin A (Bref. A), at 10 µg/mL, from Sigma-Aldrich Co.

For *in-vivo* comparison of these *in-vitro* activations, leftover EDTA blood samples from one viral- and one bacterial-infected subjects, admitted to the Adult Emergency Unit at La Timone Hospital (Marseille, France), were tested within 4 hours of admission. Samples were obtained under informed consent and Ethical Committee approval (Committee for Protection of Persons n°181160; ID-RCB n° 2018 A02706-49).

4.2. Flow cytometry procedures

Samples were treated at room temperature with flow cytometry extracellular and/or intracellular and/or phospho-epitopes procedures, with reagents that were for research use only and all used at their recommended doses. For each experiment, multiple individual samples were processed (number of tested donors indicated by n), with all testing in singlicate due to the known strong reproducibility of the procedures used.

Extracellular procedure has been described by Bourgoin et al. [34] in 2019. Briefly, 5 µL of whole blood is simultaneously lysed and stained at room temperature by incubating for 15 minutes in the dark, with 500 µL of the Versalyse lysing solution and the CD64-CD169/Infections dried custom mixture, composed of anti-CD169-Phycoerythrin (PE) (clone 7-239) and anti-CD64-Pacific Blue (PBE) (clone 22), all products or custom products from Beckman Coulter Inc. (Brea, CA, USA).

Intracellular procedure is the method described within the PerFix nc kit (Beckman Coulter Inc.). Briefly, 50 µL of whole blood is first fixed with the kit reagent number 1 "R1" and incubated for 15 minutes, then simultaneously lysed, permeabilized and stained by incubating for 15 minutes in the dark with the kit reagent number 2 "R2" and the CD64-CD169/Infections dried custom mixture. Finally, sample is washed once with the kit reagent number 3 "R3".

Phospho-epitopes procedure is the method described within the PerFix EXPOSE kit (Beckman Coulter Inc.). Briefly, 100 µL of whole blood is first fixed with the kit reagent number 1 "R1" by incubating for 10 minutes, and is simultaneously permeabilized and lysed with the kit reagent number 2 "R2" by incubating for 10 minutes. After a wash step, sample is stained by incubating for 15 minutes in the dark with the kit reagent number 3 "R3" and the DCs dried custom mixture, composed of anti-CD123-PE Cyanin 7 (clone SSDCLY107D2), anti-CD3-Allophycocyanin (APC) (clone UCHT1), anti-CD14-APC (clone RMO52), anti-CD19-APC (clone J3-119), anti-CD56-APC (clone N901-NKH1), anti-CD11c-APC Alexa Fluor 700 (clone BU15), anti-Human Leucocyte Antigen-DR (HLA-DR)-PBE (clone Immu 357) and anti-CD45-Krome Orange (clone J33), all products from Beckman Coulter Inc. (Brea, CA, USA). When needed, anti-phospho-epitope antibodies were also added: anti-phosphorylated Signal Transducer and Activator of Transcription (pSTAT) 1-Alexa Fluor 488 (clone 58D6), or pSTAT2-PE (clone D3P2P) from Cell Signaling Technology Inc. (Danvers, MA, USA). Finally, sample is washed once with the kit reagent number 4 "R4".

4.3. Flow cytometry and statistical analyses

All data were collected on a 3-laser, 10-color Navios flow cytometer and analyzed using Kaluza Software version 2.1 (both from Beckman Coulter Inc.).

When using CD64-CD169/Infections dried custom mixture, monocytes and neutrophils were first gated on the basis on their typical forward- and side-scatter characteristics. CD169 and CD64 were respectively measured on the surface of the gated cells on mono-parametric histograms.

When using the DCs dried custom mixture, leucocytes were first gated on their CD45 expression. Monocytes and neutrophils were gated out on the basis on their side-scatter characteristics whereas DCs were isolated based on their additional HLA-DR+ CD3- CD14- CD19- CD56- expression. Myeloid DCs (mDCs) were differentiated from plasmacytoid DCs (pDCs) on their respective CD11c+ or CD123+ expressions. Finally, phospho-epitope expressions were measured on monocytes, neutrophils, mDCs or pDCs.

All results were given as Median of Fluorescence Intensity (MFI) related to the entire populations.

Comparisons of quantitative variables were performed using paired Tukey or Dunnett's control tests and by ANOVA for more than two groups. The statistical analyses were performed using Jump software version 10 (SAS institute Inc., Cary, NC, USA). All p-values are considered statistically significant under 0.05.

REFERENCES.

1. Murphy K., Weaver C. *Janeway's Immunobiology*. 9th ed. United States: New York, NY : Garland Science/Taylor & Francis Group, LLC, [2017]; 2016.

2. Thompson MR, Kaminski JJ, Kurt-Jones EA, Fitzgerald KA. Pattern Recognition Receptors and the Innate Immune Response to Viral Infection. *Viruses*. 2011;3(6):920-940.

3. Luis Muñoz-Carrillo J, Francisco Contreras-Cordero J, Gutiérrez-Coronado O, Trinidad Villalobos-Gutiérrez P, Guillermo Ramos-Gracia L, Elizabeth Hernández-Reyes V. Cytokine Profiling Plays a Crucial Role in Activating Immune System to Clear Infectious Pathogens. In: K. Tyagi R, S. Bisen P, eds. *Immune Response Activation and Immunomodulation*. IntechOpen; 2019:1-30.

4. Engelmann I, Dubos F, Lobert P-E, et al. Diagnosis of Viral Infections Using Myxovirus Resistance Protein A (MxA). *PEDIATRICS*. 2015;135(4):e985-e993.

5. Kipfmueller F, Schneider J, Prusseit J, et al. Role of Neutrophil CD64 Index as a Screening Marker for Late-Onset Sepsis in Very Low Birth Weight Infants. *PLoS ONE*. 2015;10(4):1-15.

6. Mokuda S, Doi O, Takasugi K. Simultaneous quantitative analysis of the expression of CD64 and CD35 on neutrophils as markers to differentiate between bacterial and viral infections in patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol*. 2012;22(5):750-757.

7. Nuutila J. The novel applications of the quantitative analysis of neutrophil cell surface FcγRI (CD64) to the diagnosis of infectious and inflammatory diseases: *Curr Opin Infect Dis*. 2010;23(3):268-274.

8. Tang Z, Qin D, Tao M, et al. Examining the utility of the CD64 index compared with other conventional indices for early diagnosis of neonatal infection. *Sci Rep*. 2018;8(1):1-7.

9. Klaas M, Crocker PR. Sialoadhesin in recognition of self and non-self. *Semin Immunopathol*. 2012;34(3):353-364.

10. Puryear WB, Akiyama H, Geer SD, et al. Interferon-Inducible Mechanism of Dendritic Cell-Mediated HIV-1 Dissemination Is Dependent on Siglec-1/CD169. *PLoS Pathog*. 2013;9(4):1-15.

11. Pino M, Erkizia I, Benet S, et al. HIV-1 immune activation induces Siglec-1 expression and enhances viral trans-infection in blood and tissue myeloid cells. *Retrovirology*. 2015;12(1):1-15.

12. Rempel H, Calosing C, Sun B, Pulliam L. Sialoadhesin Expressed on IFN-Induced Monocytes Binds HIV-1 and Enhances Infectivity. *PLoS ONE*. 2008;3(4):1-9.

13. Liu J, Gao L, Zang D. Elevated Levels of IFN-γ in CSF and Serum of Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS ONE*. 2015;10(9).

14. Groselj-Grenc M, Ihan A, Derganc M. Neutrophil and Monocyte CD64 and CD163 Expression in Critically Ill Neonates and Children with Sepsis: Comparison of Fluorescence Intensities and Calculated Indexes. *Mediators Inflamm*. 2008;2008:1-10.

15. Letessier W, Demaret J, Gossez M, et al. Decreased intra-lymphocyte cytokines measurement in septic shock patients: A proof of concept study in whole blood. *Cytokine*. 2018;104:78-84.

16. Liang SY, Theodoro DL, Schuur JD, Marschall J. Infection Prevention in the Emergency Department. *Ann Emerg Med*. 2014;64(3):299-313.

17. Ventola CL. The Antibiotic Resistance Crisis. *Pharm Ther*. 2015;40(4):277-283.

18. Cortegiani A, Russotto V, Montalto F, Foresta G, Lozzo Santi P, Raineri M. Neutrophil CD64 as a marker of infection in patients admitted to the emergency department with acute respiratory failure. *Open Access Emerg Med*. May 2014:37-44.

19. Kapasi AJ, Dittrich S, González IJ, Rodwell TC. Host Biomarkers for Distinguishing Bacterial from Non-Bacterial Causes of Acute Febrile Illness: A Comprehensive Review. *PLOS ONE*. 2016;11(8):1-29.

20. Juskewitch JE, Abraham RS, League SC, et al. Monocyte HLA-DR expression and neutrophil CD64 expression as biomarkers of infection in critically ill neonates and infants. *Pediatr Res*. 2015;78(6):683-690.

21. Gibot S, Béné MC, Noel R, et al. Combination Biomarkers to Diagnose Sepsis in the Critically Ill Patient. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186(1):65-71.

22. Cid J, Aguinaco R, Sánchez R, García-Pardo G, Llorente A. Neutrophil CD64 expression as marker of bacterial infection: A systematic review and meta-analysis. *J Infect*. 2010;60(5):313-319.

23. Li S, Huang X, Chen Z, et al. Neutrophil CD64 expression as a biomarker in the early diagnosis of bacterial infection: a meta-analysis. *Int J Infect Dis*. 2013;17(1):e12-e23.

24. Hassan U, Ghonge T, Reddy Jr. B, et al. A point-of-care microfluidic biochip for quantification of CD64 expression from whole blood for sepsis stratification. *Nat Commun*. 2017;8:1-12.

25. Xu N, Chen J, Chang X, et al. nCD64 index as a prognostic biomarker for mortality in acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Saudi Med*. 2016;36(1):37-41.

26. Xiong S-D, Pu L-F, Wang H-P, et al. Neutrophil CD64 Index as a superior biomarker for early diagnosis of infection in febrile patients in the hematology department. *Clin Chem Lab Med CCLM*. 2017;55(1):82-90.

27. Kim W-K, McGary CM, Holder GE, et al. Increased Expression of CD169 on Blood Monocytes and Its Regulation by Virus and CD8 T Cells in Macaque Models of HIV Infection and AIDS. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2015;31(7):696-706.

28. van der Kuyl AC, van den Burg R, Zorgdrager F, Groot F, Berkhout B, Cornelissen M. Sialoadhesin (CD169) Expression in CD14+ Cells Is Upregulated Early after HIV-1 Infection and Increases during Disease Progression. Sommer P, ed. *PLoS ONE*. 2007;2(2):e257.

29. Ashokkumar C, Gabriellan A, Ningappa M, Mazariegos G, Sun Q, Sindhi R. Increased Monocyte Expression of Sialoadhesin During Acute Cellular Rejection and Other Enteritides After Intestine Transplantation in Children: *Transplantation*. 2012;93(5):561-564.

30. Scagnolari C, Antonelli G. Antiviral activity of the interferon α family: biological and pharmacological aspects of the treatment of chronic hepatitis C. *Expert Opin Biol Ther*. 2013;13(5):693-711.

31. Koyama T, Sakamoto N, Tanabe Y, et al. Divergent activities of interferon-alpha subtypes against intracellular hepatitis C virus replication. *Hepatol Res*. 2006;34(1):41-49.

32. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-γ: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*. 2004;75(2):163-189.

33. York MR, Nagai T, Mangini AJ, Lemaire R, van Seventer JM, Lafyatis R. A macrophage marker, siglec-1, is increased on circulating monocytes in patients with systemic sclerosis and induced by type i interferons and toll-like receptor agonists. *Arthritis Rheum*. 2007;56(3):1010-1020.

34. Bourgoin P, Hayman J, Rimmelé T, Venet F, Malergue F, Monneret G. A novel one-step extracellular staining for flow cytometry: Proof-of-concept on sepsis-related biomarkers. *J Immunol Methods*. 2019;470:59-63.

FIGURE LEGENDS.

Figure 1. CD169 and CD64 expressions after blood stimulation. *Whole blood of 3 donors was co-incubated for 7 hours at 37°C with either no activator (Non Act), or interleukins (IL-2, IL-6, IL-12, IL-18, IL-12+IL-18) or infectious extracts (Poly IC, LPS) or interferons (IFNα1, IFNγ). Extracellular staining of the activated blood was performed with the CD64-CD169/Infections antibody mixture. Results are expressed as averages ± standard deviations of Median of Fluorescence Intensities (MFI) of CD169 on monocytes (mCD169) (figure 1A) and of CD64 on neutrophils (nCD64) (figure 1B). Comparison was made using a Dunnett's control test, with the Non Act condition used as control (normalized at 1; in white), and p-value was considered either not statistically significant above 0.05 (in grey; ns) or statistically significant under 0.05 (in black; *) or under 0.01 (in black; **).*

Figure 2. Dose-response curves of IFNα1 and IFNγ. *Whole blood of 2 donors was co-incubated for 15 hours at 37°C with 5 doses (between 0.0003, 0.003, 0.03, 0.3, 3 or 30 ng/mL) of either one type I interferon (IFNα1) or one type II interferon (IFNγ). Extracellular staining of the activated blood was performed with the CD64-CD169/Infections antibody mixture. Results were expressed as averages of Median of Fluorescence Intensities (MFI) of CD169 on monocytes (mCD169) (figure 2A) and of CD64 on neutrophils (nCD64) (figure 2B).*

Figure 3. CD169 and CD64 flow cytometry expressions. *First, leucocytes were isolated from red blood cells or debris or apoptotic cells based on their typical side (SS INT) and forward scatter (FS INT). Then, CD169 and CD64 were respectively measured on the surface of the monocytes (CD169 on monocytes) and of the neutrophils (CD64 on neutrophils). Examples of their expressions were given for 3 subjects: (A) one first healthy volunteer whole blood, (B) the same healthy volunteer whole blood that was not activated by interferons, but that staid 15h at 37°C, (C) the same healthy volunteer whole blood that was activated by IFNα1 for 15h at 37°C, (D) the same healthy volunteer whole blood that was activated by IFNγ for 15h at 37°C, (E) one second viral-infected whole blood, and (F) one third bacterial infected whole blood.*

Figure 4. CD169 and CD64 expression after interferon stimulation. *Whole blood of 4 donors was co-incubated for 15 hours at 37°C with either no interferon (Non Act), or type I interferons (IFNα1, IFNα2, IFNα3, IFNα4, IFNα5, IFNα6, IFNα7, IFNα8, IFNα9, IFNα10, IFNα11, IFNα12, IFNβ, IFNω) or type II interferon (IFNγ). Extracellular staining of the activated blood was performed with the CD64-CD169/Infections antibody mixture. Results are expressed as averages ± standard deviations of Median of Fluorescence Intensities (MFI) of CD169 on monocytes (mCD169) (figure 4A) and of CD64 on neutrophils (nCD64) (figure 4B). Comparison was made using a Dunnett's control test, with the Non Act condition used as control (normalized at 1; in white), and p-value was considered either not statistically significant above 0.05 (in grey; ns) or statistically significant under 0.05 (in black; *) or under 0.01 (in black; **).*

Figure 5. CD169 and CD64 kinetics after interferon stimulation. *Whole blood of 4 donors was co-incubated for 2 to 12 hours at 37°C with either no interferon (Non Act ; in dark grey), or one type II interferon (IFNγ ; in medium grey) or one type I interferon (IFNα1 ; in light grey). Extracellular staining of the activated blood was performed with the CD64-CD169/Infections antibody mixture. Results were expressed as averages of Median of Fluorescence Intensities (MFI) of CD169 on monocytes (mCD169) (figure 5A) and of CD64 on neutrophils (nCD64) (figure 5B). Comparison was made using an ANOVA test, for which p-value was considered statistically significant under 0.05. When p-value was under 0.05, comparison was made using a paired Tukey test, for which p-value was also considered statistically significant under 0.05 (*) or under 0.01 (**).*

Figure 6. Direct or indirect CD169 and CD64 kinetics after interferon stimulation. *Whole blood of 8 donors was co-incubated for 2 to 24 hours at 37°C with either no interferon (Non Act ; in light grey), or one type II interferon (IFNγ ; in medium grey) or one type I interferon (IFNα1 ; in dark grey). On the one hand, biomarker extracellular expressions (Extra.) were assessed in activated whole blood without Brefeldin A (Bref. A), a Golgi apparatus blocker, (figures A1 and B1) or with Brefeldin A (figures A2 and B2). On the other hand, intracellular expressions (Intra.) were evaluated with Brefeldin A only (figures A3 and B3). All stainings were performed with the CD64-CD169/Infections antibody mixture. Results were expressed as averages of Median of Fluorescence Intensities (MFI) of CD169 on monocytes (mCD169) (figure 6A) and of CD64 on neutrophils (nCD64) (figure 6B). Comparison was made using an ANOVA test, for which p-value is considered statistically significant under 0.05.*

Figure 7. Flow cytometry extracellular or intracellular expressions of CD169 and CD64. *Flow cytometry example of whole blood of 1 donor that was co-incubated for 8 hours at 37°C with either one type I interferon (IFNα1) (figure 7A) or one type II interferon (IFNγ) (figure 7B). CD169 and CD64 were respectively presented on monocytes (mCD169) (figure 7A) and neutrophils (nCD64) (figure 7B). On the one hand, biomarker extracellular expressions (Extra.) were showed in activated whole blood without Brefeldin A (Bref. A) (figures A1 and B1) or with Brefeldin A (figures A2 and B2). On the other hand, intracellular expressions (Intra.) were showed with Brefeldin A only (figures A3 and B3).*

Figure 8. Monocytes, neutrophils, mDCs and pDCs isolation by flow cytometry. *(A) First, leucocytes were isolated from red blood cells or debris or apoptotic cells based on their typical side (SS INT) and forward scatter (FS INT). (B) Leucocytes CD45+ were gated out of them on their positive CD45 expression. (C) Using the HLA-DR expression on this population, negative neutrophils were separated from positive HLA-DR cells, including B lymphocytes, monocytes and dendritic cells (DCs). (D) Gated out from this last population, the lineage composed by CD3, CD14, CD19 and CD56 made the distinction between the positive monocytes and the lineage negative (lin-) cells, including DCs. (E) DCs were finally divided in both cellular subtypes: CD11c+CD123- myeloid DCs (mDCs) or CD11c-CD123+ plasmacytoid DCs (pDCs).*

Figure 9. Cellular actors and activation pathways after interferon stimulation. *Whole blood of 3 donors was co-incubated for 15 minutes at 37°C with either no interferon (Non Act ; normalized at 1, in white), or one type I interferon (IFNα1 ; in light grey) or one type II interferon (IFNγ ; in dark grey). Phospho-epitope staining of the activated blood was performed with the DCs antibody mixture. Results were expressed as averages of Median of Fluorescence Intensities (MFI) of phosphorylated STAT1 (pSTAT1) (figures A1 to A4) and of pSTAT2 (figures B1 to B4) on monocytes (figures 9A1 and 9B1), neutrophils (figures 9A2 and 9B2), myeloid dendritic cells (mDCs) (figures 9A3 and 9B3) and plasmacytoid dendritic cells (pDCs) (figures 9A4 and 9B4). Comparison was made using a paired Tukey test, for which p-value was considered either not statistically significant above 0.05 (ns) or statistically significant under 0.05 (*) or under 0.01 (**).*

Figure 10. Flow cytometry expressions of phospho-epitopes. *Whole blood of 1 donor was co-incubated for 15 minutes at 37°C with either no interferon (Non Act), or one type I interferon (IFNα1) or one type II interferon (IFNγ). Phospho-epitope staining of the activated blood was performed with the DCs antibody mixture. Results were presented as histograms of phosphorylated STAT1 (pSTAT1) (figure 10A) and of pSTAT2 (figure 10B) on monocytes (Mo), neutrophils (Ne), myeloid dendritic cells (mDCs) and plasmacytoid dendritic cells (pDCs).*

Figure 11. Combined effects of interferons on CD169 and CD64 expressions. *Whole blood of 6 donors was co-incubated for 18 hours at 37°C with either no interferon (Non Act ; in white), or one type I interferon (IFNα1 ; in light grey) or one type II interferon (IFNγ ; in dark grey) or a combination of both interferons (IFNα1+IFNγ ; in black). Extracellular staining of the activated blood was performed with the CD64-CD169/Infections antibody mixture. Results were expressed as averages ± standard deviations of Median of Fluorescence Intensities (MFI) of CD169 on monocytes (mCD169) (figure 11A) and of CD64 on neutrophils (nCD64) (figure 11B). Comparison was made using a paired Tukey test, for which p-value was considered either not statistically significant above 0.05 (ns) or statistically significant under 0.05 (*) or under 0.01 (**).*

FIGURES.

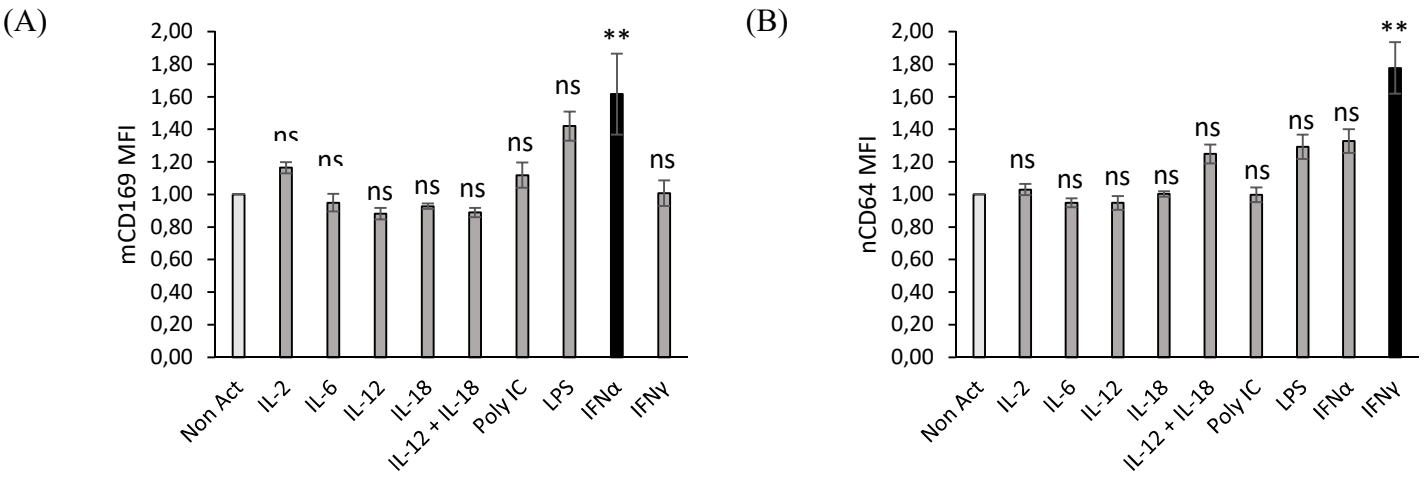


Figure 1. CD169 and CD64 expressions after blood stimulation.

FIGURES.

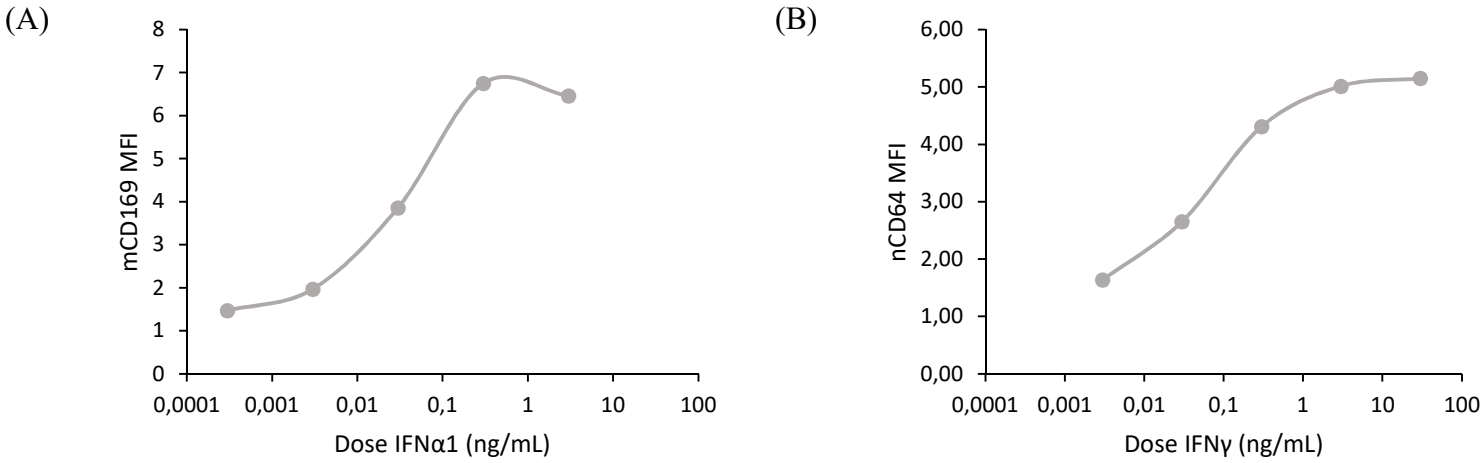
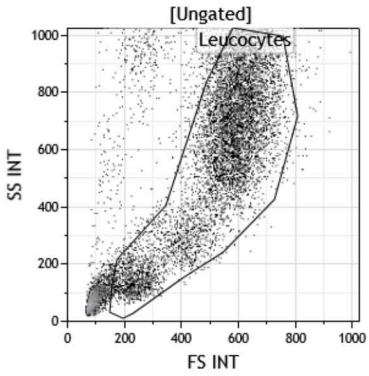
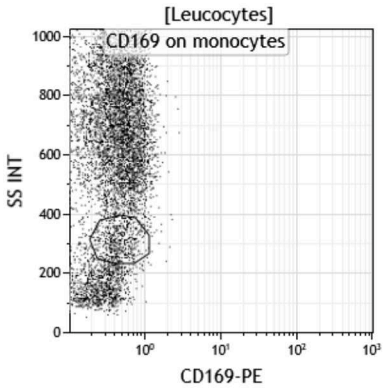


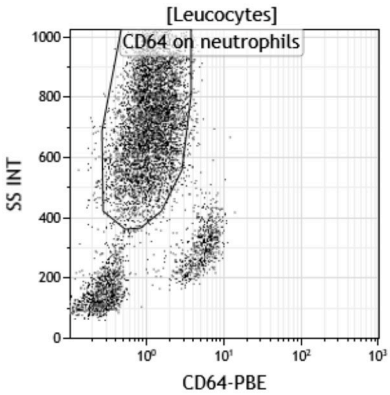
Figure 2. Dose-response curves of IFNα1 and IFNγ.

FIGURES.

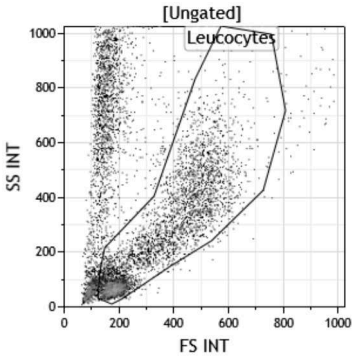
(A) Healthy

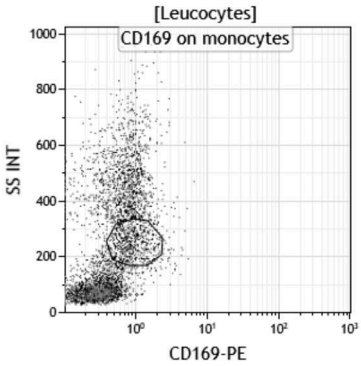


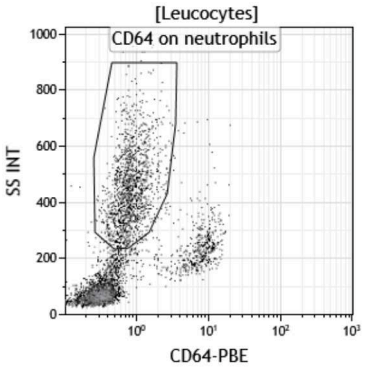




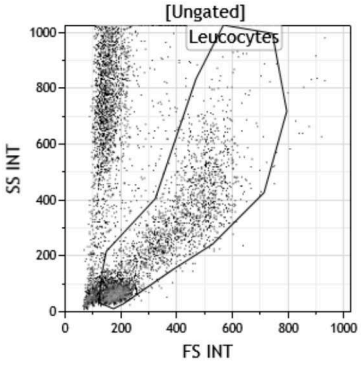
(B) Non Act

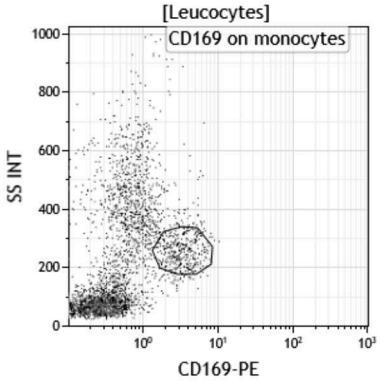


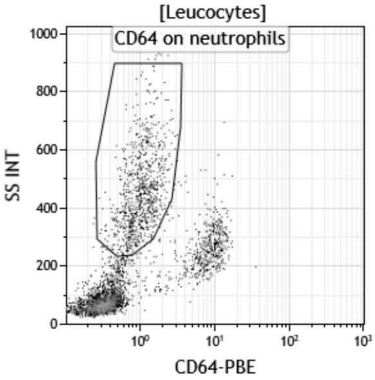




(C) IFNα1







(D) IFNγ

(E) Viral

(F) Bacterial

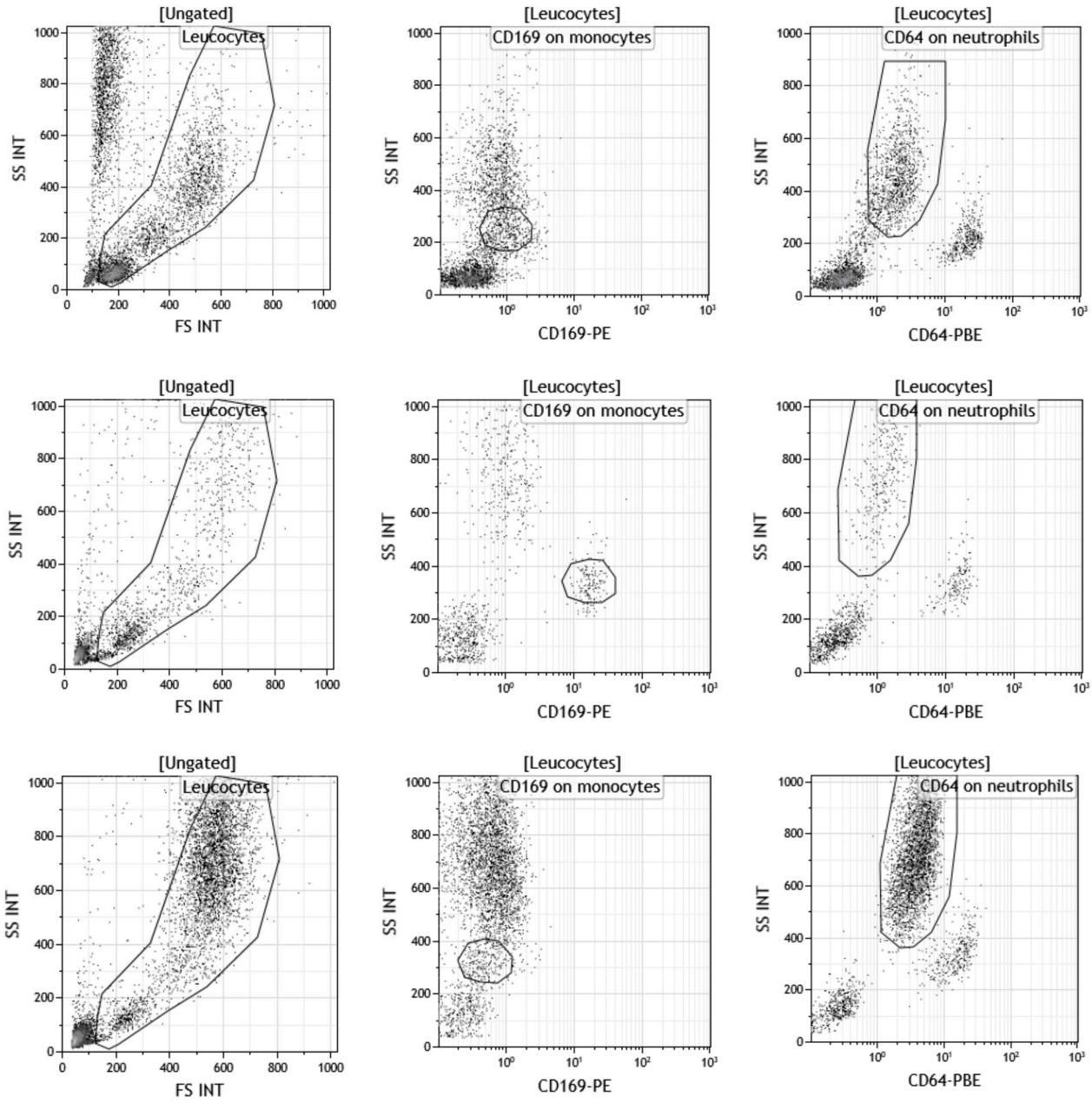


Figure 3. CD169 and CD64 flow cytometry expressions.

FIGURES.

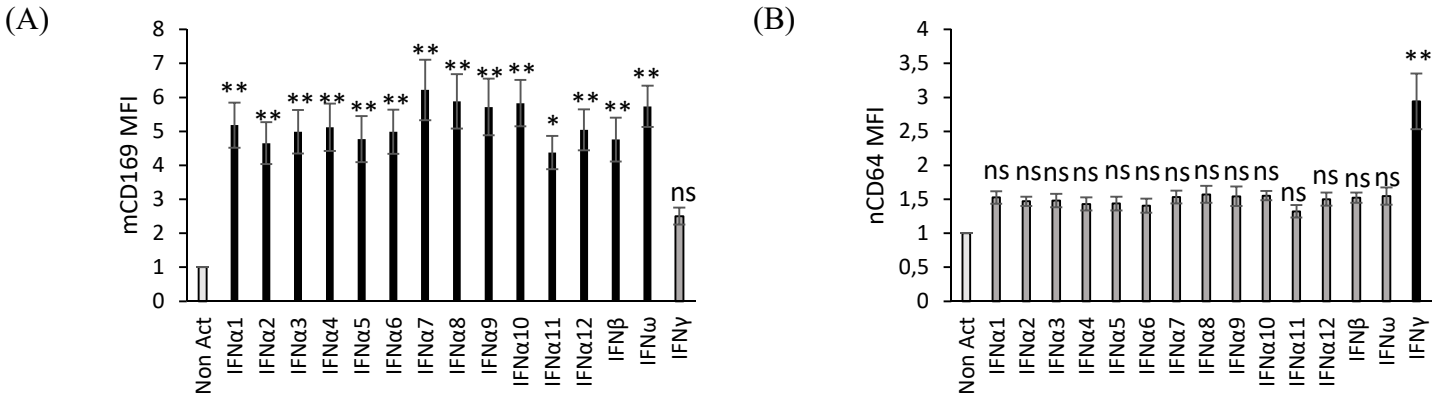


Figure 4. CD169 and CD64 expression after interferon stimulation.

FIGURES.

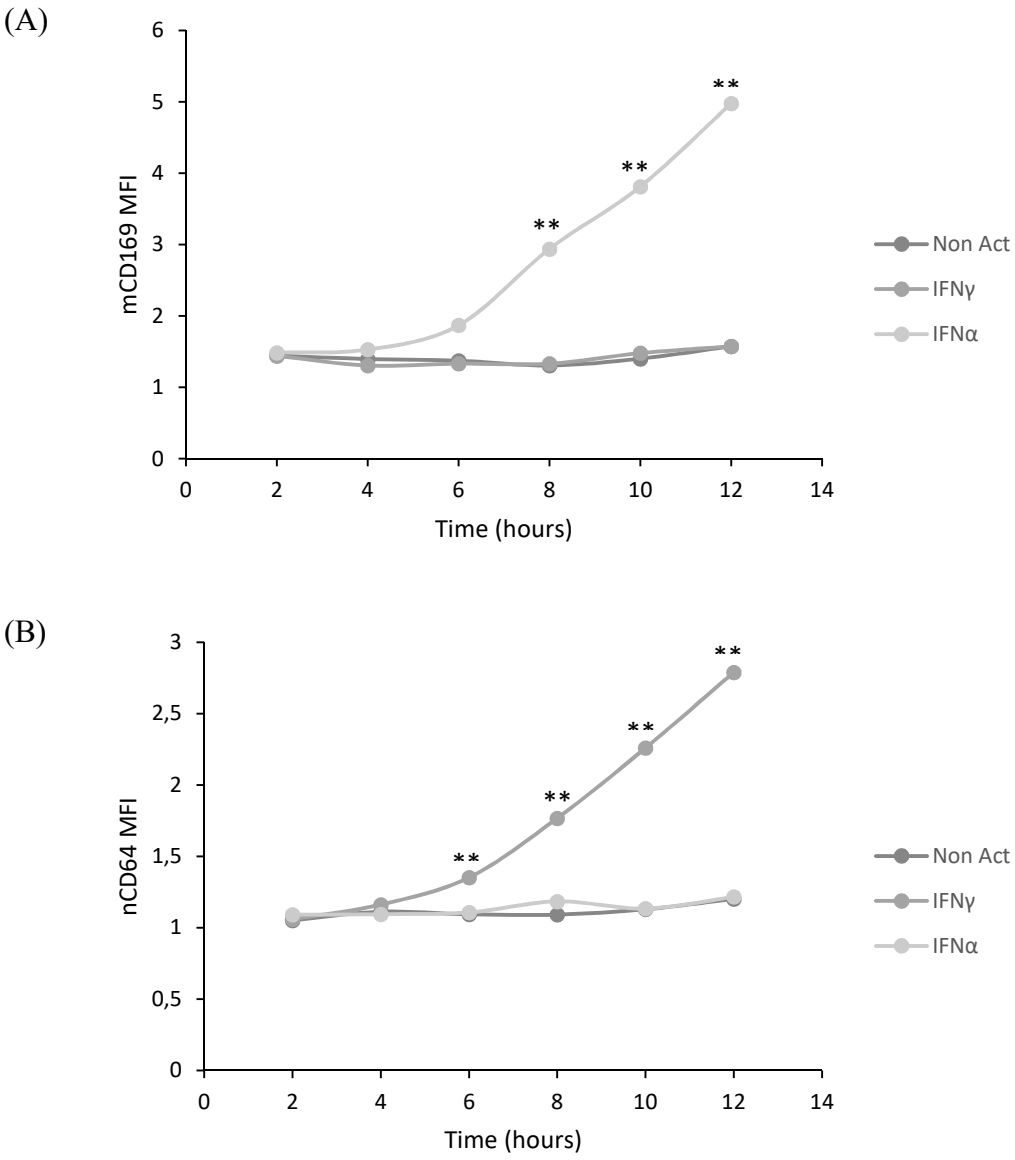
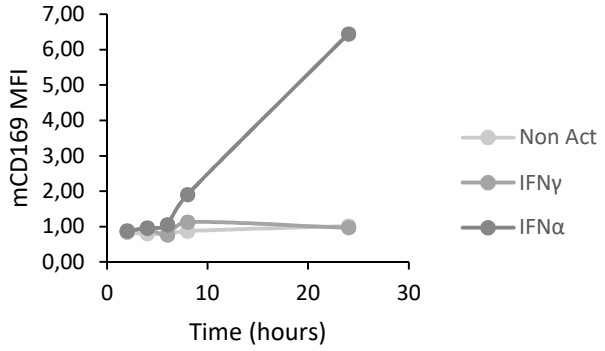


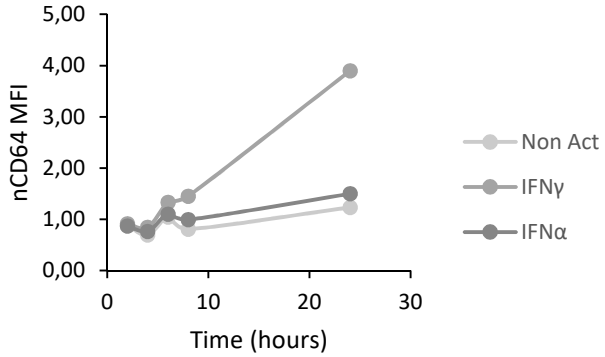
Figure 5. CD169 and CD64 kinetics after interferon stimulation.

FIGURES.

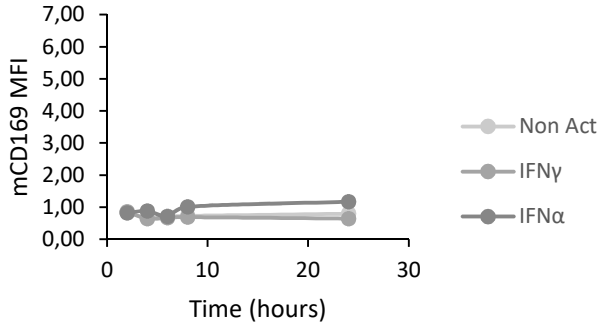
(A1)



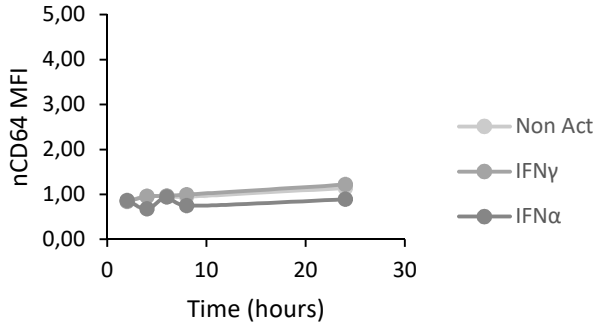
(B1)



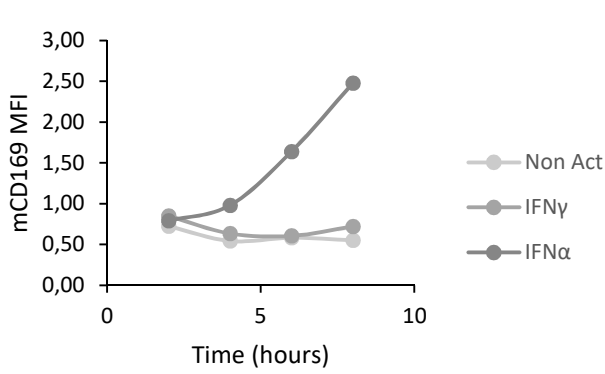
(A2)



(B2)



(A3)



(B3)

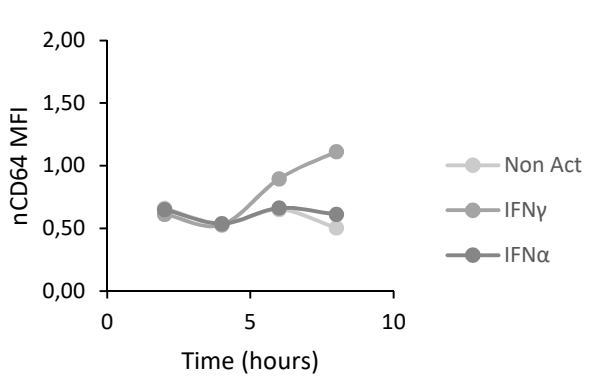
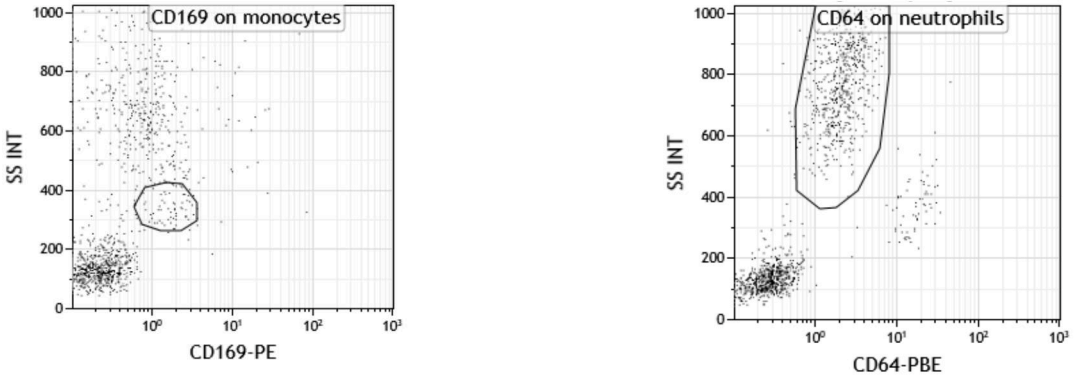


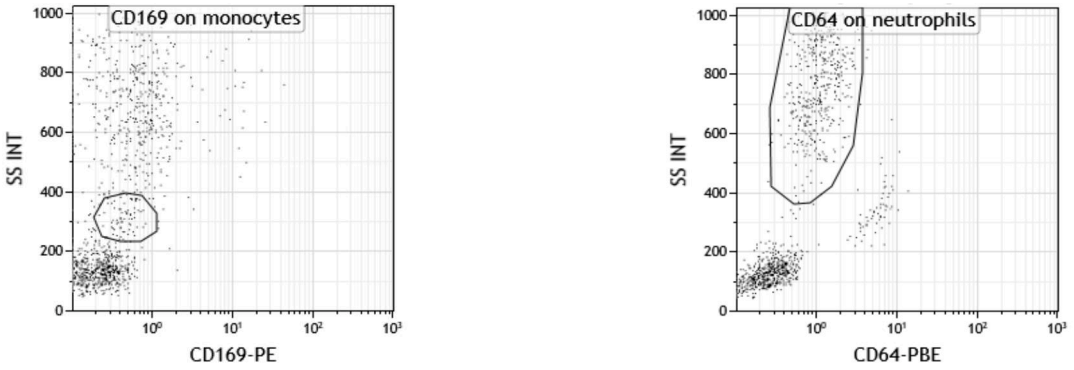
Figure 6. Direct or indirect CD169 and CD64 kinetics after interferon stimulation.

FIGURES.

(A1) **mCD169 – Extra. Without Bref. A – IFNα – 8h** (B1) **nCD64 – Extra. Without Bref. A – IFNγ – 8h**



(A2) **mCD169 – Extra. With Bref. A – IFNα – 8h** (B2) **nCD64 – Extra. With Bref. A – IFNγ – 8h**



(A3) **mCD169 – Intra. With Bref. A – IFNα – 8h** (B3) **nCD64 – Intra. With Bref. A – IFNγ – 8h**

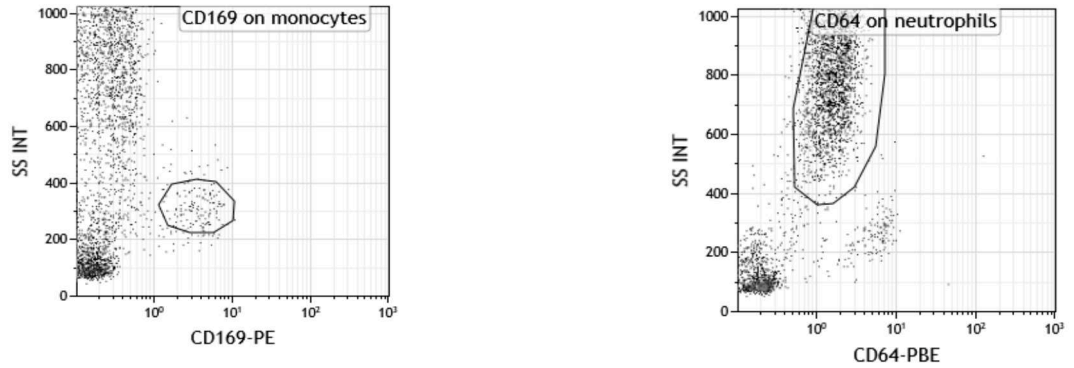


Figure 7. Flow cytometry extracellular or intracellular expressions of CD169 and CD64.

FIGURES.

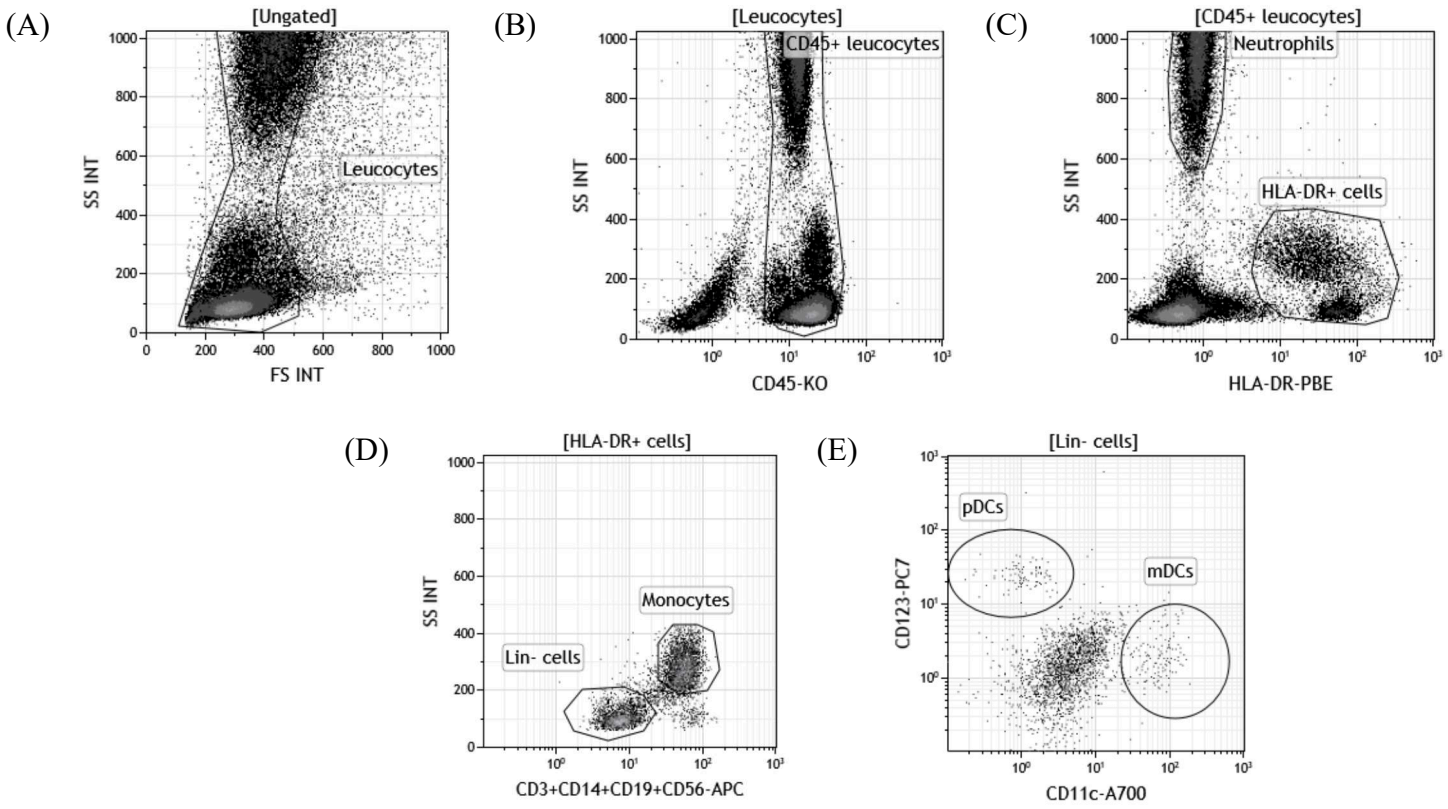


Figure 8. Monocytes, neutrophils, mDCs and pDCs isolation by flow cytometry.

FIGURES.

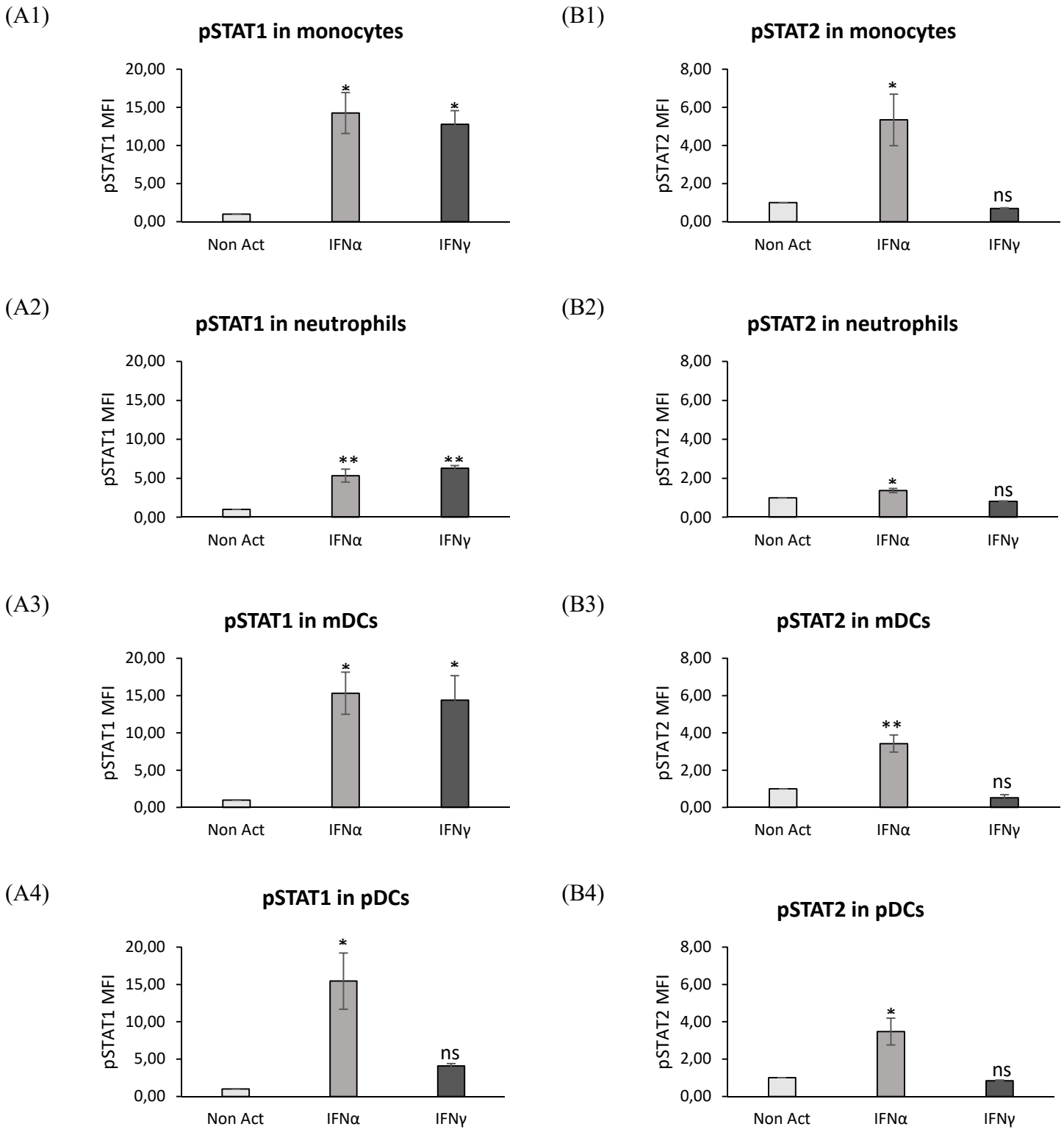
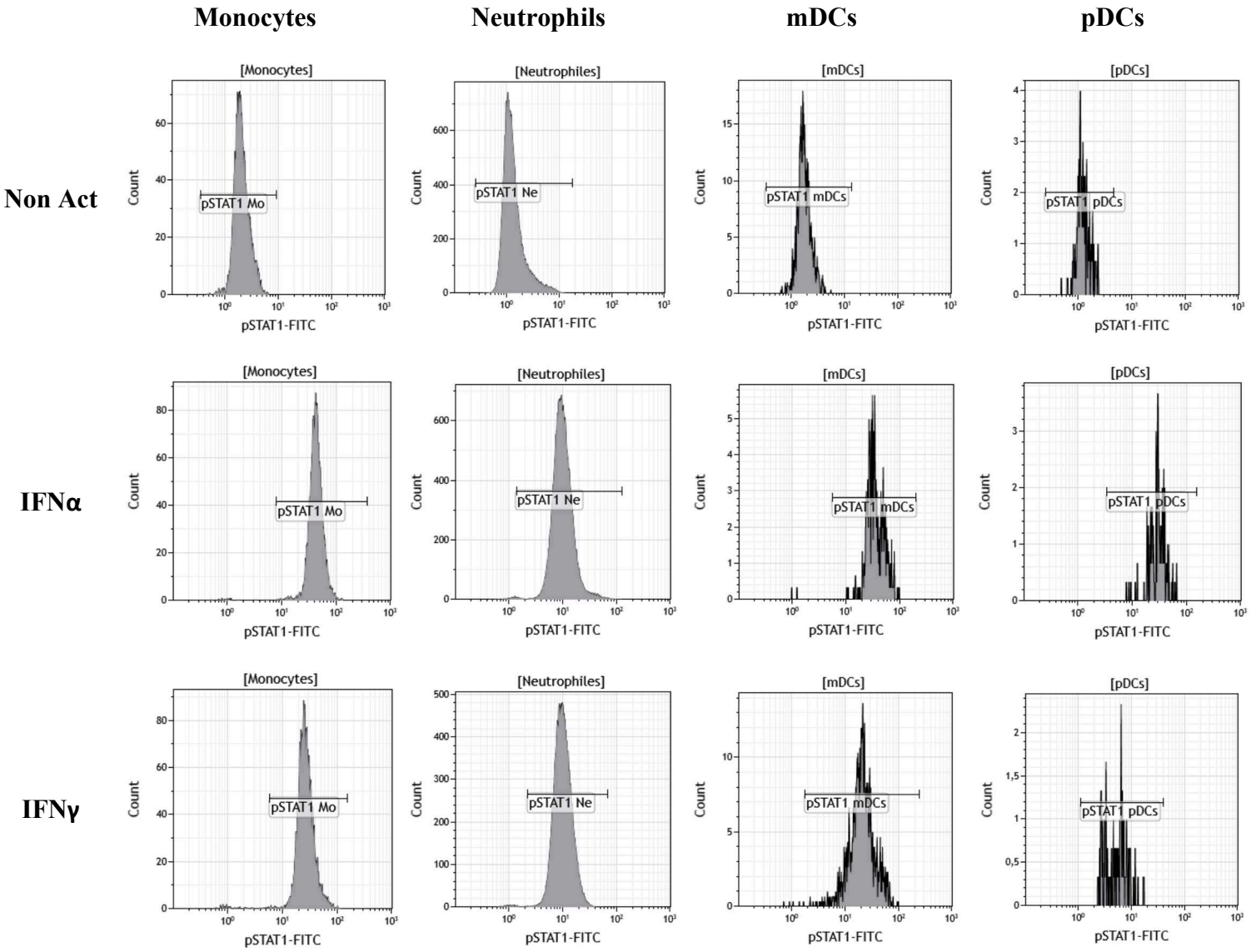


Figure 9. Cellular actors and activation pathways after interferon stimulation.

FIGURES.

(A) pSTAT1



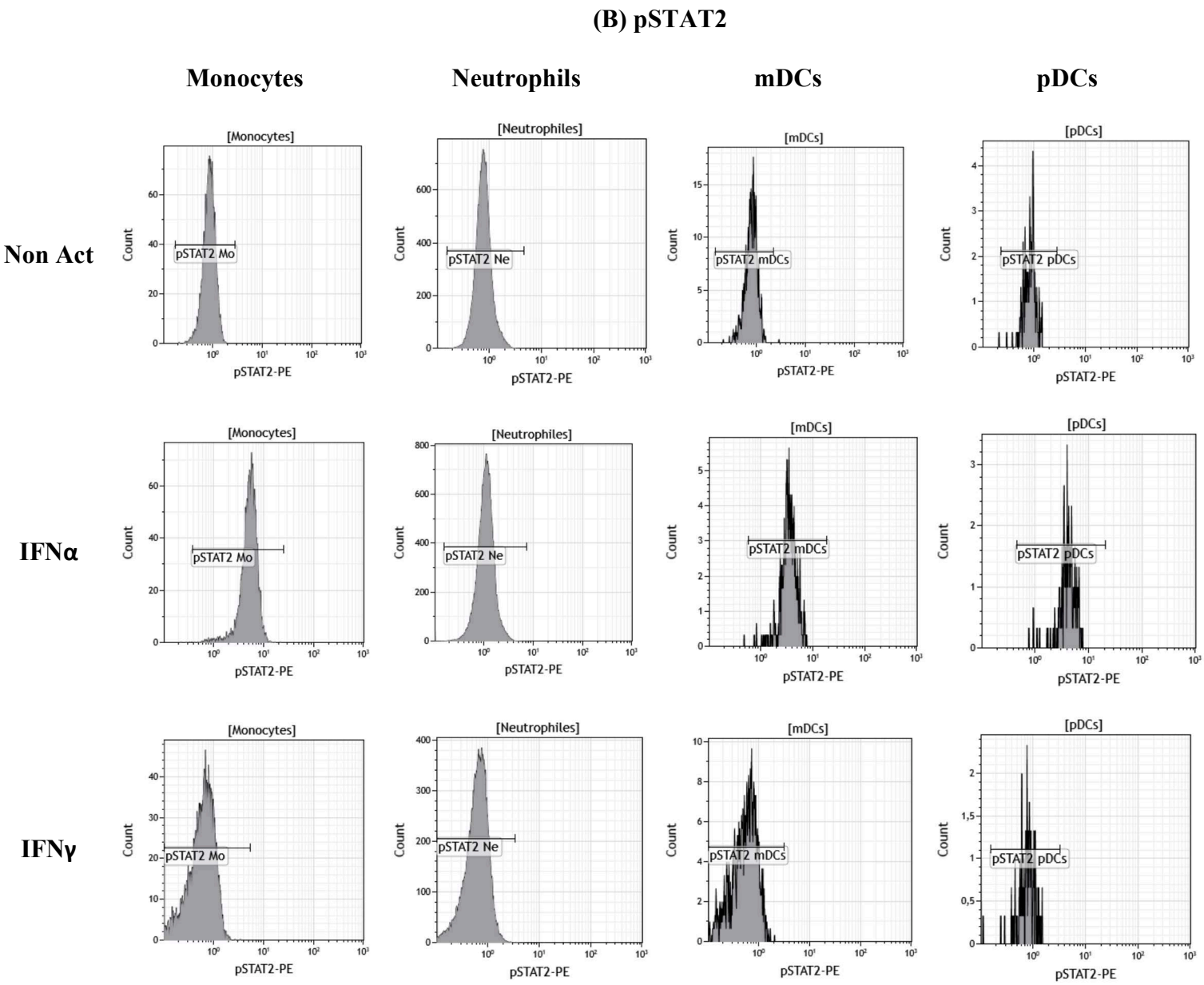


Figure 10. Flow cytometry expressions of phospho-epitopes.

FIGURES.

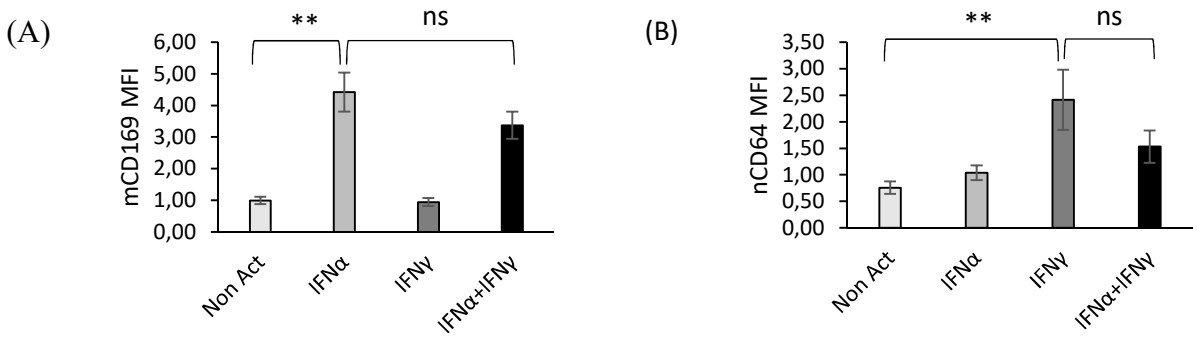


Figure 11. Combined effects of interferons on CD169 and CD64 expressions.

Figure 37 : Rôle des interférons dans les expressions du CD64 et du CD169 dans le sang total : pertinence dans l'équilibre entre les réponses immunitaires bactériennes et virales. *Publication acceptée dans la revue Immunity, Inflammation and Diseases, portant sur les travaux de compréhension des mécanismes d'expression in-vitro des marqueurs CD64 et CD169.*

Les résultats de ces travaux sont que les expressions biologiques du CD64 sur les neutrophiles et du CD169 sur les monocytes sont directement liés aux interférons produits par le système immunitaire et les cellules infectées en réponse à une bactérie ou à un virus.

La première étape a été de comprendre quels étaient les acteurs cellulaires ou moléculaires impliqués dans l'expression des deux biomarqueurs sur les cellules leucocytaires, en reproduisant *in-vitro* des stimulations du sang total de patients sains avec différents activateurs. Parmi tous les types testés, seuls les interférons α et γ induisaient respectivement les expressions des mCD169 et nCD64. Plus largement, l'étude a montré que tous les IFN de type I (IFNα, IFNβ et IFNω) induisaient l'expression du CD169 sur les monocytes, et seul l'IFN II, celle du CD64 sur les neutrophiles. Grâce à cette démonstration, le lien entre le mCD169 et les infections virales, et le lien entre le nCD64 et les infections bactériennes sont donc clairement démontrés puisque les IFN I sont des acteurs importants de la réponse antivirale, tandis que l'IFN II est produit majoritairement en réponse aux bactéries.

La deuxième étape a été de comprendre si l'induction des expressions des biomarqueurs par les interférons était un processus rapide et direct de la réponse immunitaire. Les résultats ont montré que ces marqueurs étaient en fait directement exprimés sur ces cellules immunitaires innées, comme une première ligne de réponse aux agents infectieux. En effet, le CD169 est un marqueur exprimé sur les monocytes pour son implication dans la capture et la transmission des virus, tandis que le CD64 est exprimé à la surface des neutrophiles pour faciliter leur processus de phagocytose des micro-organismes. Les résultats ont même montré que leurs expressions étaient induites en 6 à 8 heures après la production des interférons. Ils représentent ainsi des candidats biologiques d'intérêt pour le diagnostic précoce de l'étiologie d'une infection.

La dernière étape a été de comprendre les voies d'activation par lesquelles les biomarqueurs étaient exprimés. Les résultats ont montré que les IFN I activaient pSTAT1 et pSTAT2 alors que l'IFN II n'activait que pSTAT1, ce qui résultait donc en l'expression respective ou bien de mCD169 ou bien de nCD64. Cette indépendance a même été démontrée en combinant les deux types d'interférons.

Ainsi, ce travail a permis de mieux comprendre les cinétiques d'expressions des marqueurs CD169 sur les monocytes et CD64 sur les neutrophiles au cours des infections virales ou bactériennes. Les biomarqueurs semblent dépendre de voies d'activation spécifiques et indépendantes, variant selon l'interféron produit ou le type cellulaire. Deux limites se dégagent. La première limite est que les interférons sont en réalité trois classes distinctes, alors que seulement deux d'entre elles ont été évaluées dans l'étude. Pourtant, les interférons de type III (IFN III) agissent comme les IFN I, ce qui pourrait laisser supposer un rôle dans l'expression du mCD169. Les voies d'activation de ces acteurs particuliers nécessiteraient donc d'être également explorées. La seconde limite concerne les activateurs testés. Seuls les interférons ont été montrés comme impliqués de manière directe dans les expressions des biomarqueurs ; il aurait été intéressant d'explorer les voies d'activation indirectes des autres activateurs, et notamment le LPS, qui semble capable d'induire non seulement le nCD64, comme on peut l'attendre d'un PAMP bactérien, mais aussi le mCD169, de manière plus surprenante. En effet, certaines études ont évoqué un rôle du CD169 en réponse au LPS pour rendre le patient tolérant à l'endotoxine (ET). Ce cas particulier nécessiterait davantage d'exploration pour confirmer qu'il n'existe pas d'interférence au niveau clinique.

2.2.2. Rôle des interférons de type III dans les expressions des biomarqueurs

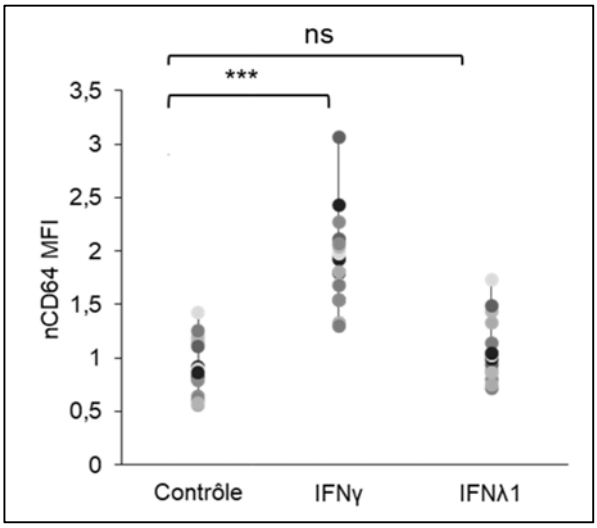
Les IFN III sont une famille de 3 protéines : IFNλ1, λ2 and λ3, connues respectivement aussi sous le nom d'IL-29, IL-28A and IL-28B. Le gène de l'IFNλ3 est transcrit dans une direction opposée à celles des gènes des IFNλ1 et IFNλ2, mais ils agissent tous comme les IFN I en activant la voie *Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transduction* (JAK/STAT) et en stimulant la phosphorylation de STAT1 et STAT2 (pSTAT1 et pSTAT2).

L'objectif du travail est donc de comprendre le rôle des IFN III dans les expressions des biomarqueurs infectieux.

L'hypothèse est que, ressemblant aux IFN I, les IFN III pourraient avoir un rôle dans l'expression du CD169 sur les monocytes.

Le premier travail a été de comparer les expressions des biomarqueurs infectieux lorsque les cellules étaient stimulées par les trois différents types d'interférons (figure 38).

a)



b)

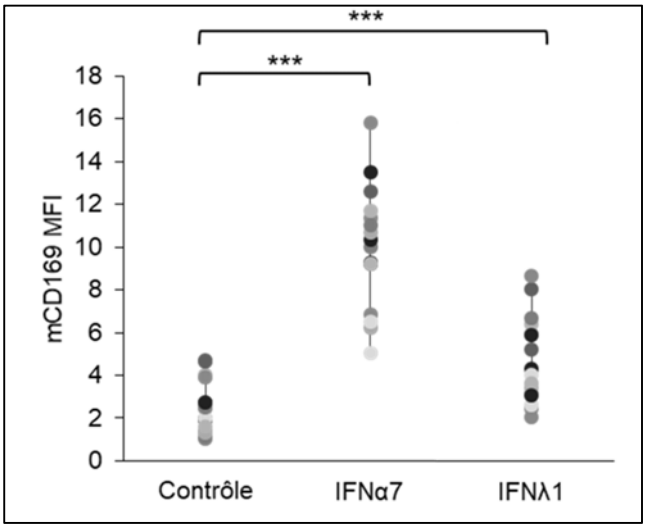


Figure 38 : Expressions des CD64 et CD169 avec les IFN III. *Le sang total de 16 donneurs sains a été incubé 20 heures à 37°C sans activateur (Contrôle) ou avec un interféron de type I (IFNα7) ou avec un interféron de type II (IFNγ) ou avec un interféron de type III (IFNλ1). Le sang activé a été testé avec la procédure de cytométrie en flux « au lit du patient » et les anticorps CD64-PBE et CD169-PE. Les résultats montrent les moyennes d'intensité de fluorescence (MFI) a) du CD64 sur les neutrophiles (nCD64) et b) du CD169 sur les monocytes (mCD169) pour chaque donneur. La comparaison statistique est faite avec le test de Dunnett, avec la condition sans activateur utilisée en condition contrôle. Les valeurs sont considérées significativement différentes pour une valeur-p inférieure à 0,05 (*), à 0,01 (**) ou à 0,001 (***) (si p > 0,05, non significatif : ns).*

Les résultats confirment que l'IFN II induit une augmentation significative de l'expression du CD64 sur les neutrophiles (MFI moyenne de 1,9 ; $p < 0,001$) que l'on ne retrouve pas avec l'IFN III (MFI moyenne de 1,07 ; $p : 0,060$), par rapport à un sang non activé (MFI moyenne de 0,9). A l'inverse, l'IFN I (MFI moyenne de 9,9 ; $p < 0,001$), et l'IFN III (MFI moyenne de 4,7 ; $p: 0,002$) induisent l'expression du CD169 sur les monocytes.

Les résultats montrent donc que les IFN III induisent une faible expression du CD169 sur les monocytes. Cependant, ces derniers ne possèdent pas de récepteurs aux IFN III. Etant donné que les cellules dendritiques plasmacytoïdes sont les seules cellules connues pour exprimer ce type de récepteurs et qu'elles sont spécialisées dans la production d'IFN I [150], il est suggéré que l'IFN III induit l'expression du CD169 sur les monocytes de manière indirecte via la stimulation des pDCs à secréter de l'IFN I. L'activation de ces deux types cellulaires a donc été suivie dans le temps, via leurs phosphorylations de STAT1 et STAT2, après une stimulation du sang avec les IFN III (figure 39).

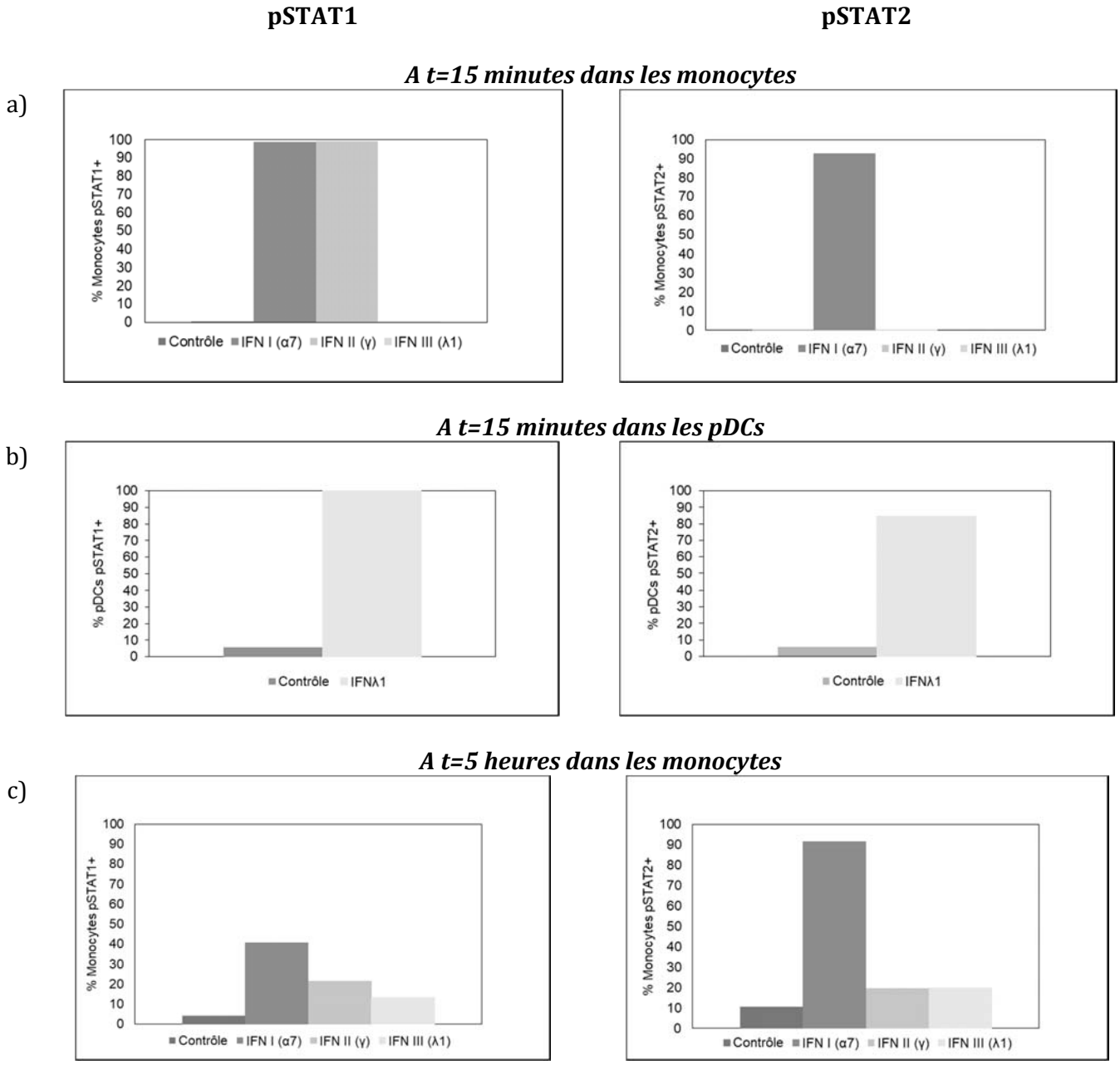


Figure 39 : Phosphorylation de STAT1 et STAT2 dans les monocytes et les pDCs avec les IFN III. *Le sang total de 3 donneurs sains a été incubé 15 minutes ou 5 heures à 37°C sans activateur (Contrôle) ou avec un interféron de type I (IFNα7) ou avec un interféron de type II (IFNγ) ou avec un interféron de type III (IFNλ1). Le sang activé a été testé avec la procédure de cytométrie en flux des phospho-épitopes et les anticorps du panel DCs, décrits en figure 29. Les résultats montrent les pourcentages (%) de phosphorylation du STAT1 (pSTAT1) et du STAT2 (pSTAT2) dans les monocytes et les pDCs après activation par les interférons.*

Les résultats confirment qu'après 15 minutes d'incubation, l'IFN I induit la phosphorylation de STAT1 et STAT2 dans les monocytes et que l'IFN II induit la phosphorylation de STAT1 uniquement dans les monocytes.

Les résultats montrent que l'IFN III n'induit pas d'activation des monocytes à ce stade, mais qu'en revanche, il induit bien une activation des cellules dendritiques (STAT1 et STAT2 phosphorylés).

Après 5 heures, l'IFN I et l'IFN II induisent toujours l'activation des monocytes, mais il y a aussi apparition de monocytes activés (STAT1 et STAT2 phosphorylés) dans le sang activé par l'IFN III.

L'ensemble de ces résultats suggère donc que les IFN III induisent indirectement l'expression du CD169 sur les monocytes : les IFN III activent directement les cellules dendritiques plasmacytoïdes à sécréter des IFN I qui vont alors activer les monocytes à exprimer le CD169.

Ainsi, ces travaux ont montré que les IFN III avaient un rôle dans l'expression du CD169 sur les monocytes. Les IFN III agiraient de manière indirecte via la stimulation des pDCs activées à secréter de l'IFN I. Les IFN I étant largement produits au cours de la réponse antivirale et de manière précoce, l'induction de l'expression du CD169 resterait donc majoritairement due à l'IFN I. Mais, plus tardivement et à moindre effet, les IFN III pourraient également induire l'expression du CD169. La limite de ce travail est que l'implication de l'FN I dans ce processus n'a pas été vérifiée. Il serait donc intéressant de stimuler des échantillons sanguins par de l'IFN III en présence ou en absence d'un inhibiteur spécifique de l'IFN I et d'observer l'expression du CD169 sur les monocytes.

2.2.3. Le modèle de la tolérance à l'endotoxine

Seuls les interférons ont été explorés comme liens entre les biomarqueurs cellulaires infectieux et la réponse immunitaire de l'hôte face à une bactérie ou à un virus : les interférons de type I et II ont été montrés comme étant impliqués de manière directe dans les expressions des biomarqueurs CD64 et CD169, et les interférons de type III sembleraient les activer de manière indirecte.

Pourtant, le LPS, aussi connu comme l'endotoxine bactérienne, semblait capable d'induire non seulement l'expression du nCD64, mais aussi du mCD169. Ce résultat surprenant a déjà été observé par l'équipe de van den Berg et al. [151], qui a rapporté une expression du CD169 sur les macrophages après stimulation au LPS. De ce fait, la mise en jeu du CD169 dans un processus antibactérien remettrait en question la pertinence de l'utiliser pour l'identification des infections virales. Dans une récente étude, il a été suggéré que le rôle antibactérien du CD169 serait de contribuer à la mise en place de l'ET ce qui expliquerait l'induction de son expression en présence de LPS [152].

Lorsqu'une bactérie pénètre l'organisme, les cellules du système immunitaire inné déclenchent une réponse inflammatoire robuste. Cette réaction doit être étroitement régulée car une inflammation incontrôlée entraînerait des complications cliniques telles que le choc septique par exemple. L'un des plus importants mécanismes de protection de l'hôte est la tolérance aux endotoxines. C'est un état transitoire dans lequel les cellules immunitaires, ayant été mises en contact, au préalable, avec une faible dose d'endotoxine ne peuvent plus répondre à une seconde stimulation par une endotoxine bien que celle-ci soit forte. Les cellules du système immunitaire inné dans cet état produisent moins de molécules pro-inflammatoires, en particulier le TNFα. Cette réponse leur confère la capacité de survivre à des doses létales d'endotoxines puisqu'elles ne déclenchent pas de réaction inflammatoire incontrôlée [153].

L'implication du CD169 dans l'ET, et l'induction de son expression en présence de LPS, n'ont à ce jour pas été clairement définies. Il a été montré que l'interaction du LPS avec le récepteur TLR4 entraîne la libération d'IFN I [154], et il a été suggéré que cette signalisation IFN I pouvait jouer un rôle régulateur dans la réponse de l'hôte face aux infections bactériennes [155]. La signalisation IFN I semble dons être impliquée dans la mise en place de l'ET via l'induction de l'expression du CD169.

L'objectif du travail a donc été de comprendre le rôle du CD169 dans le processus de tolérance à l'endotoxine bactérienne, pour savoir si cela remettait en cause son utilisation pour l'identification des infections virales.

L'hypothèse est que la construction progressive d'un modèle de tolérance à l'endotoxine devrait permettre de comprendre l'implication du CD169 dans la réponse anti-infectieuse à une bactérie.

Le premier résultat a été de confirmer les expressions des biomarqueurs CD64 et CD169 en réponse au LPS (figure 40).

Les résultats montrent une augmentation significative de l'expression du CD64 à la surface ($p < 0,001$) et à l'intérieur ($p : 0,015$) des neutrophiles en présence de LPS. En revanche, aucune augmentation significative de l'expression du CD169 n'est détectée à la surface des monocytes ($p : 0,180$) en réponse au LPS. Lorsque l'expression du CD169 est mesurée à l'intérieur des monocytes par une méthode de marquage intracellulaire plus sensible, car incluant une étape de lavage finale, une augmentation significative ($p < 0,001$) est observée en réponse au LPS.

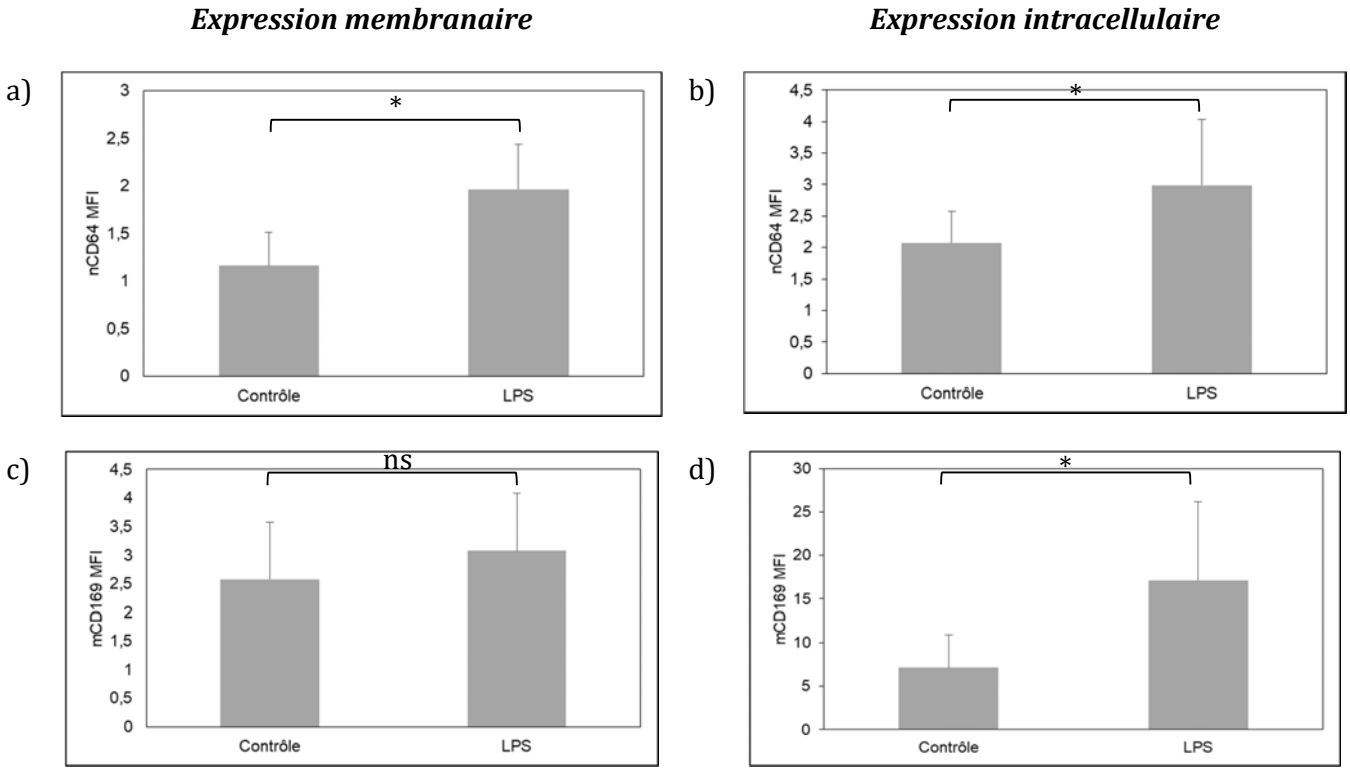
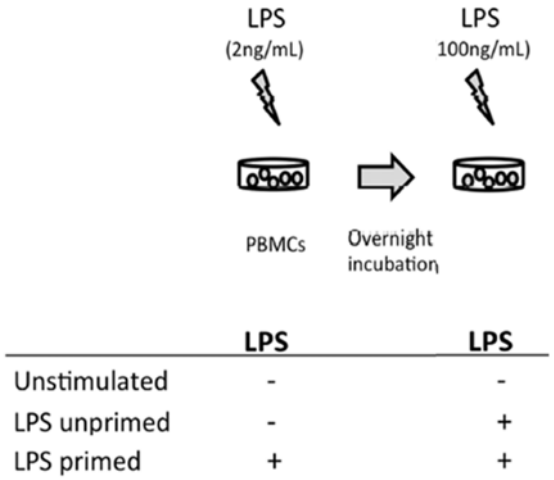


Figure 40 : Expressions du CD64 et du CD169 en réponse au LPS. *Le sang total de 20 donneurs sains a été incubé en l'absence (« contrôle ») ou en présence de 2 ng/mL de lipopolysaccharide (LPS ; « LPS ») pendant 20 heures à 37°C. La dose de 2 ng/mL est la dose de LPS moyenne retrouvée chez les patients atteints d'une infection bactérienne)* [156]*. Les moyennes d'intensité de fluorescence (MFI) du CD64 sur les neutrophiles (nCD64) et du CD169 sur les monocytes (mCD169) par la procédure de cytométrie en flux « au lit du patient » de marquage membranaire (a et c respectivement) ou par la procédure de marquage intracellulaire décrite en figure 29 (b et d respectivement). Les moyennes sont comparées avec un test ANOVA qui révéle qu'elles sont significativement différentes lorsque la valeur-p est inférieure à 0,05 (*) (si p > 0,05, ns : non significatif).*

En fait, ces résultats rejoignent les travaux précédents [151] ayant enregistré une augmentation du CD169 en présence de LPS. Cependant, l'augmentation du CD169 étant faible, elle n'est pas détectée par un marquage membranaire n'incluant pas de lavage. La suite de la compréhension du rôle du CD169 en réponse au LPS sera donc étudiée avec un marquage intracellulaire, mais il est intéressant de noter qu'avec la procédure de marquage membranaire, moins sensible, il n'y a pas d'augmentation significative du mCD169 en réponse au LPS, ce qui exclue donc toute interférence en clinique d'une augmentation du mCD169 en cas d'infection bactérienne.

Pour déchiffrer le rôle du CD169 en réponse au LPS, le second résultat a été de construire un modèle de tolérance à l'endotoxine en sang total, car il n'existait à ce jour qu'un modèle avec des PBMC (figure 41).

a)



	LPS	LPS
Unstimulated	-	-
LPS unprimed	-	+
LPS primed	+	+

b)

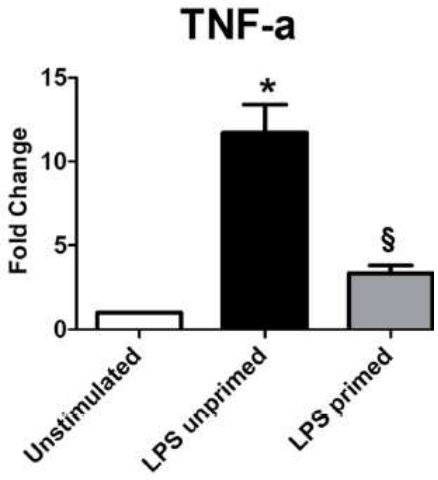


Figure 41 : Modèle de la tolérance à l'endotoxine avec des PBMC. *a) Les cellules sanguines périphériques mononuclées (PBMCs) sont ou bien non stimulées (« unstimulated ») pour mimer un cas non pathologique, ou bien stimulées par une seule forte dose (100 ng/mL) de lipopolysaccharide (LPS) pendant 2 heures (« LPS unprimed ») pour mimer une infection bactérienne, ou bien pré-stimulées par une faible dose (2 ng/mL) de LPS sur la nuit (overnight incubation) puis stimulées avec une forte dose de LPS (« LPS primed ») pour mimer une infection bactérienne tolérante à l'endotoxine. b) La quantification du facteur de nécrose tumorale α (TNFα) montre que son expression est multipliée par 11 en cas d'infection bactérienne, alors qu'elle n'est multipliée que par 4 en cas d'infection tolérante à l'endotoxine (Tiré de* [157]*).*

Les modèles classiques de tolérance à l'endotoxine sont établis sur les PBMC, alors qu'établir un modèle en sang total permet que tous les acteurs cellulaires soient présents, dans les proportions naturelles, non stressés par des étapes de purification, et leur environnement est en grande partie préservé (sérum, métabolites, cytokines, etc.). Pour l'étude de l'implication du CD169 dans la régulation de la réponse antibactérienne, le modèle sur PBMC a donc été transféré comme suit en sang total : les échantillons de sang anti-coagulés à l'héparine sont pré-stimulés par une dose « tolérisante » de LPS (2 ng/ml) pendant 24h suivie d'une forte stimulation au LPS (200 ng/ml) pendant 2h.

Pour confirmer le modèle, les niveaux de TNFα ont été mesurés dans des échantillons de sang non « tolérisés » ou « tolérisés » par le LPS (figure 42).

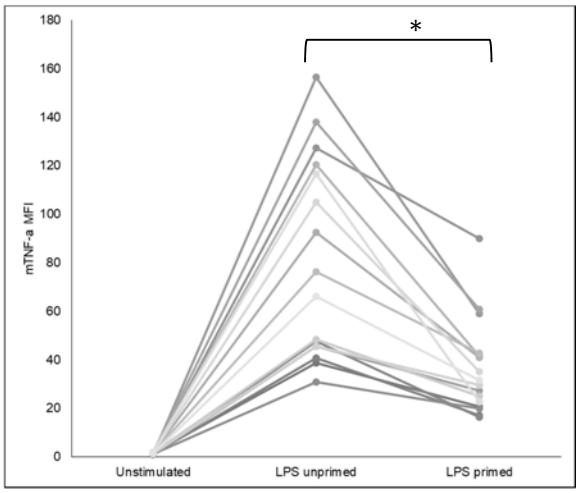


Figure 42 : Modèle de la tolérance à l'endotoxine en sang total. *Les échantillons de sang total de 19 donneurs sont ou bien non stimulés (« unstimulated »), ou bien stimulés par une seule forte dose (100 ng/mL) de lipopolysaccharide (LPS) pendant 2 heures (« LPS unprimed »), ou bien pré-stimulés par une faible dose (2 ng/mL) de LPS pendant 20 heures puis stimulés avec une forte dose de LPS (« LPS primed »). La moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) du facteur de nécrose tumorale α sur les monocytes (TNFα) est quantifiée avec une procédure de cytométrie en flux intracellulaire. Les moyennes sont comparées avec un test ANOVA qui révéle qu'elles sont significativement différentes lorsque la valeur-p est inférieure à 0,05 (*).*

Les résultats montrent que dans les échantillons directement stimulés par de fortes doses de LPS (sans pré-stimulation), des niveaux élevés de TNFα ont été enregistrés attestant de l'induction d'une réponse inflammatoire. En revanche, dans les échantillons ayant reçu une faible dose de LPS avant d'être fortement stimulés, les niveaux de TNFα sont moindres (*p : 0,006*) témoignant de la mise en place de la tolérance à l'endotoxine.

Le modèle de la tolérance à l'endotoxine en sang total est donc validé. Il est intéressant de noter que dans les échantillons ayant de faibles niveaux de TNFα, l'expression du CD169 était précédemment corrélativement élevée. Ces résultats confirment ainsi l'induction de l'expression du CD169 sur les macrophages par les lipopolysaccharides pour mettre en place une tolérance à l'endotoxine via une diminution de la production de TNFα.

La littérature décrivant que l'interaction du LPS avec le TLR4 entraîne la libération d'IFN I [154], le troisième résultat a été de vérifier si la signalisation IFN était impliquée dans la mise en place de l'ET, en pré-stimulant les échantillons sanguins avec du LPS (2ng/ml) ou par différents IFN pendant 24h, avant d'être fortement stimulés par du LPS (200ng/ml) (figure 43).

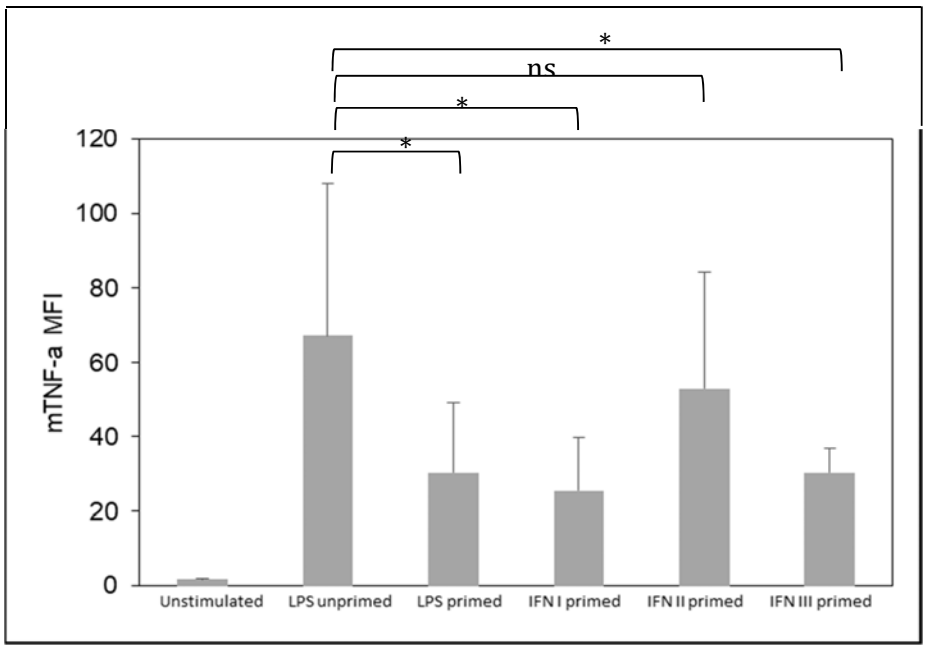


Figure 43 : Rôle des interférons dans la tolérance à l'endotoxine. *Les échantillons de sang total de 10 donneurs sont ou bien non stimulés (« unstimulated »), ou bien stimulés par une seule forte dose (100 ng/mL) de lipopolysaccharide (LPS) pendant 2 heures (« LPS unprimed »), ou bien pré-stimulés par une faible dose (2 ng/mL) de LPS pendant 20 heures puis stimulés avec une forte dose de LPS (« LPS primed »), ou bien pré-stimulés avec des interférons de type I (IFNα7), II (IFNγ) ou III (IFNλ1) pendant 20 heures puis stimulés avec une forte dose de LPS (« IFN I, II, III primed »). La moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) du facteur de nécrose tumorale α sur les monocytes (TNFα) est quantifiée avec une procédure de cytométrie en flux intracellulaire. Les moyennes sont comparées avec un test apparié de Tukey qui révéle qu'elles sont significativement différentes lorsque la valeur-p est inférieure à 0,05 (*).*

Les résultats montrent que les échantillons sanguins pré-stimulés par du LPS à 2ng/ml, de l'IFN I ou de l'IFN III présentent des taux de TNFα significativement plus faibles que les échantillons sanguins non pré-stimulés (LPS, $p < 0,0001$; IFNα7, $p < 0,0001$; IFNλ1, $p < 0,0001$). Les échantillons sanguins pré-stimulés par l'IFN II, quant à eux, présentent des taux de TNFα similaires aux taux retrouvés dans les échantillons non pré-stimulés (*p: 0.052*).

Cette observation montre que les IFN I et III miment une pré-stimulation par du LPS (2ng/ml) permettant de rendre les monocytes incapables de répondre à une seconde stimulation par une endotoxine. Cela suggère donc que les IFN I et III rendent les monocytes tolérants aux endotoxines, et potentiellement via l'induction de l'expression du CD169.

Le dernier résultat a été de comprendre si la tolérance à l'endotoxine résultait d'une action synergique entre le LPS et les interférons (figure 44).

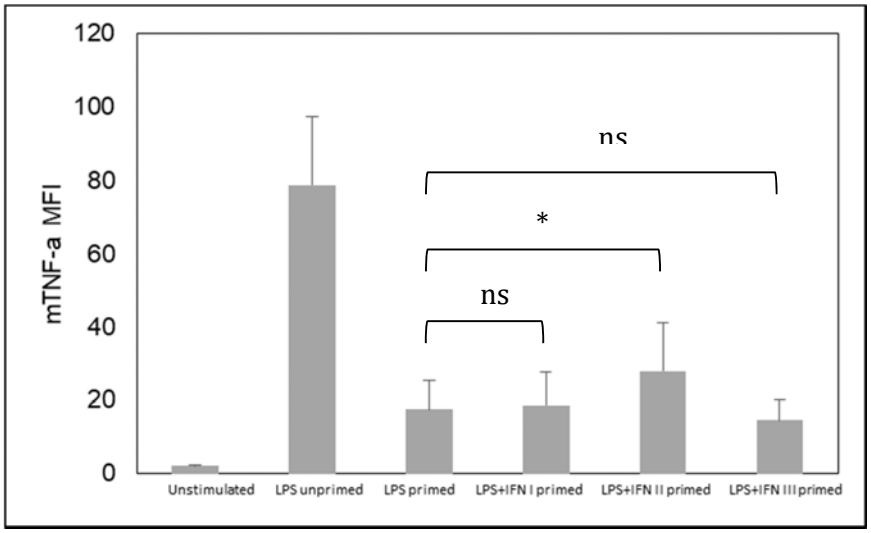


Figure 44 : Synergie entre interférons et LPS dans la tolérance à l'endotoxine. *Les échantillons de sang total de 10 donneurs sains sont ou bien non stimulés (« unstimulated »), ou bien stimulés par une seule forte dose (100 ng/mL) de lipopolysaccharide (LPS) pendant 2 heures (« LPS unprimed »), ou bien pré-stimulés par une faible dose (2 ng/mL) de LPS pendant 20 heures puis stimulés avec une forte dose de LPS (« LPS primed »), ou bien pré-stimulés avec du LPS et des interférons de type I (IFNα7), II (IFNγ) ou III (IFNλ1) pendant 20 heures puis stimulés avec une forte dose de LPS (« LPS + IFN I, II, III primed »). La moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) du facteur de nécrose tumorale-α sur les monocytes (mTNFα) est quantifiée avec une procédure de cytométrie en flux intracellulaire. Les moyennes sont comparées avec un test apparié de Tukey qui révéle qu'elles sont significativement différentes lorsque la valeur-p est inférieure à 0,05 (*).*

Les résultats montrent que dans le sang pré-stimulé par du LPS (2ng/ml) en présence d'IFN I ou III, les taux de TNFα sont similaires au sang pré-stimulé uniquement par du LPS (2ng/ml) (LPS+IFNα7, *p : 0.700* ; LPS+IFNλ1, *p : 0.500*). Il n y a donc pas d'effet de synergie entre le LPS et l'IFN I/ III pour l'induction de la tolérance à l'endotoxine.

Cependant, dans le sang pré-stimulé par du LPS (2ng/ml) en présence d'IFNγ, le taux de TNFα est plus élevé que dans le sang pré-stimulé au LPS (2ng/ml) uniquement (*p : 0.040*). Cette observation suggère que l'IFN II empêche la tolérance aux endotoxines et favorise, au contraire, la réactivité du système immunitaire.

Ces résultats dans leur ensemble suggèrent un effet opposé des IFNI/III et des IFN II dans l'ET.

Ainsi, les travaux ont montré que le LPS, ou endotoxine bactérienne, induisait non seulement le CD64 sur les neutrophiles, mais aussi le CD169 sur les monocytes.

L'implication du CD169 dans une réponse antibactérienne aurait pu remettre en question son utilisation pour la détection d'infection virale. Cependant, son augmentation à la surface des monocytes en réponse au LPS restait faible, donc ne pouvant être détectée que par un marquage sensible incluant une étape de lavage. Etant donné que le test diagnostic s'appuie sur un marquage membranaire rapide qui n'inclue pas d'étape de lavage, l'augmentation du CD169 induite par le LPS, lors d'une infection bactérienne, n'interfère pas dans le diagnostic des infections.

Son rôle en réponse au LPS était cependant intéressant à explorer, ainsi qu'indirectement ceux des interférons. Il a été montré que l'interaction du LPS avec le récepteur Toll-like 4 (TLR4) entraînait la libération des IFN I, qui joueraient un rôle régulateur dans la réponse de l'hôte face aux infections bactériennes en induisant l'expression du CD169 sur les monocytes. Un modèle de tolérance à l'endotoxine a donc été établi en sang total pour cette étude, mais plus largement, ce modèle pourrait être exploité pour l'étude des processus impliqués dans le choc septique et pour le test de thérapies visant à stimuler le système immunitaire.

Les résultats ont montré que la mise en place de la tolérance à l'endotoxine se traduisait par une augmentation du CD169 et une diminution du TNFα. Aucun effet de synergie n'a été observé entre le LPS et les IFN I/III suggérant plutôt l'existence d'une relation épistatique entre les deux types de molécules : le LPS induit l'action des IFN I et III à activer l'expression du CD169 sur les monocytes. Ces résultats sont en adéquation avec le travail ayant proposé que le CD169 était impliqué dans la mise en place de l'ET, et pour parfaire cette démonstration, il serait intéressant de répéter l'expérience en présence et en absence d'un inhibiteur spécifique du CD169. Néanmoins, l'implication de l'IFN I dans l'ET reste controversée. Il a par exemple été montré, que la perte du récepteur de l'IFN I dans les macrophages péritonéales de souris n'entravait pas la mise en place de l'ET [158]. *L'IFN II, contrairement à l'IFN I et III, antagonise l'action tolérisante du LPS et rejoint des travaux antérieurs ayant montré que l'IFNγ était impliqué dans la létalité des endotoxines en phase aigüe* [159]. *Au contraire, il peut être utilisé dans la phase d'immunodépression pour stimuler le système immunitaire* [160].

Ces résultats dans leur ensemble suggèrent un effet opposé des IFNI/III et des IFN II dans l'ET qui corrèle avec la dichotomie observée dans l'expression des récepteurs CD64 et CD169 appuyant la pertinence d'utiliser ces deux marqueurs pour la discrimination des infections bactériennes et virales.

Conclusion 2.2

Explorer le lien entre les molécules de la réponse anti-infectieuse, que sont les interférons, et les biomarqueurs CD64 et CD169 était nécessaire pour démontrer la pertinence à les utiliser dans un contexte clinique pour la discrimination entre les infections d'origine bactérienne et les infections d'origine virale.

Nous avons montré que l'expression du CD169 à la surface des monocytes était majoritairement induite par l'IFN I et indirectement par les IFN III, via la stimulation des pDC à secréter de l'IFN I. Ils ont également confirmé que l'IFN II induisait l'expression du CD64 à la surface des neutrophiles et ont même identifié une inhibition croisée entre les IFN I et II dans l'expression du CD169 et du CD64 (figure 45).

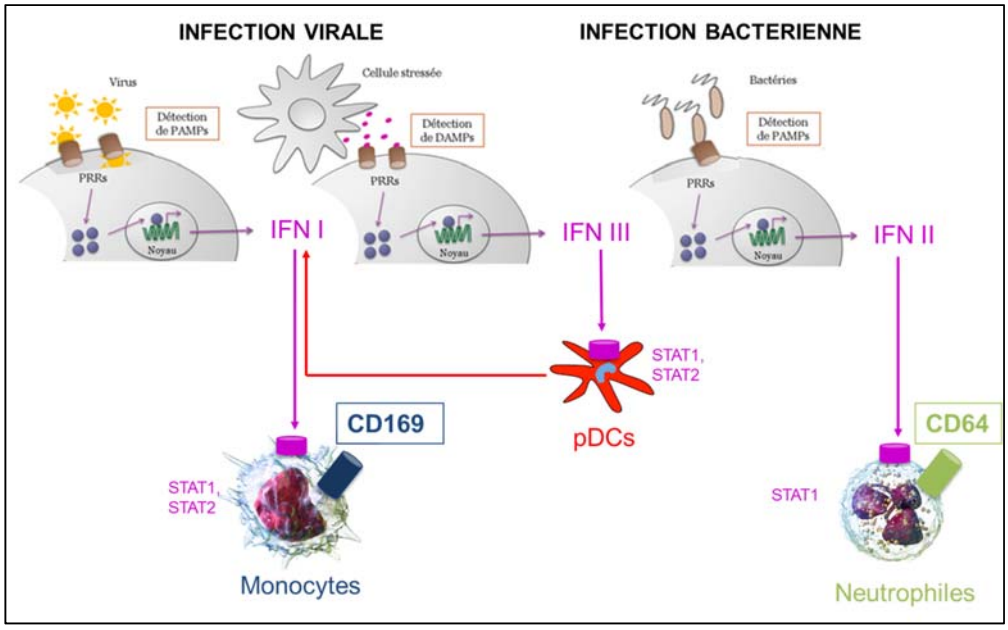


Figure 45 : Synthèse du rôle des interférons dans les expressions du CD64 et du CD169. *Les IFN de type I (α, β, ω) et les IFN III (λ) induisent l'expression du CD169 à la surface des monocytes, en réponse à un virus, alors que l'IFN II (γ) induit l'expression du CD64 sur les neutrophiles, en réponse à une bactérie.*

La mesure de l'augmentation de leurs expression, dans les 6 à 8 heures suivant l'infection, devrait permettre de diagnostiquer précocément l'étiologie de l'infection. L'exploration de leurs réponses biologiques *in-vitro* permet donc de prédire les résultats *in-vivo* en ayant une meilleure compréhension de leurs évolutions. Sachant que le développement bactérien ou viral prend de nombreuses heures à plusieurs jours avant que les premiers symptômes apparaissent chez le malade, il est probable que le test soit positif dès la première consultation.

Nous avons exploré le rôle des composants de la paroi bactérienne (LPS) dans l'expression des marqueurs CD169 et CD64, puisqu'une faible expression du CD169 sur les monocytes était induite en présence de LPS. Les résultats obtenus ont suggéré qu'en fait, les IFN I et III favorisaient une tolérance au LPS en induisant l'expression du CD169, alors que l'IFN II l'en empêchait, le CD169 ayant alors une action directe de tolérance en diminuant le TNFα pro-inflammatoire (figure 46).

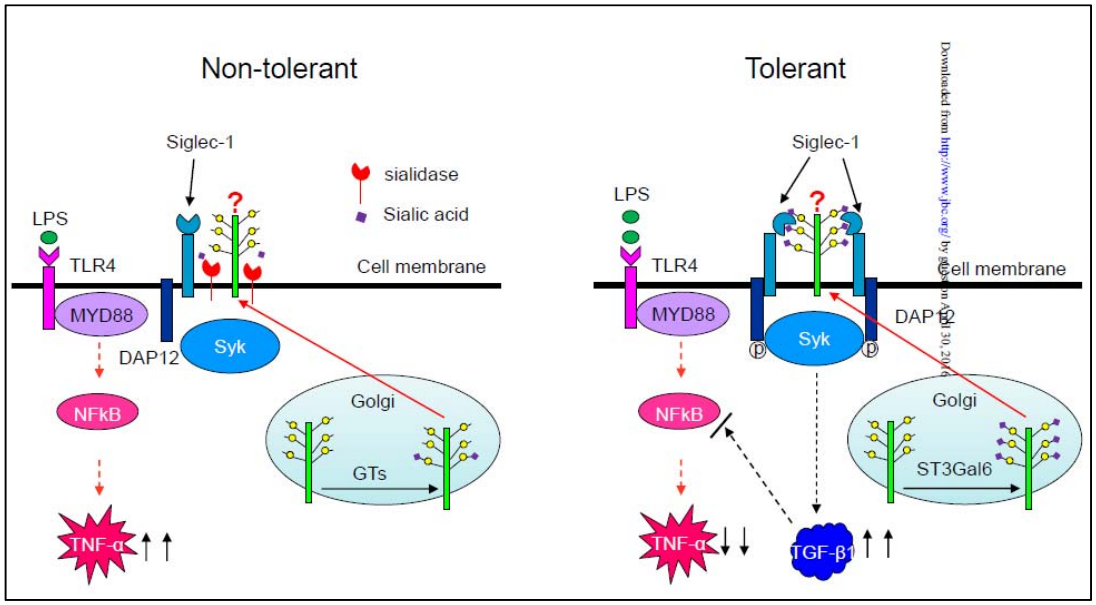


Figure 46 : Implication du CD169 dans la tolérance à l'endotoxine. *Dans des conditions « non tolérisées » (« non tolerant »), les protéines de surface sont peu sialylées, et le peu d'acides sialiques restant est même digéré par des sialidases. Dans des conditions de tolérance à l'endotoxine (« tolerant »), les protéines de surface sont hautement sialylées et donc reconnues par le CD169 (Siglec-1). Leur interaction induit une augmentation du facteur de croissance tumorale β (TGFβ), qui va provoquer l'inhibition de la production de facteur de nécrose tumorale α (TNFα) initialement induit par la reconnaissance du LPS par le TLR4 (Tiré de* [152]*).*

Toutefois, cette expression du CD169 en réponse au LPS pour la mise en place de la tolérance à l'endotoxine reste faible, et ne sera donc pas détectée incorrectement par le test en cas d'infection bactérienne.

Mesurer les biomarqueurs CD64 et CD169 pour le diagnostic des infections avec une nouvelle méthode de cytométrie en flux est un test dont l'utilité et les performances doivent maintenant être démontrées dans le domaine clinique.

2.3. Evaluation des performances cliniques du nouveau test diagnostic

2.3.1. Détermination des valeurs de référence du test

La première étape de validation clinique du test repose sur la détermination de ses valeurs de référence [161]. En effet, des variables mesurées en biologie, comme les expressions de biomarqueurs cellulaires, varient en fonction des individus, dans des limites données chez les individus en bonne santé (intervalles de référence des valeurs « normales » du test) et, l'interprétation des résultats de l'examen biologique dépend de ces intervalles de référence.

En biologie médicale humaine, les intervalles de référence sont le plus souvent déterminés sur des échantillons d'individus caucasiens en bonne santé, et ces valeurs peuvent être différentes pour un autre type de population. Par exemple, il a été montré depuis longtemps que la numération formule sanguine, fréquemment prescrite, a des valeurs de référence différentes entre une population caucasienne d'adultes sains et une population noire africaine ou antillaise [162].

La détermination de l'intervalle de référence d'une variable est une tâche longue, difficile et coûteuse, établie par des experts de la fédération internationale de chimie clinique et de médecine de laboratoire (IFCC-LM) [163]. Elle nécessite entre autres :

- D'exposer clairement les conditions métrologiques dans lesquelles la mesure de référence du test est réalisée, en définissant les facteurs préanalytiques ou biologique pouvant introduire une éventuelle variation dans cette observation ;
- D'établir des critères d'inclusion et d'exclusion précis pour la sélection des individus de référence (supposée en bonne santé, avec âge, sexe, et conditions de vie décrits) et d'en rassembler un nombre suffisant pour constituer une population de référence suffisemment représentative ;
- De collecter les échantillons nécessaires, de les tester, et d'analyser leur distribution de référence, c'est-à-dire leur répartition des valeurs de référence en fonction des individus de référence ;
- De sélectionner un échantillon de référence constitué par un certain nombre d'individus de référence pour déterminer un intervalle de référence, borné en général par deux limites de référence qui comprennent 95 % des valeurs de référence.

Nous avons établi des valeurs de référence préliminaires en évaluant les expressions des biomarqueurs cellulaires CD64 et CD169 sur une population caucasienne de 100 donneurs de sang adultes en bonne santé, issus de l'Etablissement Français du Sang (EFS), donc supposés en bonne santé, ayant donné leur consentement formel (figure 47).

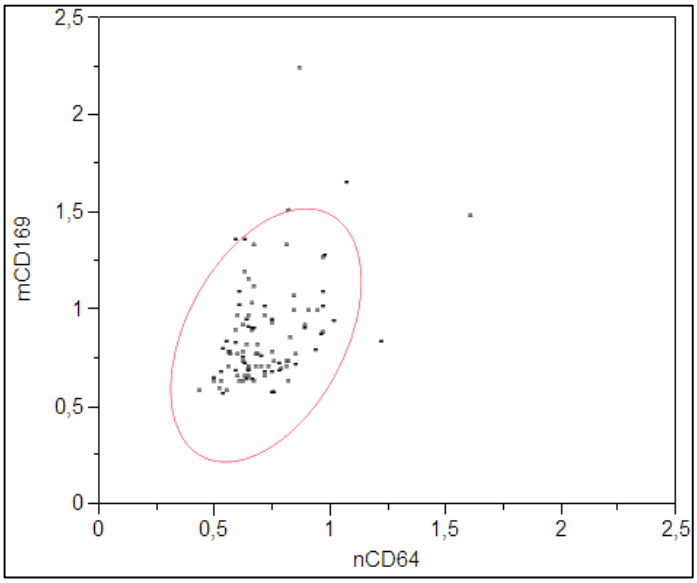


Figure 47 : Valeurs de référence des biomarqueurs nCD64 et mCD169 en cytométrie en flux « au lit du patient ». *Représentation d'une population de référence de 100 donneurs de sang de l'EFS, supposés en bonne santé d'après leurs sérologies négatives pour le VIH, le VHB, le VHC et le CMV. Chaque individu de référence est représenté en fonction des intensités moyennes de fluorescence (MFI) des marqueurs CD64 sur les neutrophiles (nCD64) et CD169 sur les monocytes (mCD169). Ces expressions ont été mesurées grâce à la technique de cytométrie en flux « au lit du patient » mise au point. Le logiciel JUMP permet l'analyse statistique des données, dont la définition de l'ellipse (en rouge) dans laquelle 95% des individus se situent.*

L'étude révèle que la population de référence a une expression moyenne de nCD64 de 0,72 en MFI (± 0,17) et une expression moyenne de mCD169 de 0,87 en MFI (±0,27). En revanche, ces valeurs de référence semblent incorrectes car certains individus de référence sont en dehors de la représentation donnée par 95% des individus de la population de référence.

La plupart des facteurs préanalytiques de la technique sont contrôlés par les optimisations apportées à la procédure : anticorps en format sec, lyse en format unitisé, faible volume de sang, procédure en une étape, et temps court d'incubation puis d'analyse. Cette variation est donc plutôt expliquée par la variabilité biologique des individus : bien qu'étant des donneurs de sang dont l'état de bonne santé a été confirmé par des sérologies multiples, il n'en demeure pas impossible qu'ils expriment des traces résiduelles d'infections antérieures ou à venir.

C'est pourquoi, il a été préférable de déterminer les valeurs et l'intervalle de référence des marqueurs sur un échantillon de référence, et non sur la population entière de référence. Cet échantillon se restreint aux les individus de référence compris à 95% dans l'ellipse (tableau 23).

Tableau 23 : Intervalles de référence des biomarqueurs nCD64 et mCD169. *Moyennes, écart-types, et limites supérieures et inférieures de l'intervalle de référence pris à 95%, des intensités de fluoresence des marqueurs CD64 sur les neutrophiles (nCD64) et CD169 sur les monocytes (mCD169) pour 95 sujets caucasiens en bonne santé, donneurs de sang de l'EFS, évaluées par une procédure « au lit du patient » de cytométrie en flux.*

Biomarqueur	Moyenne	Ecart-type	Limite inférieure à 95%	Limite supérieure à 95%
nCD64	0,70	0,13	0,68	0,73
mCD169	0,83	0,20	0,79	0,87

Ainsi, l'intervalle de référence du marqueur CD64 sur les neutrophiles est [0,68 – 0,73], et celui du marqueur mCD169 est [0,79 – 0,87]. Ces intervalles décrivent leurs fluctuations chez des sujets adultes caucasiens en bonne santé.

La première limite est que ces intervalles de référence, supposés décrire les fluctuations d'une variable chez des sujets en bonne santé, ne décrivent que 95 % des sujets en bonne santé, laissant 2,5 % de valeurs en deçà et au-delà de ces limites. Dans le cas de notre étude, il s'agit même de 95% des individus de l'échantillon de 95% de la population de référence initiale, soit 90,25% de représentation réelle. Cette restriction est la conséquence des conventions internationales qui demandent l'établissement des valeurs de référence sur cette méthode.

La seconde limite de l'étude est que ces intervalles de confiance sont déterminées sur un échantillon d'individus précis avec une méthode de référence dans un certain laboratoire. Selon les recommandations internationales, pour être appliqués dans d'autres situations, les intervalles de référence doivent être déterminés de nouveau par chaque laboratoire avec les méthodes qu'il utilise. Ces procédures n'étant pas à la portée de tous les laboratoires, deux moyens sont alors proposés pour généraliser les résultats:

- Transférer l'intervalle de référence préalablement déterminé de manière correcte, en se fondant sur la comparaison des populations et techniques utilisées ;
- Vérifier l'intervalle de référence préalablement déterminé de manière correcte, par l'analyse des résultats obtenus dans un échantillon d'une vingtaine d'individus de référence seulement.

Enfin, il est important de noter que chacun doit exploiter les intervalles donnés dans les mêmes unités internationales, mais que les valeurs de référence doivent être considérées comme des valeurs de la population et non des valeurs individuelles décrivant la variation biologique d'un individu au cours du temps.

Ainsi, des limites de référence ont été déterminées pour les expressions des biomarqueurs CD64 et CD169 lorsqu'elles sont mesurées avec la technique de cytométrie en flux « au lit du patient ». Elles reflètent les différentes valeurs que peuvent prendre les biomarqueurs chez des sujets en bonne santé. Ces limites de référence sont différentes des limites de décision médicale, c'est-à-dire les seuils à partir desquels une action médicale est recommandée. Les limites de décision médicale doivent être établies par méthode statistique sur des études épidémiologiques.

2.3.2. Détermination des valeurs de décision du test

La validation clinique du test repose sur la détermination de ses limites de décision médicale.

La décision médicale est une action « partagée » entre le professionnel de santé et le patient. Elle est divisée en une étape d'échange d'informations puis une étape de délibération de la décision, où un accord mutuel est trouvé entre plusieurs options médicales possibles [164]. Ce modèle a l'avantage d'être fondé sur le principe du respect de la personne, puisqu'il prend en compte les informations du patient et l'expérience du médecin. Il s'oppose aux modèles paternaliste (le médecin décide seul), informatif (le patient décide seul) ou collectiviste (l'intérêt collectif est privilégié). Il est même diffusé largement sur le plan européen par l'Organisation Mondiale de la Santé [165].

Cependant, les caractéristiques propres de la décision médicale contribuent à sa difficulté, et questionnent la place croissante octroyée aujourd'hui aux nouvelles technologies dans le processus de décision [166].

En effet, en raison de la complexité du processus de certaines décisions médicales, de nombreux outils d'aide à la décision ont été élaborés. Ces aides diagnostiques permettent d'augmenter la confiance des patients dans les soins qu'ils reçoivent, et aussi d'éviter le recours innaproprié à des traitements inutiles.

La détermination des limites de décision médicale d'un test de diagnostic est donc une étape sensible, et d'autant plus pour la détermination des soins et des traitements à dispenser aux patients présentant une infection. Cette détermination passe par l'évaluation des performances diagnostiques des composantes du test entrant dans la décision médicale, en tenant compte des données épidémiologiques de la maladie car réalisée sur un échantillon d'individus infectieux [167].

L'objectif de cette étape de validation clinique est de déterminer les performances diagnostiques des biomarqueurs dans un contexte pathologique complexe qu'est l'environnement des Urgences.

L'hypothèse est que la mesure des expressions des biomarqueurs CD64 et CD169 sur une cohorte de 138 patients d'un service d'Urgences permettra l'évaluation de leurs performances diagnostiques à discriminer les patients présentant une infection bactérienne de ceux présentant une infection virale ou de ceux n'ayant pas d'infection. Cette « décision » sur l'étiologie de l'infection est primordiale pour les soins et les traitements dispensés par la suite aux patients par le personnel médical.

Les résultats font l'objet d'une quatrième publication, dans la revue *Biomarkers in Medicine*, intitulée : « **Evaluation de recherche clinique par cytométrie en flux de biomarqueurs pour la stratification infectieuse en service d'Urgences** » (figure 48).

Research Article

For reprint orders, please contact: reprints@futuremedicine.com

Biomarkers in Medicine

Clinical research assessment by flow cytometry of biomarkers for infectious stratification in an Emergency Department

Pénélope Bourgoin[1,2], Thomas Soliveres[3], Dalia Ahriz[3], Isabelle Arnoux[4], Christian Meisel[5,6], Nadine Unterwalder[6], Pierre-Emmanuel Morange[2,4], Pierre Michelet[3], Fabrice Malergue*[,1] & Thibaut Markarian[3]

[1]Department of Research & Development, Beckman Coulter Life Sciences-Immunotech, 130 Avenue de Lattre de Tassigny, 13009 Marseille, France

[2]C2VN Department, INSERM-INRA, Aix-Marseille University, 27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille, France

[3]Adult Emergency Department, La Timone Hospital, 264 Rue Saint Pierre, 13385 Marseille, France

[4]Hematology Laboratory Department, La Timone Hospital, 264 Rue Saint Pierre, 13385 Marseille, France

[5]Department of Medical Immunology, Charité – University Medicine Berlin, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany

[6]Department of Immunology, Labor Berlin – Charité Vivantes GmbH, Sylter Strasse 2, 13353 Berlin, Germany

*Author for correspondence: fmalergue@beckman.com

Aim: Management of patients with infections within the Emergency Department (ED) is challenging for practitioners, as the identification of infectious causes remains difficult with current techniques. A new combination of two biomarkers was tested with a new rapid flow cytometry technique. **Materials & methods:** Subjects from the ED were tested for their CD64 on neutrophils (nCD64) and CD169 on monocytes (mCD169) levels and results were compared to their clinical records. **Results:** Among 139 patients, 29% had confirmed bacterial infections and 5% viral infections. nCD64 and mCD169 respectively showed 88 and 86% sensitivity and 90 and 100% specificity for identifying subjects in bacterial or viral conditions. **Conclusion:** This point-of-care technique could allow better management of patients in the ED.

First draft submitted: 16 May 2019; Accepted for publication: 7 August 2019; Published online: 16 October 2019

Keywords: bacterial infections • CD169 • CD64 • emergency department • flow cytometry • viral infections

When patients are presenting with a systemic infection, practitioners in an Emergency Department (ED) are always confronted by a routine challenge to take care of them. Indeed, these pathologies could result from a large diversity of existing pathogens, such as bacteria, viruses, fungi and parasites, and even from noninfectious causes. The medical issue behind this challenge, that is discussed in this article, is the complexity of rapidly differentiating, on the basis of clinical judgment alone, the etiology of the disease between bacterial, viral and noninfectious causes, in order to trigger a correct triage and proper treatment of the patients [1].

This is especially important due to the severity of these kinds of pathologies. On the one hand, bacterial infections could evolve into a serious and potentially fatal condition such as septic shock. On the other hand, viral infections have the same acute symptoms but the risk lies in the viral spread if the virus is not specifically identified, and the patient isolated. Also, the misuse or overuse of antibiotics to treat both bacterial and viral acute febrile pathologies still remains one of the most worrying issues. Indeed, in case of empiric prescription (30–60% of situations [2]), doctors could be confronted by either inefficiency or dangerousness of these drugs, and further contribute to the rising public health threat of increasing antimicrobial resistance [3].

The most frequently evaluated host biomarkers are CRP, white blood cell (WBC) count, polymorphonuclear (PMN) leucocyte count and PCT [4–10]. However, even if these bacterial-induced host proteins are routinely used to support diagnosis of infection, their performances are negatively affected by interpatient variability, including time from symptom onset, clinical syndrome and pathogens, which could have an impact on their sensitivity and specificity.

Future Medicine

Therefore, the issue arises of finding a new method of stratification for the triage and treatment of infected patients within the ED. In a recent meta-analysis, Kapasi *et al.* summarized published evidence on the utility of different soluble and cell-based host biomarkers to determine infection etiology, based on differences in recognition pathways and defense mechanisms triggered by bacterial or viral pathogens [11].

Of all cellular markers cited in this publication, CD64 (Fcγ-receptor-I) constitutively expressed on monocytes, but not on neutrophils, is presented as the most relevant, showing a strong correlation between increased expression on neutrophils and acute bacterial infection [12,13].

Moreover, another cell surface marker, CD169 (sialoadhesin or siglec-1), has been described as overexpressed on blood monocytes early during viral infection such as in Epstein–Barr virus (EBV) enteritis and acute HIV infection [14–17].

The study hypothesis was that the combination of CD64 on neutrophils (nCD64) with CD169 on monocytes (mCD169) could be presented as markers with high sensitivities (Se) and specificities (Sp) to differentiate between bacterial and viral causes of systemic infections. In this single-center, observational, retrospective study, the aim was to evaluate their levels of expression and their performances of discrimination in subjects in the clinical settings of the adult ED of a primary University hospital in France, and to compare them to another host biomarker, the CRP. Assessment of these cell-associated markers usually requires a specialized flow cytometry laboratory, limiting their use in routine workup of patients with suspected infections. An improved and innovative flow cytometry method was used to allow their measurements on peripheral blood leucocytes in only 15 min.

Materials & methods

Samples

The study was conducted on 5 days between March and October 2017. The study population included subjects older than 18 years visiting the adult ED of La Timone University Hospital in Marseille, France during this period. This broad criterion was chosen in order to perform an observational and non-interventional retrospective study on a good proportion of subjects with various conditions.

Retrospective data

Subjects' samples were transferred to the Hematology Laboratory (HL) of La Timone Hospital. Samples were processed as part of the standard, routine clinical tests universally performed at the hospital, such as hemogram, biochemical measurements, and, if necessary, microbiological analysis. WBC and PMN counts were assessed using the Sysmex XN system (Kobe, Japan). PCT and CRP were respectively measured using the Dosage ADVIA Centaur® BRAHMS procalcitonin from Siemens (Erlangen, Germany) and the CRP Gen.3 system from COBAS (Roche, Switzerland). For the detection of viruses, blood or cerebrospinal fluids samples were examined with PCR and serum samples were tested for IgG and IgM antibodies using the LIAISON® analyzer from Dia-Sorin (Sallugia, Italy). For the bacterial detection, blood cultures were treated by the Brucker Mass Spectrometry system (Billerica, MA, USA), and urinary antigen tests (for *Pneumococcus* and *Legionella*), PCR (for chlamydia and mycoplasma) and/or cultures of respiratory tract secretions (nasopharyngeal swabs, tracheobronchial aspirate or bronchoalveolar lavage) were also used.

The results of the hematological and biochemical measurements of WBC, PMN, CRP and PCT, and the name of the identified pathogens if isolated, were transferred to a team of ED practitioners, blinded to the study test results. They also retrospectively recorded relevant epidemiological, clinical and paraclinical data for each subject: sex, age, clinical history (evolutionary cancer, liver disease, congestive heart failure, cerebrovascular disease, kidney disease), medical institutionalization, altered mental status, cardiac constants (systolic, diastolic and average blood pressure and pulse rate), body temperature and vital signs and symptoms (duration and kind of symptoms, prior administration of antibiotics).

Based on these electronic medical records, they then classified each subject into one of three groups:

1. Group I: subjects for which infection was ruled out. According to clinical symptoms and laboratory test results, no evidence of infection was found. This group included subjects that presented, for example, with major trauma or fractures;
2. Group II: subjects diagnosed with bacterial infections. Subjects were categorized into this group either on the basis of a positive bacterial culture result, and/or if clinical and laboratory findings such as concomitant high levels of CRP and PCT and negative viral test results strongly suggested the presence of a bacterial infection;

3. Group III: subjects diagnosed as having viral infections. This group contained subjects that presented with typical clinical symptoms of infections, but negative bacteriological results and/or low PCT levels. In some cases, viral agents were found by antigen-based tests or serological assays.

The objective was to compare these groups, according to their medical records and routine laboratory data, to the results of flow cytometric measurement of the cell surface biomarkers.

Flow cytometry assessment

Flow cytometry assessment was performed at and with the consent and agreement of the HL of La Timone Hospital. Biomarker levels were obtained as included in the routine clinical management of subjects, at the discretion of the treating physician.

When a routine workup was finished, leftover EDTA blood tubes were pseudonymized and determination of nCD64 and mCD169 expressions in whole blood was performed according to a newly described one-step staining procedure [18].

Briefly, titrations of anti-CD169-Phycoerythrin (PE; clone 7-239) and anti-CD64-PacificBlue (PBE; clone 22), respectively custom product and product from Beckman Coulter (Beckman Coulter, Inc., CA, USA), were performed in advance in accordance with the protocol explained in the study. Then, the DURA Innovations drying process (Beckman Coulter Inc.) was applied to both antibodies, at their optimal doses, to convert the cocktail into a 'glassified' layer at the bottom of each 5 ml testing tube. Thus, the optimized amount of each of both antibodies for a single test was present in each testing tube without error-prone pipetting of liquid reagents.

When needed, 500 µl of the Versalyse lysing solution (Beckman Coulter Inc.) for the lysis of the red blood cells were added, then 5 µl of EDTA blood were transferred into this tube for simultaneously staining the white blood cells.

Data were collected once on a 3-laser, 10-color Navios flow cytometer (Beckman Coulter Inc.) after only 15 min of incubation. Flow-Set beads (Beckman Coulter Inc.) were used before each analytical run in order to control a potential variability in device performance, but no harmonization between the measured values over the study period was necessary. Analysis was done using Kaluza Analysis Software (Beckman Coulter Inc.). Neutrophils and monocytes were first gated on the basis on their typical forward- and side-scatter characteristics. The expression levels of nCD64 and mCD169 were determined as mean of fluorescence intensities (MFI).

Practitioners at the ED and physicians of the HL were blinded for the results of flow cytometry marker analysis in order to prevent any influence on medical procedures and diagnosis.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics version 20 (IBM SPSS, Inc., IL, USA). Quantitative data were expressed as means ± SD or as median with 25th and 75th percentiles ([25th–75th percentile]). Qualitative variables were expressed as frequency with percentages. Comparison of quantitative variables among the different groups was performed using student t test or Mann–Whitney U-test. Comparison of qualitative variables was performed using Fisher's exact test. Comparisons for more than two groups were performed by Freeman–Halton extension of Fisher's exact test for qualitative variables and by ANOVA or Kruskall–Wallis for quantitative variables.

Receiver operating characteristic (ROC) was used to define the best threshold of biomarker indexes. The diagnostic usefulness of nCD64 and mCD169 levels to discriminate bacterial and viral infections were investigated by means of ROC analysis. This was also applied to CRP. Analysis was based on area under curve (AUC), sensitivity (Se = TP/P), specificity (Sp = TN/N), positive likelihood ratio (LR+ = Se/[100 – Sp]) and negative likelihood ratio (LR- = [1-Se]/Sp), with P, N, TP, TN, respectively corresponding to positives, negatives, true positives and true negatives patients. All values are expressed in ranges between 0 and 100, with 95% CIs. For all tests, a two-sided p-value of <0.05 was considered statistically significant.

Results

Patients

During the 5 days of the study period, samples of 260 patients admitted to the ED of the La Timone hospital were processed at the hospital hematology laboratory. Of these patients, 122 were lost to follow-up and excluded from further analysis because patients deliberately left the hospital before the diagnostic workup was completed and final diagnosis reached.

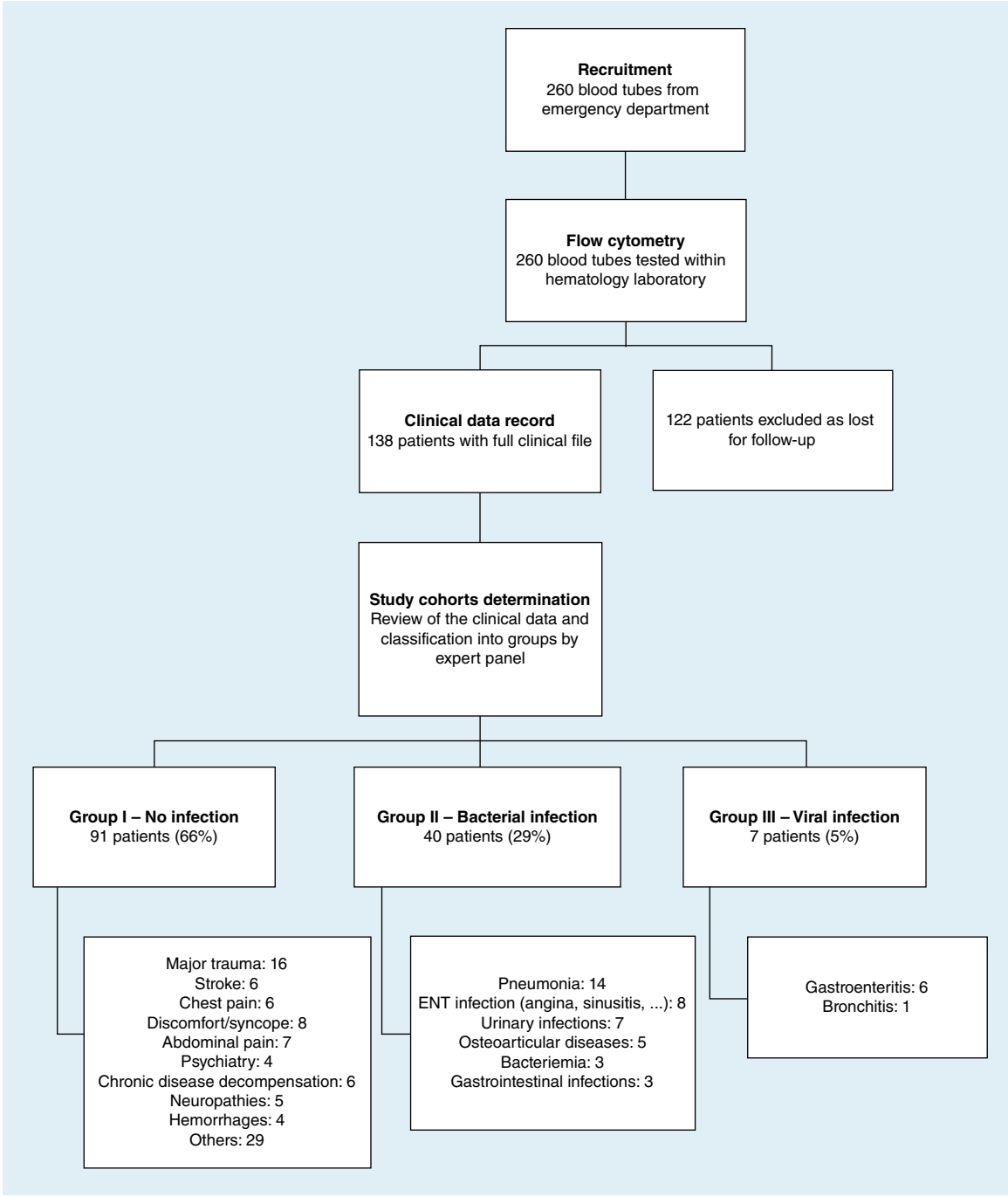


Figure 1. Study workflow: construction of the retrospective study with final numbers and diagnoses for patients who were admitted to the Emergency department.
ENT: Ears, nose and throat.

Of the remaining 138 patients, 40 (29%) patients were classified in Group II (bacterial infection), whereas 7 (5%) cases were classified as viral infection (Group III). The 91 (66%) remaining patients were confirmed as having no infection (Group I). Figure 1 shows an overview of the study workflow. Supplementary Table 1 shows examples of the raw data from representative subjects.

Table 1. Epidemiological data: patients are defined according to their sex, age, clinical history and constants.

Characteristic	Group I – no infection (n = 91)	Group II – bacterial infection (n = 40)	Group III – viral infection (n = 7)	p-value
Patient sex				
Men	36 (40%)	20 (50%)	2 (29%)	0.582
Women	55 (60%)	20 (50%)	5 (71%)	
Patient age				
Years	54 ± 23	66 ± 21	56 ± 30	0.022*
Clinical history				
Medical institutionalization	4 (4%)	11 (28%)	3 (43%)	≤0.01*
Altered mental status	6 (7%)	12 (30%)	2 (29%)	≤0.01*
Evolutionary cancer	12 (13%)	6 (15%)	1 (14%)	0.952
Liver disease	4 (4%)	3 (8%)	0	0.683
Congestive heart failure	8 (9%)	6 (15%)	0	0.637
Cerebrovascular disease	4 (4%)	9 (23%)	2 (29%)	≤0.01*
Kidney disease	7 (8%)	5 (13%)	0	0.754
Constants				
Systolic blood pressure (mmHg)	140 ± 26	132 ± 28	129 ± 24	0.383
Diastolic blood pressure (mmHg)	75 ± 17	72 ± 14	82 ± 17	0.425
Average blood pressure (mmHg)	96 ± 18	92 ± 17	97 ± 18	0.598
Pulse rate (bpm)	82 ± 15	92 ± 18	88 ± 20	0.011*
Body temperature (°C)	37 ± 0.3	37 ± 1	38 ± 1	≤0.01*

*p-value shows a significant difference.
Values are presented as either total numbers, followed by the corresponding percentages in brackets, or mean ± standard deviation. Variables for which p-values were under α = 5% were put in bold to indicate the statistically significant differences between groups.

Epidemiological infectious stratification

The final cohort of 138 patients was balanced with respect to gender, as 80 (58%) were women and 58 (42%) were men (mean age of 57; range 22–87). Patients presented a wide range of clinical symptoms (respiratory, gastrointestinal, gynecological, neurological, urinary, ear, nose and throat [ENT] and cutaneous), body temperature (range 36.6–39.2), and time from symptom onset (mean 3 days). Results of univariate analysis comparing epidemiological, clinical and paraclinical data between control Group I, bacterial-infected Group II and viral-infected Group III are summarized in Table 1.

Statistically significant differences were found between groups for age ($p = 0.022$), medical institutionalization ($p < 0.001$) and altered mental status ($p < 0.001$). Indeed, relative values of these variables were higher in the bacterial group (respectively 66 years, 28% of medical institutionalization and 30% of altered mental status). Also, this group was statistically distinct from Group I and Group III for their higher number of cerebrovascular diseases ($p < 0.001$) and pulse rates ($p = 0.011$).

All groups show statistically significant differences in their body temperatures ($p < 0.001$), duration ($p < 0.001$) and kind ($p < 0.001$) of symptoms, initiated antibiotherapies ($p < 0.001$), CRP ($p < 0.001$), and WBC ($p = 0.040$) and PMN ($p = 0.026$) counts. These parameters are all constitutive of infectious definition and evolve as expected: CRP, WBC and PMN measurements rise for inflammatory bacterial and viral states, whereas PCT rises only for bacterial infections.

The most common clinical presentation associated with bacterial and viral infections were respiratory and gastrointestinal symptoms, respectively. All together, 20 pathogen species were detected (Table 4) and represented those responsible for the majority of acute infections. *Escherichia coli* remained the most represented pathogen.

Table 2. Physiological and symptom data: clinical symptoms and medication recorded for the same patients.

Characteristic	Group I – no infection (n = 91)	Group II – bacterial infection (n = 40)	Group III – viral infection (n = 7)	p-value
Clinical Symptoms				
Duration (days)	1 ± 3	5 ± 12	3 ± 5	≤0.01*
Respiratory	3 (3%)	12 (30%)	2 (29%)	
Gastrointestinal	12 (14%)	6 (15%)	4 (57%)	
Gynecological	2 (2%)	0	0	
Neurological	4 (4%)	1 (3%)	0	≤0.01*
Urinary	3 (3%)	1 (3%)	1 (14%)	
Ear, nose and throat	1 (1%)	3 (7%)	0	
Cutaneous	0	3 (7%)	0	
No infectious symptoms	66 (73%)	14 (35%)	0	
Antibiotherapy				
Initiated	7 (8%)	25 (63%)	2 (29%)	≤0.01*

*p-value shows a significant difference.
Values are presented as either total numbers, followed by the corresponding percentages in brackets, or mean ± standard deviation. Variables for which p-values were under α = 5% were put in bold to indicate the statistically significant differences between groups.

Table 3. Biological data: biological assessments for the cohort.

Characteristic	Group I – no infection (n = 91)	Group II – bacterial infection (n = 40)	Group III – viral infection (n = 7)	p-value
Biological Measurements				
CRP (mg/ml)	7 ± 16	98 ± 89	73 ± 104	≤0.01*
PCT (ng/ml)	0.1 ± 0.1	5.3 ± 16.2	0.84 ± 0.8	0.874
White blood cells (G/l)	10 ± 4	12 ± 6	11 ± 6	0.040*
Polymorphonuclear cells (G/l)	9 ± 5	11 ± 6	17 ± 1	0.026*

*p-value shows a significant difference.
Values are presented as either total numbers, followed by the corresponding percentages in brackets, or mean ± standard deviation. Variables for which p-values were under α = 5% were put in bold to indicate the statistically significant differences between groups.

Table 4. Pathogens identified in the cohort study.

Pathogen identified	Number isolated (n = 20)
Escherichia coli	5 (25%)
Klebsiella pneumoniae	3 (15%)
Staphylococcus aureus	2 (10%)
Proteus mirabilis	1 (5%)
Enterococcus faecalis	1 (5%)
Coxiella burnetii	1 (5%)
Staphylococcus hominis	1 (5%)
Staphylococcus haemolyticus	1 (5%)
Bacteroides fragilis	1 (5%)
Pseudomonas stutzeri	1 (5%)
Klebsiella oxytoca	1 (5%)
Hepatitis C Virus	1 (5%)
Parainfluenzae	1 (5%)

Numbers of bacteria and viruses isolated and/or detected in blood culture, urinary culture or serological measurements.

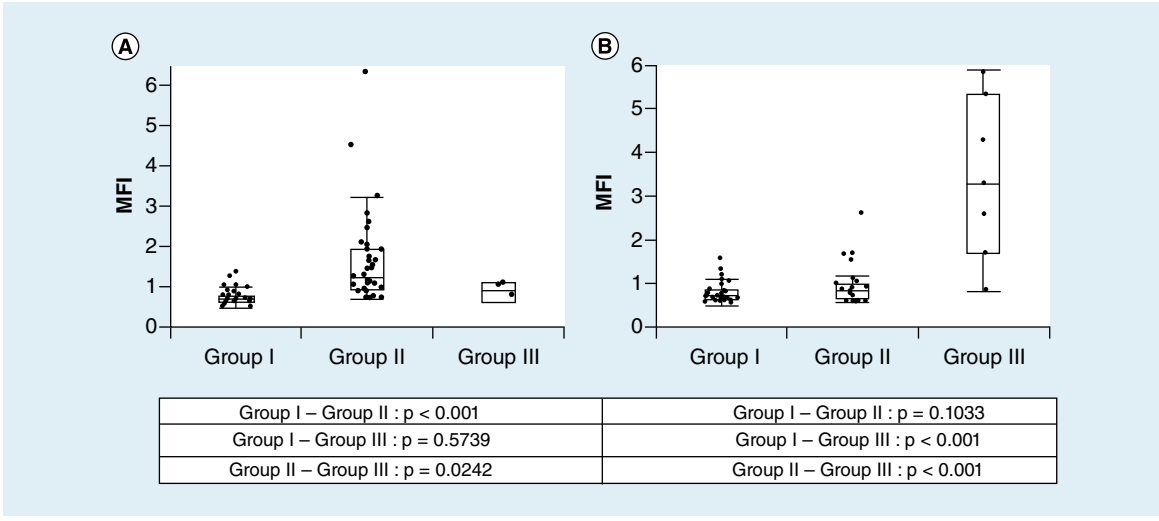


Figure 2. nCD64 and mCD169 levels for the three groups of patients. (A) CD64 expression on neutrophils for Group I (no infection), Group II (bacterial infections) and Group III (viral infections). **(B)** CD169 expression on monocytes for the same three groups. Data are presented as mean and standard errors. The p-values are calculated between each group using student t test and reveal significant increase of biomarkers if $p \leq 0.05$.
MFI: Mean of fluorescence intensities.

CD64 & CD169 levels

Figure 2A and B, respectively show nCD64 and mCD169 values for Group I, Group II and Group III.

Patients in bacterial Group II had significantly higher CD64 levels on neutrophils than patients in control Group I ($p < 0.001$) or viral Group III ($p = 0.0242$), whereas patients in Group I and Group III presented no significant differences in nCD64 expression (p : 0,5739). Conversely, patients in viral Group III showed a significant increase in CD169 levels on monocytes compared with patients in control Group I ($p < 0.001$) and in bacterial Group II ($p < 0.001$). Patients in Group I and Group II had no significant differences of mCD169 expression ($p = 0.1033$).

CD64 & CD169 ROC analysis

The optimal thresholds of each marker, for discrimination between bacterial and viral infections, have been independently assessed by ROC analysis, and their specificity and sensitivity were expressed with the respective 95% CIs. Figure 3 presents the ROC curves of nCD64 for discrimination of patients with bacterial infections (3A), and of mCD169 for discrimination of patients with viral infections (3B), from patients of all other groups.

Using a cut-off point of ≥0.87 for the Group II patients, the nCD64 MFI has a sensitivity of 87.5% (73.2–95.8), a specificity of 90.1% (82.1–95.4), a positive likelihood ratio of 8.85 (4.7–16.6) and a negative likelihood ratio of 0.14 (0.06–0.3). The AUC is 0.93 (0.87–0.97). However, for this marker of bacterial infections, sensitivity has to be maximal to ensure the highest proportion of positive patients in order not to miss any infectious cases. For another cut-off point of ≥0.66 for the Group II patients, the nCD64 MFI has a sensitivity of 100% (91.2–100), a specificity of 48.35% (37.7–59.1), a LR+ of 1.94 (1.6–2.4) and a LR- of 0. This second cut-off point seems more optimal for bacterial detection, but the lack of specificity may trigger treatment with antibiotics in some patients suspected of having a bacterial infection although not having one.

Using a cut-off point of ≥1.58 for the Group III patients, the mCD169 MFI has a sensitivity of 85.71% (42.1–99.6), a specificity of 100% (96–100), a LR+ of 0 and a LR- of 0.14 (0.02–0.9) to detect viral infections. The AUC is 0.97 (0.91–0.99). For this marker of viral infections, specificity has to be maximal to ensure the viral etiology of the viral case, so this cut-off is optimal.

Finally, nCD64 and mCD169 levels were assessed together for their performances to discriminate between bacterial and viral infections. When using an optimal cut-off point of ≥0.66 for the nCD64 MFI and an optimal cut-off point of ≥1.6 for the mCD169 MFI, the combination has a sensitivity of 92.5% (80.14–97.42), a specificity of 48.35% (38.36–58.48), a positive likelihood ratio of 1.79 (1.71–1.88) and a negative likelihood ratio of 0.15 (0.08–0.31).

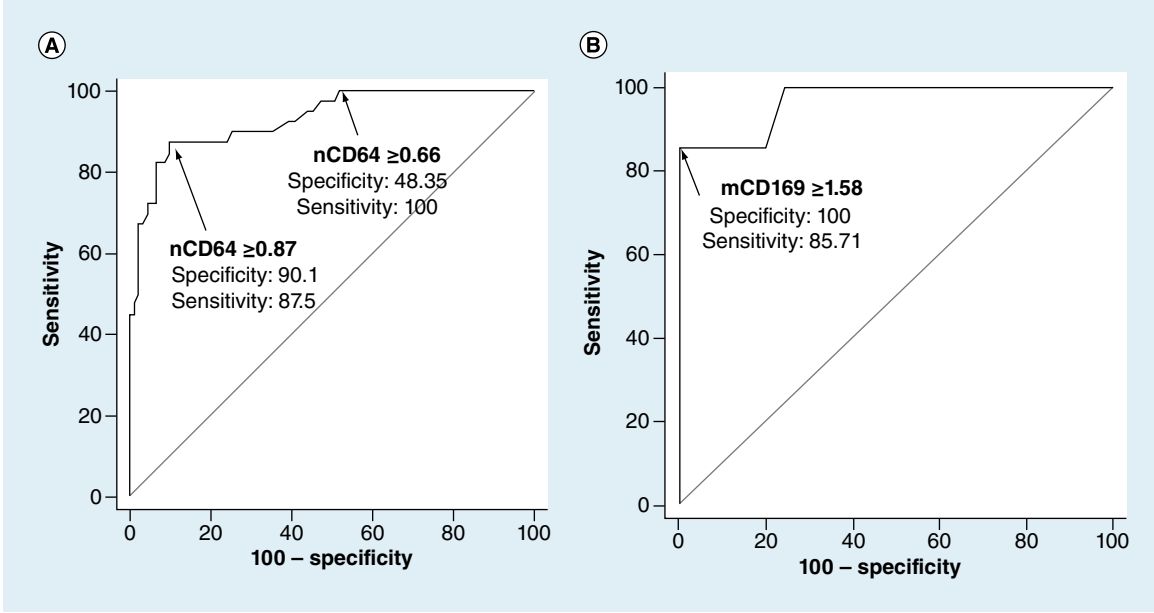


Figure 3. Receiver operating characteristic curves for nCD64 and mCD169. (A) nCD64 receiver operating characteristic curve: discrimination between presence of bacterial infection and absence of bacterial infection (no infection or viral infection). **(B)** mCD169 receiver operating characteristic curve: discrimination between presence of viral infection and absence of viral infection (no infection or bacterial infection).

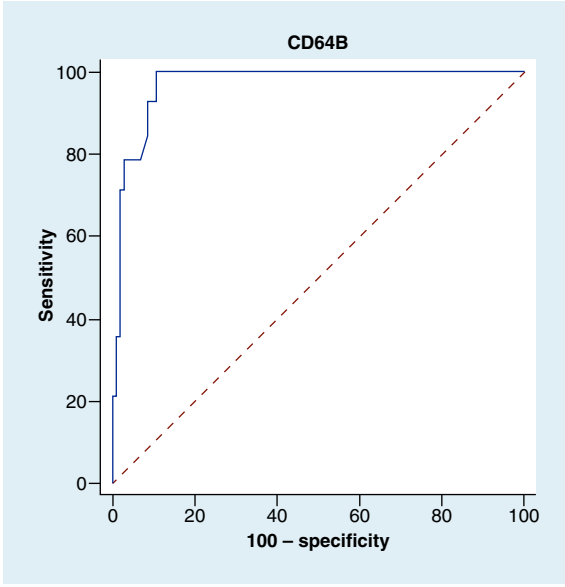


Figure 4. Receiver operating characteristic curve for nCD64 on restricted bacterial group. nCD64 receiver operating characteristic curve: discrimination between presence of confirmed bacterial infection (only subjects with isolated bacteria) and absence of bacterial infection (no infection or viral infection).

CD64 ROC analysis when restricted to infectious-confirmed patients

The Group II patients (n = 91) were subjects diagnosed with bacterial infections either on the basis of a positive bacterial culture result (n = 18; 20%), and/or if clinical and laboratory findings such as concomitant high levels of CRP and PCT and negative viral test results strongly suggested the presence of a bacterial infection (n = 73; 80%).

The ROC performances of nCD64 were evaluated in its capacity to discriminate patients with confirmed-bacterial infection only (Group II restricted to the 18 subjects for which a positive bacterial culture result was found) from patients in all other groups (Figure 4).

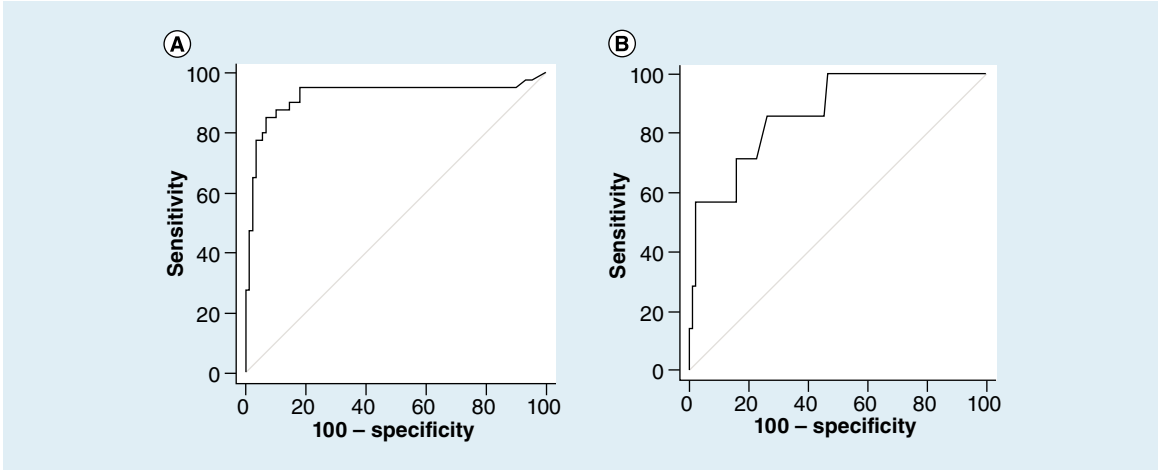


Figure 5. Receiver operating characteristic curves for CRP. (A) CRP receiver operating characteristic curve for bacterial infections: discrimination between presence of bacterial infection and absence of bacterial infection (no infection or viral infection). **(B)** CRP receiver operating characteristic curve for viral infections: discrimination between presence of viral infection and absence of viral infection (no infection or bacterial infection).

Using a cut-off point of ≥0.92 for these restricted Group II patients, the nCD64 MFI has a sensitivity of 100% (76.8–100), a specificity of 89.4% (81.9–94.6), a LR+ of 9.45 (5.4–16.5) and a LR- of 0. The AUC is 0.97 (0.92–0.99).

CRP ROC analysis

In comparison with both previous cellular biomarkers, Figure 5 presents the ROC curves of CRP for discrimination of patients with bacterial (5A) or viral (5B) infections from the other groups.

For Group II (bacterial) patients, the optimal cut-off for CRP is of ≥19.3, with sensitivity of 93.18% (85.7–97.5), specificity of 85% (70.2–94.3), LR+ of 12.47 (5.7–27.3) and LR- of 0.16 (0.08–0.3). The AUC is 0.92 (0.86–0.96). For Group III (viral) patients, the optimal cut-off is of ≥5.3, with sensitivity of 85.71% (42.1–99.6), specificity of 73.86% (63.4–82.7), LR+ of 3.28 (2.1–5.2) and LR- of 0.19 (0.03–1.2). The AUC is 0.87 (0.78–0.93).

Discussion & conclusion

This observational, retrospective, single-center study reports a new rapid method to distinguish the infectious etiology of acute febrile illness according to the levels of two cell surface biomarkers CD64 on neutrophils and CD169 on monocytes. To our knowledge, this is the first time these two biomarkers have been assessed in combination for differential diagnosis of bacterial and viral infections in an ED setting using a whole blood, flow cytometry assay that provides results in less than 15 min.

This study was of high importance, on the one hand, for its focus on providing good patient care in the ED, with appropriate triage of potentially infectious persons, and on the other hand, and mainly, for its focus on fighting against the rise of antimicrobial resistance due to overtreatment with antibiotics. Indeed, in case of infections, patients presenting in the ED often show obvious fever, but their other symptoms, such as cold, cough, and other urinary, abdominal, neurological or respiratory complications, cannot clearly delineate bacterial from viral infections. Even more, their clinical history and physical examinations are often not sufficient, and these issues become a routine challenge for practitioners who need to take them into account, as consequences of a bad diagnosis and therapy have been revealed as crucial for patients [19].

For years, in addition of clinical history and physical examination, bacterial culture, antigen-based immunoassay methods and other multiplexing molecular diagnostic assays have become the traditional and most specific tests for addressing the need of infectious stratification. However, they are strongly limited by their long time to results, their cost, which grows proportionally to the number of targets included, their access to the infectious site, and the extreme diversity and variability of the microbiological universe [20,21].

Conversely, the assessment of host biomarkers has proven to be helpful, as measurement of their levels can easily and objectively indicate potential disease activity [22,23]. The assessment of two new host cell surface biomarkers for stratification of potentially infected patients in the ED is therefore a considerable opportunity for improving sensitivity and specificity, and time-to-result, when compared with current methods. Even more, a sensitive bacterial biomarker combined with a specific viral marker could offer practitioners the ability to detect bacteria-positive cases and to differentiate viral-positive cases from negative ones.

First, the results that were achieved for the CD64 biomarker were close to those found in the literature [24–27], as its ROC curve determined an optimal nCD64 MFI threshold of ≥0.87 with a sensitivity at 88% and a specificity at 90% for discriminating bacterial from nonbacterial infections. Even more, when assessed only on patients with positive bacterial culture results and not upon diagnosis, nCD64 MFI at a threshold of ≥0.91 offers 100% sensitivity and 89% specificity in discriminating bacterial infections. These results were respectively equivalent or better to those found for the CRP, either in the literature [28] or in this study, as the optimal cut-off was of ≥19.3 with associated sensitivity of 93% and specificity of 85%. These values are also equivalent than those reported for PCT [29]. However, CD64 on neutrophils does not present some of the disadvantages of PCT and CRP. For instance, CD64 on neutrophils is not expressed in patients with inflammatory states of noninfectious origin in contrast to CRP [30]. Moreover, nCD64 has been reported to be a useful marker of localized bacterial infections, whereas PCT is mainly increased during systemic or severe invasive infections [31,32]. Finally, a large body of evidence indicates that nCD64 is a sensitive marker of early onset neonatal sepsis [33,34].

However, for stratification of bacterial infections, it is imperative to not miss any diagnosis, as doing so, without antibiotic treatment or management, increases the risk of an adverse outcome (for instance, septic shock) [35]. Minimizing the number of false negative cases is therefore necessary, even if it increases the number of false positive cases; it is therefore important to have a maximum detection sensitivity. One of the first limitations of the results concerns the sensitivity found for the nCD64, which was not as elevated as expected by the ED for a bacterial discriminator. A possibility was to decrease its cut-off to ≥0.66 to achieve a sensitivity of 100%, better than CRP, but with the limitation that it decreases specificity to 48.35%. Another possibility would be to increase the number of tested bacterial patients only with positive bacterial culture results, as it seems that better patient selection in this group improves the nCD64 performance to the desired sensitivity of 100%, while maintaining good specificity of 89%. Despite these results, CD64 remains among the most powerful biomarkers for bacterial stratification, compared, for instance, to other host biomarkers such as CD35 and CD55, for which lower sensitivity of 81% and specificity of 77% was reported [36].

This is the first time that CD169 on monocytes has been evaluated in combination with another biomarker for the discrimination between viral and nonviral infections in humans. To date, CD169 had only been described on CD169-expressing splenic macrophages that have been shown to efficiently capture blood-borne pathogens and to play an important role in bridging innate and adaptive immune responses during viral infections. In HIV though, binding of sialic acid containing glycolipids to CD169 on myeloid dendritic cells has also been shown to facilitate viral transmission to $CD4^+$ T-helper cells [37]. CD169 on myeloid cells such as monocytes and dendritic cells has been mainly investigated in viral pathologies in the context of pathogen recognition, in particular for HIV [38,39]. To our knowledge, assessment of monocytic CD169 for detection of viral infections and viral load has been performed only in HIV or EBV-infected humans and animal models of HIV infection [15–17]. Unpublished observations have confirmed high levels of monocytic CD169 in HIV-infected subjects with elevated viral loads, but also indicated this increase in patients with other acute viral infections, including cytomegalovirus, adenovirus and influenza virus.

Promising preliminary results have been found in this study for its use in discriminating viral from nonviral infections, as an optimal mCD169 MFI threshold of ≥1.6 showed sensitivity of 86% and specificity of 100%, better, for instance, than those found for the CRP, for which the optimal cut-off is of ≥5.3, with equivalent sensitivity of 86% but specificity of 74%. This marker seems to be well adapted to stratification of viral infections. Indeed, if a viral diagnosis is established, patients are either isolated in the hospital or sent home because more care or treatment cannot be provided. As a result, the marker must ensure no false positive cases, because in both cases referred below, medical care is particular and therefore requires a specific diagnosis. The 100% specificity of the mCD169, compared with the 74% of the CRP, is thus an improvement in the care of patients in the ED.

This study is promising but has several limitations. First, the study population was small. In particular, only a few patients with viral infections were included when the diagnostic performance of CD169 on monocytes was evaluated. However, the main goal was to evaluate the analytical performance of the new flow cytometry procedure

in a proof-of-concept study in an ED setting. Second, the overall number of patients with proven bacterial or viral infections was low due to a limited microbiological workup of ED patients and the known low pathogen discovery rate in clinical samples. Hence, intensified microbiological investigations to verify the infectious cause of acute febrile illness in a larger patient cohort will be required to assess the diagnostic performance of the combination in future studies. Furthermore, it is currently unknown whether induction of nCD64 and mCD169 is equally responsive to any type of bacterial and viral infection, respectively. In addition, the influence of comorbidities and medication on the course of nCD64 and mCD169 expression levels during acute bacterial and viral infections needs to be thoroughly determined in order to properly interpret test results. For example, high levels of monocytic CD169 have been reported in patients with type I interferonopathies such as systemic lupus erythematosus and Sjogren syndrome during active disease [40,41] potentially leading to false positive results when tested for suspected viral infections.

Finally, to these previous limitations, it could be added that this retrospective study required an analysis of clinical records retrospectively to the patient medical management. As a result, the data collection was sometimes limited, and hypothesis has been made that some patients put in the same group could present pathologies with notions of gravity and/or severity that could have been different. This may have introduced a bias in patient group formation as seen in other studies [42], instead of patients being selected in a prospective, randomized, multicentric way.

Few viral-infected patients were included, and so, combined with the nCD64, both markers discriminated patients with bacterial infections from patients who had viral infections with good sensitivity (92.5%) but at the expense of specificity (48.35%). These results must be supplemented with records from other virus-infected patients, but remain encouraging because biomarkers have a high negative predictive value to rule out any infection.

Moreover, simultaneous measurement of markers for bacterial and viral infections in one assay may significantly improve and expedite patient stratification and treatment decisions [43]. Although the diagnostic potential of the assay clearly needs further investigation in comparison to current standards, integration of this assay into a point-of-care system appears possible [18]. With minimal training requirements, this application would help enable doctors to identify patients with infections in just 15 min, on a procedure using reagents that are stable at room temperature, unitized and ready for use on only one drop of whole blood. The application would optimize the triage of patients with infectious symptoms in EDs, enable better management and faster treatment, and hence may also reduce misuse of antibiotics.

In summary, the results of this retrospective study warrant further exploration of this new and interesting combination of two biomarkers for the stratification of patients with infectious symptoms in an ED. The evaluation of nCD64 and mCD169 expression by flow cytometry currently discriminates between patients with bacterial infection and those with viral infection, with good values of sensitivity and specificity. Their integration in a point-of-care application that produces results in 15 min could ensure effective, timely triage of ED patients and improve their medical management when compared with existing methods.

Summary points

- The detection and characterization of infectious events are the major challenges for emergency medicine.
- Rapidly attributing a bacterial or viral or noninfectious origin to a febrile and/or inflammatory syndrome makes it possible to treat and refer the patient quickly.
- A new rapid diagnostic guidance solution is proposed, assessing simultaneously two biomarkers: CD64 on neutrophils (nCD64) and CD169 on monocytes (mCD169).
- Their expressions are measured within 15 min by a point-of-care procedure of flow cytometry.
- nCD64 and mCD169 levels are measured within a retrospective cohort of 139 patients in the Emergency department of La Timone Hospital, including 29% bacterial infections and 5% viral infections.
- nCD64 and mCD169, respectively, show 88 and 86% sensitivity and 90 and 100% specificity for identifying subjects in bacterial or viral conditions.
- nCD64 performances are equivalent or even better than CRP assay for which sensitivity of 93% and specificity of 85% were obtained.
- Restricting evaluation of bacterial subjects to culture confirmed cases only, nCD64 achieves even better sensitivity of 100% and specificity of 89%.
- These encouraging preliminary results should be confirmed and extended through prospective and larger studies, encompassing as many infectious diseases as possible.

Supplementary data

To view the supplementary data that accompany this paper please visit the journal website at: www.futuremedicine.com/doi/suppl/10.2217/bmm-2019-0142

Author contributions

C Meisel, N Unterwalder, PE Morange, I Arnoux, T Markarian and P Michelet contributed substantially to the conception and interpretation of the study. P Bourgoin and F Malergue contributed substantially to the acquisition and analysis of flow cytometry data, while T Soliveres and D Ahriz contributed substantially to the retrieval of clinical data and interpretation. Each has participated in drafting the work or revising it. Each has provided final approval of the version to be published, and has agreed to be accountable for all aspects of the work.

Acknowledgments

The authors would like to thank the technician team from the Timone University Hospital Hematology Laboratory for their assistance in blood testing.

Financial & competing interests disclosure

F Malergue and P Bourgoin are Beckman Coulter employees. P Bourgoin is recipient of a CIFRE PhD grant from the ANRT (National Agency for Research and Technology). They provided critical advice on setup of the assay and instruments and in manuscript preparation.

This study was partially supported by Beckman Coulter through donations of laboratory supplies and participation of the two employees mentioned. This private company had no role in the study design, or collection and interpretation of the clinical data. Beckman Coulter and the Beckman Coulter product and service marks mentioned herein are trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the USA and other countries. All other trademarks are the property of their respective owners. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Ethical conduct of research

The authors state that they have followed the principles outlined in the Declaration of Helsinki for all human experimental investigations. Routine care of the subjects was not modified; analyses were performed on anonymized blood left over, and all data collected in the study were part of routine clinical practice and retrieved from subject records. Results of the study had no influence on subjects' management.

Data sharing statement

The authors certify that this manuscript reports original clinical research data. Individual data that underlie the results reported in this article are available from the corresponding author following publication, including the study report and study protocol. Additional data are available upon reasonable request.

References

Papers of special note have been highlighted as: • of interest

1. Liang SY, Theodoro DL, Schuur JD, Marschall J. Infection prevention in the emergency department. *Ann. Emerg. Med.* 64(3), 299–313 (2014).
2. Ventola CL. The antibiotic resistance crisis. *Pharm. Ther.* 40(4), 277–283 (2015).
- **Gives an overview of the antibiotic resistance issue, with a global understanding on its causes and future threats at a worldwide level.**
3. Bartlett JG, Gilbert DN, Spellberg B. Seven ways to preserve the miracle of antibiotics. *Clin. Infect. Dis.* 56(10), 1445–1450 (2013).
4. Chalupa P, Beran O, Herwald H, Kaspříková N, Holub M. Evaluation of potential biomarkers for the discrimination of bacterial and viral infections. *Infection* 39(5), 411–417 (2011).
5. Cuquemelle E, Soulis F, Villers D *et al.* Can procalcitonin help identify associated bacterial infection in patients with severe influenza pneumonia? A multicentre study. *Intensive Care Med.* 37(5), 796–800 (2011).
6. Pfister R, Kochanek M, Leygeber T *et al.* Procalcitonin for diagnosis of bacterial pneumonia in critically ill patients during 2009 H1N1 influenza pandemic: a prospective cohort study, systematic review and individual patient data meta-analysis. *Crit. Care* 18(2), R44 (2014).
7. Nuutila J, Jalava-Karvinen P, Hohenthal U *et al.* A rapid flow cytometric method for distinguishing between febrile bacterial and viral infections. *J. Microbiol. Methods* 92(1), 64–72 (2013).

8. Haran JP, Beaudoin FL, Suner S, Lu S. C-reactive protein as predictor of bacterial infection among patients with an influenza-like illness. *Am. J. Emerg. Med.* 31(1), 137–144 (2013).
9. Sklavou R, Karavanaki K, Critselis E *et al.* Variation of serum C-reactive protein (CRP) over time in pediatric cancer patients with febrile illness and its relevance to identified pathogen. *Clin. Biochem.* 45(15), 1178–1182 (2012).
10. Weh J, Antoni C, Weiß C, Findeisen P, Ebert M, Böcker U. Discriminatory potential of C-reactive protein, cytokines, and fecal markers in infectious gastroenteritis in adults. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 77(1), 79–84 (2013).
11. Kapasi AJ, Dittrich S, González IJ, Rodwell TC. Host biomarkers for distinguishing bacterial from non-bacterial causes of acute febrile illness: a comprehensive review. *PLoS ONE* 11(8), e0160278 (2016).

- **This comprehensive review summarizes the diagnostic performances of host biomarkers capable of differentiating bacterial from nonbacterial infections to guide use of antibiotics.**

12. Icardi M, Erickson Y, Kilborn S, Stewart B, Grief B, Scharnweber G. CD64 index provides simple and predictive testing for detection and monitoring of sepsis and bacterial infection in hospital patients. *J. Clin. Microbiol.* 47(12), 3914–3919 (2009).
13. Hoffmann JJML. Neutrophil CD64: a diagnostic marker for infection and sepsis. *Clin. Chem. Lab. Med.* 47(8), 903–916 (2009).
14. van der Kuyl AC, van den Burg R, Zorgdrager F, Groot F, Berkhout B, Cornelissen M. Sialoadhesin (CD169) expression in $CD14^+$ cells is upregulated early after HIV-1 infection and increases during disease progression. *PLoS ONE* 2(2), e257 (2007).
15. Kim W-K, McGary CM, Holder GE *et al.* Increased expression of CD169 on blood monocytes and its regulation by virus and CD8 T cells in Macaque Models of HIV infection and AIDS. *AIDS Res. Hum. Retrov.* 31(7), 696–706 (2015).

- **This study precisely demonstrates that CD169 could be a biomarker of HIV infection, in macaques.**

16. Rempel H, Calosing C, Sun B, Pulliam L. Sialoadhesin expressed on IFN-induced monocytes binds HIV-1 and enhances infectivity. *PLoS ONE* 3(4), e1967 (2008).
17. Ashokkumar C, Gabriellan A, Ningappa M, Mazariegos G, Sun Q, Sindhi R. Increased monocyte expression of sialoadhesin during acute cellular rejection and other enteritides after intestine transplantation in children. *Transplantation* 93(5), 561–564 (2012).

- **Indicates that CD169 could be a biomarker of HIV and EBV infections, in humans.**

18. Bourgoin P, Hayman J, Rimmelé T, Venet F, Malergue F, Monneret G. A novel one-step extracellular staining for flow cytometry: proof-of-concept on sepsis-related biomarkers. *J. Immunol. Methods* 470, 59–63 (2019).

- **This proof-of-concept study introduces the new one-step procedure for flow cytometry, feasible at the point-of-care and giving results in less than 15 min.**

19. Ray P, Birolleau S, Lefort Y *et al.* Acute respiratory failure in the elderly: etiology, emergency diagnosis and prognosis. *Crit. Care* 10(3), R82 (2006).
20. Laxminarayan R, Duse A, Wattal C *et al.* Antibiotic resistance – the need for global solutions. *Lancet Infect. Dis.* 13(12), 1057–1098 (2013).
21. Parrott G, Kinjo T, Nabeya D *et al.* Evaluation of Anyplex™ II RV16 and RB5 real-time RT-PCR compared to Seeplex® RV15 OneStep ACE and PneumoBacter ACE for the simultaneous detection of upper respiratory pathogens. *J. Infect. Chemother.* 23(12), 859–861 (2017).
22. Oved K, Cohen A, Boico O *et al.* A novel host-proteome signature for distinguishing between acute bacterial and viral infections. *PLoS ONE* 10(3), e0120012 (2015).
23. Srugo I, Klein A, Stein M *et al.* Validation of a novel assay to distinguish bacterial and viral infections. *Pediatrics* 140(4), e20163453 (2017).
24. Li S, Huang X, Chen Z *et al.* Neutrophil CD64 expression as a biomarker in the early diagnosis of bacterial infection: a meta-analysis. *Int. J. Infect. Dis.* 17(1), e12–e23 (2013).

- **This meta-analysis reveals that nCD64 is a promising biomarker for diagnosing bacterial infections.**

25. Gibot S, Béné MC, Noel R *et al.* Combination biomarkers to diagnose sepsis in the critically Ill patient. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 186(1), 65–71 (2012).
26. Mokuda S, Doi O, Takasugi K. Simultaneous quantitative analysis of the expression of CD64 and CD35 on neutrophils as markers to differentiate between bacterial and viral infections in patients with rheumatoid arthritis. *Mod. Rheumatol.* 22(5), 750–757 (2012).
27. Cid J, Aguinaco R, Sánchez R, García-Pardo G, Llorente A. Neutrophil CD64 expression as marker of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis. *J. Infect.* 60(5), 313–319 (2010).
28. Xiong SD, Pu LF, Wang HP *et al.* Neutrophil CD64 Index as a superior biomarker for early diagnosis of infection in febrile patients in the hematology department. *Clin. Chem. Lab. Med.* 55(1), 82–90 (2017).

- **Demonstrates the clinical performances of the neutrophil CD64 index for early identification of infections in febrile patients, in comparison or in combination to other reference biomarkers.**

29. Xu N, Chen J, Chang X *et al.* nCD64 index as a prognostic biomarker for mortality in acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Ann. Saudi Med.* 36(1), 37–41 (2016).

30. Markic J, Jeroncic A, Polancec D *et al.* CD15s is a potential biomarker of serious bacterial infection in infants admitted to hospital. *Eur. J. Pediatr.* 172(10), 1363–1369 (2013).

31. Meisner M. Update on procalcitonin measurements. *Ann. Lab. Med.* 34(4), 263–273 (2014).

32. Gilbert DN. Role of procalcitonin in the management of infected patients in the intensive care unit. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 31(3), 435–453 (2017).

33. Tang Z, Qin D, Tao M *et al.* Examining the utility of the CD64 index compared with other conventional indices for early diagnosis of neonatal infection. *Sci. Rep.* 8(1), 9994 (2018).

34. Ng PC, Li G, Chui KM *et al.* Neutrophil CD64 is a sensitive diagnostic marker for early-onset neonatal infection. *Pediatr. Res.* 56(5), 796–803 (2004).

35. Vijayan AL, Vanimaya, Ravindran S *et al.* Procalcitonin: a promising diagnostic marker for sepsis and antibiotic therapy. *J. Intensive Care* 5(1), 1–7 (2017).

36. Nuutila J, Jalava-Karvinen P, Hohenthal U *et al.* Use of complement regulators, CD35, CD46, CD55, and CD59, on leukocytes as markers for diagnosis of viral and bacterial infections. *Hum. Immunol.* 74(5), 522–530 (2013).

37. Pino M, Erkizia I, Benet S *et al.* HIV-1 immune activation induces Siglec-1 expression and enhances viral trans-infection in blood and tissue myeloid cells. *Retrovirology* 12(1), 37 (2015).

38. Zou Z, Chastain A, Moir S *et al.* Siglecs facilitate HIV-1 infection of macrophages through adhesion with viral sialic acids. *PLoS ONE* 6(9), e24559 (2011).

39. Izquierdo-Useros N, Lorizate M, Puertas MC *et al.* Siglec-1 is a novel dendritic cell receptor that mediates HIV-1 trans-infection through recognition of viral membrane gangliosides. *PLoS Biol.* 10(12), e1001448 (2012).

40. Rose T, Grützkau A, Hirseland H *et al.* IFNα and its response proteins, IP-10 and SIGLEC-1, are biomarkers of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* 72(10), 1639–1645 (2013).

41. Lisney AR, Szelinski F, Reiter K, Burmester GR, Rose T, Dörner T. High maternal expression of SIGLEC1 on monocytes as a surrogate marker of a type I interferon signature is a risk factor for the development of autoimmune congenital heart block. *Ann. Rheum. Dis.* 76(8), 1476–1480 (2017).

42. van Houten CB, de Groot JAH, Klein A *et al.* A host-protein based assay to differentiate between bacterial and viral infections in preschool children (OPPORTUNITY): a double-blind, multicentre, validation study. *Lancet Infect. Dis.* 17(4), 431–440 (2017).

43. Dittrich S, Tadesse BT, Moussy F *et al.* Target product profile for a diagnostic assay to differentiate between bacterial and non-bacterial infections and reduce antimicrobial overuse in resource-limited settings: an expert consensus. *PLoS ONE* 11(8), e0161721 (2016).

- **This expert consensus defines a target product profile with associated requirements for a bacterial versus nonbacterial assay to guide future products' developments.**

Figure 48 : Evaluation de recherche clinique par cytométrie en flux de biomarqueurs pour la stratification infectieuse en service d'Urgences. *Publication acceptée dans la revue Biomarkers in Medicine, portant sur les travaux d'évaluation clinique des biomarqueurs CD64 et CD169 par une technique de cytométrie en flux « au lit du patient »* [168].

Ces travaux constituent la première évaluation des performances diagnostiques du test sur une cohorte clinique potentiellement infectieuse, avec la détermination des limites de décision médicale des biomarqueurs au-delà desquelles la prise en charge du patient va être revue.

Les individus sélectionnés dans l'étude sont des patients adultes qui se sont présentés au service des Urgences adultes de l'Hôpital de la Timone sur 5 jours entre Mars et Octobre 2017. Ce critère de sélection, incluant mais non-restreint aux pathologies infectieuses, a permis de mesurer les expressions des biomarqueurs dans un cadre large de pathologies. Le premier résultat important est que l'évaluation a donc pu être conduite sur 138 patients, dont les données épidémiologiques ont été précisément caractérisées. Particulièrement, les tableaux cliniques des patients et leurs résultats de tests biologiques pour l'isolation de pathogènes, ont permis de les distinguer en 3 groupes : 40 sujets étaient infectés par une bactérie, 7 sujets étaient infectés par un virus, et 91 sujets étaient non-infectés. Il est important de noter toutefois que, comme l'étude a été réalisée de manière rétrospective, il n'était pas possible d'intervenir sur les tests d'isolation demandés, et que peu ont été réalisés systématiquement. Ainsi, peu de micro-organismes ont été finalement isolés (n=20 ; 43% des sujets infectés), et la distinction des 3 sous-groupes de la cohorte a finalement été faite majoritairement sur les tableaux cliniques bien décrits des patients.

Les expressions des biomarqueurs ont été mesurées dans ces 3 échantillons de la population.

Le premier résultat important de cette partie est que l'expression du CD64 sur les neutrophiles est significativement augmentée chez les patients infectés par une bactérie, et que lorsque cette expression est supérieure à la limite de 0,87 en MFI, elle les discrimine des patients non-infectés par une bactérie avec une sensibilité de 87,5% et une spécificité de 90,1%. Le tableau de contingence associé à ce biomarqueur, qui n'est pas présenté dans la publication, donne les proportions de cas concordants ou discordants entre le CD64 et le diagnostic clinique (tableau 24).

Tableau 24 : Table de contingence du CD64. Nombres de cas vrais positifs (Groupe Bactérien et nCD64 ≥ 0.87), faux positifs (Groupe Non-Bactérien et nCD64 ≥ 0.87), faux négatifs (Groupe Bactérien et nCD64 < 0.87) et vrais négatifs (Groupe Non-Bactérien et nCD64 < 0.87) pour le nCD64 comparé à la classification bactérienne sur diagnostic.

	Groupe Bactérien	**Groupe Non-Bactérien**	**Total**
nCD64 ≥ 0.87	35	14	49
nCD64 < 0.87	5	84	89
Total	40	98	138

Le résultat important est que le CD64 présente une bonne valeur de sensibilité (la majorité des patients infectés par une bactérie ont une valeur élevée de nCD64 : n=35/40 ; 88%). En effet, il est important qu'un marqueur d'infection bactérienne privilégie la sensibilité à la spécificité, car il est plus grave de ne pas identifier un patient avec une infection bactérienne et de ne pas lui initier une antibiothérapie, que de traiter inutilement un patient non infecté.

Le second résultat de cette partie est que l'expression du CD169 sur les monocytes est significativement augmentée chez les patients infectés par un virus, et que lorsque cette expression est supérieure à la limite de 1,58 en MFI, elle les discrimine des patients non-infectés par un virus avec une sensibilité de 85,7% et une spécificité de 100%. Le tableau de contingence associé à ce biomarqueur, qui n'est pas présenté dans la publication, donne les proportions de cas concordants ou discordants entre le CD169 et le diagnostic clinique (tableau 25).

Tableau 25 : Table de contingence du CD169. Nombres de cas vrais positifs (Groupe Viral et mCD169 ≥ 1.58), faux positifs (Groupe Non-Viral et mCD169 ≥ 1.58), faux négatifs (Groupe Viral et mCD169 < 1.58) et vrais négatifs (Groupe Non-Viral et mCD169 < 1.58) pour le mCD169 comparé à la classification virale sur diagnostic.

	Groupe Viral	**Groupe Non-Viral**	**Total**
mCD169 ≥ 1.58	6	5	11
mCD169 < 1.58	1	126	127
Total	7	131	138

Le résultat important est que le CD169 présente une bonne valeur de spécificité (la majorité des patients non infectés par un virus ont une valeur négative de mCD169 : n=126/131 ; 96%). En effet, il est important qu'un marqueur d'infection virale privilégie la spécificité à la sensibilité, car il est plus grave d'identifier un patient avec une infection virale et de ne pas lui initier volontairement une antibiothérapie, que de ne pas traiter un patient non infecté mais resté sous surveillance car sans étiologie infectieuse retrouvée.

Ainsi, les résultats des deux biomarqueurs corrèlent bien avec la littérature : le CD64 semble être lié aux infections bactériennes tandis le CD169 semble être lié aux infections virales. Leurs limites de décision médicale sont supérieures aux valeurs de référence déterminées précédemment, et témoignent donc de l'éloignement des valeurs des biomarqueurs par rapport à des valeurs « normales » chez des sujets infectieux. Elles sont associées à des valeurs de sensibilité et spécificité élevées (> 85%) à discriminer les patients présentant une infection bactérienne de ceux présentant une infection virale ou de ceux n'ayant pas d'infection, confirmant l'intérêt à évaluer ces biomarqueurs.

Enfin, dans l'étude, les résultats ont été comparés à la Protéine C-Réactive. Le résultat a été que la CRP discrimine les patients infectés par une bactérie de ceux non-infectés par une bactérie avec une sensibilité de 93,1% et une spécificité de 85%, soit des performances équivalentes. Le tableau de contingence associé à la CRP, qui n'est pas présenté dans la publication, donne les proportions de cas concordants ou discordants entre la CRP et le diagnostic clinique (tableau 26).

Tableau 26 : Table de contingence de la CRP. Nombres de cas vrais positifs (Groupe Bactérien et CRP ≥ 19.3), faux positifs (Groupe Non-Bactérien et CRP ≥ 19.3), faux négatifs (Groupe Bactérien et CRP < 19.3) et vrais négatifs (Groupe Non-Bactérien et CRP < 19.3) pour la CRP comparée à la classification bactérienne sur diagnostic.

	Groupe Bactérien	**Groupe Non-Bactérien**	**Total**
CRP ≥ 19.3	34	10	44
CRP < 19.3	6	88	94
Total	40	98	138

Ainsi, ce travail a permis de mesurer les expressions des biomarqueurs CD64 et CD169 avec la technique de cytométrie en flux « au lit du patient » dans le contexte pathologique complexe qu'est l'environnement des Urgences. Leurs mesures sur 138 patients ont permis de déterminer leurs performances diagnostiques à identifier l'étiologie d'une infection. Ces performances entrent dans la décision médicale du test pour les soins et les traitements à dispenser aux patients, en définissant les seuils au-dessus desquels une action médicale est recommandée. Les résultats ont montré que ces performances étaient équivalentes à celles du test de référence évalué dans l'étude, la Protéine C-Réactive. En comparant les tables de contingence du nCD64 et de la CRP, on remarque d'ailleurs que les proportions de vrais positifs (nCD64 : n=35 ; CRP : n=34) ou de vrais négatifs (nCD64 : n=84 ; CRP : n=88) sont identiques, et qu'il ne semblerait donc pas y avoir d'intérêt à privilégier une association de la CRP avec le marqueur d'infection virale mCD169, plutôt que du nCD64 avec le mCD169. De même une association des 3 marqueurs n'aurait pas amélioré les performances de discrimination des infections bactériennes.

Deux limites se dégagent. La première concerne la cohorte de l'étude : la sélection des patients s'est faite volontairement de manière rétrospective et sur un large échantillon de pathologies, mais peu de sujets infectés ont finalement été sélectionnés (34% de la population totale) et peu ont eu systématiquement une isolation d'un pathogène pour confirmer leur infection (43% des sujets infectés). C'est pourquoi, une étude est réalisée dans la partie suivante sur une cohorte similaire, avec le même test de laboratoire, mais dont le critère de sélection de la cohorte est prospectif. Il permet de sélectionner particulièrement et en plus grand nombre des patients infectés par une bactérie ou un virus, et pour qui l'infection est confirmée par une isolation microbiologique. Egalement, des critères d'exclusion sont ajoutés : nous avons démontré que les expressions des biomarqueurs étaient induites par les interférons. Il est facile d'imaginer que toutes interféronopathies (maladies avec une production dérégulée d'interférons en réponse immunitaire, telles que les maladies auto-immunes) ou toutes pathologies traitées volontairement avec des interférons (immunodépressions systémiques, néoplasies, infections chroniques), pourraient créer une interférence dans les expressions des marqueurs. Ainsi, l'étude sert de validation clinique des biomarqueurs après cette détermination préliminaire, puisque l'évaluation des biomarqueurs dans ce contexte clinique légèrement différent mais mieux caractérisé peut faire varier leurs limites de décision médicale.

La seconde limite est que seuls les biomarqueurs CD64 et CD169 ont été évalués dans cette étude. Il existe une grande diversité de marqueurs cellulaires capables de discriminer les étiologies des infections, dont notamment le marqueur HLA-DR. Ces marqueurs, combinés aux CD64 et CD169, pourraient améliorer leurs performances diagnostiques. C'est pourquoi, en plus de valider les performances des CD64 et CD169, l'étude évaluera de nouveaux biomarqueurs cellulaires pour renforcer la décision médicale sur l'étiologie de l'infection du patient.

2.3.3. Validation des valeurs de décision du test

La validation clinique du test avec davantage de biomarqueurs repose sur la nécessité d'apporter la preuve que les marqueurs identifiés sont réellement prédictifs de l'efficacité diagnostique du test et de la stratification thérapeutique qui en découle [149]. Cette efficacité est mesurée par la capacité des biomarqueurs à orienter les soins et les traitements des patients en fonction des valeurs qu'ils prennent. Elle doit donc être démontrée sur une sous-population bien caractérisée d'individus, et dépend de différents paramètres importants, tels que la conception même de l'essai de validation et le choix des biomarqueurs utiles avec les meilleures performances de sensibilité et spécificité.

Ces deux axes ont constitué les deux conditions obligatoires à la réalisation de l'étude de validation des limites de décision médicale déterminées précédemment.

D'une part, la validation d'utiliser les biomarqueurs CD64 et CD169 pour diagnostiquer l'étiologie d'une infection s'est faite en caractérisant et en les comparant aux performances d'autres biomarqueurs cellulaires avec la même technique robuste de cytométrie en flux « au lit du patient » : CD35, CD55, CD46, HLA-ABC, HLA-DR, CD14, CD69. D'autre part, la définition d'une sous-population clairement définie d'individus adultes pris aux Urgences, mais présentant systématiquement un symptôme fébrile, a permis de valider les rôles des biomarqueurs dans le diagnostic infectieux.

L'objectif principal du travail a donc été de valider les performances diagnostiques, associées à leurs limites de décision médicale, des biomarqueurs CD64 et CD169 pour discriminer les infections bactériennes des infections virales ou des pathologies non infectieuses. L'objectif secondaire du travail a été de vérifier que ces deux biomarqueurs étaient les meilleurs candidats pour être des entités de diagnostic, en les comparant à de nouveaux biomarqueurs cellulaires potentiellement utilisables par les médecins en pratique clinique avec la même technique analytique.

L'hypothèse est qu'en réalisant l'étude sur une sous-population de l'étude précédente, à savoir la population de patients présentant un symptôme fébrile parmi tous les individus se présentant dans un service d'Urgences adultes, les performances diagnostiques des biomarqueurs CD64 et CD169 ne devraient pas être différentes, et même cela permettra de les confirmer sur davantage de cas infectieux. Aussi, l'évaluation simultanée d'autres biomarqueurs cellulaires dans ces mêmes conditions permettra de sélectionner ceux ayant des performances diagnostiques robustes pour compléter et renforcer le diagnostic des deux marqueurs principaux.

Les résultats font l'objet d'une cinquième publication, soumise dans la revue *Future Microbiology*, intitulée : « **Evaluation par cytométrie en flux de biomarqueurs liés aux infections chez des patients fébriles en service d'Urgences** » (figure 49).

Flow cytometry evaluation of infection-related biomarkers in febrile subjects in the emergency department

RUNNING TITLE. Biomarkers in febrile subjects.

AUTHOR NAMES.
Pénélope Bourgoin[1,2], Guillaume Lediagon[3], Isabelle Arnoux[4], Denis Bernot[4], Pierre-Emmanuel Morange[2,4], Pierre Michelet[3], Fabrice Malergue[1*], Thibaut Markarian[3]

AUTHOR AFFILIATIONS.
[1] Department of Research and Development, Beckman Coulter Life Sciences-Immunotech, 130 Avenue de Lattre de Tassigny, 13009 Marseille, FRANCE.
[2] C2VN INSERM-INRA, Aix-Marseille University, 27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille, FRANCE.
[3] Adult Emergency Unit, La Timone Hospital, APHM, 264 Rue Saint Pierre, 13385 Marseille, FRANCE.
[4] Hematology Laboratory, La Timone Hospital, APHM, 264 Rue Saint Pierre, 13385 Marseille, FRANCE.

ABSTRACT.
Aims: In the emergency department (ED), the etiological identification of infected subjects is essential. 13 infection-related biomarkers were assessed using a new flow cytometry procedure.

Materials & Methods: If subjects presented with febrile symptoms at the ED, 13 biomarkers' levels, including CD64 on neutrophils (nCD64) and CD169 on monocytes (mCD169), were tested and compared to clinical records.

Results: Among 50 subjects, 78% had bacterial infections and 8% had viral infections. nCD64 showed 82% sensitivity and 91% specificity for identifying subjects with bacterial infections. mCD169, Human Leucocyte Antigen (HLA)-ABC ratio and HLA-DR on monocytes had high values in subjects with viral infections.
Conclusion: Biomarkers showed promising performances to improve the ED's infectious stratification.

KEY WORDS.
Fever, emergency department, flow cytometry, bacterial infection, viral infection.

1. INTRODUCTION.

An important medical issue encountered by practitioners in the emergency department (ED) is accurate identification of the cause of infection in subjects presenting with fever or febrile symptoms [1]. It is necessary to properly and rapidly treat and manage subjects; indeed, in cases of bacterial infection, antibiotic therapy should be initiated as soon as possible to prevent the infection from evolving to septic shock [2], whereas the use of such treatments in cases of viral infection is ineffective and could even lead to the development of antibiotic resistance [3,4]. Clinical signs are often similar among different pathogens and can even be caused by noninfectious agents. Thus, proper diagnosis must be confirmed by commonly recommended assessments, such as C-reactive protein (CRP) and procalcitonin (PCT) [5]. However, the sensitivity and specificity of these biomarkers are unclear, particularly when evaluated in subjects with inflammatory syndromes or local infections [6].

The results of a recent meta-analysis by the Kapasi team [7] and of a preliminary retrospective study by the Bourgoin team [8] showed the utility of different soluble and cell-based host biomarkers to determine infection etiology. The expression of CD64 on neutrophils (nCD64) is significantly increased in subjects with bacterial infections [9–11]. Conversely, the expression of CD169 on monocytes (mCD169) has not been frequently evaluated in infections, but has recently been shown to be increased in subjects with viral infections [12–15].

Assessment of these markers traditionally uses flow cytometry. However, this technique is unsuitable for simple, rapid analysis in the ED owing to the complexity of the procedure and the materials and labor requirements for preparing samples and using the flow cytometer [16]. Therefore, improved and innovative flow cytometry methods are required [17].

Accordingly, in this single-center, observational, prospective study, the aim was to confirm the relevance of assessing the expressions of both biomarkers in subjects presenting with fever or febrile symptoms at the ED. The hypothesis was that the measurement of these biomarkers, using a novel flow cytometry method, more fitted to ED settings, may be able to distinguish between bacterial or viral infection, showing better performance than other cellular biomarkers (e.g., PCT and CRP).

In addition, other host cell surface biomarkers, including CD35 on monocytes (mCD35) and neutrophils (nCD35), CD55 on monocytes (mCD55) and neutrophils (nCD55), CD46 on monocytes (mCD46), the ratio of human leucocyte antigen (HLA)-ABC on monocytes/neutrophils (rHLA-ABC), CD69 on lymphocytes (lCD69), monocytes (mCD69) and neutrophils (nCD69), CD14 on monocytes (mCD14) and HLA-DR on monocytes (mHLA-DR), have also been studied for their ability to distinguish among bacterial and viral infections [18–20].

For all these evaluations, despite a good recruitment of subjects with bacterial infections, very few subjects with viral infections were included; therefore, the results described in this study regarding the viral group are presented as preliminary data, neither statistically compared nor evaluated for stratification performance.

2. MATERIALS & METHODS.

2.1.Prospective inclusion of samples.

The study population included subjects older than 18 years attending the adult ED of La Timone University Hospital in Marseille, France, with infectious symptoms. Subjects were enrolled during 15 consecutive days. The inclusion criteria were as follows: fever $\geq 38.0°C$ or hypothermia less than 36.5°C, with other potential respiratory (cough, sputum, and dyspnea), urinary (potential urinary infection), abdominal (pain syndrome, diarrhea), cutaneous (erysipelas), or neurological (meningitis) clinical signs. The exclusion criteria were as follows: incomplete clinical files, trauma or subjects presenting with a known inflammatory or autoimmune disease, neoplasia, chronic infectious disease (viral, fungal, or bacterial), or antibiotic, antiviral, or immunosuppressive treatment prior to admission, and subjects with extensive burns or recent surgery (less than 1 month).

The procedures were in accordance with the ethical standards of the Helsinki Declaration. The Hospital Ethical Committee and the Committee for Protection of Persons approved this observational and noninterventional prospective study (CPP approval no. 181160; ID-RCB approval no. 2018 A02706-49). Confidentiality was preserved at all levels. Subjects provided informed consent and their routine care was not modified. All data assessed in this study were part of routine clinical practice and retrieved from subject records without any intervention.

2.2.Routine sample testing.

Blood samples were sent to the Hematology Laboratory of La Timone Hospital, and processed within 24 hours as part of the standard, routine clinical tests universally performed at the hospital. White blood cell (WBC) and polymorphonuclear neutrophil (PMN) counts were assessed using a Sysmex XN system (Sysmex Inc., Kobe, Japan). PCT was measured using a Dosage ADVIA Centaur BRAHMS Procalcitonin system (Siemens, Munich, Germany) and CRP was measured using the C-Reactive Protein Gen.3 system (COBAS, Roche, Bale, Switzerland).

For the detection of viruses, blood or cerebrospinal fluid samples were examined with PCR, and serum samples were tested for IgG and IgM using a LIAISON analyzer (DiaSorin, Saluggia, Italy). For the detection of bacteria, blood cultures and bacterial identification were performed using a Bruker Mass Spectrometry system (Brucker Inc., Billerica, MA, USA), urinary antigen tests (for *Pneumococcus* and *Legionella*), PCR (for *Chlamydia* and *Mycoplasma*), and/or cultures of respiratory tract secretions (nasopharyngeal swabs, tracheobronchial aspirate, or bronchoalveolar lavage).

2.3.Clinical data collection.

A team of three ED specialist practitioners, blinded to the study test results, recorded for each subject their epidemiological data (sex, age, clinical history, medical institutionalization, altered mental status), physiological data (cardiac constants, body temperature, vital signs and symptoms, prior administration of antibiotics), biological data (WBC and PMN counts, CRP and PCT levels, biochemical measurements, name of the identified pathogens if isolated), and clinical data (time from onset, symptoms, final diagnosis), and then classify them into three groups. The classification of patients was made by taking into account only the patient's symptoms, the final diagnosis established by the practitioner during the consultation, and possibly the microbiological results of isolations if confirmation was required.

If clinical symptoms and microbiological test results, in addition to final diagnosis, proved no evidence of infection, then subjects were classified as non-infected subjects. If clinical and microbiological findings strongly confirmed the presence of a bacterial infection established by the final diagnosis (positive bacterial culture result and/or negative viral test result), subjects were categorized as having a bacterial infection. Finally, if typical clinical symptoms of infection and viral agents were detected, with potential negative bacteriological results and viral final diagnosis, subjects were confirmed as having viral infections. No subjects were co-infected. In cases in which the diagnosis was questionable, a second group of two ED practitioners was consulted and consensus was reached.

2.4.Flow cytometry assessment.

Leftover EDTA-treated blood samples were pseudonymized and treated by flow cytometry. Briefly, careful titrations of the following antibodies were performed in accordance with a newly described one-step staining procedure [17]: anti-CD169-phycoerythrin (PE) (clone 7-239), anti-CD64- PacificBlue (PBE) (clone 22), anti-CD35-fluorescein isothyocyanate (FITC) (clone J3D3), anti-CD55-PE (clone JS11KSC2.3), anti-HLA-ABC-Alexa Fluor 700 (clone B9.12.1), anti-CD69-allophycocyanin (APC) (clone TP1.55.3), anti-CD14-Krome Orange (clone RMO52), and anti-HLA-DR-PBE (clone Immu357), all custom products from Beckman Coulter Inc. (Brea, CA, USA), as well as anti-CD46-APC (clone TRA-2-10) from Biolegend Inc. (San Diego, CA, USA). Antibodies were separated in two antibody cocktails and dried at their optimized amounts in two different 5-mL testing tubes, using the DURA Innovations drying process (Beckman Coulter Inc.) [21–26].

For each sample, 500 µL Versalyse lysing solution (Beckman Coulter Inc.) and 5 µL blood were transferred to both tubes. After incubation for 15 minutes, samples were analyzed on a three-laser, 10-color Navios flow cytometer (Beckman Coulter Inc.). Flow-Set beads (Beckman Coulter) were used before each analytical run in order to control the variability in device performance; however, no harmonization between the measured values over the study period was necessary. Analysis was performed using Kaluza Analysis Software (version 2.1; Beckman Coulter Inc.). Neutrophils, monocytes, and lymphocytes were gated on the basis of their typical forward and side scatter characteristics. The expression levels of each biomarker were determined as mean fluorescence intensities (MFIs).

The influence of medical procedures and diagnosis was prevented by blinding the medical practitioners to the results of flow cytometry analysis.

2.5.Statistical analysis.

Statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics version 20 (IBM SPSS Inc., Armonk, NY, USA). Quantitative data were expressed as means ± standard deviations and compared using Student's t-tests or Mann-Whitney U tests, or for more than two groups by analysis of variance or Kruskall-Wallis tests. Qualitative variables were expressed as frequencies with percentages and compared using Khi-2 or Fisher's exact tests if conditions were missing, or for more than two groups by Freeman-Halton extension of Fisher's exact test.

Receiver operating characteristic (ROC) analyses were based on area under the curve (AUC), sensitivity (true positives / positives [TP / P]), specificity (true negatives / negatives [TN/N]), positive likelihood ratio (sensitivity / [100 – specificity]) and negative likelihood ratio ([1 – sensitivity] / specificity]).

All values were expressed as ranges (between 0 and 100), with 95% confidence intervals. For all tests, two-sided *p* values less than 0.05 were considered statistically significant.

3. RESULTS.

3.1.Clinical features of the subjects.

During the 15-day study period, 60 subjects were admitted to the ED of La Timone Hospital with febrile symptoms. Their biological samples were all processed, but 10 subjects had incomplete clinical files and did not satisfy the study criteria. Of the remaining 50 subjects definitively included in the study, 39 (78%) were classified as having bacterial infections, whereas 4 (8%) were classified as having viral infections. The 7 (14%) remaining subjects were classified as having no infection, although they were initially included in the study for febrile symptoms. The reason is that these subjects had more inflammatory than infectious pathologies. No subjects had bacterial and viral co-infections. An overview of the study workflow and pathologies' details in each group are shown in Figure 1.

3.2.Epidemiology of infected subjects.

The 50 subjects in the final cohort included 25 (50%) women and 25 (50%) men, with a mean age of 57 (± 24) years. All epidemiological data are presented in Table 1.

No significant differences were observed either for the sex balance, or for the mean age or for clinical histories of the subjects between bacterial and control (no infection) groups. However, subjects included in the viral infection group seemed having a mean age decreased from 56 (± 21) to 28 (± 14) years. Subject clinical features were similar between bacterial and control groups, except that pulse rate was significantly increased from 79 (± 16) to 104 (± 21) bpm in the bacterial infection group ($p < 0.01$).

A wide range of infectious symptoms was observed (respiratory, gastrointestinal, urological/gynecological, neurological, ear, nose, and throat [ENT], cutaneous, and postoperative), but significantly more frequently in subjects in the bacterial infection group ($p = 0.03$). However, their time from onset was equivalent between the groups. The most common clinical presentation associated with bacterial infections was respiratory symptoms (n = 21; 54%), whereas respiratory, gastrointestinal, neurological, and ENT symptoms were equivalently representative of viral conditions. As expected, subjects diagnosed as having bacterial infections were treated significantly more frequently with antibiotics (n = 27; 69%; $p < 0.01$) than subjects with no infection. No differences were observed in hospitalization duration.

Finally, comparison of biochemical and biological measurements are presented in table 2. Only hematocrit level showed statistically significant differences between bacterial and control groups ($p = 0.03$).

Overall, 11 common pathogen species were detected (Table 3). The most common pathogens were *Escherichia coli* (28%) and *Klebsiella pneumonia* (18%).

3.3.Biomarker levels and ROC analysis.

In total, nine biomarkers were assessed using flow cytometry on 1–3 leucocyte subsets, resulting in monitoring of 13 parameters (Table 4). Example of flow cytometry expressions of nCD64 and mCD169 is given in supplementary figure 1.

Biomarkers known to be altered in the presence of bacterial infection include nCD64, mCD35, nCD35, mCD55, and nCD55; lCD69, mCD69, nCD69, mCD14, and mHLA-DR may also be altered. Subjects with bacterial infections had a significantly higher level of nCD64 (MFI of 2 ± 1; $p < 0.01$), mCD35 (MFI of 31 ± 11; $p = 0.02$), nCD35 (MFI of 26 ±9; $p = 0.02$), mCD55 (MFI of 45 ± 14; $p < 0.01$), nCD55 (MFI of 26 ± 8; $p < 0.01$), lCD69 (MFI of 15 ± 7; $p = 0.03$) and nCD69 (MFI of 10 ± 2; $p = 0.04$). Figure 2 shows their results of ROC analysis. Using a cutoff point of ≥ 0.96, nCD64 MFI showed the best bacterial discriminative performance, with a sensitivity of 82% (66.5–92.5%), specificity of 91% (58.7–99.8%), positive likelihood ratio of 9.03 (1.4–58.8), and negative likelihood ratio of 0.20 (0.10–0.4). The AUC was 0.92 (0.80–0.98). Numbers of true positive, false positive, false negative and true negative cases are detailed in supplementary table 1.

Conversely, biomarkers known to be altered in the presence of viral infection include mCD169, rHLA-ABC, and mCD46; lCD69, mCD69, nCD69, mCD14, and mHLA-DR may also be altered. Neither statistical comparison nor ROC analysis could have been performed due to the low number of viral infections, but subjects with viral infections seemed to have higher levels of mCD169 (MFI of 7 ± 5), rHLA-ABC (MFI of 6 ± 1) and mHLA-DR (MFI of 12 ± 1).

3.4.Comparison with CRP and PCT.

For a comparison with previous cellular biomarkers, levels and ROC curves of CRP and PCT are presented in Table 5 and Figure 3 respectively.

CRP level ($p < 0.01$) was significantly higher in the bacterial infection group than in control group (20 ± 23 to 86 ± 74 mg/L respectively), whereas PCT level ($p = 0.24$) was not significantly different between both groups (0.07 ± 0.08 to 0.76 ± 1.80 ng/L).

For subjects with bacterial infections, the optimal cutoff for CRP was ≥ 33.1 mg/L, with a sensitivity of 69% (52.4–83%), specificity of 91% (58.7–99.8%), and AUC of 0.86 (0.73–0.94). The optimal cutoff for PCT was ≥ 0.02 ng/L, with a sensitivity of 93% (76.5–99.1%), specificity of 60% (14.7–94.7%), and AUC of 0.81 (0.64–0.93).

4. DISCUSSION.

In this observational, prospective, single-center study, 13 leucocytes parameters, i.e., nCD64, mCD169, mCD14, mCD35, nCD35, mCD46, mCD55, nCD55, lCD69, mCD69, nCD69, rHLA-ABC, and mHLA-DR, were evaluated in subjects in the ED. The aim was to assess their expression levels using an innovative, 15-minute, one-step method and evaluate correlations among expression levels with clinical parameters in subjects with or without bacterial or viral infections. CRP and PCT were also evaluated.

For many years, intense research of new biomarkers for stratification of infectious disease has been used for appropriate triage, management, and treatment of subjects with systemic infections [7,18,27]. Biomarkers, CRP and PCT levels in each group were consistent with previous reports [18,19,28–30]. Notably, however, there were no significant differences in WBC or PMN counts, confirming the very poor performances of these markers. When analyzed with ROC models, only nCD64 showed effective discrimination between bacterial and non-bacterial infections. Conversely, mCD169, mHLA-DR and rHLA-ABC biomarkers seemed having higher values in viral than in non-viral infections. Nevertheless, this result needs to be confirmed in more cases because the number of subjects with viral infections was very low. Other tested leucocyte markers did not show satisfactory performance because none showed high sensitivity to ensure that the most subjects are identified and that cases of infection are not missed, and they did not have sufficiently high specificity either to ensure the infection etiology.

For nCD64, the discriminative power was higher than those found for reference assays. These results were not surprising because CRP level has been shown to be a sensitive, albeit nonspecific marker of inflammation with limited utility in the ED for identifying infection etiology in subjects with fever [31]. In contrast, PCT level shows strong sensitivity and specificity in subjects with systemic infections, such as severe sepsis, but are limited for identifying local infections [32]. Overall, neither CRP nor PCT can be used to identify viral infections, because negative results for CRP or PCT are only suggestive of a nonbacterial etiology.

This study had some limitations. First, subjects were only enrolled from the ED, which may have resulted in selection bias. Additionally, groups were made up of individuals with various infectious diseases and degrees of severity, instead of being focused on only one type of pathology, as seen in other studies of infections [33–35]. Moreover, because this was an observational study, the ED team of experts was blinded to the flow cytometry results when establishing the diagnosis, but not to microbiological measurements of subject clinical data, which could have biased the classification of the subjects into groups [36–39] and no interventions were performed with regard to additional diagnostic assays for each subject. Because of this, very few subjects with confirmed bacterial or viral infections were included, and the proportion of subjects with viral infection was too low (8% of total cohort). The absence of microbiological confirmation may lead to higher rates of mislabeling [40]. Thus, the biomarkers relevance will have to be precisely assessed in future studies of more subjects with viral infection.

A single perfect reference standard is not easy to establish. Several strategies have to be considered, each with strengths and limitations [41]. Indeed, the study biomarkers may be useful for subjects with systemic infections, but could have limitations owing to their unknown kinetics in infected subjects. However, biomarkers such as nCD64 and mCD169 remain very promising as depending on early interferons production after bacteria or viruses infection [14,29], and therefore having levels following disease progression. Moreover, it could be challenging for practitioners to reach a diagnosis on the basis of a single blood sample rather than sequential samples [27]. Additionally, MFI measurements by flow cytometry are strongly dependent on instrument setup, which will necessitate standardization efforts, in terms of calibration strategy and automation. Future research should focus on confirming these biomarkers on a larger scale and incorporating them as part of the overall clinical management of subjects with fever [42].

Finally, nCD64, mCD169, mHLA-DR, and rHLA-ABC are not used in clinical practice yet. However, the ED environment is complex and dynamic and thus requires technologies tailored specifically for prevention of infection and enhancement of subject safety in emergency care. There is a lack of appropriate assays for improving infectious diagnostic capabilities and outcomes and for reducing the empirical use of antimicrobial drugs [1]. A solution to this may be the development of point-of-care diagnostic assays. The Dittrich team [43] highlighted the main requirements in a target product profile. One of the main achievements of this study was the use of the innovative flow cytometry protocol for assessing the levels of biomarkers [17]. This procedure, already demonstrated to give performances equivalent to standard flow cytometry procedure, may meet the minimum characteristics required for a bacterial versus viral test. Additionally, this assay yielded results in less than 15 minutes from whole blood samples. Although the study was conducted with EDTA-containing blood collection tubes containing several milliliters of material, only 5 µL of the sample was required, potentially permitting the use of capillary blood from subjects. Reagent storage and laboratory procedures were carried out at room temperature. All steps for testing the samples were combined into one step, making this method technically easier than other approaches and allowing staff at health centers to be quickly

trained. This simplified procedure combined with the biomarkers, should facilitate the discrimination between bacterial and viral infections.

5. CONCLUSION.

In this study, we demonstrated the potential value of assessing levels of nCD64, and more preliminarily of mCD169, mHLA-DR, and rHLA-ABC in subjects presenting at the ED, to predict bacterial versus viral causes of fever. As part of a global effort to improve subject care, biomarker levels were measured using an innovative, easy, rapid one-step flow cytometry procedure, that, in the ED setting, may represent a rapid, robust method to potentially inform triage and treatment decisions for a wide range of infections.

SUMMARY POINTS.

- The identification of infectious etiology is a major challenge for emergency medicine.
- Assessment of infection-related biomarkers by a new rapid method could attribute a bacterial or viral or non-infectious origin to a febrile symptom.
- Expressions of CD64, CD169, CD35, CD55, CD46, HLA-ABC, CD14, HLA-DR and CD69 are measured by a point-of-care and rapid procedure of flow cytometry.
- Biomarker levels are measured within a prospective cohort of 50 subjects in the Emergency Department of La Timone Hospital, including 78% bacterial infections and 8% viral infections.
- CD64 on neutrophils shows 82% sensitivity and 91% specificity for identifying subjects in bacterial conditions, but other biomarkers had lower discriminative performances.
- nCD64 performances are equivalent or even better than CRP and PCT assays, for which sensitivity of 69% and 93%, and specificity of 91% and 60 %, respectively, were obtained.
- Levels of CD169 on monocytes (mCD169), Human Leucocyte Antigen (HLA)-ABC ratio and HLA-DR on monocytes appear to be higher in cases of viral infections.
- These encouraging preliminary results should be confirmed and extended through larger studies, encompassing as many infectious diseases as possible.

FIGURE LEGENDS.

Fig 1. Overview of the study workflow. Construction tree of the prospective study conducted in the ED of La Timone Hospital, with final numbers and diagnoses for subjects who were admitted with febrile or acute symptoms.

Fig 2. ROC analysis for bacterial diagnosis. ROC curves for the discrimination of bacterial infections with (A) nCD64, (B) mCD35, (C) nCD35, (D) mCD55, (E) nCD55, (F) lCD69, (G) mCD69, (H) nCD69, (I) mCD14, and (J) mHLA-DR. Optimal thresholds for each biomarker are indicated with calculated values of specificity (Sp) and sensitivity (Se). Areas under the curve (AUCs) and 95% confidence intervals are also given for each ROC analysis.

Fig 3. ROC analysis for CRP and PCT. (A) CRP and (B) PCT ROC curves for diagnosis of bacterial infections. Optimal thresholds are indicated with calculated values of specificity (Sp) and sensitivity (Se).

TABLE LEGENDS.

Table 1. Cohort study characteristics. Values are presented as either total numbers, followed by the corresponding percentages in brackets, or mean ± standard deviation. Variables for which p values were less than $\alpha = 5\%$ are indicated in bold with * to indicate statistically significant differences between groups.

Table 2. Biological and biochemical data. Values are presented as either total numbers, followed by the corresponding percentages in brackets, or mean ± standard deviation. Variables for which p values were less than $\alpha = 5\%$ are indicated in bold with * to indicate statistically significant differences between groups.

Table 3. Identification of pathogens in the cohort study. Numbers of bacteria and viruses isolated and/or detected in blood culture, urinary culture, or serological measurements.

Table 4. Flow cytometry assessments. Mean of fluorescence intensities (MFI) are presented as mean ± standard deviation for each biomarker. Variables for which *p* values were less than $\alpha = 5\%$ are indicated in bold with * to indicate statistically significant differences between groups.

Table 5. PCT and CRP levels. Values are presented as mean ± standard deviation. Variables for which *p* values were less than $\alpha = 5\%$ are indicated in bold with * to indicate statistically significant differences between groups.

REFERENCES.

1. Liang SY, Theodoro DL, Schuur JD, Marschall J. Infection Prevention in the Emergency Department. *Ann. Emerg. Med.* 64(3), 299–313 (2014).

2. Hassan U, Ghonge T, Reddy Jr. B *et al.* A point-of-care microfluidic biochip for quantification of CD64 expression from whole blood for sepsis stratification. *Nat. Commun.* 8, 1–12 (2017).

3. Ventola CL. The Antibiotic Resistance Crisis. *Pharm. Ther.* 40(4), 277–283 (2015).

*** This article gives an overview of the antibiotic resistance issue, with a global understanding on its causes and future threats at a worldwide level.**

4. Bartlett JG, Gilbert DN, Spellberg B. Seven Ways to Preserve the Miracle of Antibiotics. *Clin. Infect. Dis.* 56(10), 1445–1450 (2013).

5. Sklavou R, Karavanaki K, Critselis E *et al.* Variation of serum C-reactive protein (CRP) over time in pediatric cancer patients with febrile illness and its relevance to identified pathogen. *Clin. Biochem.* 45(15), 1178–1182 (2012).

6. Judy Siegel-Itzkocich. Israeli product that pinpoints viruses, bacteria gets European grant. Health Sci.-Jerus. Post (2016).

7. Kapasi AJ, Dittrich S, González IJ, Rodwell TC. Host Biomarkers for Distinguishing Bacterial from Non-Bacterial Causes of Acute Febrile Illness: A Comprehensive Review. *PLOS ONE*. 11(8), 1–29 (2016).

*** This comprehensive review summarizes the diagnostic performances of host biomarkers capable of differentiating bacterial from non-bacterial infections to guide use of antibiotics.**

8. Bourgoin Pénélope, Soliveres Thomas, Ahriz Dalia *et al.* Clinical research assessment by flow cytometry of biomarkers for infectious stratification in an Emergency Department. *Biomark. Med.* (2019).

*** This retrospective study introduces the first results of nCD64 and mCD169 clinical evaluation with a new one-step procedure for flow cytometry.**

9. Li S, Huang X, Chen Z *et al.* Neutrophil CD64 expression as a biomarker in the early diagnosis of bacterial infection: a meta-analysis. *Int. J. Infect. Dis.* 17(1), e12–e23 (2013).

***This meta-analysis reveals that nCD64 is a promising biomarker for diagnosing bacterial infections.**

10. Xiong S-D, Pu L-F, Wang H-P *et al.* Neutrophil CD64 Index as a superior biomarker for early diagnosis of infection in febrile patients in the hematology department. *Clin. Chem. Lab. Med. CCLM*. 55(1), 82–90 (2017).

11. Cid J, Aguinaco R, Sánchez R, García-Pardo G, Llorente A. Neutrophil CD64 expression as marker of bacterial infection: A systematic review and meta-analysis. *J. Infect.* 60(5), 313–319 (2010).

12. van der Kuyl AC, van den Burg R, Zorgdrager F, Groot F, Berkhout B, Cornelissen M. Sialoadhesin (CD169) Expression in CD14+ Cells Is Upregulated Early after HIV-1 Infection and Increases during Disease Progression. *PLoS ONE*. 2(2), e257 (2007).

13. Kim W-K, McGary CM, Holder GE *et al.* Increased Expression of CD169 on Blood Monocytes and Its Regulation by Virus and CD8 T Cells in Macaque Models of HIV Infection and AIDS. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 31(7), 696–706 (2015).

14. Rempel H, Calosing C, Sun B, Pulliam L. Sialoadhesin Expressed on IFN-Induced Monocytes Binds HIV-1 and Enhances Infectivity. *PLoS ONE*. 3(4), 1–9 (2008).

15. Ashokkumar C, Gabriellan A, Ningappa M, Mazariegos G, Sun Q, Sindhi R. Increased Monocyte Expression of Sialoadhesin During Acute Cellular Rejection and Other Enteritides After Intestine Transplantation in Children: *Transplantation*. 93(5), 561–564 (2012).

*** This study indicates that CD169 could be a biomarker of HIV and EBV infections, in humans.**

16. Demaret J, Saison J, Venet F *et al.* Assessment of a novel flow cytometry technique of one-step intracellular staining: Example of FOXP3 in clinical samples. *Cytometry B Clin. Cytom.* 84B(3), 187–193 (2013).

17. Bourgoin P, Hayman J, Rimmelé T, Venet F, Malergue F, Monneret G. A novel one-step extracellular staining for flow cytometry: Proof-of-concept on sepsis-related biomarkers. *J. Immunol. Methods*. 470, 59–63 (2019).

*** This proof-of-concept study introduces the new one-step procedure for flow cytometry, feasible at the point-of-care, and giving results in less than 15 minutes.**

18. Nuutila J, Jalava-Karvinen P, Hohenthal U *et al.* A rapid flow cytometric method for distinguishing between febrile bacterial and viral infections. *J. Microbiol. Methods*. 92(1), 64–72 (2013).

19. Nuutila J, Jalava-Karvinen P, Hohenthal U *et al.* Use of complement regulators, CD35, CD46, CD55, and CD59, on leukocytes as markers for diagnosis of viral and bacterial infections. *Hum. Immunol*. 74(5), 522–530 (2013).

20. Chalupa P, Beran O, Herwald H, Kaspříková N, Holub M. Evaluation of potential biomarkers for the discrimination of bacterial and viral infections. *Infection*. 39(5), 411–417 (2011).

21. Pitoiset F, Cassard L, El Soufi K *et al.* Deep phenotyping of immune cell populations by optimized and standardized flow cytometry analyses: Deep Immunophenotyping for Clinical Studies. *Cytometry A*. 93(8), 793–802 (2018).

22. Pitoiset F, Barbié M, Monneret G *et al.* A standardized flow cytometry procedure for the monitoring of regulatory T cells in clinical trials: a standardized method to monitor Tregs. *Cytometry B Clin. Cytom.* 94(5), 621–626 (2018).

23. Hedley BD, Keeney M, Popma J, Chin-Yee I. Novel lymphocyte screening tube using dried monoclonal antibody reagents. *Cytometry B Clin. Cytom*. 88(6), 361–370 (2015).

24. Rajab A, Axler O, Leung J, Wozniak M, Porwit A. Ten-color 15-antibody flow cytometry panel for immunophenotyping of lymphocyte population. *Int. J. Lab. Hematol*. 39, 76–85 (2017).

25. Correia RP, Rajab A, Bento LC *et al.* A ten-color tube with dried antibody reagents for the screening of hematological malignancies. *Int. J. Lab. Hematol*. 40(2), 136–143 (2018).

26. Jamin C, Le Lann L, Alvarez-Errico D *et al.* Multi-center harmonization of flow cytometers in the context of the European "PRECISESADS" project. *Autoimmun. Rev.* 15(11), 1038–1045 (2016).

27. Hausfater P, Juillien G, Madonna-Py B, Haroche J, Bernard M, Riou B. Serum procalcitonin measurement as diagnostic and prognostic marker in febrile adult patients presenting to the emergency department. *Crit. Care*. 11(3), R60 (2007).

28. Hu L, Shi Q, Shi M, Liu R, Wang C. Diagnostic Value of PCT and CRP for Detecting Serious Bacterial Infections in Patients With Fever of Unknown Origin: A Systematic Review and Meta-analysis. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol*. 25(8), e61–e69 (2017).

29. Mokuda S, Doi O, Takasugi K. Simultaneous quantitative analysis of the expression of CD64 and CD35 on neutrophils as markers to differentiate between bacterial and viral infections in patients with rheumatoid arthritis. *Mod. Rheumatol*. 22(5), 750–757 (2012).

30. Pino M, Erkizia I, Benet S *et al.* HIV-1 immune activation induces Siglec-1 expression and enhances viral trans-infection in blood and tissue myeloid cells. *Retrovirology*. 12(1), 1–15 (2015).

31. Weh J, Antoni C, Weiß C, Findeisen P, Ebert M, Böcker U. Discriminatory potential of C-reactive protein, cytokines, and fecal markers in infectious gastroenteritis in adults. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*. 77(1), 79–84 (2013).

32. Meisner M. Update on Procalcitonin Measurements. *Ann. Lab. Med*. 34(4), 263–273 (2014).

33. Cuquemelle E, Soulis F, Villers D *et al.* Can procalcitonin help identify associated bacterial infection in patients with severe influenza pneumonia? A multicentre study. *Intensive Care Med.* 37(5), 796–800 (2011).

34. Pfister R, Kochanek M, Leygeber T *et al.* Procalcitonin for diagnosis of bacterial pneumonia in critically ill patients during 2009 H1N1 influenza pandemic: a prospective cohort study, systematic review and individual patient data meta-analysis. *Crit. Care*. 18(2), R44 (2014).

35. Haran JP, Beaudoin FL, Suner S, Lu S. C-reactive protein as predictor of bacterial infection among patients with an influenza-like illness. *Am. J. Emerg. Med*. 31(1), 137–144 (2013).

36. Tang BM, Eslick GD, Craig JC, McLean AS. Accuracy of procalcitonin for sepsis diagnosis in critically ill patients: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis*. 7(3), 210–217 (2007).

37. Ray P, Badarou-Acossi G, Viallon A *et al.* Accuracy of the cerebrospinal fluid results to differentiate bacterial from non bacterial meningitis, in case of negative gram-stained smear. *Am. J. Emerg. Med*. 25(2), 179–184 (2007).

38. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE *et al.* Towards complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy: the STARD initiative. *BMJ*. 326(7379), 41–44 (2003).

39. Fischer JE, Bachmann LM, Jaeschke R. A readers' guide to the interpretation of diagnostic test properties: clinical example of sepsis. *Intensive Care Med*. 29(7), 1043–1051 (2003).

40. Srugo I, Klein A, Stein M *et al.* Validation of a Novel Assay to Distinguish Bacterial and Viral Infections. *Pediatrics*. 140(4), e20163453 (2017).

41. Oved K, Cohen A, Boico O *et al.* A Novel Host-Proteome Signature for Distinguishing between Acute Bacterial and Viral Infections. *PLOS ONE*. 10(3), e0120012 (2015).

42. Tang Z, Qin D, Tao M *et al.* Examining the utility of the CD64 index compared with other conventional indices for early diagnosis of neonatal infection. *Sci. Rep.* 8(1), 1–7 (2018).

43. Dittrich S, Tadesse BT, Moussy F *et al.* Target Product Profile for a Diagnostic Assay to Differentiate between Bacterial and Non-Bacterial Infections and Reduce Antimicrobial Overuse in Resource-Limited Settings: An Expert Consensus. *PLOS ONE*. 11(8), e0161721 (2016).

*** This expert consensus defines a target product profile with associated requirements for a bacterial vs non-bacterial assay to guide future products' developments.**

FIGURES.

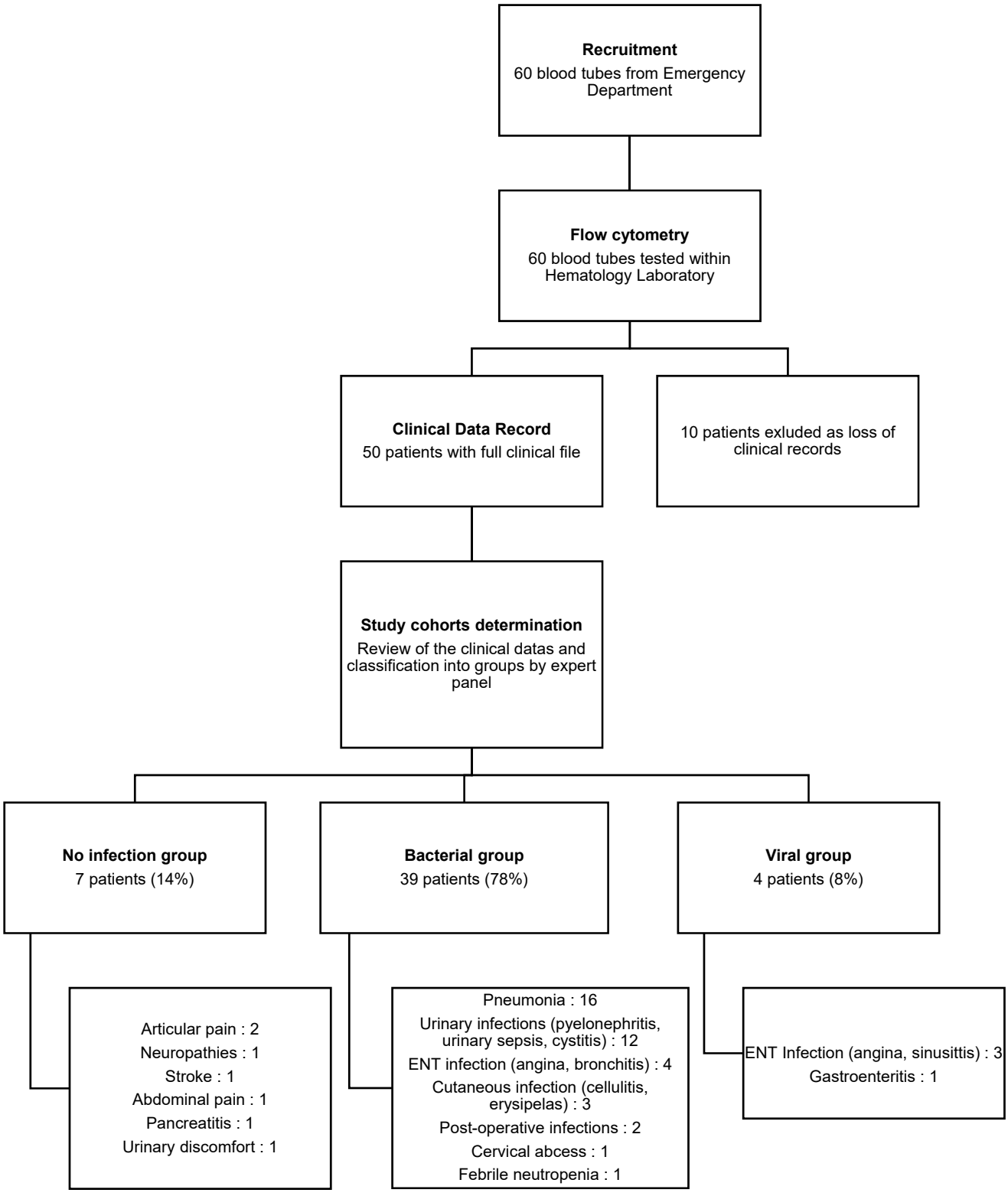


Fig 1. Overview of the study workflow.

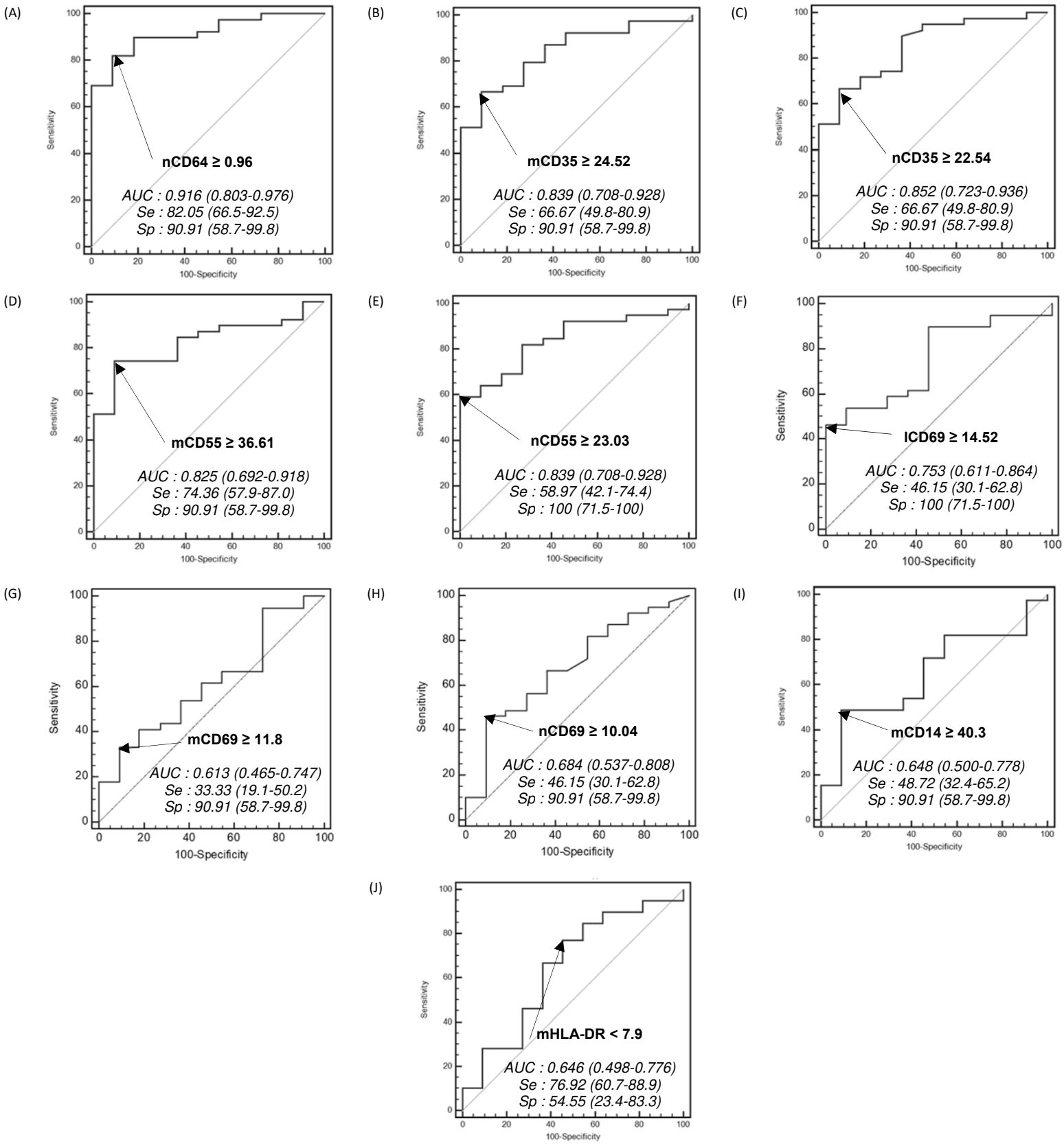


Fig 2. ROC analysis for bacterial diagnosis.

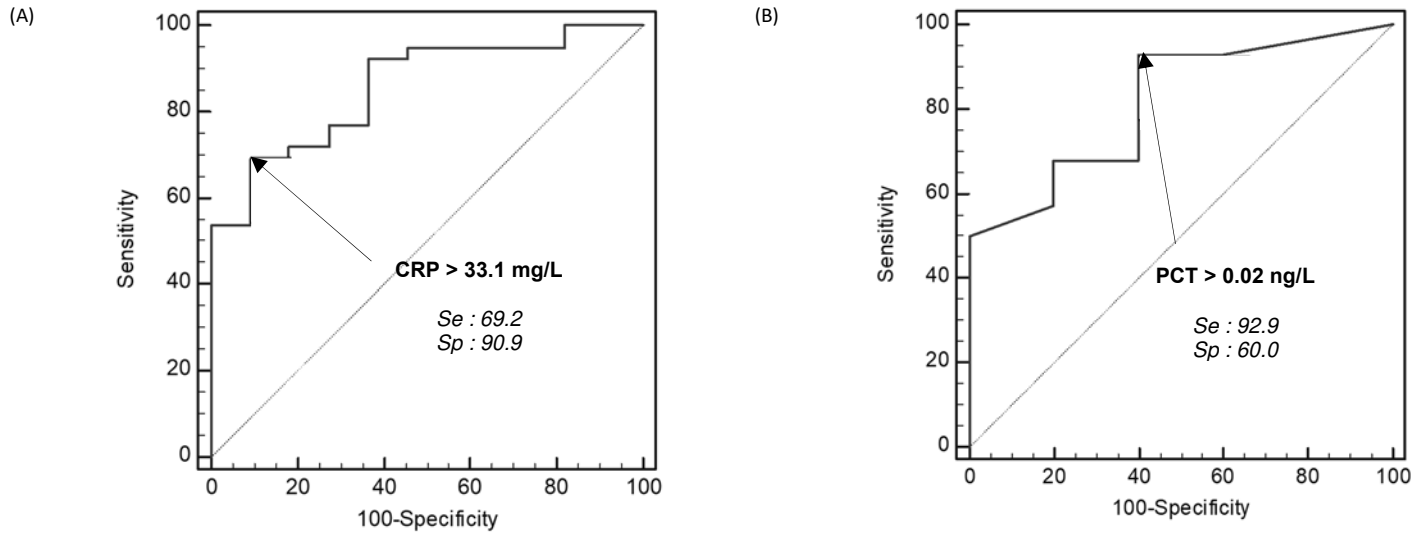


Fig 3. ROC analysis for CRP and PCT.

TABLES.

Table 1. Cohort study characteristics.

Variable	Characteristic	No Infection group (n=7)	Bacterial group (n=39)	Viral group (n=4)	p-value Bacterial vs No Infection Group
Patient sex	*Men*	3 (43%)	19 (49%)	3 (75%)	1.00
	Women	4 (57%)	20 (51%)	1 (25%)	
Patient age	*Years*	56 ± 21	61 ± 24	28 ± 14	0.62
Clinical history	*Medical institutionalization*	0 (0%)	7 (18%)	0 (0%)	0.61
	Altered Mental Status	2 (29%)	7 (18%)	0 (0%)	0.61
	Evolutive Cancer	0 (0%)	2 (5%)	0 (0%)	1.00
	Liver Disease	0 (0%)	4 (10%)	0 (0%)	1.00
	Congestive Heart Failure	1 (14%)	3 (8%)	0 (0%)	0.50
	Cerebrovascular Disease	0 (0%)	4 (10%)	0 (0%)	1.00
	Kidney Disease	0 (0%)	2 (5%)	0 (0%)	1.00
Constants	*Systolic Blood Pressure (mm Hg)*	123 ± 14	128 ± 25	127 ± 15	0.90
	Diastolic Blood Pressure (mm Hg)	68 ± 10	73 ± 16	73 ± 11	0.45
	Pulse rate (bpm)	79 ± 16	104 ± 21	90 ± 7	**< 0.01***
	Body temperature (°C)	37.1 ± 0.9	38.1 ± 1.1	38.4 ± 2.2	0.07
Clinical Symptoms	*Duration (days)*	4 ± 5	5 ± 10	2 ± 2	0.59
	Respiratory	0 (0%)	21 (54%)	1 (25%)	**0.03***
	Gastrointestinal	2 (29%)	2 (5%)	1 (25%)	
	Urological/Gynecological	0 (0%)	2 (5%)	0 (0%)	
	Neurological	1 (14%)	0 (0%)	1 (25%)	
	Urinary	1 (14%)	6 (15%)	0 (0%)	
	Ear, Nose and Throat	0 (0%)	3 (8%)	1 (25%)	
	Cutaneous	1 (14%)	2 (5%)	0 (0%)	
	Post-operative	1 (14%)	2 (5%)	0 (0%)	
	No infectious symptoms	1 (14%)	1 (3%)	0 (0%)	
Antibiotherapy	*Initiated*	0 (0%)	27 (69%)	2 (50%)	**< 0.01***
Hospitalization	*Duration (days)*	3 ± 5	6 ± 8	1 ± 1	0.20

TABLES.

Table 2. Biological and biochemical data.

Variable	Characteristic	No Infection group (n=7)	Bacterial group (n=39)	Viral group (n=4)	p-value Bacterial vs No Infection Group
Biological Measurements	*White Blood Cells (G/L)*	11 ± 3	11 ± 5	7 ± 2	0.98
	Polymorphonuclear cells (G/L)	5.9 ± 0.1	7.4 ± 5.4	5.5 ± 0.1	0.76
Biochemical constants	*Urea (mmol/L)*	5 ± 1	11 ± 19	5 ± 2	0.52
	Natremia (mmol/L)	141 ± 3	140 ± 6	140 ± 2	0.07
	Glucose (mmol/L)	6 ± 1	8 ± 5	5 ± 1	0.30
	Hematocrit (%)	41 ± 3	37 ± 5	42 ± 3	**0.03***

TABLES.

Table 3. Identification of pathogens in the cohort study.

Pathogen identified	Number isolated (n=11)
Escherichia coli	3 (28%)
Klebsiella pneumoniae	2 (18%)
Staphylococcus aureus	1 (9%)
Staphylococcus hominis	1 (9%)
Staphylococcus epidermidis	1 (9%)
Streptococcus pyogenes	1 (9%)
Enterobacter clocacae	1 (9%)
Haemophilus influenzae	1 (9%)

TABLES.

Table 4. Flow cytometry assessments.

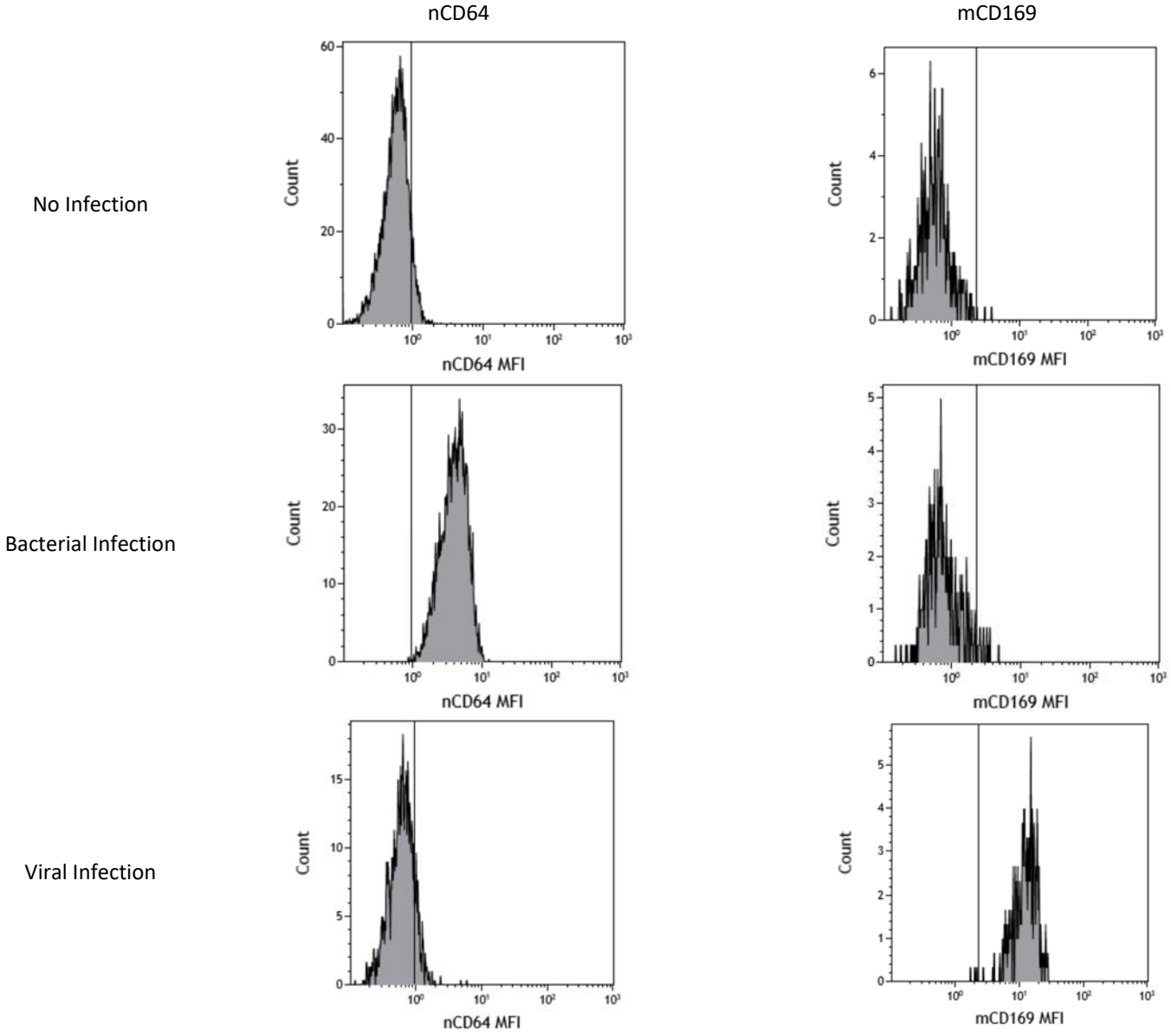
Biomarkers' MFI	No Infection group (n=7)	Bacterial group (n=39)	Viral group (n=4)	p-value Bacterial vs No Infection Group
nCD64	1 ± 0	2 ± 1	1 ± 0	**< 0.01***
mCD169	1 ± 0	1 ± 3	7 ± 5	0.19
mCD35	21 ± 5	31 ± 11	14 ± 1	**0.02***
nCD35	19 ± 4	26 ± 9	12 ± 3	**0.02***
mCD55	29 ± 6	45 ± 14	31 ± 10	**< 0.01***
nCD55	18 ± 3	26 ± 8	20 ± 3	**< 0.01***
rHLA-ABC	4 ± 1	4 ± 1	6 ± 1	0.27
mCD46	41 ± 8	47 ± 15	56 ± 19	0.47
mCD14	33 ± 9	39 ± 9	40 ± 6	0.06
mHLA-DR	5 ± 3	6 ± 5	12 ± 1	0.96
ICD69	11 ± 2	15 ± 7	11 ± 2	**0.03***
mCD69	10 ± 2	12 ± 3	11 ± 1	0.16
nCD69	9 ± 2	10 ± 2	9 ± 1	**0.04***

TABLES.

Table 5. PCT and CRP levels.

Variable	No Infection group (n=7)	Bacterial group (n=39)	Viral group (n=4)	p-value Bacterial vs No Infection Group
CRP (mg/L)	20 ± 23	86 ± 74	7 ± 8	**< 0.01***
PCT (ng/L)	0.07 ± 0.08	0.76 ± 1.80	0.04 ± 0.03	0.24

SUPPLEMENTARY FIGURES.



Supplementary Fig 1. Flow cytometry expressions of biomarkers. Flow cytometry histograms for CD64 on neutrophils (nCD64) and CD169 on monocytes (mCD169) in subjects in No Infection, Bacterial Infection or Viral Infection groups. Vertical lines give information on thresholds for both biomarkers (nCD64: 0.96; mCD169: 2.28).

SUPPLEMENTARY TABLES.

Supplementary Table 1. Cases relative to classification and flow cytometry. Numbers of true positive (Bacterial Group and nCD64 ≥ 0.96), false positive (Non-Bacterial Group and nCD64 ≥ 0.96), false negative (Bacterial Group and nCD64 < 0.96) and true negative (Non-Bacterial Group and nCD64 < 0.96) cases for nCD64 biomarker compared to bacterial classification.

	Bacterial Group	Non-Bacterial Group	Total
nCD64 ≥ 0.96	32	2	34
nCD64 < 0.96	7	9	16
Total	39	11	50

Figure 49 : Evaluation par cytométrie en flux de biomarqueurs liés aux infections chez des patients fébriles en service d'Urgences. *Publication soumise dans la revue Future Microbiology, portant sur la validation des performances cliniques des biomarqueurs CD64 et CD169 par une technique de cytométrie en flux « au lit du patient » et l'évaluation des biomarqueurs CD35, CD55, CD46, HLA-ABC, HLA-DR, CD14 et CD69 pour le diagnostic de l'étiologie infectieuse.*

Ces travaux sont la validation clinique des performances diagnostiques des biomarqueurs CD64 et CD169, et la détermination potentielle de biomarqueurs cellulaires complémentaires pour les renforcer.

La première étape a été de sélectionner une cohorte d'individus bien caractérisée : comme précédemment, ont été inclus les patients se présentant au service des Urgences adultes de l'Hôpital de la Timone pendant 15 jours consécutifs, mais cette fois, seuls ceux présentant de la fièvre, associée ou non à un syndrome potentiellement infectieux, ont été sélectionnés. Un ensemble de critères d'inclusion et d'exclusion ont été strictement définis dans ce sens, notamment pour exclure tout patient ayant une pathologie ou un traitement qui interférerait avec l'expression naturelle des marqueurs au cours des infections, et le résultat est que la cohorte finale comptait 50 patients. Comme précédemment, leurs données épidémiologiques ont été précisément récupérées, et leurs tableaux cliniques et leurs résultats de tests biologiques pour l'isolation de pathogènes, seulement, ont permis de les distinguer en 3 groupes : 39 (78%) étaient des infections bactériennes, 4 (8%) étaient des infections virales, et 7 (14%) n'étaient finalement pas des infections. Aucun cas de co-infection n'a été retrouvé parmi les patients inclus.

La deuxième étape a été de mesurer les expressions des biomarqueurs cellulaires dans cette cohorte d'individus et d'en déterminer les performances individuelles en fonction des types d'infections.

D'une part, l'expression du CD64 sur les neutrophiles reste significativement augmentée chez les patients infectés par une bactérie, et lorsque cette expression est supérieure à la limite de 0,96 en MFI, elle les discrimine des patients non-infectés par une bactérie avec une sensibilité de 82% et une spécificité de 91%. Le résultat non indiqué dans la publication est que l'aire sous la courbe associée à ces performances est de 0.92 avec une fiabilité statistique significative p de 0.0024. L'expression du CD169 sur les monocytes reste significativement augmentée chez les patients infectés par un virus, et que lorsque cette expression est supérieure à la limite de 2,28 en MFI, elle les discrimine des patients non-infectés par un virus avec une sensibilité de 75% et une spécificité de 98%. Le résultat non indiqué dans la publication est que l'aire sous la courbe associée à ces performances est de 0.91 avec une fiabilité statistique significative p de 0.0149. Ces performances sont équivalentes à celles de l'étude précédente, bien qu'elles soient évaluées sur une cohorte sensiblement différente.

Ces travaux valident donc les limites de décision médicale des biomarqueurs CD64 et CD169 déterminées précédemment et confirment la fiabilité de leurs performances diagnostiques associées, lorsqu'ils sont mesurés avec la technique de cytométrie en flux « au lit du patient » et dans ce contexte clinique des Urgences (tableau 27).

Tableau 27 : Limites de décision médicale des marqueurs CD169 et CD64. *Synthèse des limites de décision médicale, de l'étude rétrospective de détermination et de l'étude prospective de validation, pour les moyennes d'intensité de fluorescence (MFI) des biomarqueurs CD64 sur les neutrophiles (nCD64) et CD169 sur les monocytes (mCD169). Les valeurs de sensibilité et spécificité associées à ces limites sont données en %.*

Biomarqueur	Intervalle de décision médicale (en valeur de MFI)	Sensibilité (%)	Spécificité (%)
nCD64	[0,87-0,96]	[82-87,5]	[90-91]
mCD169	[1,58-2,28]	[75-85,7]	[98-100]

D'autre part, l'évaluation des biomarqueurs CD35, CD55, CD46, HLA-ABC, HLA-DR, CD14 et CD69 dans ces mêmes conditions n'a révélé que seulement l'HLA-DR et l'HLA-ABC étaient des candidats intéressants pour renforcer le diagnostic du CD169 à discriminer les infections virales : à un seuil ≥ 10,44, la mesure de l'HLA-DR sur les monocytes (mHLA-DR) a une sensibilité de 100% et une spécificité de 85%, et à un seuil ≥ 5.45, le calcul du ratio de la mesure de l'HLA-ABC des monocytes sur les neutrophiles (rHLA-ABC) a une sensibilité de 75% et une spécificité de 94%. Le résultat non indiqué dans la publication est que l'aire sous la courbe associée aux performances de l'HLA-DR est de 0.91 avec une fiabilité statistique significative p de 0.0212, et celle de l'HLA-ABC est 0.84, avec une fiabilité statistique significative p de 0.0094. Les performances de ces biomarqueurs restent fiables mais dans les limites des performances du CD169 ; elles devront être validées dans une étude réalisée dans les mêmes conditions.

Enfin, comme lors de l'étude précédente, la troisième étape a été de comparer les performances diagnostiques des biomarqueurs à celles de la Protéine C-Réactive. Celles de la Procalcitonine ont aussi été évaluées. Le résultat a été que, pour discriminer les patients infectés par une bactérie de ceux non-infectés par une bactérie, la CRP a une sensibilité de 69% et une spécificité de 91%, et la PCT a une sensibilité de 93% et une spécificité de 60%. Le résultat non indiqué dans la publication est que l'aire sous la courbe associée aux performances de la CRP est de 0.86, avec une fiabilité statistique significative p de 0.0168, et celle de la PCT est 0.81, avec une fiabilité statistique significative p de 0.0138. Ces performances sont donc plutôt démontrées comme inférieures à celles du CD64.

Ainsi, cette étude a permis de valider l'intérêt à mesurer les expressions des biomarqueurs CD64 et CD169 pour identifier l'étiologie d'une infection. Les travaux ont aussi indiqué l'utilité clinique de la mesure de deux autres biomarqueurs cellulaires, l'HLA-DR et l'HLA-ABC. Ces marqueurs, par leurs valeurs, sont capables d'orienter les soins et les traitements des patients, ce qui est un enjeu majeur dans le domaine des infections. Une limite importante demeure que leurs valeurs prédicitives à modifier ces soins et traitements restent non évaluées, alors que cela est une étape cruciale de l'élaboration d'un test diagnostique. En effet, pour l'instant, le statut du marqueur ne donne pas d'information sur les patients pour lesquels il est nécessaire d'initier, de continuer ou d'arrêter une antibiothérapie par exemple. L'approche thérapeutique liée à l'utilisation de marqueurs prédictifs constitue d'ailleurs la base de la médecine stratifiée.

Conclusion 2.3

Le passage des biomarqueurs au diagnostic utilisé en pratique clinique est un défi majeur de l'infectiologie : des milliers de biomarqueurs sont candidats à la détection de la pathologie, mais peu sont établis dans la pratique clinique en raison principalement de manque de résultats cliniques validés. La validation clinique de marqueurs biologiques permet de déterminer la combinaison la plus fiable, pertinente et spécifique à la mesure de la réponse du patient en fonction de sa pathologie infectieuse. Cette validation est obligatoire car les biomarqueurs sont utilisés dans des tests diagnostiques pour clarifier et appuyer les prises de décision du personnel médical. Ils s'inscrivent aussi dans une volonté de limiter les thérapies par antibiotiques aux patients les plus susceptibles d'en bénéficier.

Les travaux cliniques ont montré et validé que les marqueurs CD64 et CD169 définissaient deux types de statut pour les patients infectés, orientés autour d'une zone de décision médicale : si le marqueur reste dans l'intervalle de référence, alors il indique que le patient n'est pas infecté ; si le marqueur dépasse l'intervalle de décision médicale, alors il indique que le patient est infecté par une bactérie ou par un virus (figure 50).

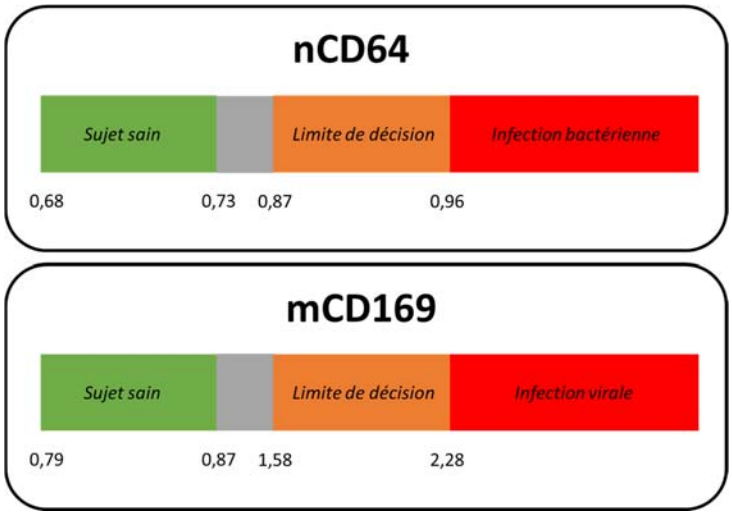


Figure 50 : Diagnostic de l'étiologie infectieuse par les marqueurs CD64 et CD169. *Diagnostic d'une infection en fonction de la moyenne d'intensité de fluorescence des marqueurs CD64 sur les neutrophiles (nCD64) et CD169 sur les monocytes (mCD169). En vert, intervalles de référence des marqueurs pour lesquels les individus sont sains ; en orange, intervalles de décision médicale pour lesquels la prise en charge des individus est susceptible d'être modifiée ; en rouge, dépassements supérieurs des limites de décision médicale pour lesquels les individus sont diagnostiqués comme infectés par une bactérie ou un virus.*

La validation clinique de ces deux biomarqueurs est conjointe à :

- **Leur mesure par une technologie avancée et robuste de cytométrie en flux réalisable « au lit du patient » (validité analytique) ;**
- **La bonne compréhension des phénotypes des individus et des processus des infections au niveau moléculaire (validité biologique) ;**
- **La démonstration de leur aptitude à améliorer la prise en charge et le devenir clinique des patients en apportant une valeur ajoutée en termes de décision de traitements et de soins (utilité clinique).**

Ces démonstrations sont les fondements de la validation clinique du test diagnostic. Elles sont indispensables parce qu'elles attestent de la valeur ajoutée apportée par le test en permettant de sélectionner une sous-population par l'identification des marqueurs, permettant ainsi de ne pas traiter inutilement des patients. Le test apporte ainsi une promesse de médecine stratifiée, plus rapide, moins chère, plus précis et plus efficace.

Conscients que la diversité du monde microbien a sûrement conduit au développement de pathogènes qui biaisent la réponse immunitaire, il est important d'identifier plus précisément les pathologies qui sont bien mises en évidence par nos marqueurs, versus celles qui n'activent pas ces voies. Il convient donc maintenant d'évaluer le test sur une diversité de cas pathologiques infectieux bien caractérisés, pour en valider progressivement les performances, en vue de son développement.

2.4. Etudes de validation du test en clinique

Au stade de preuve-de-concept, l'intérêt des biomarqueurs CD64 et CD169 dans l'identification de l'étiologie infectieuse a largement été démontré ; toutefois, en prévision de leur développement en un test de diagnostic utilisé en routine clinique, leur validation préliminaire dans des contextes médicaux variés a été initiée en évaluant leurs performances sur des problématiques médicales diverses.

2.4.1. La période hivernale en service d'Urgences adultes

L'une des nombreuses problématiques importantes d'un service d'Urgences adulte est la période hivernale. Cette problématique est intéressante car elle permet de valider le test dans un contexte clinique particulier de recrudescence de maladies infectieuses, notamment respiratoires. En effet, en période hivernale, les patients se présentent dans les services d'Urgences avec des symptômes fébriles respiratoires sensiblement communs (fièvre, toux, crachats) mais qui peuvent témoigner de pathologies infectieuses très différentes. Par exemple, il apparaît très difficile de réussir à discriminer une grippe virale saisonnière d'une grippe sévère compliquée d'une pneumopathie bactérienne.

Des équipes ont déjà tenté de résoudre ce diagnostic avec la PCT ou la CRP, en évaluant leurs performances à discriminer le virus grippal isolé, d'une pneumopathie co-infectieuse virale et bactérienne, à un moment d'épidémie de grippe saisonnière [36,39]. Les résultats étaient que, à un seuil de 0,8 µg/mL, la sensibilité et la spécificité de la PCT à distinguer un virus isolé d'une pneumopathie multiple étaient respectivement de 91 et 68%, et que sous ce seuil, les niveaux de PCT, associés au jugement clinique, était clairement indicateur de l'absence d'infection bactérienne. La CRP avait elle une sensibilité de 100% à un seuil < 20 mg/L ou une spécificité de 100% à un seuil > 80 mg/L, pour discriminer les infections bactériennes parmi les patients se présentant avec des symptômes de type grippe.

La problématique derrière cette saison hivernale reste que les tests de PCT et CRP sont des très bons marqueurs des infections bactériennes, mais qu'ils ne répondent aux infections virales que par leur absence d'expression. Cependant, dans un tel contexte, il est impossible que les outils de diagnostic aidant à la décision médicale ne soit pas précis, car les maladies infectieuses respiratoires restent parmi les premières causes de mortalité lorsqu'elles ne sont pas correctement prises en charge et traitées [39].

L'objectif du travail a été d'évaluer les performances diagnostiques des nouveaux biomarqueurs cellulaires à discriminer les étiologies infectieuses en saison hivernale aux Urgences.

L'hypothèse est que la mesure des expressions des biomarqueurs CD64 et CD169, mais aussi de l'HLA-DR et de l'HLA-ABC, dans une cohorte de 85 patients fébriles sélectionnés dans un service d'Urgences entre Décembre 2018 et Mai 2019, permettra l'évaluation de leurs performances diagnostiques à discriminer les patients présentant une infection bactérienne, de ceux présentant une infection virale, de ceux présentant une co-infection bactérienne et virale, ou de ceux n'ayant pas d'infection.

Les résultats font l'objet d'une sixième publication, en cours de soumission dans la revue *European Journal of Emergency Medicine*, intitulée : « **La cytométrie en flux pour des biomarqueurs liés aux infections : une étude de faisabilité dans les configurations des Urgences** » (figure 51).

Flow cytometry for infection-related biomarkers: a feasibility study in emergency settings

AUTHORS' NAMES.

Pénélope Bourgoin[a,b], Thomas Soliveres[c], Alexandra Barbaresi[c], Anderson Loundou[d], Isabelle Arnoux[e], Denis Bernot[e], Pierre-Emmanuel Morange[b,e], Pierre Michelet[b,c], Fabrice Malergue[a], Thibaut Markarian[b,c]

AUTHORS' AFFILIATIONS.

[a] Department of Research and Development, Beckman Coulter Life Sciences-Immunotech, 130 Avenue de Lattre de Tassigny, 13009 Marseille, FRANCE.

[b] Aix Marseille University, INSERM, INRAE, C2VN, 27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille, FRANCE.

[c] Department of Emergency Medicine and Intensive Care, Timone University Hospital, APHM, 264 Rue Saint Pierre, 13005 Marseille, FRANCE.

[d] Department of Public Health, EA3279 Self-Perceived Health Assessment Research Unit, Timone University Hospital, Aix-Marseille University, 27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille, FRANCE.

[e] Department of Hematology Laboratory, Timone University Hospital, APHM, 264 Rue Saint Pierre, 13005 Marseille, FRANCE.

CORRESPONDING AUTHOR.

Requests should be addressed to Fabrice Malergue (email: fmalergue@beckman.com; address: Beckman Coulter – Immunotech, 130 Avenue de Lattre de Tassigny, 13009 Marseille, FRANCE).

Flow cytometry for infection-related biomarkers: a feasibility study in emergency settings

ABSTRACT.
Purpose: The identification of a bacterial, viral or even non-infectious cause is essential in the management of febrile syndrome in the emergency department (ED) settings. The aim was to assess discriminative performances of two biomarkers, CD64 on neutrophils (nCD64) and CD169 on monocytes (mCD169), using a new flow cytometry procedure, on patients presenting with fever to ED. Human leucocyte antigen-DR on monocytes (mHLA-DR), HLA-ABC ratio (rHLA-ABC), and CD64 on monocytes (mCD64) were also assessed.
Methods: 85 adult patients were included during 4 months in the ED of La Timone Hospital, if they presented with infections. They were divided into four modalities according to their clinical records: no-infection, bacterial infection, viral infection and co-infection. The levels of the biomarkers were determined within their blood samples by flow cytometry, as those of reference testings (C-reactive protein – CRP and procalcitonin – PCT).
Results: In total, 38 (45%) patients were diagnosed with bacterial infections, 11 (13%) with viral infections and 29 (34%) with co-infections. nCD64 and mCD169 showed 90% and 80% sensitivity, and 78% and 91% specificity, respectively, for identifying patients with bacterial or viral infections. Other biomarkers and reference testings had lower discriminative performances.
Conclusions: nCD64 and mCD169 have a real potential for accurately distinguishing bacterial and viral infections. Assessed with the bedside flow cytometry procedure, they constitute a progress for infection management in the ED settings.

KEY WORDS. Flow cytometry, bacterial infection, viral infection, CD64, CD169, HLA-DR, HLA-ABC, emergency department.

1. INTRODUCTION.

In the management of febrile syndrome, diagnostic orientation towards an infectious etiology is essential [1]. Indeed, the characterization of a viral, bacterial or other infectious or non-infectious cause allows early appropriate therapies, depending on the etiology, while orienting the patient to a suitable service. Nevertheless, the data in the literature report the complexity of the diagnostic orientation and therefore the time to implement specific treatments [2]. Diagnostic elements are therefore needed as quickly as possible (that is since the emergency department - ED) as reported by P. Ray and collaborators in vulnerable populations, since the diagnostic error is linked, for instance, to an excess mortality in elderly patients presenting a respiratory infection [3]. Obviously, in this area as in many others, the integration of the clinical approach is essential [4] but unfortunately often not enough. Biological elements, such as biomarkers, to support or guide this clinical approach, have been proposed for decades.

Among them, scientific literature focuses on the importance of procalcitonin (PCT) in this field, as this biomarker is one of the most widespread for diagnosing bacterial infections, despite that it could orientate also the diagnostic towards a fungal infectious syndrome. Thus, despite its interest and its generalization in the early detection of infectious syndromes, a lack of specificity is reported in the literature [5]. Moreover, it only responds by the negativity of its elevation to the possibility of a viral infection [6]. C-reactive protein (CRP) has the same limitations with even lower specificity. The combination of these two biomarkers has also been studied in pediatrics

with inconclusive results [7]. Their diagnostic capacity is thus regularly challenged in the detection of infections in patients admitted to ED [8].

A comprehensive review of this research topic indicates that there are still many uncertainties regarding the interest and reliability of many biomarkers [9], but that there is still research on the validation of the interest of infectious biomarkers for triage in emergency medicine. More particularly, it seemed that measuring multiple biomarkers, simultaneously with appropriate technique and time-to-results, would be better compatible with the needs of triage in emergency medicine [10].

In this study, the tested hypothesis was that new accurate and specific biomarkers could be interesting for the care and triage of potentially infected subjects in ED settings [11] : CD64 on neutrophils (nCD64), increased in case of bacterial infections [12], and CD169 on monocytes (mCD169), increased in case of viral infections [13].

The main goal was to measure both infection-related biomarkers, with a new interesting rapid technique of flow cytometry [14], and to evaluate their relevance for discriminating bacterial and viral infections.

Secondary goal was to assess the relevance of other interesting biomarkers (*publication submitted in Future Microbiology*): Human Leucocyte Antigen (HLA)-DR on monocytes (mHLA-DR), HLA-ABC ratio (rHLA-ABC) of monocytes/neutrophils and CD64 on monocytes (mCD64). Finally, all the results were compared to orientation given by reference testings (CRP and PCT) [15].

2. METHODS.

2.1. Studied population.

The study population included consecutive patients older than 18 years attending the adult ED of La Timone University Hospital in Marseille, France, with infectious symptoms. Patients were enrolled from December 20th, 2018 to May 03rd, 2019. The inclusion criteria were the systematic association between fever greater than 38°C or hypothermia less than 36.5°C, and any potential respiratory (cough, sputum, and dyspnea), urinary (potential urinary infection), abdominal (pain syndrome, diarrhea), cutaneous (erysipelas), or neurological (meningitis) infectious clinical signs. The exclusion criteria were: incomplete clinical files, traumatized patients or patients presenting with a known inflammatory or autoimmune disease, neoplasia, chronic infectious disease (viral, fungal, or bacterial), or antibiotic, antiviral, or immunosuppressive treatment prior to admission, and patients with extensive burns or recent surgery (less than 1 month).

This observational and noninterventional prospective study was approved by the Hospital Ethical Committee and the Committee for Protection of Persons (CPP approval no. 181160; ID-RCB approval no. 2018 A02706-49). The patients enrolled in this study provided informed consent. Routine care of the patients was not modified, and confidentiality was preserved at all levels.

2.2. Clinical data collection.

All data of this study were part of routine clinical practice and retrieved from patient records without any intervention. A team of three ED specialist practitioners, blinded to the study test results, recorded for each patient:

- epidemiological data: sex, age, clinical history (evolutionary cancer, liver disease, congestive heart failure, cerebrovascular disease), medical institutionalization, altered mental status;

- physiological data: cardiac constants (systolic, diastolic and average blood pressures, pulse and respiratory rates), body temperature, fever duration, vital signs and symptoms (respiratory, abdominal, neurological, urinary, cutaneous or others), eventual oxygen-, antibio- or antiviral-therapy;
- biological data: WBC and PMN counts, CRP and PCT levels, biochemical measurements (urea, natremia, glucose, hematocrit, hemoglobin), name of the identified pathogens if isolated;
- and clinical data: time from onset, symptoms, final diagnosis, duration and orientation of the hospitalization (back home, conventional or critical care hospitalizations).

Biological data were obtained from biological samples from included subjects, sent to the Hematology Laboratory (HL) of La Timone Hospital to be standardly analyzed with testing universally applied at the hospital in cases of suspected infection.

Briefly, as already described by Bourgoin et al. [11], white blood cell (WBC) and polymorphonuclear neutrophil (PMN) counts were assessed using a Sysmex XN system (Sysmex Inc., Kobe, Japan). PCT and CRP were measured using a Dosage ADVIA Centaur BRAHMS Procalcitonin system (Siemens, Munich, Germany) and C-reactive protein Gen.3 system (COBAS, Roche, Bale, Switzerland).

Isolation of potential viruses relies on examining blood or cerebrospinal fluid samples with polymerase chain reaction (PCR), and serum IgG and IgM with LIAISON analyzer (DiaSorin, Saluggia, Italy). Potential bacteria were detected in blood and respiratory tract secretions (nasopharyngeal swabs, tracheobronchial aspirate, or bronchoalveolar lavage) cultures by a Bruker Mass Spectrometry system (Brucker Inc., Billerica, MA, USA), and in urines cultures by urinary antigen tests (for *Pneumococcus* and *Legionella*) or PCR (for *Chlamydia* and *Mycoplasma*).

Based on these records, each subject was thus defined by experts by one of the following modality: i) subject with no infection, ii) subject with bacterial infection, iii) subject with viral infection, iv) subject with a co- (bacterial and viral) infection. In cases in which the diagnosis was questionable, a fourth ED practitioner was consulted.

2.3. Flow cytometry testing.

Leftover ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-treated blood samples were pseudonymized, and processed by flow cytometry according to a newly described one-step procedure [14]. Briefly, a multicolor panel was constituted and dried as a "glassified" layer at the bottom of a 5-mL testing tube, using the DURA Innovations drying process (Beckman Coulter Inc.), with antibodies at their optimized amounts for a single test: anti-CD169-phycoerythrin (PE) (clone 7-239), anti-CD64-PacificBlue (PBE) (clone 22), anti-HLA-DR-allophycocyanin (APC) (clone Immu357) and anti-HLA-ABC-Alexa Fluor 700 (clone B9.12.1), all custom products from Beckman Coulter Inc. (Brea, CA, USA).

For each blood sample to test, 500 µL of Versalyse lysing solution (Beckman Coulter Inc.) and 5 µL of EDTA-treated blood were transferred to one dried tube. After incubation for 15 minutes, samples were analyzed on a three-laser, 10-color Navios flow cytometer (Beckman Coulter Inc.). Flow-Set beads (Beckman Coulter) were used before each analytical run in order to control the variability in device performance; however, no harmonization between the measured values over the study period was necessary. Analysis was performed using Kaluza Analysis Software (version 2.1; Beckman Coulter Inc.). Neutrophils and monocytes were gated on the basis of their typical forward and side scatter characteristics. The expression levels of nCD64, mCD169, mHLA-DR, rHLA-ABC and mCD64 were determined as mean of fluorescence intensities (MFI).

2.4. Statistical analysis.

Statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics version 20 (IBM SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Quantitative data were expressed as means ± standard deviations. Qualitative variables were expressed as frequencies with percentages.

Comparisons of quantitative variables among the different groups were performed using Student's t-test or Mann-Whitney U tests. Comparisons of percentages were performed using Khi-2 or Fisher's exact tests if conditions were missing. Comparisons of more than two groups were performed by Freeman-Halton extension of Fisher's exact test for qualitative variables and by analysis of variance or Kruskall-Wallis tests for quantitative variables.

The usefulness of biomarker levels (as well as CRP and PCT) to discriminate bacterial and viral infections was investigated by means of ROC analysis. Receiver operating characteristic (ROC) curves were used to define the best threshold of biomarker indexes. Analyses were based on area under the curve (AUC), sensitivity (true positives / positives [TP / P]), specificity (true negatives / negatives [TN/N]), positive likelihood ratio (sensitivity / [100 – specificity]) and negative likelihood ratio ([100 – sensitivity] / specificity]). All values are expressed as ranges (between 0 and 100), with 95% confidence intervals. For all tests, two-sided *p* values less than 0.05 were considered statistically significant.

3. RESULTS.

3.1. Clinical features of the patients.

During the 4-months study period, 104 patients were admitted to the ED of La Timone Hospital and satisfied the study inclusion criteria. All blood samples were processed by flow cytometry, but only 85 out of 104 subjects were finally included, because 19 were identified as having incomplete clinical files, which could interfere with their final diagnosis.

On the 85 definitively remaining subjects, 7 (8%) were defined as no-infected, 38 (45%) as bacterially infected, 11 (13%) as virally infected and 29 (34%) as presenting both a bacterial and a viral infection (co-infection). An overview of the study workflow is shown in Figure 1.

3.2. Clinical epidemiology of the patients.

The final cohort was constituted by 85 patients, including 30 (35%) women and 55 (65%) men, with a mean age of 56 (± 25) years. All their epidemiological, clinical, and para-clinical data are presented in Table 1. Bacterial infections were considered as patients presenting bacterial infections only plus bacterial co-infections, whereas viral infections were considered as patients presenting viral infections only plus viral co-infections.

Considering the demographic data, no significant differences between groups were observed for the sex balance (*p: 0.22*), the mean age (*p: 0.76*), clinical histories and features of the patients. Patients had a mean elevated body temperature (38.1 ± 1.1°C), but not significantly different between groups (*p: 0.22*).

A wide range of infectious symptoms was observed among groups (respiratory, abdominal, neurological, urinary, cutaneous, and other). The most common clinical presentations associated with bacterial infections were respiratory (n=42; 63%) or neurological (n=9; 13.5%) symptoms, whereas respiratory symptoms were representative of viral conditions (n=34; 85%). As expected, based on symptoms, patients diagnosed as having bacterial infections were treated more frequently with antibiotics (n=59; 92%; *p: 0.01*). However, all patients remained at the hospital for observation for a non-significantly different duration (*p*: *0.86*).

Finally, comparison of biochemical and biological measurements showed significant differences between groups for WBC count (*p: 0.03*), and hematocrit (*p: 0.03*) and hemoglobin (*p: 0.02*) levels. PCT (*p: 0.87*) and CRP (*p: 0.21*) were not significantly different among groups. Figure 2 details differences in CRP and PCT levels between groups.

Overall, 99 common pathogen species were detected (Table 2). The most frequent pathogens were *Streptococcus pneumoniae* (36%), *Flu A virus* (24%), *Human Respiratory Syncytial Virus* (5%) and *Escherichia coli* (8%).

3.3. Biomarker levels.

Expression levels of the five biomarkers were assessed using flow cytometry: mCD169, nCD64, mHLA-DR, rHLA-ABC and mCD64. Table 3 shows their differences between groups.

Patients with bacterial infections had a higher level of nCD64 (MFI of 2.4 ± 1.4; $p < 0.01$), whereas patients with viral infections had a higher level of mCD169 (MFI of 18.8 ± 12.4; $p < 0.01$), when compared among groups.

Patients with bacterial infections also had lower mHLA-DR levels (MFI of 80.9 ± 46.7; *p: 0.01*). Conversely, patients with viral infections also had higher mHLA-DR (MFI of 104.2 ± 46.3; *p*: *0.01*) and rHLA-ABC (MFI of 4.6 ± 1.3; $p < 0.01$) levels.

Finally, mCD64 levels were not significantly different among groups (*p: 0.399*).

Figure 3 details all these MFI levels in each group.

3.4. Biomarkers' ROC analysis.

ROC analysis of the five biomarkers was finally made for evaluating their performances to identify the bacterial or viral etiology of an infection. Biomarkers potentially determined to evolve in case of bacterial infection were nCD64, mCD64 and mHLA-DR (figure 4), whereas biomarkers mostly identified to increase in the presence of a viral infection were mCD169, mHLA-DR and rHLA-ABC (figure 5).

Using a cutoff point of greater than or equal to 1.24 for patients with bacterial infections, the results showed that the nCD64 MFI showed the best bacterial discriminative performance, with a sensitivity of 90% (80–96%), specificity of 78% (52–94%), positive likelihood ratio of 4.03 (1.7–9.6), and negative likelihood ratio of 0.13 (0.06–0.3). The area under the curve was of 0.85 (0.75–0.92), positive predictive value of 93.75% (85-98%) and negative predictive value of 66.67% (45-83%).

Using a cutoff point of greater than or equal to 6.33 for patients with viral infections, the results showed that the mCD169 MFI exhibited the best clinical discrimination, with a sensitivity of 80% (64–91%), specificity of 91% (79–98%), positive likelihood ratio of 9.00 (3.5–23.2), and negative likelihood ratio of 0.22 (0.1–0.4). The area under the curve was of 0.84 (0.75–0.91), positive predictive value of 88.89% (75-96%) and negative predictive value of 83.67% (71-91%).

ROC analysis of the three other biomarkers was more balanced. Indeed, to detect bacterial infection, using a cut-off-point greater than or equal to 8.72, mCD64 MFI exhibited good sensitivity of 90% (80-96%) but lower specificity of 33% (13-59%). Conversely, using a cut-off point of less than 63.0, mHLA-DR MFI exhibited good specificity of 94% (73-100%) but low sensitivity of 42% (30-55%). To detect viral infections, using a cut-off-point greater than or equal to 60.46, mHLA-DR MFI exhibited good sensitivity of 90% (76-97%) and low specificity of 49% (34-64%), whereas, using a cut-off-point greater than or equal to 3.92, rHLA-ABC exhibited low sensitivity of 68% (51-81%) but good specificity of 89% (76-96%).

3.5. Reference testings' ROC analysis.

For a comparison with previous cellular biomarkers, Figure 6 shows the ROC curves of CRP and PCT for detection of patients with bacterial infections.

The optimal cutoff for CRP was greater than or equal to 40, with a sensitivity of 72% (59–82%), specificity of 83% (59–96%), and AUC of 0.80 (0.70–0.88). Positive predictive value was of 94.12% (84-98%) and negative predictive value was of 44.12% (29-61%).

The optimal cutoff for PCT was greater than or equal to 0.03, with a sensitivity of 90% (68–99%), specificity of 50% (1–99%), and AUC of 0.58 (0.35–0.78).

4. DISCUSSION.

This study aims to validate the interest of assessing nCD64 and mCD169 in population of patients with febrile symptoms, in a clinical context of emergency, using a new procedure of flow cytometry. Assessment of their levels, in non-infected, bacterially-infected, virally-infected or co-infected subjects, demonstrated within this study their relevance for identifying etiology of infections.

Both biomarkers had already been evaluated in ED patients [11] and in ED febrile subjects (*publication submitted in Future Microbiology*), but these preliminary evaluation did not include enough cases. A larger study with more characterized cases was thus required to robustly demonstrate their ability to discriminate between bacterial and viral infections, and this was the rationale for this study.

In this new study, particular attention was thus given to the inclusion criteria. That is why, study cohort finally achieves a total of 85 subjects, divided into four modalities: no-, bacterially-, virally- or co-infected subjects. Among those groups, each kind of infections was always represented by more than 10 subjects. Moreover, almost all cases were confirmed by a bacterial or viral isolation in biological samples (26 different pathogens found among 99 isolations). As patients were included from December to May, most frequent pathogens were respiratory: *Streptococcus pneumoniae, Flu A* virus *and Human Respiratory Syncytial Virus*. Those pathogens are expected in such a selection period, as usually reported [16].

Particular attention was also given to the systematical measurement of reference testings (CRP and PCT) for each subject to confirm the diagnosis orientation of the infections. This was respected for CRP testing, but not for PCT which use is very limited in ED. That lack was reflected in the results, because levels of CRP in each group, and its performances for diagnosing bacterial infections, were consistent with previous reports [17] : expected sensitivity is 79% (70-86%) (72% within the study) and expected specificity is 91% (85-95%) (83% within the study). However, this was not the case for PCT, for which expected sensitivity is 85% (63-95%) (90% within the study) and expected specificity is 80% (26-96%) (50% within the study) [5].

More largely, in addition to balanced sensibilities and specificities of both assays that have already been challenged in ED settings, even when correctly assessed, one of their limits resides on the fact they can give information on viral infection only by their negativity [6].

CD64 on neutrophils and CD169 on monocytes were thus the 2 main biomarkers assessed in the study by flow cytometry for discriminating bacterial but also viral infections. Ability of nCD64 to discriminate between bacterial and non-bacterial infections has been largely demonstrated for years [18], whereas mCD169 increase after infection by viruses has been only described in the recent years and constricted to certain viral species [19–21]. A prior retrospective study had already evaluated their performances for bacterial or viral orientation [11], but this was

the first time they were measured in co-infections. Results seem to indicate that both biomarkers are equally able to discriminate between bacterial and viral infections, whatever if they are isolated pathologies or mixed simultaneously, because good values of sensitivity and specificity were found, at levels close to previous studies and superior to reference testings.

Interestingly, nCD64 showed a better sensitivity of 90% than specificity of 78%, whereas mCD169 showed a better specificity of 91% than sensitivity of 80%. These results enforce the demonstration of their valuable use for infection orientation. Indeed, a biomarker used for bacterial infections needs to be as sensitive as possible to detect the majority of the cases, because any missing could prevent the patient from receiving appropriate antibiotherapy, and thus rises its risk to evolve in sepsis and potentially death. Conversely, a viral marker has to be very specific to ensure the etiology, because it allows the practitioner to send the patient back home, but also it avoids an empirical use of antimicrobial drugs [22].

This global health issue has been again illustrated in this study: the epidemiological data showed that an antibiotherapy was finally initiated in 67 out of 85 patients. Examining the whole cohort, 36 out of 38 subjects infected by bacteria, and 23 out of 29 infected by bacteria plus viruses, received antibiotics and they really needed it. But, conversely, 4 out of the 11 subjects virally infected only, and 4 out 7 not infected subjects received antibiotics whereas it could be ineffective or, even more, dangerous [23]. As a consequence of their usefulness for etiological orientation, both biomarkers could thus be incorporated as part of the overall clinical management of patients with fever, and evaluated as valuable prognosis for antibiotherapy initiation, duration and end [24].

Other three secondary biomarkers were evaluated in the study: HLA-DR on monocytes, HLA-ABC ratio of monocytes/neutrophils and CD64 on monocytes. Both first biomarkers have been identified among 13 other leucocyte biomarkers as being the most promising for infectious orientation (*publication submitted in Future Microbiology*), and the third one has been considered in some studies for comparison to nCD64. Indeed, first, HLA-DR is widely known to be decreased in sepsis subjects [25], but also, as it is the major histocompatibility class II, it has already been seen also as increased in case of viral infections (*publication submitted in Future Microbiology*). Secondly, rHLA-ABC is less frequently evaluated, but normally increases in case of infection by a virus [26]. Finally, mCD64 is known to evolve similarly as nCD64, by increasing in case of bacterial infection, but normally with lower performances [27]. All were thus evaluated in this study to make clearer and confirm their promising use for infectious orientation. Unfortunately, they did not show expected performances: either their sensitivity or their specificity were not sufficient enough to ensure effective identification of bacterial or viral infections.

Finally, one major issue is to measure the biomarkers in ED clinical practice. The ED environment is complex and dynamic and thus requires technologies tailored specifically for prevention, diagnostic, and outcomes of infections, to enhance patient safety in emergency care. There, a new solution was brought by asssessing the expression levels of the markers using an innovative, 15-minute, one-step method of flow cytometry [14]. This procedure may meet the minimum characteristics required for a bacterial versus viral bedside test, as targeted by Dittrich team [28]: although EDTA blood samples were those tested for this non-interventional study, the use of a capillary blood drop could be potentially permitted as only 5 µL are necessary, reagent storage and laboratory procedures are carried out at room temperature, and all steps for testing the samples are combined into one step, with no specific material or training needed. In summary, this assay yields results in less than 15 minutes from initial blood collection, with discriminative power greater than other existing tests. However, the bedside procedure applied therein keeps, for the moment, limitation regarding the instrument: on the one hand, MFI measurements would

necessitate standardization efforts to avoid variations due to instrument setup, and on the other hand, work has to be done for flow cytometer and analysis automation.

The study keeps other limitations. First, patients were enrolled from the ED during approximately 5 months, and only within one Emergency Department from one hospital. Even if it gives a good representation of the most common infections, it is not sufficient to provide a complete validation of biomarkers. In future studies, it might be preferred to extend the study to other Emergency Departments from other hospitals. Secondly, biomarkers seemed to be useful for infected patients, but their kinetics are not known at all. It appears important to understand their delay of onset after infection and their sequential evolution in blood circulation. Future research should thus focus on confirming these biomarkers on sequential samples from same subjects, and to evaluate their prognosis value both for the infection and the therapy durations.

5. CONCLUSION.

In summary, CD64 and CD169 were confirmed to be biomarkers of interest to predict bacterial versus viral causes of fever. Flow cytometry is currently the universally applied method for identifying cell surface markers, but in this context, its availability remained limited in emergency settings. As part of a global effort, this study makes available the measurement of the infection-related biomarkers using a new flow cytometry procedure, promisingly applicable at the point-of-care. This association is promising to facilitate an easy, rapid and robust diagnostic of infections and thus the successful care of patients presenting to Emergency Department.

REFERENCES.

[1] Ray P, Badarou-Acossi G, Viallon A, Boutoille D, Arthaud M, Trystram D, et al. Accuracy of the cerebrospinal fluid results to differentiate bacterial from non bacterial meningitis, in case of negative gram-stained smear. Am J Emerg Med 2007;25:179–84. https://doi.org/10.1016/j.ajem.2006.07.012.

[2] Kutz A, Florin J, Hausfater P, Amin D, Amin A, Haubitz S, et al. Predictors for Delayed Emergency Department Care in Medical Patients with Acute Infections – An International Prospective Observational Study. PLOS ONE 2016;11:e0155363. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155363.

[3] Ray P, Birolleau S, Lefort Y, Becquemin M-H, Beigelman C, Isnard R, et al. Acute respiratory failure in the elderly: etiology, emergency diagnosis and prognosis. Crit Care 2006;10:R82. https://doi.org/10.1186/cc4926.

[4] Hausfater P, Juillien G, Madonna-Py B, Haroche J, Bernard M, Riou B. Serum procalcitonin measurement as diagnostic and prognostic marker in febrile adult patients presenting to the emergency department. Crit Care 2007;11:R60. https://doi.org/10.1186/cc5926.

[5] Tang BM, Eslick GD, Craig JC, McLean AS. Accuracy of procalcitonin for sepsis diagnosis in critically ill patients: systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis 2007;7:210–7. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70052-X.

[6] Uzzan B, Cohen R, Nicolas P, Cucherat M, Perret G-Y. Procalcitonin as a diagnostic test for sepsis in critically ill adults and after surgery or trauma: A systematic review and meta-analysis: Crit Care Med 2006;34:1996–2003. https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000226413.54364.36.

[7] Nijman RG, Vergouwe Y, Thompson M, van Veen M, van Meurs AHJ, van der Lei J, et al. Clinical prediction model to aid emergency doctors managing febrile children at risk of serious bacterial infections: diagnostic study. BMJ 2013;346:f1706–f1706. https://doi.org/10.1136/bmj.f1706.

[8] Le Bel J, Chenevier-Gobeaux C, Blanc F-X, Benjoar M, Ficko C, Ray P, et al. Diagnostic accuracy of C-reactive protein and procalcitonin in suspected community-acquired pneumonia adults visiting emergency department and having a systematic thoracic CT scan. Crit Care 2015;19:366. https://doi.org/10.1186/s13054-015-1083-6.

[9] Kapasi AJ, Dittrich S, González IJ, Rodwell TC. Host Biomarkers for Distinguishing Bacterial from Non-Bacterial Causes of Acute Febrile Illness: A Comprehensive Review. PLOS ONE 2016;11:1–29. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160278.

[10] van Houten CB, de Groot JAH, Klein A, Srugo I, Chistyakov I, de Waal W, et al. A host-protein based assay to differentiate between bacterial and viral infections in preschool children (OPPORTUNITY): a double-blind, multicentre, validation study. Lancet Infect Dis 2017;17:431–40. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30519-9.

[11] Bourgoin P, Soliveres T, Ahriz D, Arnoux I, Meisel C, Unterwalder N, et al. Clinical research assessment by flow cytometry of biomarkers for infectious stratification in an Emergency Department. Biomark Med 2019. https://doi.org/10.2217/bmm-2019-0214.

[12] Jämsä J, Ala-Kokko T, Huotari V, Ohtonen P, Savolainen E-R, Syrjälä H. Neutrophil CD64, C-reactive protein, and procalcitonin in the identification of sepsis in the ICU — Post-test probabilities. J Crit Care 2018;43:139–42. https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2017.08.038.

[13] van der Kuyl AC, van den Burg R, Zorgdrager F, Groot F, Berkhout B, Cornelissen M. Sialoadhesin (CD169) Expression in CD14+ Cells Is Upregulated Early after HIV-1 Infection and Increases during Disease Progression. PLoS ONE 2007;2:e257. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000257.
[14] Bourgoin P, Hayman J, Rimmelé T, Venet F, Malergue F, Monneret G. A novel one-step extracellular staining for flow cytometry: Proof-of-concept on sepsis-related biomarkers. J Immunol Methods 2019;470:59–63. https://doi.org/10.1016/j.jim.2019.05.001.
[15] Hu L, Shi Q, Shi M, Liu R, Wang C. Diagnostic Value of PCT and CRP for Detecting Serious Bacterial Infections in Patients With Fever of Unknown Origin: A Systematic Review and Meta-analysis. Appl Immunohistochem Mol Morphol 2017;25:e61–9. https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000552.
[16] Cuquemelle E, Soulis F, Villers D, Roche-Campo F, Ara Somohano C, Fartoukh M, et al. Can procalcitonin help identify associated bacterial infection in patients with severe influenza pneumonia? A multicentre study. Intensive Care Med 2011;37:796–800. https://doi.org/10.1007/s00134-011-2189-1.
[17] Cid J, Aguinaco R, Sánchez R, García-Pardo G, Llorente A. Neutrophil CD64 expression as marker of bacterial infection: A systematic review and meta-analysis. J Infect 2010;60:313–9. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2010.02.013.
[18] Xiong S-D, Pu L-F, Wang H-P, Hu L-H, Ding Y-Y, Li M-M, et al. Neutrophil CD64 Index as a superior biomarker for early diagnosis of infection in febrile patients in the hematology department. Clin Chem Lab Med CCLM 2017;55:82–90. https://doi.org/10.1515/cclm-2016-0118.
[19] Ashokkumar C, Gabriellan A, Ningappa M, Mazariegos G, Sun Q, Sindhi R. Increased Monocyte Expression of Sialoadhesin During Acute Cellular Rejection and Other Enteritides After Intestine Transplantation in Children: Transplantation 2012;93:561–4. https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3182449189.
[20] Kim W-K, McGary CM, Holder GE, Filipowicz AR, Kim MM, Beydoun HA, et al. Increased Expression of CD169 on Blood Monocytes and Its Regulation by Virus and CD8 T Cells in Macaque Models of HIV Infection and AIDS. AIDS Res Hum Retroviruses 2015;31:696–706. https://doi.org/10.1089/aid.2015.0003.
[21] Rempel H, Calosing C, Sun B, Pulliam L. Sialoadhesin Expressed on IFN-Induced Monocytes Binds HIV-1 and Enhances Infectivity. PLoS ONE 2008;3:1–9. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001967.
[22] Liang SY, Theodoro DL, Schuur JD, Marschall J. Infection Prevention in the Emergency Department. Ann Emerg Med 2014;64:299–313. https://doi.org/10.1016/j.annemergmed.2014.02.024.
[23] Ventola CL. The Antibiotic Resistance Crisis. Pharm Ther 2015;40:277–83.
[24] Tang Z, Qin D, Tao M, Lv K, Chen S, Zhu X, et al. Examining the utility of the CD64 index compared with other conventional indices for early diagnosis of neonatal infection. Sci Rep 2018;8:1–7. https://doi.org/10.1038/s41598-018-28352-7.
[25] Guillaume Monneret, Morgane Gossez, Nima Aghaeepour, Brice Gaudilliere, Fabienne Venet. How clinical flow cytometry rebooted sepsis immunology. Cytometry A 2019. https://doi.org/10.1002/cyto.a.23749.
[26] Nuutila J, Jalava-Karvinen P, Hohenthal U, Kotilainen P, Pelliniemi T-T, Nikoskelainen J, et al. A rapid flow cytometric method for distinguishing between febrile bacterial and viral

infections. J Microbiol Methods 2013;92:64–72. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.11.005.

[27] Groselj-Grenc M, Ihan A, Derganc M. Neutrophil and Monocyte CD64 and CD163 Expression in Critically Ill Neonates and Children with Sepsis: Comparison of Fluorescence Intensities and Calculated Indexes. Mediators Inflamm 2008;2008:1–10. https://doi.org/10.1155/2008/202646.

[28] Dittrich S, Tadesse BT, Moussy F, Chua A, Zorzet A, Tängdén T, et al. Target Product Profile for a Diagnostic Assay to Differentiate between Bacterial and Non-Bacterial Infections and Reduce Antimicrobial Overuse in Resource-Limited Settings: An Expert Consensus. PLOS ONE 2016;11:e0161721. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161721.

LEGEND TO THE TABLES.

Table 1. Cohort study characteristics. Clinical and biological data for the whole cohort. Values are presented either as means ± standard deviations or as numbers with percentages. Bacterial infections are defined by bacterially-infected plus bacterially-co-infected subjects, whereas viral infections are defined by virally-infected plus virally-co-infected subjects. Variables for which *p* values were less than $\alpha = 5\%$ are indicated in bold with * to indicate statistically significant differences between all groups.

Table 2. Identification of pathogens in the cohort. Name and number (percentages in brackets) of isolated bacteria and viruses in the whole cohort.

Table 3. Flow cytometry assessments. Mean Fluorescence Intensities (MFI) of CD64 on neutrophils (nCD64), CD169 on monocytes (mCD169), HLA-DR on monocytes (mHLA-DR), HLA-ABC ratio (rHLA-ABC) and CD64 on monocytes (mCD64). Data are presented as mean ± standard deviations of levels of expression of these five biomarkers in no-infected (control), bacterially infected, virally infected or co-infected subjects. Variables for which *p* values were less than $\alpha = 5\%$, in comparison to those of the control group, are indicated in bold with * to indicate statistically significant differences between all groups.

LEGEND TO THE FIGURES.

Fig 1. Overview of the study workflow. Representation of each step of the study, conducted between the Emergency Department (ED) and the Hematology Laboratory (HL) of La Timone Hospital, with final numbers of included and excluded subjects, and details about clinical kinds of infections.

Fig 2. CRP and PCT levels in the four groups of patients. (A) CRP measurement in mg/L and (B) PCT levels in ng/L, in patients with i) no infection (control group), ii) bacterial infection, iii) viral infection or iv) co-infection.

Fig 3. Biomarker levels in the four groups of patients. (A) nCD64, (B) mCD169, (C) mHLA-DR, (D) rHLA-ABC and (E) mCD64 levels of expression in patients with i) no infection (control group), ii) bacterial infection, iii) viral infection or iv) co-infection.

Fig 4. ROC analysis for bacterial identification. ROC curves for the discrimination of bacterial infections with (A) nCD64, (B) mCD64 and (C) mHLA-DR. Optimal thresholds for each biomarker are indicated with calculated values of specificity (Sp) and sensitivity (Se). Areas under the curve (AUC) and 95% confidence intervals are also given for each ROC analysis.

Fig 5. ROC analysis for viral identifications. ROC curves for the discrimination of viral infections with (A) mCD169, (B) mHLA-DR and (C) rHLA-ABC. Optimal thresholds for each biomarker are indicated with calculated values of specificity (Sp) and sensitivity (Se). Areas under the curve (AUC) and 95% confidence intervals are also given for each ROC analysis.

Fig 6. ROC analysis for CRP and PCT. (A) CRP and (B) PCT ROC curves for diagnosis of bacterial infections. Optimal thresholds for each biomarker are indicated with calculated values of specificity (Sp) and sensitivity (Se). Areas under the curve (AUC) and 95% confidence intervals are also given for each ROC analysis.

TABLES.

Table 1. Cohort study characteristics.

Variable	Characteristic	Whole cohort (n=85)	Bacterial infections (n=67)	Viral infections (n=40)	p-value
Demography					
Patient sex	Women	30 (35%)	28 (42%)	12 (30%)	0.22
	Men	55 (65%)	39 (58%)	28 (70%)	
Patient age	Years	56 ± 25	59 ± 25	58 ± 26	0.76
Clinical history	Medical institutionalization	2 (2.4%)	2 (3%)	1 (2.5%)	1.00
	Altered Mental Status	2 (2.4%)	2 (3%)	1 (2.5%)	1.00
	Evolutionary Cancer	1 (1.2%)	1 (1.5%)	0 (0%)	1.00
	Liver Disease	1 (1.2%)	1 (1.5%)	1 (2.5%)	1.00
	Congestive Heart Failure	4 (4.7%)	4 (6%)	1 (2.5%)	0.65
	Cerebrovascular Disease	2 (2.4%)	2 (3%)	0 (0%)	0.53
Constants	Systolic Blood Pressure (mm Hg)	131 ± 27	131 ± 26	132 ± 28	0.87
	Diastolic Blood Pressure (mm Hg)	72 ± 16	71 ± 15	71 ± 18	0.90
	Average Blood Pressure (mm Hg)	92 ± 18	91 ± 17	91 ± 20	0.88
	Pulse rate (bpm)	100 ± 21	100 ± 21	102 ± 22	0.64
	Respiratory rate (b)	21 ± 7	22 ± 7	22 ± 7	0.89
Oxygenotherapy	Initiated	15 (18%)	15 (22%)	11 (27.5%)	0.64
	Oxygen saturation (%)	96 ± 4	96 ± 5	95 ± 5	0.47
Fever	Body temperature (°C)	38.1 ± 1.1	38.0 ± 1.2	38.3 ± 1.1	0.22
	Duration (days)	40 ± 29	41 ± 30	45 ± 30	0.62
Physiology and Symptomatology					
Clinical Symptoms	Respiratory	54 (63.5%)	42 (63%)	34 (85%)	0.14
	Abdominal	14 (16.5%)	8 (12%)	4 (10%)	
	Neurological	9 (10.6%)	9 (13.5%)	1 (2.5%)	
	Urinary	6 (7.1%)	6 (9%)	1 (2.5%)	
	Cutaneous	1 (1.2%)	1 (1.5%)	0 (0%)	
	Other	1 (1.2%)	1 (1.5%)	0 (0%)	
Antibiotherapy	Initiated	67 (78.8%)	59 (92%)	27 (71%)	**0.01***
Hospitalization	Duration (days)	5 ± 8	6 ± 9	5 ± 8	0.86
Post-Hospitalization	Back home	32 (37.6%)	20 (30%)	13 (32.5%)	0.82
	Conventional hospitalization	50 (58.8%)	45 (67%)	25 (62.5%)	
	Critical Care hospitalization	3 (3.5%)	2 (3%)	2 (5%)	
Biology and Biochemistry					
Biological Measurements	CRP (mg/mL)	79 ± 82	92 ± 86	72 ± 71	0.21
	PCT (ng/mL)	0.6 ± 1.2	0.6 ± 1.3	0.7 ± 1.0	0.87
	White Blood Cells (G/L)	11 ± 6	12 ± 7	9 ± 4	**0.03***
	Polymorphonuclear cells (G/L)	9 ± 7	10 ± 7	7 ± 5	0.10
Biochemical constants	Urea (mmol/L)	6 ± 4	7 ± 4	7 ± 5	0.90
	Natremia (mmol/L)	138 ± 4	138 ± 4	138 ± 4	0.87
	Glucose (mmol/L)	7 ± 9	8 ± 10	7 ± 3	0.70
	Hematocrit (%)	40 ± 6	40 ± 6	42 ± 5	**0.03***
	Hemoglobin (g/L)	136 ± 24	134 ± 20	143 ± 19	**0.02***

TABLES.

Table 2. Identification of pathogens in the cohort.

Pathogen identified	Number isolated (n=99)
Respiratory	
Streptococcus pneumoniae	36 (36%)
Flu A virus	24 (24%)
Human Respiratory Syncytial Virus	5 (5%)
Rhinovirus	3 (%)
Mycoplasma pneumoniae	1 (1%)
Legionella	1 (1%)
Pseudomonas aeruginosa	1 (1%)
Streptococcus oralis	1 (1%)
Acinetobacter iwoffi	1 (1%)
Coxiella Burnetti	1 (1%)
Urinary	
Escherichia coli	8 (8%)
Cytomegalovirus	2 (2%)
Chlamydia	1 (1%)
Proteus mirabilis	1 (1%)
Gastrointestinal	
Enterococcus faeacalis	1 (1%)
Norovirus	1 (1%)
Campylobacter jejuni	1 (1%)
Yersinia	1 (1%)
Shighella	1 (1%)
Salmonella	1 (1%)
Other *Gram Negative Bacillus*	1 (1%)
Hematological	
Hepatitis B Virus	2 (2%)
Hepatitis C Virus	1 (1%)
Human Immunodeficiency Virus	1 (1%)
Epstein-Barr Virus	1 (1%)
Cutaneous	
Morexella osloensis	1 (1%)

TABLES.

Table 3. Flow cytometry assessments.

Biomarkers' MFI (Mean ± SD)	Whole cohort (n=85)	Bacterial infections (n=67)	Viral infections (n=40)	p-value
nCD64	2.1 ± 1.3	2.4 ± 1.4	1.7 ± 0.6	**< 0.01***
mCD169	11.7 ± 11.3	10.3 ± 9.9	18.8 ± 12.4	**< 0.01***
mHLA-DR	85.7 ± 45.3	80.9 ± 46.7	104.2 ± 46.3	**0.01***
rHLA-ABC	3.9 ± 1.3	3.6 ± 1.1	4.6 ± 1.3	**< 0.01***
mCD64	12.8 ± 4.6	13.1 ± 4.7	13.9 ± 3.6	0.40

FIGURES.

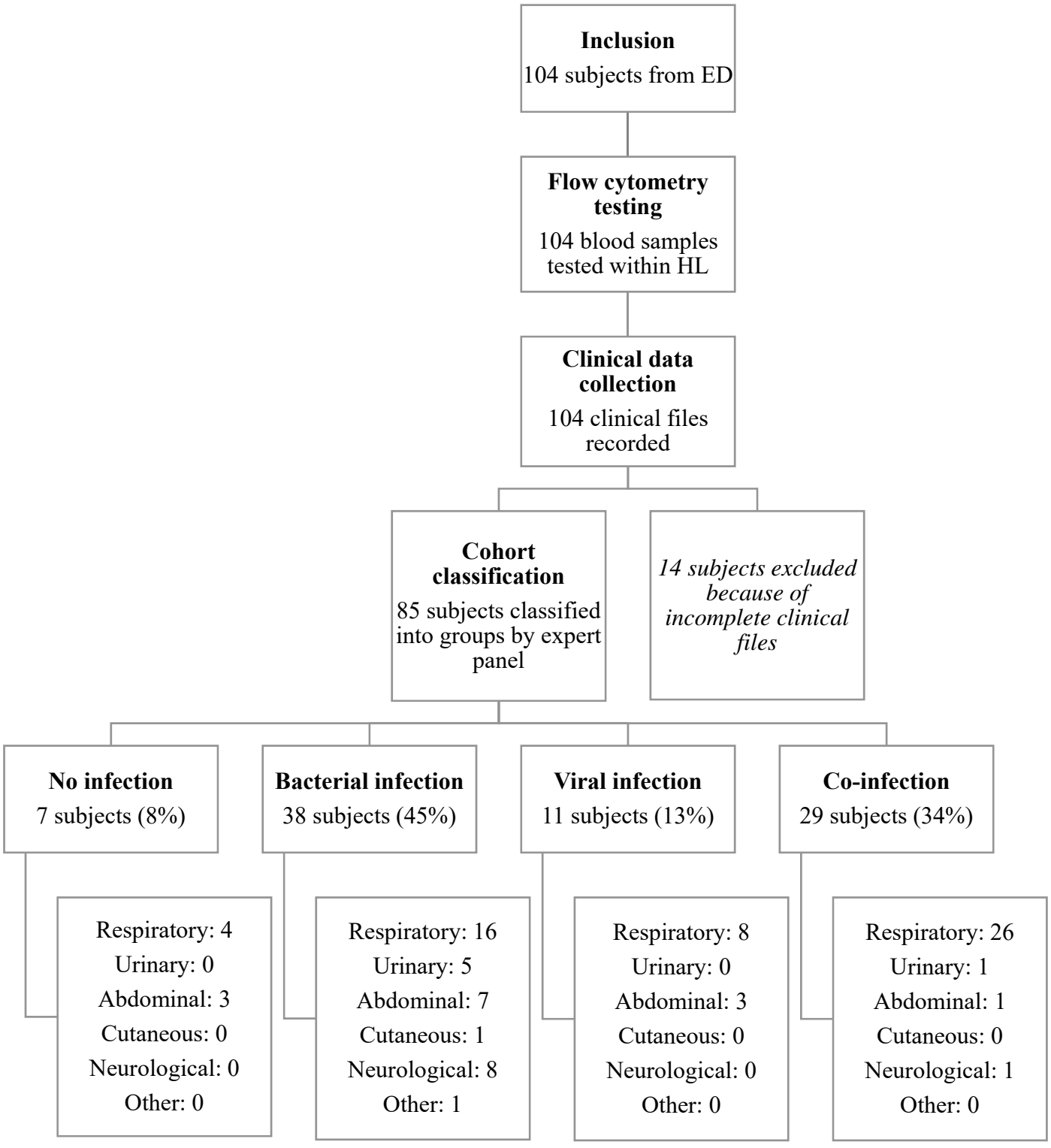
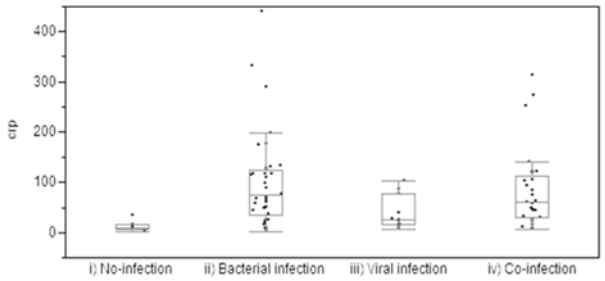


Fig 1. Overview of the study workflow.

FIGURES.

(A)



(B)

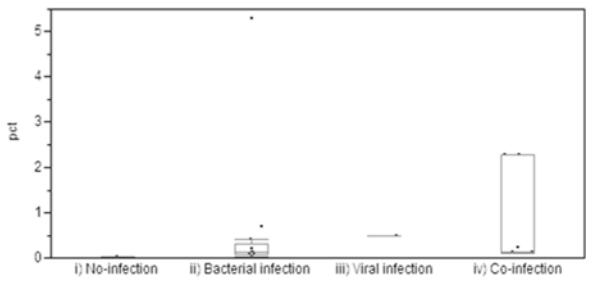


Fig 2. CRP and PCT levels in the four groups of patients.

FIGURES.

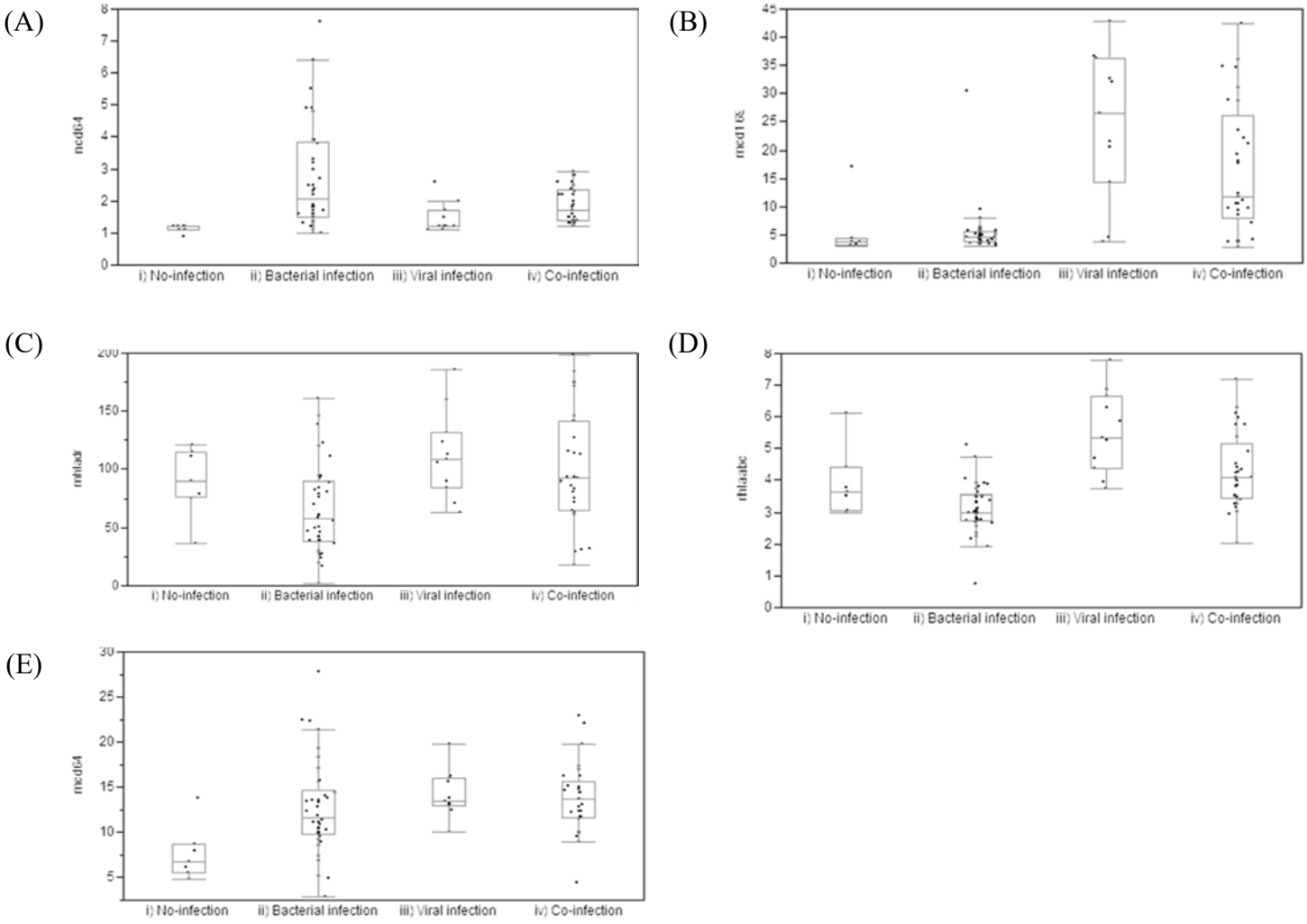
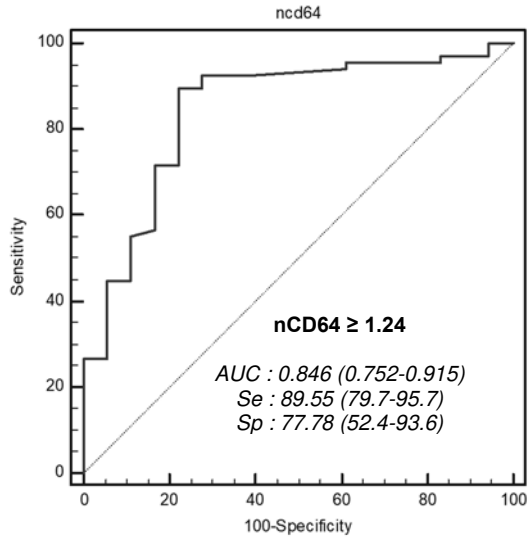


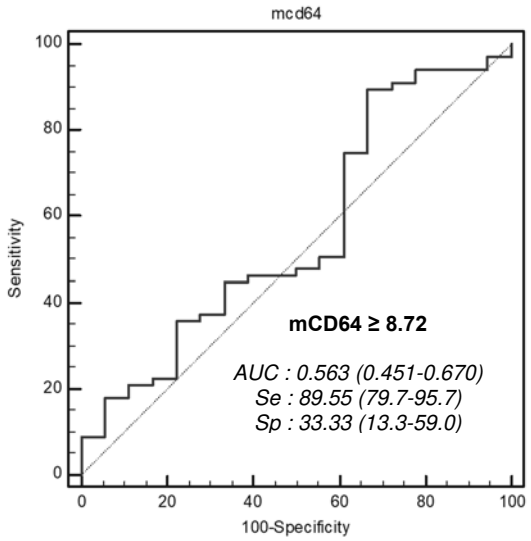
Fig 3. Biomarker levels in the four groups of patients.

FIGURES.

(A)



(B)



(C)

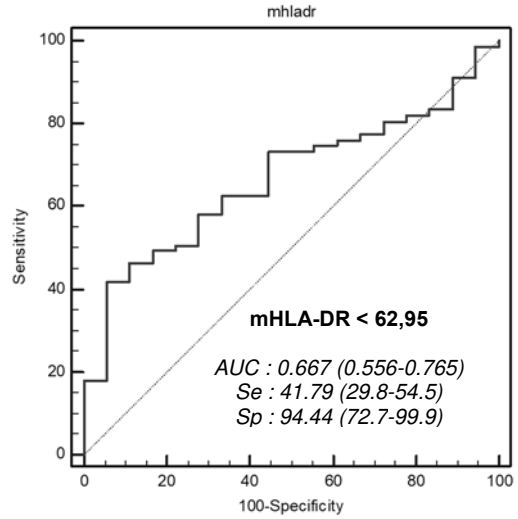


Fig 4. ROC analysis for bacterial identification.

FIGURES.

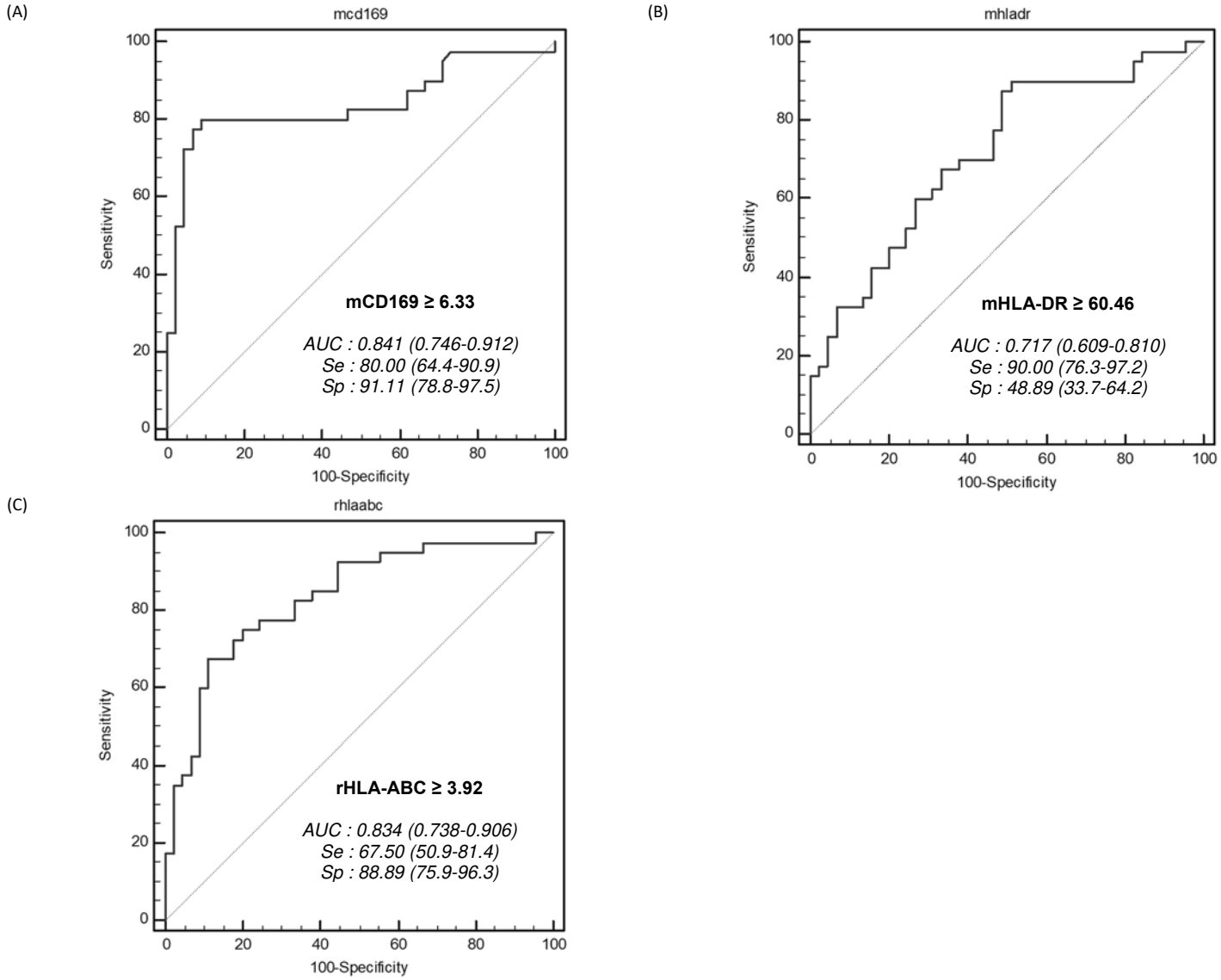


Fig 5. ROC analysis for viral identification.

FIGURES.

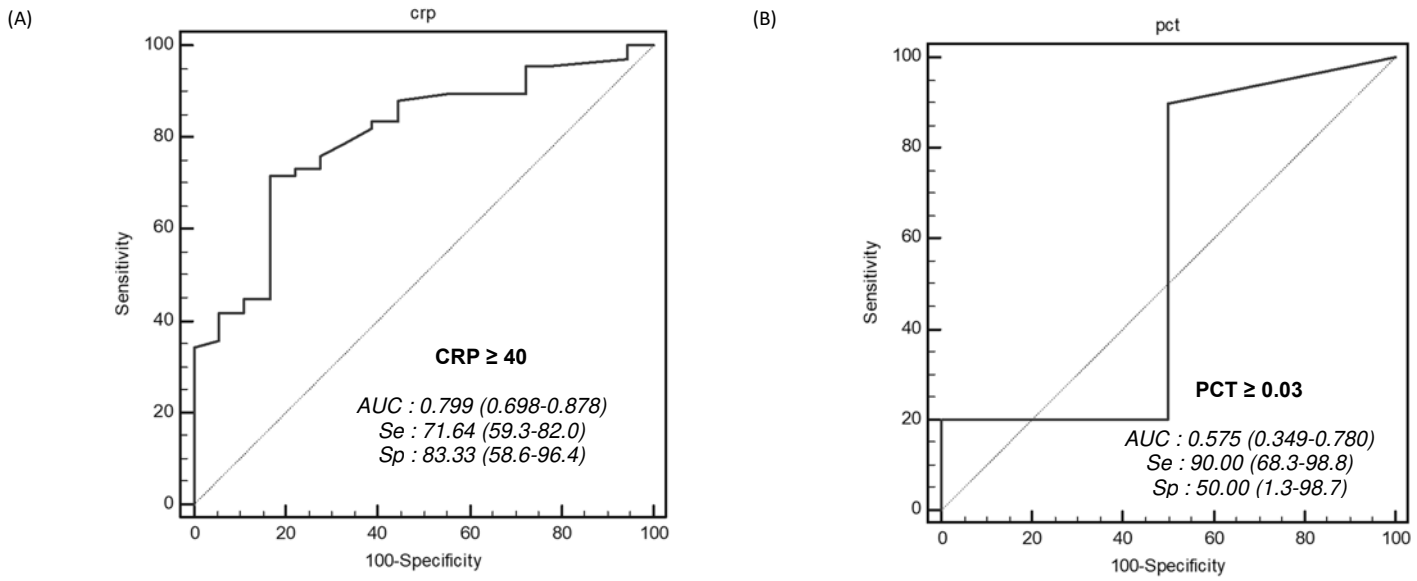


Fig 6. ROC analysis for CRP and PCT.

Figure 51 : La cytométrie en flux pour des biomarqueurs liés aux infections : une étude de faisabilité dans les configurations des Urgences. *Publication en cours de soumission dans la revue European Journal of Emergency Medicine, portant sur l'évaluation des performances cliniques des biomarqueurs CD64 et CD169 et la confirmation de l'intérêt de mesurer les biomarqueurs HLA-ABC et HLA-DR, par une technique de cytométrie en flux « au lit du patient », pour le diagnostic de l'étiologie infectieuse dans un service d'Urgences.*

Les résultats sont l'évaluation des performances diagnostiques des biomarqueurs CD64, CD169, HLA-DR et HLA-ABC dans une cohorte de patients fébrile précise des Urgences.

En effet, plus de 100 patients ont été intégrés à l'étude en saison hivernale (Décembre 2018 à Mai 2019), mais au regard des critères d'inclusion et d'exclusion stricts définis, seuls 85 ont finalement été étudiés. Parmi eux, 7 sujets (8%) ne présentaient pas d'infections, 38 (45%) présentaient une infection bactérienne, 11 (13%) une infection virale, et pour la première fois, 29 sujets (34%) présentaient une co-infection bactérienne et virale. Ces modalités étaient représentées par une majorité d'infections respiratoires (n=76 ; 89%), avec comme agents pathogènes isolés le plus fréquemment *Streptococcus pneumoniae* (36%), le virus de la Grippe A (24%), et le virus syncytial respiratoire humain (5%).

La mesure du CD64 sur les neutrophiles, à un seuil supérieur à 1,24 en MFI, restait capable de discriminer les infections bactériennes des infections non-bactériennes avec une sensibilité de 90% et une spécificité de 78%. Dans la publication, les infections bactériennes, qui ont servi à déterminer ces performances, regroupaient les infections bactériennes seules et les co-infections. Si l'on n'évalue ces performances que sur les infections bactériennes seules, le CD64 a une sensibilité de 87% et une spécificité de 78%. Il n'y a donc pas d'incidence des co-infections sur les performances du nCD64.

La mesure du CD169 sur les monocytes, à un seuil supérieur à 6,33 en MFI, restait capable de discriminer les infections virales des infections non-virales avec une sensibilité de 80% et une spécificité de 91%. De même, les infections virales, qui ont servi à déterminer ces performances, regroupaient les infections virales seules et les co-infections. Si l'on n'évalue ces performances que sur les infections virales seules, le CD169 a une sensibilité de 82% et une spécificité de 96%. Il y a donc une légère incidence des co-infections sur les performances du mCD169.

Néanmoins, ces performances restent élevées pour les deux biomarqueurs, et confirment l'intérêt d'évaluer ces biomarqueurs pour discriminer les infections bactériennes et virales, et ont validé leur utilisation dans le cadre de co-infections bactériennes et virales. Il est important de noter que leurs seuils ont changé suite à l'optimisation des concentrations en anticorps inclus dans le test.

Les autres biomarqueurs ont malheureusement obtenu des performances moindres.

La CRP et la PCT ont aussi obtenu des performances moindres avec respectivement des valeurs de sensibilité de 72 et 90%, et des valeurs de spécificité de 83 et 50%. Les performances moindres de la PCT par rapport à la CRP sont expliquées par le nombre de patients moins systématiquement testés avec la PCT et la CRP. Cette baisse dans l'effectif a ainsi un impact direct sur les performances.

Ainsi, cette étude vient en application de la validation clinique du test dans une situation médicale précise qui est la discrimination des pathologies infectieuses fébriles en saison hivernale.

D'une part, il est intéressant de noter que les biomarqueurs donnent des orientations équivalentes aux études de validation : l'augmentation de l'expression du nCD64 ou la diminution de celle du mHLA-DR sont indicatrices d'une infection bactérienne, alors que les augmentations des expressions du mCD169, mHLA-DR et rHLA-ABC révèlent une infection virale.

Comme indiqué, la validation clinique précédente des biomarqueurs a été faite avec la technique de cytométrie en flux «au lit du patient » non optimisée, alors que cette étude a bénéficié de la caractérisation complète des réactifs. Pour interpréter au mieux ces limites, il aurait été intéressant d'établir les nouvelles valeurs de référence de cette procédure optimisée.

D'autre part, même si la technique était optimisée, il ne s'agissait pas d'un test définitivement fait « au lit du patient » puisque, non seulement, l'instrument et l'analyse des résultats ne sont toujours pas automatisés pour être placé en service d'Urgences, mais aussi car tester du sang capillaire de sujets est un acte interventionnel qui nécessite des cadres éthiques qui sortent de la routine des sujets. Même si les biomarqueurs sont performants, des études devront venir évaluer le prototype final dans sa globalité. De même, d'autres études doivent être maintenant réalisées hors du cadre des urgences adultes pour valider plus globalement l'intérêt des biomarqueurs, et les évaluer progressivement sur des échantillons cliniques pathologiques bien caractérisés (démarche progressive par contexte ou par type de pathologies).

2.4.2. Le sepsis bactérien en réanimation

Les états septiques sévères associent une infection bactérienne ou fongique et une réponse inflammatoire systémique chez les patients. Ils représentent la première cause de mortalité en service de réanimation et sont caractérisés par la survenue d'une immunodépression majeure [119]. Une défaillance immunitaire similaire est observée chaque fois que l'organisme développe un rétrocontrôle négatif visant à moduler une réponse inflammatoire systémique – ce qui est le cas chez un grand nombre de patients de réanimation (après un polytraumatisme, une brûlure grave, une chirurgie lourde, une pancréatite aigüe, un accident vasculaire cérébral….). Cette défaillance immunitaire amplifie significativement le risque d'infection nosocomiale secondaire dû aux risques inhérents à la réanimation (procédures vulnérantes, dispositifs invasifs).

L'objectif du travail a été d'évaluer l'expression des biomarqueurs cellulaires sur des patients en choc septique, suivis ensuite pendant la première semaine au jour (J)1, J3-4 puis J7-8.

L'hypothèse est que la mesure des expressions des CD64, CD169, HLA-DR et autres biomarqueurs liés aux infections, dans le temps, devrait permettre de suivre les stades infectieux et d'immunosuppression des patients pour améliorer leur prise en charge.

La première partie du travail a été de mesurer les biomarqueurs infectieux chez 11 patients sains et 11 patients en état de choc septique (figure 52).

Les 11 sujets sains étaient des patients du service de réanimation n'ayant pas déclaré d'infections (patients transplantés, patients brûlés, patients ayant subi une chirurgie lourde). Les 11 autres sujets étaient des patients du service de réanimation ayant déclaré un choc septique, et étaient représentés par 3 femmes et 8 hommes. Leur âge moyen était de 72 ans, leur Indice de Gravité Simplifié II moyen (*Simplified Acute Physiology Score II* – SAPS II) était de 59, et leur Evaluation des Dysfonctionnements d'Organes Séquentiels moyenne (*Sequential Organ Failure Assessment* – SOFA) était de 11. Quatre patients (36%) sont morts dans les 28 jours.

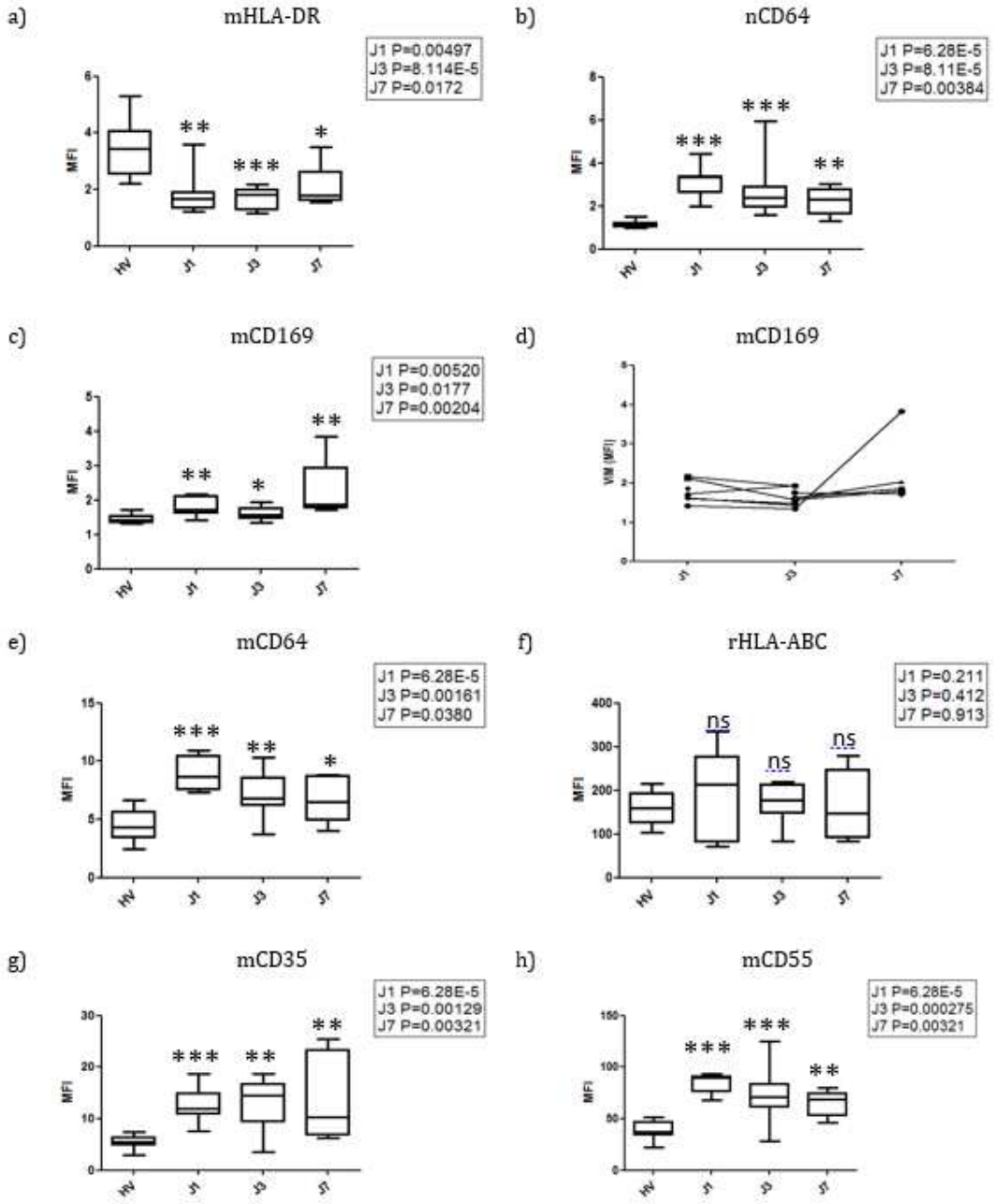


Figure 52 : Biomarqueurs infectieux chez des patients sepsis. *Evaluation des moyennes d'intensité de fluorescence (MFI) de l'HLA-DR sur les monocytes (mHLA-DR ; a), du CD64 sur les neutrophiles (nCD64 ; b), du CD169 sur les monocytes (mCD169 ; c et d), du CD64 sur les monocytes (mCD64 ; e), de l'HLA-ABC sur les monocytes/neutrophiles (ratio rHLA-ABC ; f), du CD35 sur les monocytes (mCD35 ; g) et du CD55 sur les monocytes (mCD55 ; h). Les valeurs sont obtenues avec la technique de cytométrie en flux « au lit du patient » dans les échantillons de sang total de 11 donneurs sains (HV) et 11 patients en état de choc septique de l'Hôpital Edouard Herriot (Lyon) (J1, J3, J7), ayant donné leurs consentements formels (étude NCT02803346). Les valeurs sont représentées comme les quantiles des deux populations et un test-t de Student permet de montrer leurs différences significatives lorsque la valeur-p est inférieure à 0,05 (*), à 0,01 (**) ou à 0,001 (***) (ns : p > 0,05).*

Les résultats montrent que la mesure de l'HLA-DR sur les monocytes, indicateur de référence chez les patients sepsis en réanimation, est significativement diminué chez les patients en état de choc septique à leur admission (*p : 0,005*), en comparaison à des sujets sains. Cette immunodépression semble atteindre sa réactivité maximale après 3 jours d'admission où le niveau de mHLA-DR est significativement très diminué (*p < 0,001*), mais semble commencer à se résoudre après 7 jours d'admission où le niveau de mHLA-DR est moins significativement diminué (*p : 0,017*). Cette variation du niveau du mHLA-DR est peut-être liée au succès de traitements thérapeutiques immunostimulateurs (IFNγ, GM-CSF).

Lorsque l'on mesure les biomarqueurs d'intérêt nCD64 et mCD169, on voit que les patients sepsis présentent des niveaux de nCD64 significativement très élevés (*p < 0,001*) par rapport aux sujets sains à leurs premiers et troisièmes jours en état de choc septique, témoin de leur infection bactérienne. En revanche, le nCD64 est moins significativement élevé (*p : 0,004*) après 7 jours d'admission ; ce retour vers une valeur comparable à celle de sujets sains laisse imaginer que le marqueur est potentiellement indicateur d'un succès thérapeutique par antibiothérapie.

Le biomarqueur CD169 est significativement, mais très peu, élevé chez les patients en premier jour de choc septique (*p < 0,001*). Cetté élévation du mCD169 à J1 témoigne peut-être de l'implication du marqueur dans la mise en place de la tolérance à l'endotoxine. Chez ces patients en état de choc septique sévère, il est aisé de comprendre que le marqueur révèle en effet davantage ce processus de l'organisme que l'identification d'une infection virale. D'ailleurs, par la suite, le marqueur semble revenir vers une valeur proche de celle des sujets sains après 3 jours d'admission. De même, en étudiant les valeurs individuelles des patients, on comprend que la différence significative de son niveau à J7 n'est due en fait qu'à un seul patient, ayant probablement eu une réactivation virale suite à son immunodépression, alors que tous les autres patients se situent plutôt à une valeur proche des sujets sains. Le marqueur CD169 chez les patients sepsis semble rester un marqueur utile pour détecter une infection virale secondaire.

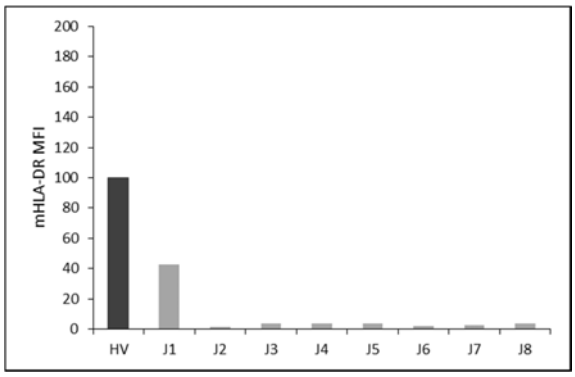
Les autres biomarqueurs infectieux évalués dans cette étude évoluent comme attendus : les marqueurs mCD64, mCD35 et mCD55 sont significatevement élevés chez les patients en état de choc septiques à leur admission (*p < 0,001*), témoignant de leurs infections bactériennes, puis semblent ensuite suivre le cours de leurs soins par antibiothérapies, en se rapprochant de valeurs moins significativement élevées (*p < 0,01)* ; à l'inverse, le ratio HLA-ABC reste non significativement élevé chez ces patients durant toute leur admission (*p > 0,05*), ce qui est cohérent puisqu'il révèle normalement une potentielle infection virale.

La seconde partie du travail est donc d'essayer de comprendre et de documenter le lien entre les évolutions de ces marqueurs et les données cliniques complexes de ces patients de réanimation (antibiothérapie, mortalité, survenue d'infections nosocomiales).

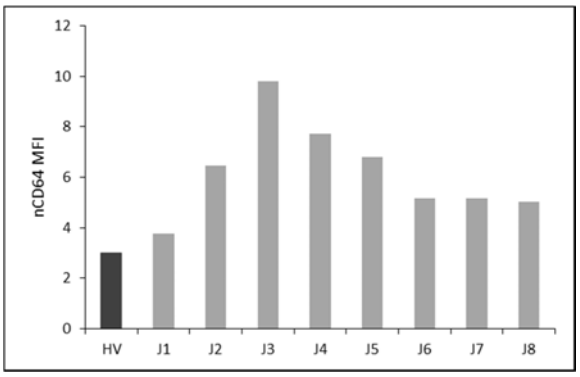
Ce travail a été initié en collaboration avec l'Hôpital Européen (Marseille), mais la sélection des patients soulève des demandes éthiques qui, tant qu'elles ne sont pas résolues, ne permettent pas pour l'instant la réalisation de l'étude. Des résultats préliminaires ont été obtenus en comparant les biomarqueurs infectieux et les tests de référence de deux patients dans ce service réanimation (figure 53).

Patient 1

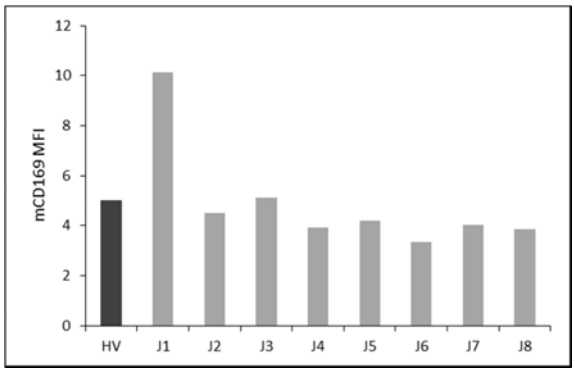
a)



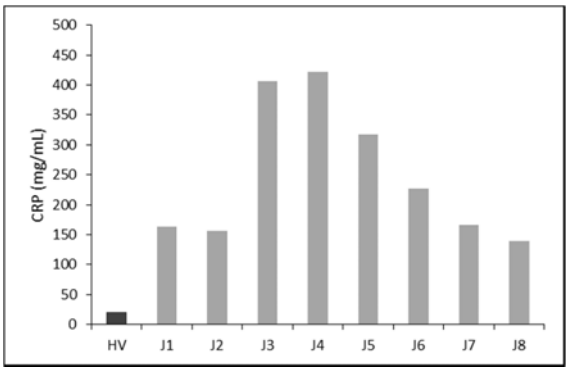
b)



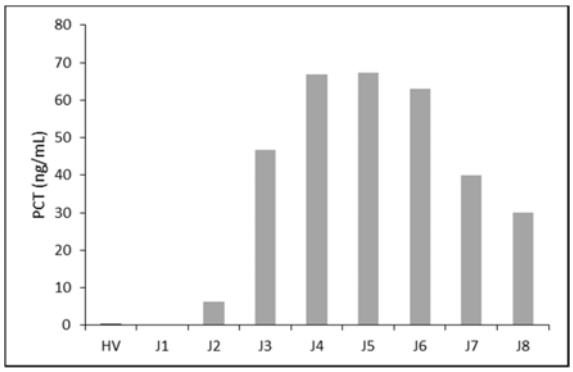
c)



d)



e)



Patient 2

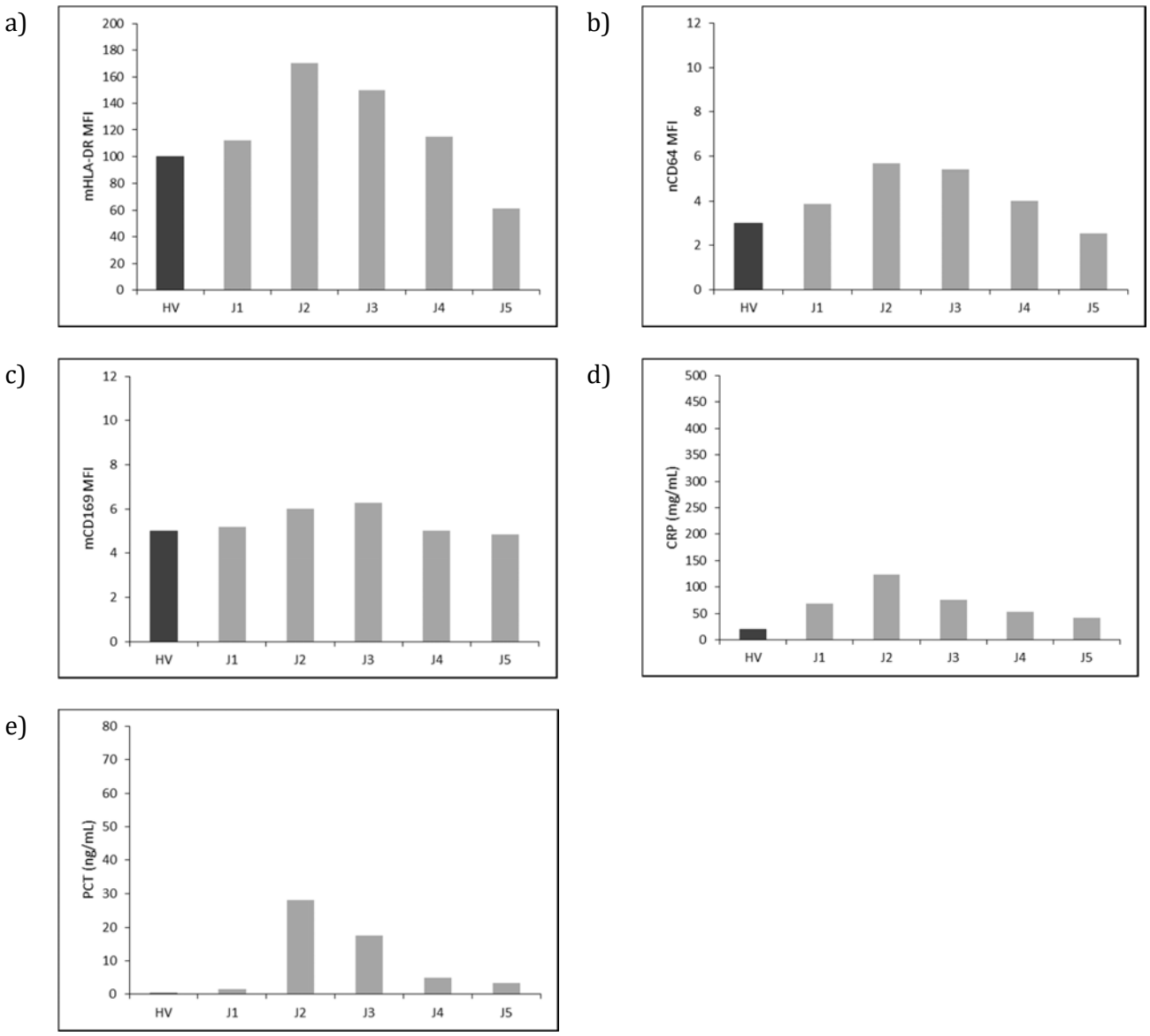


Figure 53 : Suivi clinique des patients sepsis. *Evaluation des moyennes d'intensité de fluorescence (MFI) de l'HLA-DR sur les monocytes (mHLA-DR ; a), du CD64 sur les neutrophiles (nCD64 ; b), du CD169 sur les monocytes (mCD169 ; c), et titrations de la Protéine C-Réactive (CRP ; d) et de la Procalcitonine (PCT ; e) pour deux patients admis au service de réanimation de l'Hôpital Européen (Marseille) (J1 à J8 ou J1 à J5 ; gris clair) ayant donné leurs consentements formels, en comparaison d'un sujet sain (HV ; gris foncé).*

Les résultats montrent que le patient 1 est en état de choc septique puisque l'expression de son mHLA-DR diminue très fortement au cours du temps suivant l'admission et que l'immunodépression reste au moins jusqu'au 8e jour post-admission, témoignant de l'absence de traitement immuno-stimulateur. Le patient est en effet atteint d'une infection bactérienne sévère, révélée par l'augmentation du nCD64 dans les premiers jours suivants l'admission (J1 à J3), mais est traité par antibiothérapie, révélée par le retour du nCD64 à une valeur comparable au sujet sain, à partir du 3e jusqu'au 8e jour post-admission. La très forte valeur du mCD169 à J1 est surprenante, d'autant qu'elle revient à des valeurs normales dès le lendemain. Cela paraît fort pour être expliqué par la mise en place de la tolérance à l'endotoxine. Il est possible que la conservation de l'échantillon (3 jours) avant d'être testé ait laissé se développer une activation dans le tube de prélèvement. La CRP et la PCT suivent la même évolution que le nCD64, ce qui démontre la corrélation entre les biomarqueurs et les données cliniques. On remarquera un léger retard dans l'élévation de la PCT du patient bien que ce soit normalement un marqueur précoce d'infection bactérienne.

Pour le patient 2, la valeur de son nCD64 révèle une infection bactérienne dès J1, qui s'intensifie à J2 puis est résolue par antibiothérapie dans les jours suivants. Le marqueur mHLA-DR ne révèle pas d'immunodépression à l'admission (J1), voire même son expression monte dans le premier jour suivant l'infection (J2) puis retourne à la normale à J4, avec peut-être un début d'immunodépression à J5. Le mCD169 est stable chez ce patient. Comme précédemment, les données de CRP et PCT corrèlent avec le marqueur nCD64, avec toujours un léger retard observé pour l'élévation de la PCT.

Ainsi, alors que la validation clinique du test a été réalisée en majeure partie sur des cohortes prises dans des services d'Urgences, cette étude laisse penser que le test serait intéressant dans les services des soins intensifs des hôpitaux, qui sont des environnements où les patients présentent une très grande complexité de maladies infectieuses. L'étude des niveaux des biomarqueurs confirme l'intérêt d'évaluer le CD64 sur les neutrophiles et le CD169 sur les monocytes, et soutient celui de l'HLA-DR pour qui un accord n'était pas trouvé entre les études. La comparaison de leurs valeurs à des données précises sur l'antibiothérapie, la mortalité, ou la survenue d'infections nosocomiales chez ces patients de réanimation doit être maintenant évaluée, notamment pour estimer la valeur prognostic et de bénéfice thérapeutique des marqueurs.

2.4.3. Le diagnostic infectieux en pédiatrie

La validation clinique du test a été réalisée sur des cohortes adultes, mais aucune étude n'a validé la possibilité d'utiliser les mesures des biomarqueurs en pédiatrie.

La grande majorité des fièvres de l'enfant est d'origine virale ou due à une cause bénigne, évoluant spontanément vers la guérison. Lorsque la fièvre témoigne d'une infection bactérienne, le diagnostic vital de l'enfant peut rapidement être mis en jeu.

Le sepsis est d'ailleurs l'une des causes les plus importantes et les plus précoces de mortalité chez les enfants dans le monde [169,170]. La problématique reste la même que pour les infections de l'adulte : le diagnostic des infections pédiatriques repose fréquemment sur la clinique et est donc le plus souvent présomptif.

Les investigations en pédiatrie ont longtemps été limitées, mais profitent maintenant de progrès techniques : méthodes non invasives, miniaturisation des prélèvements, outils rapides. Par exemple, la possibilité de pouvoir utiliser des dosages capillaires pour mesurer la PCT et la CRP offre des perspectives intéressantes d'évaluation du risque infectieux et de triage plus rapide et moins invasifs des enfants [171].

A ces progrès, il faut ajouter la spécialisation des outils à intégrer l'évolution biologique potentielle des pathologies en fonction de l'âge de l'enfant. En effet, en plus de l'examen clinique et des résultats biologiques, l'approche pédiatrique doit être anamnestique (tenir compte de l'âge) [171]. Avoir ce diagnostic global des infections pédiatriques permet d'assurer le pronostic des enfants, notamment en permettant de choisir leur traitement optimal et donc d'assurer leur succès thérapeutique.

L'objectif du travail a été d'évaluer chez des enfants les nouveaux biomarqueurs avec la technique de cytométrie en flux « au lit du patient » pour déterminer l'étiologie de leurs infections, représentant un outil de diagnostic des infections pédiatriques rapide, peu invasif, et performant.

La première partie de la validation du test en pédiatrie est la détermination des valeurs de référence des biomarqueurs CD64 et CD169 dans une population d'enfants de référence (figure 54).

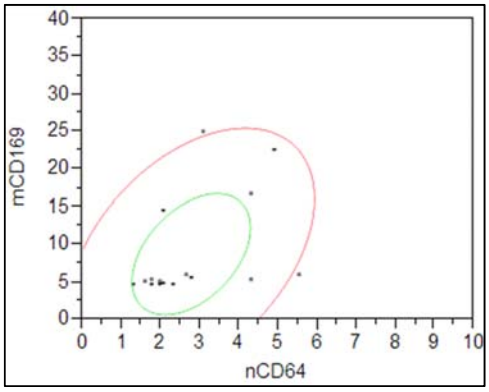


Figure 54 : Valeurs de référence des biomarqueurs nCD64 et mCD169 en pédiatrie.
Représentation d'une population de référence de 16 sujets pédiatriques de l'Hôpital Saint Joseph (Marseille), ayant donné leurs consentements formels, et supposés en bonne santé d'après leurs indications médicales. Chaque individu de référence est représenté en fonction des intensités moyennes de fluorescence (MFI) des marqueurs CD64 sur les neutrophiles (nCD64) et CD169 sur les monocytes (mCD169). Ces expressions ont été mesurées grâce à la technique de cytométrie en flux « au lit du patient ». L'ellipse rouge contient 95% des individus, et l'ellipse verte contient 65% des individus.

L'étude révèle que la population de référence a une expression moyenne de nCD64 de 2,79 en MFI (± 1,29) et une expression moyenne de mCD169 de 8,59 en MFI (± 6,86). Certains individus de référence sont en dehors de la représentation donnée par la majorité des individus de la population de référence. C'est pourquoi, un échantillon de référence a été sélectionné parmi la population pour déterminer les valeurs et l'intervalle de référence des marqueurs, plutôt que de considérer la population entière de référence. Cet échantillon s'est restreint aux les individus de référence compris à 65% dans l'ellipse (en vert), et non à 95% dans l'ellipse (en rouge) comme pour les adultes (tableau 28).

Tableau 28 : Intervalles de référence des biomarqueurs nCD64 et mCD169 en pédiatrie. *Moyennes, écart-types, et limites supérieures et inférieures de l'intervalle de référence pris à 95%, des intensités de fluoresence des marqueurs CD64 sur les neutrophiles (nCD64) et CD169 sur les monocytes (mCD169) pour 10 sujets caucasiens pédiatriques en bonne santé, évaluées par une procédure « au lit du patient » de cytométrie en flux.*

Biomarqueur	Moyenne	Ecart-type	Limite inférieure à 95%	Limite supérieure à 95%
nCD64	2,04	0,45	1,71	2,36
mCD169	4,87	0,44	4,56	5,18

Ainsi, en pédiatrie, l'intervalle de référence du marqueur CD64 sur les neutrophiles est [1,71 – 2,36], et celui du marqueur mCD169 est [4,56 – 5,18]. Ces intervalles décrivent les fluctuations que peuvent avoir les deux biomarqueurs chez des sujets enfants caucasiens en bonne santé.

La première limite est que les valeurs de référence des sujets pédiatriques est une étude en cours qui n'inclue pour l'instant que 16 enfants. Selon les recommendations internationales, une population de référence doit compter au minimum 100 sujets. Cela permet d'une part, de conserver un échantillon suffisamment représentatif de la population (il est conseillé d'établir les intervalles de référence sur 95% de la population de référence), et d'autre part, de décrire de manière juste les fluctuations des biomarqueurs dans des sujets en bonne santé.

La seconde limite est que, pour l'instant, les intervalles établis ne décrivent que 65% des sujets pédiatriques en bonne santé. Cette restriction est rapportée non seulement au faible nombre d'individus inclus, mais aussi à la proportion trop importante de sujets apparaissant potentiellement infectés. Il apparaît nécessaire de préciser davantage les critères d'inclusion et d'exclusion des sujets dans cette étude, pour maintenir un échantillon de référence de sujets pédiatriques sains suffisant et représentant 95% de la population de référence.

La troisième limite est que comme toutes valeurs de référence, ces intervalles ne sont exploitables que si le test est réalisé dans les mêmes conditions sur une population de sujets similaires. En pédiatrie, il est important de décrire la population en fonction de l'âge. Normalement, il ne devrait donc pas être établi un intervalle de référence par biomarqueur, mais plutôt un intervalle de référence par biomarqueur et par tranche d'âge considéré, augmentant donc considérablement le nombre d'échantillons à inclure pour finaliser l'étude.

Lorsque les valeurs de référence seront précisément établies, la seconde partie de la validation du test en pédiatrie sera la détermination des limites de décision médicale des biomarqueurs CD64, CD169 et HLA-DR, en tenant compte des données épidémiologiques de la maladie, donc dans une population d'enfants infectieux. Cette population est représentée le plus fréquemment dans les services d'Urgences pédiatriques. Une collaboration est donc initiée avec l'Hôpital Saint-Joseph (Marseille), mais la sélection des patients soulève des demandes éthiques qui, tant qu'elles ne sont pas résolues, ne permettent pas pour l'instant la réalisation de l'étude.

Ainsi, la problématique du diagnostic infectieux en pédiatrie a été abordée par la détermination préliminaire des limites de référence des biomarqueurs CD64 et CD169 chez les enfants sains. Les niveaux des biomarqueurs ont été mesurés avec la technique de cytométrie en flux « au lit du patient » ayant été optimisée, et semblent être complémentaires des valeurs obtenues chez les adultes avec cette même méthode (étude du paragraphe 2.4.1). Pour refléter plus justement les différentes valeurs que peuvent prendre les biomarqueurs chez des enfants en bonne santé, l'étude doit inclure davantage de sujets et doit tenir compte de leur âge. Une étude de détermination des limites de décision médicale des biomarqueurs et de leurs performances diagnostiques viendra ensuite compléter ces limites de référence pour avoir une compréhension globale du test en pédiatrie. Il est important de noter que les biomarqueurs infectieux ont un intérêt particulier en pédiatrie pour limiter la mortalité liée au sepsis chez les enfants. Le biomarqueur CD64 sur les neutrophiles a déjà été montré comme un indicateur supérieur pour diagnostiquer le sepsis pédiatrique [172]*, mais le CD169 n'a jamais été évalué seul ou en combinaison en pédiatrie.*

2.4.4. Les tueurs infectieux : VIH et tuberculose

Les maladies infectieuses sont la première cause de mortalité dans le monde (17 millions de morts par an), avec deux tueurs majeurs : le VIH et la tuberculose (*le paludisme est aussi un tueur majeur mais dont l'étude n'a pas pu être encore abordée*), qui restent des axes de recherche majeurs de nombreux instituts infectieux [173]. Les moyens de lutter contre ces maladies passent par leur diagnostic précoce.

Le Virus de l'Immunodéficience Humaine

Le Virus de l'Immunodéficience Humaine est un rétrovirus infectant l'humain via les fluides corporels (sang, sécrétions vaginales, sperme, lait maternel) et responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). L'état affaibli du système immunitaire rend le patient vulnérable à de multiples infections opportunistes, puis cause sa mort (plus de 25 millions de morts depuis 1981, date de la première identification du SIDA) [174]. Bien qu'il existe des traitements anti-rétroviraux luttant contre le VIH et retardant par conséquent l'apparition du sida, il n'existe à l'heure actuelle aucun vaccin ou traitement définitif. Le moyen de lutte le plus efficace reste donc la prévention, qui passe notamment par les rapports sexuels protégés et la connaissance de son statut sérologique par diagnostic.

L'infection par le VIH évolue en plusieurs phases pouvant se succéder dans le temps :

- la primo-infection avec (50 à 75 % des cas) ou sans symptômes, phase virémique de séroconversion qui suit la contamination ;
- une phase de latence, parfois accompagnée d'un état de lymphadénopathie généralisée ;
- une phase à symptômes mineurs de l'infection à virus de l'immunodéficience humaine, pouvant durer plusieurs années en cas de succès thérapeutique ;
- la phase d'immunodépression profonde, ou stade de sida généralement symptomatique, lorsque l'on est en cas d'échec thérapeutique, avec apparition d'infections opportunistes.

L'infection par le VIH est donc une pathologie complexe, alternant phase aigüe (pleine virémie) ou phase chronique avec différents stades (succès thérapeutique ou pleine immunodépression).

L'objectif du travail a été de comprendre la réaction des biomarqueurs CD64 et CD169 au cours de ces deux phases chez des patients porteurs du VIH, et de la comparer chez des patients présentant d'autres types d'infections aigües ou chroniques.

L'hypothèse est que cette comparaison pourrait permettre non seulement de comprendre et prédire le comportement des biomarqueurs dans des pathologies infectieuses chroniques, non évalué encore, mais aussi d'apporter une information supplémentaire et plus complète par rapport au diagnostic sérologique des patients VIH : diagnostic de l'infection virale initiale, évolution de la charge virale, immunodépression du patient, infections secondaires bactériennes ou virales opportunistes.

Les résultats font l'objet d'une septième publication, en cours de revue avant soumission dans la revue *Cytometry Part B*, intitulée : « **Siglec-1 sur les monocytes (CD169), FcγRI sur les neutrophiles (CD64), et CD38 et CD69 sur les lymphocytes, au cours d'infections bactériennes et virales aigües ou chroniques**» (figure 55).

Monocyte Siglec-1 (CD169), neutrophil FcγRI (CD64), and lymphocyte CD38, CD69 expression, during acute versus chronic bacterial and viral infections

Key words

CD64; CD169; CD38; CD69; infections; sepsis

Authors

Anne Sophie Bedin, Pénélope Bourgoin, Vincent Foulogne, Alain Makinson, Ségolène Debiesse, Stephanie Badiou, Fabrice Malergue, Edouard Tuaillon

Abstract

Background: Activation markers are over expressed on leukocytes during infectious diseases and may be used to improve the diagnosis and monitoring of sepsis. In this study, we analyzed a combination of four activations markers on neutrophils, monocytes and T cells during bacterial and viral infections.

Methods: CD64 on neutrophils (nCD64), CD169 on monocytes (mCD169), CD69 and CD38^{bright} on T cells were analyzed using a one-step procedure based on lyophilized antibodies and lysis without wash. Level of markers were evaluated in controls and in patients with proved infections: bacterial, acute viral (measles, cytomegalovirus, dengue, acute hepatitis B), chronic viral (chronic HIV and HCV).

Results: nCD64 expression was elevated during acute bacterial infections (median (IQR) = 1.6 (1.3); p < 0.0001) and acute viral infections (1.5 (0.9); p: 0.0005), in comparison to controls. mCD169 and CD38^{bright} expressions were mainly elevated during acute viral infections whereas CD69 expression on CD8- T cells was especially elevated during bacterial infections. In persons living with HIV, increase of cell surface activation markers was observed in cases of detectable plasma HIV RNA (CD69, nCD64 and CD38^{bright}) or poor immune restoration (CD69).

Conclusions: The combination of mCD169 monocytes, nCD64 on neutrophils, CD38 ^{bright}, and CD69 on T cells, allow identifying several cell signatures specifically associated with bacterial infections, acute viral infections and chronic viral infections. The performance of cellular activation markers for the diagnosis of sepsis need to be evaluated in intensive care and emergency units using a fully automated system.

Introduction

Bacterial infections need a rapid diagnosis to initiate antibiotics. Severe infection, such as sepsis, is a medical emergency and is the leading cause of death in intensive care units. According to the World

Health Organization, sepsis accounts among the main cause of morbidity and mortality, potentially killing 6 million people a year worldwide. Many bacteria can cause sepsis syndrome while some viruses (SARS, H1N1 influenza, hemorrhagic fevers) can also induce a similar response. The development of rapid and accurate diagnostic tests remains a main challenge to improve care of patients suspected of bacterial infection in emergency departments. The differential diagnosis between bacterial and viral infection is often difficult and it is challenging to implement a rapid and sensitive biological test to certify it. Markers of bacterial infections include C-reactive protein (CRP) and procalcitonin (PCT) among the most frequently used, however these soluble markers have suboptimal performance to distinguish between bacterial and viral infections. Analysis of the expression of activation markers on leukocytes represents a promising approach to improve the diagnosis of bacterial and viral infections, especially if new simple, rapid and robust preparation techniques can be implemented [1].

CD64 is a type I integral membrane glycoprotein known as an Fc receptor that binds monomeric IgG-type antibodies with high affinity. After binding IgG, CD64 interacts with an accessory chain known as the common γ chain; hence it is more commonly known as Fc-gamma receptor 1 (FcγRI). CD64 antigen is an early granulo-monocytic lineage marker expressed on monocytes, macrophages, at low levels on polymorphonuclear neutrophils (PMNs), and on a subpopulation of circulating dendritic cells. Expression of the CD64 antigen increases transiently in cases of sepsis [2] [3]. CD64 expression on neutrophils (nCD64) is quickly up-regulated under the influence of pro-inflammatory cytokines such as interferon-γ (IFN-γ), granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and lipopolysaccharide (LPS). Previous studies have shown that it is a sensitive and specific biomarker for the diagnosis of bacterial infection [4]. However, it has been reported to increase in patients with viral infections also, although the dynamic range in viral infection is about half that of bacterial infection. A previous study investigated the impact of HIV infection and replication on neutrophil CD64 expression and observed that both were associated with an up-regulation of this marker, but rarely above the clinical threshold. Thus, they concluded that neutrophil CD64 expression could be considered as a marker to get information on HIV-related infections in these patients, as well as in HIV-negative ones [5].

CD169 (also known as sialoadhesin or siglec-1), is an activation marker of chronic inflammation and tumors seen on macrophages. A previous study claimed that is was up-regulated on monocytes early after HIV infection and increases during disease progression [6]. Another study showed a significant increase in subjects with a high viral load in comparison with HIV-negative controls [7]. The results were confirmed by a more recent study on macaques which demonstrated that monocyte CD169 expression (mCD169) was directly associated with plasma viral loads [8].

As HIV-positive patients face many immune disorders, the expression of CD64 and CD169, respectively on neutrophils and monocytes which are both key cells in innate immunity, may be disturbed in different ways according to the immune status of each individual, deserving to be further investigated.

In this study, we observed the impact of HIV replication, the quality of immune restoration and age on these two markers expression in HIV-positive patients. CD38+ molecule is a type II transmembrane glycoprotein present on a lot of cells and particularly on immature T and B lymphocytes, which is re-expressed during the cellular immune response to viruses [9] [10]. Increased numbers of CD38 molecules on CD8+ cells have been reported during acute EBV and CMV infection, and as a surrogate marker of HIV replication [11]. CD69 is a calcium dependent lectin superfamily of type II transmembrane receptors. Its expression is induced on the surface of T lymphocytes and natural killer cells (NK). This an early activation marker of T lymphocytes expressed one or two hours after stimulation and rapidly decline in absence of stimulation [12]. In addition to its intrinsic value as an activation marker, recent evidence suggests that CD69 is also an important regulator of immune responses. CD69 may determine patterns of cytokine release as well as homing and migration of activated lymphocytes. [13]

In this study, we analysed expressions of CD38 on CD8+ cells, CD69 on CD8+ and CD8- cells, CD64 on neutrophils, and CD169 on monocytes during different acute and chronic viral and bacterial infections.

Methods

Study cohort

Blood samples on EDTA were collected from patients care in the Montpellier University Hospital, from September 2018 to September 2019, and from blood donors. Subjects 18 years-old or older were classified in four groups based on clinical and biological presentation: acute bacterial infection, primary and secondary syphilis, acute viral infection, chronic infection by HIV and HCV. The group of subjects infected by HIV were subdivided in four subgroups according to virological and immunological status (supplementary table 1): immunological success, immunological impairment, elderly or viremic. The study received an institutional ethics committee approval (AC-2015-2492; Comité de Protection des Personnes Sud Méditerranée III) and written informed consent was obtained from all subjects included.

Data measurement

Research reagents (not for diagnostic use) were from Beckman-Coulter. Flow cytometry tubes contained the following fluorescent antibodies mix under a dry format : CD15+CD3-FITC, CD8-Krome Orange, CD69-APC, CD64-Pacific blue, CD169-PE. They were used as described previously [1], in a “Stain&Lyse” one-step, no wash method. Another tube series containing a home-made mix of liquid reagents (CD45-FITC, CD4-PE, CD3-PC5, CD8-ECD, CD38-Pacific blue) was routinely run in the

laboratory on the same samples. Analyses were performed on NAVIOS flow cytometer (Beckman Coulter), within 48h after venous puncture on EDTA tube. Information about viral load and treatment were picked up from the patients' medical file.

Levels of activation markers in healthy controls and set up of normal threshold

Thresholds for nCD64 (MFI), CD8+ and CD8- CD69 (%), and mCD169 (MFI) were established based on expression of the markers in healthy controls (mean + 2 SD). CD38 threshold was defined at 10% as previously described [10]. The mean fluorescence threshold for nCD64 was set at 1 (0.69 + 2 SD = 1.08) as described in previous reviews and correlated to our own values [14]. CD169 cut-off was established at 1.6 (1.2 + 2 SD = 1.59), CD8- CD69+ at 2.1 (mean + 2 SD = 2.10) and CD8+ CD69+ at 2.0 (mean + 2 SD = 2.03).

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed on Prism7 Graph PAD. We used the test of Wilcoxon-Mann Whitney as the groups were non-parametric. All the tests were two-tailed and statistical significance was defined as $p < 0.05$.

Results

Markers behaviour in acute viral infection versus bacterial infections

Levels of each biomarkers were presented in figure 1.

All patients with acute bacterial infections had a nCD64 expression level above the positivity threshold (> 1). The level of CD64 expression on neutrophils was significantly increased (median = 1.6 (IQR = 1.273) [min = 1.06 – max = 4.91]) in bacterial infections in comparison to healthy controls ($p < 0.0001$). The median fluorescence intensity for nCD64 was also higher in viral acute infections (median = 1.52 (IQR = 0.933) [min = 0.63 - max = 1.93]) when compared to healthy controls ($p = 0.0005$), with five out eight (62.5%) acute viral infections above the CD64 cut-off value.

No significant difference was observed between bacterial infections and acute viral infections ($p = 0.47$). Subjects with measles infections showed the strongest expression of CD64 marker on neutrophils in this group (median = 1.93 (IQR = 1.862). All but one patient in the group of bacterial infections had a fluorescence intensity of mCD169 below the positivity threshold (< 1.6). The only subject with a positive CD169 expression was known to have a Moraxella infection (MFI CD169 = 3.48). By contrast, all subjects in the viral infection group had mCD169 level strongly over the threshold of positivity (median = 5.66 (IQR = 3.947) [min = 2.62 - max = 7.96]) in comparison to controls ($p < 0.0001$), and to bacterial infections ($p = 0.0025$). Measles presented also the strongest expression for this

marker (median = 6.695 (IQR = 6.357)). Comparing expression of CD169 on bacterial and viral infection, it appears a differential level of expression of this marker. CD38 was also overexpressed during bacterial infection (median = 7.3 (IQR = 7)) when compared with healthy controls ($p < 0.0001$).

Similarly, during bacterial infection, CD69 expressions on T CD8+ or CD8- lymphocytes were increased (median CD8+ = 0.625 (IQR = 0.512); median CD8- = 0.53 (IQR = 0.51)) in comparison to healthy controls (p: 0.0002 and $p < 0.0001$, respectively). Indeed, all patients (100%) with bacterial infections expressed the CD69 marker on CD8- T cells (median = 15.18 (IQR = 9.047) [min = 3.04 – max = 60.60%]). We also found that in group of acute viral infections, $CD38^{bright}$ was strongly expressed (median = 32.7 (IQR = 28.98)) and was significantly different from healthy controls ($p < 0.0001$). This marker is more increased in viral infections when compared to bacterial infections ($p = 0.0012$). Except for the dengue fever, this marker was expressed more than 20% at the surface of CD8+ lymphocytes. Viral infections showed a significant positivity of expression for CD69 on CD8+ and CD8- T cells in comparison to healthy controls ($p < 0.0001$ for both). However, they expressed CD69+ weaker on CD8- T cells than bacterial infections ($p = 0.0045$).

Hence, bacterial infections were associated with a raise of nCD64 and of CD69 on T CD8- cells, and a negativity of CD169 on monocytes (13 were negatives out of 14 patients). CD38 and CD69 on CD8+ T cells were not informative to discriminate this group of patients.

Chronic infections

The group of subjects infected by chronic HIV and HCV infections was included in the study to evaluate the possible impact of chronic viral infection on cell surface markers used potentially for the diagnosis of bacterial vs viral acute infections. The median of fluorescence of CD64 in this group of chronic infection was 0.67 (IQR = 0.703) and is therefore not significantly different from the healthy controls. The CD64 expression was thus lower in this group compared to acute viral infection and bacterial infection groups. On the contrary, $CD38^{bright}$ expression on CD8+ T cells was elevated in the group of chronic viral infections when compared with healthy controls ($p < 0.0001$), and lower when compared with acute viral infections ($p = 0.0002$). No difference was observed with bacterial infections ($p = 0.4139$). In the same way , on lymphocytes, CD69 is expressed more likely on chronic infection with an important difference on CD8+ and CD8- in comparison to healthy controls ($p = 0.0013$ and 0.0004 respectively) (Fig.2).

Chronic viral infections were then stratified in four subgroups of patients based on the age (above or below 65 years), immunological (T CD4+ count) and virological (supressed *viraemia* or detectable plasma HIV RNA) to explore a possible increase of one of these markers. Patients with detectable HIV RNA had elevated expression for CD64 ($p = 0.0003$), CD169 ($p = 0.0016$) and CD38 and CD69 are by far

the most expressed on cells surface ($p < 0.0001$ for both) in comparison with healthy controls. $CD38^{bright}$ was correlated with plasma HIV RNA level ($p = 0.0402$). CD169 expression were seated above the threshold value in only 4 out of 13 subjects (31%). No correlation was observed between the level of plasma HIV RNA and CD169 expression ($r = 0.128$, $p = 0.678$ (data not shown)). CD69 was strongly expressed on CD8+ T cells in this group of patients ($p < 0.0001$), when compared to healthy controls, immunological success ($p < 0.0001$), or elderly patients ($p=0.0012$). Subjects included in the group of immunological impairment had also higher CD8+ CD69+ or CD8- CD68+ expressions when compared to healthy controls ($p = 0.0004$ and $p < 0.0001$ respectively). In fact, CD8+ CD69+ expression appeared highly variable between subjects with immunological impairment. No differences were observed in the group of immunological impairment for CD64 and CD169. Finally, CD8- CD69+ remained overexpressed in all subgroups of HIV infected subjects in comparison to healthy controls, including the group of subject aged above 65, undetectable for plasma HIV RNA and having recovered a normal CD4 count (immunological success : $p < 0.0001$; immunological impairment : $p < 0.0001$; HIV Elderly : $p = 0.0005$; HIV viremic : $p < 0.0001$). A progression of the expression of CD8+ CD69+ marker is observed from healthy control (median = 0.625) and then, in this order, to the group of Immunological successes (median = 0.88), of HIV above 65 years old (median = 2.42), of Immunological impairment (median = 5.59) and of viremic (median = 5.93). CD64 expression was elevated in subjects with HIV RNA replication but only half of them was above the threshold. Chronic HCV infection was associated with a trend for a higher CD64 expression ($p = 0.0562$) and a higher CD8- CD69+ expression ($p = 0.0205$) when compared to controls, but the number of patients is low in this category. Syphilis infections was not found associated with a higher expression of any activation markers compared to controls. None of these markers presented a correlation.

Discussion

In this study, we analysed a combination of activation markers on T cells, monocytes and neutrophils during acute and chronic infections. Bacterial and viral infections were associated with different patterns of response. nCD64 expression has been proposed as a promising marker for the diagnosis of severe bacterial infections, and accordingly, we observed a high level of CD64 expression in all subjects with bacterial infections. This is even better than previous studies where the pooled sensitivity of CD64 for diagnosing infection in adult patients with septic syndrome was close to 90% [15]. CD64 overexpression on neutrophils has also been observed during acute viral infections [3]. Accordingly, in our study a clear CD64 over-expression was observed in four subjects (4/4) with measles infection, in one subject (1/1) with CMV infection (weak over-expression), and in half the subjects with active HIV replication, whereas the CD64 levels were normal in acute HBV, dengue fever and parvovirus B19 infections. Our results thus suggest that CD64 is a sensitive marker to diagnose bacterial infections but

that it can be also overexpressed in some acute viral infections. Some authors suggested that CD64 overexpression may be preferentially induced by DNA virus infections but our results on measles infections indicate that RNA virus infections can be also associated with high expression of CD64. Likewise CD64 can be moderately increased in HIV (active) and HCV infected individuals, in line with our previous studies [15]. As a consequence, testing additional cell surface activation markers can be a useful method to establish the patterns associated with bacterial versus acute viral infection.

Our results suggests that CD169 receptor on monocytes is a promising marker of acute viral infection. All subjects with acute viral infection exhibited high level of mCD169 expression whereas CD169 level was normal in all healthy controls and in all but one bacterial infections (and in that particular case, it is difficult to rule out a viral non-identified co-infection). CD169 level was also higher in the group of chronic virus infections compared to controls. However, the CD169 levels remained generally below the threshold level even in half the subjects tested positive for HIV RNA or HCV RNA and was lower than in the acute viral infection group. Few data are available regarding the CD169 expression during chronic infection; our results suggest that CD169 is up-regulated only during acute viral infections or untreated HIV infection, in line with the literature [6] [14], and remains to basal levels during latent or silent infections.

High level of CD8+ $CD38^{bright}$ expression were observed during acute viral infections but the marker is correlated to the HIV replication and was found also elevated in three patients with bacterial infections, limiting somewhat the specificity. Interestingly, high level of CD69 expressions on CD8- T cells was observed in the group of bacterial infection whereas this profile was lower in the others groups.

A pattern of bacterial versus acute viral infection can be proposed based on the results obtained in this study. Bacterial infection was characterized by high CD64 expression on neutrophils, high CD69 expression on CD8- T cells, $CD38^{bright}$ on CD8+ or CD8- T cells and CD169 negativity on monocytes, whereas the signature of acute viral infection was high CD169 expression on monocytes, moderate or no expression of CD64 on neutrophils, high elevation of $CD38^{bright}$ CD8+ cells, moderate elevation of CD69 on CD8- T cells. Interestingly, even if CD64 alone has been abundantly described as one of the best markers do detect a bacterial infection, our data indicate that its specificity can be challenged by some acute viral infections. Adding a marker such as CD169 which is specific for such an acute viral infection can help overcoming this limitation and allow a more precise diagnostic orientation, potentially leading to less antibiotics prescriptions. Nevertheless, these results are preliminary, and the performances of this combination of cell surface activation markers need to be evaluated in clinical setting.

List of references

1. **Bourgoin P**, **Hayman J**, **Rimmelé T**, **Venet F**, **Malergue F**, **Monneret G**. A novel one-step extracellular staining for flow cytometry: Proof-of-concept on sepsis-related biomarkers. *J. Immunol. Methods*. 2019; **470**:59–63.DOI: 10.1016/j.jim.2019.05.001.

2. **Fischer G, Schneider E, L. Moldawer L, Karcher C, Barth E, Suger-Wiedeck H, Georgieff M, *et al.*** CD64 surface expression on neutrophils is transiently upregulated in patients with septic shock. *Intensive Care Med.* 2001; **27**:1848–1852.DOI: 10.1007/s00134-001-1135-z.

3. **Xini A**, **Pistiki A**, **Lada M**, **Giamarellos-Bourboulis EJ**, **Dimopoulos G**. Association of the early absolute CD64-expressing neutrophil count and sepsis outcome. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2019; **38**:1123–1128.DOI: 10.1007/s10096-019-03507-0.

4. **Nuutila J**. The novel applications of the quantitative analysis of neutrophil cell surface FcγRI (CD64) to the diagnosis of infectious and inflammatory diseases: *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2010; **23**:268–274.DOI: 10.1097/QCO.0b013e32833939b0.

5. **Capsoni F, Minonzio F, Ongari AM, Colombo G, Rizzardi GP, Bonara P, D'Arminio-Monforte A, *et al.*** Increased expression of IgG Fc receptor type I on neutrophils and monocytes from HIV-infected subjects. *Clin. Exp. Immunol.* 2008; **90**:175–180.DOI: 10.1111/j.1365-2249.1992.tb07924.x.

6. **van der Kuyl AC**, **van den Burg R**, **Zorgdrager F**, **Groot F**, **Berkhout B**, **Cornelissen M**. Sialoadhesin (CD169) Expression in CD14+ Cells Is Upregulated Early after HIV-1 Infection and Increases during Disease Progression Sommer P, ed. *PLoS ONE*. 2007; **2**:e257.DOI: 10.1371/journal.pone.0000257.

7. **Pulliam L**, **Sun B**, **Rempel H**. Invasive chronic inflammatory monocyte phenotype in subjects with high HIV-1 viral load. *J. Neuroimmunol.* 2004; **157**:93–98.DOI: 10.1016/j.jneuroim.2004.08.039.

8. **Kim W-K, McGary CM, Holder GE, Filipowicz AR, Kim MM, Beydoun HA, Cai Y, *et al.*** Increased Expression of CD169 on Blood Monocytes and Its Regulation by Virus and CD8 T Cells in Macaque Models of HIV Infection and AIDS. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2015; **31**:696–706.DOI: 10.1089/aid.2015.0003.

9. **Shubinsky G**, **Schlesinger M**. The CD38 Lymphocyte Differentiation Marker: New Insight into Its Ectoenzymatic Activity and Its Role as a Signal Transducer. *Immunity*. 1997; **7**:315–324.DOI: 10.1016/S1074-7613(00)80353-2.

10. **Tuaillon E**, **Al Tabaa Y**, **Baillat V**, **Segondy M**, **Picot M-C**, **Reynes J**, **Vendrell J-P**. Close association of $CD8^{+}$/$CD38^{bright}$ with HIV-1 replication and complex relationship with $CD4^{+}$ T-cell count. *Cytometry B Clin. Cytom.* 2009; **76B**:249–260.DOI: 10.1002/cyto.b.20467.

11. **Zidovec Lepej S**, **Vince A**, **Dakovic Rode O**, **Remenar A**, **Jeren T**. Increased numbers of CD38 molecules on bright CD8+ T lymphocytes in infectious mononucleosis caused by Epstein-Barr virus infection. *Clin. Exp. Immunol.* 2003; **133**:384–390.DOI: 10.1046/j.1365-2249.2003.02219.x.

12. **Risso A**, **Smilovich D**, **Capra MC**, **Baldissarro I**, **Yan G**, **Bargellesi A**, **Cosulich ME**. CD69 in resting and activated T lymphocytes. Its association with a GTP binding protein and biochemical requirements for its expression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 1991; **146**:4105–4114.

13. **Cibrián D**, **Sánchez-Madrid F**. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur. J. Immunol.* 2017; **47**:946–953.DOI: 10.1002/eji.201646837.

14. **Bourgoin P, Soliveres T, Ahriz D, Arnoux I, Meisel C, Unterwalder N, Morange P-E, *et al.*** Clinical research assessment by flow cytometry of biomarkers for infectious stratification in an Emergency Department. *Biomark. Med.* 2019; **13**:1373–1386.DOI: 10.2217/bmm-2019-0214.

15. **Yeh C-F**, **Wu C-C**, **Liu S-H**, **Chen K-F**. Comparison of the accuracy of neutrophil CD64, procalcitonin, and C-reactive protein for sepsis identification: a systematic review and meta-analysis. *Ann. Intensive Care*. 2019; **9**. Available at: https://annalsofintensivecare.springeropen.com/articles/10.1186/s13613-018-0479-2 [Accessed November 15, 2019].DOI: 10.1186/s13613-018-0479-2.

Figures

FIGURE . 1

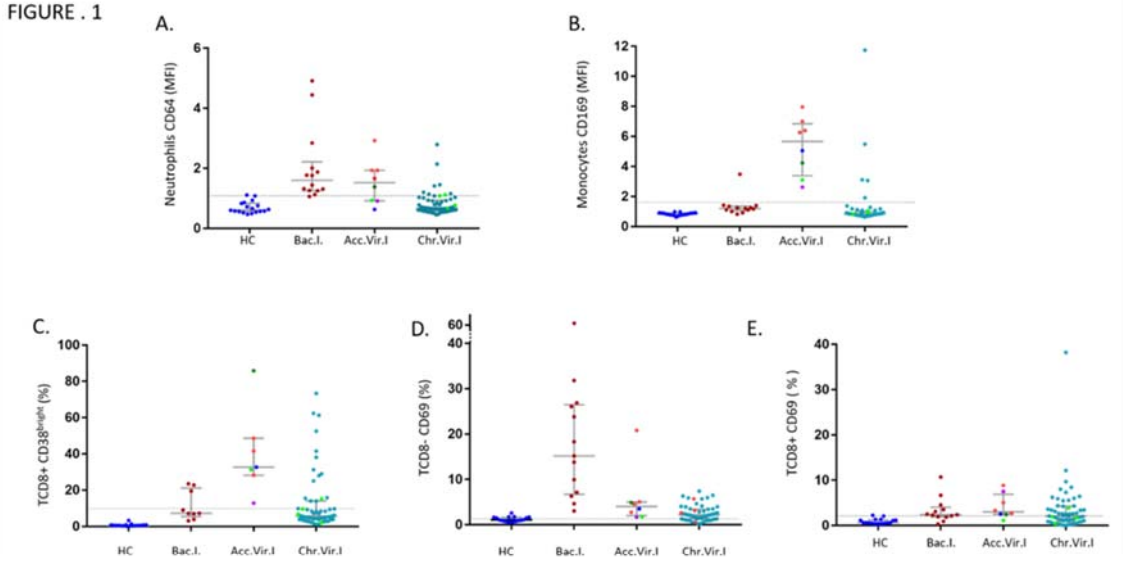
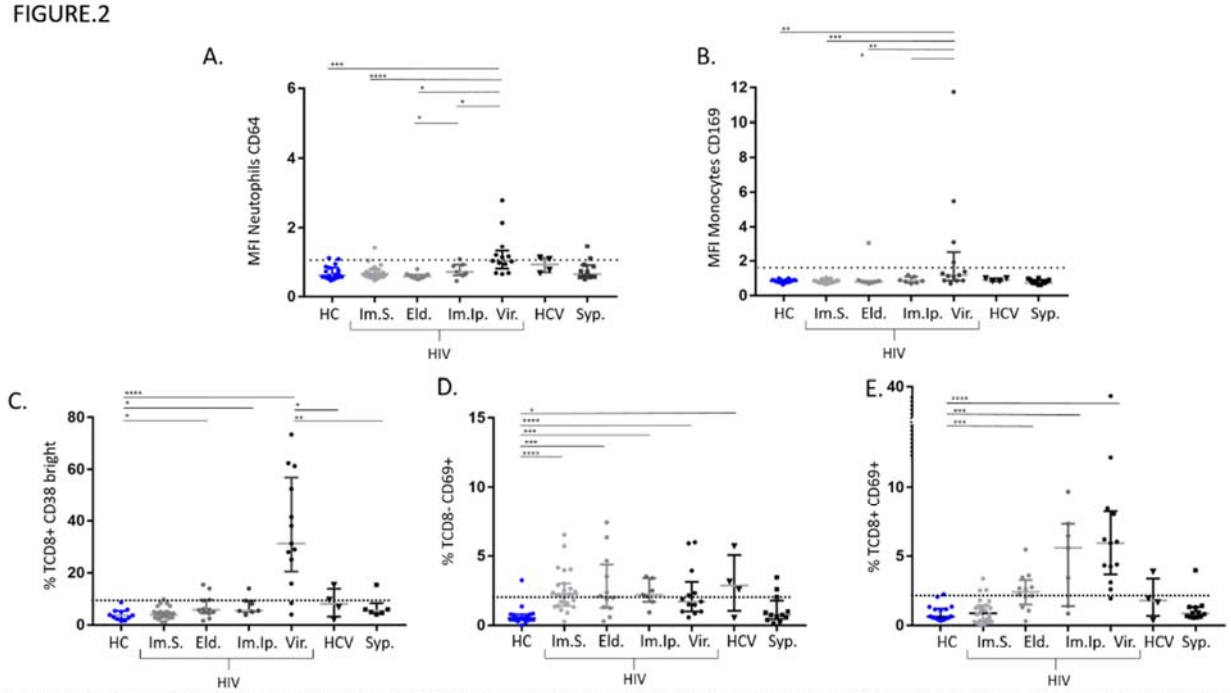


Fig. 1 : Representation of patient group for each marker tested. **A /** CD64 MFI on neutrophils; Healthy control (HC) is in blue, bacterial infections (Bac.I.) are in dark red; Acute viral infections (Acc.Vir.I) are measles in orange, dengue fever in dark blue, Hepatitis B virus (HBV) in light green, Cytomegalovirus (CMV) in dark green, Parvovirus B19 in violet; Chronic infections (Chr.Vir.I.) are green; positive HIV group in dark green and positive Hepatitis C Virus (HCV) in light green. Cut-off of 1 MFI CD64 is represented. **B /** The MFI of the CD169 marker on monocytes is shown for same groups as before with same color code. Cut-off of 1,6 MFI CD169 is represented. **C /** Percentage of CD8 + CD38 bright T cells is represented for same groups as before with same color code. Cut-off of 10% CD38 ^{bright} is represented **D /** The percentage of CD8 - CD69 + T cells is represented for same groups as above with same color code. Cut-off of 2,15 % CD8-CD69+ is represented **E /** Percentage of CD8 + CD69 + T cells is represented for the same group as above with the same color code. Cut-off of 2,03 % CD8+ CD69+ is represented

Statistical Analysis	HC	Bacterials Infections	Virals Accutes Infections.
Bacterials Infections	*CD64 p < 0,0001 ***** *CD169 p < 0,0001 ***** *CD38 p = < 0,0001 ***** *CD8- CD69+ p < 0,0001 ***** *CD8+ CD69 + p = 0,0002 ****	N/A	
Virals Accute Infections	*CD64 p = 0,0005 **** *CD169 p < 0,0001 ***** *CD38 p < 0,0001 ***** *CD8- CD69+ p < 0,0001 ***** *CD8+ CD69 + p < 0,0001 *****	*CD64 p = 0,4718 NS* *CD169 p p < 0,0001 ***** *CD38 p = 0,0012 *** *CD8- CD69 + p = 0,0045 *** *CD8+ CD69 + p = 0,2381*	N/A
Virals Chronics Infections	*CD64 p = 0,2343 NS* *CD169 p = 0,7090 NS* *CD38 p < 0,0001 ***** *CD8- CD69+ p = 0,0004 **** *CD8+ CD69 + p = 0,0013 ***	*CD64 p < 0,0001 ***** *CD169 p < 0,0001 ***** *CD38 p = 0,4139 NS* *CD8- CD69+ p < 0,0001 ***** *CD8+ CD69 + p = 0,4067 NS*	*CD64 p = 0,0013 *** *CD169 p < 0,0001 ***** *CD38 p = 0,0002 **** *CD8- CD69+ p = 0,0414 ** *CD8+ CD69 + p = 0,1220 NS*

FIGURE.2



Representation of patient from chronic infection group for each marker tested. A: CD64 MFI on neutrophils; Healthy control (HC) is in blue, Immunological Success (Im.S.) are in light- grey; Immunological Impairment (Im.Ip) are middle -grey ; Eldery (Eld.) are dark-grey ; HIV Viremic (Vir.) in black.; HCV viremics are black triangle and Syphilis are black square. The cut off at an MFI of 1 is shown. B / The MFI of the CD169 marker on monocytes is shown for the same groups as before with the same color codes. The cut off at an MFI of 1,6 is shown C / The percentage of CD8 + CD38 bright T cell is represented for the same groups as before with the same color codes. D / The percentage of CD8-CD69 + T cells is represented for the same groups as above with the same color codes. E / The percentage of CD8 + CD69 + T cells is represented for the same groups as above with the same color codes.

Statistical Analysis Fig.2	HC	Immunological sucess	Immunological Impairment	Eldery	HIV Viremic	HCV
Immunological sucess	*CD64 p = 0,8914* *CD169 p = 02474* *CD38 p = 0,5923* *CD8- CD69+ p <0,0001 ***** *CD8+ CD69 + p =0,9741*	N/A				
Immunological Impairment	*CD64 p = 0,3972* *CD169 p = 0,7116* *CD38 p = 0,0189 ** *CD8- CD69+ p < 0,0001 ***** *CD8+ CD69 + p =0,0004 ****	*CD64 p = 0,2604* *CD169 p = 0,304* *CD38 p =0,0152 ** *CD8- CD69+ p = 0,9908* *CD8+ CD69 + p = 0,011 ***	N/A			
Eldery	*CD64 p = 0,2189* *CD169 p = 0,3405* *CD38 p =0,0455 ** *CD8- CD69+ p =0,0005 **** *CD8+ CD69 + p =0,0008 ****	*CD64 p = 0,0771* *CD169 p = 0,8303* *CD38 p = 0,0516* *CD8- CD69+ p = 0,8776* *CD8+ CD69 + p = 0,0007 ****	*CD64 p = 0,0378 ** *CD169 p = 0,4199* *CD38 p = 0,9196* *CD8- CD69+ p = 0,9671* *CD8+ CD69 + p = 0,1198*	N/A		
HIV Viremic	*CD64 p = 0,0003 **** *CD169 p = 0,0016 *** *CD38 p <0,0001 ***** *CD8- CD69+ p < 0,0001 ***** *CD8+ CD69 + p <0,0001 *****	*CD64 p <0,00001 ***** *CD169 p = 0,0002 **** *CD38 p =<0,0001 ***** *CD8- CD69+ p =0,3278* *CD8+ CD69 + p < 0,0001 *****	*CD64 p = 0,0225 ** *CD169 p = 0,0313 ** *CD38 p = 0,0017 *** *CD8- CD69+ p = 0,4854* *CD8+ CD69 + p = 0,5880*	*CD64 p = <0,0001 ***** *CD169 p = 0,0018 *** *CD38 p =0,0002 **** *CD8- CD69+ p = 0,5743* *CD8+ CD69 + p =0,0012 ***	N/A	
HCV	*CD64 p = 0,0562* *CD169 p = 0,1718* *CD38 p = 0,1377* *CD8- CD69+ p =0,0205 ** *CD8+ CD69 + p = 0,2223*				*CD64 p = 03996* *CD169 p = 0,0756* *CD38 p = 0,0151 ** *CD8- CD69+ p =0,6235* *CD8+ CD69 + p =0,0059 ***	N/A
Syphilis	*CD64 p = 0,5379* *CD169 p = 0,2270* *CD38 p = 0,0507* *CD8- CD69+ p = 0,1817* *CD8+ CD69 + p = 0,2115*				*CD64 p = 0,0079 *** *CD169 p = 0,0015 *** *CD38 p = 0,0031 *** *CD8- CD69+ p =0,0211 ** *CD8+ CD69 + p <0,0001 *****	*CD64 p = 0,2027* *CD169 p = 0,1143* *CD38 p = 0,5619* *CD8- CD69+ p = 0,1703* *CD8+ CD69 + p = 0,3165*

Table

Table 1 : baseline characteristics of the Healthy Controls, Acute virals infections, and bacterials infections population

	Healthy Controls (n=18)	Virals Infections (n=25)			Bacterials Infections (n=14)	Syphilis (n=12)
		Acutes (n=8)	Chronics (n=17)*			
			HIV (n=55)	HCV (n=4)		
Age (years) (Mean ±SD)	33 (11.5)	31.5 (12)	55 (13)	52.5 (3.2)	57 (25)	47 (19)
Males (Number, %)	12 (66 %)	4 (50 %)	40 (73%)	4 (100%)	7 (50%)	12 (100 %)
CD4+ T cells (Mean,SD)	995(416)	284 (133)	622(364)	806 (187)	331 (198)	730 (204)
CD8+ T cells (Mean, SD)	596 (270)	178 (75)	876 (765)	595 (217)	132 (141)	798 (270)
PCT	ND	ND	ND	ND	32,4 (74.80)	N/A
CRP	ND	ND	ND	ND	149.5 (128.6)	N/A

* see suplemental datas

Supplementary Table

Supplementale datas : baseline characteristics of the chronics virals infections population

	HIV+				HCV +
	Immunological Success (n=23)	Immunological Impairment (n=7)	Eldery (n=12)	Viremic (n=13)	Viremic (n=4)
Age (years) (Mean ±SD)	51 (± 9)	46 (± 13)	71 (± 3)	48 (± 13)	52 (± 3)
Males (Number, %)	15 (65,2 %)	5 (71,4 %)	9 (75 %)	7 (53,8 %)	4 (100 %)
CD4+ T cells (mean,SD)	888 (± 260)	353 (± 306)	604(± 236)	312 (± 303)	820 (± 187)
CD8+ T cells (mean, SD)	528 (± 252)	865(± 345)	731 (±435)	1629 (±1189)	587 (± 217)
Ratio CD4 / CD8 (mean, SD)	1,72 (± 0,71)	0,33 (± 0,22)	0,5 (± 0,29)	0,17 (± 0,25)	1,42 (± 0,39)
Viral load (copie/ml) (mean, SD)	< 35	< 35	< 35	14894 (± 1356142)	423969 (± 401966)

Figure 55 : Siglec-1 sur les monocytes (CD169), FcγRI sur les neutrophiles (CD64), et CD38 et CD69 sur les lymphocytes, au cours d'infections bactériennes et virales aigües ou chroniques. *Publication en cours de revue avant soumission dans la revue Cytometry Part B portant sur la mesure des niveaux de biomarqueurs infectieux dans divers cas infectieux cliniques.*

Les résultats sont l'évaluation des niveaux des biomarqueurs CD64, CD169, CD38 et CD69 dans des cas d'infections bactériennes ou virales aigües ou chroniques.

Une grande diversité d'infections bien caractérisées ont été sélectionnées : des infections bactériennes, des infections virales aigües (rougeole, dengue, virus de l'Hépatite B, CMV et parvovirus B19) et des infections virales chroniques (VIH à différents stades et virus de l'Hépatite C, tous deux en phases chroniques). Des cas de syphilis ont aussi été étudiés, séparément des infections bactériennes.

Le premier résultat de l'étude est que les pathologies bactériennes sont toujours caractérisées par une élévation de l'expression du CD64 à la surface des neutrophiles. De manière intéressante, les résultats ont montré que ce type d'infections était aussi accompagnée d'une augmentation de la proportion de cellules CD8+ CD38+, CD8+ CD69+ et CD8- CD69+.

Le second résultat est que les infections virales en phase aigüe sont toujours caractérisées par une aumentation de l'expression du CD169 à la surface des monocytes, mais qu'une élévation faible du nCD64 est aussi constatée dans plus de 60% de ces pathologies, majoritairement pour les cas de rougeoles. Egalement, comme les infections bactériennes, les pathologies virales aigües étaient accompagnées d'une augmentation de la proportion des cellules CD8+ CD38%, CD8+ CD69+ et CD8- CD69+.

Le dernier résultat est que les infections virales chroniques sont plus difficiles à caractériser : les marqueurs CD64 et CD169 n'augmentent apparemment que dans certains cas. Il a donc été nécessaire de distinguer les pathologies chroniques en fonction de leurs stades. Il semblerait alors que le mCD169 soit exprimé dans les cas virémiques de VIH chroniques, et non dans des cas de VIH de succès thérapeutique ou d'immunodépression, ou dans des cas d'hépatite C chronique. Une augmentation du nCD64 est constatée dans les mêmes cas.

Les proportions des cellules CD8+ CD38%, CD8+ CD69+ et CD8- CD69+ semblaient être augmentées en cas d'infections virales chroniques. En les distingant en sous-catégories, il a été montré qu'en fait la proportion des cellules CD8+ CD38+ augmentaient chez les patients virémiques, celle des cellules CD8+ CD69+ chez les patients virémiques et immunodéprimés, et celle des cellules CD8- CD69+ chez les patients virémiques, immunodéprimés, en succès thérapeutique, âgés ou infectés au virus de l'hépatite C.

Ainsi, ces résultats préliminaires semblent indiquer les différents types d'infections, bactériennes ou virales, aigües ou chroniques, ont des signatures immunologiques différentes.

Bien que n'étant pas ou peu détecté en cas d'infection virale chronique, le mCD169 reste un marqueur d'intérêt pour identifier les infections virales aigües. A l'inverse, le nCD64 reste un bon marqueur des infections bactériennes, mais son expression est aussi augmentée dans certaines infections virales aigües ou chroniques, qui remttent en question son utilisation dans ces cas pathologiques complexes.

Les autres proportions cellulaires évaluées ont démontré un faible intérêt pour discriminer les infections bactériennes et virales. Toutefois, la proportion de cellules CD8-CD69+ dont l'augmentation est constatée dans les deux types d'infections certes, est plus forte en réponse à une bactérie qu'à un virus. A l'inverse, la proportion de cellules CD8+ CD38+ est aussi augmentée dans les deux types d'infections, mais davantage en cas d'infections virales.

Quoiqu'il en soit, l'intérêt de ces mesures réside surtout sur la double identification de l'étiologie. C'est pourquoi, si seul le nCD64 est élevé, le diagnostic pourra conclure à une infection bactérienne, et si seul le marqueur mCD169 est élevé, à une infection virale, puisque ces deux marqueurs sont bien exprimés dans ces cas. Dans les cas où les deux biomarquerrs seraient augmentés, le mCD169 témoignera bien de la présence d'une infection virale, mais pour le nCD64, il conviendra d'évaluer son augmentation relative par rapport au marqueur mCD169 : une légère augmentation serait plutôt un cas faussement positif, alors qu'une augmentation importante traduirait une co-infection bactérienne.

Enfin, l'étude a bien sûr était réalisée avec la technique de cytométrie en flux « au lit du patient », et a surtout considéré la comparaison des niveaux des biomarqueurs entre eux, mais une étude avec un système entièrement automatisé sera à réaliser.

La tuberculose

La tuberculose est une maladie infectieuse causée par la bactérie *Mycobacterium tuberculosis,* contagieuse, avec des signes cliniques variables. Même si elle est majoritairement présente dans les pays en voie de développement (20 pays regroupent 90% des cas de tuberculose), elle reste aussi un problème important de santé publique en France métropolitaine [175]. Sa prévalence, notamment dans les pays en voie de développement, est liée à la conjonction d'un ensemble de facteurs (précarité, promiscuité, dénutrition, analphabétisme, infrastructure médicale insuffisante) mais surtout à la survenue d'une épidémie d'infections par le VIH. L'Organisation Mondiale de la Santé rapporte en 2015 que la tuberculose tue 1,5 millions de personnes par an et est donc en tête des causes de mortalité d'origine infectieuse associée ou non avec le SIDA [176]. La mortalité liée à la tuberculose a cependant baissé de 47% depuis 1990 grâce en grande partie aux systèmes de soins diagnostiques et thérapeutiques, bien que demeurant parfois difficiles d'accès dans certains pays.

L'objectif du travail a donc été d'évaluer les niveaux des biomarqueurs CD64 et CD169 chez des patients atteints de tuberculose, associée ou non au VIH.

L'hypothèse est que les biomarqueurs, évalués avec la technique de cytométrie en flux « au lit du patient » pourait constituer un nouveau système de diagnostic performant et facilement réalisable pour l'identification de la maladie.

La plupart des nouveaux cas (49 %) se situant dans les zones peuplées d'Asie (Bangladesh, Pakistan, Inde, Chine et Indonésie), l'étude a évalué les niveaux des biomarqueurs chez des sujets d'Inde atteints de tuberculose ou de tuberculose associée au VIH, en comparaison à des sujets indiens sains (figure 56).

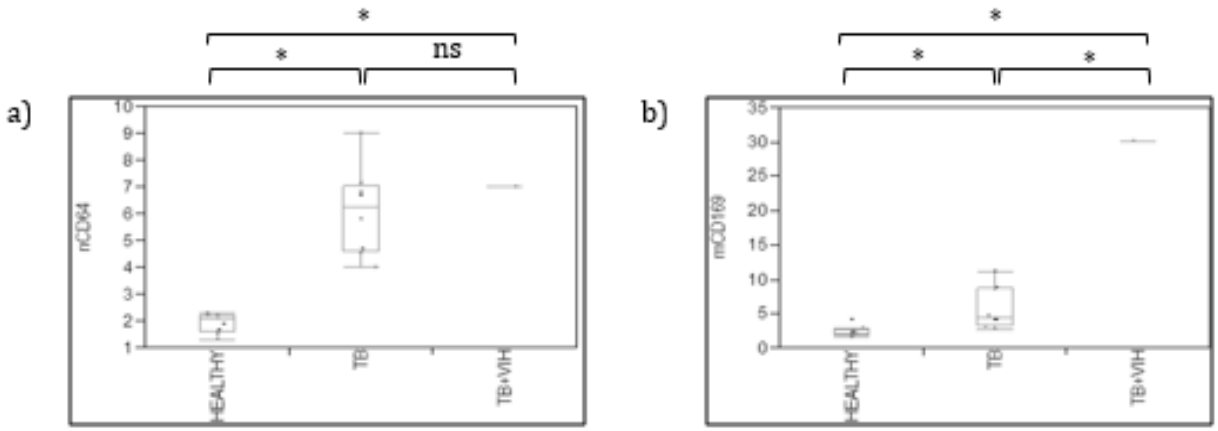


Figure 56 : Biomarqueurs infectieux chez des sujets atteints de tuberculose. *Evaluation des moyennes d'intensités de fluorescence du CD64 sur les neutrophiles (nCD64) et du CD169 sur les monocytes (mCD169) sur une cohorte de 9 sujets sains (HEALTHY), 8 sujets atteints de tuberculose (TB) et 1 sujet atteint de tuberculose associée au VIH (TB+VIH), ayant donné leurs consentements formels. Ces sujets font partie d'une étude clinique réalisée en Inde, et y ont été testés avec la technique de cytométrie en flux « au lit du patient ». Un test-t de Student avec une valeur-p inférieure à 0,05 permet d'apprécier des différences significatives entre les sujets (*) (ns : p > 0,05).*

Les résultats montrent que le niveau de nCD64 est significativement élevé chez les sujets porteurs de tuberculose (TB ; MFI de 6,1 ; *p < 0,001*) ou chez le porteur de tuberculose associée au VIH (TB+VIH ; MFI de 7,0 ; *p : 0,008*) que chez les sujets sains (HEALTHY ; MFI de 1,9). Egalement, il n'y a pas d'influence du VIH sur l'expression du nCD64 puisque les niveaux des sujets porteurs de tuberculose et du sujet porteur de tuberculose associée au VIH sont équivalents (*p : 0,469*).

Par contre, le VIH semble bien influencer le mCD169 puisque son niveau est significativement plus élevé chez le patient porteur de tuberculose associée au VIH (TB+VIH ; MFI de 30,2) que chez les patients porteurs de tuberculose seule (TB ; MFI de 5,9 ; *p < 0,001*) ou que chez les patients sains (HEALTHY ; MFI de 2,4 ; *p < 0,001*). En revanche, les résultats révèlent que le niveau du mCD169 est aussi significativement plus élevé chez les patients porteurs de tuberculose (TB) (supposés non porteurs de VIH) que chez les patients sains (HEALTHY) (*p : 0,006*).

On remarque que cette différence est probablement introduite par deux cas parmi le groupe TB qui ont une expression élevée de mCD169. Malheureusement, il est difficile de confirmer que les sujets porteurs de tuberculose ne sont pas porteurs de VIH ou d'autres virus ; le seul cas confirmé est isolé dans le groupe TB+VIH, mais il se peut que des sujets du groupe TB soient aussi porteurs de VIH, d'où une expression plus élevée du mCD169.

Ainsi, l'étude révèle que le CD64 et le CD169 sont des biomarqueurs intéressants pour discriminer les infections tuberculeuses, des infections tuberculeuses associées au VIH et des non-infections. Le travail est cependant au stade préliminaire puisque peu de cas ont été inclus et sont représentatifs de chaque groupe de la maladie. Il est important de continuer la démonstration pour présenter un potentiel nouvel outil de diagnostic de cette maladie mortelle.

Conclusion 2.4

Le test a été évalué sur une diversité de problématiques infectieuses pour en valider progressivement ses performances et son utilité en routine clinique : la saison hivernale en service d'urgences adultes, le sepsis bactérien en réanimation, le diagnostic infectieux pédiatrique, le VIH et la tuberculose. La limite de ces études reste qu'elles demeurent à un stade préliminaire qui permet de fournir des données prometteuses sur les biomarqueurs mais non confirmées.

Une synthèse des maladies infectieuses abordées dans les parties cliniques de la thèse (parties 2.3 et 2.4), avec les performances associées des biomarqueurs à les diagnostiquer, est présentée en tableau 29.

La recherche en biologie et les progrès techniques du test diagnostic constituent ainsi une solution prometteuse et performante pour le diagnostic des maladies infectieuses, bien qu'évidemment, leur grande diversité nécessitera un travail extensif pour les étudier de manière exhaustive.

Tableau 29 : Synthèse des pathogènes détectés par les CD64 et CD169. *Les bactéries (Gram + : G+ ou Gram - : G-) et virus (ADN ou ARN) (pathogènes) qui ont été rencontrés dans les différentes études cliniques de la thèse (parties 2.3 et 2.4) ont été recensées (nombre de cas testés). Pour chaque pathogène, il a été relevé à chaque fois si les moyennes d'intensité de fluorescence du CD64 sur les neutrophiles (nCD64) ou du CD169 sur les monocytes (mCD169) dépassaient les seuils établis dans les études (nombre de cas où le marqueur dépasse le seuil). Cela a permis de calculer la sensibilité (Se en %) du nCD64 à détecter chaque bactérie, et la sensibilité du mCD169 à détecter chaque virus. Le nombre de cas où le mCD169 dépasse son seuil alors qu'il s'agit d'une infection par une bactérie, et inversement le nombre de cas où le nCD64 dépasse son seuil alors qu'il s'agit d'une infection par un virus, permettent d'apprécier les éventuels cas faussement révélateurs d'infections.*

Pathogènes	Nombre de cas testés	Nombre de cas où nCD64 > seuil	Nombre de cas où mCD169 > seuil	nCD64 Se (%)	mCD169 Se (%)
Bactéries					
Bactéries respiratoires					
Streptococcus pneumoniae (G+)	37	31	3	83,8	-
Mycobacterium tuberculosis	9	9	3	100,0	-
Klebsiella pneumoniae (G-)	5	3	1	60,0	-
Streptococcus pyogenes (G+)	2	2	0	100,0	-
Coxiella burnetti (G-)	2	2	0	100,0	-
Streptococcus oralis (G+)	1	1	0	100,0	-
Klebsiella oxytoca (G-)	1	0	0	0,0	-
Acinetobacter iwoffi (G-)	1	1	0	100,0	-
Pseudomonas aeruginosa (G-)	1	1	0	100,0	-
Pseudomonas stutzeri (G-)	1	1	0	100,0	-
Legionella (G-)	1	1	0	100,0	-
Bactéries gastrointestinales					
Enterococcus faecalis (G+)	2	2	0	100,0	-
Campylobacter jejuni (G-)	1	1	0	100,0	-
Enterobacter cloacae (G-)	1	1	0	100,0	-
Yersinia (G-)	1	1	0	100,0	-
Shighella (G-)	1	1	0	100,0	-
Salmonella (G-)	1	1	0	100,0	-
Bacteroides fragilis (G-)	1	1	0	100,0	-
Autre Bacille Gram Négatif	1	1	0	100,0	-
Bactéries urinaires					
Escherichia coli (G-)	16	14	1	87,5	-
Proteus mirabilis (G-)	2	2	1	100,0	-
Chlamydia (G-)	1	0	0	0,0	-
Bactéries cutanées					
Staphylococcus aureus (G+)	3	2	0	66,7	-
Staphylococus hominis (G+)	2	2	0	100,0	-
Staphylococcus epidermidis (G+)	1	1	0	100,0	-
Morexella osloensis (G-)	1	1	0	100,0	-
Virus					
Virus de la *Grippe A (ARN)*	26	6	24	-	92,31
Virus de l'Immunodéficience Humaine (ARN)	15	6	6	-	40,00
Virus de l'Hépatite C (ARN)	6	0	0	-	0,00
Virus Respiratoire Syncytial (ARN)	5	0	4	-	80,00
Virus de la Rougeole (ARN)	4	4	4	-	100,00
Cytomégalovirus (ADN)	3	2	3	-	100,00
Rhinovirus (ARN)	3	0	1	-	33,33
Virus de l'Hépatite B (ADN)	3	0	2	-	66,67
Norovirus (ARN)	1	0	0	-	0,00
Virus Epstein-Barr (ADN)	1	1	1	-	100,00
Parvovirus B19 (ADN)	1	0	1	-	100,00
Virus de la Dengue (ARN)	1	0	1	-	100,00

3. Discussion des résultats

La problématique générale à laquelle nous avons tenté de répondre était de savoir s'il était possible d'avoir un test plus performant, mais aussi plus rapide et si possible « au lit du patient » par rapport aux tests déjà existants. Pour tenter d'y apporter une réponse, nous avons décomposé le travail en trois parties importantes :

- La mise au point d'une technique de cytométrie en flux « au lit du patient » ;
- La sélection des meilleurs biomarqueurs infectieux et la compréhension de leurs mécanismes d'activation et d'expression ;
- L'évaluation de leurs performances en clinique infectieuse.

Nos travaux ont abouti à la création d'un prototype qui continue d'être évalué dans des sites collaborateurs. A ce stade, nous appelons cela le *Minimum Viable Product.* Cependant, nous pouvons réfléchir aux diverses perspectives d'un test final.

3.1. Implémentation du test en routine clinique

Utilité du test

Les biomarqueurs associés au nouveau test ont démontré leurs performances pour diagnostiquer une étiologie infectieuse. Au-delà de leurs performances, il est important de situer leur utilité clinique pour orienter les soins et les traitements des patients en cas d'infection. Cela passe notamment par la compréhension de l'environnement clinique dans lequel ce test serait évalué et à quel niveau de l'environnement clinique son implémentation serait éventuellement la plus intéressante, la plus utile et apporterait de la « valeur ajoutée » au parcours de soins.

38 patients admis au service des Urgences Adultes de l'Hôpital de la Timone à Marseille ont été suivis pour comprendre le modèle de prise en charge dans ce service (figure 57).

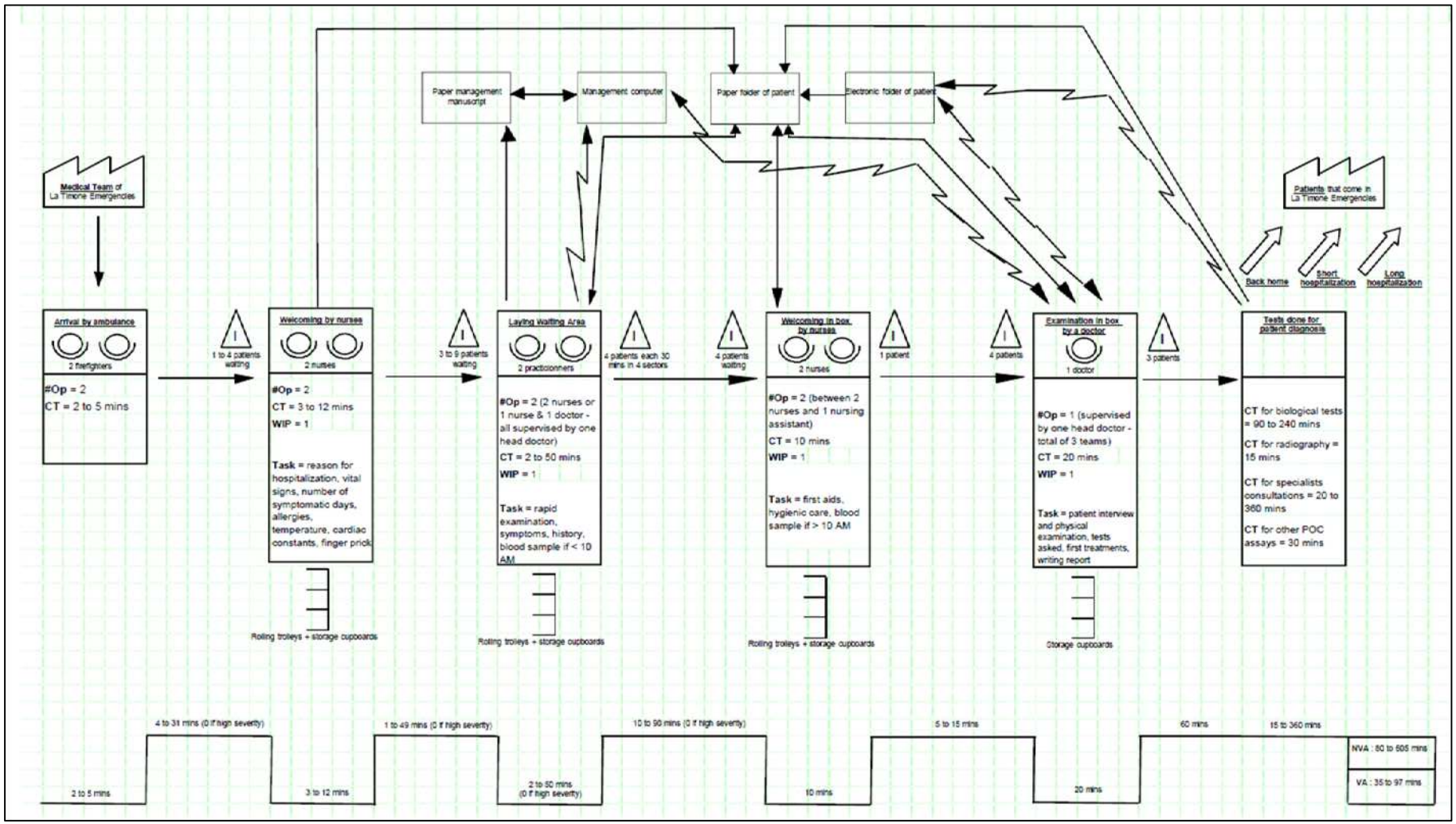

Paper management manuscript
Management computer
Paper folder of patient
Electronic folder of patient
Medical Team of La Timone Emergencies
Patients that come in La Timone Emergencies
Back home
Short hospitalization
Long hospitalization
Arrival by ambulance
2 firefighters
#Op = 2
CT = 2 to 5 mins
1 to 4 patients waiting
Welcoming by nurses
2 nurses
#Op = 2
CT = 3 to 12 mins
WIP = 1
Task = reason for hospitalization, vital signs, number of symptomatic days, allergies, temperature, cardiac constants, finger prick
3 to 9 patients waiting
Laying Waiting Area
2 practicionners
#Op = 2 (2 nurses or 1 nurse & 1 doctor - all supervised by one head doctor)
CT = 2 to 50 mins
WIP = 1
Task = rapid examination, symptoms, history, blood sample if < 10 AM
4 patients each 30 mins in 4 sectors
4 patients waiting
Welcoming in box by nurses
2 nurses
#Op = 2 (between 2 nurses and 1 nursing assistant)
CT = 10 mins
WIP = 1
Task = first aids, hygienic care, blood sample if > 10 AM
1 patient
4 patients
Examination in box by a doctor
1 doctor
#Op = 1 (supervised by one head doctor - total of 3 teams)
CT = 20 mins
WIP = 1
Task = patient interview and physical examination, tests asked, first treatments, writing report
3 patients
Tests done for patient diagnosis
CT for biological tests = 90 to 240 mins
CT for radiography = 15 mins
CT for specialists consultations = 20 to 360 mins
CT for other POC assays = 30 mins
Rolling trolleys + storage cupboards
Rolling trolleys + storage cupboards
Rolling trolleys + storage cupboards
Storage cupboards
2 to 5 mins
4 to 31 mins (0 if high severity)
3 to 12 mins
1 to 49 mins (0 if high severity)
2 to 50 mins (0 if high severity)
10 to 90 mins (0 if high severity)
10 mins
5 to 15 mins
20 mins
60 mins
15 to 360 mins
NVA : 80 to 605 mins
VA : 35 to 97 mins

Figure 57 : Cartographie de la chaîne clinique des soins reçus dans un service d'Urgences. *Etude réalisée sur deux plages de 3 heures aux Urgences Adultes de l'Hôpital de la Timone en Mars et en Avril 2018. Un total de 38 personnes, ayant donné leur consentement formel, ont été suivies en temps réel depuis leur accueil dans le service jusqu'à leur sortie (symbôles en haut à gauche et en haut à droite). Chaque étape de la prise en charge d'un patient est détaillée par un rectangle, dans lequel des informations sont fournies sur le nombre de personnes nécessaires (#Op) pour réaliser cette étape de la prise en charge, leurs qualifications (sigle « o) »), le temps que cela leur prend (CT – Cycle Time), le nombre de patient qui peut être pris en charge simultanément (WIP – Work In Process), et la tâche à réaliser (Task). Le matériel éventuellement nécessaire pour réaliser la tâche est indiqué sous chaque rectangle. Chaque étape des soins est un processus à valeur ajoutée (VA) pour le patient, dont le temps moyen est incrit sous le rectangle d'intérêt en position basse. Tout temps d'attente entre ces soins est inscrit par des flèches entre les rectangles, et constitue des étapes à valeur non ajoutée (NVA) dont le temps est inscrit sous la flèche d'intérêt en position haute. Le nombre de patients en attente de réaliser une prochaine étape de soins est indiqué par un triangle juste avant la tâche (rectangle) d'intérêt. Enfin, les moyens de transmission des informations entre les différentes étapes de la prise en charge sont caractérisés par des flèches lisses (transmission manuscrite) ou en éclair (trasmision informatique) situées au-dessus de la chaîne des tâches.*

Le résultat de cette étude montre qu'un patient admis au service des Urgences Adultes de l'Hôpital de la Timone suit 6 grandes étapes de soins depuis son admission jusqu'à sa sortie du service : l'arrivée en ambulance, l'accueil par les infirmières, les premiers soins en zone d'attente couchée, le transfert en box individuel, l'examination par un docteur en box, et la réalisation des tests complémentaires pour préciser le diagnostic. Il est important de noter que sa sortie peut être ou bien un retour à son domicile, ou bien une hospitalisation conventionnelle « courte » dans un autre service de l'hôpital, ou bien une hospitalisation sévère plus « longue » dans un service de soins intensifs de l'hôpital.

Ces 6 étapes de soins prennent un temps « à valeur ajoutée » variant entre 35 et 97 minutes pour les réaliser. La problématique que révèle l'étude est qu'elles sont articulées au sein d'un temps d'attente « à valeur non ajoutée » variant entre 80 et 605 minutes (01h20 à 10h05). Ce temps est incompatible avec des soins de médecine d'Urgences, et notamment avec des soins de patients infectés nécessitant un triage et un traitement rapides.

Ce temps perdu résulte, d'une part, de la difficulté à échanger au sein du service à différentes étapes des soins, et d'autre part, à échanger avec d'autres services que celui des Urgences. Pour comprendre le premier point, la zone du service des Urgences a été étudiée et représentée (figure 58).

Unistik Touch
30G
1.5mm
Welcoming zone
Arrival by ambulance
Laying Waiting Area
POC assays
Access to the rest of the hospital for different testings
Sector with individuals rooms

Figure 58 : Etude de l'environnement géographique d'un service d'Urgences. *Etude du service des Urgences Adultes de la Timone à Marseille. Le plan de chaque zone du service est détaillé par les indications portant sur le matériel présent, en type (lit, ordinateur, etc.), quantité (nombre par pièce) et distribution géographique (emplacement du matériel). Le contenu de certains matériels sont détaillés par des photographies. Les emplacements noirs sont des zones ne faisant pas partie du service des Urgences.*

L'étude confirme que le service est en effet séparé en trois zones : la zone d'accueil par les infirmières, une petite salle avec du matériel de premiers soins (objet de la visite, prise des constantes, éventuellement quelques tests rapides « au lit du patient »), la zone d'attente couchée, où les patients attendent sur des brancards des soins de première intention effectués par des infirmières (interrogatoire, examen physique, prise de sang), et la zone de soins en box individuels, où les patients sont définitivement pris en charge jusqu'à leur sortie (interrogatoire et examen physique minutieux, tests complémentaires demandés, diagnostic définitif du patient). On comprend aisément que les informations recueillies dans une zone vont conditionner les soins dispensés à l'étape d'après. L'implémentation d'un nouveau test doit donc être ciblée à une zone pour engager un gain de temps au niveau global.

Deux étapes de la prise en charge sont particulièrement chronophages et « sans valeur ajoutée » : la première est le temps attendu en zone d'attente couchée, après des premiers soins reçus mais avant transfert en box individuels, et la seconde est le temps d'attente en box après examen complet du médecin pour avoir le rendu des examens complémentaires avant une prise de décision finale sur l'orientation. Ces deux zones constituent donc un potentiel pour l'implémentation d'un nouveau test de diagnostic.

Dans le premier cas, en zone d'attente couchée, les patients ont entre 10 et 90 minutes d'attente avant d'être transférés en box. Ils n'ont reçu que des premiers soins, à savoir un interrogatoire, un examen physique et une prise de sang. On peut facilement imaginer que l'implémentation d'un test à cette étape pourrait dès lors faire un triage des patients. Tout d'abord, la configuration de la zone s'y prête : les chariots médicaux ont déjà des outils pour la collection du sang au bout du doigt, les armoires de stockage permettent de garder les réactifs du test, prêts-à-l'emploi et stables à température ambiante, les infirmières peuvent facilement réaliser le test en une étape mis au point, et une salle de machines pour l'analyse des tests « au lit du patient » est juxtaposée. Le rendu des résultats étant fait sur le temps de la consultation dispensée par l'infirmière, le test permettrait ainsi de faire un premier tri des patients qui pourraient dès lors retourner à domicile (virose bénine) ou qui nécessiteraient réellement des soins particuliers en box voire une hospitalisation (bactériémie sévère). Ce désengorgement réduirait d'une part le nombre de patients engagés dans davantage de soins aux Urgences, donc de libérer de l'espace dans ce service où les patients attendent souvent une place en box pour leur tour de prise en charge. D'autre part, il réduirait considérablement le temps de soins totaux en service d'Urgences en dispensant les patients des étapes de recherche complémentaire chronophages (économisant donc 110 à 465 minutes, soit 1h50 à 7h45 supplémentaires).

Dans le second cas, les patients, qui ont attendu et qui ont été transférés en box individuels, pour qui un examen clinique plus poussé a été dispensé par un médecin, attendent entre 75 à 420 minutes (1h15 à 7h) les résultats de tests complémentaires pour préciser leur diagnostic. Ces tests sont chronophages par deux aspects : l'un dans le temps même de procédure du test, l'autre dans le délai introduit par sa réalisation délocalisée et non « au lit du patient ». En effet, une examination par un médecin spécialiste peut prendre jusqu'à 6 heures (360 minutes) par exemple car demande à ce que le patient soit transféré dans un autre service, attende son tour, réalise l'examen, en attende les conclusions et soit retourné aux Urgences. Pour des tests hématologiques, le tube de sang prélevé aux Urgences est transféré en laboratoire d'analyses central, préparé et analysé par des procédures aux temps plus ou moins longs, puis les résultats doivent être transmis de manière informatique aux Urgences. Cela peut prendre jusqu'à 4 heures (240 minutes). La réalisation d'un test « au lit du patient » par le médecin en box individuel permettrait un gain de temps dans la réalisation même du test, et surtout en empêchant une perte due à la délocalisation des tests à réaliser. De plus, au-delà du triage des pathologies, ses résultats pourraient orienter les autres tests à réaliser, diminuant de fait leur nombre, le coût qu'ils représentent, et le temps qu'ils prennent à faire. Par exemple, la détection d'une étiologie virale pourrait prévenir de la recherche d'agents pathogènes par hémoculture bactérienne longue et laborieuse à réaliser. A l'inverse, une indication bactérienne économisera des recherches coûteuses de virus par PCR.

Ainsi, l'étude de la prise en charge des patients dans un service de médecine d'Urgences révèle clairement le besoin et l'utilité de ce nouveau test « au lit du patient » capable de trier les patients infectés et d'orienter leurs soins et leurs traitements. De plus, les médecins urgentistes rencontrés se sont montrés enthousiastes face à cette approche.

Réalisation délocalisée du test biologique

L'avantage de ce test « au lit du patient » est qu'il peut être implémenté dans tout environnement. Il est conçu pour être effectué par du personnel non nécessairement formé en médecine de laboratoire (infirmière, aide médicale), voire par le patient lui-même ou ses proches, donc dans une situation hors du laboratoire de biologie médicale. Cependant, cette approche, dite de « biologie délocalisée » soulève certaines contraintes réglementaires. L'ordonnance n°2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale précise que « *la phase analytique d'un examen de biologie médicale ne peut être réalisée en dehors d'un laboratoire de biologie médicale qu'au cas où elle est rendue nécessaire par une décision thérapeutique urgente* » et que « *la lecture du résultat nécessaire à la décision thérapeutique est alors assurée par le médecin [bien que] le biologiste médical conserve toutefois la responsabilité de la validation des résultats obtenus* » [177].

Réaliser notre prototype en biologie délocalisée porte bien une justification médicale validée dans le cadre de l'urgence. Tout d'abord, les besoins de rendu de résultats du test semblent incompatibles avec le temps pour tester l'échantillon au laboratoire de biologie médicale. Ensuite, au-delà de la simple urgence organisationnelle, soulevée d'ailleurs lors de l'étude du service des Urgences de l'Hôpital de la Timone, il s'agit surtout d'une urgence vitale pour le patient porteur de l'infection.

De plus, depuis janvier 2010, la réglementation de la biologie délocalisée a considérablement évolué en France. La législation française autorise désormais le recours à la biologie délocalisée à la fois pour les laboratoires du secteur public et pour ceux du secteur privé, sous la condition d'une accréditation selon la norme NF EN ISO 22870, par le comité français d'accréditation (COFRAC). Les exigences spécifiques de la norme concernent notamment :

- L'approche du processus en termes de politique qualité (gestion documentaire, formation et habilitation du personnel, gestion des dysfonctionnements ou non-conformités, autoévaluation et audits),
- La mise en place d'un groupe d'encadrement des examens de biologie médicale délocalisés,
- La vérification des performances analytiques et des conditions environnementales.

Cette liste d'exigences peut être complétée par exemple avec les exigences spécifiques de la législation française concernant l'évaluation externe de la qualité (EEQ) et la validation biologique *a posteriori* des résultats.

Un accord doit finalement être passé concernant les modalités d'utilisation délocalisée du test dans un service de l'hôpital plutôt qu'en laboratoire de biologie médicale. Cet accord doit délimiter :

- L'origine des crédits pour la réalisation du test et la maintenance de l'appareil nécessaire pour le test,
- Les membres autorisés à réaliser le test dans le service concerné et le mode opératoire qu'ils doivent suivre pour réaliser le test mais aussi en assurer la traçabilité,
- La validation des résultats rétrospective par un biologiste et les responsabilités qu'elle implique,
- Le contrôle qualité de l'interprétation des résultats, avec éventuellement des mesures correctives.

Il est évident qu'obtenir l'accréditation pour réaliser le test de manière délocalisée, par rapport au laboratoire de biologie médicale, simplifie largement la prise en charge des patients dans le service concerné. En revanche, il est évident que ce processus de validation de la biologie délocalisée est plus complexe que réaliser un test directement en laboratoire de biologie médicale (figure 59).

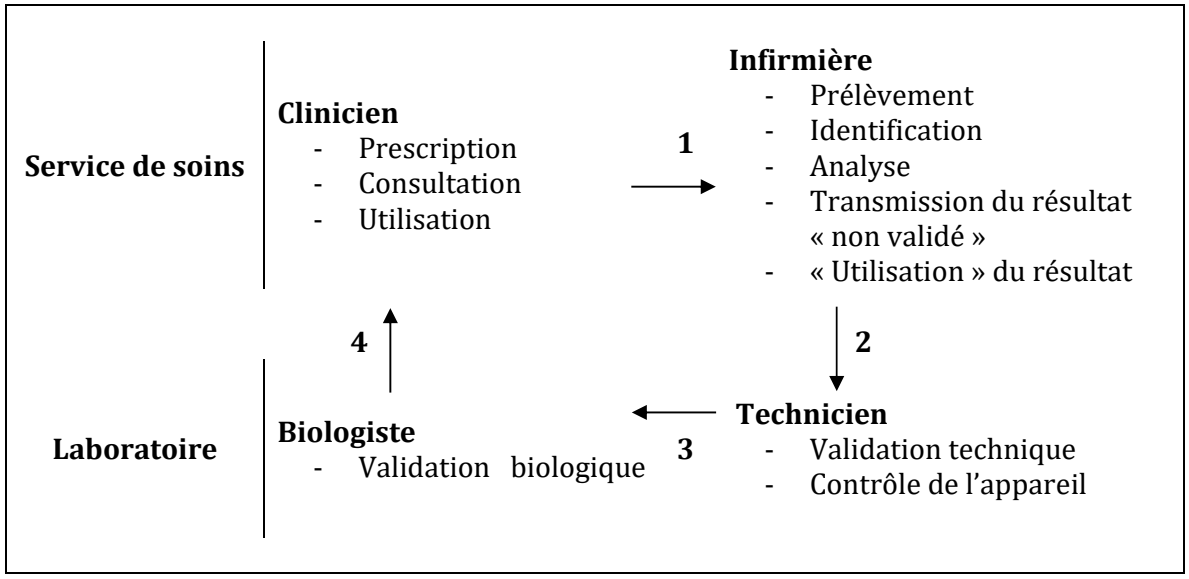


Figure 59 : Processus de validation d'un test délocalisé. *1) Le clinicien du service de soins reçoit le patient et lui prescrit l'examen à faire. 2) L'infirmière du même service réalise le test de manière délocalisée ; le résultat est transmis au laboratoire de biologie médicale pour validation, mais est, dès lors, transmis au clinicien pour le communiquer au patient. 3) Le technicien du laboratoire valide techniquement le résultat. 4) Le biologiste du laboratoire valide biologiquement le résultat et transmet sa validation au clinicien (Tiré de [177]).*

Ainsi, la biologie délocalisée implique que le clinicien respecte les procédures de l'accord passé avec le laboratoire de biologie médicale, et que le biologiste reste engagé sur ses investissements importants de maintenance, formation, validations technique et biologique, et contrôle qualité.

Alternatives au test biologique délocalisé

Bien que l'utilisation du prototype soit réalisable « au lit du patient », les contraintes liées à la réglementation pour la biologie délocalisée font que son utilisation peut aussi, dans un premier temps, être plutôt envisagée en laboratoire de biologie médicale.

En effet, d'une part, même si la vocation du prototype est d'être utilisé sur du sang capillaire, ses performances sont strictement équivalentes sur du sang veineux. Il est ainsi facile d'imaginer que le sang veineux prélevé en service de soins soit acheminé vers le laboratoire de biologie médicale pour y être testé, via une filière spéciale pour traiter ces échantillons urgemment par exemple. Cela minimiserait l'impact de cette réalisation en laboratoire sur le temps de rendu de résultats, et éviterait les contraintes de réalisation et validation d'un test délocalisé. Plus largement, même si son utilisation en service d'Urgences semble plus adaptée sous format délocalisé, il est évident qu'il y a un intérêt à ce que le laboratoire de biologie médicale ait un prototype à disposition et cette filière d'urgence également pour tout service de l'Hôpital qui souhaiterait le prescrire (en service de réanimation par exemple).

D'autre part, il existe des logiciels qui utilisent des algorithmes pour isoler et donner automatiquement les détails de populations cellulaires par cytométrie en flux. Par exemple, le logiciel CytoDiff produit un différentiel cytométrique des globules blancs automatisé en 10 populations, grâce à un cocktail réactif composé de six anticorps monoclonaux de cinq couleurs : un différentiel traditionnel en cinq populations auquel sont ajoutées les sous-populations immunologiques supplémentaires des lymphocytes B et T/NK ainsi que les populations pathologiques de blastes et de granulocytes immatures [178]. De tels logiciels pourraient ainsi être imaginés pour notre application infectieuse et la discrimination rapide des infections bactériennes et virales pourrait être une analyse supplémentaire intégrée à ces appareils de laboratoire. De plus, réaliser les mesures de nos biomarqueurs sur ces plateformes pourrait permettre d'envisager la collection en parallèle de nouveaux paramètres ayant un intérêt pour les infections, comme il l'a déjà été étudiée par plusieurs équipes [179–181].

En plus, ces logiciels sont généralement intégrés sur des cytomètres directement reliés aux automates préparateurs des échantillons ; l'ajout de notre protocole dans cette combinaison ne nécessiterait que quelques modifications mineures de ce processus, tout en offrant une possibilité de réaliser le test plus largement qu'en simple utilisation « au lit du patient » mais surtout en combinant ses résultats avec des informations complémentaires. Par exemple, les comptes de certaines cellules immunitaires (leucocytes totaux, neutrophiles) peuvent renforcer la valeur prédictive de notre test ou certaines expressions anormales de leurs marqueurs peuvent renforcer son habilité à détecter la majorité des pathologies infectieuses. D'ailleurs, cette approche pourrait même être étendue en test « reflex diagnostics », c'est-à-dire que le test infectieux soit réalisé systématiquement sur ces plateformes lors de la détection d'une anormalité dans l'échantillon.

Ainsi, l'utilité du prototype mis au point a été démontrée dans un service d'Urgences. Avec une technologie des plus optimisées, son utilisation sera envisageable facilement « au lit du patient ». Toutefois, en raison des contraintes que peut poser une telle biologie délocalisée, on peut imaginer que la recherche de ces biomarqueurs soit aussi réalisable en routine en laboratoire de biologie médicale, de manière facilitée grâce à une filière d'échantillons urgents ou grâce à une plateforme de rendu rapide de cytométrie en flux. Quelle que soit l'option finale, l'implémentation du prototype semble adéquate dans l'environnement de la routine clinique.

3.2. Perspectives autour de la technique de cytométrie en flux

Conduite de l'optimisation de la technique

Les tests de diagnostic actuels pour la discrimination des infections bactériennes et virales ne sont pas satisfaisants, non seulement en terme de standardisation des procédures, mais aussi en terme d'utilisation dans un environnement proche du patient.

Ce manque a été notifié par un consensus [130], qui a donc établi des critères que devraient normalement satisfaire les tests infectieux. Ces critères ont guidé nos objectifs à atteindre pour mettre au point la nouvelle technique.

En effet, d'une part, la mesure précise de variations du système immunitaire requiert des essais standardisés, pour distinguer ce qui change réellement au niveau biologique, de possibles artéfacts techniques. La cytométrie en flux génère des variations lors de la préparation de l'échantillon, la manipulation des réactifs, la configuration des instruments et l'analyse des données [133–138]. Il apparaissait donc nécessaire d'adopter un protocole précis de préparation de l'échantillon, l'utilisation de techniques innovantes pour réduire les risques de variabilité inter-expérimentale, et un paramétrage standard des instruments.

D'autre part, dans le cas précis de l'environnement clinique infectieux, il a été évoqué la nécessité, au-delà d'un test standardisé, d'un test « au lit du patient », c'est-à-dire dont l'utilisation est faisable facilement et rapidement, au moment et à l'endroit des soins [130].

Au sens large, ce type d'outil diagnostic est destiné à être effectué à proximité directe du patient, au cabinet médical, dans des pharmacies, des polycliniques ou centres médicaux, aux urgences de certains établissements hospitaliers, voire dans les laboratoires professionnels hospitaliers ou non, à la condition de pouvoir disposer du résultat dans un bref délai (30 à 60 minutes).

Maîtrise du temps du test

Selon le consensus, un test infectieux doit comporter au maximum deux étapes, et au mieux une seule étape non régulée en temps, car il s'agit d'un test qui doit pouvoir être réalisé facilement en situation d'urgence ou du moins en environnement médical complexe (Urgences, Soins Intensifs). Ce critère était un vrai défi technique car une procédure de cytométrie en flux standard pour le marquage de marqueurs de surface compte au minimum trois étapes : le marquage des cellules leucocytaires, la lyse des globules rouges et le lavage final de l'échantillon préparé. L'innovation majeure de notre test est d'avoir réussi à réunir le marquage et la lyse en une seule étape et à supprimer le lavage, sans trop affecter les performances techniques. Aussi, toutes ces étapes se font dans un seul dispositif qui est le tube de cytométrie, donc facilement manipulable.

Toutefois, bien qu'optimisée, la procédure n'est pas immédiate et requiert toujours un contrôle du temps d'incubation. Nous faisons l'hypothèse que le test doit comporter un outil intrinsèque du contrôle du temps d'incubation car il est difficile pour un praticien de le mesurer précisément, puisqu'il doit rester concentré sur son examen clinique et son interrogatoire. Nous avons imaginé une solution simple à ce problème, décrite en figure 60.

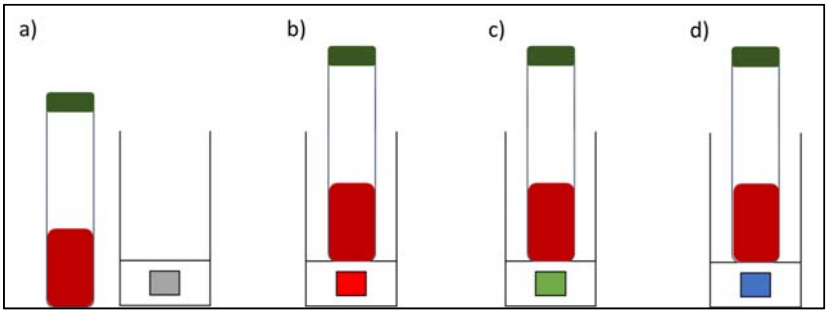


Figure 60 : Portoir de contrôle du temps d'incubation. *a) Lorsque le test serait réalisé (réactifs mélangés), on peut imaginer que le praticien poserait le tube sur le portoir « timer » avant son analyse au cytomètre en flux. b) Lorsque le tube serait placé sur ce portoir, une lumière rouge indiquerait que le temps de 10 à 15 minutes d'incubation des réactifs commence. c) Puis, la lumière deviendrait verte, indiquant au praticien qu'il pourrait analyser le contenu du tube avec le cytomètre en flux. d) S'il ne le fait pas immédiatement, une lumière bleue indiquerait que le tube est disposé sur le portoir depuis plus de 24 heures, temps maximal que nous avons démontré de stabilité des résultats du test et au-delà duquel les performances ne sont plus garanties, indiquant ou bien qu'un risque est pris à l'analyser, ou bien que le test est à refaire.*

Choix de l'échantillon

L'un des pré-requis important est que le test doit pouvoir être fait sans préparation de l'échantillon à analyser, et au mieux que cet échantillon soit une goutte de sang capillaire, collectée avec un dispositif de quantification du volume prélevé. Ce critère a été partiellement respecté.

Il a été évident de ne pas réaliser le test sur un échantillon nécessitant une étape préalable de préparation. Le meilleur échantillon humain restait le sang total, bien qu'il aurait été intéressant de penser à analyser des échantillons encore moins invasifs, tels que la salive par exemple.

La plupart des expériences ont été réalisées sur sang veineux, accessible dans les laboratoires d'analyse, mais nous avons voulu que le test infectieux puisse être réalisé sur une seule goutte de sang capillaire, pour pouvoir s'appliquer à tous types d'individus et être facilement réalisé dans tous types d'environnements. En effet, le sang capillaire représente un avantage pour les catégories d'individus sensibles que sont les personnes âgées et les enfants : ce sont des sujets pour lesquels un prélèvement veineux est difficilement réalisable (procédure de collection invasive), et particulièrement pour les enfants, la prise de sang veineux est limitée en quantité (1,5 mL pour un prélèvement de sang moyen pédiatrique contre 4 mL pour un prélèvement moyen de sang veineux adulte).

La prise de sang capillaire d'une goutte au bout du doigt représente environ 25 µL de sang, et consiste seulement en une petite piqûre au bout du doigt à l'aide d'un dispositif jetable. La grande qualité de notre test est donc qu'il puisse être applicable avec du sang capillaire, comme il l'a été optimisé (faible volume de sang nécessaire) et démontré (validation de l'équivalence avec le sang veineux).

Toutefois deux limites sont notables : la première est que la démonstration de l'équivalence des performances du test entre un sang veineux et un sang capillaire n'a été faite que sur un nombre restreint d'individus, et que des études sont toujours en cours pour augmenter ce nombre ; la seconde est que nous n'avons pas utilisé un procédé pour quantifier le volume de sang pris au bout du doigt (figure 61).

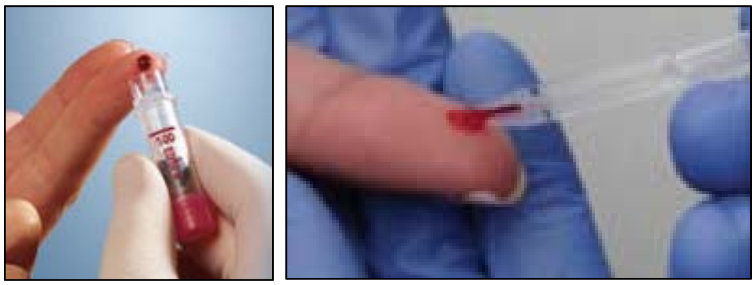


Figure 61 : Dispositif de quantification du sang capillaire. *Exemples de dispositifs utilisés en routine pour quantifier précisément le volume de sang pris au bout du doigt après piqûre.*

Pour y remédier, nous avons comparé l'influence du volume de sang sur les résultats de notre test (travaux non exposés dans la thèse). Cette comparaison a permis de démontrer que les performances étaient équivalentes pour un volume de sang allant de 2,5 à 50 µL de sang. En-deça de ces limites, le nombre de cellules à analyser peut devenir limitant, et faire perdre en robustesse ; au-delà, le ratio entre le volume de sang et le volume de lyse ne permet plus de lyser correctement les globules rouges. Rester dans ces limites acceptables peut normalement être atteint en jouant sur le modèle de la lancette (il existe différents modèles produisant des gouttes plus ou moins volumineuses) et le personnel est formé à cet acte. Nous pensons qu'il est aussi faisable de jouer sur le format du bouchon collecteur (qui ne peut accepter qu'un volume maximal). Notre test semble donc assez robuste pour s'accomoder de la variabilité du volume de sang, mais c'est car l'on ne regarde que des MFI et des pourcentages de leucocytes. S'il était nécessaire d'énumérer les cellules pour rendre un compte absolu, il faudrait imaginer à ce moment là un capillaire taré précisément à 5 ou 10 µL par exemple.

Composants du kit

Les composants intrinsèques du test doivent suffire à sa réalisation, sans matériel supplémentaire, si ce n'est des gants.

Tout d'abord, l'utilisation de sang capillaire permet de s'affranchir de tout le matériel de prélèvement : seringue, tube anti-coagulé, etc. Ensuite, les anticorps sont en format sec dans le tube de test principal, et leurs quantités sont optimisées pour maximiser leurs affinités et leurs sensibilités de détection. Seule la lyse est un réactif supplémentaire à ajouter.

Dans le cadre de la thèse, nous n'avons utilisé la lyse que sous sa forme standard en flacon requierant un pipetage pour être ajoutée au tube principal. Lors du développement, il sera obligatoire de s'affranchir de cette unique étape de pipetage, en imaginant que le volume de lyse nécessaire pour un test soit compris dans une dose unitisée (figure 62).

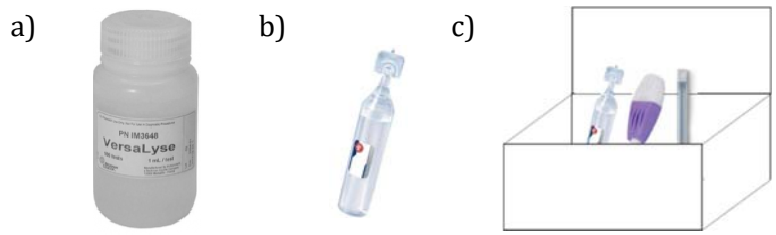


Figure 62 : Réactif de lyse dans le test final. *a) Le réactif de lyse utilisé dans le test est la Versalyse, dont la présentation standard est un flacon de 100 mL dans lequel il faut venir pipeter les 500 µL nécessaires pour le test. b) Une dose unitisée jetable comprenant directement et uniquement les 500 µL de lyse nécessaires pour le test sera le format préférentiel pour le développement du test. c) Le flacon unitisé de lyse sera fourni dans le kit du test avec le tube principal contenant les anticorps, et la lancette de collection du sang, permettant de s'affranchir de tout matériel supplémentaire, si ce n'est des gants, et de pouvoir jeter tout le matériel en fin de procédure.*

Il est important de noter que nous aurions pu imaginer que la lyse ne soit pas juxtaposée au tube principal, mais intégré dans un compartiment de ce tube, isolé au-dessus des anticorps secs. Le problème est que la solution de lyse liquide, même isolée, risque de laisser diffuser une humidité incompatible avec la stabilité des anticorps en format sec. Son empaquetage en dose unitisée est donc préféré. En plus, sous ce format, nous savons déjà que l'ensemble des réactifs du test est conservable à température ambiante (non obligatoirement contrôlée) et pendant des durées plutôt importantes (supérieures à 1 an).

Toutes ces optimisations (sang capillaire, séchage des anticorps, dose de lyse unitisée) contribuent à fournir un test prêt-à-l'emploi, réalisable en main en moins de 1 minute et pour lequel il n'est pas nécessaire d'avoir reçu une formation spécifique. Il est donc largement possible d'imaginer que les tests puissent être faits quasi-simultanément sur plusieurs patients sans limite de nombre, d'autant plus que le test final est analysé sur le cytomètre en flux en 2 minutes seulement.

Ce débit est obligatoire, et a été largement indiqué par le consensus en tant que tel, pour gérer des situations d'épidémies infectieuses où il faut tester un nombre important d'individus successivement. Cette problématique est soulevée par bien des tests, où certes le dispositif est simple à manipuler et la machine est optimisée, mais où l'analyse du test sur l'appareil dure plusieurs dizaines de minutes, sans laisser la possibilité de pouvoir analyser un autre échantillon [75].

Le cytomètre en flux

L'analyse sur le cytomètre en flux est toutefois largement discutable dans le cadre des travaux qui ont été faits pour la thèse.

Idéalement, l'appareil doit être petit, robuste, portable, résistant à la poussière, et doit pouvoir fonctionner sur batterie et sans approvisionnement en eau. Ces caractéristiques ne font pas vraiment penser à un cytomètre tel qu'on l'utilise au laboratoire (figure 63).

a)

b)

c)



Figure 63 : Cytomètres en flux. *a) Dans la thèse, l'ensemble des tests ont été réalisés sur un cytomètre en flux Navios (Beckman Coulter), non adapté à un test «au lit du patient ». b) Un modèle de cytomètre en flux plus adapté est le Cytoflex (Beckman Coulter), plus petit et plus léger (format de 42.5 cm x 42.5 cm x 34 cm et un poids de 23.4 kg), mais dont l'écran de contrôle reste séparé de l'appareil et le fonctionnement, non automatisé. c) Des cytomètres en flux de « paillasse », utilisables en « presse-bouton », comme l'Accellix (LeukoDx), existent déjà et constituent un objectif final vers lequel il faudrait se diriger.*

Au niveau des raccords, la plupart des cytomètres fonctionne sur branchement électrique. Pourtant, un Cytoflex, qui contient 3 lasers et 13 détecteurs, ne consomme qu'environ 100 watts, soit 1 kWh pour une journée de travail, ce qui est facilement stockable dans une batterie moyenne. On imagine donc qu'en réduisant le nombre de détecteurs et l'électronique, pour correspondre à notre test simple à 3 couleurs, on peut encore réduire nettement cette consommation.

On peut noter qu'aujourd'hui, les laboratoires n'ont pas systématiquement des cytomètres avec 3 lasers. Nous avons bien sûr mis au point notre panel d'anticorps-conjugués en privilégiant des associations avec des fluorochromes excités par 3 lasers distincts, pour s'affranchir de compensations à l'analyse. En revanche, il aurait été largement envisageable de considérer un panel avec des associations où les fluorochromes sont tous excités par le même laser pour être adapté à des cytomètres de certains laboratoires qui n'aient qu'un seul laser. Cette décision sera donc à prendre lors du choix de l'appareil final ; dans la thèse nous avons préféré privilégier une analyse sans compensations pour refléter directement l'expression des marqueurs.

Au regard de la fluidique, un cytomètre a besoin d'un apport en liquide de gaine, bidon externe encombrant. Cela pourrait facilement être substitué par un branchement direct sur le réseau d'eau avec un filtre intermédiaire adéquat (type milliQ). Cela rendrait toutefois le cytomètre dépendant aussi du branchement en eau. Enfin, le cytomètre doit rejeter ses déchets liquides (échantillons analysés, masse fluidique correspondante), normalement dans un bidon externe encombrant également. On pourrait imaginer que, pour générer le moins de déchets supplémentaires possibles, le réseau du cytomètre pourrait être organisé de telle façon que les liquides analysés ou servant à l'analyse soient stockés dans une chambre intermédiaire au cours de l'analyse, puis rejetés dans le tube du test à la fin de l'analyse (en circuit fermé donc). Toutefois, aucun processus de la sorte n'a encore été rencontré ni testé.

Aussi, le mieux serait également de réussir à intégrer l'ordinateur en un écran tactile « presse-bouton » directement apposé sur l'appareil. Au-delà d'en faciliter son fonctionnement, cela réduirait aussi son coût. Enfin, toutes les composantes mêmes du cytomètre en flux (lasers, détecteurs, électronique) pourraient être optimisées pour gagner en place et en coût.

Calibration

Il serait obligatoire de considérer que, préalablement à toute analyse, l'appareil soit calibré avec un contrôle de qualité précis. Des contrôles de la qualité de l'appareil existent déjà grâce à des billes ; il suffira d'en rendre l'utilisation automatique. En revanche, un gros travail est nécessaire pour mettre en place un contrôle de la qualité du test sur l'appareil. Des solutions à envisager sont par exemple :

- Une solution avec des billes à passer préalablement au test, recouvertes de quantités connues et croissantes de fluorochrome. Elles permettraient de calculer une droite de la moyenne de l'intensité de fluorescence en fonction de la quantité de fluorochrome, et ainsi de situer l'échantillon analysé. Leur inconvénient est qu'elles n'ont pas les mêmes propriétés de fluorescence et de réflexion que les cellules.

- Une solution avec des cellules contrôles marquées et lyophilisées, dont on connait le niveau à atteindre. Toutefois, il faudrait veiller à ce que le marquage de ces cellules soit excatement réalisé avec les mêmes anticorps conjugués que le test pour être comparable à l'échantillon à analyser.
- Une solution avec une analyse statistique simple d'échantillons non pathologiques préalablement au test d'échantillons infectieux (comme fait lors des calculs de valeurs de référence). Cela permettrait d'établir des seuils qui évolueraient avec le cytomètre. En revanche, bien qu'en nombre important, il faudrait s'assurer de la disponibilité en échantillons non pathologiques.

La détermination de la meilleure solution nécessitera une évaluation précise de la reproductibilité du test entre plusieurs laboratoires et de ces contrôles, mais permettra à la fin de réaliser le test dans toute structure en routine.

Analyse

Enfin, l'analyse du test sur l'appareil de cytométrie en flux se fait à l'aide du logiciel fourni. Dans le cadre d'un outil « au lit du patient », il est nécessaire que le résultat soit rendu de manière automatique, non ambigüe et sans interprétation possible du clinicien. Cela nous semble facilement réalisable car le logiciel possède déjà certaines fonctionnalités d'analyse automatique pour la sélection des populations d'intérêt à analyser. Le test mis au point a l'avantage également de ne pas nécessiter de compensations des résultats, grâce au choix des anticorps conjugués qui a été fait.

De plus, la reproductibilité des réactifs et de la méthode garantit que les populations d'intérêt tombent toujours dans des zones bien définies, ce qui rend le fenêtrage automatique d'autant plus facile voire inutile. Il y a donc surtout un besoin de rendu automatique des résultats, voire de leur intégration directe dans le dossier du patient grâce à la connectivité de l'appareil.

Ainsi, la mise au point d'une nouvelle technique de cytométrie en flux vient s'inscrire dans une volonté de pouvoir faire le test au plus près des soins du patient. Les travaux de la thèse ont permis d'aboutir à une caractérisation quasi-complète des réactifs, se rapprochant au plus près de ce qu'on peut attendre d'une solution de mesure standardisée et réalisable « au lit du patient ». En revanche, un travail reste à faire sur l'appareil d'analyse, dont les caractéristiques se rapprochent mais n'atteignent pas encore ce qui serait attendu en soins au chevet du patient. Il est évident que toute cette mise au point pourra aussi bénéficier à d'autres domaines diagnostiques que l'identification de l'étiologie infectieuse (en combinant d'autres marqueurs) ; par exemple, toute application pédiatrique, telle que la détection précoce de déficits immunitaires graves chez les nouveau-nés, pose des problèmes de prélèvement sanguin qui seraient palliés avec la nouvelle technique. Plus largement, l'application de cette technique robuste et sans source de variabilités pourra aussi constituer un avantage lors de la réalisation d'études multicentriques, sans nécessiter de transférer les échantillons.

3.3. La complexité des pathologies infectieuses.

L'enjeu du test mis au point dans le cadre de la thèse est qu'il doit être applicable à toute personne pour en identifier la cause de son infection. L'objectif du travail de la thèse tenait donc dans ce contexte complexe, qui est que le test doit donc être capable de diagnostiquer tout un ensemble de maladies diverses, et non une seule pathologie isolée.

Le travail est donc passé en tout premier par la recherche des meilleurs biomarqueurs pour caractériser tout état infectieux bactérien ou viral. Il est important que les analytes choisis reflètent une information quantitative et non qualitative sur le type infectieux, mais au mieux, il aurait intéressant qu'ils soient couplés avec des analytes précis d'identification des pathogènes (figure 64).



Figure 64 : Tests d'identification des pathogènes. *De nombreux tests existent sur le marché pour l'identification précise des pathogènes, notamment grâce à l'utilisation de la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction). Les cibles infectieuses à identifier sont « multiplexées », c'est-à-dire qu'un test est capable de reconnaître plusieurs pathogènes (Veritor Plus : Grippe, Virus Respiratoire Syncytial (RSV), Streptocoques ; Alere : Grippe, RSV, Streptocoques ; Gene Xpert : Plus de 20 pathogènes ; Cobas List : Grippe, Streptocoques ; BioFire Film Array : Plus de 20 pathogènes).*

Dans notre projet, les biomarqueurs ne permettent pas de déterminer précisément l'agent infectieux, mais permettent néanmoins d'orienter les tests d'identification à réaliser. Même si l'agent responsable n'est pas identifié, nous avons démontré qu'un tel test de triage avait déjà une grande utilité clinique, en terme de gain de temps notamment dans les soins reçus en services d'Urgences. Ce genre d'études devrait être étendu à d'autres institutions médicales, car c'est la compréhension de leurs problématiques qui permet d'améliorer le test. On imagine par exemple que des services de Soins Intensifs ont des problématiques de triage, de soins et de traitements similaires mais où le gain lié au test serait sûrement identifié dans un autre endroit de la succession des étapes de la prise en charge : par exemple, le monitoring du patient, l'efficacité antibiotique, la surveillance des infections opportunistes.

Notre choix s'est porté sur des biomarqueurs exprimés à la surface des cellules immunitaires. En effet, le système immunitaire réagit rapidement à une infection, et quand des signes cliniques apparaissent (fièvre, symptôme local), les cellules du système immunitaire sont déjà en action : elles ont « senti » l'intrus et montent une réponse adaptée en communiquant entre elles. Des molécules sont donc produites à leur surface et relarguées dans le milieu. Ces molécules sont des marqueurs de l'infection et leur analyse peut donner des indications sur la nature du pathogène, car le système immunitaire ne répond pas de la même façon à l'attaque d'une bactérie ou d'un virus [182]. Des marqueurs du système immunitaire existent déjà en mesures actuelles utilisées en routine clinique (nombre de leucocytes, nombre de neutrophiles, CRP, PCT) et ont largement démontré leurs performances.

Cependant, la problématique de la diversité du monde immunologique et clinique des patients infectés font qu'il est difficile de s'accorder sur les résultats d'un seul test, aussi performant soit-il, plutôt que de les considérer chacun avec leurs forces et leurs faiblesses, et en tenant bien compte des profils cliniques et microbiologiques des patients. Il y a donc une recherche permanente de nouveaux biomarqueurs, dans laquelle nous nous sommes inscrits (figure 65).



Figure 65 : Tests infectieux basés sur des biomarqueurs de l'hôte. *Exemple de tests « au lit du patient » en cours de développement pour l'identification de l'étiologie infectieuse, via la mesure du CD64 pour Accelix, des MxA+CRP pour Febri Dx, des TRAIL+IP-10+CRP pour ImmunoXpert, et de l'HNL pour MiniCare.*

Evidemment, la compétition est importante, et notamment elle est beaucoup encouragée par de nombreux appels d'offres et concours [54], qui visent à promouvoir et à soutenir financièrement le développement de nouveaux outils de diagnostic innovants pour lutter contre la résistance antimicrobienne. Toutefois, aucun test basé sur des biomarqueurs de l'hôte n'est pour l'instant sur le marché ni n'a démontré un réel avantage en routine clinique. Lorsqu'ils le seront, on peut penser que notre test pourra largement co-exister pour cette même application, et cela nous encourage même à mieux le caractériser et l'optimiser.

D'ailleurs, l'étude des voies d'activation des biomarqueurs que nous avons sélectionnés, le CD64 et le CD169, nous fait dire que les biomarqueurs sont bien positionnés dans la séquence de la réponse immunitaire. Les classes I et II des interférons semblent être des effecteurs majeurs de leurs augmentations en réponse à un virus ou une bactérie, les rendant suffisemment exprimés à la surface des leucocytes, donc facilement mesurables en cytométrie en flux. En effet, à l'inverse, détecter directement les interférons est connu pour être difficile car ils sont produits en faible quantité et sont très labiles dans le sang. Aucun test de diagnostic n'est basé sur la quantification de ces molécules. En revanche, le choix des marqueurs induits par ces molécules est plus pertinent car plus facile pour leur détection et leur stabilité. Evidemment, il doit exister d'autres biomarqueurs induits par les interférons, de manière plus ou moins semblable aux CD64 et CD169. Les techniques de transcriptomique ou protéomique pourraient permettre d'ailleurs de screener un large éventail de biomarqueurs exprimés en réponse aux interférons et/ou aux infections communes.

La révélation de biomarqueurs intéressants ne sera toutefois pas un obstacle car l'avantage de la cytométrie en flux est de pouvoir mesurer simultanément plusieurs biomarqueurs. Nous avons par exemple commencé à démontrer un intérêt d'étudier l'HLA-DR ou l'HLA-ABC, en parallèle des autres biomarqueurs, mais leurs performances doivent être confirmées. Quels que soient les autres biomarqueurs déterminés, il suffira alors simplement d'ajouter de nouveaux anticorps conjugués sans changer pour autant la technique. Nous voyons notre approche comme une solution évolutive qui s'enrichira plutôt que de s'obsoléter.

Nous nous sommes limités à la caractérisation de biomarqueurs utiles pour le triage des infections bactériennes et virales, et non à l'identification d'un pathogène particulier, mais cela impliquait donc de valider leurs performances sur une multitude de cas et non sur une seule pathologie.

De plus, une présentation clinique est toujours à considérer dans son ensemble car il peut y avoir d'éventuels facteurs perturbants comme des traitements interférants (immunostimulateur, immunosuppresseur, chimiothérapie, antibiothérapie) ou des inflammations non infectieuses (chirurgie, brûlures, maladies autoimmunes, néoplasies, maladies chroniques).

L'enjeu est donc de réussir à estimer la fiabilité avec laquelle les résultats sont donnés par les biomarqueurs dans ces cohortes complexes. Nous avons réalisé plusieurs études dans le cadre de la thèse, et il semblerait que les biomarqueurs choisis aient des performances satisfaisantes et supérieures aux tests existants (Tableau 30).

Tableau 30 : Evaluation globale des performances du test. *Comparaison des performances du test avec ce qui est attendu ou idéal d'après le consensus* [130]*, en termes de population ciblée, sensibilité (Se) et spécificité (Sp) du diagnostic, temps de rendu du résultat, temps de réalisation du test, temps de formation au test, et prix d'un test individuel. Ces performances sont aussi comparées à celles des tests de référence, la Procalcitonine (PCT) et la Protéine C-Réactive (CRP).*

Critères	Acceptable	Idéal	Test de la thèse	PCT	CRP
Population ciblée	Patient se présentant avec une fièvre non-sévère dans un environnement médical	Population fébrile entière	Population entière	Patients fébriles systémiques	Population fébrile entière
Sensibilité	Se > 90%	Se > 95%	75-100%	63% < 85% < 95%	30% < 69% < 89%
Spécificité	Sp > 80%	Sp > 90%	85-100%	26% < 80% < 96%	57% < 75% < 93%
Temps de rendu de résultat	< 2 heures	< 10 minutes	10-15 minutes	> 20 minutes	< 10 minutes
Temps de réalisation du test	< 5 minutes	< 1 minute	< 1 minute	< 1 minute (POC)	< 1 minute (POC)
Temps de formation au test	< 2 jours	< 0,5 jours	< 0,5 jours	< 0,5 jours	< 0,5 jours
Prix d'un test individuel	5 USD	< 1 USD	5 USD	20 USD	4-8 USD

L'un des gains notables du test est tout d'abord sa capacité à discriminer toute pathologie infectieuse, systémiques ou locales, à tout stade de l'infection. Cet avantage n'est pas donné par exemple à la PCT. En effet, si l'infection est trop localisée, le dosage de la PCT est inutile. De même, si le patient est testé dès le début des symptômes, nous avons observé que la PCT n'était pas toujours détectable. A l'inverse, il semblerait que la PCT disparaisse plus tôt et soit moins informative si le patient est testé tardivement, là où nos biomarqueurs sont maintenus plus longtemps dans l'organisme (plusieurs jours).

Ensuite, la combinaison de deux biomarqueurs, le CD64 et le CD169, rend le test capable de donner une indication multiple sur l'état infectieux du patient : non infecté, infecté par une bactérie, infecté par un virus, ou co-infecté par une bactérie et un virus. Cette indication puissante est traduite dans les valeurs de sensibilité et spécificité obtenues, mais aussi par rapport à la PCT ou la CRP qui ne donnent que l'information d'être infecté par une bactérie, et ne réponde que par leur négativité à la possibilité d'être infecté par un virus. Cela se traduit d'ailleurs par le fait que la PCT et la CRP manquent de spécificité : la PCT peut répondre à des infections fongiques, et à l'inverse la CRP s'élève parfois en réponse à des processus inflammatoires non infectieux ou voire même parfois à certaines infections virales. Il n'en demeure pas moins qu'il est fortement probable que les performances de nos biomarqueurs puissent aussi être affectées dans certains cas, par exemple, si certains pathogènes échappent à la détection ou bien dévient la réponse immunitaire.

Aussi, les valeurs de sensibilité et spécificité de nos biomarqueurs peuvent être affectées par l'étape souvent laborieuse de comparaison des expressions des marqueurs avec les dossiers des patients. Les pathologies sont parfois difficilement identifiables, ou peu statistiquement fiables. Tester davantage de cas est dépendant non seulement du respect de procédures éthiques complexes, mais aussi tout simplement de la fréquence relative des pathologies. Bien les caractériser est également plus coûteux car nécessite de réaliser des tests supplémentaires. Cependant, ce manque de la thèse est primordial pour appréhender les variabilités inter-pathologiques, voire inter-patients pour chacune des infections, et reflète tout ce qui reste à faire avant l'entrée en developpement du produit et la validation clinique du test. Notamment, en plus de tester la multitude de maladies infectieuses possibles, il faudra évaluer l'impact des biomarqueurs en conditions réelles, c'est-à-dire lorsqu'ils sont testés au plus près du patient et lorsqu'ils orientent les traitements par antibiotiques.

Pour conduire au mieux toutes ces études, il serait plus aisé d'avoir accès à des échantillons de manière rétrospective plutôt que de devoir monter des études prospectives. Malheureusement, la plupart des échantillons sanguins conservés le sont sous forme de PBMC congelées. Cela ne convient évidemment pas à notre test puisque les neutrophiles ne s'y trouvent plus. Nous avons imaginé que peut-être les leucocytes pourraient être maintenus dans leur intégrité au sein d'échantillons sanguins simplement congelés (sans autre pré-traitement). Cette hypothèse a été évaluée et confirmée (travail présenté en Annexe 1, en cours de soumission dans la revue *Journal of Immunological Methods*). Cela ouvre comme perspectives d'avoir accès à des banques de sang congelé (fréquentes dans les études de virologie entre autres), et de collecter de nouveaux échantillons à travers le monde de manière simplifiée, en s'affranchissant de la prépration des PBMC. Une autre piste à l'étude, encore plus facile à implémenter, est le séchage de gouttes de sang sur papier buvard (technique des *Dried Blood Spots* appliquée à la cytométrie), avec des résultats préliminaires encourageants.

Ainsi, de nombreux biomarqueurs sont constamment évalués pour le triage initial des patients infectés, sans qu'un consensus ne se dégage sur leur intérêt et leur fiabilité. Le manque de tests de diagnostic étiologique est reconnu en clinique comme un besoin urgent à résoudre. Une revue extensive de la littérature et une compréhension des problématiques médicales ont montré que l'association simultanée de biomarqueurs cellulaires de l'hôte paraissait intéressante. La démonstration exhaustive des performances du CD64 et du CD169 pour discriminer les infections bactériennes et virales se heurte toutefois à la complexité des maladies infectieuses, et bien qu'avancée et robuste, devra être poursuivie sur de nombreuses autres études.

3.4. La problématique mondiale des antibiotiques.

Distinguer l'origine d'une infection pour réduire la consommation d'antibiotiques est un défi majeur de santé publique, au niveau mondial. Les travaux de la thèse doivent donc être envisagés dans un contexte plus général et positionnés dans le système de soins actuel.

Le test mis au point présenterait de nombreux avantages à être directement implémenté au plus près des patients, mais aussi au plus près des services de santé : meilleur diagnostic, économies sur les autres tests moins utiles, orientation plus rapide et plus précise des patients aux urgences, moindre consommation d'antibiotiques, meilleur suivi des patients infectés, et possibilité de triage rapide en cas d'épidémie de tout type.

Pour un patient atteint de fièvre et de douleurs, le test est une aide diagnostique aux médecins qui ont souvent du mal à déterminer rapidement si la cause de la maladie est un virus ou une bactérie. Là où de nombreux tests biologiques sont souvent nécessaires, mais plus ou moins longs et coûteux, notre test est rapide et abordable et évite ainsi, que, dans le doute, des antibiotiques soient administrés, à tort dans plus de la moitié des cas. Cet emploi incorrect d'antibiotiques conduit chaque année à plus de 25 000 morts et plus de 1,5 Milliards d'euros de dépenses de santé publique en Europe [20]. Aujourd'hui, l'enjeu est donc d'arriver à distinguer les patients qui ont ou n'ont pas besoin d'antibiotiques. Cette demande, faite par les professionnels de santé de plusieurs pays, est une problématique certes économique mais surtout de sécurité nationale. En un temps réduit, notre outil de diagnostic rapide, précis et réalisable auprès du patient, pourrait identifier le type de pathogène infectieux en vue de choisir le traitement le plus adapté pour le patient.

Au-delà des hôpitaux, le test doit donc pouvoir s'adresser à n'importe quel praticien médical, voire au mieux à n'importe quelle personne formée qui peut ne pas être du monde médical. La facilité de la procédure mise au point est facilement applicable par tout personnel médical voire par toutes personnes désireuses de se tester seules. Seulement l'optimisation de la machine reste un point primordial sans lequel cette démocratisation ne sera pas possible.

Tout d'abord, le test améliore l'expérience du patient : la procédure n'est pas invasive (pas de prélèvement d'un volume inutile), elle est réalisable dans toute structure proche de chez eux, et elle simplifie le parcours de soins et son coût (pas de recours systématique à un déplacement souvent coûteux en service d'Urgences). Grâce au test, les patients ont également plus confiance en les praticiens et les traitements qui leurs sont donnés car ils trouvent toute justification de leur décision médicale.

Pour les professionnels de santé (médecins de villes, services d'Urgences), le test représente un gain de temps pour gérer le patient infecté ; il n'y a plus besoin d'attendre un retour du laboratoire central ou de ville, et le traitement peut ainsi être initié correctement (pas d'usage inutile des antibiotiques). Le patient peut être testé immédiatement et son résultat est obtenu en 10 minutes avec un minimum de complexité technique, ce qui correspond à un temps équivalent à celui de la consultation. Le test est aussi un gain pour le triage des patients. Par exemple en cas d'épidémie de grippe, le test permettrait de désengorger plus rapidement les services d'urgences en renvoyant à domicile les cas d'infections virales bénins et en gardant sous surveillance les patients surinfectés par une bactérie.

Pour les établissements médico-sociaux et sanitaires, il représente un gain financier car le test peut être moins cher que les tests existants et qu'il permet de ne pas déplacer le patient vers un service spécialisé inutilement, donc de mieux gérer une situation infectieuse. Par exemple, pour un test réalisé sur une personne âgée en Etablissement pour Hébergement de Personnes Âgées Dépendantes (EHPAD), en cas d'infection virale, le patient peut ne pas être déplacé, tandis qu'en cas d'infection bactérienne, le patient va être déplacé pour que des tests supplémentaires soient réalisés pour identifier précisément le pathogène bactérien et le traitement adapté. Les services hospitaliers sont de fait désengorgés par le non transfert automatique des patients. Egalement, les épidémies sont mieux contenues car le test améliore le triage des patients.

Enfin, pour le système de santé, le test devrait permettre une forte réduction de coûts :

- Moins de tests secondaires à réaliser (si c'est un virus il sera inutile de réaliser les cultures bactériennes, et inversement si c'est une bactérie la recherche de virus par test PCR coûteux pourra être évitée) ;
- Moins de transports médicalisés ;
- Moins de consultations redondantes (médecin de ville, puis laboratoires, puis urgences) ;
- Moindre utilisation d'antibiotiques, donc moins de résistances difficiles à traiter ;
- Prise en charge plus rapide diminuant les temps de traitements et donc les durées de séjour ou les arrêts de travail.

L'objectif général du test doit donc être de pouvoir être appliqué au plus grand nombre, pour fluidifier le parcours de soins des patients infectés, et leur prise en charge par tous personnels mêmes non qualifiés, dans tous locaux.

Plus largement, le test peut même être intéressant pour les laboratoires de recherche, pour permettre de tester plus largement des patients avec des pathologies diverses et de comprendre leurs symptômes en comprenant la réaction de leur système immunitaire.

Dans cette même idée, bien que le test vise pour l'instant des services d'Urgences voire tous laboratoires de ville ou toutes structures médicales (EHPAD, médecins généralistes), à terme, le test pourrait être étendu aux zones sensibles reculées (zones militaires, zones pauvres, déserts médicaux) voire en zones où le contrôle des épidémies est nécessaire (aéroports, frontières). En effet, les épidémies sont croissantes dans ces zones et difficilement reconnaissables par tableau clinique.

Le test aurait donc un intérêt majeur pour la gestion de crise en cas d'épidémies pour trier et orienter les populations.

Ainsi, le test proposé est un diagnostic des patients infectés avec des performances supérieures à celles des tests existants, qui permet d'orienter leur traitement par antibiotiques et leur en éviter une prise inutile voire dangereuse. Le test simplifie facilement et rapidement les services du personnel médical envers les patients infectés. La consécration ultime serait que, si les performances du projet étaient suffisamment démontrées et la machine entièrement optimisée, nous pourrions espérer le trouver même en structures non spécialisées, avec bien sûr, une prise en charge du test dès que possible.

Conclusion

En médecine, l'établissement d'un diagnostic est une étape sensible car il s'agit du processus permettant d'établir la présence d'une maladie ou d'un dysfonctionnement chez un patient. De ce diagnostic est décidé toute la conduite à tenir (surveillance, soins, traitements, chirurgie, hospitalisation). Parmi la diversité des pathologies humaines, les maladies infectieuses sont des plus complexes à diagnostiquer, car leur diagnostic ne tient pas seulement dans l'identification de la pathologie fébrile, mais plutôt dans le fait de savoir en expliquer sa cause. Cette étape est aujourd'hui encore trop imprécise, car souvent basée uniquement sur des observations symptomatologiques. Le risque associé à un mauvais diagnostic de l'étiologie bactérienne, virale ou autre d'une infection peut pourtant avoir des conséquences importantes voire fatales pour les patients. L'un des plus gros enjeux liés à cette détermination du germe infectieux est de savoir si le patient doit avoir recours ou non à une antibiothérapie : mal indiquée, elle pourrait faire émerger des résistances aux antibiotiques dangereuses pour l'organisme.

Le diagnostic est la conclusion d'un cheminement intellectuel se reposant certes sur un interrogatoire minutieux et un examen physique complet, mais aussi pouvant être confirmé par des examens diagnostiques complémentaires. C'est pourquoi, dans le cadre de la problématique de la prescription d'antibiotiques, il s'avérerait presque obligatoire d'avoir recours à des tests de diagnostic pour confirmer les observations cliniques du médecin. Actuellement, trop peu de tests sont réalisables au plus proche des patients, rapidement lors d'une consultation, et facilement par tout personnel même non spécialisé. Ces limites entretiennent ainsi le manque de recours aux mesures biologiques pour le diagnostic infectieux.

Tout l'enjeu de la thèse a donc été la mise au point, l'optimisation et l'évaluation d'un nouveau test de diagnostic pour la discrimination des infections bactériennes et virales au plus près du patient pour réduire l'usage inutile d'antibiotiques.

La solution finale apportée est une mesure des biomarqueurs CD64, CD169, éventuellement HLA-DR, à la surface des cellules leucocytaires, grâce à une nouvelle technique de cytométrie en flux réalisable « au lit du patient ». L'étude des mécanismes d'expression de ces marqueurs et l'évaluation de leurs performances en clinique ont montré que l'expression du CD64 sur les neutrophiles était directement liée à une infection par une bactérie, alors que l'expression du CD169 sur les monocytes était directement liée à une infection par un virus. L'expression de l'HLA-DR sur les monocytes semblait renforcer leur identification étiologique de l'infection.

Leur mesure par cytométrie en flux conservait toute la sensibilité de détection que l'on peut attendre de cette technique d'analyse, et l'optimisation de la procédure, normalement complexe à mettre en œuvre, autoriserait la généralisation de son utilisation au plus près du patient.

Il semblerait donc possible de discriminer les infections bactériennes et les infections virales par un test de cytométrie en flux aussi voire plus performant, mais surtout plus rapide et non délocalisé (« au lit du patient ») que les tests existants. Plus largement, ces travaux peuvent aider à réduire les problématiques générales des maladies infectieuses, que sont leur prévention, leur prise en charge et leur traitement, liées directement à l'enjeu du diagnostic de l'étiologie de l'infection.

Bibliographie

1. Larousse É. Définitions : infection - Dictionnaire de français Larousse [Internet]. . Available from: https://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/infection/42901.

2. Hart CA, Shears P. Atlas de poche de microbiologie. Flammarion Médecine-Sciences, Paris.

3. Maladies infectieuses [Internet]. Fond. Pour Rech. Médicale. Available from: https://www.frm.org/recherches-maladies-infectieuses.

4. OMS | Maladies infectieuses [Internet]. WHO. Available from: http://www.who.int/topics/infectious_diseases/fr/.

5. Liang SY, Theodoro DL, Schuur JD, Marschall J. Infection Prevention in the Emergency Department. *Ann. Emerg. Med.* [Internet]. 64(3), 299–313 (2014). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4143473/.

6. Direction des maladies infectieuses [Internet]. . Available from: /a-propos/notre-organisation/une-organisation-au-service-des-programmes/direction-des-maladies-infectieuses.

7. OMS | Maladies infectieuses endémiques: les 15 prochaines années [Internet]. WHO. Available from: http://www.who.int/mediacentre/commentaries/2016/Endemic-infectious-diseases-next-15-years/fr/.

8. Abraham E. New Definitions for Sepsis and Septic Shock: Continuing Evolution but With Much Still to Be Done. *JAMA* [Internet]. 315(8), 757 (2016). Available from: http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2016.0290.

9. Gyawali B, Ramakrishna K, Dhamoon AS. Sepsis: The evolution in definition, pathophysiology, and management. *SAGE Open Med.* [Internet]. 7 (2019). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6429642/.

10. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* [Internet]. 315(8), 801–810 (2016). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4968574/.

11. Pirozzi N, Rejali N, Brennan M, Vohra A, McGinley T, Krishna MG. Sepsis: Epidemiology, Pathophysiology, Classification, Biomarkers and Management. *Emerg. Med. Trauma Surg. Care* [Internet]. 3(1), 1–7 (2016). Available from: http://heraldopenaccess.us/fulltext/Emergency-Medicine-Trauma-&-Surgical-

Care/Sepsis-Epidemiology-Pathophysiology-Classification-Biomarkers-and-Management.php.

12. Kutz A, Florin J, Hausfater P, *et al.* Predictors for Delayed Emergency Department Care in Medical Patients with Acute Infections – An International Prospective Observational Study. *PLOS ONE* [Internet]. 11(5), e0155363 (2016). Available from: https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0155363.

13. Ray P, Birolleau S, Lefort Y, *et al.* Acute respiratory failure in the elderly: etiology, emergency diagnosis and prognosis. *Crit. Care* [Internet]. 10(3), R82 (2006). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1550946/.

14. Hausfater P, Juillien G, Madonna-Py B, Haroche J, Bernard M, Riou B. Serum procalcitonin measurement as diagnostic and prognostic marker in febrile adult patients presenting to the emergency department. *Crit. Care* [Internet]. 11(3), R60 (2007). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2206417/.

15. Charles Nicolle. Le destin des maladies infectieuses. Edition France Lafayette : réédition d'un grand classique de 1933. Paris.

16. CMIT. ECN PILLY: maladies infectieuses et et tropicales. MED-LINE EDITIONS - EDUC.

17. Ventola CL. The Antibiotic Resistance Crisis. *Pharm. Ther.* [Internet]. 40(4), 277–283 (2015). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4378521/.

18. Bartlett JG, Gilbert DN, Spellberg B. Seven Ways to Preserve the Miracle of Antibiotics. *Clin. Infect. Dis.* [Internet]. 56(10), 1445–1450 (2013). Available from: https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/cid/cit070.

19. Haute Autorité Santé. Principes généraux et conseils de prescription des antibiotiques en premier recours. , 1–2 (2014).

20. Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, *et al.* Antibiotic resistance—the need for global solutions. *Lancet Infect. Dis.* [Internet]. 13(12), 1057–1098 (2013). Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309913703189.

21. Self WH, Rosen J, Sharp SC, *et al.* Diagnostic Accuracy of FebriDx: A Rapid Test to Detect Immune Responses to Viral and Bacterial Upper Respiratory Infections. *J. Clin. Med.* [Internet]. 6(10), 94 (2017). Available from: http://www.mdpi.com/2077-0383/6/10/94.

22. BIOFIRE® FILMARRAY® RP Panel [Internet]. BioMérieux Clin. Diagn. Available from: BIOFIRE® FILMARRAY® Respiratory Panel.

23. Oved K, Cohen A, Boico O, *et al.* A Novel Host-Proteome Signature for Distinguishing between Acute Bacterial and Viral Infections. *PLOS ONE* [Internet]. 10(3), e0120012 (2015). Available from: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0120012.

24. Srugo I, Klein A, Stein M, *et al.* Validation of a Novel Assay to Distinguish Bacterial and Viral Infections. *Pediatrics* [Internet]. 140(4), e20163453 (2017). Available from: http://pediatrics.aappublications.org/lookup/doi/10.1542/peds.2016-3453.

25. Parrott G, Kinjo T, Nabeya D, *et al.* Evaluation of Anyplex™ II RV16 and RB5 real-time RT-PCR compared to Seeplex ® RV15 OneStep ACE and PneumoBacter ACE for the simultaneous detection of upper respiratory pathogens. *J. Infect. Chemother.* [Internet]. 23(12), 859–861 (2017). Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1341321X17301770.

26. Stewart EH, Davis B, Clemans-Taylor BL, Littenberg B, Estrada CA, Centor RM. Rapid Antigen Group A Streptococcus Test to Diagnose Pharyngitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE* [Internet]. 9(11) (2014). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4219770/.

27. Kapasi AJ, Dittrich S, González IJ, Rodwell TC. Host Biomarkers for Distinguishing Bacterial from Non-Bacterial Causes of Acute Febrile Illness: A Comprehensive Review. *PLOS ONE* [Internet]. 11(8), 1–29 (2016). Available from: http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0160278.

28. Pierrakos C, Vincent J-L. Sepsis biomarkers: a review. *Crit. Care* [Internet]. 14(1), R15 (2010). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2875530/.

29. Hassan U, Ghonge T, Reddy Jr. B, *et al.* A point-of-care microfluidic biochip for quantification of CD64 expression from whole blood for sepsis stratification. *Nat. Commun.* [Internet]. 8, 1–12 (2017). Available from: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ncomms15949.

30. Judy Siegel-Itzkocich. Israeli product that pinpoints viruses, bacteria gets European grant [Internet]. Health Sci.-Jerus. Post (2016). Available from: http://www.jpost.com/Business-and-Innovation/Health-and-Science/Israeli-product-that-pinpoints-viruses-bacteria-gets-European-grant-467771.

31. van Houten CB, de Groot JAH, Klein A, *et al.* A host-protein based assay to differentiate between bacterial and viral infections in preschool children (OPPORTUNITY): a double-blind, multicentre, validation study. *Lancet Infect. Dis.* [Internet]. 17(4), 431–440 (2017). Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309916305199.

32. Hausfater P, Garric S, Ayed SB, Rosenheim M, Bernard M, Riou B. Usefulness of Procalcitonin as a Marker of Systemic Infection in Emergency Department Patients: A Prospective Study. *Clin. Infect. Dis.* [Internet]. 34(7), 895–901 (2002). Available from: https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/339198.

33. Chalupa P, Beran O, Herwald H, Kaspříková N, Holub M. Evaluation of potential biomarkers for the discrimination of bacterial and viral infections. *Infection*

[Internet]. 39(5), 411–417 (2011). Available from: http://link.springer.com/10.1007/s15010-011-0126-4.

34. Vijayan AL, Vanimaya, Ravindran S, *et al.* Procalcitonin: a promising diagnostic marker for sepsis and antibiotic therapy. *J. Intensive Care* [Internet]. 5(1) (2017). Available from: http://jintensivecare.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40560-017-0246-8.

35. Gibot S, Béné MC, Noel R, *et al.* Combination Biomarkers to Diagnose Sepsis in the Critically Ill Patient. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* [Internet]. 186(1), 65–71 (2012). Available from: https://www.atsjournals.org/doi/full/10.1164/rccm.201201-0037OC.

36. Cuquemelle E, Soulis F, Villers D, *et al.* Can procalcitonin help identify associated bacterial infection in patients with severe influenza pneumonia? A multicentre study. *Intensive Care Med.* [Internet]. 37(5), 796–800 (2011). Available from: http://link.springer.com/10.1007/s00134-011-2189-1.

37. Pfister R, Kochanek M, Leygeber T, *et al.* Procalcitonin for diagnosis of bacterial pneumonia in critically ill patients during 2009 H1N1 influenza pandemic: a prospective cohort study, systematic review and individual patient data meta-analysis. *Crit. Care* [Internet]. 18(2), R44 (2014). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4056761/.

38. Nuutila J, Jalava-Karvinen P, Hohenthal U, *et al.* A rapid flow cytometric method for distinguishing between febrile bacterial and viral infections. *J. Microbiol. Methods* [Internet]. 92(1), 64–72 (2013). Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701212003521.

39. Haran JP, Beaudoin FL, Suner S, Lu S. C-reactive protein as predictor of bacterial infection among patients with an influenza-like illness. *Am. J. Emerg. Med.* [Internet]. 31(1), 137–144 (2013). Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0735675712003518.

40. Sklavou R, Karavanaki K, Critselis E, *et al.* Variation of serum C-reactive protein (CRP) over time in pediatric cancer patients with febrile illness and its relevance to identified pathogen. *Clin. Biochem.* [Internet]. 45(15), 1178–1182 (2012). Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009912012004316.

41. Weh J, Antoni C, Weiß C, Findeisen P, Ebert M, Böcker U. Discriminatory potential of C-reactive protein, cytokines, and fecal markers in infectious gastroenteritis in adults. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* [Internet]. 77(1), 79–84 (2013). Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0732889313002733.

42. Uzzan B, Cohen R, Nicolas P, Cucherat M, Perret G-Y. Procalcitonin as a diagnostic test for sepsis in critically ill adults and after surgery or trauma: A systematic review and meta-analysis: *Crit. Care Med.* [Internet]. 34(7), 1996–2003 (2006). Available from: https://insights.ovid.com/crossref?an=00003246-200607000-00020.

43. Meisner M. Update on Procalcitonin Measurements. *Ann. Lab. Med.* [Internet]. 34(4), 263–273 (2014). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4071182/.

44. Tang BM, Eslick GD, Craig JC, McLean AS. Accuracy of procalcitonin for sepsis diagnosis in critically ill patients: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* [Internet]. 7(3), 210–217 (2007). Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S147330990770052X.

45. Markic J, Jeroncic A, Polancec D, *et al.* CD15s is a potential biomarker of serious bacterial infection in infants admitted to hospital. *Eur. J. Pediatr.* [Internet]. 172(10), 1363–1369 (2013). Available from: http://link.springer.com/10.1007/s00431-013-2047-y.

46. Nijman RG, Vergouwe Y, Thompson M, *et al.* Clinical prediction model to aid emergency doctors managing febrile children at risk of serious bacterial infections: diagnostic study. *BMJ* [Internet]. 346(apr02 1), f1706–f1706 (2013). Available from: http://www.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bmj.f1706.

47. Le Bel J, Chenevier-Gobeaux C, Blanc F-X, *et al.* Diagnostic accuracy of C-reactive protein and procalcitonin in suspected community-acquired pneumonia adults visiting emergency department and having a systematic thoracic CT scan. *Crit. Care* [Internet]. 19(1), 366 (2015). Available from: http://ccforum.com/content/19/1/366.

48. Pinto VLL. IL-6 and IL-8 in cerebrospinal fluid from patients with aseptic meningitis and bacterial meningitis: their potential role as a marker for differential diagnosis. *Braz. J. Infect. Dis.* , 3 (2011).

49. Engelmann I, Dubos F, Lobert P-E, *et al.* Diagnosis of Viral Infections Using Myxovirus Resistance Protein A (MxA). *PEDIATRICS* [Internet]. 135(4), e985–e993 (2015). Available from: http://pediatrics.aappublications.org/cgi/doi/10.1542/peds.2014-1946.

50. Venge P. Human neutrophil lipocalin (HNL) as a biomarker of acute infections. *Ups. J. Med. Sci.* [Internet]. 123(1), 1–8 (2018). Available from: https://doi.org/10.1080/03009734.2017.1420112.

51. Venge P, Douhan-Håkansson L, Garwicz D, Peterson C, Xu S, Pauksen K. Human Neutrophil Lipocalin as a Superior Diagnostic Means To Distinguish between Acute Bacterial and Viral Infections. *Clin. Vaccine Immunol. CVI* [Internet]. 22(9), 1025–1032 (2015). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4550662/.

52. Hausfater P, Claessens Y-E, Martinage A, *et al.* Prognostic value of PCT, copeptin, MR-proADM, MR-proANP and CT-proET-1 for severe acute dyspnea in the emergency department: the BIODINER study. *Biomarkers* [Internet]. 22(1), 28–34 (2017). Available from: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/1354750X.2016.1201541.

53. Heining L, Giesa C, Ewig S. MR-proANP, MR-proADM, and PCT in Patients Presenting with Acute Dyspnea in a Medical Emergency Unit. *Lung* [Internet]. 194(2), 185–191 (2016). Available from: http://link.springer.com/10.1007/s00408-015-9837-0.

54. National Institute for Health (NIH). Federal prize competition seeks innovative ideas to combat antimicrobial resistance [Internet]. Natl. Inst. Health NIH (2016). Available from: https://www.nih.gov/news-events/news-releases/federal-prize-competition-seeks-innovative-ideas-combat-antimicrobial-resistance.

55. Frédéric Gros, Sylvie Fournel, Samuel Liégeois, Daniel Richard, Pauline Soulas-Sprauel. Atlas d'immunologie. Sciences Sup. Dunod.

56. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai, Pierre L. Masson. Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique. Elsevier Masson.

57. Nathalie Davoust-Nataf. Les récepteurs de l'immunité innée (PRR). (2018).

58. Kapellos TS, Bonaguro L, Gemünd I, *et al.* Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases. *Front. Immunol.* [Internet]. 10 (2019). Available from: https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.02035/full.

59. Garley M, Jabłońska E. Heterogeneity Among Neutrophils. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* [Internet]. 66(1), 21–30 (2018). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5767199/.

60. Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Immunol. Res.* [Internet]. 5(1), 3–8 (2017). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5426480/.

61. Katoh S, Ikeda M, Shimizu H, *et al.* Increased Levels of Plasma Galectin-9 in Patients with Influenza Virus Infection. *Tohoku J. Exp. Med.* [Internet]. 232(4), 263–267 (2014). Available from: http://jlc.jst.go.jp/DN/JST.JSTAGE/tjem/232.263?lang=en&from=CrossRef&type=abstract.

62. Mokuda S, Doi O, Takasugi K. Simultaneous quantitative analysis of the expression of CD64 and CD35 on neutrophils as markers to differentiate between bacterial and viral infections in patients with rheumatoid arthritis. *Mod. Rheumatol.* [Internet]. 22(5), 750–757 (2012). Available from: http://link.springer.com/10.1007/s10165-011-0587-4.

63. Nuutila J, Jalava-Karvinen P, Hohenthal U, *et al.* Use of complement regulators, CD35, CD46, CD55, and CD59, on leukocytes as markers for diagnosis of viral and bacterial infections. *Hum. Immunol.* [Internet]. 74(5), 522–530 (2013). Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0198885913000220.

64. Sabroe I, Jones EC, Usher LR, Whyte MKB, Dower SK. Toll-Like Receptor (TLR)2 and TLR4 in Human Peripheral Blood Granulocytes: A Critical Role for Monocytes in Leukocyte Lipopolysaccharide Responses. *J. Immunol.* [Internet]. 168(9), 4701–

4710 (2002). Available from: http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.168.9.4701.

65. Wang S-Z, Smith PK, Lovejoy M, Bowden JJ, Alpers JH, Forsyth KD. Shedding of L-selectin and PECAM-1 and upregulation of Mac-1 and ICAM-1 on neutrophils in RSV bronchiolitis. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* [Internet]. 275(5), L983–L989 (1998). Available from: http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajplung.1998.275.5.L983.

66. Monneret G, Venet F, Meisel C, Schefold JC. Assessment of monocytic HLA-DR expression in ICU patients: analytical issues for multicentric flow cytometry studies. *Crit. Care* [Internet]. 14(4), 432 (2010). Available from: http://ccforum.biomedcentral.com/articles/10.1186/cc9184.

67. Kipfmueller F, Schneider J, Prusseit J, *et al.* Role of Neutrophil CD64 Index as a Screening Marker for Late-Onset Sepsis in Very Low Birth Weight Infants. *PLoS ONE* [Internet]. 10(4), 1–15 (2015). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4404048/.

68. Selvaraj P, Fifadara N, Nagarajan S, Cimino A, Wang G. Functional Regulation of Human Neutrophil Fc γ Receptors. *Immunol. Res.* [Internet]. 29(1–3), 219–230 (2004). Available from: http://link.springer.com/10.1385/IR:29:1-3:219.

69. Nuutila J. The novel applications of the quantitative analysis of neutrophil cell surface FcγRI (CD64) to the diagnosis of infectious and inflammatory diseases: *Curr. Opin. Infect. Dis.* [Internet]. 23(3), 268–274 (2010). Available from: https://insights.ovid.com/crossref?an=00001432-201006000-00012.

70. Tang Z, Qin D, Tao M, *et al.* Examining the utility of the CD64 index compared with other conventional indices for early diagnosis of neonatal infection. *Sci. Rep.* [Internet]. 8(1), 1–7 (2018). Available from: http://www.nature.com/articles/s41598-018-28352-7.

71. Raghavan M, Bjorkman PJ. Fc RECEPTORS AND THEIR INTERACTIONS WITH IMMUNOGLOBULINS. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* [Internet]. 12(1), 181–220 (1996). Available from: http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.cellbio.12.1.181.

72. Van Avondt K, Sorge NM van, Meyaard L. Bacterial Immune Evasion through Manipulation of Host Inhibitory Immune Signaling. *PLOS Pathog.* [Internet]. 11(3), e1004644 (2015). Available from: https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1004644.

73. Swanson JA, Hoppe AD. The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J. Leukoc. Biol.* [Internet]. 76(6), 1093–1103 (2004). Available from: http://doi.wiley.com/10.1189/jlb.0804439.

74. Joshi T, Butchar J, Tridandapani S. Fcγ Receptor Signaling in Phagocytes. *Int. J. Hematol.* [Internet]. 84(3), 210–216 (2006). Available from: http://link.springer.com/10.1532/IJH97.06140.

75. Cortegiani A, Russotto V, Montalto F, Foresta G, Lozzo Santi P, Raineri M. Neutrophil CD64 as a marker of infection in patients admitted to the emergency department with acute respiratory failure. *Open Access Emerg. Med.* , 37–44 (2014).

76. Juskewitch JE, Abraham RS, League SC, *et al.* Monocyte HLA-DR expression and neutrophil CD64 expression as biomarkers of infection in critically ill neonates and infants. *Pediatr. Res.* [Internet]. 78(6), 683–690 (2015). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4689644/.

77. Cid J, Aguinaco R, Sánchez R, García-Pardo G, Llorente A. Neutrophil CD64 expression as marker of bacterial infection: A systematic review and meta-analysis. *J. Infect.* [Internet]. 60(5), 313–319 (2010). Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163445310000563.

78. Li S, Huang X, Chen Z, *et al.* Neutrophil CD64 expression as a biomarker in the early diagnosis of bacterial infection: a meta-analysis. *Int. J. Infect. Dis.* [Internet]. 17(1), e12–e23 (2013). Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1201971212012222.

79. Xu N, Chen J, Chang X, *et al.* nCD64 index as a prognostic biomarker for mortality in acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Ann. Saudi Med.* [Internet]. 36(1), 37–41 (2016). Available from: http://www.annsaudimed.net/index.php/vol36/vol36iss1/859.html.

80. Xiong S-D, Pu L-F, Wang H-P, *et al.* Neutrophil CD64 Index as a superior biomarker for early diagnosis of infection in febrile patients in the hematology department. *Clin. Chem. Lab. Med. CCLM* [Internet]. 55(1), 82–90 (2017). Available from: https://www.degruyter.com/view/j/cclm.2017.55.issue-1/cclm-2016-0118/cclm-2016-0118.xml.

81. Gilbert DN. Role of Procalcitonin in the Management of Infected Patients in the Intensive Care Unit. *Infect. Dis. Clin. North Am.* [Internet]. 31(3), 435–453 (2017). Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891552017300338.

82. Ng PC, Li G, Chui KM, *et al.* Neutrophil CD64 Is a Sensitive Diagnostic Marker for Early-Onset Neonatal Infection. *Pediatr. Res.* [Internet]. 56(5), 796–803 (2004). Available from: http://www.nature.com/doifinder/10.1203/01.PDR.0000142586.47798.5E.

83. Klaas M, Crocker PR. Sialoadhesin in recognition of self and non-self. *Semin. Immunopathol.* [Internet]. 34(3), 353–364 (2012). Available from: http://link.springer.com/10.1007/s00281-012-0310-3.

84. Puryear WB, Akiyama H, Geer SD, *et al.* Interferon-Inducible Mechanism of Dendritic Cell-Mediated HIV-1 Dissemination Is Dependent on Siglec-1/CD169. *PLoS Pathog.* [Internet]. 9(4), 1–15 (2013). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3623718/.

85. Crocker P. Siglecs: sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins in cell–cell interactions and signalling. *Curr. Opin. Struct. Biol.* [Internet]. 12(5), 609–615 (2002). Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959440X02003755.

86. Macauley MS, Crocker PR, Paulson JC. Siglec regulation of immune cell function in disease. *Nat. Rev. Immunol.* [Internet]. 14(10), 653–666 (2014). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4191907/.

87. Varki A, Angata T. Siglecs—the major subfamily of I-type lectins. *Glycobiology* [Internet]. 16(1), 1R-27R (2006). Available from: http://academic.oup.com/glycob/article/16/1/1R/651347/Siglecsthe-major-subfamily-of-Itype-lectins.

88. Crocker PR, Paulson JC, Varki A. Siglecs and their roles in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* [Internet]. 7(4), 255–266 (2007). Available from: http://www.nature.com/articles/nri2056.

89. Pillai S, Netravali IA, Cariappa A, Mattoo H. Siglecs and Immune Regulation. *Annu. Rev. Immunol.* [Internet]. 30(1), 357–392 (2012). Available from: http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-immunol-020711-075018.

90. Crocker PR. Properties and distribution of a lectin-like hemagglutinin differentially expressed by murine stromal tissue macrophages. *J. Exp. Med.* [Internet]. 164(6), 1862–1875 (1986). Available from: http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.164.6.1862.

91. Pino M, Erkizia I, Benet S, *et al.* HIV-1 immune activation induces Siglec-1 expression and enhances viral trans-infection in blood and tissue myeloid cells. *Retrovirology* [Internet]. 12(1), 1–15 (2015). Available from: http://www.retrovirology.com/content/12/1/37.

92. Kim W-K, McGary CM, Holder GE, *et al.* Increased Expression of CD169 on Blood Monocytes and Its Regulation by Virus and CD8 T Cells in Macaque Models of HIV Infection and AIDS. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* [Internet]. 31(7), 696–706 (2015). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4505761/.

93. Izquierdo-Useros N, Lorizate M, McLaren PJ, Telenti A, Kräusslich H-G, Martinez-Picado J. HIV-1 Capture and Transmission by Dendritic Cells: The Role of Viral Glycolipids and the Cellular Receptor Siglec-1. *PLoS Pathog.* [Internet]. 10(7) (2014). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4102576/.

94. Cao H, Crocker PR. Evolution of CD33-related siglecs: regulating host immune functions and escaping pathogen exploitation? *Immunology* [Internet]. 132(1), 18–26 (2011). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3015071/.

95. Angata T, Ishii T, Motegi T, *et al.* Loss of Siglec-14 reduces the risk of chronic obstructive pulmonary disease exacerbation. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* [Internet]. 70(17), 3199–3210 (2013). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3718857/.

96. van Rees DJ, Szilagyi K, Kuijpers TW, Matlung HL, van den Berg TK. Immunoreceptors on neutrophils. *Semin. Immunol.* [Internet]. 28(2), 94–108 (2016). Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044532316000075.

97. Martinez-Picado J, McLaren PJ, Telenti A, Izquierdo-Useros N. Retroviruses As Myeloid Cell Riders: What Natural Human Siglec-1 "Knockouts" Tell Us About Pathogenesis. *Front. Immunol.* [Internet]. 8, 1593 (2017). Available from: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.01593/full.

98. Surolia I, Pirnie SP, Chellappa V, *et al.* Functionally defective germline variants of sialic acid acetylesterase in autoimmunity. *Nature* [Internet]. 466(7303), 243–247 (2010). Available from: http://www.nature.com/articles/nature09115.

99. Chen W, Han C, Xie B, *et al.* Induction of Siglec-G by RNA Viruses Inhibits the Innate Immune Response by Promoting RIG-I Degradation. *Cell* [Internet]. 152(3), 467–478 (2013). Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867413000172.

100. Rempel H, Calosing C, Sun B, Pulliam L. Sialoadhesin Expressed on IFN-Induced Monocytes Binds HIV-1 and Enhances Infectivity. *PLoS ONE* [Internet]. 3(4), 1–9 (2008). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2288672/.

101. van der Kuyl AC, van den Burg R, Zorgdrager F, Groot F, Berkhout B, Cornelissen M. Sialoadhesin (CD169) Expression in CD14+ Cells Is Upregulated Early after HIV-1 Infection and Increases during Disease Progression. *PLoS ONE* [Internet]. 2(2), e257 (2007). Available from: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0000257.

102. Ashokkumar C, Gabriellan A, Ningappa M, Mazariegos G, Sun Q, Sindhi R. Increased Monocyte Expression of Sialoadhesin During Acute Cellular Rejection and Other Enteritides After Intestine Transplantation in Children: *Transplantation* [Internet]. 93(5), 561–564 (2012). Available from: https://insights.ovid.com/crossref?an=00007890-201203150-00017.

103. Zou Z, Chastain A, Moir S, *et al.* Siglecs Facilitate HIV-1 Infection of Macrophages through Adhesion with Viral Sialic Acids. *PLoS ONE* [Internet]. 6(9), e24559 (2011). Available from: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0024559.

104. Caballero IS, Yen JY, Hensley LE, Honko AN, Goff AJ, Connor JH. Lassa and Marburg viruses elicit distinct host transcriptional responses early after infection. *BMC Genomics* [Internet]. 15(1) (2014). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4232721/.

105. Cutler AJ, Oliveira J, Ferreira RC, *et al.* Capturing the systemic immune signature of a norovirus infection: an n-of-1 case study within a clinical trial. *Wellcome Open Res.* [Internet]. 2 (2017). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5531165/.

106. Farina A, Peruzzi G, Lacconi V, *et al.* Epstein-Barr virus lytic infection promotes activation of Toll-like receptor 8 innate immune response in systemic sclerosis monocytes. *Arthritis Res. Ther.* [Internet]. 19 (2017). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5331713/.

107. Green AM, Harris E. Monocyte-plasmablast crosstalk during dengue. *Cell Host Microbe* [Internet]. 16(1), 7–9 (2014). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4174296/.

108. Hirsch AJ, Smith JL, Haese NN, *et al.* Zika Virus infection of rhesus macaques leads to viral persistence in multiple tissues. *PLOS Pathog.* [Internet]. 13(3), e1006219 (2017). Available from: https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1006219.

109. Jans J, Unger WWJ, Vissers M, *et al.* Siglec-1 inhibits RSV-induced interferon gamma production by adult T cells in contrast to newborn T cells. *Eur. J. Immunol.* [Internet]. 48(4), 621–631 (2018). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5947594/.

110. Kwissa M, Nakaya HI, Onlamoon N, *et al.* Dengue Virus Infection Induces Expansion of a CD14+CD16+ Monocyte Population that Stimulates Plasmablast Differentiation. *Cell Host Microbe* [Internet]. 16(1), 115–127 (2014). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4116428/.

111. Lastrucci C, Bénard A, Balboa L, *et al.* Tuberculosis is associated with expansion of a motile, permissive and immunomodulatory CD16+ monocyte population via the IL-10/STAT3 axis. *Cell Res.* [Internet]. 25(12), 1333–1351 (2015). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4670988/.

112. Lin G-L, McGinley JP, Drysdale SB, Pollard AJ. Epidemiology and Immune Pathogenesis of Viral Sepsis. *Front. Immunol.* [Internet]. 9 (2018). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6170629/.

113. Noriega VM, Haye KK, Kraus TA, *et al.* Human Cytomegalovirus Modulates Monocyte-Mediated Innate Immune Responses during Short-Term Experimental Latency In Vitro. *J. Virol.* [Internet]. 88(16), 9391–9405 (2014). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4136239/.

114. Sammicheli S, Kuka M, Lucia PD, *et al.* Inflammatory monocytes hinder antiviral B cell responses. *Sci. Immunol.* , 11 (2016).

115. Seyerl M, Kirchberger S, Majdic O, *et al.* Human rhinoviruses induce IL-35-producing Treg via induction of B7-H1 (CD274) and sialoadhesin (CD169) on DC. *Eur. J. Immunol.* [Internet]. 40(2), 321–329 (2010). Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/eji.200939527.

116. Theobald SJ, Khailaie S, Meyer-Hermann M, *et al.* Signatures of T and B Cell Development, Functional Responses and PD-1 Upregulation After HCMV Latent Infections and Reactivations in Nod.Rag.Gamma Mice Humanized With Cord Blood CD34+ Cells. *Front. Immunol.* [Internet]. 9 (2018). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6262073/.

117. Izquierdo-Useros N, Lorizate M, Puertas MC, *et al.* Siglec-1 Is a Novel Dendritic Cell Receptor That Mediates HIV-1 Trans-Infection Through Recognition of Viral Membrane Gangliosides. *PLoS Biol.* [Internet]. 10(12) (2012). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3525531/.

118. Imamichi H, Lempicki RA, Adelsberger JW, *et al.* The CD8+HLA-DR+ T cells expanded in HIV-1 infection are qualitatively identical to those from healthy controls. *Eur. J. Immunol.* [Internet]. 42(10) (2012). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3818066/.

119. Guillaume Monneret, Morgane Gossez, Nima Aghaeepour, Brice Gaudilliere, Fabienne Venet. How clinical flow cytometry rebooted sepsis immunology. *Cytometry A*. (2019).

120. Remy S, Kolev-Descamps K, Gossez M, *et al.* Occurrence of marked sepsis-induced immunosuppression in pediatric septic shock: a pilot study. *Ann. Intensive Care* [Internet]. 8 (2018). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5849582/.

121. Machowicz R, Janka G, Wiktor-Jedrzejczak W. Similar but not the same: Differential diagnosis of HLH and sepsis. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* [Internet]. 114, 1–12 (2017). Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1040842817301828.

122. Monneret G, Venet F. Monocyte HLA-DR in sepsis: shall we stop following the flow? *Crit. Care* [Internet]. 18(1), 102 (2014). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4056426/.

123. Remy S, Gossez M, Belot A, *et al.* Massive increase in monocyte HLA-DR expression can be used to discriminate between septic shock and hemophagocytic lymphohistiocytosis-induced shock. *Crit. Care* [Internet]. 22 (2018). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6131803/.

124. Lees O. Immunophénotypage : Apport de la cytométrie à la biologie clinique. *Rev. Fr. Lab.* [Internet]. 2000(327), 91–103 (2000). Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0338989800802322.

125. Chan RC-F, Kotner JS, Chuang CM-H, Gaur A. Stabilization of pre-optimized multicolor antibody cocktails for flow cytometry applications: PRE-OPTIMIZED MULTICOLOR ANTIBODY COCKTAILS. *Cytometry B Clin. Cytom.* [Internet]. 92(6), 508–524 (2017). Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/cyto.b.21371.

126. Brown M, Wittwer C. Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology. *Flow Cytom.* (8), 9 (2000).

127. RONOT Xavier, GRUNWALD Didier, MAYOL Jean-François, BOUTONNAT Jean. La cytométrie en flux. Lavoisier.

128. El Hentati F-Z, Iobagiu C, Lambert C. Cytométrie et ses applications en immunologie clinique. *Rev. Francoph. Lab.* [Internet]. 2009(410), 23–32 (2009). Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1773035X09716788.

129. Beauvillain C, Drouet M, Renier G. Le test d'activation des basophiles. *Rev. Francoph. Lab.* [Internet]. 2008(404), 67–77 (2008). Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1773035X08715624.

130. Dittrich S, Tadesse BT, Moussy F, *et al.* Target Product Profile for a Diagnostic Assay to Differentiate between Bacterial and Non-Bacterial Infections and Reduce Antimicrobial Overuse in Resource-Limited Settings: An Expert Consensus. *PLOS ONE* [Internet]. 11(8), e0161721 (2016). Available from: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0161721.

131. Bourgoin P, Hayman J, Rimmelé T, Venet F, Malergue F, Monneret G. A novel one-step extracellular staining for flow cytometry: Proof-of-concept on sepsis-related biomarkers. *J. Immunol. Methods* [Internet]. 470, 59–63 (2019). Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022175919300444.

132. Baumgarth N, Roederer M. A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *J. Immunol. Methods* [Internet]. 243(1–2), 77–97 (2000). Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022175900002295.

133. Correia RP, Rajab A, Bento LC, *et al.* A ten-color tube with dried antibody reagents for the screening of hematological malignancies. *Int. J. Lab. Hematol.* [Internet]. 40(2), 136–143 (2018). Available from: http://doi.wiley.com/10.1111/ijlh.12753.

134. Hedley BD, Keeney M, Popma J, Chin-Yee I. Novel lymphocyte screening tube using dried monoclonal antibody reagents. *Cytometry B Clin. Cytom.* [Internet]. 88(6), 361–370 (2015). Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/cyto.b.21251.

135. Jamin C, Le Lann L, Alvarez-Errico D, *et al.* Multi-center harmonization of flow cytometers in the context of the European "PRECISESADS" project. *Autoimmun. Rev.* [Internet]. 15(11), 1038–1045 (2016). Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568997216301793.

136. Rajab A, Axler O, Leung J, Wozniak M, Porwit A. Ten-color 15-antibody flow cytometry panel for immunophenotyping of lymphocyte population. *Int. J. Lab.*

Hematol. [Internet]. 39, 76–85 (2017). Available from: http://doi.wiley.com/10.1111/ijlh.12678.

137. Pitoiset F, Cassard L, El Soufi K, *et al.* Deep phenotyping of immune cell populations by optimized and standardized flow cytometry analyses: Deep Immunophenotyping for Clinical Studies. *Cytometry A* [Internet]. 93(8), 793–802 (2018). Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/cyto.a.23570.

138. Pitoiset F, Barbié M, Monneret G, *et al.* A standardized flow cytometry procedure for the monitoring of regulatory T cells in clinical trials: a standardized method to monitor Tregs. *Cytometry B Clin. Cytom.* [Internet]. 94(5), 621–626 (2018). Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/cyto.b.21622.

139. Agthoven A van, Jarrossay D. Nouveaux réactifs et méthode de lyse des érythrocytes [Internet]. (1999). Available from: https://patents.google.com/patent/EP0955543A1/it.

140. Duvigneau JC, Sipos W, Hartl RT, *et al.* Heparin and EDTA as anticoagulant differentially affect cytokine mRNA level of cultured porcine blood cells. *J. Immunol. Methods* [Internet]. 324(1–2), 38–47 (2007). Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002217590700141X.

141. Feske S, Giltnane J, Dolmetsch R, Staudt LM, Rao A. Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. *Nat. Immunol.* [Internet]. 2(4), 316–324 (2001). Available from: http://www.nature.com/articles/ni0401_316.

142. Heinzelmann M, Bosshart H. Fondaparinux sodium lacks immunomodulatory effects of heparin. *Am. J. Surg.* [Internet]. 187(1), 111–113 (2004). Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002961003004483.

143. Krishnan VV, Ravindran R, Wun T, Luciw PA, Khan IH, Janatpour K. Multiplexed measurements of immunomodulator levels in peripheral blood of healthy subjects: Effects of analytical variables based on anticoagulants, age, and gender. *Cytometry B Clin. Cytom.* [Internet]. 86(6), 426–435 (2014). Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cyto.b.21147.

144. ANSM. Etat des lieux sur les heparines. , 40 (2014).

145. Srisala S, Pongsakul N, Sahakijpicharn T, Hongeng S, Chutipongtanate S, Apiwattanakul N. Capillary blood as an alternative specimen for enumeration of percentages of lymphocyte subsets. *BMC Res. Notes* [Internet]. 12 (2019). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6761722/.

146. Florent ARNAL. RÉPÉTABILITÉ & REPRODUCTIBILITÉ D'UNE MÉTHODE. (2017).

147. Desquilbet L. Guide pratique de validation statistique de méthodes de mesure : répétabilité, reproductibilité, et concordance. , 44.

148. Biomnis. Procalcitonine. (2012).

149. Haute Autorité de santé. Test compagnon associé à une thérapie ciblée : définitions et méthode d'évaluation. , 27 (2014).

150. Kelly A, Robinson MW, Roche G, Biron CA, O'Farrelly C, Ryan EJ. Immune Cell Profiling of IFN-λ Response Shows pDCs Express Highest Level of IFN-λR1 and Are Directly Responsive via the JAK-STAT Pathway. *J. Interferon Cytokine Res.* [Internet]. 36(12), 671–680 (2016). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5165669/.

151. van den Berg TK, van Die I, de Lavalette CR, *et al.* Regulation of sialoadhesin expression on rat macrophages. Induction by glucocorticoids and enhancement by IFN-beta, IFN-gamma, IL-4, and lipopolysaccharide. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 157(7), 3130–3138 (1996).

152. Wu Y, Lan C, Ren D, Chen G-Y. Induction of Siglec-1 by Endotoxin Tolerance Suppresses the Innate Immune Response by Promoting TGF-β1 Production. *J. Biol. Chem.* [Internet]. 291(23), 12370–12382 (2016). Available from: http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M116.721258.

153. Biswas SK, Lopez-Collazo E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol.* [Internet]. 30(10), 475–487 (2009). Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471490609001549.

154. Lu Y-C, Yeh W-C, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* [Internet]. 42(2), 145–151 (2008). Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043466608000070.

155. González-Navajas JM, Lee J, David M, Raz E. Immunomodulatory functions of type I interferons. *Nat. Rev. Immunol.* [Internet]. 12(2), 125–135 (2012). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3727154/.

156. Opal SM, Scannon PJ, Vincent J, *et al.* Relationship between Plasma Levels of Lipopolysaccharide (LPS) and LPS-Binding Protein in Patients with Severe Sepsis and Septic Shock. *J. Infect. Dis.* [Internet]. 180(5), 1584–1589 (1999). Available from: https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/315093.

157. Allantaz-Frager F, Turrel-Davin F, Venet F, *et al.* Identification of Biomarkers of Response to IFNg during Endotoxin Tolerance: Application to Septic Shock. *PLoS ONE* [Internet]. 8(7) (2013). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3708924/.

158. Karimi Y, Poznanski SM, Vahedi F, *et al.* Type I interferon signalling is not required for the induction of endotoxin tolerance. *Cytokine* [Internet]. 95, 7–11 (2017). Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043466617300352.

159. Doherty GM, Lange JR, Langstein HN, Alexander HR, Buresh CM, Norton JA. Evidence for IFN-gamma as a mediator of the lethality of endotoxin and tumor necrosis factor-alpha. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 149(5), 1666–1670 (1992).

160. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect. Dis.* [Internet]. 13(3), 260–268 (2013). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3798159/.

161. Henny J, Arnaud J, Giroud C. Intervalles de référence : détermination et vérification. , 9 (2011).

162. Saxena S, Wong ET. Heterogeneity of common hematologic parameters among racial, ethnic, and gender subgroups. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 114(7), 715–719 (1990).

163. Horowitz GL, Clinical and Laboratory Standards Institute. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory: approved guideline. .

164. Code de la santé publique - Article L1111-4. .

165. Angela Coulter, Suzanne Parsons and, Janet Askham. Where are the patients in decision-making about their own care? Health Syst. POLICY Anal., 26 (2008).

166. Carole Bouleuc et Dominique Poisson. La decision medicale partagee. *Cent. Laennec*. 62, 4–7 (2014).

167. Delacour H, Servonnet A, Perrot A, Vigezzi JF, Ramirez JM. La courbe ROC (receiver operating characteristic) : principes et principales applications en biologie clinique. *Ann Biol Clin*. 63, 10 (2005).

168. Bourgoin P, Soliveres T, Ahriz D, *et al.* Clinical research assessment by flow cytometry of biomarkers for infectious stratification in an Emergency Department. *Biomark. Med.* [Internet]. (2019). Available from: https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/bmm-2019-0214.

169. Plunkett A, Tong J. Sepsis in children. *BMJ* [Internet]. 350(jun09 10), h3017–h3017 (2015). Available from: http://www.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bmj.h3017.

170. Cvetkovic M, Lutman D, Ramnarayan P, Pathan N, Inwald DP, Peters MJ. Timing of Death in Children Referred for Intensive Care With Severe Sepsis: Implications for Interventional Studies*. *Pediatr. Crit. Care Med.* [Internet]. 16(5), 410–417 (2015). Available from: http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00130478-201506000-00003.

171. C. Gras-Le Guen*, G. Hubert, C. Feildel, L. Danjou,, M. Dupont, E. Launay. Fièvre avant 3 mois. *Elsevier Masson.* , 2 (2017).

172. Abdel-Aleem NF, Sorour AS, Elkholy YS, Sabry AM. Diagnostic Role of CD64 on Different Immune Cells in Early Diagnosis of Neonatal Sepsis. *Egypt. J. Immunol.* 25(2), 35–44 (2018).

173. Missions et Objectifs – IHU [Internet]. . Available from: https://www.mediterranee-infection.com/linstitut/missions-et-objectifs/.

174. Światowa Organizacja Zdrowia. Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2010. World Health Organization, Geneva.

175. Lortholary O. Pathologies infectieuses et précarité en France. *Laennec* [Internet]. 55(4), 6 (2007). Available from: http://www.cairn.info/revue-laennec-2007-4-page-6.htm.

176. World Health Organization. Global Tuberculosis Report. (2019).

177. Vaubourdolle M, Bénéteau B, Mario N, Gerrier F, Pernet P. Une expérience d'accréditation 22870 des gaz du sang. , 40.

178. Kahng J, Kim Y, Kim M, Oh E-J, Park Y-J, Han K. Flow Cytometric White Blood Cell Differential Using CytoDiff is Excellent for Counting Blasts. *Ann. Lab. Med.* [Internet]. 35(1), 28–34 (2015). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4272962/.

179. Daix T, Guerin E, Tavernier E, *et al.* Multicentric Standardized Flow Cytometry Routine Assessment of Patients With Sepsis to Predict Clinical Worsening. *Chest* [Internet]. 154(3), 617–627 (2018). Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012369218306470.

180. Roussel M, Gros A, Gacouin A, Le Meur N, Le Tulzo Y, Fest T. Toward new insights on the white blood cell differential by flow cytometry: A proof of concept study on the sepsis model. *Cytometry B Clin. Cytom.* [Internet]. 82B(6), 345–352 (2012). Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/cyto.b.21027.

181. Gros A, Roussel M, Sauvadet E, *et al.* The sensitivity of neutrophil CD64 expression as a biomarker of bacterial infection is low in critically ill patients. *Intensive Care Med.* [Internet]. 38(3), 445–452 (2012). Available from: http://link.springer.com/10.1007/s00134-012-2483-6.

182. Murphy K., Weaver C. Janeway's immunobiology [Internet]. 9th ed. New York, NY : Garland Science/Taylor & Francis Group, LLC, [2017], United States. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/101674267.

ANNEXE

A. Annexe 1 : Etude d'échantillons congelés

Etude en cours de soumission pour la revue *Journal of Immunological Methods*.

Direct freezing of whole blood allows analysis of leucocyte markers by flow cytometry: a proof-of-concept study

Pénélope Bourgoin[a,b], Isabelle Arnoux[c], Pierre-Emmanuel Morange[b,c], Fabrice Malergue[a]

[a] Department of Research and Development, Beckman Coulter Life Sciences-Immunotech, Marseille FRANCE.
[b] C2VN INSERM-INRA, Aix-Marseille University, Marseille FRANCE.
[C] Laboratory of Hematology, La Timone Hospital, Marseille FRANCE.

Corresponding author. Correspondence and requests for materials should be addressed to Fabrice Malergue (email: fmalergue@beckman.com; phone: +33 638 290 051; address: 130 Avenue de Lattre de Tassigny, 13009 Marseille, FRANCE).

Abbreviations. APC : Allophycocyanin ; DMSO : Dymethylsulfoxide ; FBS : Foetal bovine serum ; FITC : Fluorescein Isothiocyanate ; KO : Krome Orange ; MFI : Mean of Fluorescence Intensity ; lCD3 : CD3 on lymphocytes ; lCD4 : CD4 on lymphocytes ; lCD8 : CD8 on lymphocytes ; mCD14 : CD14 on monocytes ; mCD169 : CD169 on monocytes ; mHLA-DR : HLA-DR on monocytes ; nCD15 : CD15 on neutrophils ; nCD64 : CD64 on neutrophils ; PE : Phycoerythrin ; PBE : Pacific Blue.

ABSTRACT.

Background: Flow cytometry has been recently demonstrated to be powerful for identification of subjects with infections. Although technically optimized, for the moment, the one-step flow cytometry procedure for quantifying infectious biomarkers remains demonstrated only for fresh whole blood samples. The goal was to assess its applicability on frozen samples, by proposing a new method to perform the sample freezing directly, without dimethylsulfoxide (DMSO) or serum addition, and easily. Common markers of white blood cells as well as infection-related biomarkers were tested as a model of this simplifying freezing procedure.

Methods: Peripheral blood was tested fresh and then frozen either with DMSO and serum, or directly. Recruitment of CD3-, CD4-, CD8-, CD14-, and CD15-positive cells were analyzed and correlated between both kinds of thawed samples. Finally, the direct freezing method was evaluated for infection-related biomarkers: CD64, CD169 and HLA-DR.

Results: All percentages of leucocytes subsets from both kinds of frozen samples were significantly correlated with those from fresh samples ($r > 0.9$ for every cell type). Levels of infection-related biomarkers were also significantly correlated between all samples, with $r \geq 0.9$ for every tested biomarker.

Conclusions: Frozen samples could be an alternative to fresh samples when processed with the one-step flow cytometry procedure. The direct freezing method, described here-in, even enables an accurate flow cytometry assessment of common cellular sub-populations and of levels of important infectious biomarkers. Overcoming logistic constraints, by simplifying both the freezing and the testing of the sample, enlarges the possibility of flow cytometry applications.

Keywords. One-step freezing, Whole blood analysis, Flow Cytometry, CD169, CD64, HLA-DR.

INTRODUCTION.

Flow cytometry is increasingly used by many research fields for its diversity of applications (Baumgarth and Roederer, 2000). Recently, a new method was described to perform the sample preparation for flow cytometry in only one step (Bourgoin et al., 2019). One of the main achievement of this simple procedure is its application to the measurement of two infection-related biomarkers in complex environments such as the emergency department, CD64 on neutrophils (nCD64) and CD169 on monocytes (mCD169) (Bourgoin Pénélope et al., 2019). Applying this easy technique to measure both biomarkers may allow rapid triage and proper treatment of infected subjects. However, the procedure has been only evaluated on fresh whole blood samples, rising issues for infected samples that would require testing but that are in geographically distant areas, as this in the case in multi-center studies, or that would be tested in larger numbers from characterized samples' biobanks, as this is the case in research studies, for instance.

An easy solution could be to freeze those samples until they are tested. However, the freezing / thawing procedure consists of several steps, where dimethylsulfoxide (DMSO) is often used as cryoprotectant. A high concentration of DMSO is toxic to human leucocytes, that could thus affect functional and phenotypic properties of measured cells (Kloverpris et al., 2010). Despite similar issues regarding the sample preparation, testing of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) could be another option, because many studies demonstrated that PBMC are often extracted from whole blood samples, frozen and then thawed for later analyses, providing good cellular viability and recovery after thawing (Hønge et al., 2017). However, cryopreserved PBMC could not be a method of choice for later assessment of infection-related biomarkers, because they are devoided of neutrophils and thus are not able to give a value for nCD64 level.

In this study, the aim was to propose a direct method of whole blood freezing, free of complex or toxic preparation issues. The main hypothesis was that the direct whole blood freezing could allow the delayed testing of samples with the new one-step flow cytometry method, because the procedure is rapid, and devoid of stressful washing steps.

1. MATERIAL AND METHODS.

1.1. One-step flow cytometry fresh evaluation.

For the evaluation at Immunotech (Marseille, France), EDTA blood samples from 31 healthy volunteers from the La Timone Hospital (Marseille, France) were freshly tested upon informed consent according to the new one-step flow cytometry method (Bourgoin et al., 2019) : 5 µL of blood was stained and incubated 15 minutes at room temperature in the dark with 500 µL of Versalyse lysing solution and either a dried antibody cocktail of common antigens that are anti-CD3-Allophycocyanin (APC) (clone UCHT1), anti-CD4-Phycoerythrin (PE) (clone 13B8.2), anti-CD8-Krome Orange (KO) (clone B9.11), anti-CD14-Pacific Blue (PBE) (clone RMO52) and anti-CD15-Fluorescein Isothiocyanate (FITC) (clone 80H5), or a dried mix of infection-related biomarkers that are anti-CD169-PE (clone 7-239), anti-Human Leucocyte Antigen (HLA)-DR-APC (clone Immu 357) and anti-CD64-PBE (clone 22).

All reagents were products or custom research products from Beckman Coulter Inc. (Brea, California, USA). The drying process was the DURA Innovations technology from Beckman Coulter Inc., used to reduce sources of human error and variability (Correia et al., 2018; Pitoiset et al., 2018).

1.2.Comparison between DMSO and direct freezing methods.

In the DMSO freezing procedure, used there as a comparative freezing method, a part of the whole blood from the same 31 volunteers was supplemented in 1:1 ratio with 20% DMSO (Sigma Aldrich, Saint-Louis, USA) and 80% foetal bovine serum (FBS) (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada), and, after mixing, then placed at -20°C during at least 24 hours.

In the direct freezing procedure, the other part of the same samples was directly placed at -20°C during at least 24 hours.

Samples were stored for up to 2 weeks. Both kind of frozen samples were then simultaneously placed between 18 and 25°C for an average of 2 minutes. As soon as frozen bloods were partially thawed with ice still visible, samples were treated accordingly to the one-step flow cytometry procedure. The only difference was that 10 µL of DMSO frozen/thawed samples were treated instead of 5 µL for direct frozen/thawed samples, in order to keep an equivalent number of cells.

1.3. Flow cytometry acquisition and data analysis.

Data were collected on a 3-laser, 10-color Navios flow cytometer from Beckman Coulter Inc. Flow-Set beads (Beckman Coulter Inc.) were used before each testing in order to control a potential variability in device performance, but no harmonization between the measured values over the study period was necessary. Analysis was done using Kaluza Analysis Software version 2.1 (Beckman Coulter Inc.). Lymphocytes, monocytes and neutrophils were first gated on the basis on their typical forward- and side-scatter characteristics. The proportions and expression levels of CD3, CD4, CD8 on lymphocytes (lCD3, lCD4, lCD8 respectively), of CD14, CD169, HLA-DR on monocytes (mCD14, mCD169, mHLA-DR respectively) and of CD15, CD64 on neutrophils (nCD15, nCD64 respectively) were determined as percentages and Mean of Fluorescence Intensities (MFI), respectively.

Correlations between methods were evaluated using the Pearson's correlation coefficient. The Bland-Altman approach was used to assess the agreement between methods. The statistical analyses were performed using Jump software version 10 (SAS institute Inc., Cary, NC, USA). All p-values were considered statistically significant under 0.05.

2. RESULTS.

Proportions of different leucocytes subsets have been compared between fresh, DMSO frozen and directly frozen samples: CD3+ lymphocytes, CD3+ CD4+ lymphocytes, CD3+ CD8+ lymphocytes, CD14+ monocytes and CD15+ neutrophils. Examples of plots representing those subsets within the different samples are shown in Figure 1.

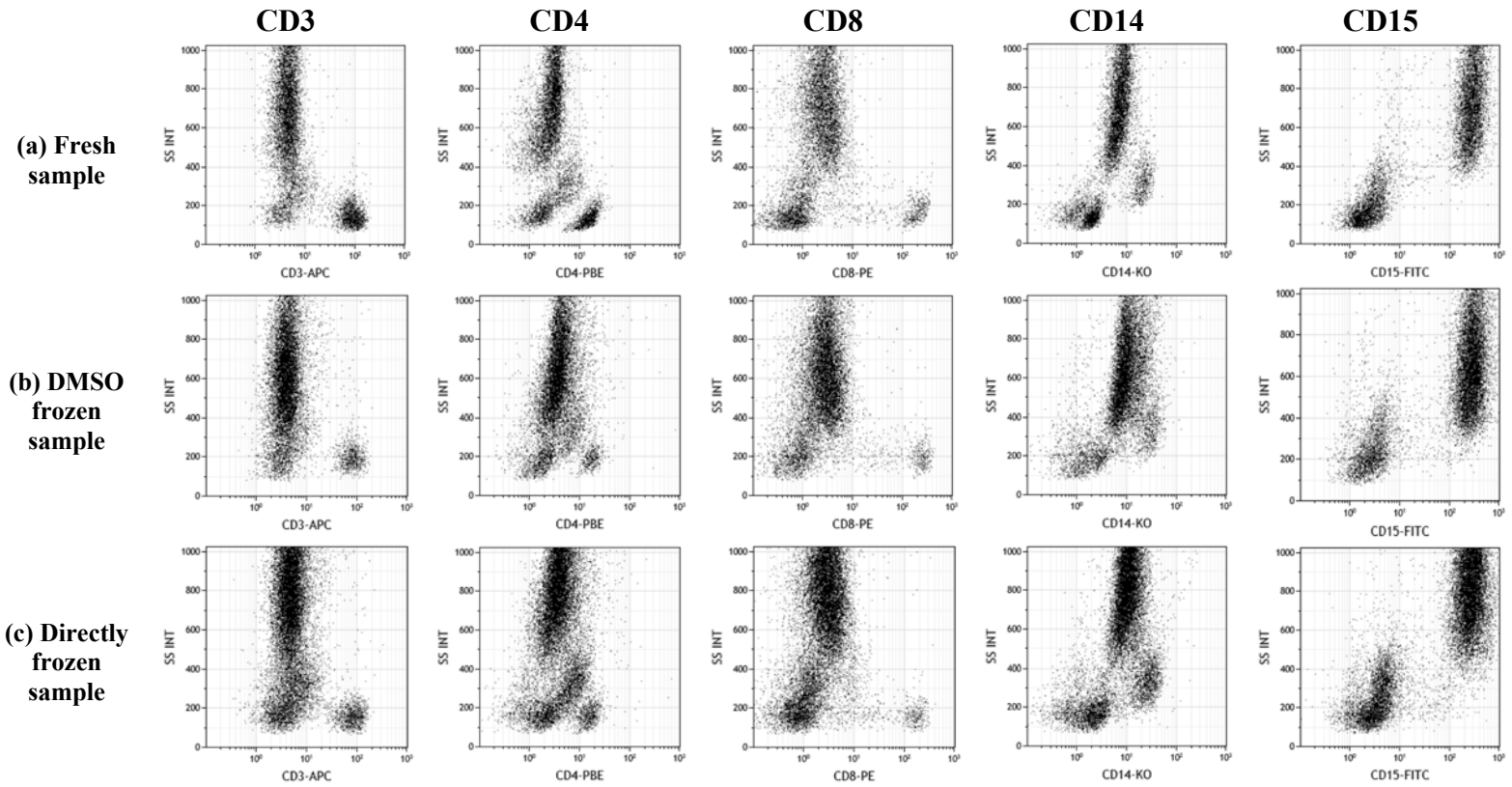


Fig 1. Analysis of common markers. Plots representing CD3, CD4, CD8, CD14 and CD15 expressions on leucocytes, are compared on one whole blood sample either (a) fresh, or (b) frozen with DMSO or (c) directly frozen.

Pearson correlation coefficients for the percentages of all these leucocyte subsets, between fresh and DMSO frozen samples, and between fresh and directly frozen samples, were all > 0.9 (figure 2).

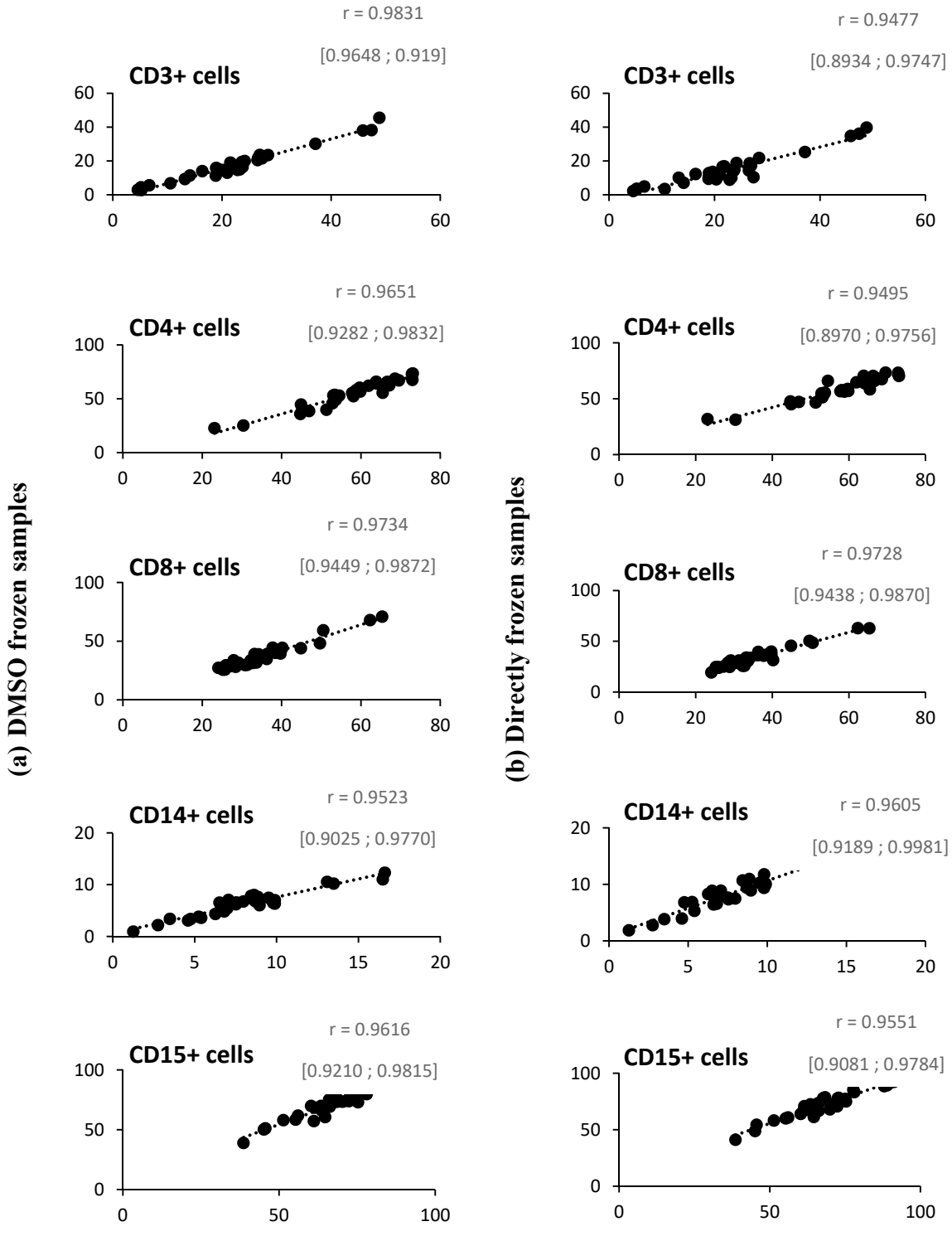


Fig 2. Percentages of common markers. Percentages of CD3+, CD4+, CD8+, CD14+ and CD15+ cellular subsets were compared (a) between fresh and DMSO frozen blood samples, and (b) between fresh and directly frozen blood samples. A total of 31 samples were evaluated.

Correlations were represented by the Pearson r value. 95% confidence intervals are provided in parentheses. All correlations were significantly different ($p < 0.0001$).

As a consequence, Pearson correlation coefficients for the percentages of all these leucocyte subsets, between DMSO and directly frozen samples, were also all > 0.9 (supplementary figure 1).

Therefore, Pearson results indicate that percentages of common leucocyte subsets obtained in both kinds of frozen samples are strongly correlated to those obtained in fresh samples. Bland Altman bias plots were constructed to appreciate the agreement between percentages given by frozen techniques or given by fresh measurement (figure 3).

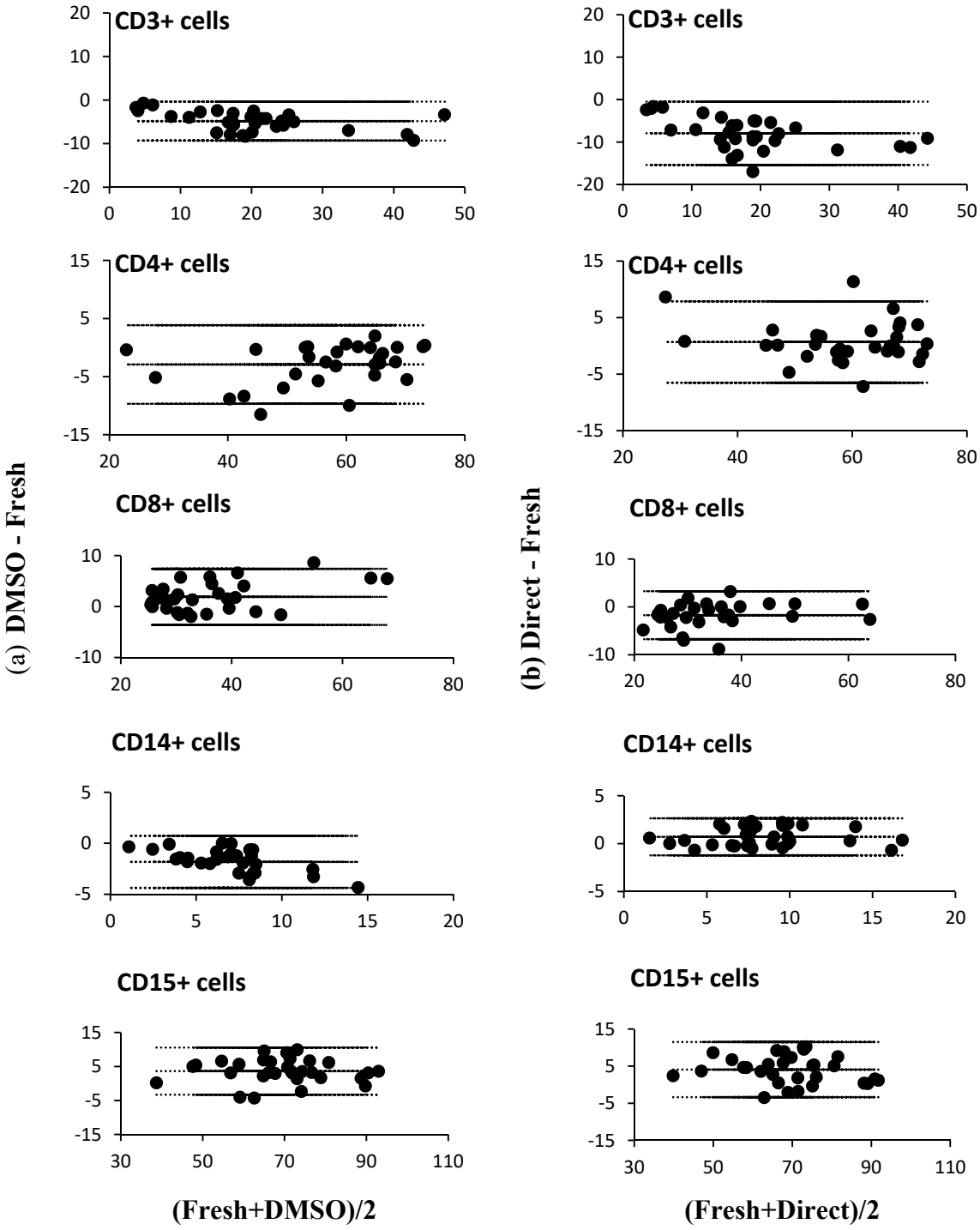


Fig 3. Bland-Altman plots for agreement of common markers. Bland-Altman plots were constructed by plotting the differences between the percentages of cells from (a) fresh or DMSO frozen samples, or (b) fresh or directly frozen samples, against the mean percentage values of the two methods. Percentages analyzed are those of CD3+, CD4+, CD8+, CD14+ and CD15+ cellular subsets. A total of 31 samples were evaluated. Middle dot line represents the mean bias value.

Upper and lower dot lines represent 95% confidence intervals of upper and lower limits of agreement, respectively.

Table 1 shows the details of Bland-Altman parameters, including bias values, bias standard deviations and limits of agreement.

Tab 1. Bland-Altman parameters for agreement of common markers. Bland-Altman parameters, including mean bias, standard deviation of bias and 95% limits of agreement, were given for comparing percentages between (a) fresh and DMSO frozen samples, or (b) fresh and directly frozen samples. Percentages analyzed are those of CD3+, CD4+, CD8+, CD14+ and CD15+ cellular subsets. A total of 31 samples were evaluated.

(a) Agreement between fresh and DMSO frozen samples	Mean bias	Standard deviation of bias	95% Limits of agreement
CD3+ cells	-4.81	2.28	[-9.28 ; -0.34]
CD4+ cells	-2.91	3.45	[-9.67 ; 3.85]
CD8+ cells	1.9	2.8	[-3.59 ; 7.4]
CD14+ cells	-1.81	1.3	[-4.36 ; 0.73]
CD15+ cells	3.65	3.53	[-3.27 ; 10.58]

(b) Agreement between fresh and directly frozen samples	Mean bias	Standard deviation of bias	95% Limits of agreement
CD3+ cells	-7.92	3.8	[-15.39 ; -0.46]
CD4+ cells	0.69	3.67	[-6.51 ; 7.89]
CD8+ cells	-1.72	2.55	[-6.73 ; 3.27]
CD14+ cells	0.7	0.98	[-1.22 ; 2.64]
CD15+ cells	4.09	3.79	[-3.33 ; 11.52]

Supplementary figure 2 and supplementary table 1 give Bland Altman bias plots and parameters, respectively, for the agreement between percentages given by DMSO freezing technique and direct freezing technique.

Therefore, Bland-Altman results indicate that percentages of common leucocyte subsets seem to have some systematical bias when measured between both kinds of frozen samples and fresh samples. However, methods keep good agreements because percentages are always given with a bias $\leq 5\%$, excepting CD3 for which bias was around 7%, and very few outliers were detected.

The comparison between fresh and both kinds of frozen samples was finally made by assessing the levels of expression of CD169 on monocytes (mCD169), of CD64 on neutrophils (nCD64) and of HLA-DR on monocytes (mHLA-DR) in the same 31 samples. Examples of plots representing those biomarkers within the different samples are shown in Figure 4.

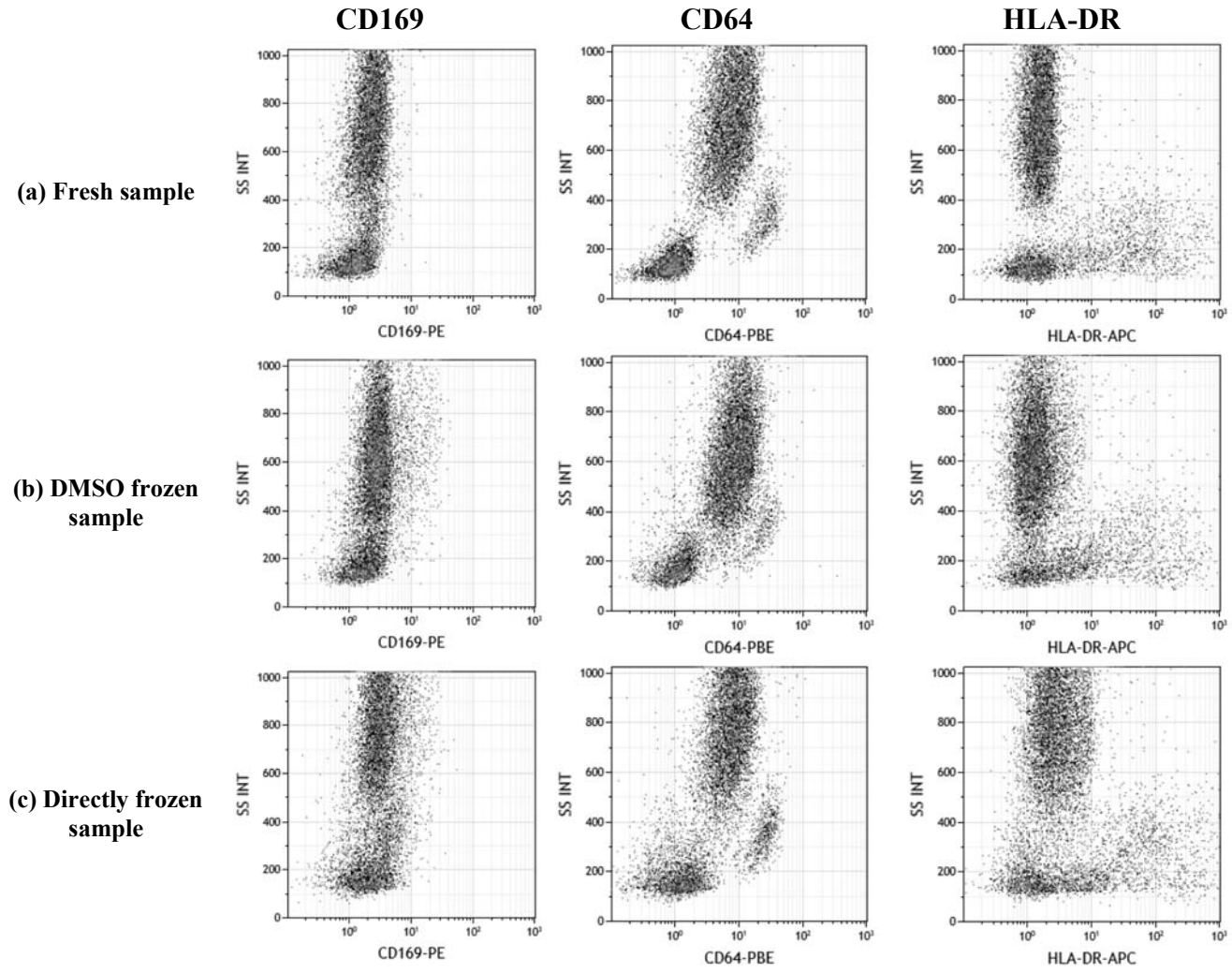


Fig 4. Analysis of infection-related markers. Plots representing CD169, CD64 and HLA-DR expressions on leucocytes, toward the side scatter of the cells, are compared on one whole blood sample either (a) fresh, or (b) DMSO frozen (SVF-DMSO) or (c) directly frozen (total freezing).

Pearson correlation coefficients for the levels of expression of these biomarkers, between fresh and DMSO frozen samples, and between fresh and directly frozen samples, were all > 0.9 (figure 5).

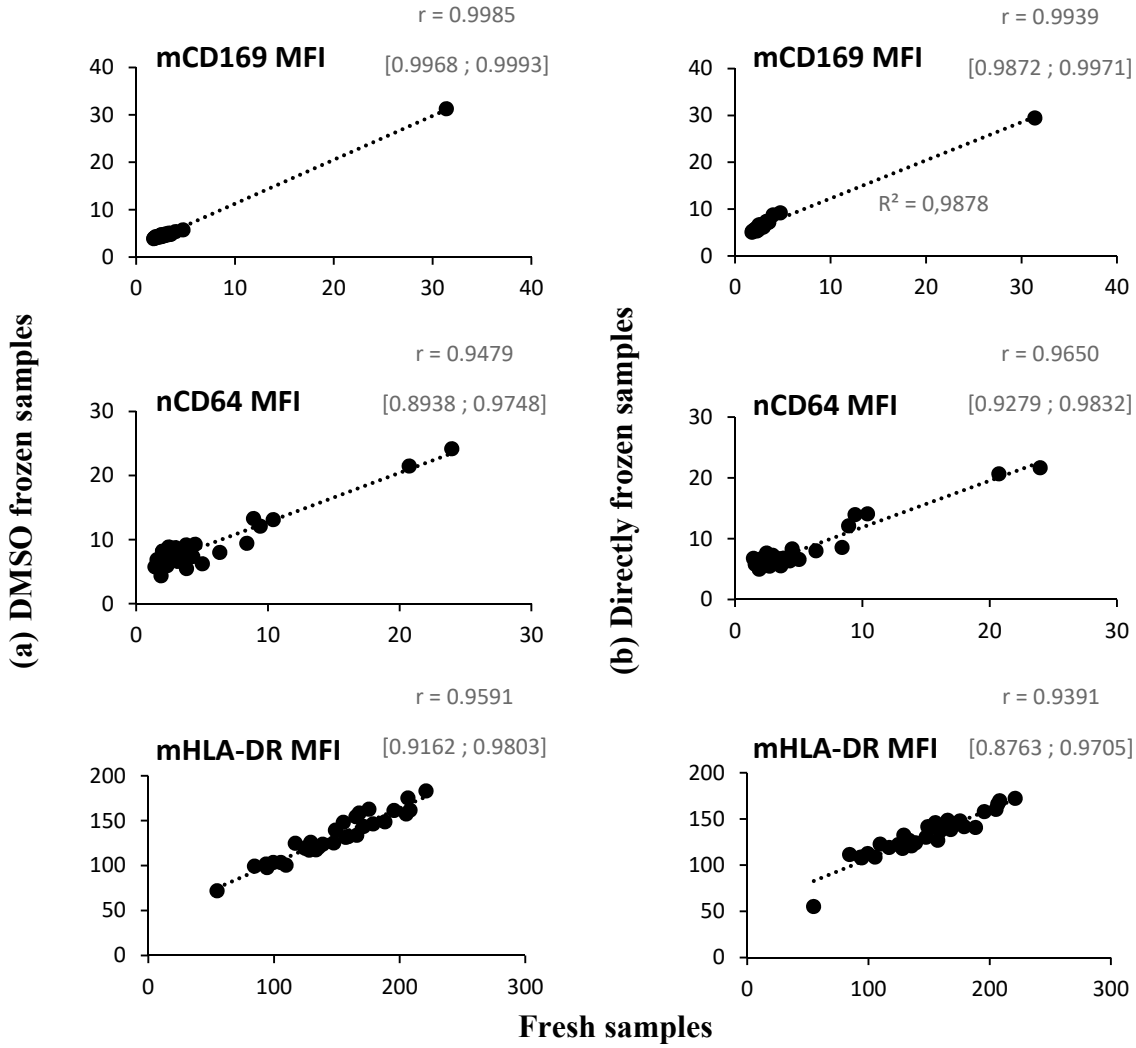


Fig 5. Expressions of infection-related markers. Mean Fluorescence Intensity (MFI) of CD169 on monocytes (mCD169), of CD64 on neutrophils (nCD64) and of HLA-DR on monocytes (mHLA-DR), were compared (a) between fresh and DMSO frozen blood samples, and (b) between fresh and one-step frozen blood samples. A total of 31 samples were evaluated. Correlations were represented by the Pearson r value. 95% confidence intervals are provided in parentheses. All correlations were significantly different ($p < 0.0001$).

As a consequence, Pearson correlation coefficients for the levels of expression of these biomarkers, between DMSO and directly frozen samples, were also all > 0.9 (supplementary figure 3).

Therefore, Pearson results indicate that levels of expression of infection-related biomarkers obtained in both kinds of frozen samples are strongly correlated to those obtained in fresh samples. Bland Altman bias plots were constructed to appreciate the agreement between levels of expression given by frozen techniques or given by fresh measurement (figure 6).

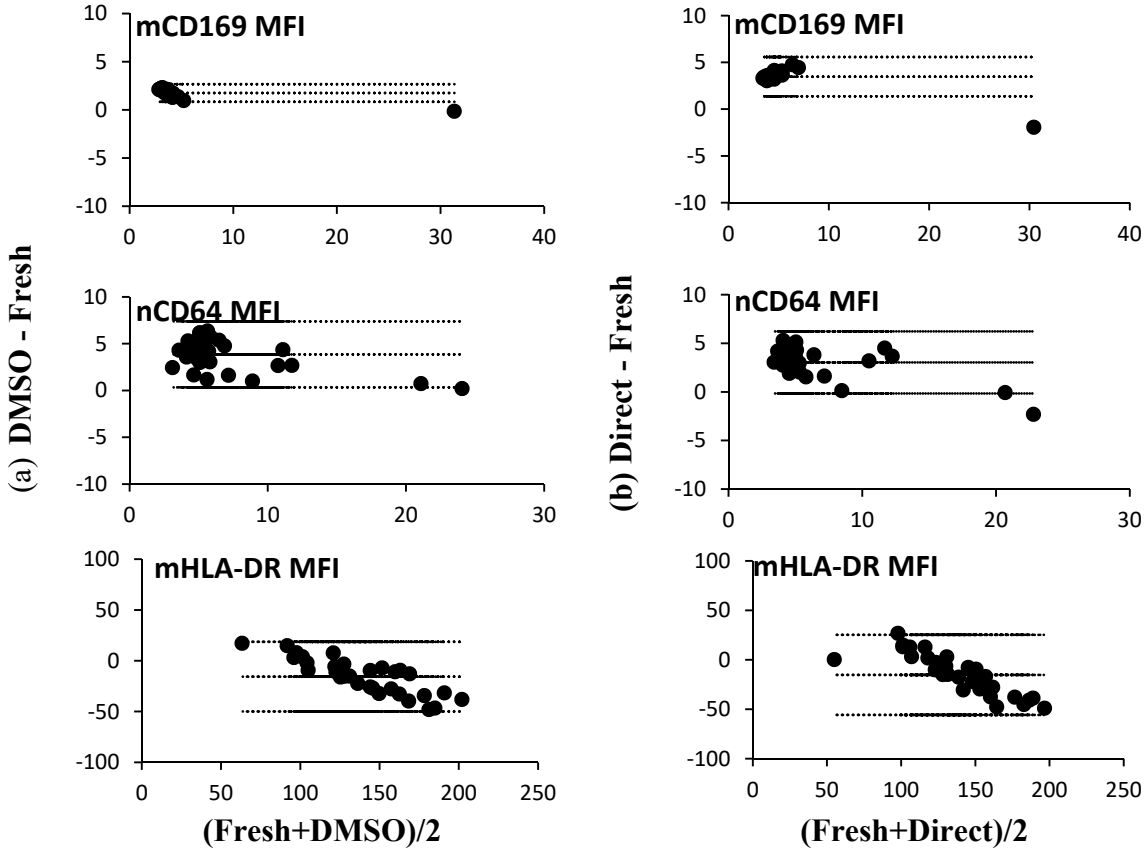


Fig 6. Bland-Altman plots for agreement of infection-related markers. Bland-Altman plots were constructed by plotting the differences between the levels of expression from (a) fresh or DMSO frozen samples, or (b) fresh or directly frozen samples, against the mean expression values of the two methods. Mean Fluorescence Intensities (MFI) analyzed are those of CD169 on monocytes (mCD169), of CD64 on neutrophils (nCD64) and of HLA-DR on monocytes (mHLA-DR). A total of 31 samples were evaluated. Middle dot line represents the mean bias value. Upper and lower dot lines represent 95% confidence intervals of upper and lower limits of agreement, respectively.

Table 2 shows the details of Bland-Altman parameters, including bias values, bias standard deviations and limits of agreement.

Tab 2. Bland-Altman parameters for agreement of infection-related markers. Bland-Altman parameters, including mean bias, standard deviation of bias and 95% limits of agreement, were given for comparing the levels of expression between (a) fresh and DMSO frozen samples, or (b) fresh and directly frozen samples. Mean Fluorescence Intensities (MFI) analyzed are those of CD169 on monocytes (mCD169), of CD64 on neutrophils (nCD64) and of HLA-DR on monocytes (mHLA-DR). A total of 31 samples were evaluated.

(a) Agreement between fresh and DMSO frozen samples	Mean bias	Standard deviation of bias	95% Limits of agreement
mCD169 MFI	1.75	0.46	[0.84 ; 2.67]
nCD64 MFI	3.86	1.79	[0.33 ; 7.38]
mHLA-DR MFI	-15.53	17.5	[-49.84 ; 18.77]

(b) Agreement between fresh and directly frozen samples	Mean bias	Standard deviation of bias	95% Limits of agreement
mCD169 MFI	3.47	1.07	[1.37 ; 5.57]
nCD64 MFI	3.03	1.62	[-0.15 ; 6.22]
mHLA-DR MFI	-15.13	20.65	[-55.61 ; 25.35]

Supplementary figure 4 and supplementary table 2 give Bland Altman bias plots and parameters, respectively, for the agreement between levels of expression given by DMSO freezing technique and direct freezing technique.

Therefore, Bland-Altman results indicate that levels of expression of infection-related biomarkers seem to have, as previous analyzed percentages, some systematical bias when measured between both kinds of frozen samples and fresh samples. However, methods keep good agreements for mCD169 and nCD64 because their expression levels are always given with a MFI bias ≤ 5. For HLA-DR, there is less agreement between methods because MFI is given with a mean bias that exceeds 15.

3. DISCUSSION.

This study reports the direct freezing of whole blood, without adjuvants, combined with an optimized one-step flow cytometry procedure (Bourgoin et al., 2019). The aim of the study was to achieve a simpler and faster preparation for the frozen samples that may help to democratize their testing by flow cytometry even if they are delocalized or from biobanks as this is the case in multi-center or research studies.

Some authors have already demonstrated the benefit to use frozen specimen, and have tried also to optimize some of the freezing procedures, proposing for instance to use DMSO and controlled-freezing containers, but requiring pipetting and trained technician (Verschoor and Kohli, 2018). This kind of procedure was used in the study as a comparative method for what is best achieved currently in terms of freezing techniques. The technique, assessed there, allowed the freezing of whole blood sample in its entirety, directly without additional adjuvants or any preparation steps, offering the possibility to freeze any samples, in any -20°C freezer, with neither serum isolation nor reagents to pipet in.

Within this method, it could be pointed out that cell integrity is impacted. Indeed, when samples are thawed, blood cells are mostly permeabilized because of the lack of protective adjuvants. That is why, a short time of 2 minutes for thawing is recommended and necessary not to amplify the proportion of cellular debris.

However, this does not impact cellular biology, as results show that cellular proportions and biomarkers' expression levels in these frozen samples are close to those of fresh samples. Verschoor and his team, for instance, had already shown that frozen blood was comparable to fresh blood for the enumeration of major leucocyte cell types (Verschoor et al., 2018), and particularly extended these observations to distinct subsets of monocytes, T-cells and NK cells (Verschoor and Kohli, 2018). They even suggested that *"[frozen] peripheral blood be given greater consideration for studies in which the quantification of distinct leucocyte subsets is required*", in terms of enumeration but also of expression of cell-surface receptors.

Good correlations were observed between the percentages of common leucocyte subsets gated as positive by the direct freezing method, when compared to the freezing DMSO procedure or the fresh measurement. No major bias was observed between techniques, the slight lower percentage of lymphocytes, associated with a slight higher percentage of neutrophils could be explained by a higher lymphocyte fragility, or by a few more debris contaminating the neutrophils' gate. If a precise quantification of these cell percentages is required for future studies, it could be helpful to add a CD45 as gating marker.

The direct freezing method was evaluated with three biomarkers of the infectiology field, whom levels need to be precisely assessed in whole blood samples for indicating the etiology of the infection (Bourgoin Pénélope et al., 2019) : CD169 is increased on monocytes in the course of a viral infection (van der Kuyl et al., 2007), nCD64 level increases in subjects in septic conditions or acute bacterial infections (Jämsä et al., 2018), and diminished mHLA-DR is a reliable indicator of immunosuppression (Demaret et al., 2013; Monneret and Venet, 2014).

The current study demonstrated that levels of expression of mCD169 and nCD64 could be assessed in both kinds of frozen samples as they presented excellent correlations with fresh samples. A bias was detected for each of them, that lets imagine that a corrective factor could be applied in case they are measured from frozen samples instead of fresh samples. Indeed, mCD169 and nCD64 levels within directly frozen samples are given with a MFI bias of 3.47 and 3.03, respectively. In a previous report (*publication submitted in European Journal of Emergency Medicine*), these biomarkers had thresholds within fresh samples demonstrated to give an infectious information when below 6.3 and 1.2, respectively. We could imagine that within frozen samples, those thresholds could easily be set at 9,77 (6,3 + 3,47) for mCD169 and 4,23 (1,2 + 3,03) for nCD64.

Regarding mHLA-DR, good correlations were also obtained between frozen and fresh samples. A bias was introduced (MFI bias of 15,13), which is low in comparison to the high MFI values for mHLA-DR (100-200), thus representing approximately 10% errors. Further, it seems that the bias is proportional to the MFI, suggesting a lower impact on low mHLA-DR measurements, usually found in sepsis patients.

These biases could be the result of membrane disruption during the freezing/thawing procedure, giving access for antibodies to the intracellular biomarker stock, thus increasing the total quantity measured per cell. Also, giving access to the intracellular space obviously increases the non-specific background fluorescence, due to unbound conjugates. On the other hand, the somewhat decreased signal (mHLA-DR especially) could be explained if the membranes are not only permeabilized by ice, but have lost some pieces, or if the biomarker have suffered from degradation or aggregation by cold.

This demonstration has been made on five common leucocyte subsets and three infection-related biomarkers; other markers should be assessed to underline the global value of the concept for different applications. But, overall, this first study points out that these very easy and cheap freezing-thawing and testing methods allow to recover most leucocytes, with preserved proportions and preserved markers.

CONCLUSION.

In this study, an easy protocol of freezing was established by allowing the whole blood sample storage at -18°C in its entirety. The method is promising for the cell subsets considered, because it saves time and work while offering cellular proportions similar to a DMSO freezing protocol or a fresh measurement. The proof-of-concept of measuring mCD169, nCD64 and mHLA-DR suggest potential value of considering this direct freezing concept for flow cytometry testing.

ACKNOWLEDGEMENTS.

The authors would like to thank the technician team of the La Timone Hospital laboratory for their assistance in blood sampling.

FUNDING.

This work was partially supported by Beckman Coulter through donations of laboratory supplies and participation of the two employees mentioned. This private company had no role in the study design, or collection and interpretation of data. Beckman Coulter and the Beckman Coulter product and service marks mentioned herein are trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States and other countries. All other trademarks are the property of their respective owners.

DECLARATION OF INTEREST.

Fabrice Malergue and Pénélope Bourgoin are Beckman Coulter employees. Pénélope Bourgoin is recipient of a CIFRE PhD grant [n°2016/1368] from the ANRT (National Agency for Research and Technology).

They provided critical advice on setup of the assay and instruments and in manuscript preparation.

REFERENCES.

Baumgarth, N., Roederer, M., 2000. A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. J. Immunol. Methods 243, 77–97. https://doi.org/10.1016/S0022-1759(00)00229-5

Bourgoin, P., Hayman, J., Rimmelé, T., Venet, F., Malergue, F., Monneret, G., 2019. A novel one-step extracellular staining for flow cytometry: Proof-of-concept on sepsis-related biomarkers. J. Immunol. Methods 470, 59–63. https://doi.org/10.1016/j.jim.2019.05.001

Bourgoin Pénélope, Soliveres Thomas, Ahriz Dalia, Arnoux Isabelle, Meisel Christian, Unterwalder Nadine, Morange Pierre-Emmanuel, Michelet Pierre, Malergue Fabrice, Markarian Thibaut, 2019. Clinical research assessment by flow cytometry of biomarkers for infectious stratification in an Emergency Department. Biomark. Med.

Correia, R.P., Rajab, A., Bento, L.C., Alexandre, A.M., Vaz, A.C., Schimidell, D., Pedro, E.C., Perin, F.S., Nozawa, S.T., Barroso, R.S., Bacal, N.S., 2018. A ten-color tube with dried antibody reagents for the screening of hematological malignancies. Int. J. Lab. Hematol. 40, 136–143. https://doi.org/10.1111/ijlh.12753

Demaret, J., Walencik, A., Jacob, M.-C., Timsit, J.-F., Venet, F., Lepape, A., Monneret, G., 2013. Inter-laboratory assessment of flow cytometric monocyte HLA-DR expression in clinical samples. Cytometry B Clin. Cytom. 84B, 59–62. https://doi.org/10.1002/cyto.b.21043

Hønge, B.L., Petersen, M.S., Olesen, R., Møller, B.K., Erikstrup, C., 2017. Optimizing recovery of frozen human peripheral blood mononuclear cells for flow cytometry. PLoS ONE 12. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187440

Jämsä, J., Ala-Kokko, T., Huotari, V., Ohtonen, P., Savolainen, E.-R., Syrjälä, H., 2018. Neutrophil CD64, C-reactive protein, and procalcitonin in the identification of sepsis in the ICU — Post-test probabilities. J. Crit. Care 43, 139–142. https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2017.08.038

Kloverpris, H., Fomsgaard, A., Handley, A., Ackland, J., Sullivan, M., Goulder, P., 2010. Dimethyl sulfoxide (DMSO) exposure to human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) abolish T cell responses only in high concentrations and following coincubation for more than two hours. J. Immunol. Methods 356, 70–78. https://doi.org/10.1016/j.jim.2010.01.014

Monneret, G., Venet, F., 2014. Monocyte HLA-DR in sepsis: shall we stop following the flow? Crit. Care 18, 102. https://doi.org/10.1186/cc13179

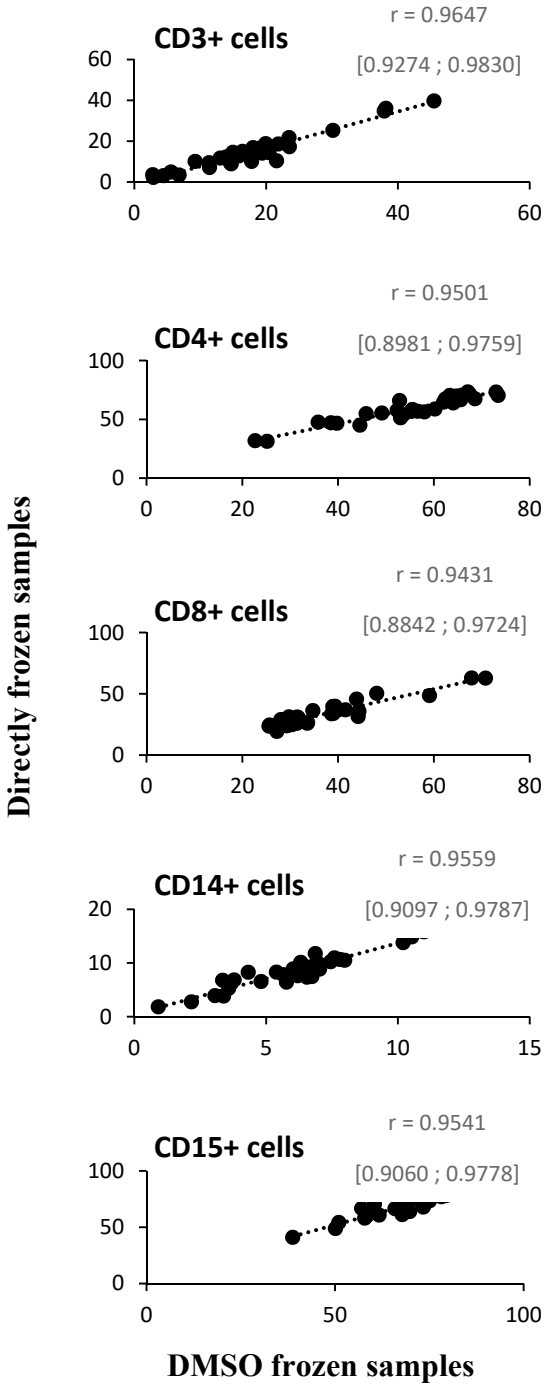
Pitoiset, F., Cassard, L., El Soufi, K., Boselli, L., Grivel, J., Roux, A., Klatzmann, D., Chaput, N., Rosenzwajg, M., 2018. Deep phenotyping of immune cell populations by optimized and standardized flow cytometry analyses: Deep Immunophenotyping for Clinical Studies. Cytometry A 93, 793–802. https://doi.org/10.1002/cyto.a.23570

van der Kuyl, A.C., van den Burg, R., Zorgdrager, F., Groot, F., Berkhout, B., Cornelissen, M., 2007. Sialoadhesin (CD169) Expression in CD14+ Cells Is Upregulated Early after HIV-1 Infection and Increases during Disease Progression. PLoS ONE 2, e257. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000257

Verschoor, C.P., Kohli, V., 2018. Cryopreserved whole blood for the quantification of monocyte, T-cell and NK-cell subsets, and monocyte receptor expression by multi-color flow cytometry: A methodological study based on participants from the canadian longitudinal study on aging: Cryopreserved Blood for Leukocyte Subset Determination. Cytometry A 93, 548–555. https://doi.org/10.1002/cyto.a.23372

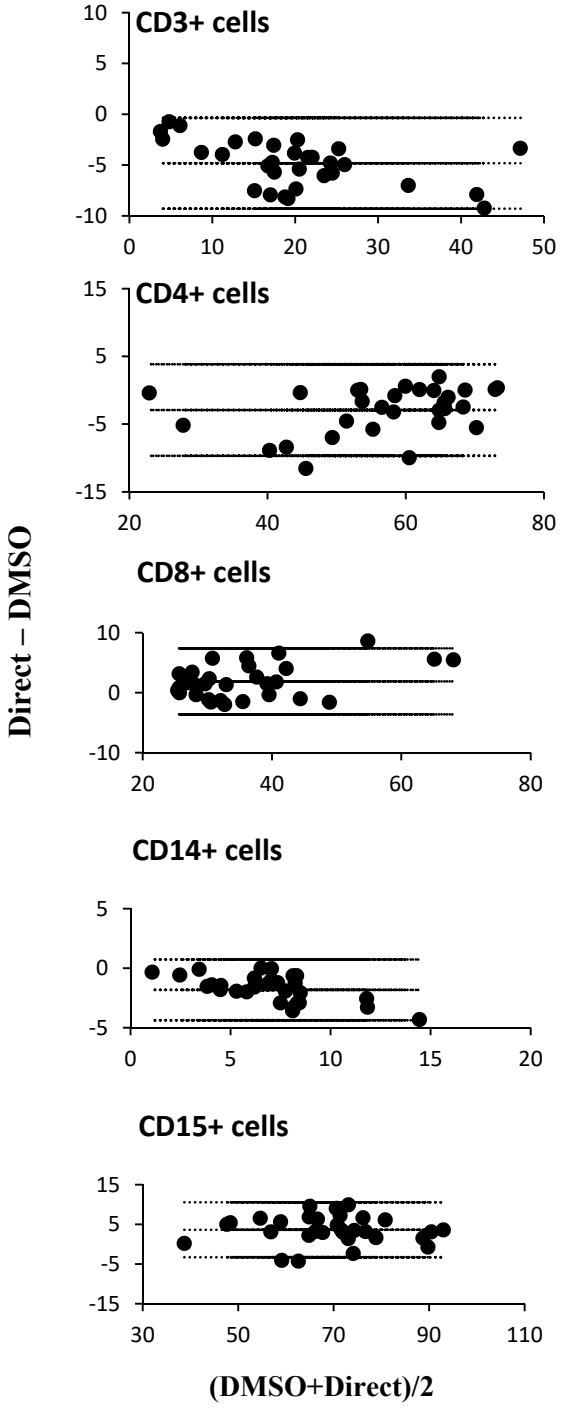
Verschoor, C.P., Kohli, V., Balion, C., 2018. A comprehensive assessment of immunophenotyping performed in cryopreserved peripheral whole blood: TESTING CRYOPRESERVED BLOOD FOR IMMUNOPHENOTYPING. Cytometry B Clin. Cytom. 94, 818–826. https://doi.org/10.1002/cyto.b.21526

SUPPLEMENTARY FIGURES.



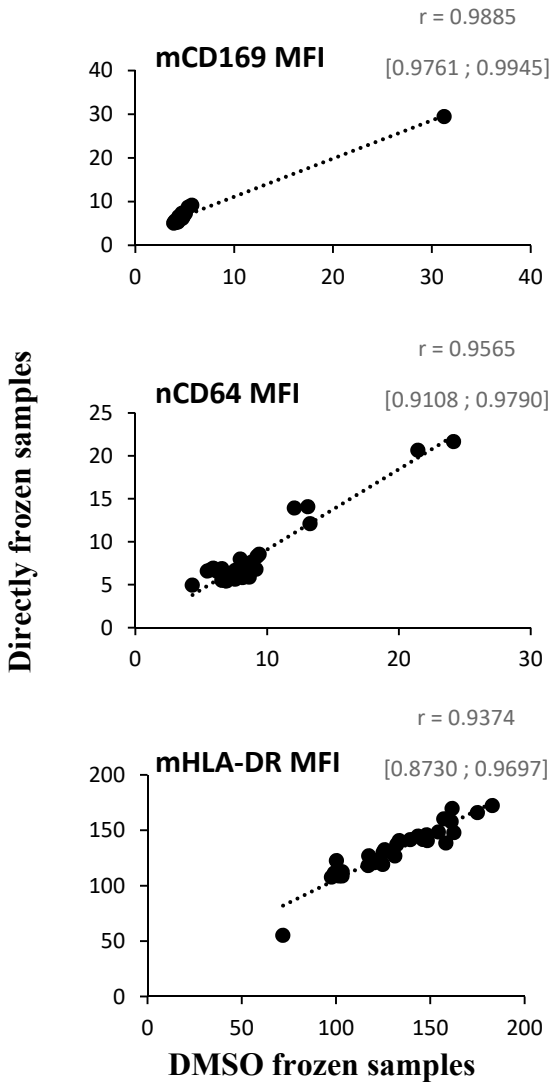
Supplementary Fig 1. Percentages of common markers. Percentages of CD3+, CD4+, CD8+, CD14+ and CD15+ cellular subsets were compared between DMSO frozen and directly frozen bood samples. A total of 31 samples were evaluated. Correlations were represented by the Pearson r value. 95% confidence intervals are provided in parentheses. All correlations were significantly different ($p < 0.0001$).

SUPPLEMENTARY FIGURES.



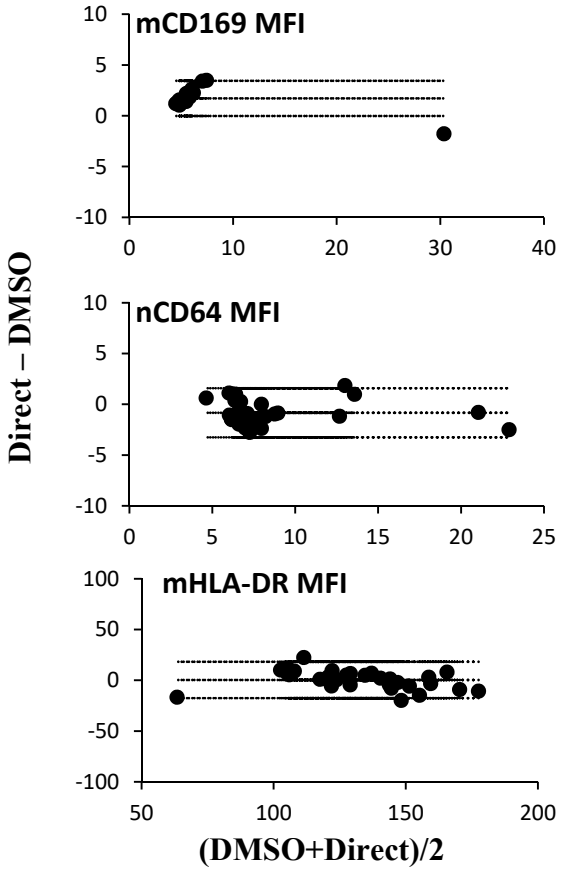
Supplementary Fig 2. Bland-Altman plots for agreement of common markers. Bland-Altman plots were constructed by plotting the differences between the percentages of cells from DMSO frozen samples or directly frozen samples, against the mean percentage values of the two methods. Percentages analyzed are those of CD3+, CD4+, CD8+, CD14+ and CD15+ cellular subsets. A total of 31 samples were evaluated. Middle dot line represents the mean bias value. Upper and lower dot lines represent 95% confidence intervals of upper and lower limits of agreement, respectively.

SUPPLEMENTARY FIGURES.



Supplementary Fig 3. Expressions of infection-related markers. Mean Fluorescence Intensity (MFI) of CD169 on monocytes (mCD169), of CD64 on neutrophils (nCD64) and of HLA-DR on monocytes (mHLA-DR), were compared between DMSO frozen blood samples and directly frozen blood samples. A total of 31 samples were evaluated. Correlations were represented by the Pearson r value. 95% confidence intervals are provided in parentheses. All correlations were significantly different ($p < 0.0001$).

SUPPLEMENTARY FIGURES.



Supplementary Fig 4. Bland-Altman plots for agreement of infection-related markers. Bland-Altman plots were constructed by plotting the differences between the levels of expression from DMSO frozen samples or directly frozen samples, against the mean expression values of the two methods. Mean Fluorescence Intensities (MFI) analyzed are those of CD169 on monocytes (mCD169), of CD64 on neutrophils (nCD64) and of HLA-DR on monocytes (mHLA-DR). A total of 31 samples were evaluated. Middle dot line represents the mean bias value. Upper and lower dot lines represent 95% confidence intervals of upper and lower limits of agreement, respectively.

SUPPLEMENTARY TABLES.

Supplementary Tab 1. Bland-Altman parameters for agreement of common markers. Bland-Altman parameters, including mean bias, standard deviation of bias and 95% limits of agreement, were given for comparing percentages between DMSO frozen samples and directly frozen samples. Percentages analyzed are those of CD3+, CD4+, CD8+, CD14+ and CD15+ cellular subsets. A total of 31 samples were evaluated.

Agreement between DMSO and directly frozen samples	Mean bias	Standard deviation of bias	95% Limits of agreement
CD3+ cells	-3,1	2,65	[-8,31 ; 2,1]
CD4+ cells	3,6	4,14	[-4,52 ; 11,72]
CD8+ cells	-3,63	3,85	[-11,19 ; 3,93]
CD14+ cells	2,52	1,32	[-0,06 ; 5,11]
CD15+ cells	0,43	3,8	[-7,02 ; 7,88]

SUPPLEMENTARY TABLES.

Supplementary Tab 2. Bland-Altman parameters for agreement of infection-related markers. Bland-Altman parameters, including mean bias, standard deviation of bias and 95% limits of agreement, were given for comparing the levels of expression between DMSO frozen samples and directly frozen samples. Mean Fluorescence Intensities (MFI) analyzed are those of CD169 on monocytes (mCD169), of CD64 on neutrophils (nCD64) and of HLA-DR on monocytes (mHLA-DR). A total of 31 samples were evaluated.

Agreement between DMSO and directly frozen samples	Mean bias	Standard deviation of bias	95% Limits of agreement
mCD169 MFI	1,71	0,88	[-0,01 ; 3,45]
nCD64 MFI	-0,82	1,23	[-3,24 ; 1,59]
mHLA-DR MFI	0,4	9,12	[-17,48 ; 18,29]

Résumé

Les maladies infectieuses sont des pathologies dont le diagnostic étiologique est souvent complexe. Le clinicien doit baser son diagnostic sur ses observations cliniques et les relier aux mesures biologiques du patient. Plusieurs groupes recherchent activement de nouveaux marqueurs biologiques pour préciser ce diagnostic. C'est dans cette optique que la cytométrie en flux a été utilisée et optimisée pour comparer l'expression de nouveaux biomarqueurs sur les cellules du sang des patients infectés ou des sujets sains. La caractérisation des mécanismes d'expression des marqueurs montre que l'expression du CD64 sur les neutrophiles est amplifiée chez les patients infectés par une bactérie via l'interféron γ, alors que l'expression du CD169 sur les monocytes est amplifiée chez les patients infectés par un virus via la famille des interférons de type I (α, β, ω). De plus, l'expression de l'HLA-DR sur les monocytes semble aider à l'identification étiologique de l'infection. Les travaux suggèrent que le dosage de ces trois biomarqueurs par la technique de cytométrie en flux optimisée pourrait être un candidat intéressant dans les études sur le diagnostic des infections bactériennes et virales.

Mots clés : *cytométrie en flux, immunologie, pathologies infectieuses, diagnostic au lit du patient.*

Abstract

Infectious diseases are pathologies whose etiological diagnosis is often complex. The clinician must base his diagnosis on his clinical observations and link them to the patient's biological measurements. Several groups are actively seeking new biomarkers to clarify this diagnosis. It is for this purpose that flow cytometry has been used and optimized to compare the expression of new biomarkers on blood cells of infected patients or healthy subjects. Characterization of the expression mechanisms of the markers shows that the expression of CD64 on neutrophils is amplified in patients infected by a bacterium via interferon γ, whereas the expression of CD169 on monocytes is amplified in patients infected with a virus via the type I interferon family (α, β, ω). In addition, the expression of HLA-DR on monocytes seems to help the etiological identification of the infection. The work suggests that the assay of these three biomarkers combined into an optimized flow cytometry technique could be an interesting candidate in studies on the diagnosis of bacterial and viral infections.

Keywords : *flow cytometry, immunology, infectious diseases, point-of-care diagnosis.*