

# Université Louis Pasteur

Année 2007

N°

Thèse présentée pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université Louis Pasteur Strasbourg I

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

## Etude de mécanismes régulant l'apoptose lymphocytaire dans le choc septique chez l'homme

par Thomas LAVAUX

Soutenue publiquement le 13 septembre 2007

### Membres du jury

Monsieur le Professeur Pierre OUDET, Directeur de Thèse

Monsieur le Professeur Francis SCHNEIDER, Co-Directeur de Thèse

Madame le Docteur Marie-Hélène METZ-BOUTIGUE, Rapporteur Interne

Madame le Professeur Christiane MOUGIN, Rapporteur Externe

Monsieur le Professeur Pierre-Édouard BOLLAERT, Rapporteur Externe







Je remercie vivement Mme le Dr Marie-Hélène Metz-Boutigue, Mme le Pr Christiane Mouglin, M le Pr Pierre-Edouard Bollaert, M le Pr Francis Schneider et M le Pr Pierre Oudet d'avoir accepté de juger ce travail de thèse.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au Pr Francis Schneider qui m'a toujours soutenu et conseillé tout au long de mon cursus, ce qui m'a permis d'acquérir une formation et un éclairage précieux sur les aspects cliniques et biologiques des syndromes infectieux graves. Je tiens également à remercier le Pr Albert Jaeger grâce à qui j'ai pu me consacrer à ce travail de thèse lors de mon internat.

Je remercie le Pr Pierre Oudet de m'avoir fait confiance pour travailler sur cette thématique, ce qui m'a permis d'acquérir une formation à la recherche dans son laboratoire.

Je remercie le Dr Marie-Pierre Gaub qui m'a soutenu durant ce travail. La qualité et la rigueur de son encadrement technique et scientifique ont été des éléments indispensables à l'aboutissement de ce mémoire.

Je tiens à remercier le Dr Pascal Bilbault pour sa collaboration essentielle à l'inclusion des malades dans les différents protocoles de recherche et son aide au recueil des données cliniques, ainsi qu'au Pr Thierry Pottecher et au Dr Anne Launoy qui ont rendu possible ce travail de collaboration avec le service de réanimation chirurgicale.

Je tiens à remercier le Dr Béatrice Uring-Lambert pour sa collaboration dans l'analyse cellulaire par cytométrie en flux et son aide pour l'interprétation des données.

Un grand merci à l'ensemble du personnel du service de réanimation médicale, du service de réanimation chirurgicale et à tout le personnel du laboratoire de biochimie et biologie moléculaire pour leur assistance technique, leurs conseils, leur gentillesse et leur patience.

Enfin je tiens à remercier Christelle pour son soutien durant la rédaction de ce mémoire, mes deux filles Agathe et Charlotte et toute ma famille.

Ce travail a été en partie financé par le projet hospitalier de recherche clinique n° 2629 (2001)



## Sommaire

---



SOMMAIRE.....	7
LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES .....	13
LISTE DES ABREVIATIONS .....	15
INTRODUCTION .....	19
<b>AVANT PROPOS.....</b>	<b>21</b>
<b>1<sup>ER</sup> PARTIE : LES VOIES DE SIGNALISATION DE L' APOPTOSE .....</b>	<b>28</b>
<i>A) Des évidences morphologiques et biochimiques .....</i>	28
<i>B) Une mécanique moléculaire complexe .....</i>	29
<i>C) Les acteurs de l'apoptose .....</i>	31
1) Les récepteurs de mort cellulaire .....	31
a) Structures.....	32
b) Ligands.....	32
c) Invalidation génique .....	32
d) En résumé.....	34
2) La famille de Bcl-2.....	35
a) Structures.....	35
b) Relation structure/activité .....	36
c) Invalidation génique .....	37
d) En résumé.....	39
3) Les caspases .....	40
a) Structures.....	40
b) Activation.....	40
c) Substrats .....	41
d) Invalidation génique.....	41
e) En résumé .....	45
4) La mitochondrie .....	45
a) Relation structure/activité.....	45
b) Invalidation génique.....	47
c) En résumé .....	48
<i>D) Mécanismes moléculaires de l'apoptose.....</i>	49
1) Voie extrinsèque.....	49
2) Voie intrinsèque .....	51

a) Dimérisation .....	53
b) Autres modifications .....	53
3) <i>Activation des caspases</i> .....	54
a) Régulation transcriptionnelle .....	54
b) Apoptose caspase indépendante.....	55
c) Conclusion.....	55
<b>2<sup>EME</sup> PARTIE : MORT CELLULAIRE DANS LE SYSTEME IMMUNITAIRE .....</b>	<b>57</b>
A) <i>Généralités</i> .....	57
1) L'immunité innée .....	57
2) L'immunité acquise.....	58
3) Relation entre immunité innée et immunité acquise .....	60
4) Profils Th1/Th2 .....	60
B) <i>Le lymphocyte T</i> .....	61
1) Le récepteur T .....	61
2) Activation lymphocytaire T .....	62
3) Les voies de signalisation associées au TCR .....	63
C) <i>Apoptose lymphocytaire T</i> .....	66
1) Apoptose des lymphocytes T matures.....	66
2) Apoptose induite par l'antigène : apoptose « active » ou AICD .....	67
3) Apoptose induite par la privation en lymphokines : apoptose « passive » .....	68
D) <i>Apoptose et sepsis</i> .....	71
1) Chez l'animal .....	71
2) Chez l'homme .....	72
E) <i>Une variabilité de la réponse infectieuse d'origine génétique</i> .....	72
1) Les Toll-like récepteurs.....	73
2) L'importance des polymorphismes génétiques.....	75
F) <i>Une voie de signalisation commune : NF-κB</i> .....	76
1) Rôle de NF-κB .....	76
2) NF-κB et sepsis .....	77
<b>3<sup>EME</sup> PARTIE : VERS DE NOUVELLES THERAPEUTIQUES DE L'INFECTION</b>	
<b>GRAVE.....</b>	<b>79</b>
1) Sepsis, coagulation et implication de la protéine C .....	79
2) Coagulation et protéine C activée .....	83

3) Protéine C activée recombinante et apoptose.....	85
4) Vers une sélection des patients traités par protéine C activée.....	85
OBJECTIFS DE NOTRE TRAVAIL .....	87
RÉSULTATS.....	91
<i>Article 1</i> .....	93
<i>Article 2</i> .....	101
<i>Article 3</i> .....	111
DISCUSSION.....	141
CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	155
BIBLIOGRAPHIE .....	159
ANNEXE.....	173



## Liste des tableaux et des figures

Figure 1 : Relation schématique entre le SIRS, le sepsis et l'infection. ....	21
Figure 2 : Probabilité de décès en fonction de la durée d'hospitalisation.....	22
Figure 3 : Cinétique d'évolution des principales cytokines pro-inflammatoires et des marqueurs de l'inflammation après un SIRS. ....	24
Figure 4 : Physiopathologie de la réponse immunitaire lors du choc septique. ....	26
Figure 5 : Structure des membres de la famille Bcl-2. ....	36
Figure 6 : Les principales voies d'activation extrinsèque de l'apoptose. ....	50
Figure 7 : Les deux voies principales d'induction de l'apoptose. ....	52
Figure 8 : Représentation schématique du récepteur T alpha/bêta.....	61
Figure 9 : Modèle de régulation de l'expression de FasL durant l'AICD des cellules T induite par le récepteur T.....	65
Figure 10 : Apoptose des lymphocytes T matures. ....	69
Figure 11 : Voie de signalisation des TLR.....	75
Figure 12 : Organisation du gène Bcl-2. ....	78
Figure 13 : La cascade de la coagulation.....	81
Figure 14 : Action de la rhPCA sur la modulation du SIRS, sur la coagulation et la réponse fibrinolytique de l'hôte contre l'infection.....	82
Tableau I : Etude de sous-groupes des essais PROWESS et ADDRESS. ....	84
Figure 15 : Séquençage d'un fragment de l'exon 4 du récepteur TLR-4. ....	98
Tableau II : Répartition des polymorphismes des récepteurs TLR-4 et TLR-2.....	99
Figure 16 : Mesure de l'IL-10 et du TNF-alpha avant et après traitement. ....	105
Figure 17 : Evolution du ratio IL-10 sur TNF-alpha. ....	106
Figure 18 : Evolution du taux d'IL-6 avant et après traitement. ....	107
Figure 19 : Evolution des sous-populations lymphocytaires entre le groupe contrôle et le groupe PCA. ....	108



## Liste des abréviations

AACP	American College of Chest Physicians
Act. D	Actinomycine D
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique Complémentaire
ADDRESS	ADministration of DRotrecogin alfa activated in Early stage Severe Sepsis
Ag	Antigène
AICD	Apoptosis Induced Cell Death
AIF	Apoptosis Inducing Factor
ANT	Adenine Nucléotide Translocator
APACHE II	Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II
APAF	Apoptosis Protease Activating Factor
ARN	Acide RiboNucléique
ATP	Adénosine TriPhosphate
BCR	B cell receptor
BH	Bcl-2 homology domain
BCL-2	B Cell Lymphoma 2
CARD	Caspase Recruitment Domain
CARS	Compensatory Anti-Inflammatory Response
CED	Caenorhabditis elegans death
CHX	Cycloheximide
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	Cellule présentatrice de l'antigène
CRP	Protéine C réactive
CYT	Cytochrome
DAG	Diacylglycérol
DD	Death Domain
DED	Death Effector Domains
EDTA	Acide éthylène diamine tétracétique
ENHANCE	Extended Evaluation of Recombinant Human Activated Protein
EPCR	Endothelial protein C receptor
ERK	Extracellular signal-regulated protein kinase

FADD	FAS-Associated Death Domain Protein
FASL	FAS Ligand
FLIP	FLICE Inhibitory Protein
GLD	Generalized Lymphoproliferation Disease
GPI	Glycosyl Phosphatidyl Inositol
HLA	Human leukocyte antigen
HMBS	HydroxyMethylBilane Synthase
ICAM	Intracellular Cell Adhesion Molecule
IL	Interleukine
IκB	Inhibitor of kappa B
INF- $\gamma$	Interferon gamma
IP3	Inositol 1,4,5 Triphosphate
IKK	IκB kinase
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine based Activation Motif
JNK	c-Jun NH2-terminal kinase
LOD	Logistic Organ Dysfunction
LPR	Lymphoprolifération
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	Leucine Rich Repeats
LTc	Lymphocyte T cytotoxique
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAPKK	MAP kinase kinases
MAPKKK	MAP kinase kinase kinases
MIF	Macrophage migration Inhibitory Factor
MOF	Multiple Organ Failure
NF-κB	Nuclear Factor kappa B
NK	Natural Killer
NO	Monoxyde d'azote
ORF	Open Reading Frame
PAF	Platelet Activating Factor
PAI1	Plasminogen Activator Inhibitor 1
PAR	Protease Activated receptor
PCA	Protéine C Activée

PCR	Polymerase Chain Reaction
PCT	Procalcitonie
PI	Phosphatidylinositol 4,5 biphosphate
PKC	Protéine kinase C
PT	Permeability Transition
PTPC	Permeability Transition Pore Complex
PTK	Protéine Tyrosine Kinase
PROWESS	PROtein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis
RasGRP	Ras guanyl-nucleotide-releasing protein
RING	Really Interesting New Gene
RHD	Rel Homology Domain
rhPCA	Protéine C Activée recombinante humaine
RT-PCR	Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction
SCCM	Society of Critical Care Medicine
SH2	Src homology 2
SLP-76	SH2-domain-containing leukocyte protein of 76 kDa
TAFI	Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor
TCR	T Cell Receptor
TGF	Transforming Growth Factor
TIM	TNF-receptor interacting motifs
TIR	Toll-Interleukine1 Receptor
TLR	Toll-like recepteurs
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNF-R	Tumor Necrosis Factor Receptor
tPA	Tissue Plasminogen activator
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
TRADD	TNFR-Associated Death Domain
TRAMP	TNF-like receptor apoptosis mediating protein
SAM	Sterile Alpha Motif
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
VDAC	Voltage Dependent Anion Channel



# Introduction

---

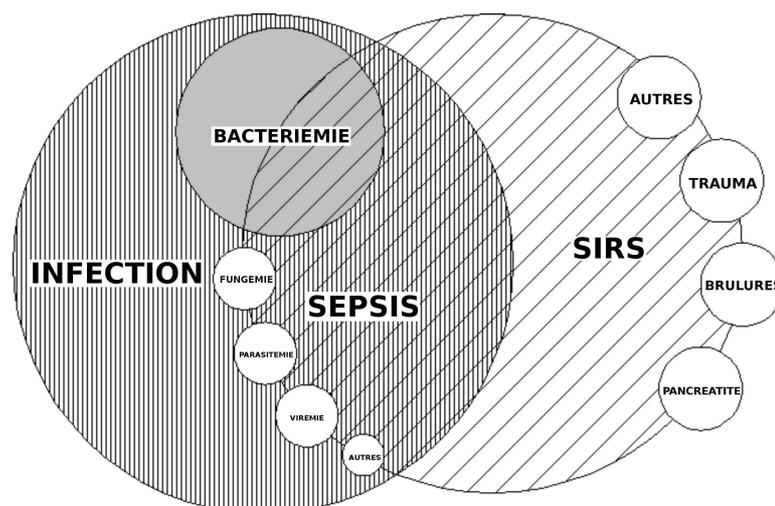


# Avant propos

Les syndromes infectieux graves font partie des principales causes de mortalité dans les services de réanimation. Leur incidence annuelle est estimée à 1 500 cas par million d'habitants dans les pays industrialisés. Leur mortalité avoisine 30 % en l'absence d'insuffisance circulatoire aiguë et atteint 40 à 90 % selon les études en présence d'un choc [1]. La conférence de consensus d'août 1991 [2] organisée à Chicago par l'American College of Chest Physicians (ACCP) et la Society of Critical Care Medicine (SCCM) et révisée sans changements majeurs en 2001 [3], a permis de réactualiser les définitions des syndromes infectieux et des infections graves en tenant compte de l'évolution des connaissances (cf. Annexe pour les définitions précises). Notamment, une mise au point de différents concepts a été faite, dont une définition du syndrome inflammatoire de réponse systémique (SIRS), de l'infection et du sepsis (cf. Figure 1).

**Figure 1 : Relation schématique entre le SIRS, le sepsis et l'infection.**

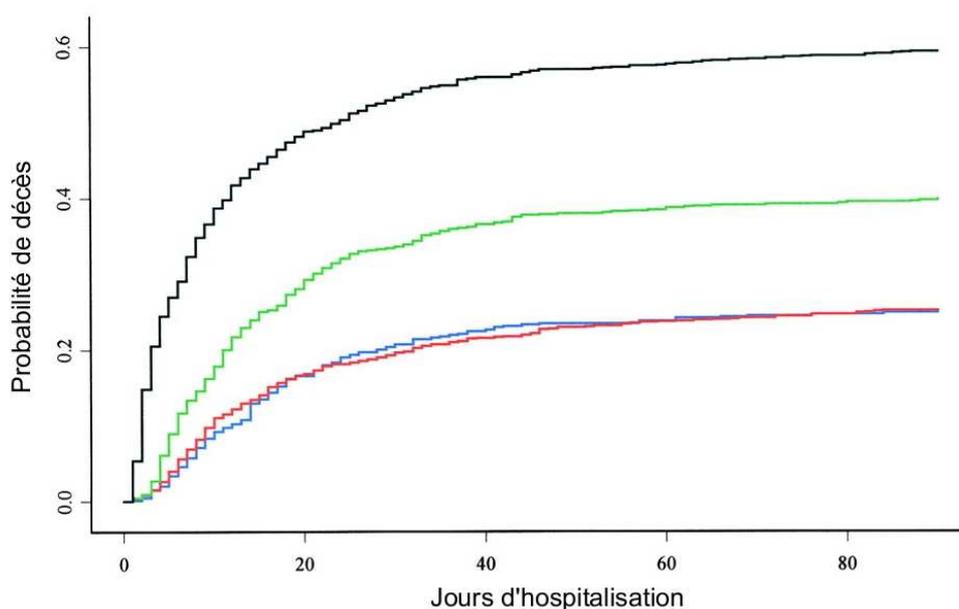
Ce schéma permet de visualiser les points communs entre les différents syndromes infectieux et les interactions possibles entre les différentes définitions posés lors de la conférence de consensus de l'ACCP/SCCM de 1992. Notamment, le SIRS peut être provoqué par d'autres événements inflammatoires que l'infection (brûlures, traumatismes, etc.). De plus, une infection n'est pas systématiquement associée à un SIRS, comme dans l'exemple des infections locales. Enfin, le sepsis est à l'intersection entre SIRS et infection et peut s'accompagner de passage de pathogènes dans le sang (bactériémie, fongémie, etc.). D'après [2].



A partir de cette conférence a été élaborée une définition clinique et biologique permettant une meilleure caractérisation de ces syndromes. Trois stades sont décrits en fonction de la gravité : le sepsis, le sepsis grave et le choc septique dont l'importance des symptômes est associée au risque de décès (cf. Figure).

**Figure 2 : Probabilité de décès en fonction de la durée d'hospitalisation.**

Chez les patients présentant initialement : un choc septique (ligne noire) ; un sepsis grave (ligne verte); un sepsis (ligne bleue) ; un syndrome de réponse inflammatoire systémique ou SIRS (ligne rouge). D'après [4].



Le choc septique succède au sepsis et au sepsis sévère dans le cadre d'un continuum nosologique : le sepsis associe infection et manifestations cliniques d'inflammation ; le sepsis sévère est caractérisé par l'apparition de la dysfonction d'un ou plusieurs organes (troubles de la conscience, oligoanurie, hypoxémie, etc.) chez un patient atteint de sepsis. Le choc septique correspond au sepsis sévère compliqué d'une hypotension persistante et réfractaire au remplissage vasculaire, nécessitant de ce fait un traitement vasopresseur physiopathologiques (cf. Figure 2).

Il constitue une insuffisance circulatoire aiguë qui est le témoin de la réponse inflammatoire systémique à une infection grave. La première modification hémodynamique est une vasodilatation, suivie d'une augmentation du débit cardiaque si l'hypovolémie est corrigée. La principale caractéristique de cette atteinte, en dehors d'un foyer infectieux initial, est la survenue d'une SIRS dont l'intensité varie d'un malade à l'autre. Lorsque le patient est incapable d'augmenter proportionnellement son débit cardiaque, la pression artérielle chute, conduisant à la

révélation clinique de l'état de choc. Ceci peut être le fait soit d'une hypovolémie persistante, soit d'une vasodilatation intense, soit d'une défaillance cardiaque, soit enfin d'une association de ces facteurs [5]. Ainsi, le choc septique se définit comme une hypotension persistante malgré une expansion volémique apparemment adaptée aux modifications de la volémie efficace et associée à des signes de dysfonction d'organes [6]. Le type de choc se caractérise par une distribution inappropriée du débit cardiaque qui aboutit à une inadéquation entre la consommation et les besoins en oxygène, source de défaillance multiviscérale.

Secondairement à la réponse inflammatoire de l'hôte peut se développer une défaillance multiviscérale appelée Multiple Organ Failure (MOF) [7] ou Multiple Organ Dysfunction Syndrome (MODS) dont la définition, basé sur le nombre d'organes défaillant ne fait toujours pas l'objet d'un consensus. Toutefois, le terme de défaillance correspond à un fonctionnement anormal d'un organe ou plus précisément à l'expression anormale d'un paramètre clinique ou biologique reflétant une des fonctions de l'organe [8]. Ce syndrome est caractérisé par différentes scores cliniques et biologiques, comme par exemple le Logistic Organ Dysfunction score [9].

La sévérité de ces réactions est associée au pronostic vital selon deux modalités. D'une part, plus la réaction inflammatoire est intense, plus l'insuffisance circulatoire qui l'accompagne est sérieuse et devient résistante aux traitements pharmacologiques classiques. D'autre part, plus cette réaction se prolonge, plus le risque de défaillance multiviscérale augmente [10].

Le but du traitement est d'inverser les processus physiopathologiques en restaurant un état hémodynamique satisfaisant et en assurant une ventilation efficace par une assistance ventilatoire appliquée précocement. Cette prise en charge symptomatique ne se conçoit que dans le cadre d'une stratégie étiologique menée parallèlement et nécessite une surveillance intensive qui ne se conçoit que dans des unités de réanimation [5]. Elle comprend dans l'ordre : le rétablissement d'une volémie efficace, la restauration d'une pression de perfusion suffisante et le maintien d'une oxygénation tissulaire adaptée aux besoins. [11].

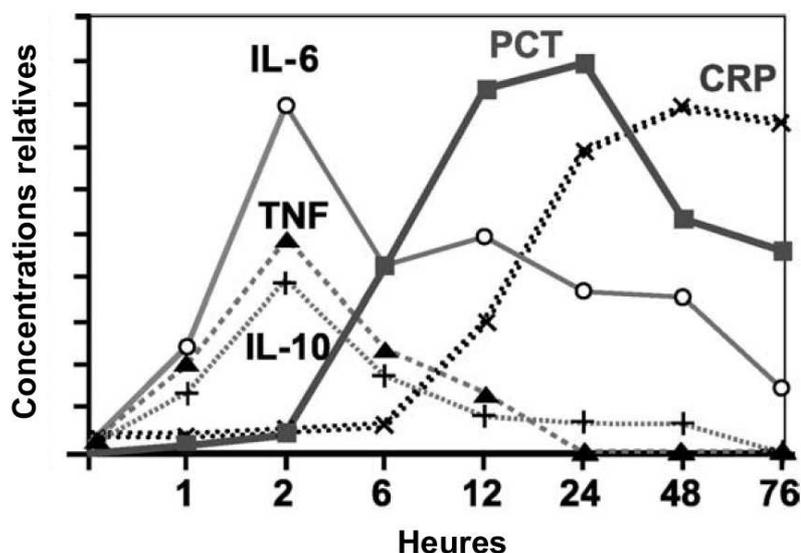
Une infection sévère, c'est-à-dire s'accompagnant d'un état de choc, de troubles de la conscience ou d'une oligoanurie, est en fait le résultat de l'activation de médiateurs dont la libération est déclenchée par la présence dans l'organisme de micro-organismes pathogènes. Ces médiateurs sont des cytokines, des sélectines, des dérivés membranaires et cellulaires [12], etc. La compréhension de la régulation de leur synthèse commence à être mieux appréhendée. Les avancées réalisées ces dernières décennies en terme de prise en charge des patients de réanimation, notamment grâce au soutien artificiel de certaines défaillances d'organes, ont modifié le pronostic de ces malades. Dans le passé, la mortalité des patients était principalement

attribuable à la pathologie ayant motivé l'admission en soins intensifs. Aujourd'hui c'est plus souvent le développement d'une réponse inflammatoire inadaptée qui semble être source de mortalité et de morbidité. D'importants efforts ont été réalisés pour, d'une part mieux comprendre la physiopathologie du sepsis et d'autre part proposer des solutions thérapeutiques.

Initialement, le sepsis a été considéré comme étant la mobilisation appropriée, mais inadéquate en terme d'intensité, des défenses immunitaires d'un organisme agressé par un agent infectieux virulent. Ceci a été corroboré par des données expérimentales rapportant des taux très élevés de cytokines pro-inflammatoires dans les sérums des patients [13]. Des études ultérieures ont permis de montrer qu'une inflammation du même type pouvait apparaître en absence d'infection [14]. Après la survenue d'un traumatisme ou d'une hémorragie, certains médiateurs relargués par les leucocytes pouvaient à eux seuls déclencher l'apparition des signes et symptômes mimant cette réponse infectieuse (cf. Figure 3).

**Figure 3 : Cinétique d'évolution des principales cytokines pro-inflammatoires et des marqueurs de l'inflammation après un SIRS.**

Le schéma représente l'évolution de chaque molécules en fonction du temps. L'échelle est relative à chaque protéines mesurées (cytokines en pg/mL ; procalcitonine (PCT) en ng/mL ; protéine C réactive (CRP) en mg/L). La cinétique d'apparition du TNF-alpha est de moins d'une heure, suivit par l'IL-10 et l'IL-6 qui atteignent leur pic en 2 heures. La CRP, principale protéine de l'inflammation, est synthétisée dès la 6<sup>ème</sup> heure et atteint sa concentration maximum en 48h. L'expression de la PCT, marqueur de l'origine infectieuse de l'infection qui est plus spécifique que la CRP, démarre vers la 2<sup>ème</sup> après le début de l'agression, avec un plateau de 6 à 12h. D'après [15].



De ces observations est né un premier modèle permettant d'expliquer ce type de réponse inflammatoire excessive : le SIRS excessif, c'est à dire une inflammation persistante et inappropriée en intensité après une agression, responsable de diverses atteintes survenant à distance du foyer lésionnel initial, du choc puis finalement de la défaillance multiple d'organes [6].

C'est à partir de ce concept d'inflammation excessive qu'ont été proposés par le passé de nombreux essais thérapeutiques, mettant en œuvre des molécules à propriétés anti-inflammatoires : corticoïdes à fortes posologies, anticorps anti Tumor Necrosis Factor (TNF), anticorps anti-endotoxine, anti-Platelet Activating Factor (PAF), anti Interleukine-1 (IL-1), anti récepteur à l'IL-1 (Ilra), etc. Lors de ces études, aucune amélioration de la survie n'a été constatée [16-20]. L'HA-1A, un anticorps monoclonal anti-endotoxine de bactérie Gram négatif, plus connu sous son nom de spécialité Centoxin<sup>®</sup>, s'est même avéré délétère lors d'une étude réalisée à la suite de son autorisation de mise sur le marché, provoquant une surmortalité chez les patients traités [21]. L'utilisation du Centoxin<sup>®</sup> a été suspendue en France et dans le monde le 21 janvier 1993. Mais malgré l'échec de ces différents essais, d'autres mécanismes impliqués au cours du sepsis et des états « sepsis-like » ont été caractérisés, permettant de concevoir d'autres modèles physiopathologiques [22].

A l'heure actuelle, il est admis qu'après une agression infectieuse sont produites des molécules pro-inflammatoires destinées à neutraliser et détruire les agents pathogènes [12]. Dans le même temps des molécules anti-inflammatoires seront synthétisées afin de circonscrire les lésions initiales et d'empêcher la diffusion de l'inflammation à l'ensemble de l'organisme [23]. Ainsi, en réponse à la phase initiale pro-inflammatoire (le SIRS), il existe une phase secondaire d'activation d'un système anti-inflammatoire limitant les effets néfastes de la réaction inflammatoire engendrée par l'agression septique. Cette phase secondaire est appelée Compensatory Anti-Inflammatory Response (CARS). Dès lors, il devenait logique d'envisager l'existence d'un déficit de cette activité anti-inflammatoire chez les patients dont la réponse inflammatoire persistait et qu'*a contrario* s'installait un véritable état d'immunoparalysie chez d'autres patients [24] (cf. Figure 4).

L'administration de molécules destinées à moduler l'inflammation doit tenir compte des différentes phases d'évolution du choc septique. Il semble évident qu'un traitement par des molécules à visée anti-inflammatoire peut être délétère chez des patients lors de la phase tardive d'immunoparalysie, alors que ces mêmes molécules seront bénéfiques à la phase initiale de SIRS excessif. Ceci explique probablement l'échec des essais cliniques visant à moduler l'inflammation

au cours du choc septique, les molécules administrées n'ayant probablement un effet bénéfique qu'à la phase initiale du sepsis.

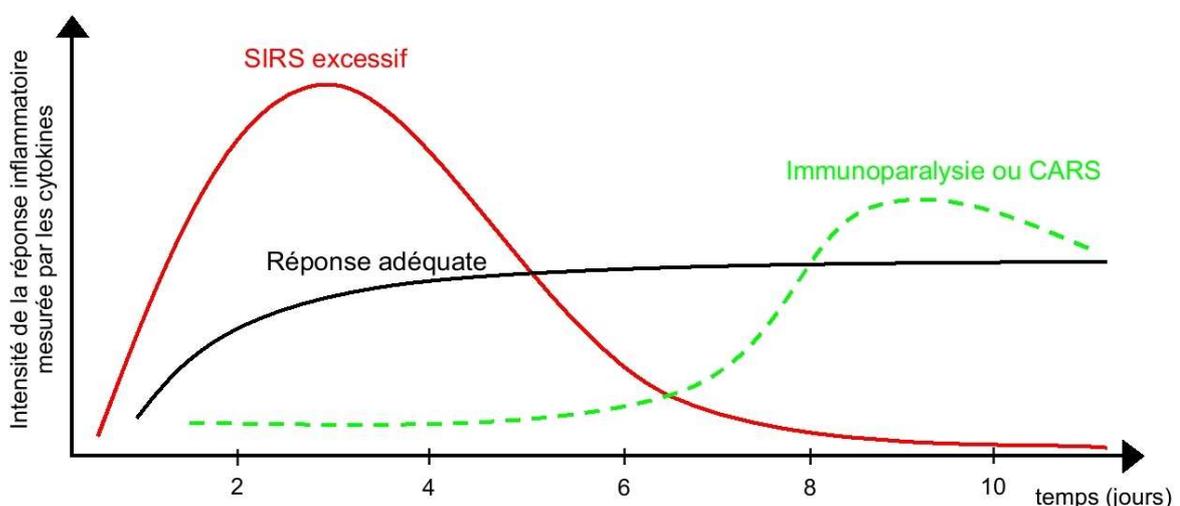
Or cette phase est relativement courte et variable selon les patients, de 24 à 96 heures et donc difficilement accessible chez des patients dont les médecins ne connaissent pas systématiquement le temps d'évolution de l'affection avant l'admission à l'hôpital. Il est probable que ces patients arrivent le plus souvent en phase d'immunoparalysie qu'en phase de SIRS excessif, ce qui expliquerait que les stratégies anti-inflammatoires sont sans effet voir même aggravent le pronostic. Il semblerait plus logique et plus facile d'administrer des molécules à la phase d'immunoparalysie, molécules qui pourront restaurer l'immunité des patients en modulant les mécanismes de mort cellulaire enclenchés dans la phase de SIRS.

Parmi les molécules et mécanismes permettant de restaurer l'homéostasie, nous pouvons citer certaines cytokines comme l'IL-6 ou l'IL-1 [23], l'anti-PAF [25] mais aussi l'élimination par apoptose [26] des cellules produisant les substances pro-inflammatoires. Ce mécanisme de mort cellulaire programmée supprime les cellules immunitaires activées au cours d'une agression de type septique mais concourt à l'immunoparalysie secondaire ainsi qu'à l'apparition de dysfonctions d'organes, par une extension des phénomènes apoptotiques à certains tissus sains [27-29].

#### Figure 4 : Physiopathologie de la réponse immunitaire lors du choc septique.

La ligne noire représente la réponse inflammatoire adéquate. Selon les études, la phase de SIRS excessif (ligne rouge) est responsable d'un tiers des décès alors que la phase d'immunoparalysie ou CARS (ligne verte) est responsable des deux autres tiers des décès.

D'après [30].



L'apoptose [31], est de plus en plus explorée dans le choc septique. L'hypothèse que l'exacerbation des processus apoptotiques au cours du choc septique puisse être responsable d'une élimination excessive des cellules immunocompétentes, plus particulièrement lymphocytaires, est soulevée depuis plusieurs années [32]. Ce mécanisme, qui permet d'expliquer l'immunodépression observée au décours d'un sepsis grave ou d'un choc septique, a été mis en évidence par des travaux expérimentaux chez l'animal et dans des travaux cliniques chez l'homme.

Après un rappel des voies de signalisation impliquées dans l'apoptose nous analyserons ensuite l'implication de cette mort cellulaire programmée sur le système immunitaire lors des infections graves, et plus particulièrement dans certaines sous-populations lymphocytaires. Enfin, après une revue des expériences faites sur des modèles cellulaires ou animaux et des observations réalisées chez l'homme concernant le choc septique, nous étudierons l'implication que peut avoir une nouvelle molécule aux propriétés anticoagulantes, la protéine C activée, dans la prise en charge des infections graves et dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques de ces syndromes septiques. Ensuite, nous présenterons nos travaux qui ont eue pour objectif de mieux caractériser les événements apoptotiques lors du choc septique chez l'homme, de mesurer les effets de la protéine C activée sur ces phénomènes de mort cellulaire et de caractériser les voies de signalisations impliquées.

# 1<sup>er</sup> partie : les voies de signalisation de l'apoptose

Même si sa description moléculaire n'a été que relativement récente [33], l'apoptose est un mécanisme fondamental et conservé dans l'évolution [34]. Ce mécanisme de régulation de l'homéostasie cellulaire [35] joue un rôle indispensable au développement des organismes vivants. Au cours de l'embryogenèse des organes, ce mécanisme permet par exemple l'involution des vestiges phylogéniques, le modelage des membres et la mise en place des grandes fonctions biologiques comme le système nerveux central [36] ou le système immunitaire [37]. En physiopathologie, l'apoptose est un mécanisme impliqué dans un grand nombre de maladies : néoplasiques (lymphomes, tumeurs solides [38]), auto-immunes (lupus, au cours duquel les lymphocytes auto-réactifs ne sont pas éradiqués [39]), syndromes d'ischémie-reperfusion [40], accidents vasculaires cérébraux, infarctus du myocarde [41] dégénératives (maladie d'Alzheimer [42], maladie de Parkinson [43]). Ce mécanisme de mort cellulaire propre s'oppose à celui de la nécrose qui est un mécanisme considéré comme une mort cellulaire désordonnée. Par opposition à la nécrose, l'apoptose est considérée comme une mort cellulaire ordonnée, procédant par différentes phases [31, 44]. En effet au cours de la nécrose, la perméabilité cellulaire est perturbée provoquant le gonflement de la cellule jusqu'à la rupture des membranes plasmiques. La lyse cellulaire entraîne la libération du contenu intracellulaire, l'ADN nucléaire va être dégradé de manière aléatoire par des endonucléases activées, ces fragments seront dépourvus d'extrémités 3' exposées. [45].

## A) Des évidences morphologiques et biochimiques

Les observations de Kerr et al. dans les années 1972 [31] ont permis de caractériser les critères morphologiques et biochimiques de l'apoptose :

- morphologiques, avec l'apparition d'une condensation de la chromatine et du cytoplasme, une fragmentation du noyau et la formation de protubérances à la surface cellulaire permettant la reconnaissance puis l'élimination des corps apoptotiques ainsi formés ;
- biochimiques, avec la fragmentation de l'ADN et le clivage protéolytique de nombreuses protéines intracellulaires par activation de protéases de type caspase.

Dans un premier temps les cellules en apoptose vont s'isoler des autres cellules par perte de contact. L'un des stades morphologiques caractéristiques de l'apoptose est l'importante condensation à la fois du noyau et du cytoplasme ce qui induit une diminution significative du volume cellulaire. La mitochondrie de la cellule apoptotique va subir plusieurs modifications

majeures : relargage du cytochrome c dans le cytoplasme [46], diminution du potentiel membranaire mitochondrial et de la transition de la perméabilité mitochondriale qui permet l'ouverture de pores spécialisés [47]. Le noyau se condense, puis la chromatine est clivée en fragments réguliers d'environ 180 paires de bases [48]. La membrane plasmique va bourgeonner et conduire à la formation de corps apoptotiques renfermant une partie du cytoplasme de la cellule. Afin de faciliter la reconnaissance des corps apoptotiques par les phagocytes, la cellule va signaler son état apoptotique à son environnement notamment grâce à un changement très précoce de localisation des molécules de phosphatidylsérines qui vont passer de la surface interne de la membrane (côté cytoplasmique) vers la surface externe (côté extracellulaire). La mort cellulaire programmée est un processus rapide se déroulant en quelques heures. L'un des points majeurs de l'apoptose est que l'intégrité de la membrane plasmique n'est jamais altérée au cours du processus, ce qui permet d'éviter tout déversement du contenu cellulaire, prévenant ainsi tout dommage infligé aux tissus alentour. Toutefois, il faut noter que l'inflammation n'est pas nécessairement totalement absente durant l'apoptose en raison du relargage de l'IL-1 et IL-18 dans l'environnement.

Plusieurs observations indiquent que l'apoptose est dépendante de la présence d'énergie, c'est à dire d'ATP. Ainsi des cellules Jurkat ou des cellules du tubule proximal de rein de souris privées totalement ou même partiellement d'ATP vont mourir par nécrose et non par apoptose. Cependant, certains événements apoptotiques, comme la fragmentation d'ADN, ne nécessitent aucune source d'énergie, contrairement au phénomène de condensation nucléaire [49].

## **B) Une mécanique moléculaire complexe**

La majeure partie de nos connaissances actuelles sur les mécanismes moléculaires de la régulation de l'apoptose provient de travaux menés sur le nématode *Caenorhabditis elegans* [50]. Ainsi, la sélection par mutagenèse chimique de larves présentant des défauts d'élimination des cellules au cours du développement a permis l'identification de 11 gènes impliqués dans la régulation de la mort cellulaire programmée chez *C. elegans*.

Parmi ces 11 gènes, 3 furent identifiés comme des régulateurs-clé de l'apoptose dans toutes les cellules somatiques : il s'agit de ced-3, ced-4 et ced-9 (ced pour *Caenorhabditis elegans* death). Ced-3 et ced-4 sont tous les deux nécessaires au déclenchement des mécanismes de mort cellulaire. En effet, une mutation conduisant à une inactivation de l'un ou l'autre de ces gènes aboutit au blocage de l'apoptose dans chacune des 131 cellules somatiques du ver. Ced-9, pour sa part, a une fonction antagoniste de ced-3 et ced-4 en ce sens qu'il est capable de promouvoir la survie. Ainsi

une perte partielle de fonction de ced-9 est létale, par exacerbation de la mort cellulaire, alors qu'un gain de fonction de ced-9 conduit à un excès de prolifération cellulaire. Le clonage de ces différents gènes a révélé que :

- ced-3 code pour une protéase à cystéine homologue à l'enzyme de conversion de l'IL-1b (ICE, maintenant désignée comme caspase 1) [51].
- ced-4 code pour une protéine ayant des homologies avec la protéine humaine Apoptosis Protease Activating Factor 1 (APAF-1) [52].
- ced-9 code pour une protéine homologue à la protéine anti-apoptotique B Cell Lymphoma 2 (Bcl-2) préalablement identifiée chez l'homme [53].

Il a été démontré que Ced-4 est capable d'interagir à la fois avec Ced-3 et Ced-9 [54]. Ce résultat rend bien compte des différents niveaux de régulation entre ces protéines et leurs homologues chez les mammifères, où le mécanisme d'apoptose est gouverné par deux voies principales d'activation :

- une voie dite extrinsèque, impliquant des récepteurs appartenant à la superfamille des récepteurs au TNF ,
- une voie dite intrinsèque mettant particulièrement en jeu la mitochondrie ; cette voie est gouvernée par des protéines appartenant à la superfamille de Bcl-2.

Ces deux voies conduisent à l'activation de protéases à cystéine appelées caspases, responsables des phénomènes morphologiques et biochimiques observés : exposition de phosphatidylsérine à la surface de la membrane cellulaire, arrêt de la réplication, fragmentation du noyau et du cytosquelette entraînant la formation de corps apoptotiques phagocytés par les cellules environnantes.

## C) Les acteurs de l'apoptose

Deux voies principales d'activation de l'apoptose sont actuellement décrites :

une voie dite extrinsèque, impliquant des récepteurs appartenant à la superfamille des récepteurs de mort cellulaire, dont le principal représentant est le TNF

- une voie dite intrinsèque mettant particulièrement en jeu la mitochondrie.

### 1) Les récepteurs de mort cellulaire

Il existe une famille de récepteurs spécialisés dans l'induction de la mort cellulaire programmée : les récepteurs de mort. Une fois stimulés, ces récepteurs induisent l'activation des caspases [55]. Cette voie est impliquée dans l'élimination des cellules potentiellement dangereuses pour l'organisme et notamment les lymphocytes autoréactifs. Les récepteurs de mort appartiennent à la famille des récepteurs du TNF (TNF-R) [56]. Ces récepteurs extracellulaires peuvent être classés en 3 groupes.

Un premier groupe comprend :

- DR 1 correspond à CD95 ou Fas (Apo1)
- DR2 correspond au récepteur au TNF- $\alpha$  (TNF R1)
- DR3 correspond au TNF-like receptor apoptosis mediating protein (TRAMP)
- DR4 correspond au TNF-related apoptosis inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1) mais comprend également DR5 (TRAIL-R2), DcR2 (TRAIL-R4) et l'ectodysplasin receptor (EDAR).

Le second groupe comprend :

- TNFR1, CD27, CD30, CD40, LT $\beta$ R, OX40, 4-1BB, BAFFR, B-cell maturation antigen (BCMA), receptor activator of NF- $\kappa$ B, transmembrane activator and calcium-signal modulating cyclophilin ligand interactor, Fn14, herpes virus entry mediator, activation induced TNF-receptor, X-linked EDA-A2 receptor et les membres de la famille du TNFR contenant des TNF-receptor associated factor et des TNF-receptor interacting motifs (TIMs) dans leur domaine cytoplasmique.

Le troisième groupe comprend TRAIL-R3 (DcR1), DcR3 et l'osteoprotégerin. Ils ne contiennent pas de motifs TIMs dans leur domaine cytoplasmique mais entrent en compétition avec les récepteurs du groupe 2.

Dans ce travail nous ne nous intéresserons qu'aux récepteurs et aux ligands du groupe 1.

## a) Structures

Les récepteurs du groupe 1 sont des protéines transmembranaires de type 1 possédant dans leur domaine extracellulaire une à six régions riches en cystéines impliquées dans la liaison du ligand [56]. Les récepteurs de mort possèdent dans leur partie intracellulaire une région conservée d'environ 80 acides aminés appelée domaine de mort cellulaire (« Death Domain » ou DD) impliquée dans l'activation de la voie des caspases par le recrutement d'un complexe protéique dont un des facteurs est appelé FAS-Associated Death Domain Protein (FADD) ou TNFR-Associated Death Domain (TRADD). Le DD a été conservé au cours de l'évolution. Ainsi un domaine homologue est retrouvé dans le produit du gène Reaper impliqué dans la régulation de la mort cellulaire programmée au cours de l'embryogenèse normale chez la drosophile [57].

Le prototype des récepteurs de mort est Fas (CD95/APO-1) dont le ligand est Fas ligand (FasL). Il est exprimé à la surface de nombreux types cellulaires. La stimulation de Fas par son ligand physiologique ou par un anticorps anti-Fas, va induire son oligomérisation et le recrutement, par l'intermédiaire de son domaine de mort cellulaire d'un certain nombre de protéines impliquées dans la transduction du signal apoptotique.

## b) Ligands

La famille des ligands du TNF comprend une quinzaine de membres (TNF- $\alpha$ , FasL, CD30L, TRAIL, lymphotoxine, etc.) [58]. Ces ligands sont, en grande majorité, des protéines transmembranaires de type II, qui présentent donc leur extrémité C-terminale du côté extracellulaire. Le domaine extracellulaire est composé d'environ 150 acides aminés et possède 20 à 25 % d'homologie avec les autres membres de la famille du TNF. Certaines de ces protéines, telles que FasL et TNF- $\alpha$ , existent également sous forme circulantes.

## c) Invalidation génique

L'invalidation génique permet de mieux cerner la fonction de certains membres de la famille du TNF [59].

### FAS

Il existe à l'état naturel des souris déficientes pour Fas : les souris lpr/lpr (lymphoprolifération). Elles souffrent d'une lymphoadénopathie, d'une splénomégalie et produisent une quantité accrue d'IgM et d'IgG [60]. Deux types de modifications du gène ont été mises en évidence. La première conduit à l'absence d'expression de Fas, la seconde consiste en une mutation ponctuelle dans le DD de Fas qui remplace l'isoleucine 225 par une asparagine et qui rend le récepteur incapable

d'interagir avec la protéine FADD et donc d'induire la mort. L'apoptose médiée par Fas et TNF-RI, n'est modifiée ni par la présence d'inhibiteur de la synthèse d'ARN ni de celles de protéines [61]. De plus, des cellules sans noyau peuvent enclencher un programme de mort cellulaire après stimulation du récepteur Fas [62]. Il existe également des souris possédant un FasL non fonctionnel : les souris *gld* (generalized lymphoproliferation disease). Chez ces souris, FasL présente une mutation ponctuelle qui empêche sa liaison à son récepteur [63]. Le phénotype de ces souris est analogue à celui des souris *lpr/lpr* [60]. Enfin, en ce qui concerne le sepsis, l'inactivation de Fas réduit les défenses contre l'infection à *L. monocytogenes* [59].

### **TNF-RI**

Les souris invalidées pour le TNF-RI sont viables mais certains organes lymphoïdes comme les plaques de Peyer ou les ganglions lymphatiques sont absents. Elles présentent une sensibilité accrue aux infections par des bactéries intracellulaires, malgré une production d'espèces radicalaires comparables aux souris sauvages. Ces souris sont également très sensibles aux infections par les mycobactéries ou certains parasites. Toutefois les souris invalidées pour les TNFR sont insensibles au choc endotoxinique induit par plusieurs toxines bactériennes dont le lipopolysaccharide (LPS), bien que l'inactivation du TNFRI ne les protège pas contre une péritonite induite expérimentalement [59].

### **TNF-RII**

Les souris invalidées pour le TNF-RI sont viables et ne présentent pas de défaut de développement du système immunitaire. On retrouve également une susceptibilité accrue aux bactéries à développement intracellulaire [59].

### **TNF- $\alpha$**

Les souris invalidées pour le TNF- $\alpha$  sont viables mais présentent les mêmes troubles du développement du système immunitaire que les souris invalidées pour le TNF-RI. En plus de la sensibilité accrue aux agents pathogènes intracellulaires, ces souris sont plus sensibles aux infections par *S. aureus* [59].

### **TNF- $\beta$**

Les souris invalidées pour le TNF- $\beta$  présentent des caractéristiques similaires à celles invalidées pour le TNF- $\alpha$  [59].

## **TRAIL-R1**

Les souris invalidées pour TRAIL-R1 sont viables et présentent un développement normal. La fonction de TRAIL-R1 ne semble donc pas être indispensable au développement. Toutefois des expériences de carcinogenèse induite montrent que les défenses anti-tumorales sont réduites chez ces souris. De plus, il semble que TRAIL-R1 soit impliqué dans le métabolisme osseux, en particulier dans l'induction de ce métabolisme lors d'infections expérimentales [59].

## **FADD**

L'importance du FADD et son rôle central dans l'apoptose ont été renforcés par l'étude des souris invalidées pour ce gène. Les souris FADD<sup>-/-</sup> meurent au cours du développement embryonnaire. Elles présentent des malformations cardiaques majeures ainsi qu'une prédisposition aux hémorragies [64]. Le phénotype de ces souris est similaire à celui des souris caspase 8<sup>-/-</sup>. Les fibroblastes de souris FADD<sup>-/-</sup> sont insensibles à la surexpression de Fas, TNF-RI ou DR3 alors que des drogues anticancéreuses ainsi que l'expression de certains proto-oncogènes vont aboutir à leur élimination par apoptose.

### **d) En résumé**

L'invalidation d'une des familles des ligands du TNF ne protège pas la cellule contre l'apoptose, les systèmes de suppléance étant suffisamment nombreux pour pallier un défaut de signalisation d'une des voies. Toutefois ces invalidations conduisent le plus souvent à une sensibilité accrue aux infections à germes à développement intracellulaire et parfois à des malformations ou des déficits du système immunitaire. En revanche l'invalidation des DD est critique pour le développement embryonnaire et la transduction du signal.

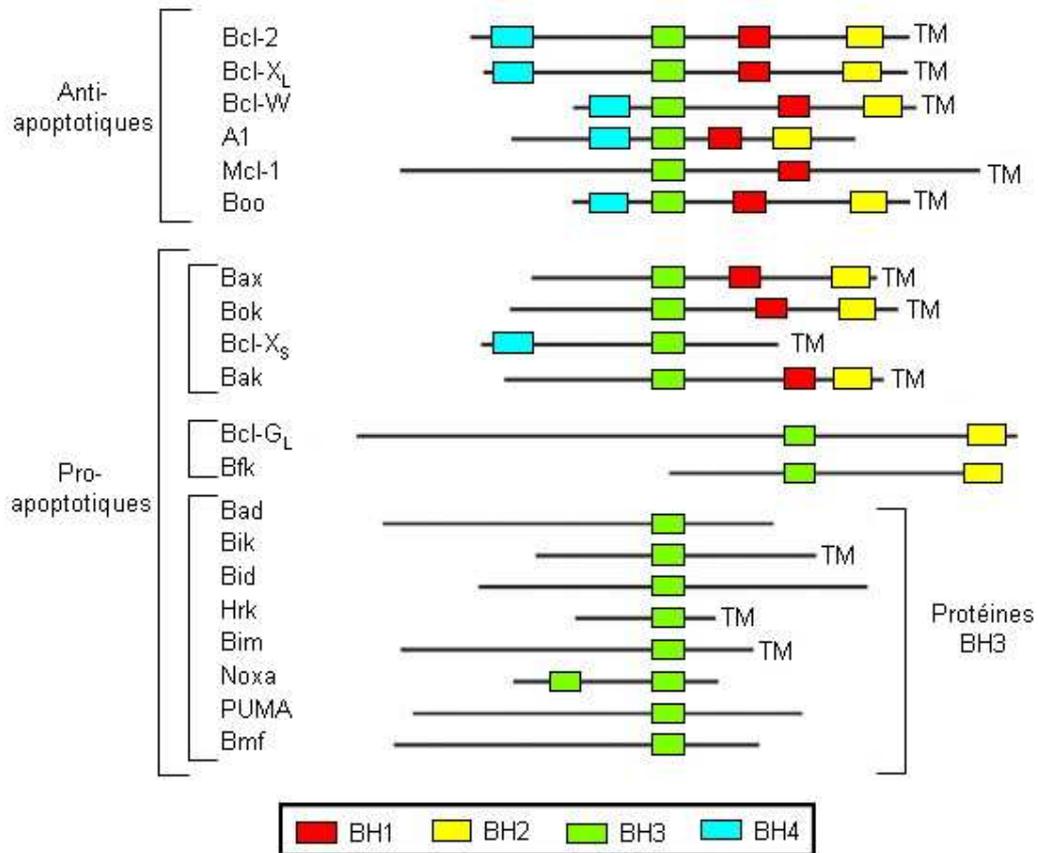
## 2) La famille de Bcl-2

Les homologies de séquence et de fonctions entre Ced-4 et Bcl-2 semblent indiquer que les protéines de la famille Bcl-2, tout comme Ced-4, jouent un rôle majeur dans la régulation des caspases et plus généralement de l'apoptose. La translocation t(14,18) retrouvée dans les lymphomes folliculaires de type B a conduit à l'identification de Bcl-2 chez l'homme [53]. La surexpression de Bcl-2 permet de bloquer l'apoptose induite par de nombreux stimuli (dommages de l'ADN, irradiations, expression de proto-oncogènes, glucocorticoïdes, etc.) [65].

### a) Structures

Cette famille se caractérise par la présence de domaines BH 1 à 4 (Bcl-2 homology domain) [66]. En se référant à leur fonction biologique et à la distribution des domaines BH, il est possible de classer les membres de la famille Bcl-2 en trois classes :

- les membres anti-apoptotiques comme Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl1, Boo, etc. présentent des homologies de séquence dans les domaines BH 1, 2, 3 et 4. Il est à signaler toutefois que certains de ces membres ne possèdent pas de domaines BH4 ;
- les membres pro-apoptotiques comme Bax, Bak, Bad, Bok/Mtd, Diva, etc. présentent des homologies dans les séquences des domaines BH1, 2 et 3 mais pas ou peu dans les séquences BH4 ;
- les membres n'ayant qu'un seul domaine BH3. Ce sont des protéines pro-apoptotiques telles que Bik/Nbk, Hrk, Bim, Blk, Bid, Noxa, Puma, BNIP3, etc. Elles présentent des homologies de séquence mais uniquement dans leur domaine BH3 [67](cf. Figure 5).



**Figure 5 : Structure des membres de la famille Bcl-2.**

Représentation schématique des membres de la famille de Bcl-2 selon leur fonction pro ou anti-apoptotique et la présence des différents domaines BH. D'après [67].

## b) Relation structure/activité

Tous les membres de la famille Bcl-2, à l'exception de Bad et Bid, possèdent un domaine transmembranaire qui leur permet d'être localisés dans la membrane mitochondriale, le réticulum endoplasmique ou la membrane nucléaire externe [68-70]. Certains membres de la famille semblent avoir la capacité de former des pores. Ainsi, la structure tridimensionnelle de Bcl-XL s'est révélée être similaire à celle du domaine formant des pores de certaines toxines bactériennes telles que la toxine diphtérique et les colicines [71]. En fait, il a été montré que les molécules anti-apoptotiques Bcl-XL [72] et Bcl-2 [73-75] et la protéine pro-apoptotique Bax [73, 75], pouvaient former des canaux ioniques en s'insérant dans des membranes lipidiques. Le canal ionique généré par Bcl-2 présente une conductance optimale à pH acide ainsi qu'une préférence pour des cations monovalents comme K<sup>+</sup> et Na<sup>+</sup> [73-75]. Le canal formé par Bcl-XL est sélectif des cations à pH physiologique mais perd cette sélectivité à pH acide [72]. En revanche, Bax forme un canal plutôt spécifique des anions et peu sensible au pH [73, 75].

BAR, un membre anti-apoptotique de la famille, qui a été identifié par le groupe de John Reed, présente une structure originale. Il se compose de quatre domaines : un domaine RING (Really Interesting New Gene), un domaine SAM (Sterile Alpha Motif), un Domaines Effecteurs de Mort Cellulaire (Death Effector Domains : DEDs) suivi d'un domaine trans-membranaire [76]. Le domaine SAM est requis pour l'interaction de BAR avec Bcl-2 et Bcl-XL et pour l'inhibition de l'apoptose induite par Bax. Les DEDs sont des structures permettant la liaison de la caspase aux molécules adaptatrices FADD [77] ou TRADD [78]. Ces DEDs lui permettent d'interagir avec les procaspases et ainsi d'abolir la mort cellulaire induite par Fas. En fait, BAR est capable de former un complexe comprenant la procaspase 8 et Bcl-2. Les auteurs suggèrent que BAR entreraient en compétition avec les protéines adaptatrices, tel que FADD, pour la liaison aux procaspases 8 et 10 [79].

### **c) Invalidation génique**

L'invalidation génique donne des indications sur la fonction de chaque membre de la famille de Bcl-2 et renseigne sur leur implication dans les mécanismes liés à la réponse à l'infection [80].

#### **BAX**

Les souris Bax<sup>-/-</sup> sont viables, indiquant donc que Bax n'est pas essentiel pour le développement de l'organisme [81]. Les souris mâles invalidées pour Bax sont stériles en raison d'une exacerbation des phénomènes apoptotiques au niveau des cellules germinales. Les ovaires des souris Bax<sup>-/-</sup> présentent un excès cellulaire dans les follicules primaires consécutif à un défaut d'apoptose. De plus, les neurones isolés à partir de ces souris Bax<sup>-/-</sup> peuvent proliférer en absence de facteur de croissance. Bien que les neurones expriment la plupart des membres de la famille Bcl-2, il semble que la mort induite par la privation en facteur de croissance soit strictement dépendante de Bax [82].

#### **BAK**

Le phénotype des souris invalidées pour Bak est très proches de celui de Bax. Ces protéines pro-apoptotiques sont essentielles au développement normal des souris, l'invalidation de Bak conduit également à de multiples malformations [83]. L'invalidation conjointe de Bax et Bak protège les cellules hématopoïétiques de l'apoptose induite par privation en facteurs de croissance [84].

## **BCL-2**

Les souris invalidées pour le gène de Bcl-2 sont viables. Cependant la majorité d'entre elles meurent quelques semaines après la naissance. Les souris Bcl-2<sup>-/-</sup> développent une insuffisance rénale sévère par une déficience du nombre de néphrons formés [85-87]. De plus, les souris deviennent grises à l'âge de 5 ou 6 semaines, période qui correspond au deuxième cycle des follicules pileux. Cette hypopigmentation reflète la diminution de la survie des mélanocytes [85-87]. Bien que les souris Bcl-2<sup>-/-</sup> présentent une différenciation normale des lignages T et B, elles sont incapables de maintenir l'homéostasie du système immunitaire. Le thymus et la rate subissent une apoptose massive quelques semaines après la naissance des souris [85, 86].

En définitive il semble que Bcl-2 joue un rôle mineur dans la différenciation des cellules T au cours du développement (cellules immatures) mais un rôle central dans la survie de la population de lymphocytes T matures à l'âge adulte.

## **BCL-X**

L'inactivation du gène Bcl-X est létale au jour 13 de développement embryonnaire [88]. Les souris Bcl-X<sup>-/-</sup> présentent une apoptose massive au niveau du cerveau, de la moelle épinière et du thymus. L'effet létal de l'inactivation de ce gène est probablement dû à la mort cellulaire massive des cellules hématopoïétiques et des neurones [88]. Contrairement à Bcl-2, la fonction de Bcl-X semble être capitale pour la survie des lymphocytes immatures.

En définitive, il apparaît que Bcl-2 et Bcl-X régulent de manière séquentielle la mort cellulaire au cours du développement des lymphocytes.

## **BCL-W**

Les souris Bcl-w<sup>-/-</sup> sont viables [89]. Alors que les femelles possèdent des fonctions reproductrices normales, les mâles sont infertiles. Les testicules se développent normalement mais la maturation des spermatozoïdes ne peut se faire jusqu'à terme en raison de la présence d'un grand nombre de cellules apoptotiques au niveau du tube séminifère.

## **BIM**

Les protéines Bim sont sans doute les plus complexes des protéines BH3 car on compte 18 isoformes résultantes d'épissage alternatif [90], variant selon l'espèce et le type cellulaire. Cependant, trois isoformes sont plus communes : BimEL, BimL et BimS. Les souris invalidées pour Bim présentent des malformations touchant essentiellement le système immunitaire, avec

un accroissement du nombre des cellules B et T, des macrophages, des organes lymphoïdes, etc. [91] L'inactivation de Bim protège ces souris d'un sepsis expérimental. La mortalité de ces souris est considérablement réduite par rapport aux souris sauvages et l'inactivation de Bim protège totalement les thymocytes et les splénocytes contre l'apoptose induite [80]. Cette protection est associée à un taux d'IL-6 et d'IL-10 réduit par rapport aux souris sauvages.

## **BID**

Les souris invalidées pour Bid ne présentent pas de phénotype particulier. Seul quelques tissus semblent plus résistants à l'apoptose induite par Fas, dont les hépatocytes [92]. Les souris invalidées pour Bim sont protégées d'un sepsis expérimental mais en revanche la réduction de l'apoptose des thymocytes est plus réduite (de l'ordre de 30%). Comme pour les souris Bim-/- cette protection est associée à un taux d'IL-6 et d'IL-10 réduit par rapport aux souris sauvages. La mortalité suite à l'induction d'un sepsis expérimental est également réduite par rapport aux souris sauvages [80].

## **NOXA**

Les souris invalidées pour Noxa ne présentent pas de phénotype particulier ni de malformations [93]. Les mécanismes apoptotiques sont maintenus dans les cellules de ces souris, à l'exception des fibroblastes embryonnaires qui présentent une résistance accrue aux dommages de l'ADN induits par les radiations ou les agents de chimiothérapie. Les souris invalidées pour Noxa ne sont pas protégées d'un sepsis expérimental [80].

## **PUMA**

Comme pour les souris Noxa-/-, les souris invalidées pour Puma ne présentent pas de phénotype particulier ni de malformations [93]. Toutefois, à la différence des souris Noxa-/-, de nombreux tissus présentent une résistance accrue aux dommages de l'ADN induits par les radiations ou les agents de chimiothérapie. Ces souris sont également protégées d'un sepsis expérimental mais en revanche la réduction de l'apoptose des thymocytes est de l'ordre de 50 % [80].

### **d) En résumé**

L'inactivation des gènes de la famille de Bcl-2 a des conséquences variables. Seul Bcl-X est indispensable au développement embryonnaire des souris. Toutefois les invalidations de Bax/Bak, Bcl-2, Bcl-w, si elles ne sont pas létales, conduisent toutes à des malformations

touchant des organes différents (cerveau, gamète, rein, organes lymphoïdes etc.). Il est intéressant de noter que Bcl-2, Bcl-X et Bim semblent jouer un rôle critique dans la maturation du système immunitaire. En revanche Bcl-2, Noxa, Puma, Bid semblent plutôt jouer un rôle dans la fonction du système immunitaire des souris matures.

### **3) Les caspases**

Comme nous l'avons déjà noté, ced-3 code pour une protéase à cystéine homologue à ICE [94]. Les protéases pro-apoptotiques sont des protéases à cystéine qui possèdent une spécificité stricte de clivage de leurs substrats après un résidu d'acide aspartique. La nomenclature proposée par Alnemri et al. [95] regroupe les protéases pro-apoptotiques sous le nom de caspases. Le « c » représente la cystéine du centre actif (QACxG) et le suffixe « aspase » définit la spécificité stricte de clivage des substrats de cette famille de protéases après un acide aspartique. L'ICE, qui fut chronologiquement la première caspase caractérisée, a été rebaptisée caspase 1.

#### **a) Structures**

Toutes les caspases ont une structure très conservée comprenant, un prodomaine N-terminal de taille variable, un domaine qui deviendra après clivage la grande sous-unité (17-21 kDa, qui porte le centre actif) et un domaine qui deviendra après clivage la petite sous-unité (10-14 kDa). Les prodomaines sont variables, à la fois dans leur taille et dans leur séquence. Ainsi les caspases 3, 6 et 7 ont un petit prodomaine alors que les caspases 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12 et 13 possèdent un grand prodomaine. Les caspases à petit prodomaine sont souvent regroupées sous le nom de caspases effectrices. Ces caspases sont activées par des caspases dites initiatrices. Les prodomaines semblent jouer un rôle dans les interactions protéines-protéines. Ainsi les prodomaines des caspases 8 et 10 contiennent des DEDs permettant la liaison de la caspase aux molécules adaptatrices FADD [77] ou TRADD [78]. Certaines autres caspases (caspases 1, 2, 4 et 9) possèdent un Domaine de Recrutement des Caspases (Caspase Recruitment Domain : CARD [96]). Ces domaines CARDS jouent un rôle dans l'interaction entre caspases ainsi qu'avec une grande variété de molécules adaptatrices ou régulatrices.

#### **b) Activation**

La conversion de la caspase à l'état de zymogène en une enzyme mature nécessite au moins deux clivages au niveau de liaison Asp-X. Ces clivages successifs ont lieu de manière séquentielle : tout d'abord il y a coupure entre la grande et la petite sous-unité (donc libération de la petite sous-unité du reste de la molécule) puis libération du prodomaine [97]. La caspase s'assemblera sous sa

forme active, qui est composée de deux grandes et de deux petites sous-unités. Les caspases vont pouvoir s'auto-activer et/ou être activées par d'autres caspases, conduisant à des cascades d'activation. Ainsi, ces caspases initiatrices activées cliveront à leur tour d'autres caspases à l'état de zymogène, en particulier les caspases effectrices. Ce type d'activation en cascade permet à la fois de réguler et d'amplifier le signal de mort.

### **c) Substrats**

Le rôle des caspases est principalement exécutif : elles vont bloquer les voies protectrices et dans le même temps activer les voies de signalisation participant à la mort cellulaire. Les caspases sont des enzymes extrêmement sélectives. Les protéines cibles doivent impérativement posséder un aspartate en position P1 [97]. Cet aspartate sera niché dans une poche et sera ainsi aligné avec Arg179, Gln283, Arg341 et Ser347 (numérotation correspondant à la caspase 1). Cette structure est conservée chez toutes les caspases humaines à l'exception de Ser347 remplacée par une Thr dans la caspase 8.

Les protéines cibles des caspases regroupent des diverses protéines : des protéines cytoplasmiques, nucléaires, des protéines impliquées dans le métabolisme et la réparation de l'ADN, des protéines kinases, des protéines impliquées dans la transduction du signal et dans l'expression de gènes, dans la régulation du cycle cellulaire, la prolifération ou la régulation de l'apoptose, etc.

Enfin, il faut noter que certains substrats ne sont pas clivés dans tous les types cellulaires. L'actine, par exemple, est clivée dans la lignée myélomonocytaire U937 [98], dans les neurones et dans les thymocytes [99] mais pas dans les autres types cellulaires durant l'apoptose [100]. De plus, certains substrats sont clivés à des sites différents selon le type cellulaire. Ainsi, la topoisomérase I a un profil de clivage différent selon qu'il s'agit de cellules de cancer de poumon ou de cellules de cancer du sein [101]. Cette hétérogénéité pourrait soit refléter l'activation de caspases différentes, soit des variations dans l'accessibilité des substrats par les protéases, soit plus probablement une combinaison de ces deux possibilités.

### **d) Invalidation génique**

Etant donné le grand nombre de caspases ainsi que l'absence d'inhibiteurs réellement sélectifs d'une caspase donnée, l'implication individuelle de ces protéases pro-apoptotiques dans la mort cellulaire programmée n'a pu être étudiée jusqu'à présent qu'en générant des animaux déficients

pour l'expression de certaines d'entre elles. Nous ne parlerons que de l'invalidation des caspases 1, 2, 3, 8, 9, 11 et 12.

### **Caspase 1 et 11**

Les souris caspase 1<sup>-/-</sup> et caspase 11<sup>-/-</sup> présentent un développement normal [102]. Cependant, elles présentent une production défectueuse d'IL-1 $\alpha$  et  $\beta$ , d'IL-18 et d'INF- $\gamma$ . De plus, elles présentent une résistance accrue au choc septique. En fait, il semble bien établi que la caspase 1 joue un rôle dans la régulation du système immunitaire mais pas ou peu dans les voies apoptotiques [103] ; enfin, la caspase 1 est activée par une interaction directe avec la caspase 11 (caspase murine) [102]. La caspase 11 présente des homologues avec les caspases humaines 4 et 5.

### **Caspase 2**

Les souris caspase 2<sup>-/-</sup> présentent un développement normal jusqu'à l'âge adulte et ne présentent aucune malformation sévère [104]. En revanche, la caspase 2 semble être requise pour la mort des cellules germinales femelles. De plus, les ovocytes de ces souris présentent une résistance à l'apoptose induite par des agents de chimiothérapie. A la naissance, les souris déficientes présentent une diminution du nombre de motoneurones faciaux. Ceci nous indique que la caspase 2 n'agit pas simplement comme un effecteur positif de l'apoptose mais qu'elle est aussi capable, selon le type cellulaire, de retarder la mort cellulaire. Cette différence pourrait s'expliquer par la présence de deux formes de caspase 2 obtenues par épissage alternatif. Ainsi, il a été montré que Casp2L (Long) induit l'apoptose alors que Casp2S (Small) inhibe l'apoptose [105]. Enfin, les lymphoblastes B de souris caspase 2<sup>-/-</sup> sont plus résistants à l'action combinée de la perforine et du granzyme B mais ne présentent pas de sensibilité moindre à l'apoptose induite par un anticorps anti-Fas, l'étoposide, la staurosporine ou les rayonnements gamma.

En définitive, la caspase 2 est probablement essentielle pour l'apoptose des cellules germinales femelles mais elle peut toutefois, dans certaines situations, avoir un effet protecteur contre l'apoptose. De plus, l'action de la caspase 2 semble être dépendante du type cellulaire, du stade de développement, de l'épissage de son ARNm ainsi que de la présence ou de l'absence d'autres caspases.

### **Caspase 3**

Les souris invalidées pour la caspase 3 furent les premières à présenter des profonds bouleversements de l'apoptose [106, 107]. Elles sont plus petites que les souris sauvages et meurent entre la première et la troisième semaine de vie. De manière surprenante, il s'est avéré que le phénotype de ces souris est extrêmement restreint. En effet, les anomalies les plus marquées semblent sélectivement localisées au niveau du système nerveux central. Ainsi, les animaux caspase 3-/- souffrent d'une hyperplasie cérébrale massive. Les thymocytes issus de ces souris peuvent initier un programme apoptotique normal en réponse à un anticorps anti-Fas, à la dexaméthasone, au céramide-C2, à la staurosporine et aux rayonnements  $\gamma$ . En revanche, la caspase 3 semble être requise pour l'apoptose des neutrophiles et des lymphocytes T activés [107]. De plus, ces mêmes études ont décrit que la caspase 3 n'était pas requise pour le clivage de la PARP ou la liaison à l'annexine V qui reconnaît spécifiquement les résidus phosphatidylsérine mais qu'elle était absolument nécessaire à la dégradation de l'ADN ainsi qu'à la condensation de la chromatine. De plus, les lymphocytes T périphériques de ces souris étaient insensibles à l'AICD (Activation Induced Cell Death) ainsi qu'à l'apoptose induite par un anticorps anti-CD3 dirigé contre la partie monomérique du récepteur T ou un anti-Fas.

Il semble que l'implication de la caspase 3 dépende du type de stimulus apoptotique considéré. De plus, il existe une spécificité tissulaire. Ainsi, un traitement au TNF- $\alpha$  induit une apoptose normale des thymocytes issus de souris caspase 3-/- alors que les fibroblastes transformés y sont résistants. Ceci souligne que la caspase 3 pourrait jouer un rôle différent selon le type de cellules et de stimuli considérés.

### **Caspase 8**

Les souris caspase 8-/- se développent normalement durant les 11 premiers jours suivant la fécondation, puis meurent, probablement des suites de malformations cardiaques importantes. Le cœur de ces animaux est hypotrophique, suggérant que la caspase 8 puisse être impliquée dans la transmission des signaux de survie plutôt que dans des signaux de mort, au moins au niveau de cet organe. De plus, ces embryons produisent très peu de précurseurs myéloïdes. Les fibroblastes embryonnaires de ces souris sont insensibles aux effets cytotoxiques initiés par Fas, TNF-RI ou DR3 mais restent sensibles à la privation en facteurs de croissance, aux radiations ultraviolets, au céramide et à l'étoposide [108]. Les fibroblastes embryonnaires répondent normalement aux signaux non apoptotiques émanant des récepteurs de mort et sont capables d'activer la voie JNK ainsi que le facteur de transcription NF- $\kappa$ B de manière équivalente aux cellules sauvages.

Ces résultats indiquent non seulement que la caspase 8 est un élément essentiel et non redondant de l'apoptose initiée par les récepteurs de mort, mais aussi qu'elle joue un rôle essentiel dans le développement cardiaque et l'hématopoïèse.

### **Caspase 9**

Le phénotype de ces souris est semblable à celui des souris caspase 3<sup>-/-</sup> [109] mais les malformations sont plus graves. En effet, ces souris meurent au 16<sup>ème</sup> jour de développement. Elles souffrent de malformations cérébrales avec un excès cellulaire au niveau du système nerveux central. Il a été observé environ 10 fois moins de cellules apoptotiques dans les cerveaux des souris invalidées au stade E12,5 par rapport à des souris contrôles. Ce phénotype est aussi partagé par les souris Apaf-1<sup>-/-</sup>. De plus, il existe une absence d'activation de la caspase 3 *in vivo* dans le cerveau alors que cette activation se produit normalement dans les tissus ectodermiques et méningés. Contrairement au cerveau, certains organes comme le cœur, le poumon, le foie mais aussi la colonne vertébrale présentent un développement normal. Les cellules ES ou les fibroblastes embryonnaires de ces souris libèrent le cytochrome c de leurs mitochondries suite à une irradiation aux ultraviolets. Cependant, dans ces conditions, la caspase 3 n'est pas activée. De plus, des extraits de cellules nerveuses ou de thymocytes issus de souris caspase 9<sup>-/-</sup> n'autorisent pas l'activation de la procaspase 3 lorsqu'ils sont incubés en présence de cytochrome c et de dATP [110].

Le fait que les souris invalidées pour la caspase 3, la caspase 9 ou Apaf-1 présentent toutes un phénotype très semblable indique que ces molécules interviennent probablement dans une voie commune au cours de l'apoptose.

### **Caspase 12**

Les souris invalidées pour la caspase 12 ne présentent aucun défaut apparent du développement. Les thymocytes de ces souris répondent de manière comparable aux cellules contrôles lorsqu'elles sont stimulées par un anticorps anti-Fas ou par la dexaméthasone [111]. Il semble donc que la caspase 12 ne soit pas essentielle pour l'apoptose induite par Fas. Des études de microscopie confocale suggèrent que la pro-caspase 12 est principalement localisée dans le réticulum endoplasmique. La pro-caspase 12 est activée lorsque les cellules sont traitées avec des agents capables d'induire un stress du réticulum endoplasmique [112]. Ainsi, les auteurs ont montré que

la tunicamycine provoquait l'apoptose des cellules épithéliales rénales des souris contrôles mais pas des souris invalidées pour le gène de cette caspase. La même étude montre que les neurones des souris caspase 12-/- sont moins sensibles à la toxicité induite par la protéine amyloïde b. Il a été montré que cette protéine possédait des récepteurs localisés dans le réticulum endoplasmique et qu'elle était capable d'induire un processus apoptotique, mécanisme qui pourrait jouer un rôle dans la maladie d'Alzheimer.

La caspase 12 serait essentielle pour l'apoptose induite par un stress au niveau du réticulum endoplasmique ou pour la mort neuronale induite par la protéine amyloïde b, ce qui fait de la caspase 12 une cible pharmacologique potentielle dans la maladie d'Alzheimer.

### **e) En résumé**

Toutes ces études menées sur les souris dont le gène de différentes caspases a été invalidé ont permis d'établir les notions suivantes :

- 1) aucune de ces invalidations géniques prises isolément n'est capable d'inhiber totalement l'apoptose au cours du développement. En fait, les phénotypes les plus sévères sont obtenus avec les souris caspase 3-/- et caspase 9-/- qui possèdent des anomalies cérébrales majeures. Cependant tous les autres tissus embryonnaires ne présentent que peu ou pas de différences avec les souris sauvages.
- 2) quelle que soit la caspase considérée, les effets sur l'apoptose sont à la fois dépendants du type cellulaire et du stimulus utilisé. Ainsi, le jeu des caspases est probablement différent selon l'effecteur et le tissu considéré, ce qui rend très complexe la transposition d'expérience d'un type de tissu à un autre lorsque ces caspases sont impliquées.

## **4) La mitochondrie**

La mitochondrie est l'acteur principal impliqué dans la voie intrinsèque de l'apoptose. Divers stimuli (stress genotoxique, ultraviolets, etc.) vont provoquer la fuite du cytochrome c par un pore nouvellement créé dans la membrane mitochondriale externe. Le cytochrome c ainsi relargué dans le cytoplasme participe à l'assemblage d'un complexe protéique appelé apoptosome.

### **a) Relation structure/activité**

La mitochondrie joue un rôle clé dans la régulation de l'apoptose [113, 114]. En effet, la phase effectrice de l'apoptose comporte l'ouverture des pores de transition de perméabilité (pores PT)

des mitochondries. Les pores PT sont des canaux oligo-protéiques constitués au niveau de la membrane externe par la porine (ou VDAC : Voltage Dependent Anion Channel), sur la membrane interne par l'ANT (Adenine Nucléotide Translocator). Suite à l'ouverture des pores PT, il y a libération de molécules pro-apoptotiques telles que le cytochrome c, les caspases 2, 3 et 9 ainsi que l'Apoptosis Inducing Factor (AIF). L'AIF est une des molécules pro-apoptotiques libérées de la mitochondrie, il est localisé dans l'espace intermembranaire mitochondrial. Il s'agit d'une molécule possédant une double fonction : oxydoréductase et facteur pro-apoptotique. Afin que cette dernière activité s'exerce, il y a nécessité d'une redistribution subcellulaire : de la mitochondrie vers le cytosol puis vers le noyau. La voie AIF est indépendante des caspases et ne nécessite aucun intermédiaire pour provoquer l'apoptose nucléaire : il interviendrait dans la voie apoptotique indépendante des caspases [115].

Le mécanisme central de cette phase effectrice est l'altération de la perméabilité membranaire mitochondriale et l'ouverture du PTPC (Permeability Transition Pore Complex), un complexe multiprotéique de la membrane interne. Cette phase s'accompagne d'une diminution du potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\Delta \Psi_m$ ), suivi du gonflement de la matrice mitochondriale, une interruption du métabolisme énergétique aérobie et un stress oxydatif. Par voie de conséquence, des protéines intermembranaires telles que la protéine AIF, le cytochrome c, certaines pro-caspases, l'endonucléase G et d'autres facteurs vont être relargués dans le cytosol, initiant la phase de dégradation. Cette phase de libération est sous le contrôle de membres de la famille Bcl-2. Ainsi, Bcl-2 est capable de bloquer la sortie du cytochrome c [46, 47, 116] alors que Bax peut l'induire [117]. Dans la majorité des cas la libération du cytochrome c est indépendante de l'activité des caspases [118]. L'activation des caspases induite par le cytochrome c cytosolique associé à Apaf-1 ou l'apoptose induite par les récepteurs de mort ne sont pas des mécanismes totalement indépendants. En effet, Bid est le lien entre les récepteurs de mort et la libération du cytochrome c. Bid est directement clivé par la caspase 8 et le fragment C-terminal produit permet la libération du cytochrome c [119, 120]. Ainsi, des extraits cytosoliques déplétés en Bid rendent la caspase 8 incapable de libérer le cytochrome c *in vitro*. En parallèle, des études ont montré que l'addition de molécules recombinantes Bax ou Bak sur des mitochondries isolées pouvait induire la libération du cytochrome c ainsi que la perte du potentiel membranaire  $\Delta \Psi_m$  [121, 122].

Il est actuellement admis que la libération du cytochrome c ainsi que la perte du  $\Delta \Psi_m$  induite par Bax/Bak pourraient être régulées par le pore PT. Il a été montré que Bax pouvait interagir avec le VDAC et l'ANT [123]. Il semble que Bax/Bak puissent, soit induire un changement de conformation du canal VDAC afin de former un pore permettant le passage des

différentes molécules pro-apoptotiques, soit interagir directement avec VDAC et participer ainsi à agrandir le pore. La libération du cytochrome c se fait en une seule étape [124]. Il semble que la mitochondrie joue le rôle d'intégrateur des différents signaux et qu'une fois un certain seuil de dépolarisation de la membrane mitochondriale soit atteint, la totalité du cytochrome c soit libérée en une seule étape. Cette libération va permettre la formation de l'apoptosome. Ce complexe multiprotéique est formé par l'interaction du cytochrome avec l'APAF-1 et la procaspase-9 dans le cytosol, à la suite de la libération du cytochrome C depuis la mitochondrie. L'apoptosome permet le clivage de la procaspase-9 ce qui induit la formation de la forme active de cette enzyme qui activera à son tour d'autres caspases effectrices.

## **b) Invalidation génique**

### **APAF-1**

L'invalidation du gène d'Apaf-1 conduit à un phénotype semblable, bien que plus sévère, à celui obtenu lors de l'invalidation des gènes des caspases 3 et 9. Brièvement, les souris Apaf-1<sup>-/-</sup> présentent un développement anormal du cerveau et meurent au stade embryonnaire E16. La plupart des autres tissus, notamment le système immunitaire, sont normaux [125]. Toutefois il faut noter un décalage dans la disparition de la membrane interdigitale qui n'est éliminée que plus tardivement chez les souris caspases 3<sup>-/-</sup> et caspase 9<sup>-/-</sup>. Ce résultat semble indiquer qu'Apaf-1 module l'activité d'autres caspases. Le fait que la majeure partie de la mort cellulaire soit normale au cours du développement, ajouté à l'observation que les fibroblastes embryonnaires de souris Apaf-1<sup>-/-</sup> présentent une apoptose quasi normale, après un traitement à la staurosporine, [126] laissent suggérer l'existence d'autres molécules jouant un rôle équivalent à celui d'Apaf-1.

### **Cytochrome c <sup>-/-</sup>**

L'invalidation du gène codant pour le cytochrome c a confirmé l'importance cruciale de cette protéine dans l'apoptose. Etant donné le rôle primordial joué par le cytochrome c (Cyt c) dans la chaîne respiratoire de la mitochondrie, il n'est pas surprenant que l'invalidation de ce gène conduise à une mort des embryons à un stade précoce du développement (E10,5). Les auteurs ont cependant réussi à maintenir en culture des cellules issues de ces embryons en utilisant un milieu approprié, ceci afin d'étudier l'effet du cytochrome c sur l'apoptose. Les cellules Cyt c<sup>-/-</sup> ne peuvent pas induire l'activation de la caspase 3 en réponse à différents stimuli pro-apoptotiques. De plus, Apaf-1 reste sous forme monomérique dans des conditions où l'apoptosome devrait se former. Enfin, les cellules Cyt c<sup>-/-</sup> sont résistantes à l'apoptose induite

par les ultraviolets ou l'étoposide et très peu sensibles aux effets pro-apoptotiques de la privation en facteur de croissance ou de la staurosporine [127]. Ceci implique qu'aucune autre protéine cellulaire ne puisse remplacer le Cyt c pour l'oligomérisation d'Apaf-1 et pour l'activation de la caspase 3 induite par un stress cellulaire ou par un agent ciblant la mitochondrie.

### **Caspase 9 -/-**

Comme nous l'avons déjà vu précédemment, l'inactivation du gène de la caspase 9 conduit à un phénotype proche de celui de l'inactivation de l'Apaf-1.

### **c) En résumé**

Les gènes impliqués dans la formation de l'apoptosome sont des éléments clé dans la régulation de l'apoptose lors du développement. Leurs fonctions doivent être nécessairement conservées dans les cellules matures pour que les mécanismes moléculaires impliquant l'apoptose puissent avoir lieu.

## D) Mécanismes moléculaires de l'apoptose

Comme nous l'avons vu précédemment, deux voies aux mécanismes moléculaires distinctes peuvent conduire à l'apoptose des cellules :

- une voie dite extrinsèque, impliquant des récepteurs appartenant à la superfamille des récepteurs du TNF dont le modèle le mieux connu est le modèle de Fas.
- une voie dite intrinsèque mettant particulièrement en jeu la mitochondrie ; cette voie est gouvernée par des protéines appartenant à la superfamille de Bcl-2.

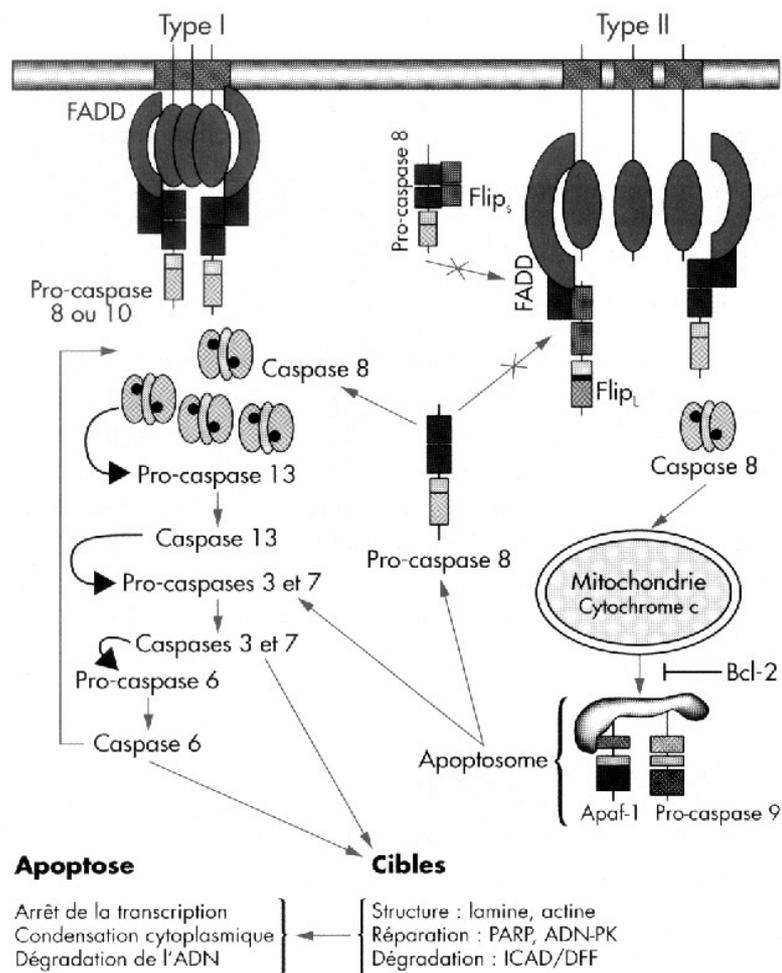
Ces deux voies vont conduire à l'activation des caspases, responsables des phénomènes morphologiques et biochimiques observés lors de l'apoptose.

### 1) Voie extrinsèque

Nous ne décrivons dans ce paragraphe que le mécanisme d'activation du récepteur Fas. Dans l'état des connaissances actuelles, il semble toutefois que ce mécanisme puisse être étendu aux autres récepteurs de mort. Une fois stimulé par son ligand spécifique, Fas trimérise et recrute une protéine adaptatrice FADD/MORT1. FADD présente la particularité de posséder, en plus de son DD, un DED. Le DED est nécessaire et suffisant pour induire l'apoptose. La transfection d'un module DED suffit à induire l'apoptose de cellules eucaryotes [128]. Dans certaines conditions, TNF-RI recrute également FADD. Ce couplage est cependant indirect et se fait par l'intermédiaire d'une protéine comportant un DD : TRADD [78]. En définitive FADD représente le point de convergence des voies de signalisation induites par Fas ou TNF-RI. Par la suite, FADD peut recruter la caspase 8 [129] ou la caspase 10 [130] par l'intermédiaire de ces DEDs et ainsi initier la cascade apoptotique (cf. Figure 6).

**Figure 6 : Les principales voies d'activation extrinsèque de l'apoptose.**

La signalisation par Fas recrute un complexe composé d'une molécule adaptatrice FADD et de la procaspase-8. FADD se lie à travers son propre domaine de mort à ceux des récepteurs Fas. FADD contient également un domaine qui se lie à la procaspase-8. La formation de ce complexe entraîne le clivage de la caspase-8 sous sa forme dimérique active, puis déclenche la cascade d'activation des différentes caspases dont la caspase-3. Ces protéases effectuent le clivage de plusieurs molécules, parmi lesquelles des protéines de structure et celles impliquées dans les systèmes de réparation cellulaire. Il existe 2 voies de transduction du signal de la voie Fas, dépendant du type cellulaire. Dans les cellules de type 1 comme les thymocytes, la caspase 8 active directement la caspase 3. Dans les cellules de type 2 comme les hépatocytes, la caspase 8 active Bid, provoquant la libération du cytochrome c. L'association cytochrome c/Apaf1 active la caspase 9 qui active à son tour la caspase 3. Concernant la voie intrinsèque, l'implication des protéines de la famille de Bcl-2 sur les mitochondries semble majeur. Les protéines de la famille Bcl-2 associées aux membranes de la mitochondrie contrôlent la perméabilité de la membrane mitochondriale. Bax favorise la libération de différents composants de la membrane, comme le cytochrome C, tandis que Bcl-2 s'y oppose. Une fois libéré, le cytochrome c s'associe à la protéine Apaf-1 et va activer la pro-caspase-9. D'après [131].

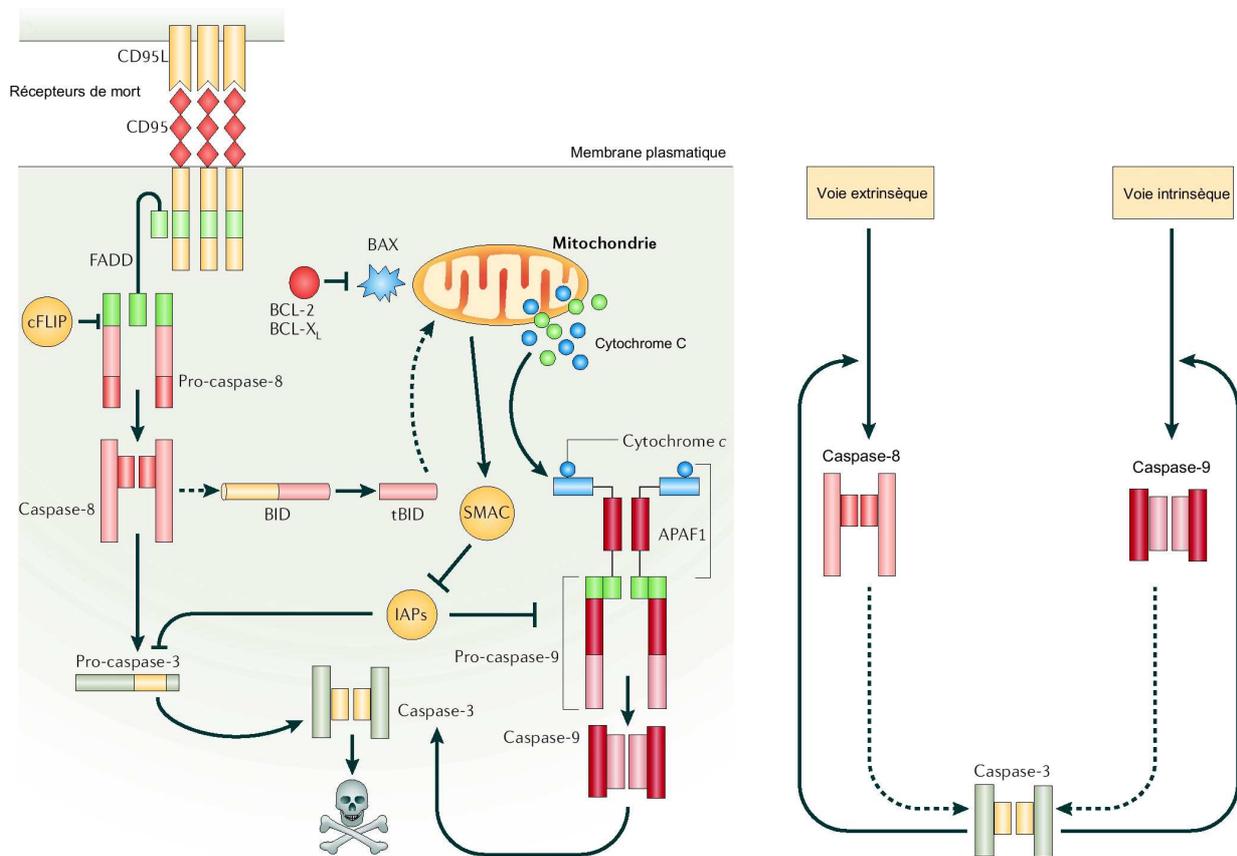


## 2) Voie intrinsèque

Il est maintenant établi que la grande famille des protéines homologues à Bcl-2 joue un rôle majeur dans la régulation de l'apoptose. Cette régulation passe par la modulation de l'activité de certaines caspases, principalement la caspase 9. Ainsi, en empêchant la libération du cytochrome c par la mitochondrie, Bcl-2 et Bcl-XL inhibent la formation du complexe Apaf-1/cytochrome c/caspase 9 nécessaire à l'apoptose. Des études ont montré que APAF-1/ced-4 pouvait interagir à la fois avec ced-3 et ced-9 et que lorsqu'il était exprimé dans des cellules de mammifères, il se localisait à la membrane mitochondriale en présence d'une molécule de Bcl-2 [132]. De plus, il a été possible d'isoler le complexe Bcl-XL/ced-4/caspase. En fait, il est établi que la localisation du complexe à la membrane mitochondriale est inhibitrice de l'apoptose alors que la libération de ced-4 dans le cytoplasme entraîne l'activation des caspases et la mort cellulaire. L'équipe de Zou et al. a réussi à isoler et à caractériser l'homologue humain de ced-4 [52]. Grâce à un système acellulaire d'étude de l'activation des caspases, les auteurs ont identifié un complexe protéique indispensable à la maturation protéolytique de cette caspase ainsi qu'à son activation. Ce complexe est composé d'Apaf-1, du cytochrome c (Apaf-2) et de la caspase 9 (Apaf-3) [133]. Tout comme ced-4, Apaf-1 s'est révélé indispensable à l'activation de la caspase 9. L'action d'Apaf-1 requiert absolument la présence de cytochrome c et de dATP [133]. En fait, le dATP va permettre un changement de conformation d'Apaf-1 de telle sorte qu'il puisse lier le cytochrome c libéré de la mitochondrie. Ce pré-complexe peut alors recruter la procaspase 9 et ainsi conduire à son activation. Le complexe ainsi formé est appelé apoptosome. Des études ont montré que le clivage et donc l'activation de la procaspase 3 était également dépendant de son recrutement à l'apoptosome [134] et que ce n'était donc pas un événement cytoplasmique dû à la libération d'une caspase 9 active [135]. Apaf-1 peut aussi interagir avec d'autres protéines telle que Bcl-XL et les caspases 4 et 8 [136]. L'interaction entre Apaf-1 et Bcl-XL se fait principalement par le domaine BH4 de Bcl-XL [137]. Elle conduit à l'inhibition de l'association Apaf-1/caspase 9 et donc à l'absence d'activation de cette caspase (cf. Figure 7).

**Figure 7 : Les deux voies principales d'induction de l'apoptose.**

L'apoptose peut être initiée par la voie intrinsèque, voie impliquant la mitochondrie ou par la voie extrinsèque contrôlée par les récepteurs de mort cellulaire. Les deux voies conduisent à l'activation d'une caspase initiatrice (caspase-8 et probablement caspase-10 pour la voie extrinsèque, caspase-9 via l'apoptosome pour la voie intrinsèque). Il existe des interactions entre ces deux voies. Par exemple, l'activation d'un récepteur de mort peut provoquer le clivage de Bid par la caspase 8, amplifiant le signal apoptotique en activant la voie mitochondriale. La fixation de CD95L ou FasL sur son récepteur provoque la formation du complexe de signalisation et d'induction de la mort cellulaire. La procaspase-8 initiatrice, recrutée par FADD, est activée par clivage autocatalytique. Les deux voies, intrinsèque et extrinsèque, conduisent à l'activation de la caspase 3. D'après [138].



En se basant sur l'implication de la mitochondrie dans la voie apoptotique induite par les récepteurs de mort, l'équipe de Krammer a proposé l'existence de deux types de cellules [139]. D'une part les cellules de type I (SKW6.4, H9) présentent un taux important de caspase 8 active après stimulation du récepteur Fas. Le blocage des fonctions mitochondriales par une expression hétérologue de Bcl-2 n'a aucun effet sur l'activation des caspases 3 et 8 ou sur la sensibilité de ces cellules à l'effet pro-apoptotique de Fas. D'autre part, les cellules du type II (Jurkat, CEM) ne

présentent pas un taux significatif de caspases 8 et 3 activées uniquement après la perte du Delta Psi m. Ceci indique que cette activation des caspases est en aval de la mitochondrie. Dans les cellules de type II, l'activation des caspases ainsi que l'apoptose sont bloquées par une surexpression de Bcl-2 ou de Bcl-XL.

## **a) Dimérisation**

Une caractéristique importante des membres de la famille Bcl-2 est de pouvoir former des homo ou des hétérodimères. Les homodimères anti-apoptotiques Bcl-2 ou Bcl-XL se font par l'intermédiaire des domaines BH1 et BH2 [140]. Les membres pro-apoptotiques contenant un domaine BH3, comme Bax ou Bak, peuvent interagir avec Bcl-2 ou Bcl-XL par l'intermédiaire à la fois de leur domaine BH3 mais aussi grâce à la poche hydrophobe formée par les domaines BH1, BH2 et BH3 de Bcl-2 et Bcl-XL [141]. En fait, il semble que la balance entre la vie et la mort cellulaire soit influencée par le type et la proportion de dimères anti- ou pro-apoptotiques formés [142]. Ainsi, lorsque Bax est préférentiellement exprimé, des homodimères Bax/Bax se formeront et conduiront à la mort cellulaire. En revanche, si Bcl-2 est majoritairement exprimée, alors il y aura formation de dimères Bcl-2/Bcl-2 et donc la survie cellulaire. Toutefois d'autres expériences ont montré que, pour des raisons structurales, les homodimères Bcl-2 ne pourraient pas se former et que Bcl-2 jouerait son rôle anti-apoptotique sous forme monomérique [143]. Les membres ne comportant qu'un domaine BH3, comme Bad ou Bid, ne peuvent pas former d'homodimères et ne possèdent pas d'activité intrinsèque. En fait, ils joueraient leur rôle pro-apoptotique en formant des dimères avec des membres anti-apoptotiques réduisant ainsi la capacité de ceux-ci à former des homodimères protecteurs et dans le même temps favoriseraient la constitution de dimères pro-apoptotiques [144].

## **b) Autres modifications**

En plus des niveaux d'expression respectifs de chaque membre et de leur capacité à former des dimères, l'action de cette famille de protéines sur le devenir cellulaire peut être également modulée par des modifications pré ou post-traductionnelles. Certains homologues de Bcl-2 peuvent subir un épissage au niveau protéique et/ou au niveau de l'ARNm. Par exemple, Bcl-XL peut être clivé et converti en un fragment pro-apoptotique appelé Bcl-XS [145]. Ce dernier peut également être généré par épissage alternatif de l'ARNm de Bcl-XL [146]. Un autre exemple caractéristique de régulation post-traductionnelle est la phosphorylation de Bad dans des lignées cellulaires dépendantes des facteurs de croissance. En présence d'IL-3, Bad est

phosphorylé par la kinase Akt. Cette phosphorylation se produit en présence de mitogènes, de facteurs de croissance, d'hormones ou d'ester phorbol par exemple. Elle entraîne l'association de Bad avec la protéine cytosolique 14-3-3 sigma [147]. En absence d'IL-3, Bad est déphosphorylé et peut donc se libérer de la protéine 14-3-3 sigma. Une fois le domaine BH3 de Bad libéré, il peut interagir avec Bcl-XL et ainsi bloquer son action protectrice [148]. Bcl-2 est également une phosphoprotéine [149]. Ainsi, certains traitements par des agents de chimiothérapie ou par des inhibiteurs de phosphatase provoquent indirectement la phosphorylation d'une sérine de Bcl-2. Cette phosphorylation inhibe l'effet anti-apoptotique de Bcl-2 [150].

### 3) Activation des caspases

Les deux voies (intrinsèque et extrinsèque) conduisent à l'activation des caspases qui sont responsables des phénomènes morphologiques et biochimiques observés lors de l'apoptose. Etant donné les effets délétères que pourrait avoir une activation inopportune des caspases, il n'est pas surprenant que cette étape soit étroitement modulée. C'est pourquoi l'activation mais aussi l'activité et la production des caspases sont régulées à différents niveaux.

#### a) Régulation transcriptionnelle

Bien que l'apoptose puisse se produire dans la majorité des types cellulaires en absence d'ARNm et de synthèse protéique [151], plusieurs observations suggèrent que la régulation de l'expression des gènes des procaspases puisse avoir une importance dans certaines conditions. Ainsi, bien que les ARNm des procaspases soient clairement détectables dans la plupart des types cellulaires [152], les niveaux de zymogènes sont très différents d'un type cellulaire à l'autre. Par exemple, la caspase 3 est fortement exprimée dans de nombreuses cellules lymphoïdes et myéloïdes matures alors qu'elle n'est que faiblement présente dans l'épithélium mammaire et dans les neurones [153]. De plus, le niveau d'expression de ces zymogènes n'est pas statique. Des études ont décrit que dans des conditions d'induction de l'apoptose, des neurones (*in vitro*) ainsi que des cerveaux de souris (*in vivo*) exprimaient des niveaux d'ARNm de la caspase 3 plus élevés. Lorsque des cellules leucémiques humaines sont incubées en présence d'étoposide (inhibiteur de la topoisomérase II), le niveau d'expression de plusieurs messagers de procaspases croît significativement [154].

Enfin, l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ), molécule impliquée dans les mécanismes de défenses contre

les agents pathogènes, est un des facteurs ayant une grande influence sur l'expression des gènes de plusieurs caspases. Ainsi, un traitement des cellules U937 à l'IFN- $\gamma$  augmente très sensiblement l'expression de caspases ainsi que la sensibilité de ces cellules à l'apoptose [155].

## **b) Apoptose caspase indépendante**

L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des caspases a montré que les cellules peuvent entrer en apoptose aussi bien par des mécanismes impliquant les caspases que par des mécanismes indépendants des caspases. Par exemple, la surexpression de Bax (facteur pro-apoptotique) conduit à l'activation des caspases et à la mort cellulaire. Cependant, l'inhibiteur général des caspases, le zVAD-fmk, bien qu'étant capable d'inhiber l'activation des caspases, s'est avéré incapable d'empêcher la mort cellulaire induite par Bax [156]. Ce type de mort cellulaire se distingue de l'apoptose par différents points. En effet, il y a simultanément une chute du potentiel mitochondrial mais aussi une absence de dégradation de l'ADN ainsi qu'une perte de l'intégrité membranaire. Or ce dernier point est plutôt une caractéristique de la nécrose plutôt que de l'apoptose. De nombreux stimuli, comme la privation en sérum [157], la surexpression de certaines proto-oncogènes ou de Bak, un facteur anti-apoptotique, les dommages à l'ADN [158], etc. sont également capables d'induire une mort cellulaire qui ne peut pas être bloquée par des inhibiteurs de caspases. Dans tous ces cas, les cellules meurent selon un processus proche de la nécrose, sans présenter les modifications nucléaires spécifiques de l'apoptose [159]. Toutefois le bourgeonnement de la membrane plasmique de ces cellules est observé de la même façon qu'au cours de l'apoptose [157].

## **c) Conclusion**

Il est établi que la grande famille des protéines homologues à Bcl-2 joue un rôle majeur dans la régulation de l'apoptose. Cette régulation passe par la modulation de l'activité de certaines caspases, principalement la caspase 9. En revanche, les caspases ne semblent pas essentielles à la régulation des mécanismes de l'apoptose : aucune des invalidations géniques prises isolément chez la souris n'est capable d'inhiber totalement l'apoptose au cours du développement. Les phénotypes les plus sévères sont obtenus avec les souris caspase 3 $^{-/-}$  et caspase 9 $^{-/-}$ . De plus, les effets sur l'apoptose sont à la fois dépendant du type cellulaire et du stimulus utilisé.

Les membres de la famille Bcl-2 exercent deux fonctions essentielles : ils participent d'une part à la formation de pores régulant le passage d'ions et de certaines substances activatrices de l'apoptose [160] et d'autre part modulent la fonction des molécules régulatrices de l'apoptose par

l'intermédiaire d'interactions protéine-protéine. Il ressort des différentes études chez l'homme et l'animal que Bcl-2, Bax et Bcl-XL sont plus particulièrement impliqués dans la régulation de l'apoptose lors du développement et de la maturation du système immunitaire : Bcl-2 serait impliqué dans le maintien de l'homéostasie du système immunitaire, dans la survie de la population de lymphocytes T matures à l'âge adulte ; Bcl-XL régulent la mort cellulaire au cours du développement des lymphocytes ; enfin Bax est impliqué dans la prévention de la mort induite par la privation en facteur de croissance.

C'est pourquoi dans notre travail de thèse, nous nous sommes intéressés aux 3 membres de la famille de Bcl-2 qui sont Bcl-2, Bax et Bcl-XL car il apparaît qu'ils sont plus particulièrement dans la maturation et la régulation du système immunitaire, en particulier dans le mécanisme de sélection des lymphocytes T.

## 2<sup>ème</sup> partie : Mort cellulaire dans le système

### immunitaire

Dans ce chapitre, après un rappel des grandes fonctions de l'immunité, nous décrivons les mécanismes d'activation des cellules T. Par la suite, nous détaillerons l'implication de la mort cellulaire programmée dans la régulation du système immunitaire et en particulier dans le sepsis.

#### A) Généralités

Le système immunitaire maintient l'intégrité de notre organisme par l'immunité innée ou naturelle et l'immunité acquise. L'immunité innée utilise des mécanismes qui ne sont pas spécifiques à un agent pathogène particulier et qui sont très conservés dans l'évolution [161]. Elle est la première ligne de défense durant la période critique suivant l'exposition de l'hôte à un agent pathogène. Les cellules de l'immunité innée détectent des signaux provenant d'agents pathogènes par une famille de récepteurs particuliers, les Toll-like receptors (TLR) présents à la surface des cellules de l'immunité non-spécifique et reconnaissant des patrons conservés d'agents pathogènes. Après une telle reconnaissance, une réponse inflammatoire et antimicrobienne est déclenchée par les cellules de l'immunité innée [162].

#### 1) L'immunité innée

Les cellules phagocytaires jouent un rôle important dans plusieurs aspects de cette immunité. Ces cellules spécialisées, telles le monocyte, le macrophage et le neutrophile, ont la capacité de phagocyter et détruire l'agent pathogène rencontré. Notamment, les neutrophiles sont équipés d'un arsenal de mécanismes effecteurs bactéricides très puissants incluant leur habileté à adhérer, à phagocyter et à dégrader le microorganisme phagocyté par la production de radicaux libres et la libération d'enzymes et de protéines bactéricides, stockés dans diverses populations de granules, dans le phagolysosome [163]. Chez les macrophages les particules phagocytées sont également dégradées par des enzymes lysosomiaux. Les macrophages produisent également des cytokines qui recrutent d'autres cellules inflammatoires, spécialement le neutrophile et tous sont responsables de plusieurs des effets systémiques de l'inflammation comme la fièvre. Les phagocytes sont attirés sur les lieux d'une réaction inflammatoire par chimiotaxie où ils procèdent à la phagocytose des micro-organismes pathogènes présents ainsi que des débris cellulaires [164].

La synthèse de peptides à activité antimicrobienne au niveau de certains tissus est également un mécanisme important de l'immunité innée qui a été conservé au cours de l'évolution [165]. Les peptides antimicrobiens sont les principales molécules effectrices de la défense immunitaire innée des organismes multicellulaires animaux et végétaux. Il s'agit d'un vaste ensemble de peptides (> 500 peptides antimicrobiens ont été identifiés), comportant en moyenne de 20 à 50 acides aminés qui partagent un caractère cationique et des propriétés amphiphiles. Ils sont classés selon leur mécanismes d'actions en différentes groupes dont les défensines, les protégrines, la tripticine et les lactoferrines, les analogues du domaine 3 de la protéine Bactericidal and permeability-increasing protein et les chromogranines [166] avec en particulier la vasostatine [167]. La plupart des peptides antimicrobiens ont un spectre d'activité étendu qui couvre la majorité des espèces bactériennes et fongiques, notamment celles pathogènes pour l'homme. Chez l'homme, le rôle des peptides antiinfectieux dans la lutte contre les pathogènes commence à être établi dans certaines pathologies comme le choc septique [168].

## 2) L'immunité acquise

L'immunité acquise est hautement spécifique et a la propriété remarquable de conserver une mémoire. Typiquement la réponse spécifique à un antigène survient cinq à six jours après l'exposition initiale à cet antigène. Par contre, une deuxième exposition à ce même antigène générera une réponse mémoire survenant plus rapidement, qui sera plus forte et souvent plus efficace pour neutraliser et éliminer l'agent pathogène.

Plusieurs types de cellules participent à l'initiation et au développement des réactions immunitaires spécifiques : les lymphocytes et les macrophages. Les lymphocytes B et T sont les cellules effectrices de l'immunité spécifique. Chaque lymphocyte porte un récepteur lui permettant d'identifier un motif protéique spécifique. Le motif de l'antigène reconnu par le récepteur est un déterminant antigénique ou épitope. Les lymphocytes T ne reconnaissent pas directement les antigènes. Ces derniers doivent être présentés aux lymphocytes T par une cellule présentatrice d'antigène (CPA), c'est-à-dire une cellule porteuse des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II dont nous verrons la définition plus en détail dans la description de l'activation des lymphocytes T.

Les lymphocytes B effectuent leur maturation dans la moelle osseuse. Lorsqu'ils en ressortent, chaque lymphocyte B exprime un récepteur d'antigène unique à sa surface (B cell receptor ou BCR). Le BCR est une molécule d'anticorps liée à la membrane. Lorsqu'une cellule B naïve, qui n'a jamais rencontré d'antigène, rencontre pour la première fois l'antigène pour lequel

son récepteur est spécifique, la liaison BCR-antigène initie la division rapide de la cellule. Sa progéniture se différencie en cellules B mémoires et cellules B effectrices, également appelées plasmocytes.

Les cellules B mémoires ont une plus longue durée de vie que les cellules naïves et continuent à exprimer le même anticorps de surface (BCR) de la cellule naïve dont elles sont issues. Lors d'une exposition à l'antigène, les cellules B mémoires prolifèrent et se différencient en plasmocytes. Les cellules effectrices n'expriment plus d'anticorps de surface mais produisent l'anticorps sous une forme pouvant être sécrétée. Bien que ces cellules aient une demi-vie de l'ordre de quelques jours elles arrivent à sécréter d'importantes quantités d'anticorps durant cette période. Ces anticorps sont les molécules effectrices principales de l'immunité humorale puisqu'elles lient l'antigène pour le neutraliser ou faciliter son élimination.

Les lymphocytes T sont issus de précurseurs présents dans la moelle osseuse ayant migré dans le thymus où ils ont fait leur maturation. Ces lymphocytes T matures sont subdivisés en populations ayant des fonctions distinctes, les mieux définis étant les lymphocytes T auxiliaires et cytotoxiques. Ces populations expriment différentes protéines membranaires qui servent de marqueur phénotypique. C'est ainsi que la plupart des cellules T auxiliaires expriment une protéine de surface nommée CD4 alors que la majorité des cellules T cytotoxiques expriment le marqueur CD8.

Les lymphocytes T initient l'immunité spécifique à médiation cellulaire et humorale en reconnaissant des portions d'antigènes protéiques (peptides) liés à des molécules du CMH à la surface d'autres cellules. Il existe deux types de molécules du CMH, le CMH de classe I, exprimé par pratiquement toute cellule nucléée et le CMH de classe II, dont l'expression est restreinte aux cellules présentatrices d'antigènes incluant les macrophages, les lymphocytes B et les cellules dendritiques. Les lymphocytes T auxiliaires (T CD4+) reconnaissent un peptide en association avec une molécule du CMH de classe II alors que les cellules T cytotoxiques (T CD8+ ou LTc) reconnaissent un peptide complexé à une molécule du CMH de classe I [169]. Les cellules T sont insensibles à ces mêmes antigènes lorsqu'ils sont circulants. Pour cette raison la reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes T est dite restreinte par le CMH. Suivant l'activation par un antigène spécifique, les cellules T prolifèrent et se différencient en cellules T mémoires ou effectrices [170]. Les cellules T activées sécrètent des cytokines et plusieurs de celles-ci agissent sur d'autres populations cellulaires impliquées dans la défense de l'hôte. Les cytokines sécrétées par le lymphocyte T auxiliaire (CD4+) activent la prolifération et la différenciation des

lymphocytes T et B, activent les macrophages et causent l'inflammation. Pour sa part, l'activation du lymphocyte T cytotoxique (CD8+) mène à la lyse de la cellule lui ayant présenté l'antigène.

### **3) Relation entre immunité innée et immunité acquise**

L'immunité innée et l'immunité acquise ne sont pas totalement indépendantes l'une de l'autre. En effet elles agissent en collaboration. Ainsi les micro-organismes pathogènes détectés par les TLR de la cellule dendritique commandent la maturation des lymphocytes T CD4+ et initient la réponse immune spécifique. D'autre part, les macrophages sont des CPA qui expriment des portions de l'antigène phagocyté à leur surface en association avec les molécules du CMH de classe II essentielles à l'activation des lymphocytes T auxiliaires [171]. De plus, dans certaines conditions les lymphocytes T activés peuvent sécréter des cytokines qui activent le macrophage et le rendent plus efficace dans la phagocytose [172]. Enfin, après la génération d'anticorps par les cellules B, les antigènes étrangers sont recouverts ou opsonisés par les molécules d'anticorps et les protéines du complément [173]. Les macrophages qui expriment les récepteurs de surface pour les anticorps et certaines protéines du complément lient et phagocytent ces particules opsonisées avec beaucoup plus d'avidité que celles qui ne le sont pas. Ainsi les macrophages participent à l'élimination des antigènes étrangers par l'immunité humorale [174].

### **4) Profils Th1/Th2**

La production d'un profil cytokinique par les lymphocytes T CD4+ permet de distinguer le profil pro-inflammatoire dit Th1 (synthèse de TNF- $\alpha$ , d'INF- $\gamma$ , d'IL-2), du profil anti-inflammatoire dit Th2 (synthèse d'IL-4 et d'IL-10). Au cours d'infections sévères, il a été décrit une inhibition des caractères Th1 au profit du profil Th2, et une diminution des capacités de prolifération et de la sécrétion cytokinique des cellules lymphoïdes, compatibles avec un état d'anergie [175]. Une partie de cette atténuation de la réponse inflammatoire pourrait être due à l'induction du programme apoptotique de certaines lignées cellulaires dont les lymphocytes. L'apoptose semble être responsable d'une déplétion en cellules dendritiques et lymphoïdes B et T d'autant plus importante que l'infection est grave [176]. Ceci peut expliquer le défaut d'activation de l'immunité adaptative et notamment de production d'anticorps. Il a été également décrit une diminution d'expression des molécules du CMH et des costimulateurs à la surface des macrophages, qui additionnée aux autres anomalies, explique le défaut de l'immunité innée notamment du système monocytes-macrophages et la diminution de la présentation d'antigène [177].

## B) Le lymphocyte T

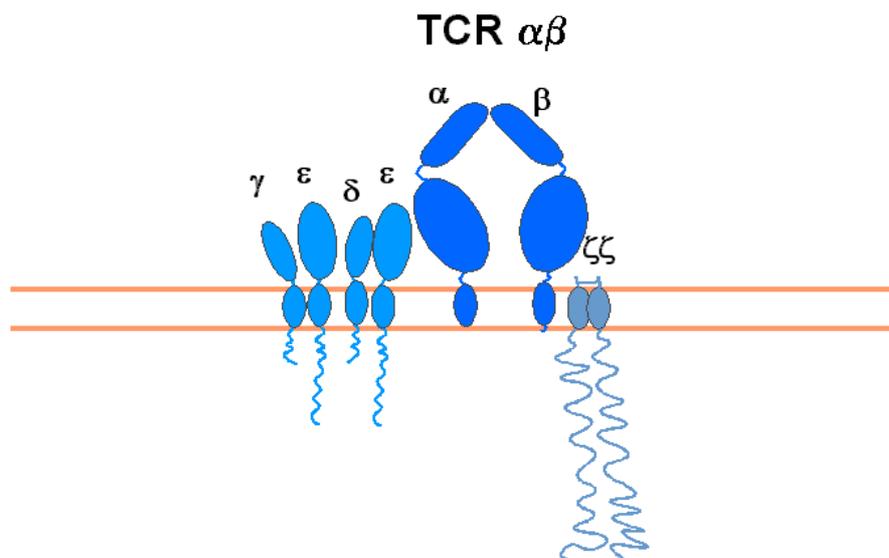
### 1) Le récepteur T

Les cellules T des vertébrés supérieurs présentent deux types de récepteur T ou TCR :  $\alpha\beta$  et  $\gamma\delta$ . Le TCR  $\alpha\beta$  présente un pont disulfure entre les sous-unités  $\alpha$  (40-50 kDa) et  $\beta$  (35-47 kDa). Chaque chaîne polypeptidique qui comprend deux régions homologues aux domaines des immunoglobulines (Ig), est ancrée dans la membrane plasmique par un domaine transmembranaire et une courte queue cytoplasmique. La variabilité de la séquence en acides aminés réside dans le domaine N-terminal des polypeptides  $\alpha$  et  $\beta$ , présentant des homologies avec les domaines variables des Ig. La chaîne  $\alpha$  est codée par le réarrangement des segments de gènes V et J et la chaîne  $\beta$  par le réarrangement des segments de gènes V, D et J [178].

Les chaînes du TCR sont associées avec une série de polypeptides appelés CD3. Cette association est nécessaire à l'expression du complexe TCR à la surface des cellules T. Le CD3 ne présente aucune variabilité de séquence et ne peut donc pas participer à la diversité des TCRs. Il est acquis que le CD3 est nécessaire à la transduction du signal suite à la stimulation du TCR. Il comprend au moins 5 polypeptides invariants :  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  et  $\eta$  (cf. Figure 8).

**Figure 8 : Représentation schématique du récepteur T alpha/bêta.**

La reconnaissance de l'antigène implique les parties N-terminales des chaînes alpha et bêta, permettant au récepteur de reconnaître un antigène présenté par le complexe majeur d'histocompatibilité. La partie invariante du récepteur T est composée de différentes chaînes (gamma, epsilon, delta, zêta) appelées CD3. D'après [179].



## 2) Activation lymphocytaire T

Les lymphocytes T reconnaissent l'antigène sous forme d'un peptide lié aux molécules du CMH situé à la surface des cellules présentatrices de l'antigène. Les CPA vont en général présenter très peu de copies d'un même épitope. Par conséquent, la reconnaissance par la cellule T doit être extrêmement sensible. De plus, cette reconnaissance doit être hautement sélective puisque les cellules T vont devoir identifier les quelques complexes CMH-peptide antigéniques parmi un grand nombre de complexes non pertinents constitués des mêmes molécules de CMH liées à des peptides du soi. Finalement, les cellules T doivent être capables d'interpréter le contexte dans lequel un antigène donné est présenté afin d'induire une réponse envers un antigène infectieux ou bien ignorer un antigène inoffensif ou appartenant au soi. Pour que l'activation des cellules T soit efficace, elle nécessite également l'engagement d'autres récepteurs de surface. Ce modèle est défini comme le modèle des deux signaux. Il propose que l'activation des cellules T nécessite un signal provenant du TCR et un signal provenant des molécules costimulatrices telles que CD28. L'antigène CD28 est une glycoprotéine de 44 kDa exprimée à la surface de la majorité des cellules T. L'engagement de CD28 par son ligand sur une CPA (B7/CD80) ou par un anticorps permet d'augmenter fortement la réponse induite par le TCR, la prolifération et la production des cytokines [180]. Pour les lymphocytes B, cette interaction induit la prolifération, la différenciation en plasmocytes et la commutation des anticorps. Pour les macrophages et les cellules dendritiques, cette interaction induit la production de cytokines et l'expression de B7/CD80.

Aux points de contact du lymphocyte T avec la CPA, a été décrit une oligomérisation du TCR d'assez grande amplitude, stabilisée par des molécules co-réceptrices et de co-stimulation. Cette oligomérisation serait à l'origine des événements de signalisation intracellulaire consécutifs [180]. Ces grands complexes moléculaires à la jonction cellule T / CPA sont appelés synapses immunes [181]. Leur formation s'accompagne d'une large réorganisation du cytosquelette et semble requise pour induire une activation T complète. Un co-engagement de CD3 et de la molécule accessoire CD28 permettrait une réorganisation importante de microdomaines glycosphingolipidiques au site d'engagement du récepteur T [182]. Brièvement, les microdomaines glycosphingolipidiques ou radeaux lipidiques sont des complexes macromoléculaires enrichis en glycosphingolipides, en cholestérol et en protéines ancrées par un groupement GPI (glycosyl phosphatidyl inositol) [183].

Le premier changement biochimique observé consécutivement à l'engagement du TCR est l'activation des tyrosines kinases de la famille Src, principalement Lck [184] et Fyn [185]. Cette

activation résulterait soit d'une trans-phosphorylation de kinases associées à deux complexes TCRs agrégés soit plus probablement à un TCR associé à un co-récepteur CD4 ou CD8 couplé à Lck. Une fois activées, les kinases phosphorylent les tyrosines de différentes chaînes du CD3 [186].

### 3) Les voies de signalisation associées au TCR

Le domaine intracytoplasmique des chaînes CD3 contient une (CD3- $\gamma$ , - $\delta$  et - $\epsilon$ ) ou trois copies (CD3- $\zeta$ ) d'une séquence consensus d'acides aminés (YxxL/I) [187] appelée Immunoreceptor Tyrosine based Activation Motif (ITAM). La phosphorylation des résidus tyrosines des motifs ITAMs par les protéines tyrosine kinases de la famille Src constitue une des premières étapes de déclenchement de la réponse immunitaire [179]. La phosphorylation des motifs ITAMs est réalisée par deux membres de la famille de protéines tyrosine kinases (PTK) Src retrouvés chez les lymphocytes T : Lck et Fyn, bien que Lck joue un rôle prédominant [188]. Cette phosphorylation initie une série d'événements de signalisation qui mènent à l'activation de la cellule. En premier lieu, elle permet le recrutement et l'activation subséquente d'une autre PTK, ZAP-70. Le domaine SH2 (Src homology 2) de ZAP-70 se lie aux deux tyrosines phosphorylées de chaque motif ITAM de façon hautement spécifique et coopérative [189]. Suite à sa liaison au TCR, ZAP-70 est activé par phosphorylation dans la boucle d'activation du domaine kinase et cette phosphorylation est effectuée par des PTKs de la famille Src. Deux substrats connus de ZAP-70 sont les protéines adaptatrices transmembranaires appelées linker for activation of T cells (LAT) et SH2-domain-containing leukocyte protein of 76 kDa (SLP-76) [190]. La phosphorylation sur les résidus tyrosine de LAT et SLP-76 ordonne le recrutement de plusieurs protéines impliquées dans l'activation de la voie Ras, dans la mobilisation de calcium et dans la réorganisation du cytosquelette [191].

La phospholipase  $C\gamma 1$  est une des protéines recrutées par LAT et joue un rôle critique dans la signalisation du TCR. Son activation est responsable de la libération des seconds messagers que sont le diacylglycérol (DAG) et l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) par clivage du phosphatidylinositol 4,5 biphosphate (PI) à la membrane plasmique. Ces seconds messagers sont essentiels à l'activation de la cellule T. Le DAG active plusieurs protéines telles que les diverses isoformes de la protéine kinase C (PKC) et Ras guanyl-nucleotide-releasing protein (RasGRP) alors que l'IP3 se lie à son récepteur à la surface du réticulum endoplasmique entraînant le relargage des stocks de calcium du réticulum dans le cytoplasme [192]. Cet événement provoque l'ouverture des canaux calciques à la membrane plasmique, permettant un influx de calcium

extracellulaire [193]. L'augmentation de la concentration de calcium provoque l'activation de la calcineurine en levant les effets inhibiteurs de la calmoduline [194]. L'activation de la calcineurine mène à la déphosphorylation du facteur de transcription NFAT lui permettant ainsi d'entrer dans le noyau où il coopère avec d'autres facteurs de transcription pour se lier à des promoteurs [195].

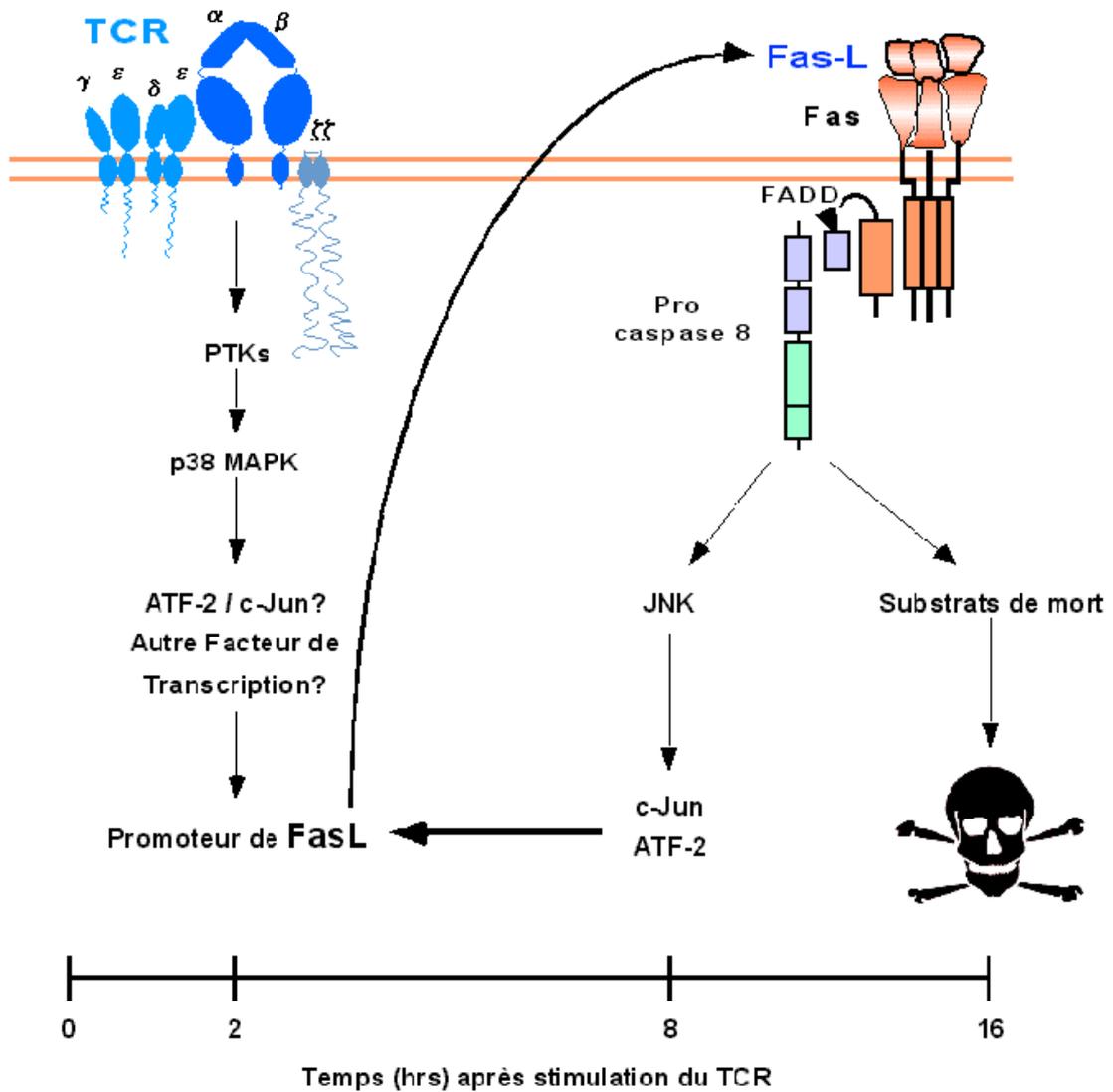
Une voie de signalisation parmi les plus anciennes et les mieux conservées dans l'évolution [196], la voie des mitogen-activated protein kinases (MAPK), est également activée par le TCR. Il existe trois groupes de MAPK chez les cellules de mammifères qui sont la voie de l'extracellular signal-regulated protein kinases (ERK), les kinases p38 et la famille des c-Jun NH2-terminal kinases (JNK). Ces MAPK sont activées par la phosphorylation simultanée d'une thréonine et d'une tyrosine sur un motif tripeptidique différent pour chaque groupe de MAPK. Les MAPK sont activées par des MAP kinase kinases (MAPKK), pour ERK se sont MEK-1 et MEK-2, pour les kinases p38 il s'agit de MKK3 et MKK6 alors que pour les membres du groupe JNK il s'agit de MKK4 et MKK7. Ces MAPKK sont à leur tour activées par différentes MAP kinase kinase kinases (MAPKKK). Différents signaux peuvent mener à l'activation de ces MAPKKK. Pour la voie ERK, la MAPKKK est un membre de la famille Raf (Raf-1, Raf-A ou Raf-B) qui est activé par la petite protéine G Ras [197].

Plusieurs MKKK ont été proposées pour p38 et JNK dont MEKK1, MLK2, MLK3, ASK1 et TAK1 [198]. La famille de protéines kinases Pak avait également été suggérée comme MKKK mais une étude a montré que Pak-1 phosphoryle MEKK1 mais que cette phosphorylation empêche l'activation de JNK [199]. Une autre étude a montré que Pak recrute MLK2 via la molécule adaptatrice Nck mais n'est pas capable lui-même d'induire l'activation de la voie JNK [200]. En amont des MKKK la voie des MAPK p38 et JNK est activée par des GTPases de la famille Rho [201].

Les diverses voies de signalisation induites par le TCR culminent en l'activation de facteurs de transcription dans le noyau de la cellule qui permettent l'expression de gènes. Ainsi NFAT est activé lorsqu'il est déphosphorylé par la calcineurine. ATF-2, Jun et Elk-1 sont respectivement activés par p38, JNK et ERK. Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B est activé seulement lors de la stimulation du TCR et de la costimulation de CD28. La sérine/thréonine kinase Akt activée par le CD28 doit participer avec les MAPKKKs à l'activation du complexe hétérotrimérique de l'I $\kappa$ B kinase (IKK) [202] Ce complexe régule l'activité de NF- $\kappa$ B en phosphorylant I $\kappa$ B qui sera par la suite ubiquitinylé et dégradé. Libéré de son association avec I $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B peut alors être transporté au noyau et activer la transcription (cf. Figure 9).

**Figure 9 : Modèle de régulation de l'expression de FasL durant l'AICD des cellules T induite par le récepteur T.**

L'engagement du TCR conduit à l'activation des kinases de la famille Src, ce qui aboutit à l'activation de p38MAPK. p38MAPK phosphoryle divers facteurs de transcription (par exemple ATF-2), qui peuvent se fixer sur le promoteur de FasL et ainsi activer la transcription du gène. Une fois FasL traduit, il est adressé à la membrane plasmique où il va interagir avec son récepteur (Fas). L'interaction Fas/FasL aboutit à l'activation des caspases qui vont, entre autre, activer les JNK. Les JNK activées vont promouvoir l'AICD en régulant l'expression de FasL et ainsi amplifier le signal. Il semble que p38MAPK et JNK puissent réguler l'expression de FasL à des étapes différentes suite à l'activation. D'après [203] .



## C) Apoptose lymphocytaire T

L'apoptose des lymphocytes T matures permet de préserver l'homéostasie périphérique et la tolérance en prenant en compte les profonds changements du nombre et du type de cellules T stimulées par les antigènes. Il existe au moins deux voies conduisant à l'apoptose des cellules T : une voie induite par l'antigène, l'apoptose dite « active » et une voie induite par la privation en lymphokines, l'apoptose dite « passive » [204].

La réponse d'une cellule T à un antigène se passe en deux étapes : une phase d'activation suivie d'une phase de prolifération [205]. Un des éléments-clé de la phase d'activation est l'induction des gènes de l'IL-2 et de ses récepteurs de haute affinité. Lorsqu'une cellule T au repos est activée par un antigène (Ag), il y a peu ou pas d'apoptose induite par le TCR afin de permettre à la réponse immunitaire de se développer [206, 207]. En revanche, suite à un ou plusieurs cycles cellulaires, les cellules T deviennent sensibles à l'apoptose [208, 209]. Ceci explique pourquoi des hybridomes T, qui sont des cellules en perpétuelle expansion, meurent par apoptose suite à un engagement du TCR. L'IL-2 est capable de promouvoir l'apoptose induite par l'antigène *in vitro* ainsi que la mort induite par un super-antigène *in vivo* [210]. Ceci confère à l'IL-2 un rôle fondamental de régulateur de l'apoptose des cellules T. Ce rôle est confirmé par l'étude des souris invalidées pour les gènes de IL-2 ou de ces récepteurs [211]. En effet, ces souris présentent une accumulation de cellules T activées couplée à une apoptose défectueuse induite par le TCR.

### 1) Apoptose des lymphocytes T matures

La grande majorité des lymphocytes sont quiescents, c'est à dire qu'ils sont bloqués au stade G0 du cycle cellulaire et qu'ils ne présentent aucune des fonctions effectrices des cellules activées. Afin de prévenir tout effet délétère pour l'organisme, le nombre de cellules T est étroitement contrôlé par un phénomène de mort cellulaire programmée. L'apoptose des cellules T implique principalement deux voies :

- d'une part l'apoptose passive lorsque les cellules T sont privées de facteurs de croissance (IL-2, IL-4, IL-9, IL-15, IL-21) permettant l'activation de facteurs anti-apoptiques tels que Bcl-2 et Bcl-XL ;
- d'autre part l'apoptose active ou AICD induite par la fixation de l'IL-2 sur son récepteur.

## 2) Apoptose induite par l'antigène : apoptose « active » ou AICD

L'apoptose active nécessite l'engagement du TCR et implique les cytokines de mort, telles que FasL et TNF [212]. Dans les cellules au repos, les gènes du TNF- $\alpha$  et de FasL sont très peu induits par la stimulation du TCR ; en revanche, ces cytokines sont fortement induites dans les cellules T stimulées par l'IL-2. Le principal mécanisme de l'apoptose active repose sur l'induction de Fas L par l'IL-2 à la surface des lymphocytes T activés. Fas-L, en se liant à Fas qui est exprimé aussi à la surface des lymphocytes, produit un signal suicidaire de mort qui conduit à l'activation de caspases. L'apoptose induite par l'IL-2 pourrait favoriser l'apparition de lymphocytes T régulateurs [213]. En effet, les cellules apoptotiques externalisent des résidus phosphatidylsérine qui favorisent leur élimination par des phagocytes possédant des récepteurs de phosphatidylsérine. La phagocytose de ces cellules apoptotiques pourrait provoquer la synthèse de cytokines immunorégulatrices, telles que l'IL-10 et le Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Celles-ci suppriment la réponse inflammatoire et régulent la réponse immunitaire en favorisant l'émergence de lymphocytes T régulateurs [214].

Les souris présentant les mutations *gld* et *lpr* (mutation respectivement sur FasL ou Fas) présentent des défauts majeurs de l'apoptose des cellules T et souffrent d'un syndrome lymphoprolifératif et de maladies auto-immunes. L'expansion dramatique des cellules lymphoïdes chez ces souris illustre bien l'importance de l'apoptose pour la régulation des cellules T [215, 216]. Les cellules déficientes pour Fas présentent une mort induite par le TCR, bien que celle-ci soit réduite, suggérant que d'autres mécanismes d'apoptose puissent suppléer au déficit du système Fas/FasL.

En définitive, l'apoptose active induite par le TCR se produit en deux étapes : il y a tout d'abord stimulation du TCR qui aboutit à la production de FasL et/ou de TNF- $\alpha$  puis interaction de ces cytokines avec leurs récepteurs spécifiques et activation de la voie extrinsèque.

Plusieurs autres protéines sont directement associées à Fas ou influencent son activation. Par exemple, FAP-1 est une phosphatase qui se lie au récepteur et inhibe l'apoptose [217]. L'expression sélective de FAP-1 dans les cellules T Th2 CD4+ pourrait expliquer la sensibilité moindre des cellules Th2 à l'apoptose induite par Fas [218]. D'autres protéines telles que DAXX [219], FLASH [220] ou Toso [221] jouent un rôle dans la régulation de l'apoptose induite par les récepteurs de mort. Toso est un membre de la super famille des immunoglobulines. Il est capable de bloquer spécifiquement l'apoptose induite par les TNF-R, dont Fas notamment et joue probablement un rôle dans le devenir des cellules T [221]. Les auteurs suggèrent que Toso est capable de former des complexes avec d'autres protéines de surface et ainsi initier un signal anti-

apoptotique. DAXX se lie au domaine cytosolique du récepteur Fas et augmente la sensibilité des cellules à l'effet pro-apoptotique de Fas. Cette augmentation résulte probablement d'une modulation de la transcription de gènes impliqués dans l'activation des caspases et dans l'apoptose induite par Fas [219].

### **3) Apoptose induite par la privation en lymphokines : apoptose**

#### **« passive »**

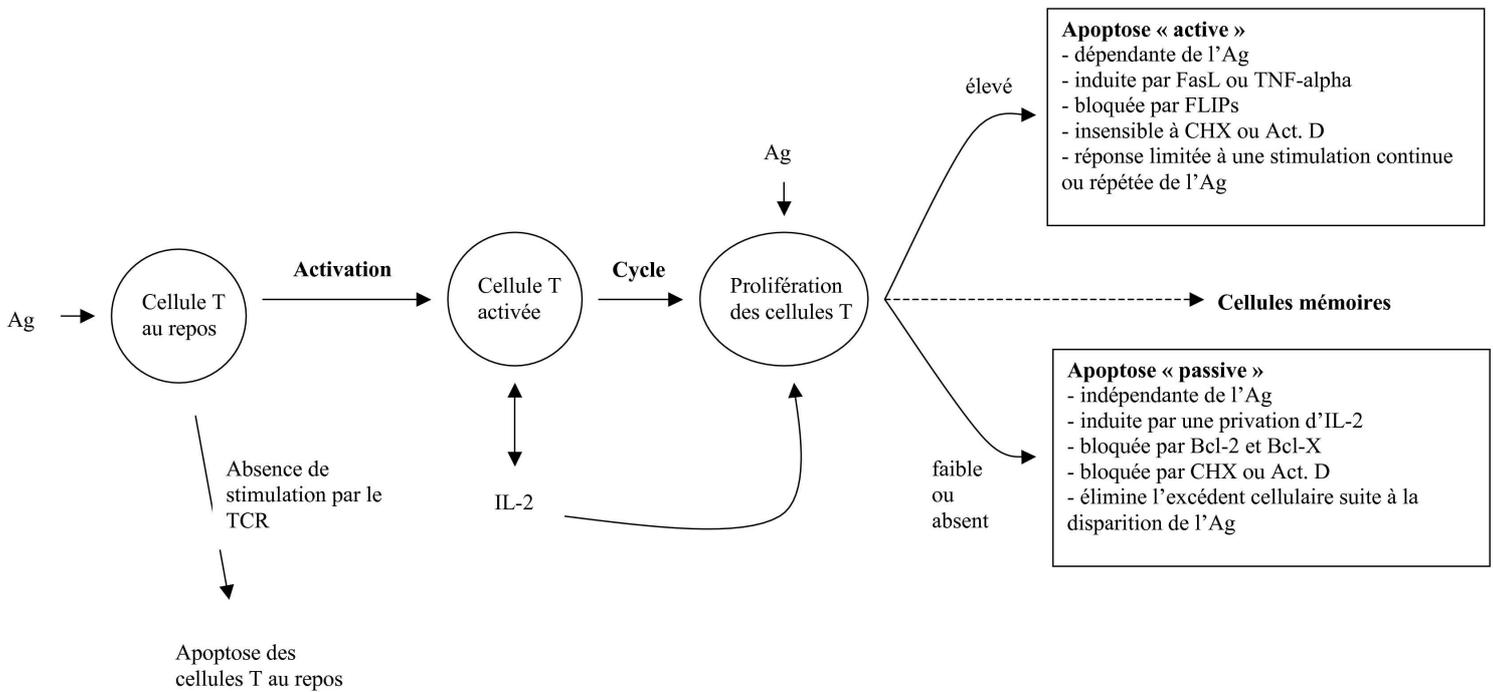
L'apoptose dite passive permet de diminuer le nombre de cellules T une fois que la réponse immune est terminée (cf. Figure 10). Ainsi, en l'absence de nouvelle stimulation par l'Ag, l'expression de l'IL-2 et de ces récepteurs diminue, aboutissant à une apoptose par privation en lymphokines. En revanche, si les cellules T sont fortement stimulées par un Ag, il se produit une apoptose induite par l'Ag ou apoptose dite active. La mort se produit lors du ré-engagement du TCR à plusieurs reprises successives ou lors de la présence de l'Ag de manière continue. Il semble qu'une fraction des cellules T puisse échapper à la fois à l'apoptose active et passive. Elles vont former au niveau hépatique un réservoir de cellule T mémoire.

Un des effets majeurs qui accompagne la disparition d'un Ag à la fin d'une réponse immune est la délétion massive et sélective des cellules T activées. Le fait que la diminution de la réponse à l'Ag coïncide avec l'atténuation du nombre de lymphocyte suggère que l'apoptose passive résulte de la disparition d'une substance trophique importante comme l'IL-2. Ainsi *in vitro*, les cellules T en prolifération enclenchent rapidement un programme apoptotique lorsqu'elles sont privées d'IL-2 [222].

**Figure 10 : Apoptose des lymphocytes T matures.**

La réponse d'une cellule T à l'antigène se produit en deux étapes distinctes : une étape d'activation qui conduit à la production de l'IL-2 et une étape de prolifération induite par l'IL-2. Les cellules T qui se divisent deviennent hautement susceptibles à l'apoptose mais reste sous la dépendance des conditions environnementales. L'apoptose active se produit suite à une forte stimulation secondaire du récepteur T. L'apoptose passive se produit en l'absence d'antigène et en l'absence de stimulation par l'IL-2. Une petite proportion des cellules échappent aux deux voies et vont probablement former la population mémoire. D'après [223].

CHX : cycloheximide ; Act. D : actinomycine D ; FLIP : FLICE Inhibitory Protein



Fas est un co-facteur important de la stimulation des lymphocytes T induite par l'IL-2. Il peut induire une angiogenèse et participer à la régénération tissulaire. Le couple Fas/FasL, au même titre que la paire granzyme B/perforine joue un rôle prépondérant dans la cytotoxicité des lymphocytes T. Ces deux mécanismes coopèrent pour permettre l'élimination de la cellule cible par un processus d'apoptose [224]. Dans le cas du couple granzyme B/perforine, la perforine libérée à l'interface entre le LTc et la cellule cible forme un canal. Ce canal permet au granzyme B, une protéase à sérine possédant une spécificité de clivage identique à celle des caspases, de pénétrer dans la cellule cible afin d'activer directement les caspases effectrices et par voie de conséquence, d'induire l'apoptose [225]. Desbarats et al. [226] ont démontré que Fas peut induire la croissance de neurites, soit dans les cellules d'une lignée issue d'un neuroblastome, soit dans des cultures primaires de neurones obtenues à partir du ganglion dorsal supérieur. Fas stimule également la repousse axonale après lésion par écrasement du nerf sciatique et tout ceci sans aucune induction apparente d'apoptose. L'inhibition de la MAP-kinase ERK inhibe également l'effet de Fas. Chez la souris *lpr-cg*, où une mutation de Fas interdit son couplage aux caspases, l'induction de la croissance neuritique est identique à celle de la souris sauvage, confirmant l'absence d'effet d'un inhibiteur de caspases. L'effet observé de Fas sur les neurones est donc indépendant de l'activité caspase. Les auteurs suggèrent que l'environnement local et le niveau d'activité de la MAP-kinase ERK déterminent l'effet final de Fas.

Tout comme l'apoptose « active », l'apoptose « passive » conduit à l'activation des caspases et peut être modulée par les membres de la famille Bcl-2. Elle ne semble pas impliquer les cytokines de mort ou leurs récepteurs mais semble plutôt être une conséquence des dommages subis par la mitochondrie [227].

## D) Apoptose et sepsis

L'exacerbation des processus apoptotiques au cours du choc septique semble être responsable d'une élimination excessive des cellules immunocompétentes, plus particulièrement lymphocytaires, [228]. Ce mécanisme a été mis en évidence par des travaux expérimentaux chez l'animal et dans des travaux cliniques chez l'homme que nous allons détailler.

### 1) Chez l'animal

Dans le modèle d'infection grave chez la souris par péritonite expérimentale, il existe une augmentation importante des phénomènes apoptotiques des cellules immunitaires, des cellules bronchiques, intestinales, hépatiques et vasculaires [29]. L'injection intrapéritonéale de bactéries induit une atrophie thymique associée à une apoptose prédominante des lymphocytes CD4+ et CD8+, phénomène également observé au niveau des cellules épithéliales bronchiques, intestinales, des hépatocytes et des cellules endothéliales vasculaires [176]. D'autres études ont montré, lors de sepsis expérimentaux une corrélation entre le taux d'apoptose des hépatocytes et la baisse d'expression de gènes anti-apoptotiques comme Bcl-2 et Bcl-XL, ainsi qu'une augmentation tardive de l'expression de Bax, gène pro-apoptotique [229]. Les études des gènes appartenant à la famille de Bcl-2 (surexpression, gène knock-out) ont permis de montrer l'impact de leur expression sur l'apoptose observée dans le choc septique et la relation directe avec la survie des animaux. En effet, le rapport d'expression Bax/Bcl-2 semble être un bon indicateur de la susceptibilité des cellules à entrer en apoptose [230]. Plus le rapport Bax/Bcl-2 est faible, moins la cellule est susceptible de déclencher son programme de mort cellulaire en réponse à un stress oxydatif, à la présence de radicaux libres ou à certaines molécules antimitotiques. Les souris n'exprimant pas Bcl-2, bien qu'apparaissant normales dans les premières semaines de développement, montrent par la suite un retard de croissance, une immaturité morphologique mais surtout une mortalité précoce. Celle-ci est liée à une apoptose des cellules du thymus et de la rate avec pour conséquence une diminution du nombre de lymphocytes circulants [85]. Dans un modèle de sepsis murin par péritonite expérimentale, la prévention de l'apoptose lymphocytaire par la surexpression du gène Bcl-2, du gène codant pour l'IL-10 ou l'inhibition pharmacologique de la caspase-3 ont permis de réduire significativement l'apoptose des cellules thymiques, lymphocytaires et spléniques avec comme corollaire une meilleure survie des animaux traités [231-233].

## **2) Chez l'homme**

Chez l'homme, des phénomènes similaires d'apoptose des cellules immunitaires ont été observés. Dans une étude post-mortem de 20 patients décédés de choc septique [234], Hotchkiss et al. observent une augmentation significative de l'apoptose des lymphocytes de la rate et des cellules épithéliales coliques. L'apoptose lymphocytaire splénique touche essentiellement les lymphocytes T CD4+, alors que les lymphocytes T CD8+ et les lymphocytes Natural Killer ou NK sont préservés. Une activation plus importante de la caspase 3 dans les lymphocytes a été observée dans le groupe septique.

Ces données concernant les lymphocytes ont été confirmées par des travaux montrant [32] que l'intensité et la durée de la lymphopénie sont des facteurs de mauvais pronostic. Ces données confirment également que l'apoptose lymphocytaire observée chez les patients en choc septique est significativement augmentée par rapport à des patients atteints d'autres pathologies aiguës graves mais non reliées à l'infection. Ce même type de phénomène a été observé sur des monocytes circulants, chez lesquels existe une perturbation du potentiel mitochondrial ainsi qu'une diminution du marquage de la protéine Bcl-2 [235]. Il semble exister une forte tendance à l'apoptose des monocytes chez les patients en état de choc septique comparés à ceux de sujets sains [236]. L'intensité des lésions et la lymphopénie semblent en relation avec la durée du choc précédant le décès.

## **E) Une variabilité de la réponse infectieuse d'origine génétique**

Pour comprendre la variabilité de réponse des patients au choc septique, différentes hypothèses physiopathologiques ont été émises. En particulier, cette variabilité de la réponse immunitaire pourrait avoir un déterminant d'origine génétique, conduisant à une réponse immuno-inflammatoire innée plus ou moins adaptée. En effet, l'importance des facteurs génétiques dans la survenue de pathologies infectieuses sévères a été démontrée chez l'homme grâce à diverses approches. Les études épidémiologiques ont rapporté depuis longtemps l'existence de différences d'incidence de certaines infections entre ethnies différentes vivant dans le même milieu [237]. L'importance mineure des facteurs liés à l'environnement dans la survenue d'infections a été confirmée par les études d'enfants adoptés et de jumeaux. La place des facteurs génétiques dans la physiopathologie de certaines affections apparaît de plus en plus importante, essentiellement en déstabilisant un équilibre physiologique fragile comme la cascade immuno-

inflammatoire et en favorisant l'émergence d'un phénotype pathologique [238, 239]. Toutefois ces études s'attardaient sur le rôle de la variabilité génétique dans la susceptibilité aux infections dans un cadre extra-hospitalier, chez des patients antérieurement sains et non chez des patients hospitalisés présentant parfois plusieurs pathologies sous-jacentes et soumis à de multiples agressions d'origines infectieuses ou non.

## 1) Les Toll-like récepteurs

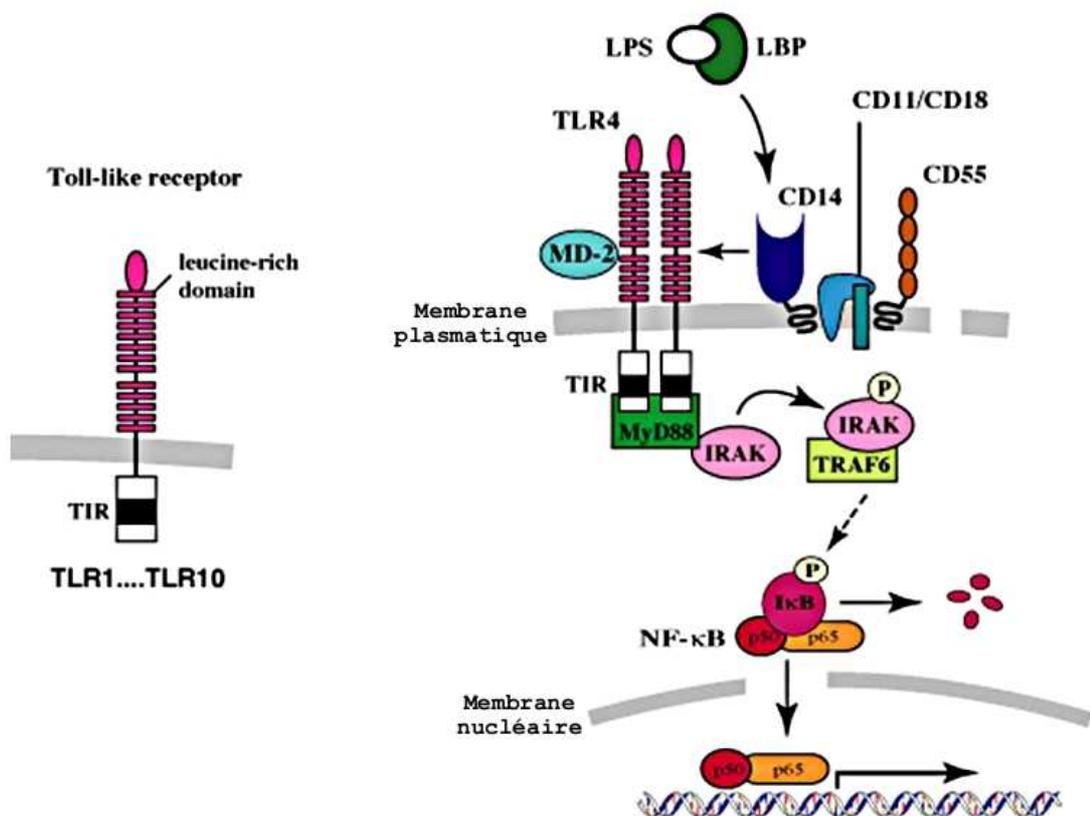
Ces déterminants génétiques seraient liés à la reconnaissance des micro-organismes pathogènes par le système immunitaire. En effet, le puissant effet inducteur sur la réponse immunitaire des fractions des membranes bactériennes est connu depuis longtemps. Le LPS des bactéries Gram négatif ou l'acide lipotéichoïque des bactéries Gram positif sont susceptibles de mimer les symptômes du sepsis, voir du choc septique : c'est le choc endotoxinique [240]. Une des raisons de ce phénomène est la synthèse massive de TNF- $\alpha$  dont le gène est induit par une voie de signalisation intracellulaire impliquant une protéine appelée CD14, caractérisée par la présence de domaines riches en résidus leucine dits Leucine Rich Repeats (LRR). Ce récepteur CD14 capable de fixer le LPS peut être circulant, mais il est principalement présent sur de nombreuses cellules du système immunitaire, fixé à la membrane par une ancre GPI. Cependant, la simple présence de l'ancre GPI ne permet pas au récepteur CD14 d'activer des cascades de signalisation intracellulaire conduisant à l'expression de gènes de la réponse immunitaire.

D'autres études ont montré que la voie de signalisation de l'IL-1, cytokine pro-inflammatoire, est impliquée dans la reconnaissance des agents pathogènes, en activant NF- $\kappa$ B ainsi que la transcription de certains gènes de la réponse immunitaire [241]. Le domaine extracellulaire du récepteur de l'IL-1 est composé de motifs de type immunoglobuline et non par des LLR comme c'est le cas pour CD14. Le domaine intracytoplasmique du récepteur de l'IL-1 capable d'activer NF- $\kappa$ B, a une séquence en acides aminés proche de celle d'un récepteur transmembranaire de la drosophile appelé Toll [242]. Les travaux de l'équipe de Nüsslein-Volhard [243] ont montré que ce récepteur joue un rôle dans le contrôle de la mise en place de l'axe dorsoventral chez l'embryon de drosophile et active un homologue de NF- $\kappa$ B. Le domaine intracytoplasmique a été appelé Toll-Interleukine1 Receptor domain (TIR domain) [244]. Des expériences ultérieures sur la réponse antimicrobienne innée de la drosophile ont montré que Toll joue également un rôle clef dans la défense immunitaire [245, 246]. Or, le récepteur Toll de la drosophile possède un domaine extracellulaire de type LRR, comme la molécule CD14 et un domaine intracytoplasmique TIR, capable de déclencher la signalisation intracellulaire aboutissant à l'activation de NF- $\kappa$ B [247].

En 1997, l'équipe de Janeway [248] a isolé le premier récepteur de type Toll à partir de banques d'ADN humain. Ils ont montré dans un système de cultures cellulaires que ce récepteur pouvait activer NF- $\kappa$ B, mais également l'expression de gènes codant pour des protéines costimulatrices et des cytokines [249]. La première preuve que les TLR jouent effectivement un rôle *in vivo* dans la défense immunitaire chez un mammifère a été apportée par l'équipe de Beutler [250]. L'existence de souches mutantes de souris C3H/HeJ ne répondant pas au LPS était déjà connue avant la découverte des TLR [251]. Ces souris dont la résistance aux bactéries à Gram-négatif (source de LPS) est faible ne développent pas de choc septique, même après injection massive de LPS. Le clonage positionnel de la mutation *lps* responsable de ce phénotype a montré que cette mutation affecte un gène codant pour le TLR-4, le récepteur du LPS [252]. Le défaut de signalisation du récepteur TLR-4 lié à cette mutation rend ces souris insensibles à l'injection de LPS. Mais ce défaut de signalisation entraîne un retard dans le déclenchement des mécanismes de défenses immunitaires, provoquant chez ces animaux une sensibilité accrue à l'infection par les bactéries à Gram-négatif. Depuis la découverte du premier récepteur Toll chez l'homme, d'autres récepteurs de cette même famille ont été identifiés. Ils reconnaissent des motifs structuraux très divers et essentiellement d'origine microbienne : TLR-3 reconnaît l'ARN double brin d'origine virale, TLR-4 reconnaît le LPS, TLR-5 la flagelline, TLR-9 des séquences d'ADN CpG non-méthylées propres à certains microorganismes [245] (cf. Figure 11).

**Figure 11 : Voie de signalisation des TLR.**

Quand un TLR est activé, il recrute une molécule adaptatrice pour propager le signal au niveau du domaine TIR. A ce jour, quatre adaptateurs sont connus dans la signalisation TLR : MyD88, TIRAP (aussi appelé MAL), TRIF et TRAM. Ces adaptateurs activent d'autres protéines au sein de la cellule via des cascades de phosphorylation, y compris certaines protéines kinase (IRAK1, IRAK4, TBK1 et IKKi). Les kinases IKK phosphorylent alors les molécules inhibitrices des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B, les I $\kappa$ B, ce qui conduit à la dégradation de ces inhibiteurs. Les facteurs NF- $\kappa$ B ainsi libérés peuvent pénétrer dans le noyau, entraînant l'induction ou la suppression de gènes qui orchestrent entre autre la réponse immuno-inflammatoire. D'après [253].



## 2) L'importance des polymorphismes génétiques

Des polymorphismes ont été décrits dans la littérature pour le récepteur TLR-2 et pour le récepteur TLR-4 humain. Ces polymorphismes ont été impliqués dans des pathologies infectieuses humaines [254]. L'équipe d'Arbour et al. [255] a démontré qu'il existe un polymorphisme de séquence au niveau des récepteurs TLR-4 responsable d'une différence de

réponse au LPS inhalé. Ce polymorphisme touche l'exon 4 du gène, où plus d'une dizaine de polymorphismes sont décrits, mais seul deux situés respectivement en 299 (Asp299Gly) et 399 (Thr399Ile) de la séquence des acides aminés ont été observés. Toutefois il semble évident que la seule présence d'un polymorphisme ne constitue pas en soi un facteur suffisamment déterminant pour expliquer à lui seul l'ensemble de la physiopathologie de l'infection grave. Des études sont en cours pour permettre de mieux appréhender le poids de ces variations génétiques dans la susceptibilité aux infections et le développement de syndromes infectieux graves [254]. Il reste probable que dans le cadre de l'infection grave, dont les déterminants sont très nombreux (l'âge, le terrain, la gravité de l'atteinte motivant l'admission à l'hôpital, le statut immunitaire, la fréquence et la durée d'exposition à des dispositifs invasifs, etc.) la plupart de ces facteurs jouent un rôle tout aussi déterminant.

## **F) Une voie de signalisation commune : NF- $\kappa$ B**

En tout état de cause, le lien entre les TLR et l'immunité passe par un élément central de l'immunité, qu'elle soit innée ou adaptative : le facteur de transcription NF- $\kappa$ B, découvert en 1986 par l'équipe de David Baltimore [256]. C'est un activateur transcriptionnel latent de l'immunité innée et adaptative. Les protéines de la famille NF- $\kappa$ B sont des facteurs de transcription particulièrement importants pour l'élaboration et la coordination des réponses immunes et inflammatoires [257, 258].

### **1) Rôle de NF- $\kappa$ B**

De très nombreux stimuli physiopathologiques (antigènes, cytokines, contacts cellulaires, stress, agents pathogènes, etc.) sont susceptibles d'activer NF- $\kappa$ B. Ce facteur contrôle en retour l'expression de gènes diversifiés codant pour des immunorécepteurs, des cytokines et leurs récepteurs, des protéines de la phase aiguë de l'inflammation, de la régulation de la croissance et de la mort cellulaire [259], etc. Les protéines NF- $\kappa$ B sont présentes sous forme d'hétérodimères (dont les principaux membres sont NF- $\kappa$ B1/p50, NF- $\kappa$ B2/p52, RelA/p65, Rel/c-Rel et RelB), retenus dans le cytoplasme sous une forme inactive par une sous-unité inhibitrice de la famille I $\kappa$ B (dont les principaux membres sont I $\kappa$ B-a, b et e). La famille des protéines activatrices est subdivisée en deux grands groupes présentant des différences du point de vue structural et fonctionnel. Le premier groupe (classe I) se compose des protéines p50 et p52 formées à partir des précurseurs p100 et p105. Dans les cellules de mammifères, le second groupe (classe II) se compose des protéines p65/RelA, c-Rel, RelB, v-Rel. Les propriétés de liaison à l'ADN au niveau

des séquences spécifiques  $\kappa$ B impliquent une dimérisation entre deux protéines de la famille Rel. Le potentiel transactivateur des protéines de classe II est bien plus important que celui des protéines de classe I. En effet, p50 et p52 sous forme d'homodimères n'ont qu'une activité transactivatrice faible voire nulle, ce qui leur confère un rôle modulateur ou répresseur de la transcription. En revanche une forme homo ou hétérodimérique de NF- $\kappa$ B formée d'au moins une protéine de classe II (p65/RelA, c-Rel, RelB,  $\nu$ -Rel) possède un fort potentiel transactivateur dû à la présence d'un domaine spécifique situé dans la partie C-terminale de la protéine de classe II. Les protéines de classe I ne possèdent pas un tel domaine. Théoriquement, toutes les associations entre les différentes protéines de classe I et II sont possibles. Les nombreux dimères possibles présentent des affinités différentes selon les sites consensus et des potentialités transactivatrices variables, augmentant ainsi les possibilités de régulation de l'expression des gènes dépendants de NF- $\kappa$ B. Cependant, certaines associations sont rares (RelA/Rel, RelA/RelA, Rel/Rel) voire inexistantes (RelB/RelB, RelB/Rel). A l'inverse, la forme dimérique la plus représentée est composée des sous-unités p50 et p65/RelA [260].

Les sous-unités activatrices présentent une séquence conservée dite RHD (Rel Homology Domain) d'environ 300 acides aminés, située en position N-terminale, intervenant dans leur liaison à l'ADN, dans leur dimérisation et dans l'interaction entre les dimères et les protéines répresseurs I $\kappa$ B. La partie C-terminale de RHD contient un groupe très conservé d'acides aminés chargés fonctionnant en tant que séquence de localisation nucléaire (NLS) nécessaire à la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B. La fixation d'I $\kappa$ B sur un dimère NF- $\kappa$ B masque le signal de localisation nucléaire présent sur chacune des sous-unités du facteur de transcription, empêchant ainsi sa translocation dans le noyau. L'activation du facteur NF- $\kappa$ B à partir du pool cytoplasmique est temporellement corrélée à la dégradation protéolytique du répresseur I $\kappa$ B [261]). Ce phénomène s'articule en trois phases : phosphorylation, ubiquitination et dégradation. L'étape de phosphorylation est nécessaire au processus d'ubiquitination lui-même permettant la protéolyse. Une fois I $\kappa$ B phosphorylé, il est dégradé par le protéasome. Le dimère formé par les deux sous-unités activatrices de NF- $\kappa$ B voit son domaine de localisation nucléaire libéré. NF- $\kappa$ B passe alors dans le noyau et peut alors moduler l'expression de gènes cibles [262].

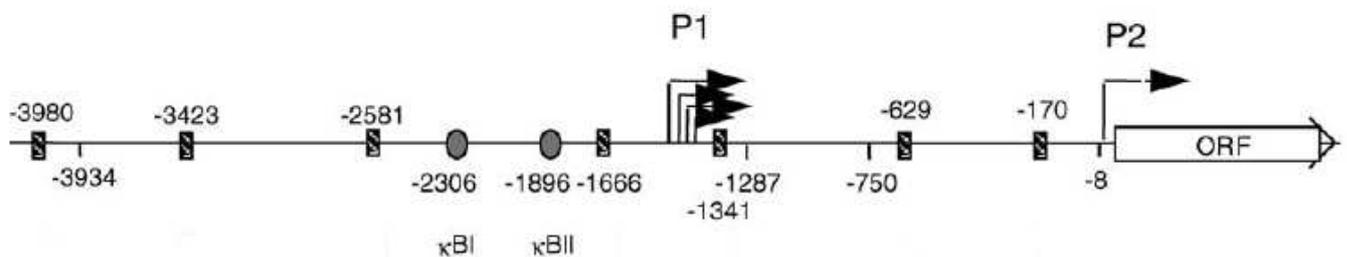
## 2) NF- $\kappa$ B et sepsis

Ce facteur de transcription semble être impliqué dans la mortalité liée au sepsis chez l'homme [263, 264]. Dans l'étude de Arnalich et al.[265], le niveau d'activité de NF- $\kappa$ B est significativement plus élevé chez les patients non survivants (n=23) que chez les patients

survivants (n=11). Le niveau d'activation de NF- $\kappa$ B était aussi bon prédicteur du décès que le score Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II ou APACHE II [266] APACHE II. De plus il existerait une relation entre l'activité de NF-B et les dysfonctions d'organes observées lors du choc septique [267]. L'auteur suggère que ces dysfonctions d'organes sont reliées à une extension des mécanismes apoptotiques à l'ensemble des tissus de l'organisme. En effet, une réduction de l'activation de NF- $\kappa$ B lors de choc endotoxinique prévient l'apoptose des polynucléaires neutrophiles [268] qui sont en partie responsables des dommages cellulaires observés. En effet, NF- $\kappa$ B est susceptible de réguler l'expression des gènes appartenant à la superfamille de Bcl-2 [269] : il existe des sites de liaison de NF- $\kappa$ B sur le promoteur de ces gènes, en particulier sur celui de Bcl-2 (cf. Figure 12) et de Bcl-XL [270, 271]. Des expériences d'inhibition de l'expression de NF- $\kappa$ B ou de blocage des sites de liaisons de NF- $\kappa$ B dans divers types cellulaires ont confirmé que l'expression de ces gènes était directement régulée par ce facteur de transcription [269].

**Figure 12 : Organisation du gène Bcl-2.**

Le gène de Bcl-2 contient deux promoteurs P1 et P2. P1 est situé 1 400 paires de bases en amont de la phase ouverte de lecture (Open Reading Frame ou ORF) et dispose de sites d'initiations multiples (flèches noires). P2 est situé juste avant la phase ouverte de lecture (ORF) et n'a qu'un seul site d'initiation. Deux sites consensus de fixation des sous unités de NF-kB sont situés en -2306 et -1896 (cercles gris). D'après [269].



## 3<sup>ème</sup> partie : vers de nouvelles thérapeutiques de l'infection grave

A partir de ces études sur la physiopathologie du choc septique et l'implication des cytokines pro ou anti-inflammatoires, de nombreuses équipes ont cherché à en établir leur cinétique. Et ce, d'autant plus que certaines cytokines semblaient à elles seules capables de reproduire les symptômes du sepsis [272]. C'est ainsi que chez les volontaires sains, a été mise en évidence une augmentation de TNF- $\alpha$  après injection de LPS, avec en parallèle une augmentation de l'IL-6 et de l'IL-10. Chez les patients septiques, a été également observée une augmentation du taux des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TNF- $\alpha$ ) mais aussi des cytokines anti-inflammatoires (IL-6, IL-10). Cependant aucune corrélation fiable entre les taux de ces cytokines et la mortalité n'a pu être mis en évidence jusqu'à maintenant [273]. Les résultats de ces différentes études concernant les marqueurs de l'inflammation ont abouti à la mise en place d'une vingtaine d'essais cliniques de phase III chez des patients atteints de choc septique. Mais aucune de ces expérimentations thérapeutiques basées sur l'utilisation d'anticorps ou de molécules anti-inflammatoires (anticorps anti-TNF- $\alpha$ , anticorps anti-endotoxines, inhibiteur des caspases, anti-IL-1, anti-IL-1ra, etc.) n'a permis d'améliorer la survie des patients [274].

### 1) Sepsis, coagulation et implication de la protéine C

Les échecs de ces démarches thérapeutiques ont conduit des équipes de recherche à s'intéresser aux mécanismes de la coagulation. En effet, dans le sepsis existe une forte stimulation des voies de la coagulation par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 et l'IL-6. Celles-ci activent une série de cascades protéolytiques conduisant à la déposition des caillots de fibrine au niveau de la micro-circulation. Ceci provoque une diminution de la perfusion tissulaire conduisant à une déchéance multiviscérale. Parmi les facteurs procoagulants, la thrombine joue un rôle essentiel. Elle provient de la prothrombine activée par le facteur Xa. C'est une glycoprotéine formée de deux chaînes polypeptidiques réunies par un pont disulfure. La thrombine se comporte à la fois comme une protéase qui hydrolyse plusieurs facteurs de la coagulation et un messenger qui agit sur des récepteurs cellulaires liés aux protéines G appelés PAR (protease-activated receptors). Par son activité protéasique modulée par les ions Na<sup>+</sup>, la thrombine favorise la coagulation en transformant le fibrinogène en fibrinopeptides et fibrine, en activant le facteur XIII qui stabilise la fibrine et en activant les facteurs V et VIII, notamment au niveau des plaquettes.

Cependant, à cet effet procoagulant s'ajoute un effet anticoagulant indirect : la thrombine en interagissant avec la thrombomoduline fixée à une cellule endothéliale, active la protéine C, laquelle forme avec la protéine S un complexe anticoagulant qui inactive les facteurs Va et VIIIa. Par son activité de messenger, la thrombine active les plaquettes, les cellules endothéliales qui libèrent la prostaglandine I<sub>2</sub>, l'endothéline, le monoxyde d'azote (NO) et le tissu plasminogen activator ; elle favorise la prolifération des fibroblastes et des myocytes, elle augmente l'adhésivité de diverses cellules ; elle possède des effets vasculaires, vasoconstriction par effet direct, vasodilatation par libération de NO ; elle active les leucocytes et les macrophages qui libèrent des cytokines pro inflammatoires [275].

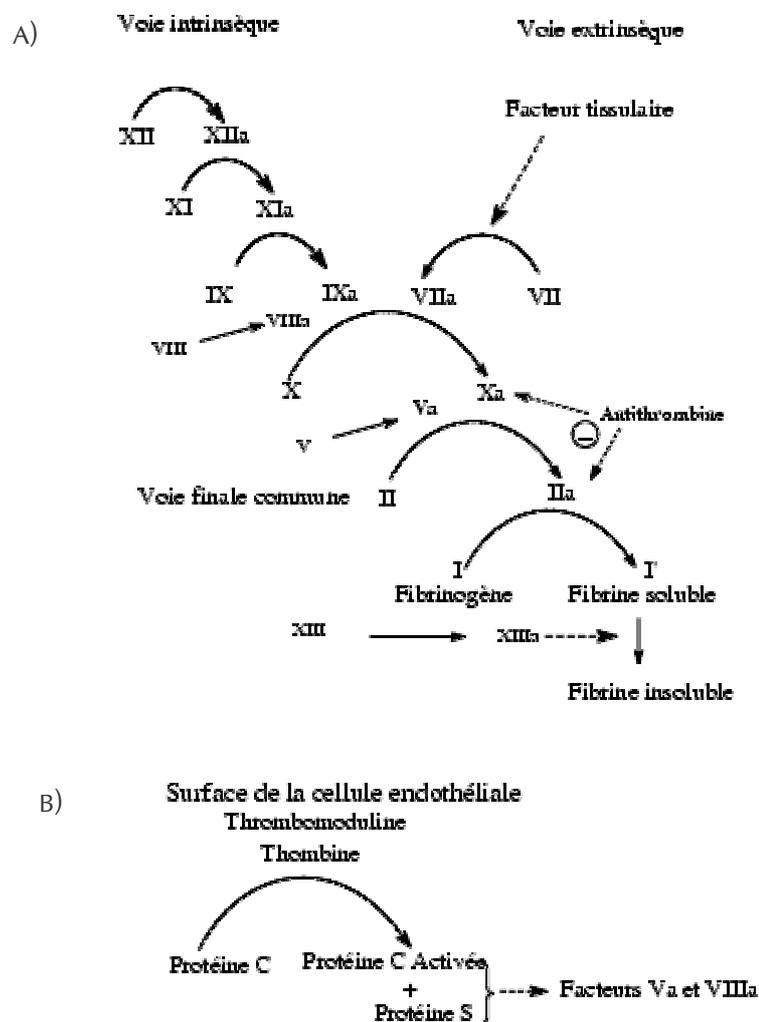
A côté des facteurs procoagulants, il existe des facteurs anticoagulants, notamment l'antithrombine III, la protéine C et la protéine S. Leur déficience se traduit par une augmentation des risques d'accidents thrombotiques. L'antithrombine III, appelée plus simplement antithrombine, est une  $\alpha_2$ -protéine dont le site actif comporte deux acides aminés : l'arginine et la sérine. Elle neutralise pratiquement toutes les protéases à effet procoagulant sauf la VIIa (proconvertine) et est classée parmi les serpinines (serine proteinase inhibitors). Cependant elle neutralise préférentiellement la thrombine IIa et le facteur Xa et beaucoup plus lentement le IXa, le XIa et le XIIIa. Le facteur Xa est protégé de l'action de l'antithrombine lorsqu'il est fixé à des phospholipides ou à la surface des plaquettes activées (cf. Figure 13).

La protéine C, constituée de deux chaînes polypeptidiques reliées par un pont disulfure, est présente dans le sang sous forme inactive. Elle est transformée en protéine C activée (PCA) par le complexe thrombine-thrombomoduline. La protéine C activée possède une activité anticoagulante par inhibition des facteurs Va et VIIIa et favorise la fibrinolyse (cf. Figure). La conversion de la protéine C en protéine C activée nécessite la fixation de la thrombine à la thrombomoduline. Cette conversion est inhibée par la réponse inflammatoire. Les dommages provoqués sur la cellule endothéliale par la réponse inflammatoire à l'infection provoquent une baisse de l'expression de la thrombomoduline. Au final, la réponse inflammatoire de l'hôte contre l'infection conduit au développement d'une atteinte du tissu vasculaire endothélial, des microthromboses avec des ischémies multi-focales conduisant à la dysfonction d'organe et au décès. Un autre phénomène responsable de l'état procoagulant dans le sepsis est la diminution du taux circulant des protéines anticoagulantes comme l'antithrombine, la protéine C et l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire. Ces anticoagulants naturels, outre leur action sur la génération de la thrombine, ont un effet anti-inflammatoire en agissant sur la libération du TNF- $\alpha$  des monocytes et en inhibant l'activation de la transcription de NF- $\kappa$ B et de l'activator protein 1 (AP-1). La

protéine C utilise le récepteur de la protéine C comme un co-récepteur pour le clivage de la protease-activated receptor 1 (PAR-1). L'expression génique du PAR-1 peut intervenir dans l'activation de la PCA et du monocyte chemoattractant protein-1, suggérant un rôle protecteur de l'activation du PAR-1 [276] dans le sepsis (cf. Figure 14). A partir de ces données sur la PCA, il semblait logique de proposer un analogue recombinant de cette molécule afin de limiter l'état procoagulant [277].

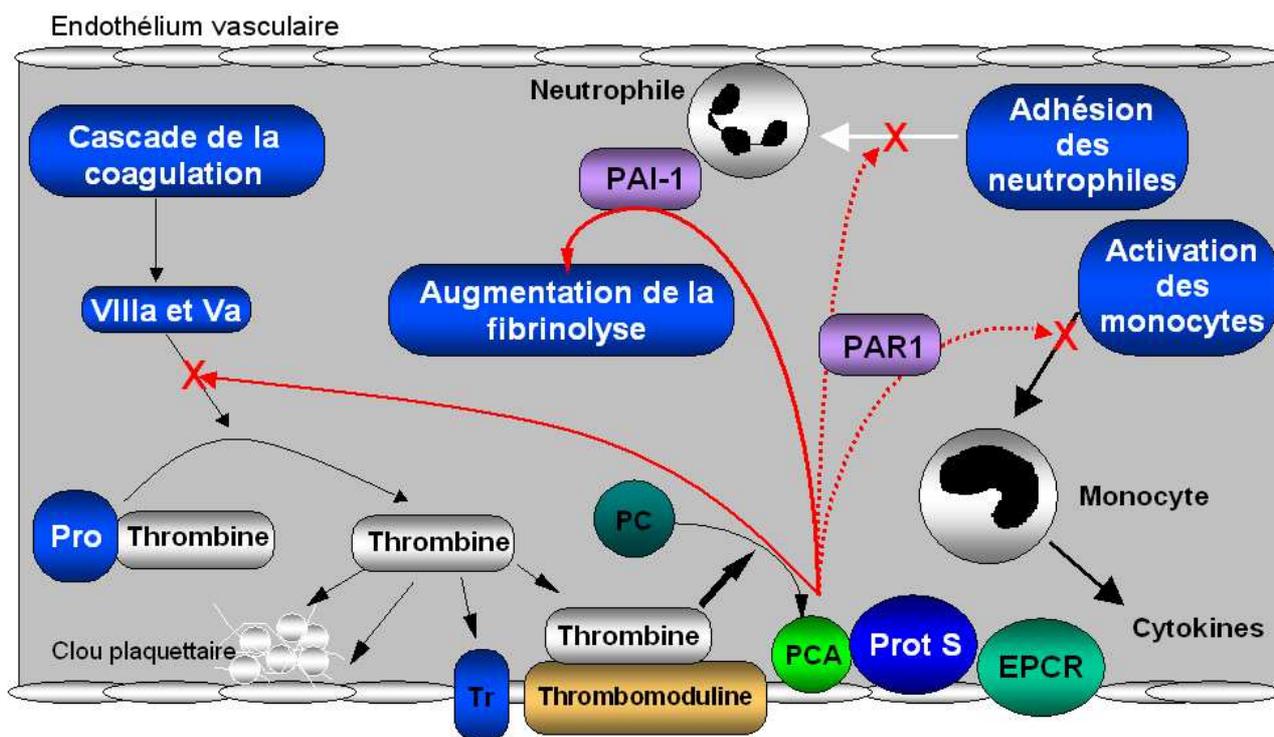
**Figure 13 : La cascade de la coagulation.**

A) Les différentes cascades enzymatiques des voies intrinsèques et extrinsèques conduisent à l'activation du facteur X en Xa. B) La protéine C activée est activée par le complexe thrombine-thrombomoduline, ce qui lui permet de se combiner avec la protéine S afin d'inhiber le facteur Va et VIIIa. D'après [278].



**Figure 14 : Action de la rhPCA sur la modulation du SIRS, sur la coagulation et la réponse fibrinolytique de l'hôte contre l'infection.**

L'inflammation et l'effet pro-coagulant sont étroitement intriqués dans le sepsis. Les agents infectieux et les cytokines pro-inflammatoires comme le TNF-alpha et l'IL-1 activent la coagulation en stimulant la libération du facteur tissulaire des monocytes et de l'endothélium. Ceci conduit à la formation de thrombine et du caillot de fibrine. Les cytokines pro-inflammatoires et la thrombine peuvent inhiber l'effet fibrinolytique en stimulant la libération du plasminogène-activateur inhibiteur 1 (PAI-1) des plaquettes et de l'endothélium. PAI-1 est un inhibiteur du tissu plasminogène activateur (t-PA), nécessaire à la lyse du caillot de fibrine. De plus, la thrombine est capable de stimuler de nombreuses voies pro-inflammatoires et par son effet procoagulant, inhibe la fibrinolyse en activant le thrombin-activable fibrinolyse inhibitor (TAFI). D'après [279].



## 2) Coagulation et protéine C activée

Il a fallu attendre l'année 2001 et l'étude PROWESS (*PROtein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis*) [280] pour que le drotrécogine  $\alpha$  activée ou protéine C activée recombinante humaine (rhPCA) montre son efficacité dans le traitement de l'infection grave. Cette étude multicentrique randomisée en double aveugle a comparé l'efficacité et la tolérance de la rhPCA (24 $\mu$ g/kg/heure en perfusion IV pendant 96 heures) par rapport au placebo chez 1 690 patients ayant un sepsis sévère. Le traitement par protéine C activée a permis une réduction significative de la mortalité à 28 jours (24,7% dans le groupe rhPCA contre 30,8% dans le groupe placebo). Cette amélioration de la survie serait reliée soit à l'effet anticoagulant de la protéine C activée, soit à un effet anti-inflammatoire de cette molécule couplé à un éventuel effet de régulation de l'expression de certains gènes impliqués dans l'apoptose.

Les résultats de l'étude PROWESS montrent qu'à 28 jours, 30,8 % des patients sous placebo et 24,7 % des patients du groupe de l'intervention étaient décédés, ce qui représente une réduction relative de 19,4 % et une réduction absolue de 6,1 % ( $p=0,005$ ) des décès, quelle que soit la cause. La réduction du risque absolu est de 6% entre les 2 groupes en faveur de la rhPCA, ce qui indique que le nombre de personnes à traiter pour éviter un décès à 28 jours serait de 16. Il faut noter que le nombre d'interruption de traitement par suite d'un effet indésirable était plus grand dans le groupe rhPCA que dans le groupe placebo (6,4 % contre 3,6 %;  $p=0,009$ ). Les saignements gastro-intestinaux constituent le motif le plus fréquent d'abandon du traitement (1,3 % contre 0,6 %;  $p=0,138$ ). Enfin, le taux de survenue d'infarctus du myocarde, motif d'interruption du traitement, est plus élevé dans le groupe de l'intervention que dans le groupe du placebo (0,7 % contre 0 %;  $p=0,015$ ).

Toutefois la proportion de patients éprouvant au moins un effet indésirable grave n'est pas statistiquement différente dans les deux groupes, soit 12,5 % dans le groupe rhPCA et 12,2 % dans le groupe du placebo ( $p=0,84$ ). La survenue d'hémorragies graves (à savoir, une hémorragie intracrânienne, une hémorragie mettant la vie en péril, un incident hémorragique jugé grave ou tout saignement nécessitant l'administration de trois unités de concentré de globules rouges pendant deux jours d'affilée) a été plus fréquente dans le groupe rhPCA que dans le groupe du placebo, c'est-à-dire 3,5 % contre 2,0 % ( $p=0,06$ ), ce qui représente un effet indésirable grave observé pour 66 patients traités.

Cependant le bénéfice en terme de mortalité ne semble pas toucher toutes les catégories de patients. Des analyses complémentaires et des observations faites dans le cadre des essais ADDRESS [281] (*ADministration of DRotrecogin alfa [activated] in Early stage Severe Sepsis*) et PROWESS ont montré que, parmi le faible nombre de patients qui ne présentaient qu'un seul dysfonctionnement d'organe et qui avaient subi une chirurgie dans les 30 jours ayant précédé le traitement, les taux de mortalité après 28 jours et de mortalité durant l'hospitalisation étaient numériquement supérieurs dans le groupe de patients traités par rhPCA par rapport au groupe placebo, sans que la différence ne soit statistiquement significative. Des analyses préliminaires *a posteriori* menées dans le cadre de l'étude ADDRESS ont montré un taux de mortalité plus élevé après 28 jours et ceci de façon statistiquement significative chez les patients traités par rhPCA par rapport aux patients sous placebo, au sein du sous-groupe de patients présentant un seul dysfonctionnement d'organe et ayant subi une chirurgie. Dans ce même sous-groupe de patients, le taux de mortalité durant l'hospitalisation était numériquement plus élevé chez les patients traités par rhPCA que chez les patients ayant reçu le placebo, sans que la différence ne soit statistiquement significative. Ceci ne remet pas en cause le bénéfice de la protéine C activée mais montre que certaines catégories de patients semblent bénéficier de ce traitement alors qu'il apparaît un effet délétère pour d'autres (cf. Tableau I).

**Tableau I : Etude de sous-groupes des essais PROWESS et ADDRESS.**

Mortalité toutes causes confondues après 28 jours et mortalité durant l'hospitalisation chez les participants aux essais PROWESS et ADDRESS n'ayant qu'un seul dysfonctionnement organique et ayant subi une chirurgie.

	Mortalité après 28 jours		Mortalité durant l'hospitalisation	
	rhPCA	Placebo	rhPCA	Placebo
PROWESS	10/49	8/49	14/48	8/47
	$p = 0,60 \dagger$		$p = 0,16 \dagger$	
ADDRESS	67/323	44/313	76/325	62/314
	$p = 0,03 \dagger$		$p = 0,26 \dagger$	

† Test du chi carré sans correction en fonction de multiples comparaisons.

### 3) Protéine C activée recombinante et apoptose

Certains auteurs ont relié l'effet bénéfique de la protéine C activée dans le traitement du sepsis à un éventuel effet de modulation de l'expression de gènes impliqués dans la régulation des phénomènes apoptotiques [282]. Des observations chez l'animal ont montré que la protéine C activée est susceptible de diminuer l'expression de Bax (molécule pro-apoptotique) et d'augmenter certains facteurs anti-apoptotiques comme Bcl-2 [283]. De plus, l'activité anti-inflammatoire de la protéine C passerait par une inhibition de la production de TNF- $\alpha$  et du macrophage migration inhibitory factor (MIF), bloquerait l'adhérence leucocytaire via les sélectines, limiterait la réponse inflammatoire induite par la thrombine dans la microvascularisation et diminuerait l'activation de NF- $\kappa$ B dans la cellule cible. En effet des expériences *in vitro* utilisant une lignée monocyttaire ont montré que la protéine C activée est susceptible d'inhiber l'apoptose induite par la staurosporine, sans que le mécanisme impliqué ne soit clairement identifié. Cet effet anti-apoptotique de la protéine C activée associé à son action anti-inflammatoire pourraient expliquer la diminution de la mortalité des patients de l'étude PROWESS. Selon certains auteurs l'activité anticoagulante de la protéine C activée ne suffit pas à elle seule à expliquer l'amélioration de la survie observée. Ceci expliquerait l'absence d'efficacité d'autres traitements à visée anticoagulante comme l'antithrombine ou l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire, qui ne semble pas présenter d'activité anti-inflammatoire et/ou anti-apoptotique [284, 285].

### 4) Vers une sélection des patients traités par protéine C activée

La protéine C activée ne bénéficie qu'à 1 malade traité sur 16, sans qu'il ne soit possible à l'heure actuelle de déterminer les raisons précises qui amènent un patient à répondre favorablement au traitement [286]. Il est probable que des facteurs génétiques peuvent être à l'origine de cette différence d'évolution, mais sans qu'aucune preuve expérimentale ne soit pour l'instant disponible dans le cadre de l'utilisation de cette nouvelle thérapeutique. Il n'est pas démontré que le médicament procure des effets bénéfiques aux patients qui ne rentrent pas dans les critères d'inclusions de l'étude PROWESS. Enfin, chez certaines catégories de patients (score APACHE II inférieur ou égal à 25) il n'apparaît aucun bénéfice de la rhPCA, voire une surmortalité (chirurgie dans les 30 jours précédents l'administration de rhPCA) par rapport au groupe placebo.

Les effets biologiques de la protéine C activée semblent être doubles : d'une part une action sur la coagulation, limitant l'extension des phénomènes de microthrombose. Ces effets sur

la coagulation sont bien documentés mais n'expliquent pas à eux seuls tous les effets de la rhPCA. D'autre part, la rhPCA a des effets anti-inflammatoires et anti-apoptotiques *in vivo* mais dont la preuve expérimentale n'est basée que sur la baisse plus importante de l'IL-6 du groupe traité par rhPCA par rapport au groupe placebo de l'étude PROWESS. Les autres effets biologiques n'ont été observés que dans des études expérimentales *in vitro*, avec des modèles cellulaires utilisant des inducteurs de l'apoptose qui n'ont pas de lien direct avec le modèle physiopathologique du choc septique actuellement connu. En vue d'assurer un usage plus approprié de ce médicament, il nous a semblé utile d'élaborer des protocoles de sélection stricte d'administration afin d'écartier les personnes chez qui le médicament n'apporte pas de bénéfices.

## **Objectifs de notre travail**

---



Le choc septique est une insuffisance circulatoire en réponse à une infection aboutissant parfois vers un tableau de dysfonctions viscérales, conséquence à la fois de la libération de toxines microbiennes et de la relation hôte-pathogène. Au niveau cellulaire, la physiopathologie reste extrêmement complexe et mêle l'activation de différents systèmes, dont l'altération du métabolisme, la production d'espèces radicalaires, l'inflammation, les troubles de la coagulation et l'altération de l'homéostasie cellulaire, l'immunité innée et adaptative, la réactivité vasculaire, etc. [287] Malgré l'amélioration de nos connaissances sur la physiopathologie du sepsis, ces états infectieux graves représentent aujourd'hui encore une source importante de morbidité et de mortalité dans les unités de soins intensifs.

Toutefois, à la lumière des travaux de l'équipe de Hotchkiss [12], il paraît de plus en plus probable que des mécanismes apoptotiques jouent un rôle important dans les processus septiques aussi bien chez l'homme que chez l'animal, en particulier sur le système immunitaire. C'est pourquoi notre travail de thèse s'est concentré sur les mécanismes pouvant réguler l'apoptose lymphocytaire dans le choc septique chez l'homme.

Nous avons débuté notre travail de thèse en 2002 sous la direction conjointe du Pr Oudet et du Pr Schneider en établissant une cinétique des événements apoptotiques lors du choc septique chez l'homme (cf. article 1). Pour cela, nous avons mesuré pour chaque temps l'expression des 2 gènes de la famille de Bcl-2 impliqués dans les mécanismes de l'apoptose, Bax et Bcl-2, en corrélant leur expression avec le taux d'apoptose des lympho-monocytes circulants et les différentes sous-populations lymphocytaires. Nous avons cherché un lien entre l'évolution de ces différents marqueurs apoptotiques et la survie ou le décès des patients. Nous avons mesuré différentes cytokines pro et anti-inflammatoires susceptibles d'avoir un rôle dans les mécanismes d'apoptose observés (IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ ). Enfin, à la suite de ce travail, nous avons réalisé le phénotypage des récepteurs TLR-2 et 4 afin de rechercher un éventuel lien entre les polymorphismes de ces récepteurs et l'expression des différents gènes de la famille de Bcl-2

Dans un second temps (cf. article 2) nous avons étudié les effets directs de la rhPCA sur l'apoptose lympho-monocytaire au cours du choc septique par la mesure de l'apoptose et la quantification des sous-populations lymphocytaires, en corrélant ces données avec les modifications d'expression de gènes régulateurs de l'apoptose (Bcl-2, Bax, Bcl-XL). Dans le même temps, nous avons cherché à confirmer les effets anti-inflammatoires de la rhPCA par la mesure de différentes cytokines pro et anti-inflammatoires.

Enfin, nous avons cherché à montrer si l'action de la rhPCA impliquait le facteur de transcription NF- $\kappa$ B, (cf. article 3) un élément clé dans la régulation de l'expression des principales cytokines pro et anti-inflammatoires. Nous avons mesuré l'expression des principaux facteurs activateurs (p50, p65/RelA) et inhibiteurs (I $\kappa$ Ba) de NF- $\kappa$ B. Nous avons recherché un lien entre l'expression des sous-unités de NF- $\kappa$ B et l'expression des principales cytokines définissant le profil Th1/Th2. Nous avons mesuré les principaux polymorphismes des TLR-2 et 4 afin de pouvoir contrôler un éventuel biais lié aux effets de ces polymorphismes sur la signalisation via NF- $\kappa$ B. Nous avons également recherché s'il existait un lien entre l'expression des différentes sous-unités de NF- $\kappa$ B et les principaux facteurs de la famille de Bcl-2, c'est-à-dire Bcl-2, Bax et Bcl-XL.

## Résultats

---



## Article 1

“ Transient Bcl-2 gene down-expression in circulating mononuclear cells of severe sepsis patients who died despite appropriate intensive care ”

Bilbault, P. \*, **Lavaux, T. \***, Lahlou, A., Uring-Lambert, B., Gaub, M. P., Ratomponirina, C., Meyer, N., Oudet, P., Schneider, F.

Publié dans Intensive Care Medecine, 2004, 30 : p. 408-15

Les deux auteurs ont contribué de façon équivalente à la publication

**Transient Bcl-2 gene down-expression in circulating mononuclear cells of severe sepsis patients who died despite appropriate intensive care**

BILBAULT P., LAVAUX T., LAHLOU A., URING-LAMBERT B., GAUB M. P., RATOMPONIRINA C., MEYER N., OUDET P., SCHNEIDER F.

**Intensive care medicine, 2004, Vol. 30, Pages 408-415**

© Springer. Part of Springer Science+Business Media.

**Pages 94-100 : Article 1**

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1007/s00134-003-2118-z>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

L'objectif de ce travail était d'établir une cinétique des événements cellulaires et moléculaires liés à l'apoptose des lympho-monocytes circulants lors du choc septique chez l'homme à une époque où cette cinétique était méconnue. Pour établir une cinétique la plus précise possible, nous n'avons inclus dans cette étude que des patients atteints d'un choc septique nosocomial afin de pouvoir déterminer avec précision le début de l'infection grave. Nous avons prélevé chaque patient dans une fenêtre de 6 à 12h suivant le début du choc septique, puis 24h, 48h et 7 jours après ce premier temps. Nous avons mesuré l'expression des gènes Bax et Bcl-2 par RT-QPCR, quantifié les différentes sous-populations lymphocytaires par cytométrie en flux et déterminé le taux d'apoptose des lymphocytes totaux. Nous avons également mesuré différents paramètres de l'inflammation (CRP, TNF- $\alpha$ , IL-10 et IL-6).

Nous observons à la phase précoce du choc septique (T1 soit 6 à 12 h après le diagnostic) une lymphopénie plus importante chez les patients qui décèdent par rapport aux patients qui survivent. Cette lymphopénie touche principalement les lymphocytes T sans distinction entre les T CD4+ et les T CD8+. Le ratio CD4/CD8 n'est pas différent entre les patients qui meurent et ceux qui survivent (données non montrées).

Le taux d'apoptose observé dans notre groupe de patients en choc septique est supérieur à celui des témoins sains pris comme référence (valeur moyenne respectivement 15,7 % vs 3,4 %,  $p < 0,0001$ ). En revanche nous n'observons pas de différence de niveau d'apoptose entre le groupe contrôle et le groupe choc septique, ni entre les patients qui survivent et ceux qui décèdent dans le groupe choc septique. L'étude des gènes pro-apoptotique (Bax) et anti-apoptotique (Bcl-2) par une méthode de quantification par PCR en temps réel montre que leur expression ne variait pas au cours du temps chez des sujets sains. En revanche à la phase précoce du choc septique (6 à 12 heures), nous observons une baisse transitoire de l'expression de Bcl-2 d'un facteur 10 chez les patients qui décèdent, sans modification significative de l'expression de Bax. De plus le niveau d'expression de Bcl-2 est corrélé aux taux de lymphocytes circulants à la phase précoce du choc septique Cette corrélation concerne les lymphocytes T ( $r^2=0,665$ ,  $p < 0,0001$ ), les T CD4+ ( $r^2=0,707$ ,  $p < 0,0001$ ) et les T CD8+ ( $r^2=0,599$ ,  $p < 0,0001$ ).

Les ratios TNF- $\alpha$ /IL-10 montrent d'une part qu'à T1 le ratio est plus élevé dans le groupe des patients en choc septique par rapport au groupe contrôle et d'autre part que ce ratio est plus élevé chez les patients qui décèdent par rapport à ceux qui survivent (respectivement 5,1 +/- 2,4 versus 2,8 +/- 1,7 ;  $p < 0,05$ ).

### **Autres cytokines mesurées**

Dans ce travail, afin de préciser le rôle de l'AICD dans la physiopathologie du choc septique, nous avons mesuré le taux circulant d'IL-2. Nous n'avons pas trouvé de taux supérieur au seuil de détection de 2 pg/mL dans notre étude, que ce soit chez les patients en choc septique ou les patients témoins (données non montrées).

### **Recherche des polymorphismes du récepteur TLR-4 et du récepteur TLR-2**

Afin de comprendre le mécanisme moléculaire pouvant provoquer la baisse d'expression de Bcl-2, nous avons recherché quelle voie de signalisation pouvait être à la fois impliquée dans la régulation de l'expression de ce gène anti-apoptotique et dans la réponse immuno-inflammatoire contre les agents pathogènes. Or, la voie de signalisation des récepteurs TLRs, impliqués dans la reconnaissance des agents pathogènes conduit au facteur de transcription NFkB. Ce facteur est lui-même susceptible de réguler l'expression de Bcl-2 ou de Bcl-XL [269]. Enfin la présence de certains polymorphismes sur ces TLRs peut modifier la transduction du signal et pourrait conduire à une modification de l'expression des gènes de la famille de Bcl-2. C'est pourquoi nous avons recherché par une technique de séquençage les principaux polymorphismes des récepteurs TLR-2 et TLR-4.

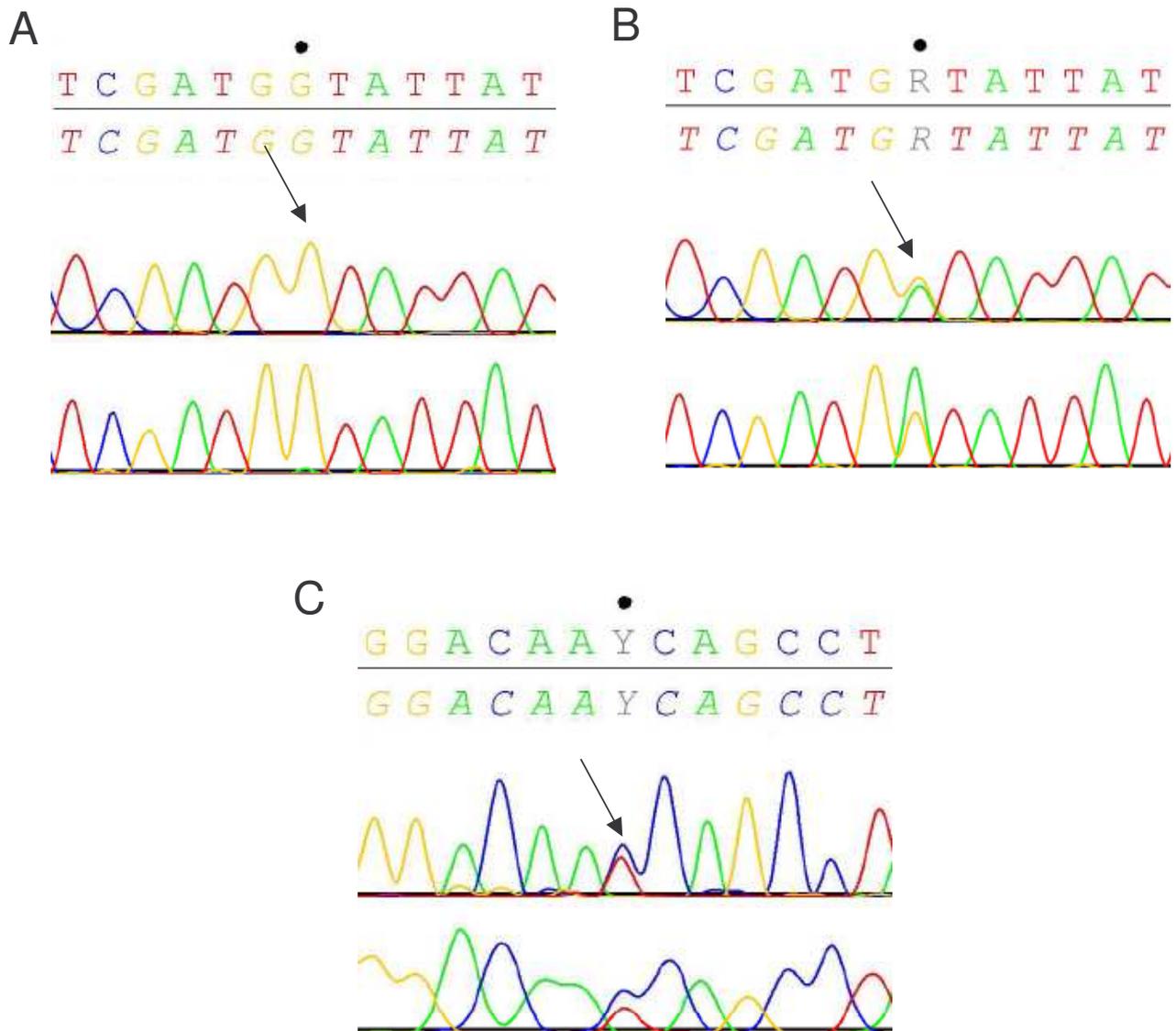
La technique de séquençage utilisée dérive de la technique de Sanger. Après amplification de l'ADN génomique extrait, le produit de PCR est purifié à l'aide de filtres spécifiques (Microcon PCR filter unit, Millipore) qui permettent de débarrasser le produit de PCR des primers en excès, des sels, des dNTPs non utilisés en ne retenant que les fragments d'une taille supérieure à 100 paires de bases. Un contrôle sur gel d'agarose permet d'estimer la taille, la quantité et la pureté du produit de PCR obtenu. Ce contrôle permet d'ajuster la quantité d'ADN qui sera utilisé pour la PCR séquence. Cette PCR s'effectue dans une plaque transparente 96 puits. La composition finale du mix (20µl) est H<sub>2</sub>O : 12µl, mix Big Dye terminator (2µl), tampon (2µl), primer à 5µM (F ou R) 2µl, ADN amplifié et purifié, de 2µl à 8 µl selon l'intensité de la bande sur gel d'agarose.

Le séquençage fait appel à une sequinase qui synthétise un nouveau brin antiparallèle dans le sens 5' vers 3'. Les dexoyNTP sont en compétition avec des didexoyNTP (ddNTP). A chaque fois qu'un ddNTP est incorporé au brin néosynthétisé, l'élongation est stoppée. Le programme d'amplification du thermocycleur comporte une phase de dénaturation initiale à 96°C pendant 1 minute suivie de 25 cycles comportant : une phase de dénaturation à 96°C pendant 10 secondes, une phase d'hybridation à 50°C pendant 5 secondes puis une phase d'élongation de 4 minutes.

Le produit de séquence est précipité à l'aide d'un mélange de 65µl d'éthanol 95°C additionné de 5µl d'EDTA 125mM à pH 8. Après 30 min. d'incubation à température ambiante, la plaque est centrifugée à 3 200 rpm pendant 30 min. Le surnageant est éliminé par retournement de la plaque puis séchage. 10µl de formamide sont ajoutés dans chaque puits avant lecture sur le séquenceur ABI 3100. Les séquences sont analysées à l'aide d'un logiciel spécifique Sequencing Analysis, qui permet la comparaison et l'alignement avec des séquences de références. Les graphiques obtenus pour les polymorphismes du récepteur TLR-4 sont présentés sur la figure n° 15.

Nous avons réalisé le séquençage d'un fragment du gène codant pour le récepteur TLR-4 situé dans l'exon 4. Les deux polymorphismes décrits dans la littérature sont situés respectivement en 299 et 399 de la séquence des acides aminés, sachant que la région séquencée comporte 5 autres polymorphismes recensés par les banques de données. Le séquençage est réalisé pour les deux brins sens et anti-sens de notre ADN et permet la confirmation de la détection d'un polymorphisme sous forme homozygote ou hétérozygote. Le tableau n° II regroupe les résultats pour nos deux groupes de patients. Aucun polymorphisme en dehors de ceux décrits en position 299 et 399 n'a été retrouvé chez nos patients. Nous n'observons pas de différence significative de distribution de ces deux polymorphismes entre les deux groupes, bien que le seul patient homozygote en 299 du groupe choc septique soit décédé de façon précoce. Sur l'ensemble des groupes, il faut noter la présence concomitante des deux polymorphismes en 299 et 399, plus fréquente (8 patients sur 45) que l'apparition d'un seul polymorphisme (1 patient sur 45 ; test Khi 2,  $p < 0,05$ ).

En ce qui concerne le récepteur TLR-2, nous n'observons pas de différence significative de distribution de ces deux polymorphismes entre les deux groupes (cf. Tableau II). Il n'existe pas de relation entre la présence des différents polymorphismes et l'expression du gène Bcl-2.



**Figure 15 : Séquençage d'un fragment de l'exon 4 du récepteur TLR-4.**

A) polymorphisme homozygote situé en 299 de la séquence d'acides aminés : le nucléotide A est substitué par le nucléotide G sur les deux allèles. B) même polymorphisme mais hétérozygote : seul un allèle porte le nucléotide G, l'autre allèle porte le nucléotide A, nous observons un pic double G/A. C) polymorphisme hétérozygote situé en 399 de la séquence d'acides aminés : un allèle porte le nucléotide C, l'autre allèle le nucléotide T, nous observons un pic double C/T.

A)

	TLR-4 299			TLR-4 399		
	Asp299Asp	Asp299Gly	Gly299Gly	Thre399Thre	Thre399Ile	Ile399Ile
<b>Choc septique</b>	3/19	1/19 *	15/19	3/19	0/19	16/19
<b>Contrôle</b>	3/26	0/26	23/26	4/26	0/26	22/26

\* patient hétérozygote pour le TLR4 399

B)

	TLR-2 753		
	Arg753Arg	Arg753Gln	Gln753Gln
<b>Choc septique</b>	0/19	0/19	19/19
<b>Contrôle</b>	0/26	0/26	26/26

**Tableau II : Répartition des polymorphismes des récepteurs TLR-4 et TLR-2.**

A) Polymorphismes du TLR-4 dans le groupe de patients ayant présenté un choc septique et dans le groupe contrôle constitué de patients hospitalisés mais n'ayant pas présentés de syndromes infectieux. Nous n'observons pas de différence de répartition des polymorphismes entre les groupes. Toutefois 1 patient sur 45 ne présente qu'un seul polymorphisme sous forme hétérozygote alors que 8 patients sur 45 présente les deux polymorphismes (test Khi 2  $p < 0,05$ ).

B) Répartition du polymorphisme du récepteur TLR-2 dans la même population. Nous n'observons pas de différence de répartition des polymorphismes entre les groupes.

## **Conclusion**

Notre travail a permis d'établir une cinétique précise des événements apoptotiques observés *in vivo* sur une série de patients atteints de choc septique nosocomial. Nos résultats renforcent les observations de phénomènes apoptotiques au niveau des cellules immunitaires circulantes déjà établies chez l'animal et chez l'homme. Mais au-delà de cette confirmation, nous avons observé à la phase la plus précoce du choc septique une forte baisse de l'ARNm de Bcl-2, un facteur anti-apoptotique. Cette baisse d'expression corrélée à la lymphopénie permet de penser que ce phénomène est lié à une apoptose massive des cellules immunitaires. Notre travail confirme également que l'intensité de la lymphopénie est corrélée à la mortalité. Enfin, la baisse de l'expression de Bcl-2 au niveau des cellules immunitaires circulantes pourrait constituer un marqueur de gravité à la phase précoce du choc septique.

## Article 2

**“ Influence of drotrecogin  $\alpha$  (activated) infusion on the variation of Bax/Bcl-2 and Bax/Bcl-XL ratios in circulating mononuclear cells: a cohort study in septic shock patients ”**

Bilbault, P., **Lavaux, T.**, Launoy, A., Gaub, M. P., Meyer, N., Oudet, P., Pottecher, T., Jaeger, A., Schneider, F.

Publié dans *Critical Care Medicine*, 2007. 35 : p. 69-75

**Influence of drotrecogin alpha (activated) infusion on the variation of Bax/Bcl-2 and Bax/Bcl-xl ratios in circulating mononuclear cells: a cohort study in septic shock patients**

BILBAULT P., LAVAUX T., LAUNOY A., GAUB M. P., MEYER N., OUDET P., POTTECHER T., JAEGER A., SCHNEIDER F.

**Critical care medicine, 2007, Vol. 35, Pages 69-75**

Copyright © 2008, Society of Critical Care Medicine. All rights reserved.  
Published by Lippincott Williams & Wilkins.

**Pages 101-109 : Article 2**

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://www.ccmjournal.com/pt/re/ccm/abstract.00003246-200701000-00012.htm>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

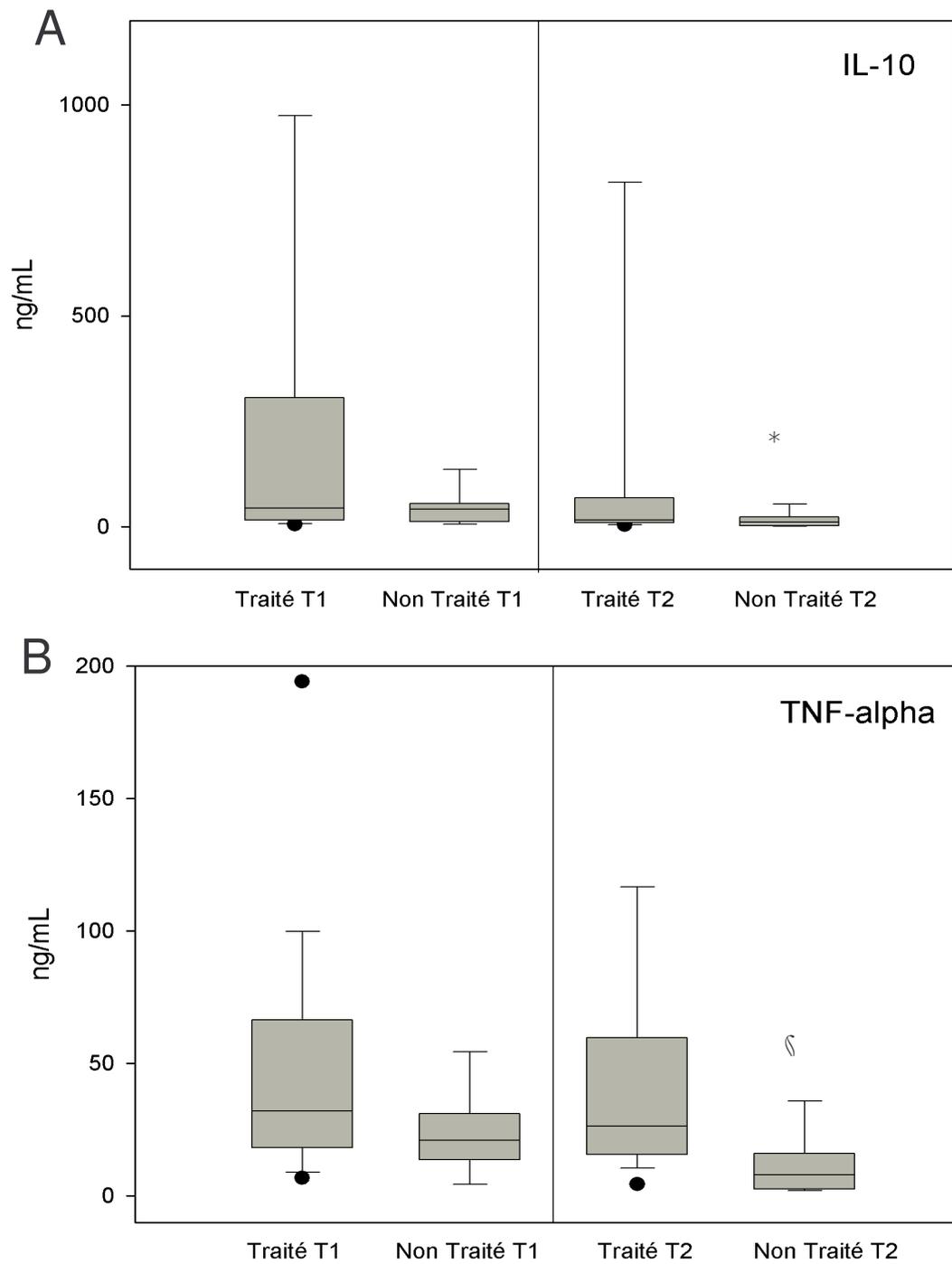
L'objectif de ce travail était de montrer si la protéine C activée pouvait exercer son effet par le biais de la modification de l'expression de certains gènes de la famille de Bcl-2. En effet, en dehors de ses effets sur la coagulation, la rhPCA possède des propriétés anti-inflammatoires et anti-apoptotiques qui ont été démontrés sur des modèles cellulaires ou murins [282], mais pas directement chez l'homme atteint de choc septique. Les effets anti-apoptotiques de la rhPCA pourraient être à l'origine de son effet protecteur sur le sepsis mais aussi sur d'autres modèles d'agressions aiguës, comme l'ischémie cérébrale chez le rat [283]. Afin de confirmer cet effet anti-apoptotique sur des patients en choc septique, nous avons mesuré l'expression des gènes Bax, Bcl-2 et Bcl-XL par RT-QPCR, quantifié les différentes sous-populations lymphocytaires et déterminé le taux d'apoptose des cellules mononuclées circulantes. Nous avons également cherché à confirmer l'effet anti-inflammatoire de cette molécule par la mesure de différents paramètres de l'inflammation (TNF- $\alpha$ , IL-10 et IL-6).

20 patients ont été inclus dans le groupe rhPCA et 16 patients dans le groupe contrôle. Nous n'observons pas de différence statistique entre les 2 groupes que ce soit en terme d'âge, de sexe ratio, de mortalité, de score APACHE II à l'admission ou de Logistic Organ Dysfunction (LOD) score à l'inclusion. Les tableaux regroupant les caractéristiques cliniques du groupe choc septique contrôle et du groupe choc septique traité par rhPCA sont disponibles sur l'article original ci-après.

Les valeurs de TNF- $\alpha$  et d'IL-10 sont augmentées dans les deux groupes par rapport aux valeurs des témoins sains (données non montrées,  $p < 0,001$ ). En ce qui concerne le TNF- $\alpha$ , nous n'observons pas de différence entre T1 et T2 dans le groupe choc septique traité par rhPCA. En revanche pour le groupe choc septique contrôle, le taux de TNF- $\alpha$  diminue de façon significative entre T1 et T2 ( $p = 0,002$ , cf. Figure 16A). De même le taux d'IL-10 n'est pas significativement différent entre T1 et T2 pour le groupe choc septique traité par rhPCA mais l'IL-10 diminue de façon significative entre T1 et T2 pour le groupe choc septique contrôle ( $p = 0,0018$  ; cf. Figure 16B). Cependant nous n'observons aucune modification entre les groupes et au cours du temps du ratio IL-10 sur TNF- $\alpha$  (ratio moyen de 3,34 pour le groupe rhPCA et contrôle à T1 et de 2,51 versus 2,52 à T2, cf. Figure 17). Enfin l'IL-6 (cf. Figure 18) est augmenté dans les deux groupes par rapport aux témoins sains mais sans différence significative entre les groupes rhPCA et contrôle ou au cours du temps.

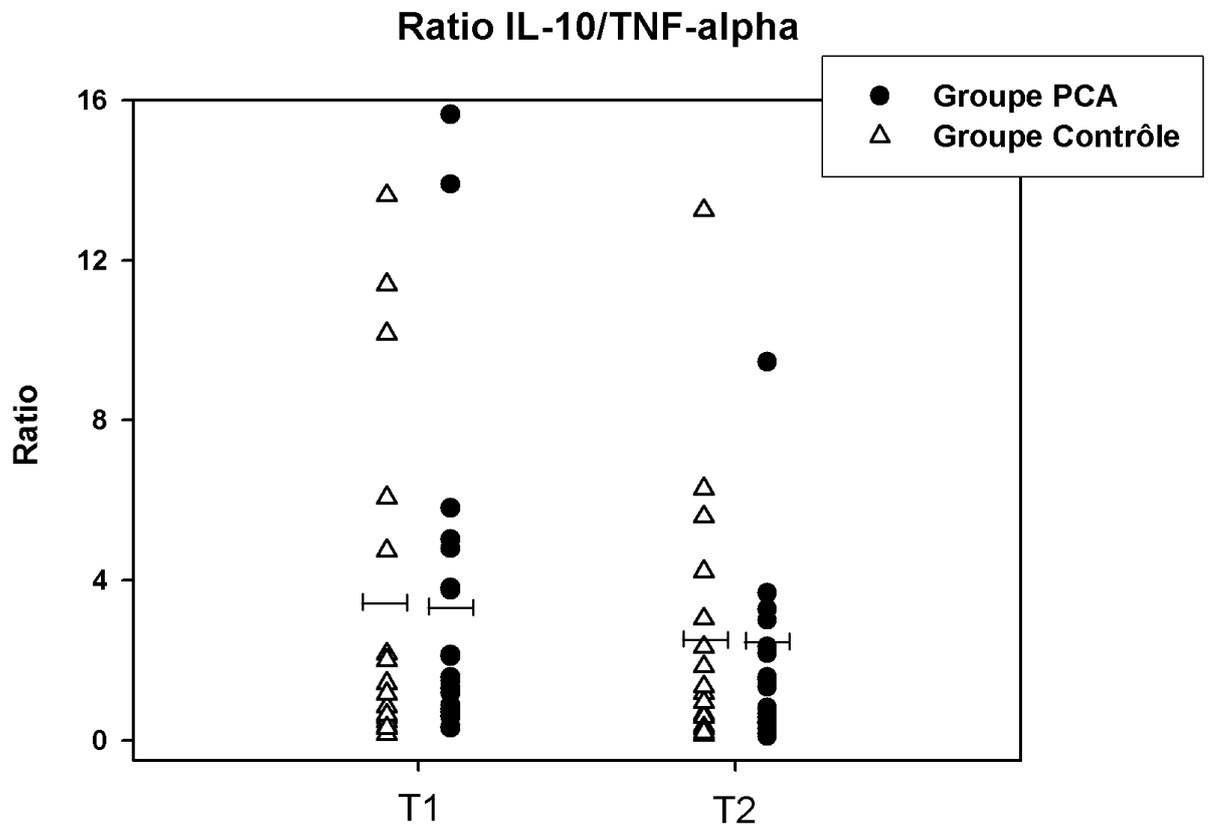
Le taux d'apoptose des 2 groupes est significativement supérieur à celui du groupe de témoins sains pris comme contrôle (3,1 %,  $p < 0,001$  par rapport au groupe traité par rhPCA et au groupe choc septique contrôle). Le taux d'apoptose reste stable dans le groupe traité par protéine C activée (12,0 % à T1 vs 11,7 % à T2) alors qu'il augmente dans le groupe contrôle (10,4% à T1 vs 16,2% à T2,  $p < 0,001$ ).

Dans les deux groupes, nous n'observons pas de modification significative de l'expression de Bax. Nous observons une augmentation significative de l'expression de Bcl-2 entre T1 et T2 dans le groupe choc septique traité par rhPCA ( $p=0,023$ , données non montrées) mais pas dans le groupe choc septique contrôle. Nous observons une corrélation positive entre l'expression de Bcl-2 et le taux d'apoptose lymphocytaire à T2 dans le groupe choc septique traité par la rhPCA ( $r^2=0,640$ ,  $p = 0,023$ ). Cependant nous n'observons pas de modification significative d'expression de Bcl-XL entre les groupes. Nous avons ensuite calculé le ratio Bax/Bcl-2 et Bax/Bcl-XL. En effet le ratio Bax/Bcl-2 est décrit comme étant le rhéostat indiquant la susceptibilité d'une cellule à entrer en apoptose. Nous avons observé que le ratio Bax/Bcl-2 et Bax/Bcl-XL n'évolue pas de la même façon au cours du temps entre les deux groupes. Dans le groupe contrôle, nous observons une augmentation du ratio Bax/Bcl-2 (de 1,31 à T1 vs 1,81 à T2) alors que nous observons une diminution de ce ratio dans le groupe traité par protéine C activé (0,92 à T1 vs 0,39 à T2,  $p < 0,001$ ). Le ratio Bax/Bcl-XL diminue dans les deux cas mais cette baisse est significativement plus forte dans le groupe traité par la rhPCA : de 2 à T1 à 0,68 à T2 pour le groupe rhPCA et de 1,31 à T1 à 1,22 à T2 pour le groupe contrôle. Ceci correspond à une baisse de 2,9 fois pour le groupe traité par rhAPC contre 1,1 fois pour le groupe contrôle.



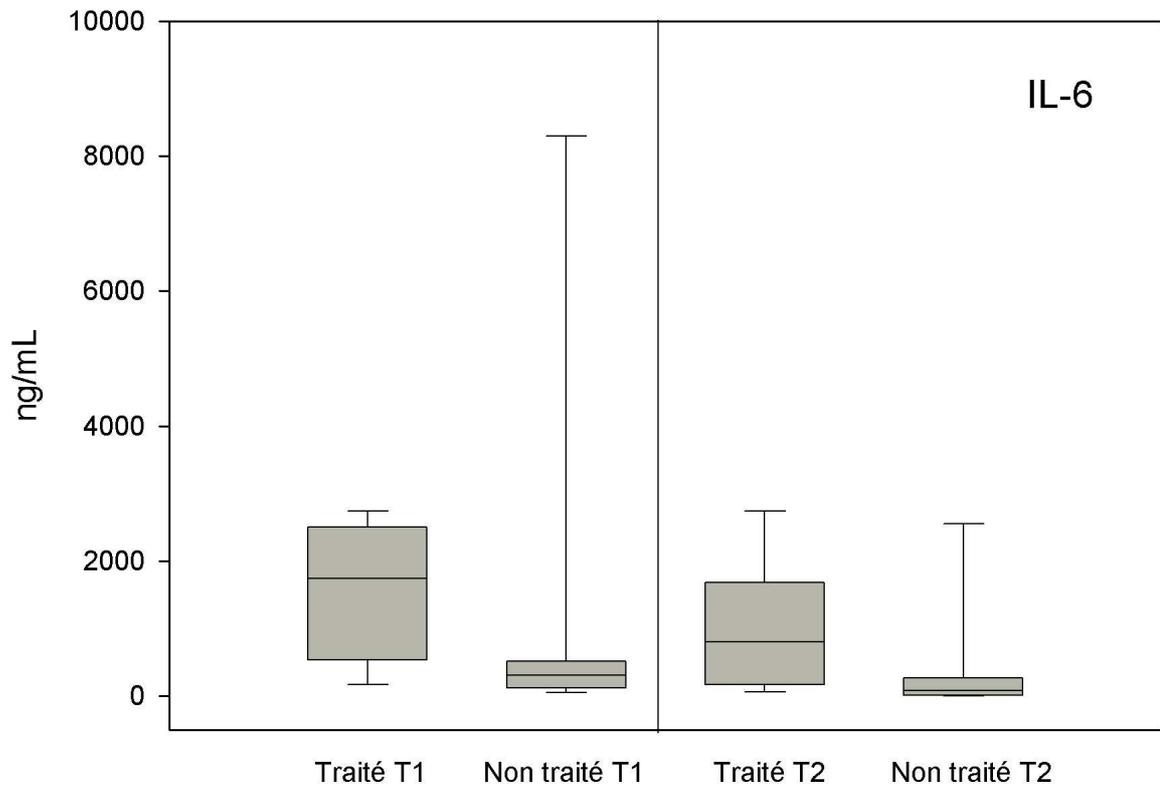
**Figure 16 : Mesure de l'IL-10 et du TNF-alpha avant et après traitement.**

Evolution du taux de A) d'IL-10 B) de TNF-alpha. Les boîtes grisées représentent la distribution des valeurs entre les percentiles 25 et 75, la barre intérieure la médiane et les barres d'erreur la distribution entre les percentiles 5 et 95. Les points représentent les valeurs extrêmes de la distribution. \*  $p = 0,0018$  et §  $p = 0,002$  pour le groupe contrôle entre T1 et T2.



**Figure 17 : Evolution du ratio IL-10 sur TNF-alpha.**

Pour chaque distribution la moyenne est indiquée sous forme d'une barre. Aucune différence significative entre les 2 groupes n'est observée.

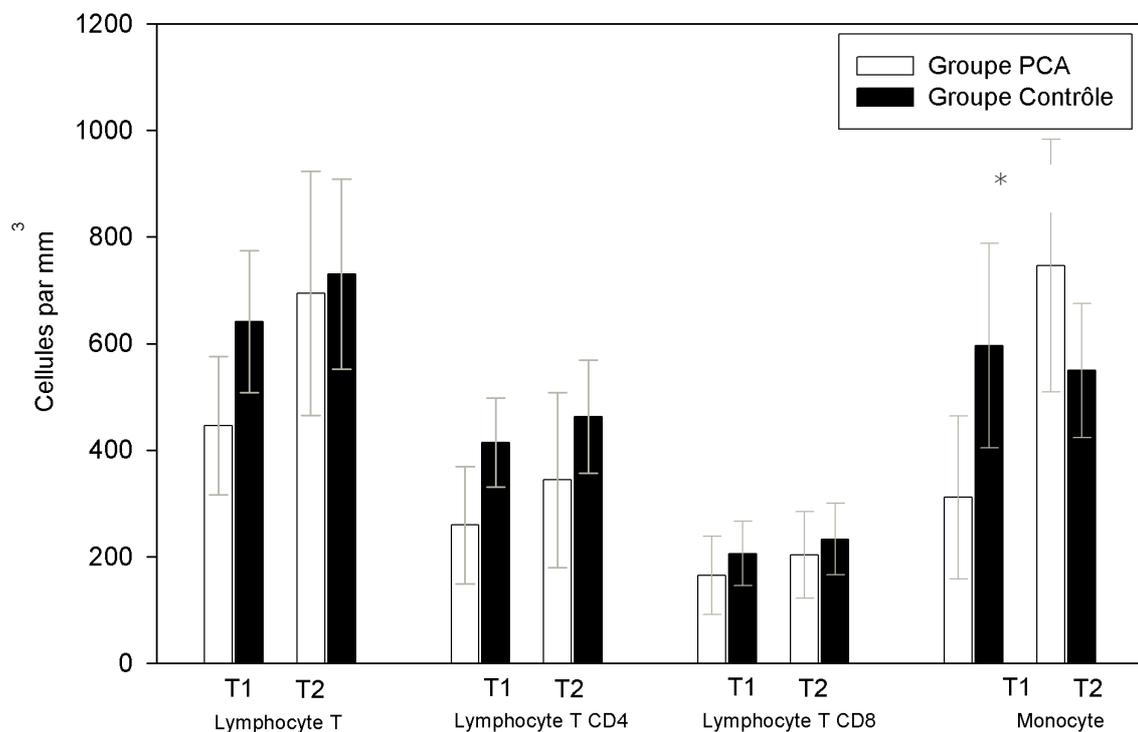


**Figure 18 : Evolution du taux d'IL-6 avant et après traitement.**

Les boîtes grisées représente la distribution des valeurs entre les percentiles 25 et 75, la barre intérieure la médiane et les barres d'erreurs la distribution entre les percentiles 5 et 95. Les points représentent les valeurs extrêmes de la distribution. Aucune différence significative entre les 2 groupes n'est observée.

### Sous-populations lymphocytaires

L'augmentation du nombre de lymphocytes totaux circulants est significativement plus importante dans le groupe traité par rhPCA par rapport au groupe contrôle (données non montrées,  $p = 0,001$ ). Concernant les sous-populations lymphocytaires (T CD4+ et T CD8+), nous n'observons pas de différence entre les groupes et au cours du temps, ni de variation du ratio T CD4/CD8. Pour les monocytes, nous observons une augmentation significative de leur taux entre T1 et T2 dans le groupe traité par rhPCA par rapport au groupe contrôle ( $p = 0,005$  cf. Figure 19).



**Figure 19 : Evolution des sous-populations lymphocytaires entre le groupe contrôle et le groupe PCA.**

Nous n'observons pas de différence de variations des sous-populations lymphocytaires mais une augmentation significative des taux de monocytes entre T1 et T2 dans le groupe traité par rhPCA par rapport au groupe contrôle. \*  $p = 0,005$

## Conclusion

L'ensemble de ces résultats démontre que chez les patients traités par rhPCA, cette molécule maintient un taux d'apoptose des cellules immunitaires circulantes inférieur à celui des patients non traités en augmentant l'expression des facteurs anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL, sans effet significatif sur Bax, facteur pro-apoptotique, ni sur les principales cytokines pro ou anti-inflammatoires. Ce travail constitue à notre connaissance la première démonstration d'un tel effet de la rhPCA observée directement *in vivo* chez des patients atteints de choc septique et confirme que cette nouvelle molécule est douée de propriétés anti-apoptotiques *in vivo*.



## Article 3

**“ rhAPC treatment enhance NF- $\kappa$ B gene expression during human septic shock regardless of common TLR-2 and TLR-4 polymorphisms ”.**

**Thomas LAVAUX, Pascal BILBAULT, Anne LAUNOY, Béatrice URING-LAMBERT, Marie-Pierre GAUB, Charline RATOMPONIRINA, Pierre OUDET, Thierry POTTECHER, Francis SCHNEIDER**

En soumission



Lors de l'infection, l'organisme reconnaît les micro-organismes pathogènes via les TLR. Or une des voies principales de transduction du signal via ces récepteurs passe par le facteur de transcription NF- $\kappa$ B. Il existe une dizaine de TLR, parmi ceux-ci les TLR-2 et TLR-4 sont les récepteurs impliqués dans la reconnaissance des fragments de paroi des bactéries Gram + et Gram -. La présence de polymorphismes sur certains de ces TLR est susceptible de modifier la transduction du signal via NF- $\kappa$ B [255]. Ce facteur de transcription est un complexe formé par l'association de deux sous unités activatrices dont les plus fréquentes sont p50 et p65/RelA. La translocation de ce complexe au noyau est bloquée par l'interaction avec une sous-unité inhibitrice dont le principal représentant est I $\kappa$ Ba. La phosphorylation de I $\kappa$ Ba va conduire à sa dégradation par le protéasome, libérant les sous unités activatrices qui vont pouvoir être transportées au niveau du noyau pour activer les différents promoteurs des gènes cibles de NF- $\kappa$ B.

Dans des modèles *in vitro*, Joyce et al. ont montrés que la protéine C activée pouvait moduler l'activation de NF- $\kappa$ B au niveau protéique. En revanche aucune études *in vivo* chez des patients en choc septique n'a confirmé cet effet aussi bien au niveau protéique qu'au niveau transcriptionnel. Enfin, l'expression de Bcl-2 (facteur anti-apoptotique) et de certaines autres facteurs de la famille de Bcl-2 comme Bcl-XL que nous avons étudié dans nos articles précédents sont sous le contrôle du facteur de transcription NF- $\kappa$ B. Il était donc possible que l'effet anti-apoptotique rapporté dans notre travail précédent soit lié à une action de la protéine C activée sur NF- $\kappa$ B.

L'objectif de ce travail a été d'étudier les effets de la protéine C activée sur l'expression des principales sous unités du complexe NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B. Pour vérifier si les effets de la protéine C activée sont liés à des polymorphismes connus des récepteurs TLR-2 et TLR-4, nous avons recherché par séquençage le polymorphisme TLR2-Arg753Gln et les deux polymorphismes de TLR-4 Asp299Gly et Thre399Ile.

Enfin, pour mieux caractériser l'effet de la protéine C activée sur l'inflammation, nous avons mesuré les principales cytokines caractérisant la réponse Th1/Th2 lymphocytaire ainsi que les sous-populations lymphocytaires T CD4+ et CD8+.

## Résultats

Chez des patients présentant un choc septique, traité ou non par protéine C activée, nous avons mesuré par RT-PCR quantitative relative sur les cellules mononuclées du sang circulant l'expression des sous unités de NF- $\kappa$ B (p50, p65/RelA) et I $\kappa$ Ba. Deux prélèvements ont été effectués au cours du temps : dans une fenêtre de 6 à 12 heure suivant le début du choc septique (T1) et 36 heures après ce premier prélèvement (T2). Pour le groupe traité par rhPCA, le premier prélèvement a été réalisé avant le début de traitement.

25 patients en choc septique ont été inclus prospectivement dans le groupe traité par protéine C activée et 25 dans le groupe contrôle. Les données cliniques des deux groupes n'ont pas montré de différence statistique, que ce soit pour l'âge (respectivement de  $61,7 \pm 15,4$  pour le groupe traité par rhPCA vs  $58,3 \pm 15,1$  ans pour le groupe contrôle) le LOD score (respectivement  $9,2 \pm 4,1$  vs  $8,0 \pm 3,3$ ), le score APACHE II à l'admission (respectivement  $61,7 \pm 15,4$  vs  $58,3 \pm 15,1$ ) ou la mortalité (respectivement 44% vs 36 %). Aucune différence de distribution des polymorphismes des récepteurs TLR-2 ou TLR-4 n'a été mise en évidence. Seule une association significative entre les polymorphismes TLR-4-Asp299Gly et TLR-4-Thre399Ile est observée dans les deux groupes ( $p < 0,05$ ). Il n'y a pas de différence d'évolution des profils Th1/Th2 entre les groupes à l'exception d'une diminution significative du taux d'IFN- $\gamma$  pour les 2 groupes entre T1 et T2. Cette baisse du niveau de l'IFN- $\gamma$  associé à un ratio de IL-10/TNF- $\alpha$  élevé suggère une orientation du profil Th1/Th2 vers une réponse Th2 quels que soient les groupes.

Dans le groupe rhPCA, nous avons observé une augmentation significative de l'expression des sous-unités activatrices de NF- $\kappa$ B que sont p50 et p65/RelA (respectivement 39,9 % et 81,3%,  $p < 0.05$ ), mais pas d'augmentation significative de I $\kappa$ Ba. Par rapport aux témoins sains, il existe toutefois une augmentation de l'expression de I $\kappa$ Ba (données non montrées). En revanche nous n'observons pas de corrélation entre le niveau d'expression des sous unités de NF- $\kappa$ B et les concentrations plasmatiques des cytokines. Il n'existe pas non plus de différence d'expression de ces sous unités en fonction des polymorphismes des TLR-2 ou 4.

## Conclusion

Ces résultats confirment que l'action de la protéine C activée *in vivo* chez des patients en choc septique passe en partie par la modification de l'expression des facteurs activateurs de NF- $\kappa$ B que sont p50 et p65/RelA, sans que cet effet transcriptionnel ne modifie ni les sous-populations lymphocytaires ni le profil Th1/Th2. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour confirmer cet effet au niveau protéique.

**rhAPC treatment enhance NF- $\kappa$ B gene expression during human septic shock regardless of common TLR-2 and TLR-4 polymorphisms.**

**Thomas LAVAUX<sup>1</sup>, Pascal BILBAULT<sup>2</sup>, Anne LAUNOY<sup>3</sup>, Béatrice URING-LAMBERT<sup>4</sup>, Marie-Pierre GAUB<sup>1</sup>, Charline RATOMPONIRINA<sup>1</sup>, Pierre OUDET<sup>1</sup>, Thierry POTTECHER<sup>3</sup>, Francis SCHNEIDER<sup>2</sup>.**

<sup>1</sup> Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Hautepierre University Hospital, Strasbourg, France.

<sup>2</sup> Laboratory of Immunology, Hautepierre University Hospital, Strasbourg, France.

<sup>3</sup> Anesthesiology unit (AL, TP), Hautepierre University Hospital, Strasbourg, France.

<sup>4</sup> Intensive Care Unit, Hautepierre University Hospital, Strasbourg, France.

**Address for reprint requests and other correspondence to:**

Thomas Lavaux, Laboratoire de biochimie et biologie moléculaire, Hopital de Hautepierre, avenue Molière, 67098 Strasbourg Cedex, France. **E-mail** :

[Thomas.Lavaux@chru-strasbourg.fr](mailto:Thomas.Lavaux@chru-strasbourg.fr)

Key words : NF- $\kappa$ B ; Th1/Th2 balance; septic shock; rhAPC; Toll like receptor.

**Abstract (150 words)**

During infection, the immune system recognize pathogens through Toll like receptors (TLR), leading to Nuclear Factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) activation. Recombinant human activated protein C (rhAPC) is an anticoagulant treatment for septic shock, acting also an inflammatory and apoptotic pathway via NF- $\kappa$ B. To assess rhAPC transcriptional effect on NF- $\kappa$ B, regarding TLR-2 and TLR-4 polymorphisms, we included 50 septic shock patients among them 25 were treated with rhAPC. We measured Th1/Th2 cytokines, lymphocytes subsets, p50, p65 and I $\kappa$ Ba gene expressions before treatment (T1) and 36h later (T2). No difference between the two groups were detected for neither TLR-2 or TLR-4 polymorphism distribution nor Th1/Th2 profile. Concerning rhAPC group, we found a significant increase of p50 and p65 RNA expression at T2 (respectively 39.9 % and 81.3%  $p < 0.05$ ), but not for I $\kappa$ Ba. This result confirm that rhAPC acts *in vivo* through NF- $\kappa$ B pathway at the transcriptional level in human septic shock.

## Introduction

Aberrant regulation of inflammatory responsiveness underlies the pathogenesis of widely disparate clinical syndromes such as cancer (1), sepsis (2), inflammatory bowel diseases, atherogenesis and other inflammatory disorders (3). During infection, macrophages recognize conserved pathogen-associated molecular patterns through Toll-like receptors (TLR) family (4). The ten members of already described TLRs recognizes a wide range of microbial components. For example, bacterial lipoproteins, lipopolysaccharide (LPS) and DNA containing unmethylated CpG dinucleotides are recognized by TLR-2, 4 and 9 respectively (5). Activation of TLR triggers a rapid antimicrobial response through stimulation of pro-inflammatory pathways. These TLRs mediate innate immunity signalling processes leading to the activation of Nuclear Factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (6), but cellular signalling of this receptor could be modified by polymorphism affecting their extra cellular domain. For example, TLR-4 polymorphism Asp299Gly is associated with decrease of LPS signal transduction via NF- $\kappa$ B and may worsen prognostic of Gram-negative bacteria septic shock (7,8). The term NF-kappaB commonly refers specifically to a p50-p65 heterodimer, which is one of the most avidly forming dimers and is the major NF- $\kappa$ B complex in most cells. This ubiquitous transcription factor is inhibited by formation of a cytoplasmic complex with I $\kappa$ B inhibitor family (9). This combinatorial diversity contributes to the regulation of distinct, but overlapping, sets of genes, in that the individual dimers have distinct DNA-binding site specificities for a collection of related  $\kappa$ B sites. These targeted genes included several pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , interleukin-6, IL-1 beta, IL-8), cytokines implied in the Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$ )/Th2 (IL-10) balance, adhesion molecules, nitric oxide synthase (10), gene involved in apoptosis regulation (Bcl-2, Bcl-XL, (11)) and play a pivotal role in the

inflammatory and immune response. *In vivo* studies have demonstrated that NF- $\kappa$ B activity is enhanced in human sepsis and therefore identifying it as a prime candidate for targeted inactivation. Paterson and colleagues (12) showed an increased of NF- $\kappa$ B nuclear activity at the protein level in both monocytes and neutrophils of septic patients compared with healthy controls. Nevertheless, no gene expression profiles of the NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B complex were performed in this study to search for a transcriptional modification of the NF- $\kappa$ B subunits expression during sepsis.

Despite more than 20 years of extensive research, most clinical trials targeting blockade of specific inflammatory mediators have failed (13). But in 2001, the PROWESS trial proven that drotrecogin  $\alpha$  (activated) or recombinant human activated protein C (rhAPC) reduces the all-cause 28-day absolute mortality in septic shock patient by 6.1% (14). A major mechanism of action of rhAPC is likely to be related to its anticoagulant properties. However, *in vitro* studies demonstrated that rhAPC had also anti-inflammatory and anti-apoptotic effect through the modulation of NF $\kappa$ -B activity (15). But none of them had studied the effect of rhAPC on gene expression of the several subunits of the NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B complex. Because an intact inflammatory response is essential in maintaining normal host defence mechanisms, modulation rather than blockade NF- $\kappa$ B activation is likely to be most effective in improving outcome from sepsis. As we have already demonstrated that rhAPC is involved in Bcl-2 over expression and apoptosis control in human shock septic (16), we thought that rhAPC could be also involved in transcriptional regulation of the subunits of the NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B complex. Furthermore, a better understanding of rhAPC effect could be helpful to define better time points for therapeutic intervention.

Therefore, to evidence an effect of rhAPC on NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B complex at the transcriptional level, we have studied the effect of rhAPC in standardized conditions

during human septic shock. Regarding TLR-2 and 4 polymorphisms, which could modulate NF- $\kappa$ B expression, we have measured NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B gene expression by RT-QPCR, Th1/Th2 cytokines balance and lymphocyte subpopulation counts.

## **Material and Methods**

### **Patients**

Our institutional review board for human research approved this study. Special attention was paid to exclude patients having inherited or acquired immunodeficiency. Patients of the medical and surgical wards were eligible if they had septic shock, according to the definition of the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference (17). Patients were treated as soon as fever started with both adequate antibiotics and standard goal-directed therapy (18).

25 consecutive patients admitted for septic shock and treated with rhAPC were included in the rhAPC group. 25 matching patients who were not treated with rhAPC consist on the control group. 10 healthy patients were included for gene expression normalization.

For both groups, two time points were defined : T1 within 12 h after the second organ failure. The second time point T2 was drowned 36 h later. The Simplified Acute Physiology Score II (SAPS II) on admission (19) was recorded for each patient on admission in ICU and the Logistic Organ Dysfunction (LOD) score (20) was recorded at T1. Mortality was assessed 24 hrs after the T2 measurement.

### **Th1/Th2 profil**

Analysis was performed using the CBA Human inflammation kit (BD Biosciences, San Jose, CA) according to manufacturer's instructions. A 10-point standard curve

was obtained by serial dilution of the reconstituted lyophilized standard. A reagent mixture was obtained by mixing 10  $\mu$ L of each human inflammation capture bead suspension (cytokines tested were: IL1-beta, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-10, IFN-gamma and IL-12p70). After vortexing, 50  $\mu$ L was distributed into each test tube. Finally 50  $\mu$ L of sample or standard point was added, vortexed, and incubated 90 min at room temperature in the dark. The beads were washed using 1 ml of buffer and centrifuged (200 g for 5 min). The supernatant was carefully discarded. Then 50  $\mu$ L of phycoerythrin (PE)-labeled detection reagent was added to each tube and incubated 90 min at room temperature in the dark. Beads were washed using the same procedure and resuspended in 300  $\mu$ L of buffer for analysis. The flow cytometer (XL MCC EPICS; Beckman Coulter, Fullerton, CA) was set up according to manufacturer's instructions. Beads were electronically selected on forward-scatter/side-scatter dot plot and identified by the 675 nm fluorescence intensity. The cytokine level was measured at 570 nm and mean fluorescent intensity for each type of bead was recorded. The flow cytometry standard files were transferred to a Microsoft Excel spreadsheet (Microsoft, Redmond, WA) and calculations were performed using BD CBA Software following a four-step procedure using a geometric mean of fluorescence and a four-parameter polynomial regression curve on a log-log scale.

### **Lymphocyte sub-population counts**

Lymphocytes were determined by flow cytometry (XL MCC EPICS; Beckman Coulter, Fullerton, CA) using fluorescent monoclonal specific antibodies (Becton Dickinson, Rungis, France). T-lymphocyte subsets were selected with antibodies against CD3, CD4 and CD8 markers, B-lymphocytes were selected by anti-CD19 and the natural killer (NK) cells by anti-CD16 and CD56. The absolute cell counts were obtained by

mixing calibrated beads with the blood samples (Becton Dickinson Trucount, Rungis, France).

### **Cell treatment**

Aliquots of 20 ml of blood were drawn in EDTA, and CMNC were isolated by Ficoll gradient centrifugation (Eurobio, Les Ulis, France) to obtain aliquots of  $10^6$  cells.

### **RNA extraction and reverse transcription**

Total RNA was isolated using RNeasy columns (Quiagen, Valencia, USA), eluted in 33  $\mu$ l and the cDNA synthesis reaction using the AMV reverse transcriptase kit (Roche Diagnostics, Meylan, France) were performed according to the manufacturer's protocols.

### **Real-time PCR**

Real-time PCR was performed according to the manufacturer's protocol (0.25  $\mu$ mol/l of primers and 3 mmol/l of MgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ L of DMSO 20%, 2  $\mu$ L of PCR mix containing Taq polymerase and Sybrgreen reagent) in a 20  $\mu$ L final volume with a thermocycler (LightCycler, Roche, France). For relative quantification, we chose HydroxyMethyl-Bilane Synthase (HMBS) as reference gene. In a previous study, we assessed that HBMS expression did not change significantly when severe infection was starting or during inflammatory conditions (21). The primers (Genome Express, Montreuil, France) for the gene amplification were :

- HMBS F : TGCACGATCCCGAGAC ; HMBS R : CGTGGAATGTTACGAGC
- p50 F : TTTTCGGACTACGCGGTG ; p50 R : GTTACCCAAGCGGTCC
- p65 F : TTCCGCTACAAGTGCG ; p65 5-reverse : GGGTTGTTGTTGGTCTG
- I $\kappa$ Ba F : CTCCGAGACTTTCGAGG ; I $\kappa$ Ba 5-reverse : AGTCCGGCCATTACAG

The HotStart Taq polymerase (Roche Diagnostics, Meylan, France) was activated by heating for 8 min at 95 °C. For all genes duplicate PCRs were performed for 40 cycles

with 20s of denaturation at 95°C, 20s of hybridisation at 61 °C followed by 20s of elongation at 72 °C for each cycle. Fluorescent signals from individual PCR reactions were collected as peak-normalised values plotted versus the cycle number. Amplifications were compared by their threshold cycle values estimated by the software (Roche Diagnostics, Meylan, France). All the experiments were performed at least twice.

### **Calculations of results**

Gene expressions were performed using the 2-DDCT method (23). The relative gene quantification is based on the prerequisite that the efficiencies (E) of both the references and target gene PCR amplifications were identical, with a variation of  $E=10^{-1/\text{slope}}$  less than 0.05. In our hands, serial dilutions of 50 ng to 0.5 ng HeLa cDNA showed comparable efficiencies for p50 (E=2.03), p65 (E=2.03), Ikb- $\alpha$  (E=2.04) and HMBS (E=2.03) with linear kinetics between respective Ct values. 10 healthy control (5 men and 5 women ; mean age 43.5 +/- 12.1 year) were included to normalise gene expression profile as required for the 2-DDCT method.

### **TLR-2 and TLR-4 genotyping**

Detection of the TLRs polymorphisms was performed by an hybridization probe assay as previously described (23). Briefly PCR was performed using 5  $\mu$ l DNA, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, and 0.25  $\mu$ M of the TLR-2 or TLR-4 probes. The PCR amplification was performed in the LightCycler™ (Roche Diagnostics, France) using 10 min of initial denaturation at 95 ° following 40 cycles of amplification for TLR-2 with an annealing temperature of 55 °C or 50 cycles for TLR-4 with an annealing temperature of 54 °C. For TLR-2 melting curve analysis, we use a slope of 0.1 °C/s. For TLR-2 melting curve analysis, we use a slope of 0.05 °C/s. Melting curves were converted to melting peaks by plotting the second negative derivative of fluorescence with respect

to temperature. All the results were confirmed by sequencing analysis on an ABI 7100 (Big dye terminator kit, Applied Biosystems) using the same sets of primers.

### **Statistical analysis**

Values are expressed as means +/- SD. Kinetic data were studied with analysis of variance for repeated measurements. When necessary non-parametric comparisons of the mean were performed (Mann-Whitney U-test or Wilcoxon test as required). Correlations between continuous variables were performed using Spearman S rank correlation tests.  $p < 0.05$  was considered significant. All statistical analyses were performed using SPSS version 11.5 (SPSS Inc., Chicago, IL)

## Results

### Clinical characteristics

We included prospectively 50 patients admitted to the intensive care unit fulfilling the criteria for septic shock (17) : one group of 25 treated by rhAPC (APC group), one group of matching patients not treated by rhAPC (control group). Table I shows clinical characteristics of the rhAPC and control group. No difference between the rhAPC and the control group was found concerning SAPS II (respectively  $61.7 \pm 15.4$  vs  $58.3 \pm 15.1$ ) or LOD score (respectively  $9.2 \pm 4.1$  vs  $8.0 \pm 3.3$ ). Mortality was 44 % for the rhAPC group and 36 % for the control group (NS).

### Th1/Th2 profiles

To establish Th1/Th2 profiles, several cytokines were measured : IL1-beta, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-10, IFN-gamma and IL-12p70. Only IL1-beta, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-10, IFN-gamma show values above detection threshold. Figure 1 show IL-10 / TNF- $\alpha$  ratio : this ratio did not change between T1 and T2 regarding the 2 groups. No change of cytokine expression was found regarding TLR-4 or TLR-2 polymorphisms. Figure 2 show a) INF-gamma, b) IL-6, c) IL-8, d) IL1-beta expression for the two group. The high level of IL-6 at T1 and T2, the statistical decrease of INF-gamma between T1 and T2 for both groups ( $p < 0.05$ ), the increase of the IL-10/TNF- $\alpha$  ratio between T1 and T2, respectively a mean value of 2.26 vs 2.85 for the rhAPC group and 2.08 vs 2.62 for the control group, despite no statistical difference lead to a predominance of Th2 cytokines at T2 without difference between rhAPC and control group.

### Lymphocyte subsets

No statistical change was found between the rhAPC or the control group regarding CD4+ or CD8+ T cells subsets. No change of T cell CD4/CD8 ratio was found over time or between groups (data not shown).

### **TLR polymorphisms**

To assess whether TLR polymorphism had a role in rhAPC response, we searched for TLR-2 and TLR-4 polymorphisms in the control and rhAPC groups. Results are indicated on Table I. No difference of distribution was found between rhAPC group and control group regarding TLR-2 or TLR-4 polymorphisms. Concerning TLR-4 we observed that the TLR-4-Asp299Gly is associated with the TLR-4-Thre399Ile for 9 patients (5 in the rhAPC group and 4 in the control group, Fisher exact test,  $p < 0.05$ ).

### **Evolution of NF- $\kappa$ B expression**

To go further in the molecular basis of rhAPC effect, since overall TLR polymorphisms distribution appeared not different between rhAPC and control group, we studied the RNA expression of the NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B complex by RT-QPCR. At T1, I $\kappa$ Ba expression was increased in both rhAPC group and control group comparing to healthy control ( $p < 0.05$ , data not shown), whereas p50 and p65 level were not different (data not shown). At T1, relative expression of p50, p65 and I $\kappa$ Ba was not different between rhAPC and control group (respectively 0.77 +/- 0.70 vs 0.73 +/- 0.69 for p50 ; 1.55 +/- 1.45 vs 1.18 +/- 1.23 for p65 ; 2.40 +/- 2.79 vs 2.04 +/- 2.87 for I $\kappa$ Ba). At T2, p50, p65 and I $\kappa$ Ba expression were increased in the rhAPC group comparing to healthy control ( $p < 0.05$ , data not shown). Figure 3 shows the percentage of variation of the NF- $\kappa$ B gene expression between T1 and T2 in the control and rhAPC group. Interestingly, in the rhAPC group we observed a significant increase of p50 and p65 RNA level between T1 and T2 (respectively 39.9 % and 81.3%  $p < 0.05$ ), showing an increase of p65 expression two times greater than p50.

However, in the control group, we did not observe such variation. Despite a slight increase from T1 to T2 in the rhAPC group (from 2.40 +/- 2.79 to 3.15 +/- 3.38) and a decrease in the control group (from 2.04 +/- 2.87 to 1.72 +/- 1.90), there was no statistical difference for I $\kappa$ B $\alpha$  expression between rhAPC and control group. Since we observed a significant increase at mRNA level of p50 and p65 after rhAPC treatment, we search for a possible effect of the TLR polymorphism. At T1 or T2, there is no difference between p50, p65 or I $\kappa$ ba expression regarding TLR-2 and TLR-4 polymorphisms (data not shown).

Altogether, these results shows that rhAPC treatment increase significantly p50 and p65 expression at the RNA level regardless of common TLR-2 and TLR-4 polymorphism.

## Discussion

In this *in vivo* human septic shock study, we have shown that rhAPC increased p50 and p65 mRNA level comparing to control group. Despite this effect on these activating subunits, circulating TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 and IFN- $\gamma$  concentrations were unrelated to NF- $\kappa$ B mRNA variation. However, this lack of concordance could be related to the fact that detectable concentrations of all these cytokines in the present study are dispersed in very large range even within individual patients, as reported previously (24). Nevertheless, this result is in agreement with a study from Paterson et al. (12), in which nuclear activity of NF- $\kappa$ B in both monocytes and neutrophils of septic patients was also unrelated to plasma IL-6, IL-8, and sICAM-1 concentrations. We should also note that NF- $\kappa$ B is not the only transcriptional regulator of all these cytokines (25), suggesting that NF- $\kappa$ B is not the only pathway involved in cytokines expression. Except significant decrease of IFN- $\gamma$  in rhAPC and control group at T2 comparing to T1, no statistical change of these cytokine concentration were found between the two groups or during time. IFN- $\gamma$  has an immunoregulatory effect in patients with immunoparalysis during the compensatory anti-inflammatory response syndrome, not only restoring levels of HLA-DR expression but also reestablishing the ability of monocytes to secrete cytokines such as TNF- $\alpha$  (26). This decrease should reflect natural evolution of septic shock syndrome toward immunoparalysis (27). Altogether, rhAPC did not seem to change the evolution of Th1/Th2 cytokine profil. Possibly, it may reflect insufficient patient numbers given the biological variation in immune response. Nevertheless, this result is in agreement with a review from Macias et al., who confirm that to date, no anti-inflammatory effect of the rhAPC has been observed in any clinical studies (28).

In a previous study (16) we found that in human septic shock, rhAPC has antiapoptotic effects on circulating mononuclear cells, assessed by a significant decrease of the Bax/Bcl-2 ratio due to an effect on Bcl-2 mRNA levels. As Bcl-2 is known to be potentially regulated by NF- $\kappa$ B, this increase could be related to an increase of p50 and p65 subunits and could be an indirect proof of rhAPC anti-apoptotic action through NF- $\kappa$ B pathway. A previous study by Joyce et al. (15) demonstrated with an *in vitro* model using several endothelial cell lines that rhAPC interact with one subunit of the NF- $\kappa$ B complex called NF- $\kappa$ B1/p105. Our study confirm that *in vivo*, in human septic shock, rhAPC act also through the NF- $\kappa$ B complex, but via p50 and p65 subunits. In an animals study, Gadjeva et al. (29) have demonstrated that p50-deficient mice exhibited a modest increase in susceptibility to LPS-induced shock but p50<sup>-/-</sup>p65<sup>+/-</sup> mice were exquisitely sensitive to LPS. This latter study demonstrated that NF- $\kappa$ B subunits p50 and p65 have critical inhibitory functions during the systemic response to LPS. By the way, we thought that rhAPC can induce p50 and p65 expression to restore NF- $\kappa$ B anti-apoptotic function. In another hand, excessive NF- $\kappa$ B activity could worsen prognostic as demonstrated by the Paterson study (12) : the patients who died from sepsis had increased levels of NF- $\kappa$ B activity in the nucleus of monocytes, as compared with patients who survived sepsis. Rather than blockade or increase activity of NF- $\kappa$ B, by sustaining p50 and p65 expression at the RNA level, rhAPC seems to maintain the possibility of an NF- $\kappa$ B response. Including more patient in the rhAPC group should be helpful to compare RNA level of p50 and p65 between survivors and non survivors and therefore could lead to a better understanding of the rhAPC effect on NF- $\kappa$ B expression.

Concerning TLR, we only evidenced TLR-4 polymorphisms. However their distributions were similar between control and rhAPC group. Patient carrying the TLR-4 Asp299Gly polymorphism have the same response to rhAPC than patient carrying the TLR-4 Thre399Ile polymorphism. This result suggests that rhAPC effect is not linked to TLR response to pathogens. Many other factors could be involved in innate immunity response. For example, polymorphisms have been identified for two FcγR classes, representing allelic variation of the FcγRIIa (CD32), FcγRIIIa and FcγRIIIb (CD16). The FcγRIIa polymorphisms are now considered to be an heritable risk factor for infectious diseases and some manifestations of autoimmune disorders (30).

In conclusion we have shown that rhAPC increased both p50 and p65 RNA expression of NF-κB in human septic shock, without inducing change of Th1/Th2 cytokine balance and regarding TLR-2 and TLR-4 polymorphisms, confirming *in vivo* that rhAPC could act through NF-κB pathway in anti-apoptotic rather than anti-inflammatory effect.

### **Acknowledgement**

This work was supported by the Délégation à la Recherche Clinique des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (PHRC 2001-Grant 2629)

## References

- (1) Inoue J, Gohda J, Akiyama T, Semba K. NF-kappaB activation in development and progression of cancer. *Cancer Sci.* 3:268-74, 2007
- (2) Liu SF, Malik AB. NF-kappa B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 4:L622-L645, 2006
- (3) Hayden MS, West AP, Ghosh S. NF-kappaB and the immune response. *Oncogene.* 51:6758-80, 2006.
- (4) Cook DN, Pisetsky DS, Schwartz DA. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat Immunol.* 10:975-9, 2004.
- (5) Cook DN, Pisetsky DS, Schwartz DA. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat Immunol.* 10:975-9, 2004.
- (6) Zhang G, Ghosh S. Molecular mechanisms of NF-kappaB activation induced by bacterial lipopolysaccharide through Toll-like receptors. *J Endotoxin Res.* 6:453-7, 2000.
- (7) Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet.* 2:187-91, 2000.
- (8) Lorenz E, Mira JP, Frees KL, Schwartz DA. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch Intern Med.* 9:1028-32, 2002.
- (9) Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1:49-62, 2007.
- (10) Hoffmann A, Natoli G, Ghosh G. Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene.* 51:6706-16, 2006.

- (11) Bureau F, Vanderplasschen A, Jaspar F, Minner F, Pastoret PP, Merville MP, Bours V, Lekeux P. Constitutive nuclear factor-kappaB activity preserves homeostasis of quiescent mature lymphocytes and granulocytes by controlling the expression of distinct Bcl-2 family proteins. *Blood*. 10:3683-91, 2002.
- (12) Paterson RL, Galley HF, Dhillon JK, Webster NR. Increased nuclear factor kappa B activation in critically ill patients who die. *Crit Care Med*. 4:1047-51, 2000.
- (13) Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*. 6917:885-91, 2002.
- (14) Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJ Jr; Recombinant human protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis (PROWESS) study group. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med*. 10:699-709, 2001.
- (15) Joyce DE, Grinnell BW. Recombinant human activated protein C attenuates the inflammatory response in endothelium and monocytes by modulating nuclear factor-kappaB. *Crit Care Med*. 5:S288-93, 2002.
- (16) Bilbault P, Lavaux T, Launoy A, Gaub MP, Meyer N, Oudet P, Pottecher T, Jaeger A, Schneider F. Influence of drotrecogin  $\alpha$  (activated) infusion on the variation of Bax/Bcl-2 and Bax/Bcl-XL ratios in circulating mononuclear cells: a cohort study in septic shock patients. *Crit Care Med*. 1:69-75, 2007.
- (17) Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G; SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med*. 4:1250-6, 2003.
- (18) Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, Peterson E, Tomlanovich M; Early Goal-Directed Therapy Collaborative Group. Early goal-

directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med.* 19:1368-77, 2001.

(19) Le Gall JR, Lermeshow S, Saunier F, et al: A new simplified acute physiology score (SAPS II) based on European/North American multicenter study. *JAMA.* 270:2957–2963, 1993.

(20) Le Gall JR, Klar J, Lermeshow S, et al: The logistic organ dysfunction system. A new way to assess organ dysfunction in the intensive care unit. *JAMA.* 276:802–810, 1996.

(21) Bilbault P, Lavaux T, Lahlou A, Uring-Lambert B, Gaub MP, Ratomponirina C, Meyer N, Oudet P, Schneider F. Transient Bcl-2 gene down-expression in circulating mononuclear cells of severe sepsis patients who died despite appropriate intensive care. *Intensive Care Med.* 3:408-15, 2004.

(22) Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  method. *Methods.* 25:402–408, 2001.

(23) Hamann L, Hamprecht A, Gomma A, Schumann RR. Rapid and inexpensive real-time PCR for genotyping functional polymorphisms within the Toll-like receptor - 2, -4, and -9 genes. *J Immunol Methods.* 2:281-91, 2004.

(24) Hynninen M, Pettila V, Takkunen O, Orko R, Jansson SE, Kuusela P, Renkonen R, Valtonen M. Predictive value of monocyte histocompatibility leukocyte antigen-DR expression and plasma interleukin-4 and -10 levels in critically ill patients with sepsis. *Shock.* 1:1-4, 2003.

(25) Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol.* 15:707-47, 1997.

- (26) Haveman JW, Muller Kobold AC, Tervaert JW, van den Berg AP, Tulleken JE, Kallenberg CG, The TH. The central role of monocytes in the pathogenesis of sepsis: consequences for immunomonitoring and treatment. *Neth J Med.* 3:132-41, 1999.
- (27) Kox WJ, Volk T, Kox SN, Volk HD. Immunomodulatory therapies in sepsis. *Intensive Care Med.* 1:S124-8, 2000.
- (28) Macias WL, Yan SB, Williams MD, Um SL, Sandusky GE, Ballard DW, Planquois JM. New insights into the protein C pathway: potential implications for the biological activities of drotrecogin alfa (activated). *Crit Care.* 4:S38-45, 2005.
- (29) Gadjeva M, Tomczak MF, Zhang M, Wang YY, Dull K, Rogers AB, Erdman SE, Fox JG, Carroll M, Horwitz BH. A role for NF-kappa B subunits p50 and p65 in the inhibition of lipopolysaccharide-induced shock. *J Immunol.* 9:5786-93, 2004.
- (30) Dahmer MK, Randolph A, Vitali S, Quasney MW. Genetic polymorphisms in sepsis. *Pediatr Crit Care Med.* 3:S61-73, 2005.

Table I : Clinical characteristics and genotyping results of rhAPC and control group.

	rhAPC group (n=25)	Control group (n=25)	p
Age (yr) *	66.5 ± 14.4	65.8±11.8	NS
SAPS II *	61.7±15.4	58.3±15.1	NS
LOD score *	9.2±4.1	8.0±3.3	NS
Mortality (%)	44 %	36 %	NS
Source of infection : n (%)			
Pneumonia	10 (40 %)	13 (52%)	NS
Peritonitis	7 (28%)	4 (16%)	NS
Others	8 (32%)	8 (32 %)	NS
TLR genotyping			
Genotype of TLR-2 (n for each SNP)			
Arg753Arg/Arg753Gln/Gln753Gln	25/0/0	25/0/0	NS
Genotype of TLR-4 (n for each SNP)			
Asp299Asp/Asp299Gly/Gly299Gly	20/5/0	21/4/0	NS
Thre399Thre/ Thre399Ile/Ile399Ile	20/5/0	21/4/0	NS

\* Data are means +/- SD. The respective p values result from the nonparametric Kruskal-Wallis test, while associations with the genotype were searched with logistic regression.

Figure 1 : Evolution of IL-10 to TNF- $\alpha$  ratio in rhAPC and control group at T1 and T2. Box and whiskers plot show median and interquartile range for IL-10 to TNF- $\alpha$  ratio. No significant changes between rhAPC and control group are observed at T1 or T2.

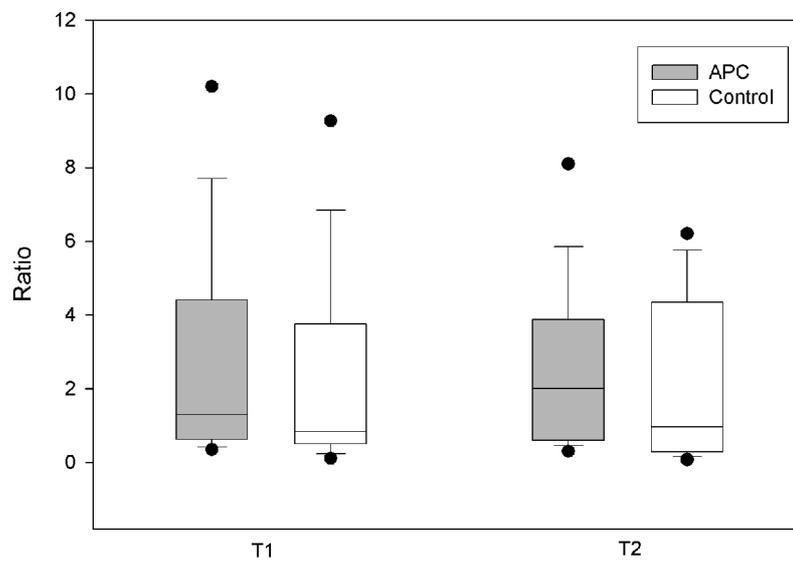
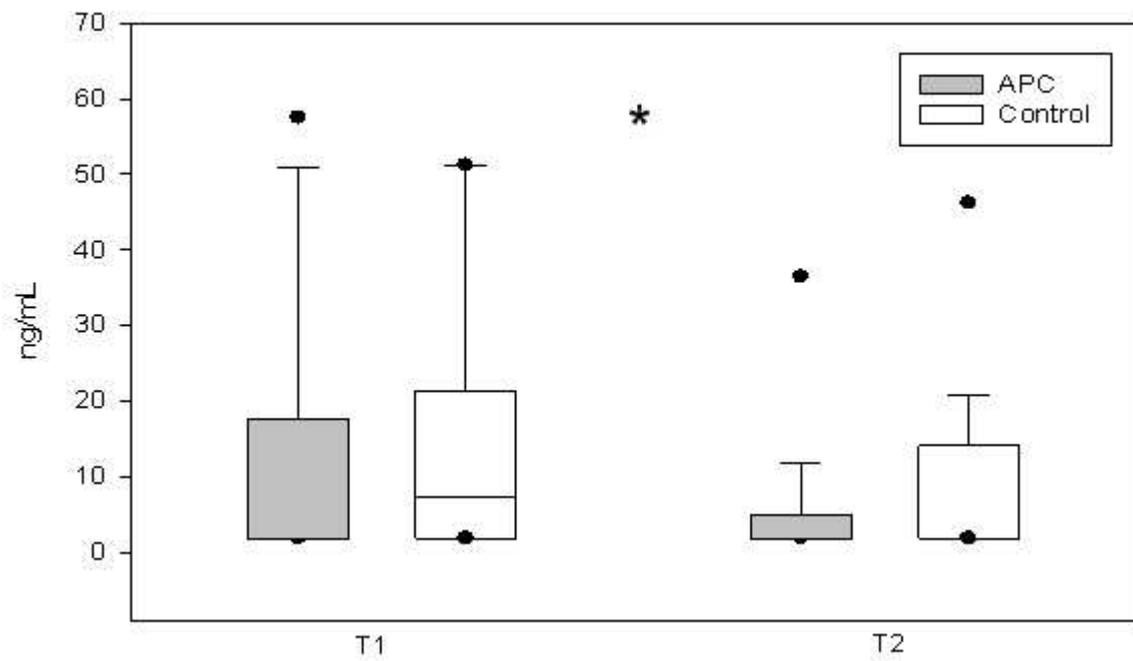


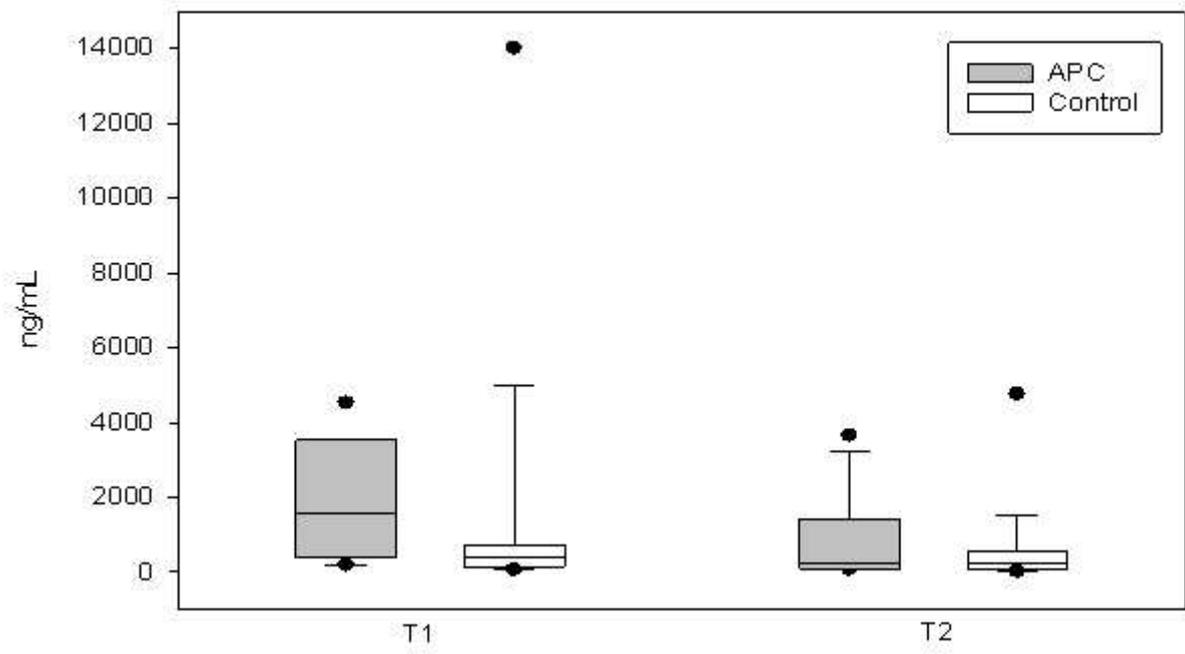
Figure 2 : Evolution of a) INF-gamma, b) IL1-beta, c) IL-6 and d) IL-8 expression in rhAPC and control group between T1 and T2. Box and whiskers plot show median and interquartile range group for these cytokines. There is a significant decrease of INF-gamma levels between T1 and T2 for both rhAPC and control group (\*  $p < 0.05$ ) but no difference between groups.

For the others cytokines, no statistical change was found between groups or during time.

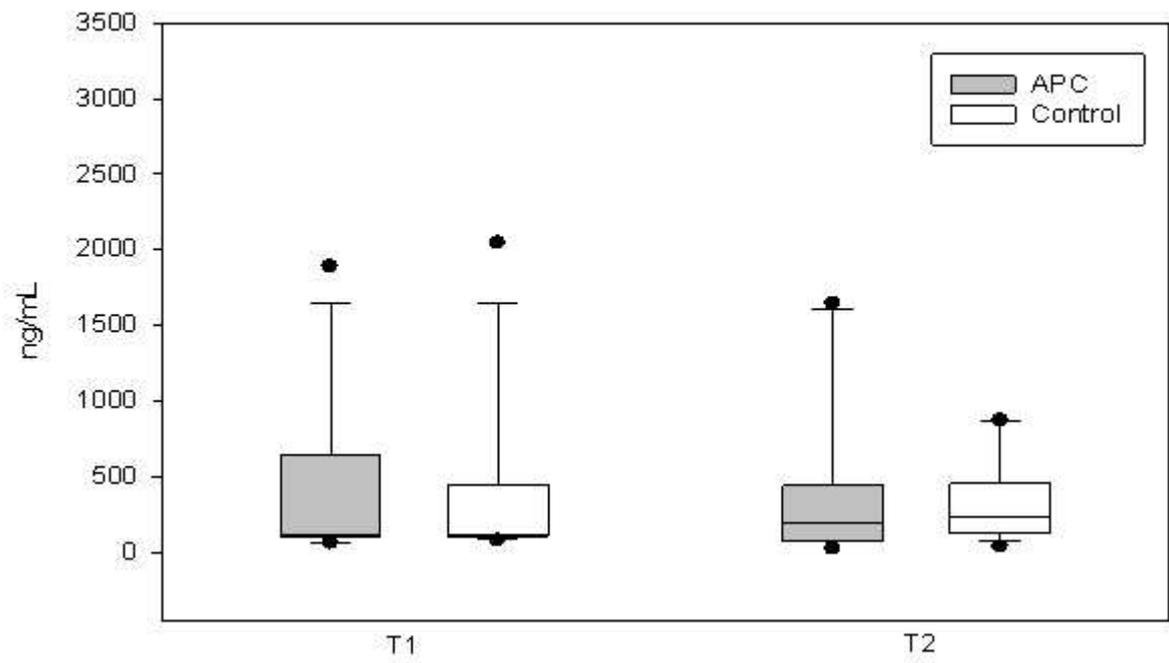
a) IFN gamma



b) IL1-beta



c) IL-6



d) IL-8

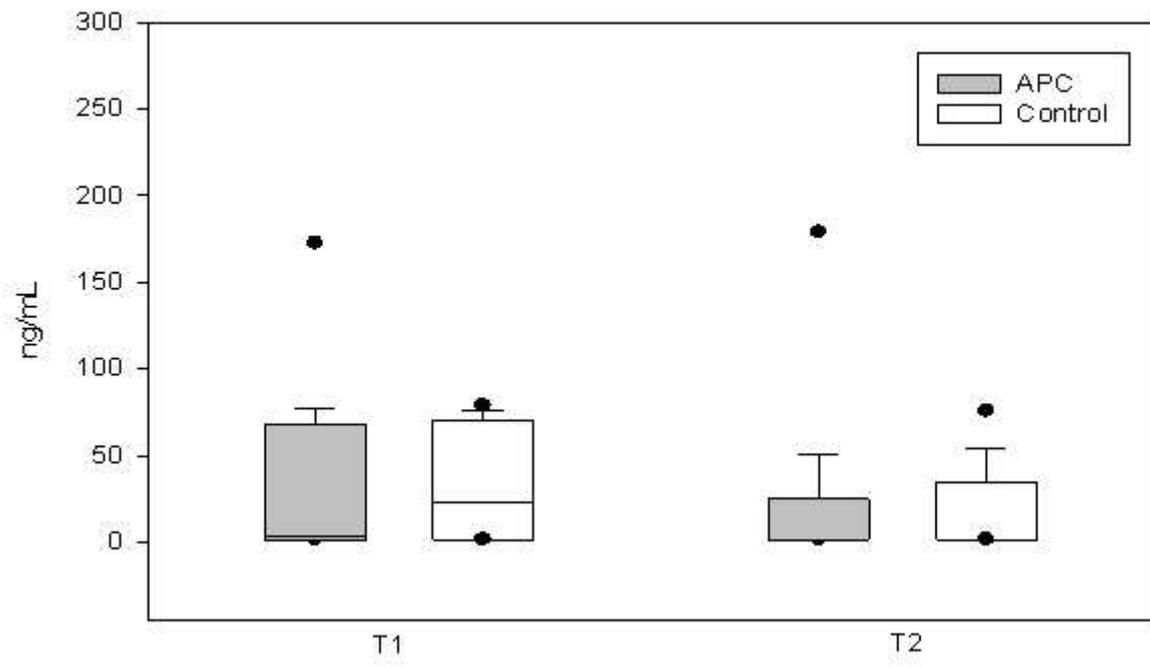
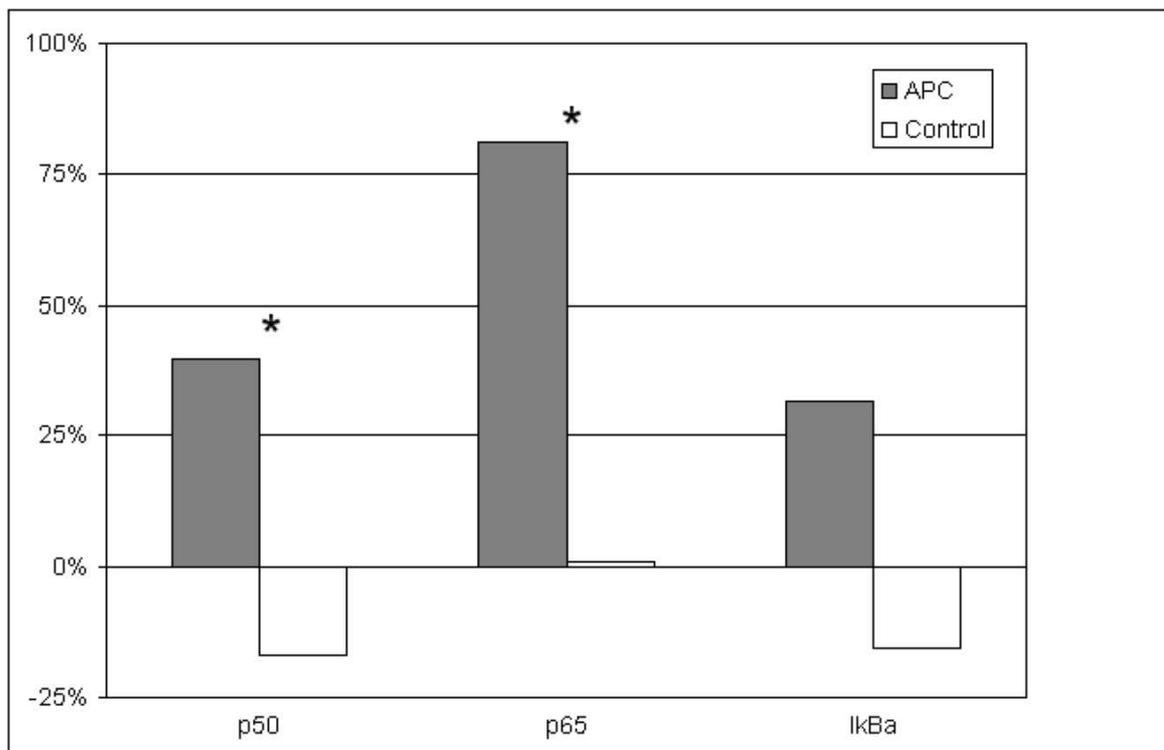


Figure 3 : NF- $\kappa$ B gene expression profile of rhAPC (n=25) and control group (n=25). The figure shows the percentage of variation of mRNA level of the NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B subunits between T1 and T2 for rhAPC group (solid bar) and control group (empty bar). There is a statistical difference of expression of p50 and p65 between the rhAPC and the control group (\* p < 0.01), but no statistical difference for I $\kappa$ Ba expression between the two groups (NS).





## Discussion

---



Notre travail de thèse avait pour objectif de mieux comprendre les bases moléculaires du choc septique chez l'homme, en particulier d'explorer certains mécanismes régulant l'apoptose lymphocytaire. Nous avons également recherché d'éventuels marqueurs prédictifs de gravité ou de réponse au nouveau traitement que constitue la PCA.

Notre première étude (cf. article 1) a consisté à mettre en évidence les phénomènes d'apoptose observés dans le choc septique chez l'homme et à essayer d'en préciser les mécanismes moléculaires. En effet, comme nous avons pu le voir dans l'introduction de notre travail, l'évolution des phénomènes immuno-inflammatoires dans le choc septique est extrêmement rapide. Compte-tenu de la cinétique des événements physiopathologiques du choc septique, constituée de la succession d'une phase pro-inflammatoire (SIRS) et d'une phase anti-inflammatoire (CARS) nous avons choisi d'effectuer nos prélèvements à des temps précisément documentés pour contrôler au mieux les biais liés au temps de prélèvement initial. Contrairement à notre étude, la plupart des travaux publiés chez l'homme ne tiennent que très peu compte de cette cinétique. Par exemple, certains travaux comparent des événements cellulaires ayant lieu dans un intervalle de temps de 1 à 3 jours suivant le début supposé du choc septique. Enfin, l'évolution des patients avant l'admission à l'hôpital n'est pas connue. Ainsi, certains patients avaient pu commencer à développer leur infection grave plusieurs jours avant leur arrivée à l'hôpital. C'est pourquoi nous avons choisi de n'inclure dans notre travail que des patients développant un choc septique nosocomial, ce qui permet d'utiliser le processus d'infection grave comme un modèle fiable.

Dans ce travail, nous avons cherché à établir la cinétique des événements apoptotiques par la mesure de l'apoptose précoce des cellules immunitaires circulantes et l'expression de Bcl-2 et Bax, deux facteurs impliqués dans la régulation de l'apoptose lymphocytaire. En corrélant leur expression avec l'apoptose de ces cellules circulantes et les différentes sous-populations lymphocytaires T, nous avons mis en évidence une immunodépression plus forte chez les patients qui décèdent de choc septique par comparaison avec ceux qui survivent. Si nous n'observons pas de variation d'expression significative de Bax à la phase initiale du choc septique et au cours du temps, en revanche nos résultats montrent que l'expression de Bcl-2 semble être un facteur pronostique précoce d'évolution défavorable lors du choc septique : son expression est fortement diminuée à la phase précoce du choc septique chez les patients qui décéderont. De

plus, son expression est corrélée au taux d'apoptose lymphocytaire, révélant l'existence d'un lien entre la baisse de son expression et l'augmentation du taux d'apoptose lympho-monocytaire.

Notre étude a permis de montrer que cette immunodépression plus forte n'est pas liée à la production plus importante de cytokines proinflammatoires dans le groupe qui décède car nos résultats ne montrent pas de différence de concentration entre les groupes survivants et non survivants, que ce soit pour le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 ou d'autres cytokines proinflammatoires. De même, le taux de cytokines anti-inflammatoires n'est pas différent entre ces deux groupes. Notre travail confirme que le mécanisme conduisant à l'apoptose des cellules immunocompétentes est indépendant du taux plasmatique des cytokines mesurées.

Cependant, les mécanismes à l'origine de la baisse d'expression transitoire de Bcl-2 ne sont pas encore élucidés. Il peut en effet s'agir d'une baisse d'expression liée à la régulation du promoteur de Bcl-2 ou à une dégradation accélérée de l'ARNm de Bcl-2. Mais il est techniquement difficile de pouvoir mettre en évidence de tels mécanismes *in vivo* chez l'homme. Des expériences complémentaires sur des modèles cellulaires ou animaux plus faciles à contrôler seraient nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires de ces phénomènes d'immunodépression contemporain de la phase initiale du choc septique.

Si nous replaçons nos travaux en regard des hypothèses physiopathologiques classiquement admises dans le choc septique, il apparaît que la lymphopénie initiale observée dans les 6 à 12 heures suivant le début de l'infection grave est liée à la fois à l'induction de l'apoptose par une augmentation significative des cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1, etc.) et une chute de l'expression de Bcl-2, principal facteur anti-apoptotique. Or la baisse d'expression de Bcl-2 est beaucoup plus importante chez les patients qui décèdent, de l'ordre d'un facteur 10 par rapport aux survivants. La mortalité initiale liée à la phase de SIRS excessif ne serait pas liée exclusivement à une plus forte expression des cytokines pro-inflammatoires puisque les taux initiaux de cytokines ne sont pas différents entre patients qui survivent et ceux qui décèdent. Plus vraisemblablement, elle serait liée à une chute de l'expression du facteur anti-apoptotique Bcl-2 qui rend les cellules immunitaires plus sensibles à l'apoptose. Cette hypothèse est à confronter avec une étude de Hotchkiss et al. publiée en 2005 [288] faites chez l'homme. Dans cette publication, les auteurs montrent que l'apoptose des lymphocytes T CD3+ est augmentée chez les patients présentant un sepsis par rapport aux patients non septiques, cette augmentation de l'apoptose étant liée à une baisse globale de l'expression de Bcl-2. Toutefois, les auteurs ne montrent pas de différence du niveau d'apoptose des lymphocytes T CD3+ selon le niveau

d'expression de Bcl-2. Mais leur analyse par cytométrie montre chez les patients en choc septique que le pourcentage de T CD3 + apoptotique (via le marquage par la caspase 3 activée) est de 21,1 % lorsque Bcl-2 est exprimé normalement. Alors que ce pourcentage est de 5,9 % lorsque l'expression de Bcl-2 est réduite. Etant donné que Bcl-2 est anti-apoptotique, il semble contradictoire que l'augmentation de son expression conduise à une augmentation de l'apoptose. Toutefois, les résultats de ce travail montrent des taux d'apoptose moyens des lymphocytes T CD3+ chez leurs patients en choc septique (de 9 à 12 %) comparables à ceux de notre étude (de l'ordre de 16 %) qui mesurait l'apoptose lymphocytaire globale.

Par la suite, l'équipe de Hotchkiss et al. [289] s'est intéressée au lien possible entre l'engagement du TCR et l'AICD sur l'apoptose lymphocytaire observée dans le choc septique. L'engagement du TCR par des Ags ou d'autres activateurs polyclonaux devant conduire à une prolifération cellulaire puis une mort par apoptose. Les auteurs ont mesuré sur un modèle murin ces différents phénomènes, mais quel que soit le type de stimulation du TCR, aucune prolifération des lymphocytes T n'est observée. De plus, l'engagement du TCR n'est pas nécessaire pour induire l'apoptose observée dans le choc septique. Une seconde stimulation des lymphocytes T ne modifie pas définitivement l'orientation du profil Th1/Th2. Toutefois, à la suite d'une seconde stimulation, l'expression des cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4 et IL-5) est plus faible alors que l'expression de l'IL-10, principale cytokine anti-inflammatoire, est augmentée. Ces résultats confirment l'hypothèse que la phase d'immunoparalysie est en partie liée à la production plus importante d'IL-10, sans que le niveau d'IL-10 ne soit systématiquement prédictif de la mortalité de cette phase tardive [290-295]. En effet, nos travaux ne montrent pas de différence d'expression d'IL-10 entre les patients survivants et non survivants, ni de différence de ratio IL-10/TNF $\alpha$ .

Des expériences d'inactivation de l'IL-10 chez la souris [296] montrent que le défaut d'expression de cette cytokine augmente la mortalité lors d'une péritonite expérimentale. De plus, le taux des cytokines pro-inflammatoires est statistiquement plus grand chez les souris IL-10/-/- par rapport aux souris sauvages. De façon encore plus intéressante, une administration d'anticorps anti-IL-10 à la phase précoce d'un sepsis expérimental n'améliore pas la survie des souris [297], alors qu'une administration plus tardive est efficace [298]. Enfin, l'IL-10 est susceptible de limiter les phénomènes d'induction d'apoptose des lymphocytes B en augmentant l'expression de Bcl-2 [299, 300]. A la lumière de nos résultats, il est possible qu'à la phase précoce du choc septique, un défaut de production d'IL-10 ne puisse pas compenser la baisse d'expression de Bcl-2 et donc limiter l'extension des phénomènes apoptotiques.

Cependant, une étude longitudinale chez l'homme mesurant l'ARNm d'un panel de cytokines impliquées dans le choc septique [301] a montré que l'élévation précoce de l'ARNm de l'IL-10 était un facteur de mauvais pronostic. Son expression était corrélée à l'expression d'un CHM de classe II (HLA-DR) à la surface des monocytes, un autre marqueur d'immunoparalysie [177]. Si ce résultat peut sembler paradoxal, il faut préciser que l'expression de l'IL-10 restait élevée tout le long de l'étude (soit 13 jours) chez les patients non survivants, alors que son expression diminuait significativement chez les patients survivants.

Ceci indique très vraisemblablement qu'une augmentation trop importante de l'IL-10 à la phase précoce du choc septique ou une persistance d'un taux élevé d'IL-10 conduit à un état d'immunoparalysie qui est, comme nous l'avons vu dans l'introduction, responsable du décès tardif. L'IL-10 n'est probablement utile qu'à la phase précoce du choc, en compensant la phase de SIRS excessif et donc en limitant la mortalité précoce.

Enfin, de nombreuses autres publications sur des modèles cellulaires ou animaux montrent que l'IL-10 serait inducteur d'apoptose via la modulation de l'expression des gènes de la famille de Bcl-2 [302-305]. En définitive, s'il semble établi que l'IL-10 peut interagir avec les mécanismes de l'apoptose, son effet dépend du contexte physiopathologique, du temps d'administration et du type cellulaire étudié [306]. A la lumière de ces données, il serait utile de conduire une étude longitudinale mesurant sur au moins 15 jours d'évolution du choc septique, les principales cytokines impliquées dans sa physiopathologie et leur relation avec les phénomènes d'apoptose observés dans le choc septique.

En tout état de cause, ces résultats confortent l'hypothèse que l'exacerbation des processus apoptotiques à la phase initiale du choc septique est délétère. La recherche de stratégies thérapeutiques visant à limiter ces phénomènes de mort cellulaire est un choix qui apparaît de plus en plus fondé.

C'est dans ce contexte de recherche de stratégies thérapeutiques anti-apoptotiques dans le choc septique qu'en 2001, l'étude PROWESS a montré que la rhPCA réduisait significativement la mortalité à 28 jours de patients en choc septique (24,7% dans le groupe rhPCA contre 30,8% dans le groupe placebo). L'effet thérapeutique de la rhPCA dans le choc septique a été présenté comme la conséquence de son activité anticoagulante. Cette activité antithrombotique passe par l'inactivation des facteurs Va et VIIIa, limitant ainsi la génération de thrombine. Cette baisse de production de thrombine serait à l'origine de la réduction des phénomènes inflammatoires, pro-coagulants et antifibrinolytiques. Or, de nombreuses preuves directes ou indirectes suggèrent que les effets de la rhPCA ne se limitent pas à ces effets anticoagulants.

Parmi ces preuves indirectes, une étude [307] de génotypage du facteur V a été conduite à la suite de l'essai PROWESS. En effet, le polymorphisme R506Q de ce facteur de la coagulation est, d'une part associé à des risques plus importants de thromboses veineuses et d'autre part rend le facteur Va résistant au clivage par la PCA [308]. Dans cette étude, 3,9% des patients (150/3894) présentant un sepsis grave étaient hétérozygotes pour le polymorphisme du facteur V. Aucun homozygote n'a été identifié. La proportion d'hétérozygotes retrouvée dans l'étude est statistiquement différente par rapport à la population utilisée comme référence (3,9 % dans l'étude PROWESS versus 2,5 % pourcentage d'hétérozygotie servant de référence;  $p=0,05$ ). Il n'y avait pas de différence significative entre les hétérozygotes et les patients non mutés pour ce qui concerne le score APACHE II, le nombre de dysfonctions d'organes ou le nombre d'hémorragies graves ou d'événements thrombotiques observés. Le pourcentage de mortalité à 28 jours dans le groupe rhPCA n'était pas significativement différent entre le groupe de patients portant la mutation et les patients non mutés (respectivement de 20,3% et 24,9%, risque ratio à 0,82; intervalle de confiance 95% : 0,57-1,17). Le fait que les patients traités par rhPCA portant une mutation hétérozygote aient une survie comparable aux patients non mutés suggèrerait de façon indirecte que le bénéfice de la rhPCA passe par d'autres voies que l'inactivation du facteur Va. Ces données ont conduit à rechercher des analogues de la rhPCA dépourvus d'effet anticoagulants mais conservant des effets anti-inflammatoires et anti-apoptotiques [309]. Tout comme la protéine C activée, ces analogues semblent efficaces sur les modèles *in vitro* pour limiter l'apoptose induite par la staurosporine, un inhibiteur des protéines kinase C. Toutefois la staurosporine est un inducteur de l'apoptose via une voie de signalisation, qui à notre connaissance, n'est pas impliquée dans la physiopathologie du choc septique. De plus, aucune donnée sur les effets de ces molécules n'est disponible dans des modèles expérimentaux chez l'animal.

Compte tenu de ces preuves indirectes d'un effet de la rhPCA sur d'autres mécanismes physiologiques que la coagulation, notre second travail (cf. article 2) s'est attaché à mettre en évidence et à préciser d'éventuels effets sur l'apoptose ou l'inflammation. Nos résultats montrent que la protéine C activée intervient essentiellement dans la régulation de l'apoptose lymphomonocytaire. En effet, la comparaison de l'expression des différents gènes pro (Bax) et anti-apoptotiques (Bcl-2 et Bcl-XL) avant et après traitement entre notre groupe traité par rhPCA et le groupe choc septique contrôle indique que l'expression de Bcl-2 et Bcl-XL est augmentée dans le groupe traité par rapport au groupe non traité par rhPCA, alors que l'expression de Bax ne varie pas. La rhPCA oriente le ratio Bax/Bcl-2 et Bax/Bcl-XL vers un effet anti-apoptotique. De plus, la mesure de l'apoptose par cytométrie en flux montre que l'effet de la rhPCA maintient le taux d'apoptose des PBMC à un taux inférieur à celui du groupe contrôle (respectivement 11,7 % vs 16,2% à T2,  $p < 0,001$ ).

Enfin, il existe une corrélation dans le groupe traité par rhPCA entre le taux d'apoptose à T2 et le niveau d'expression de Bcl-2 ( $r^2=0,624$ ,  $p =0,023$ ) mais il n'y a pas de corrélation avec celui de Bcl-XL ou de Bax. Concernant l'effet anti-inflammatoire de la rhPCA, nos résultats ne montrent pas de différence d'évolution des marqueurs de l'inflammation entre les groupes. Ainsi l'augmentation du nombre de lymphocytes totaux circulants entre T1 et T2 est significativement plus importante dans le groupe traité par rhPCA que dans le groupe contrôle. Mais nous n'observons pas de différence en ce qui concerne les sous-populations lymphocytaires (T CD4+ et T CD8+) ou le ratio T CD4/CD8 (données non montrées). Seuls les monocytes présentent un profil d'évolution différent entre les groupes avec une augmentation significative de leur taux entre T1 et T2 dans le groupe traité par rhPCA par rapport au groupe contrôle.

Dans notre étude, nous n'avons pas observé de réduction plus importante de l'expression de l'IL-6 dans le groupe traité par rhPCA par rapport au groupe contrôle. Dans l'étude PROWESS, la réduction du taux d'IL-6 était significativement plus importante à J2 ( $p=0,009$ ) et à J4, J5, J6, J7 (respectivement  $p=0,025$ ,  $p=0,017$ ,  $p=0,016$  et  $p=0,022$ ) dans le groupe rhPCA par rapport au groupe placebo. Malgré un effet de la rhPCA sur l'expression de l'IL-6, sa concentration n'est pas systématiquement différente entre le groupe placebo et le groupe traité à tous les temps de l'étude. De plus, une seconde analyse statistique des données de l'étude PROWESS ne retrouve pas cette diminution de l'IL-6 dans le groupe traité par rhPCA par rapport au groupe placebo [310]. Si l'effet anti-inflammatoire de la rhPCA est prouvé dans des modèles cellulaires, à l'heure actuelle il n'existe toujours pas de preuve de cet effet *in vivo* chez l'homme.

L'ensemble de nos résultats montre que la protéine C activée module l'expression des gènes de la famille de Bcl-2 en augmentant l'expression des gènes anti-apoptotiques Bcl-2 et dans une moindre mesure Bcl-XL, sans effet sur l'expression de Bax, gène pro-apoptotique. Toutefois, son mécanisme d'action sur la population lymphocytaire reste à élucider. Des récepteurs de la rhPCA sont présents sur les polynucléaires, les monocytes et les cellules endothéliales, mais à notre connaissance, sont absents sur les lymphocytes humains. L'effet observé sur notre population majoritairement lymphocytaire pourrait donc être un effet indirect. Des données *in vitro* proposent que la protéine C activée exerce ses propriétés anti-inflammatoires en inhibant la production des cytokines inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 et IL-6) par les monocytes et en réduisant l'adhérence des monocytes et des neutrophiles à l'endothélium lésé. Toutefois nos résultats *in vivo* ne montrent pas de différence d'évolution des marqueurs de l'inflammation entre les groupes. Une baisse significative du taux d'IL-10 et de TNF- $\alpha$  dans le groupe choc septique contrôle entre T1 et T2 est observée sans que cette baisse ne soit accompagnée par une différence d'évolution du ratio IL-10 sur TNF- $\alpha$ , reflet du statut inflammatoire des patients. Compte tenu des variations interindividuelles parfois importantes que nous observons, il est possible que cette différence ne soit pas mise en évidence dans le groupe traité par rhPCA du fait de l'effectif réduit. L'inclusion de nouveaux patients devrait permettre de répondre plus clairement à cette question.

Le choc septique est un syndrome qui évolue au cours du temps. Un biais possible de notre étude est que le temps T1 d'inclusion des patients dans l'étude ne soit pas strictement comparable entre les groupes. En effet, pour le groupe choc septique contrôle le prélèvement du temps T1 est réalisé dans une fenêtre de 6 à 12 heures suivant le diagnostic de choc septique. En revanche, pour le groupe choc septique traité par rhPCA, le prélèvement du temps T1 est effectué 1 heure avant le début de la perfusion de rhPCA, soit jusqu'à 24 heures après le début du choc septique. Ceci est en accord avec les valeurs des cytokines observées, en particulier le TNF- $\alpha$  et l'IL-10 dont les valeurs sont statistiquement supérieures à T1 dans le groupe rhPCA par rapport au groupe contrôle. Toutefois, la valeur moyenne des ratios IL-10 sur TNF- $\alpha$  à T1 n'est pas différente entre les groupes T1 et à T2, ce qui indique que les prélèvements ont été effectués lors de la même phase inflammatoire du choc septique. De plus, les valeurs d'expression de Bax, Bcl-2 et Bcl-XL comme les sous-populations lymphocytaires ne sont pas différentes entre les deux groupes à T1. Ce faisceau d'arguments tend à prouver que les patients ont été prélevés dans la même phase d'évolution du choc septique du fait des temps d'inclusion proches.

Ce second travail a mis en évidence la modulation de l'expression de facteurs anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL. Or une étude récente de Hotchkiss et al. [138] a montré que, suite à une péritonite expérimentale, des souris surexprimant Bcl-XL ont un taux de survie 3 fois supérieure à celui de souris sauvages. Cette surexpression s'accompagne d'une apoptose lymphocytaire B et T fortement réduite par rapport aux souris sauvages. Ce résultat conforte nos observations faites chez l'homme et montre qu'en effet Bcl-2 n'est probablement pas le seul gène anti-apoptotique impliqué dans les phénomènes d'apoptose lymphocytaire lors du choc septique.

L'objectif de notre troisième travail (cf. article 3) nous a conduit à préciser le mécanisme conduisant à la modification d'expression de Bcl-2 et de Bcl-XL par la rhPCA. Nous avons recherché quels sont les facteurs de transcription impliqués dans la régulation de son expression. Parmi ceux décrits dans la littérature, le facteur de transcription NF- $\kappa$ B a retenu notre attention. D'une part, un des phénomènes précoces d'activation de l'immunité innée passe par la reconnaissance des micro-organismes pathogènes via les TLR. Or, une des voies principales de signalisation cellulaire des TLR est la voie de NF- $\kappa$ B. D'autre part, il existe deux sites consensus de fixation des sous-unités de NF- $\kappa$ B, situés au niveau du promoteur du gène de Bcl-2, respectivement en -2306 et -1896 par rapport au gène. Enfin, des expériences de siRNA des principales sous-unités de NF- $\kappa$ B (p50, p65/RelA) sur des cellules immunitaires ont montré que l'expression constitutive de NF- $\kappa$ B est nécessaire pour maintenir le niveau d'expression de certaines protéines de la famille de Bcl-2 dont Bcl-XL afin d'éviter une apoptose massive de ces cellules. Pour contrôler les biais liés aux principaux polymorphismes des récepteurs TLR-2 et TLR-4 pouvant modifier l'expression des gènes de NF- $\kappa$ B, nous avons recherché par séquençage les principaux polymorphismes de ces TLR. Ensuite, nous avons recherché s'il existait une corrélation entre l'expression des principales sous-unités activatrices et inhibitrices de NF- $\kappa$ B et les gènes de la famille de Bcl-2. Nous avons mesuré par RT-PCR quantitative relative sur les cellules mononuclées du sang circulant, l'expression des sous-unités de NF-kappa B (p50, p65/RelA) et I $\kappa$ Ba, la principale sous unité inhibitrice de NF- $\kappa$ B, chez des patients présentant un choc septique traité ou non par protéine C activée. Deux prélèvements ont été effectués au cours du temps : dans une fenêtre de 6 à 12 heures suivant le début du choc septique (T1) et 36 heures après ce premier prélèvement (T2). Pour le groupe traité par protéine C activée, le premier prélèvement a également été réalisé avant le début de traitement par la rhPCA.

Aucune différence statistique entre les deux groupes n'a été montrée, que ce soit pour l'âge, les scores cliniques ou la mortalité. Aucune différence de distribution des polymorphismes des récepteurs TLR-2 ou TLR-4 n'a été mise en évidence. Seule une association entre les polymorphismes TLR-4-Asp299Gly et TLR-4-Thre399Ile est significative ( $p < 0,05$ ) mais qui a déjà été décrite dans la littérature [311]. Aucune différence dans les profils Th1/Th2 n'a été observée entre les groupes, mais les profils suggèrent une orientation vers une réponse Th2 quels que soient les groupes. Le résultat le plus intéressant de notre étude est l'augmentation significative de l'expression des sous-unités activatrices de NF- $\kappa$ B que sont p50 et p65/RelA (respectivement 39,9 % et 81,3%,  $p < 0,05$ ) par la rhPCA entre T1 et T2, sans modification significative de I $\kappa$ Ba. Nos résultats confirment que la protéine C activée agit *in vivo* chez des patients en choc septique, en modifiant au niveau transcriptionnel l'expression des facteurs activateurs de NF- $\kappa$ B (p50 et p65/RelA) dans les cellules immunitaires circulantes.

Une publication de l'équipe de Joyce et al. [282] a montré sur des cellules endothéliales ombilicales humaines que la rhPCA diminue d'au moins un facteur 2 l'expression d'une sous-unité de NF- $\kappa$ B qui est NF- $\kappa$ B2, que les cellules soient stimulées par le TNF- $\alpha$  ou non. Notre étude montre un phénomène similaire *in vivo* chez des patients en choc septique sur les cellules mononuclées circulantes, majoritairement des lymphocytes circulants. En revanche, les sous-unités induites sont p50 (NF- $\kappa$ B1) et p65/RelA. Si nos données confirment bien une interaction entre la rhAPC et la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B, la différence de type cellulaire et le modèle d'induction de l'apoptose par le TNF- $\alpha$  dans ces études *in vitro* peuvent expliquer les différences d'action sur les sous-unités de NF- $\kappa$ B que nous observons *in vivo*. Enfin, sur ce même modèle cellulaire, la rhAPC induit également l'expression d'un membre de la famille de Bcl-2, le facteur anti-apoptotique A1, qu'il y ait induction ou non de l'apoptose par le TNF- $\alpha$ . Dans ce cas, nos observations *in vivo* sont en accord avec ces données *in vitro*.

A la suite de l'essai PROWESS, il est intéressant de noter qu'un essai utilisant les corticoïdes à faible dose sur une population ciblée en insuffisance cortico-surrénalienne relative, a fait la preuve de son efficacité dans le choc septique [312]. Or les corticoïdes sont des molécules anti-inflammatoires dont le mécanisme d'action passe par la modulation de NF- $\kappa$ B. Ces données, ainsi que nos travaux *in vivo* destinés à caractériser certains mécanismes moléculaires régulés par la rhPCA et impliquant l'apoptose des cellules immunitaires circulantes via la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B, ouvrent de nombreuses perspectives en terme de recherche physiopathologique chez l'homme.

Nos données suggèrent que la rhAPC agit sur la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B mais sans préciser le type de mécanisme sous-jacent potentiel. Il existe un récepteur physiologique à la PCA, l'endothelial protein C receptor (EPCR) [276]. Cette protéine transmembranaire présente des homologies avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et CD1, et est principalement exprimée par les cellules endothéliales des gros vaisseaux. L'EPCR seul ne suffit pas pour que la PCA déclenche des signaux intracellulaires. Il faut pour cela l'intervention d'un second récepteur qui appartient à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G et activés par protéolyse ou PAR, famille qui compte à l'heure actuelle 4 membres. À la surface de la cellule endothéliale, la PCA fixée sur l'EPCR active par protéolyse le récepteur PAR-1 [276], stimulant en réponse la transcription de nombreux gènes dont plusieurs sont impliqués dans la lutte contre l'inflammation ou contre l'apoptose. Ainsi au niveau des cellules endothéliales, l'expression de l'Intracellular Cell Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) est régulée par l'activation de PAR-1 via entre autre, la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B [313]. La collaboration EPCR / PAR-1 pourrait expliquer l'effet bénéfique de la rhPCA dans le choc septique. Toutefois, le mécanisme moléculaire qui permet à l'EPCR de se comporter comme un co-récepteur, changeant la spécificité de la PCA, lui permettant de cliver PAR-1 et/ou positionnant l'enzyme en regard de la liaison peptidique à cliver reste à élucider. De même, le mécanisme expliquant pourquoi la différence d'activation des cellules endothéliales via PAR-1 conduit à un phénotype induit pro-inflammatoire pour la thrombine, anti-inflammatoire pour la PCA, n'est pas connu à l'heure actuelle. Une autre équipe a suggéré que la translocation du complexe EPCR/PCA dans le noyau soit, elle aussi, associée à une modification du profil d'expression des gènes. Il est alors possible d'imaginer que les deux mécanismes (activation de PAR-1, translocation du complexe EPCR/PCA) pourraient s'associer ou se relayer pour donner un profil spécifique d'expression génique [314]. Le mécanisme décrit ici pour expliquer les réponses cellulaires induites par la PCA s'applique à la cellule endothéliale, mais n'est pas généralisable à tous les types cellulaires susceptibles d'exprimer l'EPCR (comme le monocyte par exemple), où le ou les partenaires de l'EPCR restent à identifier.

Malgré un bénéfice relativement modeste en terme de survie, la rhPCA constitue un outil thérapeutique dans la prise en charge des patients en choc septique. Les échecs des nombreux essais thérapeutiques visant à contrer les phénomènes inflammatoires précoces du choc septique prouvent les limites de l'intervention pharmacologique. Réduire de façon excessive l'inflammation à la phase précoce de SIRS peut être tout aussi délétère qu'à la phase tardive d'immunoparalysie. Dans le premier cas, le risque est de retarder la réponse immunitaire innée et de renforcer secondairement la phase d'immunoparalysie. Dans le second cas, le risque est de prolonger excessivement la phase d'immunoparalysie et de contribuer à l'émergence d'infections secondaires ou d'infections nosocomiales. L'administration de molécules destinées à moduler l'inflammation doit tenir compte des différentes phases d'évolution du choc septique. Il semble évident qu'un traitement par des molécules à visé anti-inflammatoires peut être délétère chez des patients lors de la phase tardive d'immunoparalysie, alors que ces mêmes molécules seront bénéfiques à la phase de SIRS excessif. Ceci explique probablement l'échec des essais cliniques visant à moduler l'inflammation au cours du choc septique, les molécules administrées n'ayant probablement un effet bénéfique qu'à la phase initiale du sepsis. Le dernier essai clinique concernant la rhPCA (Extended Evaluation of Recombinant Human Activated Protein C ou ENHANCE trial) [315] montre d'ailleurs que, plus le traitement par protéine C activée est administré précocement, plus la mortalité est faible : dans cet essai, les patients traités dans l'intervalle 0-24 h après la première dysfonction d'organe ont un taux de mortalité plus faible que les patients traités après 24 h (respectivement 22,9% vs. 27,4%,  $p = 0,01$ ).

L'ensemble des données de cette étude pourrait conduire à la mise au point d'outils permettant de caractériser l'effet du traitement par la rhPCA chez les patients en choc septique. L'inclusion de nouveaux patients dans notre cohorte pourrait permettre la mise en évidence d'autres marqueurs biologiques susceptibles d'expliquer la différence de réponse au traitement par la rhPCA.



## Conclusion et perspectives

---



Ce travail de collaboration entre les services de réanimation de l'hôpital de Hautepierre et le laboratoire de biochimie et biologie moléculaire, réalisé au sein du CHRU de Strasbourg a permis d'améliorer notre connaissance des mécanismes moléculaires précoces responsables de l'apoptose lymphocytaire dans le choc septique chez l'homme. La baisse très précoce et transitoire de l'expression de Bcl-2 est liée à l'intensité de la lymphopénie, elle-même associée à la mortalité précoce des patients en choc septique. La suite de nos travaux a permis de préciser au niveau moléculaire et cellulaire les effets biologiques de la protéine C activée. D'après nos résultats observés *in vivo* chez des patients en choc septique, la rhPCA semble bien exercer un effet anti-apoptotique en prévenant l'augmentation du taux d'apoptose lympho-monocytaire par un effet sur l'expression des gènes anti-apoptotiques que sont Bcl-2 et Bcl-XL. Le gène Bcl-2 semble plus particulièrement impliqué, l'augmentation de son expression est corrélée au taux d'apoptose lympho-monocytaire après traitement par rhPCA.

Afin d'élargir notre recherche, des prélèvements sanguins ont été effectués chez nos patients traités par rhPCA avant et après traitement en vue de réaliser une étude du profil d'expression de gène des leucocytes sur des puces à ADN commercialisées par la société Affymetrix. Cet outil de biologie moléculaire permet de mesurer l'expression de plus de 30 000 gènes et pourrait se montrer d'un grand intérêt pour mettre en évidence d'autres gènes ou d'autres voies de signalisation impliqués dans la réponse au traitement par la rhPCA. Par la comparaison des profils d'expression de patients bons ou mauvais répondeurs à la rhPCA ou par la comparaison des profils des patients qui décèdent avec ceux qui survivent, cette stratégie pourrait nous permettre de trouver des marqueurs permettant de sélectionner soit les patients susceptibles de bénéficier de ce traitement, soit de mieux comprendre les mécanismes moléculaires conduisant à la survie ou au décès des patients en choc septique et élaborer de nouveaux traitements ciblés.



## Bibliographie

---



1. Alberti, C., Brun-Buisson, C., Burchardi, H., et al. *Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study*. Intensive Care Med, 2002, 28: p. 108-21.
2. Bone, R. C., Sibbald, W. J. and Sprung, C. L. *The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure*. Chest, 1992, 101: p. 1481-3.
3. Levy, M. M., Fink, M. P., Marshall, J. C., et al. *2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference*. Crit Care Med, 2003, 31: p. 1250-6.
4. Alberti, C., Brun-Buisson, C., Goodman, S. V., et al. *Influence of systemic inflammatory response syndrome and sepsis on outcome of critically ill infected patients*. Am J Respir Crit Care Med, 2003, 168: p. 77-84.
5. Annane, D., Bellissant, E. and Cavaillon, J. M. *Septic shock*. Lancet, 2005, 365: p. 63-78.
6. Goris, R. J. *MODS/SIRS: result of an overwhelming inflammatory response?* World J Surg, 1996, 20: p. 418-21.
7. Bone, R. C. *Toward an epidemiology and natural history of SIRS (systemic inflammatory response syndrome)*. Jama, 1992, 268: p. 3452-5.
8. Charbonneau, P. *Syndrome de défaillance multiviscérale*. Conférences d'actualisation 1996 [cited; Available from: [http://www.sfar.org/sfar\\_actu/ca96/html/ca96\\_033/96\\_33.htm](http://www.sfar.org/sfar_actu/ca96/html/ca96_033/96_33.htm)].
9. Le Gall, J. R., Klar, J., Lemeshow, S., et al. *The Logistic Organ Dysfunction system. A new way to assess organ dysfunction in the intensive care unit. ICU Scoring Group*. Jama, 1996, 276: p. 802-10.
10. Baue, A. E., Durham, R. and Faist, E. *Systemic inflammatory response syndrome (SIRS), multiple organ dysfunction syndrome (MODS), multiple organ failure (MOF): are we winning the battle?* Shock, 1998, 10: p. 79-89.
11. Rivers, E., Nguyen, B., Havstad, S., et al. *Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock*. N Engl J Med, 2001, 345: p. 1368-77.
12. Hotchkiss, R. S. and Karl, I. E. *The pathophysiology and treatment of sepsis*. N Engl J Med, 2003, 348: p. 138-50.
13. Calandra, T., Baumgartner, J. D., Grau, G. E., et al. *Prognostic values of tumor necrosis factor/cachectin, interleukin-1, interferon-alpha, and interferon-gamma in the serum of patients with septic shock. Swiss-Dutch J5 Immunoglobulin Study Group*. J Infect Dis, 1990, 161: p. 982-7.
14. Smail, N., Messiah, A., Edouard, A., et al. *Role of systemic inflammatory response syndrome and infection in the occurrence of early multiple organ dysfunction syndrome following severe trauma*. Intensive Care Med, 1995, 21: p. 813-6.
15. Meisner, M. *Pathobiochemistry and clinical use of procalcitonin*. Clin Chim Acta, 2002, 323: p. 17-29.
16. Abraham, E., Wunderink, R., Silverman, H., et al. *Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor alpha in patients with sepsis syndrome. A randomized, controlled, double-blind, multicenter clinical trial. TNF-alpha MAb Sepsis Study Group*. Jama, 1995, 273: p. 934-41.
17. Gallagher, J., Fisher, C., Sherman, B., et al. *A multicenter, open-label, prospective, randomized, dose-ranging pharmacokinetic study of the anti-TNF-alpha antibody afelimomab in patients with sepsis syndrome*. Intensive Care Med, 2001, 27: p. 1169-78.
18. Tracey, K. J., Fong, Y., Hesse, D. G., et al. *Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia*. Nature, 1987, 330: p. 662-4.
19. Wortel, C. H., von der Mohlen, M. A., van Deventer, S. J., et al. *Effectiveness of a human monoclonal anti-endotoxin antibody (HA-1A) in gram-negative sepsis: relationship to endotoxin and cytokine levels*. J Infect Dis, 1992, 166: p. 1367-74.
20. Poeze, M., Froon, A. H., Ramsay, G., et al. *Decreased organ failure in patients with severe SIRS and septic shock treated with the platelet-activating factor antagonist TCV-309: a prospective, multicenter, double-blind, randomized phase II trial. TCV-309 Septic Shock Study Group*. Shock, 2000, 14: p. 421-8.
21. *The French National Registry of HA-1A (Centoxin) in septic shock. A cohort study of 600 patients. The National Committee for the Evaluation of Centoxin*. Arch Intern Med, 1994, 154: p. 2484-91.
22. Adrie, C., Laurent, I., Monchi, M., et al. *Postresuscitation disease after cardiac arrest: a sepsis-like syndrome?* Curr Opin Crit Care, 2004, 10: p. 208-12.
23. Dinarello, C. A. *Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock*. Chest, 1997, 112: p. 321S-329S.
24. Bone, R. C. *Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS*. Crit Care Med, 1996, 24: p. 1125-8.
25. Koltai, M., Hosford, D. and Braquet, P. G. *Platelet-activating factor in septic shock*. New Horiz, 1993, 1: p. 87-95.
26. Wang, S. D., Huang, K. J., Lin, Y. S., et al. *Sepsis-induced apoptosis of the thymocytes in mice*. J Immunol, 1994, 152: p. 5014-21.
27. Ayala, A., Herdon, C. D., Lehman, D. L., et al. *Differential induction of apoptosis in lymphoid tissues during sepsis: variation in onset, frequency, and the nature of the mediators*. Blood, 1996, 87: p. 4261-75.

28. Hiramatsu, M., Hotchkiss, R. S., Karl, I. E., et al. *Cecal ligation and puncture (CLP) induces apoptosis in thymus, spleen, lung, and gut by an endotoxin and TNF-independent pathway*. Shock, 1997, 7: p. 247-53.
29. Hotchkiss, R. S., Swanson, P. E., Cobb, J. P., et al. *Apoptosis in lymphoid and parenchymal cells during sepsis: findings in normal and T- and B-cell-deficient mice*. Crit Care Med, 1997, 25: p. 1298-307.
30. van der Poll, T. *Immunotherapy of sepsis*. Lancet Infect Dis, 2001, 1: p. 165-74.
31. Kerr, J. F., Wyllie, A. H. and Currie, A. R. *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972, 26: p. 239-57.
32. Le Tulzo, Y., Pangault, C., Gacouin, A., et al. *Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome*. Shock, 2002, 18: p. 487-94.
33. Lee, S., Christakos, S. and Small, M. B. *Apoptosis and signal transduction: clues to a molecular mechanism*. Curr Opin Cell Biol, 1993, 5: p. 286-91.
34. Leach, A. P. *Apoptosis: molecular mechanism for physiologic cell death*. Clin Lab Sci, 1998, 11: p. 346-9.
35. Igney, F. H. and Krammer, P. H. *Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis*. Nat Rev Cancer, 2002, 2: p. 277-88.
36. Mathe, G. *Apoptosis: an identical central or collateral mechanism in the development, function and death of neurons*. Biomed Pharmacother, 1997, 51: p. 97-100.
37. Opferman, J. T. and Korsmeyer, S. J. *Apoptosis in the development and maintenance of the immune system*. Nat Immunol, 2003, 4: p. 410-5.
38. Kofler, R., Schmidt, S., Kofler, A., et al. *Resistance to glucocorticoid-induced apoptosis in lymphoblastic leukemia*. J Endocrinol, 2003, 178: p. 19-27.
39. Kaplan, M. J. *Apoptosis in systemic lupus erythematosus*. Clin Immunol, 2004, 112: p. 210-8.
40. Eefting, F., Rensing, B., Wigman, J., et al. *Role of apoptosis in reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 2004, 61: p. 414-26.
41. Zhao, Z. Q. *Oxidative stress-elicited myocardial apoptosis during reperfusion*. Curr Opin Pharmacol, 2004, 4: p. 159-65.
42. Roth, K. A. *Caspases, apoptosis, and Alzheimer disease: causation, correlation, and confusion*. J Neuropathol Exp Neurol, 2001, 60: p. 829-38.
43. Anglade, P., Vyas, S., Javoy-Agid, F., et al. *Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease*. Histol Histopathol, 1997, 12: p. 25-31.
44. Duvall, E. and H., and Wyllie A. *Death and the cell*. Immunol Today 1986, 7: p. 115-19.
45. Bicknell, G. R. and M., and Cohen G. *Cleavage of DNA to large kilobase pair fragments occurs in some forms of necrosis as well as apoptosis*. Biochem Biophys Res Commun 1995, 207: p. 40-7.
46. Yang, J., X., Liu, K., Bhalla, et al. *Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked*. Science, 1997, 275: p. 1129-32.
47. Vander Heiden, M. G., S., Chandel N., K., Williamson E., et al. *Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria*. Cell, 1997, 91: p. 627-37.
48. Wyllie, A. H. *Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation*. Nature, 1980, 284: p. 555-6.
49. Kass, G. E., E., Eriksson J., M., Weis, et al. *Chromatin condensation during apoptosis requires ATP*. Biochem J, 1996, 318: p. 749-52.
50. Hengartner, M. O. and R., and Horvitz H. *Programmed cell death in Caenorhabditis elegans*. Curr Opin Genet Dev, 1994, 4: p. 581-6.
51. Yuan, J., S., Shaham, S., Ledoux, et al. *The C elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme*. Cell 1993, 75: p. 641-52.
52. Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., et al. *Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3*. Cell, 1997, 90: p. 405-13.
53. White, E. *Life, death, and the pursuit of apoptosis*. Genes Dev, 1996, 10: p. 1-15.
54. Chinnaiyan, A. M., K., O'Rourke, R., Lane B., et al. *Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death*. Science, 1997, 275: p. 1122-6.
55. Longthorne, V. L. and T., and Williams G. *Caspase activity is required for commitment to Fas-mediated apoptosis*. Embo J, 1997, 16: p. 3805-12.
56. Nagata, S. *Apoptosis by death factor*. Cell, 1997, 88: p. 355-65.
57. Golstein, P., D., Marguet and V., and Depraetere. *Homology between reaper and the cell death domains of Fas and TNFR1* letter. Cell, 1995, 81: p. 185-6.
58. Nagata, S. and P., and Golstein. *The Fas death factor*. Science, 1995, 267: p. 1449-56.
59. Yeh, W. C., Hakem, R., Woo, M., et al. *Gene targeting in the analysis of mammalian apoptosis and TNF receptor superfamily signaling*. Immunol Rev, 1999, 169: p. 283-302.
60. Nagata, S. and T., and Suda. *Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations*. Immunol Today, 1995, 16: p. 39-43.

61. Itoh, N., S., Yonehara, A., Ishii, et al. *The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis*. Cell, 1991, 66: p. 233-43.
62. Schulze-Osthoff, K., H., Walczak, W., Droge, et al. *Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis*. J Cell Biol, 1994, 127: p. 15-20.
63. Lynch, D. H., L., Watson M., R., Alderson M., et al. *The mouse Fas-ligand gene is mutated in gld mice and is part of a TNF family gene cluster*. Immunity, 1994, 1: p. 131-6.
64. Yeh, W. C., L., Pompa J., E., McCurrach M., et al. *FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis*. Science, 1998, 279: p. 1954-8.
65. Yang, E. and J., and Korsmeyer S. *Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death*. Blood, 1996, 88: p. 386-401.
66. Kelekar, A. and B., and Thompson C. *Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis*. Trends Cell Biol, 1998, 8: p. 324-30.
67. Strasser, A. *The role of BH3-only proteins in the immune system*. Nat Rev Immunol, 2005, 5: p. 189-200.
68. Nguyen, M., G., Millar D., W., Yong V., et al. *Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence*. J Biol Chem, 1993, 268: p. 25265-8.
69. Akao, Y., Y., Otsuki, S., Kataoka, et al. *Multiple subcellular localization of bcl-2: detection in nuclear outer membrane, endoplasmic reticulum membrane, and mitochondrial membranes*. Cancer Res, 1994, 54: p. 2468-71.
70. Hsu, Y. T., G., Wolter K. and J., and Youle R. *Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94: p. 3668-72.
71. Muchmore, S. W., M., Sattler, H., Liang, et al. *X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death*. Nature, 1996, 381: p. 335-41.
72. Minn, A. J., P., Velez, L., Schendel S., et al. *Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes*. Nature, 1997, 385: p. 353-7.
73. Antonsson, B., F., Conti, A., Ciavatta, et al. *Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2*. Science, 1997, 277: p. 370-2.
74. Schendel, S. L., Z., Xie, O., Montal M., et al. *Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94: p. 5113-8.
75. Schlesinger, P. H., A., Gross, M., Yin X., et al. *Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94: p. 11357-62.
76. Zhang, H., Q., Xu, S., Krajewski, et al. *BAR: An apoptosis regulator at the intersection of caspases and Bcl-2 family proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97: p. 2597-602.
77. Chinnaiyan, A. M., K., O'Rourke, M., Tewari, et al. *FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis*. Cell, 1995, 81: p. 505-12.
78. Hsu, H., J., Xiong and V., and Goeddel D. *The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation*. Cell, 1995, 81: p. 495-504.
79. Tschopp, J., M., Irmeler and M., and Thome. *Inhibition of fas death signals by FLIPs*. Curr Opin Immunol, 1998, 10: p. 552-8.
80. Chang, K. C., Unsinger, J., Davis, C. G., et al. *Multiple triggers of cell death in sepsis: death receptor and mitochondrial-mediated apoptosis*. Faseb J, 2007, 21: p. 708-19.
81. Knudson, C. M., S., Tung K., G., Tourtellotte W., et al. *Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death*. Science, 1995, 270: p. 96-9.
82. Deckwerth, T. L., L., Elliott J., M., Knudson C., et al. *BAX is required for neuronal death after trophic factor deprivation and during development*. Neuron, 1996, 17: p. 401-11.
83. Lindsten, T., Ross, A. J., King, A., et al. *The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues*. Mol Cell, 2000, 6: p. 1389-99.
84. Rathmell, J. C., Lindsten, T., Zong, W. X., et al. *Deficiency in Bak and Bax perturbs thymic selection and lymphoid homeostasis*. Nat Immunol, 2002, 3: p. 932-9.
85. Veis, D. J., Sorenson, C. M., Shutter, J. R., et al. *Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair*. Cell, 1993, 75: p. 229-40.
86. Nakayama, K., I., Negishi, K., Kuida, et al. *Targeted disruption of Bcl-2 alpha beta in mice: occurrence of gray hair, polycystic kidney disease, and lymphocytopenia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91: p. 3700-4.
87. Kamada, S., A., Shimono, Y., Shinto, et al. *bcl-2 deficiency in mice leads to pleiotropic abnormalities: accelerated lymphoid cell death in thymus and spleen, polycystic kidney, hair hypopigmentation, and distorted small intestine*. Cancer Res, 1995, 55: p. 354-9.
88. Motoyama, N., F., Wang, A., Roth K., et al. *Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice*. Science, 1995, 267: p. 1506-10.
89. Print, C. G., L., Loveland K., L., Gibson, et al. *Apoptosis regulator bcl-w is essential for spermatogenesis but appears otherwise redundant*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95: p. 12424-31.

90. Ley, R., Hadfield, K., Howes, E., et al. *Identification of a DEF-type docking domain for extracellular signal-regulated kinases 1/2 that directs phosphorylation and turnover of the BH3-only protein BimEL*. J Biol Chem, 2005, 280: p. 17657-63.
91. Bouillet, P., Metcalf, D., Huang, D. C., et al. *Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity*. Science, 1999, 286: p. 1735-8.
92. Yin, X. M., Wang, K., Gross, A., et al. *Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis*. Nature, 1999, 400: p. 886-91.
93. Shibue, T., Takeda, K., Oda, E., et al. *Integral role of Noxa in p53-mediated apoptotic response*. Genes Dev, 2003, 17: p. 2233-8.
94. Thornberry, N. A., G., Bull H., R., Calaycay J., et al. *A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes*. Nature, 1992, 356: p. 768-74.
95. Alnemri, E. S., J., Livingston D., W., Nicholson D., et al. *Human ICE/CED-3 protease nomenclature letter*. Cell, 1996, 87: p. 171.
96. Hofmann, K., P., Bucher and J., and Tschopp. *The CARD domain: a new apoptotic signalling motif*. Trends Biochem Sci, 1997, 22: p. 155-6.
97. Howard, A. D., J., Kostura M., N., Thornberry, et al. *IL-1-converting enzyme requires aspartic acid residues for processing of the IL-1 beta precursor at two distinct sites and does not cleave 31-kDa IL-1 alpha*. J Immunol, 1991, 147: p. 2964-9.
98. Mashima, T., M., Naito, K., Noguchi, et al. *Actin cleavage by CPP-32/apopain during the development of apoptosis*. Oncogene, 1997, 14: p. 1007-12.
99. Villa, P. G., J., Henzel W., M., Sensenbrenner, et al. *Calpain inhibitors, but not caspase inhibitors, prevent actin proteolysis and DNA fragmentation during apoptosis*. J Cell Sci 1998, 111: p. 713-22.
100. Rice, R. L., G., Tang D. and D., and Taylor J. *Actin cleavage in various tumor cells is not a critical requirement for executing apoptosis*. Pathol Oncol Res, 1998, 4: p. 135-45.
101. Samejima, K., A., Svingen P., S., Basi G., et al. *Caspase-mediated cleavage of DNA topoisomerase I at unconventional sites during apoptosis*. J Biol Chem, 1999, 274: p. 4335-40.
102. Pan, G., H., Bauer J., V., Haridas, et al. *Identification and functional characterization of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor*. FEBS Lett, 1998, 431: p. 351-6.
103. Kuida, K., A., Lippke J., G., Ku, et al. *Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme*. Science, 1995, 267: p. 2000-3.
104. Bergeron, L., I., Perez G., G., Macdonald, et al. *Defects in regulation of apoptosis in caspase-2-deficient mice*. Genes Dev 1998, 12: p. 1304-14.
105. Wang, L., M., Miura, L., Bergeron, et al. *Ich-1, an Ice/ced-3-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death*. Cell, 1994, 78: p. 739-50.
106. Kuida, K., S., Zheng T., S., Na, et al. *Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice*. Nature, 1996, 384: p. 368-72.
107. Woo, M., R., Hakem, S., Soengas M., et al. *Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes*. Genes Dev, 1998, 12: p. 806-19.
108. Varfolomeev, E. E., M., Schuchmann, V., Luria, et al. *Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally*. Immunity, 1998, 9: p. 267-76.
109. Hakem, R., A., Hakem, S., Duncan G., et al. *Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo*. Cell, 1998, 94: p. 339-52.
110. Kuida, K., F., Haydar T., Y., Kuan C., et al. *Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9*. Cell, 1998, 94: p. 325-37.
111. Nakagawa, T., H., Zhu, N., Morishima, et al. *Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta*. Nature, 2000, 403: p. 98-103.
112. Welihinda, A. A., W., Tirasophon and J., and Kaufman R. *The cellular response to protein misfolding in the endoplasmic reticulum*. Gene Expr 1999, 7: p. 293-300.
113. Zamzami, N., A., Susin S., P., Marchetti, et al. *Mitochondrial control of nuclear apoptosis*. J Exp Med, 1996, 183: p. 1533-44.
114. Brenner, C., I., Marzo, N., Zamzami, et al. *Coopération mortelle entre la protéine pro-apoptotique Bax et le translocateur à adénine nucléotidique pour le contrôle mitochondriale de l'apoptose*. Med Sci 1998, 14: p. 1399-401.
115. Modjtahedi, N., Giordanetto, F., Madeo, F., et al. *Apoptosis-inducing factor: vital and lethal*. Trends Cell Biol, 2006, 16: p. 264-72.
116. Kluck, R. M., E., Bossy-Wetzler, R., Green D., et al. *The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis*. Science, 1997, 275: p. 1132-6.
117. Jurgensmeier, J. M., Z., Xie, Q., Deveraux, et al. *Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95: p. 4997-5002.

118. Bossy-Wetzel, E., D., Newmeyer D. and R., and Green D. *Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization.* *Embo J* 1998, 17: p. 37-49.
119. Li, H., H., Zhu, J., Xu C., et al. *Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis.* *Cell*, 1998, 94: p. 491-501.
120. Luo, X., I., Budihardjo, H., Zou, et al. *Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors.* *Cell*, 1998, 94: p. 481-90.
121. Narita, M., S., Shimizu, T., Ito, et al. *Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95: p. 14681-6.
122. Shimizu, S., Y., Eguchi, W., Kamiike, et al. *Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95: p. 1455-9.
123. Shimizu, S., M., Narita and Y., and Tsujimoto. *Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC.* *Nature*, 1999, 399: p. 483-7.
124. Goldstein, J. C., Waterhouse, N. J., Juin, P., et al. *The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant.* *Nat Cell Biol*, 2000, 2: p. 156-62.
125. Yoshida, H., Y., Kong Y., R., Yoshida, et al. *Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development.* *Cell*, 1998, 94: p. 739-50.
126. Cecconi, F., G., Alvarez-Bolado, I., Meyer B., et al. *Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development.* *Cell*, 1998, 94: p. 727-37.
127. Li, K., Y., Li, M., Shelton J., et al. *Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis.* *Cell*, 2000, 101: p. 389-99.
128. Chinnaiyan, A. M., K., O'Rourke, L., Yu G., et al. *Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95.* *Science*, 1996, 274: p. 990-2.
129. Muzio, M., M., Chinnaiyan A., C., Kischkel F., et al. *FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex.* *Cell*, 1996, 85: p. 817-27.
130. Vincenz, C. and M., and Dixit V. *Fas-associated death domain protein interleukin-1beta-converting enzyme 2 (FLICE2), an ICE/Ced-3 homologue, is proximally involved in CD95- and p55-mediated death signaling.* *J Biol Chem*, 1997, 272: p. 6578-83.
131. Rieux-Laucat, F., Fischer, A. and Deist, F. L. *Cell-death signaling and human disease.* *Curr Opin Immunol*, 2003, 15: p. 325-31.
132. Irmeler, M., K., Hofmann, D., Vaux, et al. *Direct physical interaction between the Caenorhabditis elegans 'death proteins' CED-3 and CED-4.* *FEBS Lett*, 1997, 406: p. 189-90.
133. Li, P., D., Nijhawan, I., Budihardjo, et al. *Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade.* *Cell*, 1997, 91: p. 479-89.
134. Cain, K., G., Brown D., C., Langlais, et al. *Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex.* *J Biol Chem*, 1999, 274: p. 22686-92.
135. Zou, H., Y., Li, X., Liu, et al. *An APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9.* *J Biol Chem*, 1999, 274: p. 11549-56.
136. Pan, G., K., O'Rourke and M., and Dixit V. *Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex.* *J Biol Chem*, 1998, 273: p. 5841-5.
137. Huang, D. C., M., Adams J. and S., and Cory. *The conserved N-terminal BH4 domain of Bcl-2 homologues is essential for inhibition of apoptosis and interaction with CED-4.* *Embo J*, 1998, 17: p. 1029-39.
138. Hotchkiss, R. S. and Nicholson, D. W. *Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis.* *Nat Rev Immunol*, 2006, 6: p. 813-22.
139. Scaffidi, C., S., Fulda, A., Srinivasan, et al. *Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways.* *Embo J*, 1998, 17: p. 1675-87.
140. Yin, X. M., N., Oltvai Z. and J., and Korsmeyer S. *BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax.* *Nature*, 1994, 369: p. 321-3.
141. Simonen, M., H., Keller and J., and Heim. *The BH3 domain of Bax is sufficient for interaction of Bax with itself and with other family members and it is required for induction of apoptosis.* *Eur J Biochem*, 1997, 249: p. 85-91.
142. Sedlak, T. W., N., Oltvai Z., E., Yang, et al. *Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92: p. 7834-8.
143. Conus, S., T., Kaufmann, I., Fellay, et al. *Bcl-2 is a monomeric protein: prevention of homodimerization by structural constraints.* *Embo J*, 2000, 19: p. 1534-44.
144. Sattler, M., H., Liang, D., Nettessheim, et al. *Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis.* *Science*, 1997, 275: p. 983-6.

145. Kamada, S., H., Kusano, H., Fujita, et al. *A cloning method for caspase substrates that uses the yeast two-hybrid system: cloning of the antiapoptotic gene gelsolin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95: p. 8532-7.
146. Boise, L. H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C. E., et al. *bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death*. Cell, 1993, 74: p. 597-608.
147. Zha, J., H., Harada, E., Yang, et al. *Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L)*. Cell, 1996, 87: p. 619-28.
148. Zha, J., H., Harada, K., Osipov, et al. *BH3 domain of BAD is required for heterodimerization with BCL-XL and pro-apoptotic activity*. J Biol Chem, 1997, 272: p. 24101-4.
149. Chang, B. S., J., Minn A., W., Muchmore S., et al. *Identification of a novel regulatory domain in Bcl-X(L) and Bcl-2*. Embo J, 1997, 16: p. 968-77.
150. Haldar, S., N., Jena and M., and Croce C. *Inactivation of Bcl-2 by phosphorylation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92: p. 4507-11.
151. Weil, M., D., Jacobson M., S., Coles H., et al. *Constitutive expression of the machinery for programmed cell death*. J Cell Biol, 1996, 133: p. 1053-9.
152. Thornberry, N. A., A., Rosen and W., and Nicholson D. *Control of apoptosis by proteases*. Adv Pharmacol, 1997, 41: p. 155-77.
153. Krajewska, M., G., Wang H., S., Krajewski, et al. *Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of expression of CPP32 (Caspase-3), a cell death protease*. Cancer Res, 1997, 57: p. 1605-13.
154. Droin, N., L., Dubrez, B., Eymin, et al. *Upregulation of CASP genes in human tumor cells undergoing etoposide-induced apoptosis*. Oncogene, 1998, 16: p. 2885-94.
155. Tamura, T., S., Ueda, M., Yoshida, et al. *Interferon-gamma induces Ice gene expression and enhances cellular susceptibility to apoptosis in the U937 leukemia cell line*. Biochem Biophys Res Commun 1996, 229: p. 21-6.
156. Xiang, J., T., Chao D. and J., and Korsmeyer S. *BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93: p. 14559-63.
157. Mills, J. C., L., Stone N., J., Erhardt, et al. *Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation*. J Cell Biol 1998, 140: p. 627-36.
158. McCarthy, N. J., K., Whyte M., S., Gilbert C., et al. *Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the Bcl-2 homologue Bak*. J Cell Biol, 1997, 136: p. 215-27.
159. Monney, L., I., Otter, R., Olivier, et al. *Defects in the ubiquitin pathway induce caspase-independent apoptosis blocked by Bcl-2*. J Biol Chem, 1998, 273: p. 6121-31.
160. Kroemer, G., Galluzzi, L. and Brenner, C. *Mitochondrial membrane permeabilization in cell death*. Physiol Rev, 2007, 87: p. 99-163.
161. Danilova, N. *The evolution of immune mechanisms*. J Exp Zoolog B Mol Dev Evol, 2006, 306: p. 496-520.
162. Medzhitov, R. and Janeway, C., Jr. *Innate immunity*. N Engl J Med, 2000, 343: p. 338-44.
163. Appelberg, R. *Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing*. Trends Microbiol, 2007, 15: p. 87-92.
164. Mantovani, A., Sica, A. and Locati, M. *New vistas on macrophage differentiation and activation*. Eur J Immunol, 2007, 37: p. 14-6.
165. Gura, T. *Innate immunity: ancient system gets new respect*. Science, 2001, 291: p. 2068-71.
166. Metz-Boutigue, MH., Kieffer, AE., Goumon, Y., et al. *Innate immunity: involvement of new neuropeptides*. Trends Microbiol, 2003 11: p. 585-92.
167. Metz-Boutigue, MH., Goumon, Y., Strub, JM., et al. *Antimicrobial chromogranins and proenkephalin-A-derived peptides: Antibacterial and antifungal activities of chromogranins and proenkephalin-A-derived peptides*. Ann N Y Acad Sci, 2003, 992: p. 168-78.
168. Giacometti, A., Cirioni, O., Ghiselli, R., et al. *Cathelicidin peptide sheep myeloid antimicrobial peptide-29 prevents endotoxin-induced mortality in rat models of septic shock*. Am J Respir Crit Care Med, 2004, 169: p. 187-94.
169. Rocha, B. and Tanchot, C. *The Tower of Babel of CD8+ T-cell memory: known facts, deserted roads, muddy waters, and possible dead ends*. Immunol Rev, 2006, 211: p. 182-96.
170. Tan, J. T. and Surh, C. D. *T cell memory*. Curr Top Microbiol Immunol, 2006, 311: p. 85-115.
171. Kemper, C. and Atkinson, J. P. *T-cell regulation: with complements from innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2007, 7: p. 9-18.
172. Larson, D. F. and Horak, K. *Macrophage migration inhibitory factor: controller of systemic inflammation*. Crit Care, 2006, 10: p. 138.
173. Holers, V. M. and Kulik, L. *Complement receptor 2, natural antibodies and innate immunity: Interrelationships in B cell selection and activation*. Mol Immunol, 2007, 44: p. 64-72.

174. Unanue, E. R. and Allen, P. M. *The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells*. Science, 1987, 236: p. 551-7.
175. Opal, S. M. and DePalo, V. A. *Anti-inflammatory cytokines*. Chest, 2000, 117: p. 1162-72.
176. Hotchkiss, R. S., Tinsley, K. W., Hui, J. J., et al. *p53-dependent and -independent pathways of apoptotic cell death in sepsis*. J Immunol, 2000, 164: p. 3675-80.
177. Monneret, G., Lepape, A., Voirin, N., et al. *Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock*. Intensive Care Med, 2006, 32: p. 1175-83.
178. Davis, M. M. and J., and Bjorkman P. *T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition published erratum appears in Nature 1988 Oct 20;335(6192):744*. Nature, 1988, 334: p. 395-402.
179. Nel, A. E. *T-cell activation through the antigen receptor. Part 1: signaling components, signaling pathways, and signal integration at the T-cell antigen receptor synapse*. J Allergy Clin Immunol, 2002, 109: p. 758-70.
180. Shaw, A. S. and L., and Dustin M. *Making the T cell receptor go the distance: a topological view of T cell activation*. Immunity, 1997, 6: p. 361-9.
181. Dustin, M. L. and S., and Shaw A. *Costimulation: building an immunological synapse comment*. Science, 1999, 283: p. 649-50.
182. Viola, A., S., Schroeder, Y., Sakakibara, et al. *T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains*. Science, 1999, 283: p. 680-2.
183. Filipp, D. and Julius, M. *Lipid rafts: resolution of the "fyn problem"?* Mol Immunol, 2004, 41: p. 645-56.
184. Straus, D. B. and A., and Weiss. *Genetic evidence for the involvement of the lck tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor*. Cell, 1992, 70: p. 585-93.
185. June, C. H., C., Fletcher M., A., Ledbetter J., et al. *Increases in tyrosine phosphorylation are detectable before phospholipase C activation after T cell receptor stimulation*. J Immunol, 1990, 144: p. 1591-9.
186. Wange, R. L. and E., and Samelson L. *Complex complexes: signaling at the TCR*. Immunity, 1996, 5: p. 197-205.
187. Isakov, N. *ITAMs: immunoregulatory scaffolds that link immunoreceptors to their intracellular signaling pathways*. Receptors Channels, 1998, 5: p. 243-53.
188. Palacios, E. H. and Weiss, A. *Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation*. Oncogene, 2004, 23: p. 7990-8000.
189. Fodor, S., Jakus, Z. and Mocsai, A. *ITAM-based signaling beyond the adaptive immune response*. Immunol Lett, 2006, 104: p. 29-37.
190. Lucas, J. A., Miller, A. T., Atherly, L. O., et al. *The role of Tec family kinases in T cell development and function*. Immunol Rev, 2003, 191: p. 119-38.
191. Wange, R. L. *LAT, the linker for activation of T cells: a bridge between T cell-specific and general signaling pathways*. Sci STKE, 2000, 2000: p. RE1.
192. Sommers, C. L., Samelson, L. E. and Love, P. E. *LAT: a T lymphocyte adapter protein that couples the antigen receptor to downstream signaling pathways*. Bioessays, 2004, 26: p. 61-7.
193. van Leeuwen, J. E. and Samelson, L. E. *T cell antigen-receptor signal transduction*. Curr Opin Immunol, 1999, 11: p. 242-8.
194. Hogan, P. G., Chen, L., Nardone, J., et al. *Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT*. Genes Dev, 2003, 17: p. 2205-32.
195. Wu, H., Peisley, A., Graef, I. A., et al. *NFAT signaling and the invention of vertebrates*. Trends Cell Biol, 2007.
196. Hamel, L. P., Nicole, M. C., Sritubtim, S., et al. *Ancient signals: comparative genomics of plant MAPK and MAPKK gene families*. Trends Plant Sci, 2006, 11: p. 192-8.
197. Nishimoto, S. and Nishida, E. *MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2*. EMBO Rep, 2006, 7: p. 782-6.
198. Mor, A. and Philips, M. R. *Compartmentalized Ras/MAPK signaling*. Annu Rev Immunol, 2006, 24: p. 771-800.
199. Gallagher, E. D., Xu, S., Moomaw, C., et al. *Binding of JNK/SAPK to MEKK1 is regulated by phosphorylation*. J Biol Chem, 2002, 277: p. 45785-92.
200. Poitras, L., Jean, S., Islam, N., et al. *PAK interacts with NCK and MLK2 to regulate the activation of jun N-terminal kinase*. FEBS Lett, 2003, 543: p. 129-35.
201. Gaur, U. and Aggarwal, B. B. *Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily*. Biochem Pharmacol, 2003, 66: p. 1403-8.
202. Liu, J. O. *The yins of T cell activation*. Sci STKE, 2005, 2005: p. re1.
203. Zhang, J., X., Gao J., K., Salojin, et al. *Regulation of fas ligand expression during activation-induced cell death in T cells by p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun NH2-terminal kinase*. J Exp Med, 2000, 191: p. 1017-30.
204. Marsden, V. S. and Strasser, A. *Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more*. Annu Rev Immunol, 2003, 21: p. 71-105.

205. Crabtree, G. R. *Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation*. Science, 1989, 243: p. 355-61.
206. Green, D. R., P., Bissonnette R., M., Glynn J., et al. *Activation-induced apoptosis in lymphoid systems*. Semin Immunol, 1992, 4: p. 379-88.
207. Radvanyi, L. G., Y., Shi, H., Vaziri, et al. *CD28 costimulation inhibits TCR-induced apoptosis during a primary T cell response*. J Immunol, 1996, 156: p. 1788-98.
208. Lissy, N. A., F., Van Dyk L., M., Becker-Hapak, et al. *TCR antigen-induced cell death occurs from a late G1 phase cell cycle check point*. Immunity, 1998, 8: p. 57-65.
209. Radvanyi, L. G., Y., Shi, B., Mills G., et al. *Cell cycle progression out of G1 sensitizes primary-cultured nontransformed T cells to TCR-mediated apoptosis*. Cell, 1996, Immunol: p. 260-73.
210. Lenardo, M. J. *Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis*. Nature, 1991, 353: p. 858-61.
211. Hunig, T. and A., and Schimpl. *Systemic autoimmune disease as a consequence of defective lymphocyte death*. Curr Opin Immunol, 1997, 9: p. 826-30.
212. Fas, S. C., Fritzsching, B., Suri-Payer, E., et al. *Death receptor signaling and its function in the immune system*. Curr Dir Autoimmun, 2006, 9: p. 1-17.
213. Roberts, A. I., Devadas, S., Zhang, X., et al. *The role of activation-induced cell death in the differentiation of T-helper-cell subsets*. Immunol Res, 2003, 28: p. 285-93.
214. Janssen, O., Sanzenbacher, R. and Kabelitz, D. *Regulation of activation-induced cell death of mature T-lymphocyte populations*. Cell Tissue Res, 2000, 301: p. 85-99.
215. Singer, G. G. and K., and Abbas A. *The fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice*. Immunity, 1994, 1: p. 365-71.
216. Zheng, L., G., Fisher, E., Miller R., et al. *Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor*. Nature, 1995, 377: p. 348-51.
217. Sato, T., S., Irie, S., Kitada, et al. *FAP-1: a protein tyrosine phosphatase that associates with Fas*. Science, 1995, 268: p. 411-5.
218. Zhang, X., T., Brunner, L., Carter, et al. *Unequal death in T helper cell (Th)1 and Th2 effectors: Th1, but not Th2, effectors undergo rapid Fas/FasL-mediated apoptosis*. J Exp Med, 1997, 185: p. 1837-49.
219. Torii, S., A., Egan D., A., Evans R., et al. *Human Daxx regulates Fas-induced apoptosis from nuclear PML oncogenic domains (PODs)*. Embo J, 1999, 18: p. 6037-49.
220. Imai, Y., T., Kimura, A., Murakami, et al. *The CED-4-homologous protein FLASH is involved in Fas-mediated activation of caspase-8 during apoptosis published erratum appears in Nature 1999 Jul 1;400(6739):89*. Nature, 1999, 398: p. 777-85.
221. Hitoshi, Y., J., Lorens, I., Kitada S., et al. *Toso, a cell surface, specific regulator of Fas-induced apoptosis in T cells*. Immunity, 1998, 8: p. 461-71.
222. Duke, R. C. and J., and Cohen J. *IL-2 addiction: withdrawal of growth factor activates a suicide program in dependent T cells*. Lymphokine Res 1986, 5: p. 289-99.
223. Lenardo, M., M., Chan K., F., Hornung, et al. *Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment*. Annu Rev Immunol, 1999, 17: p. 221-53.
224. Cohen, J. J. *Programmed cell death in the immune system*. Adv Immunol 1991, 50: p. 55-85.
225. Heusel, J. W., L., Wesselschmidt R., S., Shresta, et al. *Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells*. Cell, 1994, 76: p. 977-87.
226. Desbarats, J., Birge, R. B., Mimouni-Rongy, M., et al. *Fas engagement induces neurite growth through ERK activation and p35 upregulation*. Nat Cell Biol, 2003, 5: p. 118-25.
227. Ohta, T., T., Kinoshita, M., Naito, et al. *Requirement of the caspase-3/CPP32 protease cascade for apoptotic death following cytokine deprivation in hematopoietic cells*. J Biol Chem 1997, 272: p. 23111-6.
228. Hotchkiss, R. S., Tinsley, K. W. and Karl, I. E. *Role of apoptotic cell death in sepsis*. Scand J Infect Dis, 2003, 35: p. 585-92.
229. Kobayashi, M., Tsujitani, S., Kurisu, Y., et al. *Bcl-2 and Bax expression for hepatocellular apoptosis in a murine endotoxin shock model*. Hepatogastroenterology, 2002, 49: p. 1602-6.
230. Korsmeyer, S. J., Shutter, J. R., Veis, D. J., et al. *Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death*. Semin Cancer Biol, 1993, 4: p. 327-32.
231. Hotchkiss, R. S., Swanson, P. E., Knudson, C. M., et al. *Overexpression of Bcl-2 in transgenic mice decreases apoptosis and improves survival in sepsis*. J Immunol, 1999, 162: p. 4148-56.
232. Hotchkiss, R. S., Tinsley, K. W., Swanson, P. E., et al. *Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96: p. 14541-6.
233. Hotchkiss, R. S., Chang, K. C., Swanson, P. E., et al. *Caspase inhibitors improve survival in sepsis: a critical role of the lymphocyte*. Nat Immunol, 2000, 1: p. 496-501.

234. Hotchkiss, R. S., Tinsley, K. W., Swanson, P. E., et al. *Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans*. J Immunol, 2001, 166: p. 6952-63.
235. Adrie, C., Bachelet, M., Vayssier-Taussat, M., et al. *Mitochondrial membrane potential and apoptosis peripheral blood monocytes in severe human sepsis*. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 164: p. 389-95.
236. Williams, M. A., Withington, S., Newland, A. C., et al. *Monocyte anergy in septic shock is associated with a predilection to apoptosis and is reversed by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor ex vivo*. J Infect Dis, 1998, 178: p. 1421-33.
237. Hill, A. V. *The immunogenetics of human infectious diseases*. Annu Rev Immunol, 1998, 16: p. 593-617.
238. Petersen, L., Nielsen, G. G., Andersen, P. K., et al. *Case-control study of genetic and environmental influences on premature death of adult adoptees*. Genet Epidemiol, 2002, 23: p. 123-32.
239. Sorensen, T. I., Nielsen, G. G., Andersen, P. K., et al. *Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees*. N Engl J Med, 1988, 318: p. 727-32.
240. Copeland, S., Warren, H. S., Lowry, S. F., et al. *Acute inflammatory response to endotoxin in mice and humans*. Clin Diagn Lab Immunol, 2005, 12: p. 60-7.
241. Heguy, A., Baldari, C. T., Macchia, G., et al. *Amino acids conserved in interleukin-1 receptors (IL-1Rs) and the Drosophila toll protein are essential for IL-1R signal transduction*. J Biol Chem, 1992, 267: p. 2605-9.
242. Anderson, K. V., Bokla, L. and Nusslein-Volhard, C. *Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: the induction of polarity by the Toll gene product*. Cell, 1985, 42: p. 791-8.
243. Stein, D. and Nusslein-Volhard, C. *Multiple extracellular activities in Drosophila egg perivitelline fluid are required for establishment of embryonic dorsal-ventral polarity*. Cell, 1992, 68: p. 429-40.
244. Beutler, B., Hoebe, K., Georgel, P., et al. *Genetic analysis of innate immunity: identification and function of the TIR adapter proteins*. Adv Exp Med Biol, 2005, 560: p. 29-39.
245. Imler, J. L. and Hoffmann, J. A. *Toll and Toll-like proteins: an ancient family of receptors signaling infection*. Rev Immunogenet, 2000, 2: p. 294-304.
246. Hoffmann, J. A. *The immune response of Drosophila*. Nature, 2003, 426: p. 33-8.
247. Kirschning, C. J. and Schumann, R. R. *TLR2: cellular sensor for microbial and endogenous molecular patterns*. Curr Top Microbiol Immunol, 2002, 270: p. 121-44.
248. Janeway, C. A., Jr. and Medzhitov, R. *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002, 20: p. 197-216.
249. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. and Janeway, C. A., Jr. *A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity*. Nature, 1997, 388: p. 394-7.
250. Beutler, B., Du, X. and Poltorak, A. *Identification of Toll-like receptor 4 (Tlr4) as the sole conduit for LPS signal transduction: genetic and evolutionary studies*. J Endotoxin Res, 2001, 7: p. 277-80.
251. Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., et al. *Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene*. Science, 1998, 282: p. 2085-8.
252. Beutler, B. *TLR4 as the mammalian endotoxin sensor*. Curr Top Microbiol Immunol, 2002, 270: p. 109-20.
253. Bendtzen, K., Bovin, L. F., Andersen, V., et al. *[Toll-like receptors. What can we learn about the immune system from banana flies and a mouse strain]*. Ugeskr Laeger, 2001, 163: p. 4562-5.
254. Holmes, C. L., Russell, J. A. and Walley, K. R. *Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock: role in prognosis and potential for therapy*. Chest, 2003, 124: p. 1103-15.
255. Arbour, N. C., Lorenz, E., Schutte, B. C., et al. *TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans*. Nat Genet, 2000, 25: p. 187-91.
256. Singh, H., Sen, R., Baltimore, D., et al. *A nuclear factor that binds to a conserved sequence motif in transcriptional control elements of immunoglobulin genes*. Nature, 1986, 319: p. 154-8.
257. Cook, D. N., Pisetsky, D. S. and Schwartz, D. A. *Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease*. Nat Immunol, 2004, 5: p. 975-9.
258. Hoffmann, A., Natoli, G. and Ghosh, G. *Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module*. Oncogene, 2006, 25: p. 6706-16.
259. Gerondakis, S., Grumont, R., Gugasyan, R., et al. *Unravelling the complexities of the NF-kappaB signalling pathway using mouse knockout and transgenic models*. Oncogene, 2006, 25: p. 6781-99.
260. May, M. J. and Ghosh, S. *Signal transduction through NF-kappa B*. Immunol Today, 1998, 19: p. 80-8.
261. Luo, J. L., Kamata, H. and Karin, M. *IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death--a new approach to cancer therapy*. J Clin Invest, 2005, 115: p. 2625-32.
262. Viatour, P., Merville, M. P., Bours, V., et al. *Phosphorylation of NF-kappaB and I-kappaB proteins: implications in cancer and inflammation*. Trends Biochem Sci, 2005, 30: p. 43-52.
263. Bohrer, H., Qiu, F., Zimmermann, T., et al. *Role of NFkappaB in the mortality of sepsis*. J Clin Invest, 1997, 100: p. 972-85.

264. Paterson, R. L., Galley, H. F., Dhillon, J. K., et al. *Increased nuclear factor kappa B activation in critically ill patients who die.* Crit Care Med, 2000, 28: p. 1047-51.
265. Arnalich, F., Garcia-Palomero, E., Lopez, J., et al. *Predictive value of nuclear factor kappaB activity and plasma cytokine levels in patients with sepsis.* Infect Immun, 2000, 68: p. 1942-5.
266. Knaus, W. A., Draper, E. A., Wagner, D. P., et al. *APACHE II: a severity of disease classification system.* Crit Care Med, 1985, 13: p. 818-29.
267. Abraham, E. *Nuclear factor-kappaB and its role in sepsis-associated organ failure.* J Infect Dis, 2003, 187 Suppl 2: p. S364-9.
268. Wang, C. Y., Guttridge, D. C., Mayo, M. W., et al. *NF-kappaB induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bfl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis.* Mol Cell Biol, 1999, 19: p. 5923-9.
269. Bureau, F., Vanderplasschen, A., Jaspard, F., et al. *Constitutive nuclear factor-kappaB activity preserves homeostasis of quiescent mature lymphocytes and granulocytes by controlling the expression of distinct Bcl-2 family proteins.* Blood, 2002, 99: p. 3683-91.
270. Chen, C., Edelstein, L. C. and Gelinas, C. *The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L).* Mol Cell Biol, 2000, 20: p. 2687-95.
271. Glasgow, J. N., Qiu, J., Rassin, D., et al. *Transcriptional regulation of the BCL-X gene by NF-kappaB is an element of hypoxic responses in the rat brain.* Neurochem Res, 2001, 26: p. 647-59.
272. Michie, H. R., Manogue, K. R., Spriggs, D. R., et al. *Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration.* N Engl J Med, 1988, 318: p. 1481-6.
273. Marecaux, G., Pinsky, M. R., Dupont, E., et al. *Blood lactate levels are better prognostic indicators than TNF and IL-6 levels in patients with septic shock.* Intensive Care Med, 1996, 22: p. 404-8.
274. Opal, S. M. *Clinical trial design and outcomes in patients with severe sepsis.* Shock, 2003, 20: p. 295-302.
275. Taylor, F. B., Jr. *Response of anticoagulant pathways in disseminated intravascular coagulation.* Semin Thromb Hemost, 2001, 27: p. 619-31.
276. Riewald, M., Petrovan, R. J., Donner, A., et al. *Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway.* Science, 2002, 296: p. 1880-2.
277. Morris, P. E., Hite, R. D. and Ohl, C. *Relationship between the inflammation and coagulation pathways in patients with severe sepsis: implications for therapy with activated protein C.* BioDrugs, 2002, 16: p. 403-17.
278. Osterud, B. *Activation pathways of the coagulation system in normal haemostasis.* Scand J Haematol, 1984, 32: p. 337-45.
279. Bernard, G. R., Vincent, J. L., Laterre, P. F., et al. *Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis.* N Engl J Med, 2001, 344: p. 699-709.
280. Bernard, G. R., Ely, E. W., Wright, T. J., et al. *Safety and dose relationship of recombinant human activated protein C for coagulopathy in severe sepsis.* Crit Care Med, 2001, 29: p. 2051-9.
281. Abraham, E., Laterre, P. F., Garg, R., et al. *Drotrecogin alfa (activated) for adults with severe sepsis and a low risk of death.* N Engl J Med, 2005, 353: p. 1332-41.
282. Joyce, D. E., Gelbert, L., Ciaccia, A., et al. *Gene expression profile of antithrombotic protein c defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis.* J Biol Chem, 2001, 276: p. 11199-203.
283. Cheng, T., Liu, D., Griffin, J. H., et al. *Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective.* Nat Med, 2003, 9: p. 338-42.
284. Abraham, E., Reinhart, K., Svoboda, P., et al. *Assessment of the safety of recombinant tissue factor pathway inhibitor in patients with severe sepsis: a multicenter, randomized, placebo-controlled, single-blind, dose escalation study.* Crit Care Med, 2001, 29: p. 2081-9.
285. Baudo, F., Caimi, T. M., de Cataldo, F., et al. *Antithrombin III (ATIII) replacement therapy in patients with sepsis and/or postsurgical complications: a controlled double-blind, randomized, multicenter study.* Intensive Care Med, 1998, 24: p. 336-42.
286. Angus, D. C., Laterre, P. F., Helterbrand, J., et al. *The effect of drotrecogin alfa (activated) on long-term survival after severe sepsis.* Crit Care Med, 2004, 32: p. 2199-206.
287. Cohen, J. *The immunopathogenesis of sepsis.* Nature, 2002, 420: p. 885-91.
288. Hotchkiss, R. S., Osmon, S. B., Chang, K. C., et al. *Accelerated lymphocyte death in sepsis occurs by both the death receptor and mitochondrial pathways.* J Immunol, 2005, 174: p. 5110-8.
289. Unsinger, J., Herndon, J. M., Davis, C. G., et al. *The role of TCR engagement and activation-induced cell death in sepsis-induced T cell apoptosis.* J Immunol, 2006, 177: p. 7968-73.
290. Marchant, A., Deviere, J., Byl, B., et al. *Interleukin-10 production during septicemia.* Lancet, 1994, 343: p. 707-8.
291. Lehmann, A. K., Halstensen, A., Sornes, S., et al. *High levels of interleukin 10 in serum are associated with fatality in meningococcal disease.* Infect Immun, 1995, 63: p. 2109-12.

292. Marchant, A., Alegre, M. L., Hakim, A., et al. *Clinical and biological significance of interleukin-10 plasma levels in patients with septic shock*. J Clin Immunol, 1995, 15: p. 266-73.
293. Gomez-Jimenez, J., Martin, M. C., Sauri, R., et al. *Interleukin-10 and the monocyte/macrophage-induced inflammatory response in septic shock*. J Infect Dis, 1995, 171: p. 472-5.
294. Friedman, G., Jankowski, S., Marchant, A., et al. *Blood interleukin 10 levels parallel the severity of septic shock*. J Crit Care, 1997, 12: p. 183-7.
295. Neidhardt, R., Keel, M., Steckholzer, U., et al. *Relationship of interleukin-10 plasma levels to severity of injury and clinical outcome in injured patients*. J Trauma, 1997, 42: p. 863-70; discussion 870-1.
296. Berg, D. J., Kuhn, R., Rajewsky, K., et al. *Interleukin-10 is a central regulator of the response to LPS in murine models of endotoxic shock and the Shwartzman reaction but not endotoxin tolerance*. J Clin Invest, 1995, 96: p. 2339-47.
297. van der Poll, T., Marchant, A., Buurman, W. A., et al. *Endogenous IL-10 protects mice from death during septic peritonitis*. J Immunol, 1995, 155: p. 5397-401.
298. Lyons, A., Kelly, J. L., Rodrick, M. L., et al. *Major injury induces increased production of interleukin-10 by cells of the immune system with a negative impact on resistance to infection*. Ann Surg, 1997, 226: p. 450-8; discussion 458-60.
299. Levy, Y. and Brouet, J. C. *Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein*. J Clin Invest, 1994, 93: p. 424-8.
300. Cohen, S. B., Crawley, J. B., Kahan, M. C., et al. *Interleukin-10 rescues T cells from apoptotic cell death: association with an upregulation of Bcl-2*. Immunology, 1997, 92: p. 1-5.
301. Pachot, A., Monneret, G., Voirin, N., et al. *Longitudinal study of cytokine and immune transcription factor mRNA expression in septic shock*. Clin Immunol, 2005, 114: p. 61-9.
302. Fukuzuka, K., Rosenberg, J. J., Gaines, G. C., et al. *Caspase-3-dependent organ apoptosis early after burn injury*. Ann Surg, 1999, 229: p. 851-8; discussion 858-9.
303. Ertel, W., Keel, M., Infanger, M., et al. *Circulating mediators in serum of injured patients with septic complications inhibit neutrophil apoptosis through up-regulation of protein-tyrosine phosphorylation*. J Trauma, 1998, 44: p. 767-75; discussion 775-6.
304. Selzman, C. H., Shames, B. D., Miller, S. A., et al. *Therapeutic implications of interleukin-10 in surgical disease*. Shock, 1998, 10: p. 309-18.
305. Ayala, A., Chung, C. S., Song, G. Y., et al. *IL-10 mediation of activation-induced TH1 cell apoptosis and lymphoid dysfunction in polymicrobial sepsis*. Cytokine, 2001, 14: p. 37-48.
306. Oberholzer, A., Oberholzer, C. and Moldawer, L. L. *Interleukin-10: A complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an anti-inflammatory drug*. Crit Care Med, 2002, 30: p. S58-S63.
307. Yan, S. B. and Nelson, D. R. *Effect of factor V Leiden polymorphism in severe sepsis and on treatment with recombinant human activated protein C*. Crit Care Med, 2004, 32: p. S239-46.
308. Dahlback, B. *Blood coagulation and its regulation by anticoagulant pathways: genetic pathogenesis of bleeding and thrombotic diseases*. J Intern Med, 2005, 257: p. 209-23.
309. Mosnier, L. O., Gale, A. J., Yegneswaran, S., et al. *Activated protein C variants with normal cytoprotective but reduced anticoagulant activity*. Blood, 2004, 104: p. 1740-4.
310. Dhainaut, J. F., Yan, S. B., Margolis, B. D., et al. *Drotrecogin alfa (activated) (recombinant human activated protein C) reduces host coagulopathy response in patients with severe sepsis*. Thromb Haemost, 2003, 90: p. 642-53.
311. Lorenz, E., Mira, J. P., Frees, K. L., et al. *Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock*. Arch Intern Med, 2002, 162: p. 1028-32.
312. Annane, D., Sebille, V., Troche, G., et al. *A 3-level prognostic classification in septic shock based on cortisol levels and cortisol response to corticotropin*. Jama, 2000, 283: p. 1038-45.
313. Rahman, A., Anwar, K. N., True, A. L., et al. *Thrombin-induced p65 homodimer binding to downstream NF-kappa B site of the promoter mediates endothelial ICAM-1 expression and neutrophil adhesion*. J Immunol, 1999, 162: p. 5466-76.
314. Mosnier, L. O. and Griffin, J. H. *Inhibition of staurosporine-induced apoptosis of endothelial cells by activated protein C requires protease-activated receptor-1 and endothelial cell protein C receptor*. Biochem J, 2003, 373: p. 65-70.
315. Bernard, G. R., Margolis, B. D., Shanies, H. M., et al. *Extended evaluation of recombinant human activated protein C United States Trial (ENHANCE US): a single-arm, phase 3B, multicenter study of drotrecogin alfa (activated) in severe sepsis*. Chest, 2004, 125: p. 2206-16.



## Annexe

---



## Définitions des différents syndromes septiques selon la conférence du ACCP/SCCM [2]

Le **syndrome de réponse inflammatoire systémique** est un syndrome clinique correspondant à la réponse inflammatoire systémique à certaines agressions cliniques graves comme un état infectieux, un état de choc ou un traumatisme. Ce syndrome est caractérisé par la présence d'**au moins deux des signes suivants** :

- une **température** corporelle  $> 38^{\circ}\text{C}$  ou  $< 36^{\circ}\text{C}$ ,
- une **rythme cardiaque**  $> 90$  battements par minute,
- un **rythme respiratoire**  $> 20/\text{min}$  ou une hyperventilation se traduisant par une  $\text{PaCO}_2 < 32 \text{ mm Hg}$  ( $< 4,3 \text{ kPa}$ ) en air ambiant,
- une **leucocytose**  $> 12\,000/\text{mm}^3$  ou  $< 4\,000/\text{mm}^3$  ou  $> 10\%$  de cellules immatures.

Ces trois états septiques sont par **ordre de gravité** croissant :

1. le **sepsis** : infection cliniquement suspectée ou microbiologiquement documentée, associée à un syndrome de réponse inflammatoire systémique
2. le **sepsis grave** : sepsis avec dysfonction aiguë d'un ou de plusieurs organes définie par :
  - sepsis + lactates  $> 4 \text{ mmol/l}$  ou
  - hypotension avant remplissage ou
  - dysfonction d'un ou plusieurs organes consécutive à leur hypoperfusion et à la toxicité cellulaire des toxines bactériennes :
    - **poumon** : atteinte de la fonction respiratoire définie par une  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 300$ ,
    - **rein** : atteinte de la fonction rénale définie par une créatinine  $> 176 \mu\text{mol/l}$ ,  $> 2x$  la normale ou une oligurie,
    - **sang** (en tant qu'organe) : thrombocytopénie  $< 100/\text{mm}^3$ ; coagulation :  $\text{INR} > 1.5$ ,
    - **foie** : atteinte de la fonction hépatique définie par une  $\text{INR} > 4$ , bilirubine  $> 78 \mu\text{mol/l}$ ,
    - **cerveau** : troubles de la vigilance mesurés par l'échelle de Glasgow avec un  $\text{GCS} < 13$ .
3. le **choc septique** : sepsis grave avec hypotension artérielle réfractaire malgré un remplissage vasculaire adéquat (20-40 ml/kg)



Thomas LAVAUX

Né le 19 juillet 1973

Soutenu le 13 septembre 2007

N° d'ordre :

**Résumé :** L'exacerbation de l'apoptose au cours des infections graves peut conduire à une élimination excessive des cellules immunocompétentes, responsable en partie des 50 % à 60 % de décès lors de choc septique. Prévoir la sévérité de ces syndromes infectieux permettrait de pouvoir adapter la thérapeutique le plus précocement possible. C'est pourquoi nous avons recherché *in vivo* à la phase initiale du sepsis des marqueurs biologiques pouvant nous renseigner sur l'importance de ces phénomènes d'apoptose. Par la suite, un essai clinique a montré que la protéine C activée recombinante (rhPCA) réduit la mortalité de patients en choc septique de 6%. Outre son effet anticoagulant, cette molécule semble disposer de propriétés anti-apoptotiques *in vitro*. Par l'étude des gènes pro (Bax) et anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-XL) par PCR quantitative relative, nous avons observé à la phase précoce du choc septique (6 à 12 heures) une baisse de l'expression de Bcl-2 d'un facteur 10, corrélée à la lymphopénie, chez les patients qui décèdent. Pour étudier le rôle *in vivo* chez l'homme de la rhPCA, nous avons réalisé une étude prospective qui montrent que la rhPCA prévient l'augmentation du taux d'apoptose lympho-monocytaire (11,7 % pour le groupe rhAPC vs 16,2% sans traitement,  $p < 0,001$ ) corrélé à une baisse du ratio Bax/Bcl-2 (0,39 pour le groupe rhAPC vs 1,81,  $p < 0,001$ ) et Bax/Bcl-XL (0,68 pour le groupe rhAPC vs 1,22  $p < 0,001$ ) par augmentation de l'expression de Bcl-2 et Bcl-XL. L'expression de Bcl-2 est corrélée au taux d'apoptose lympho-monocytaire dans le groupe rhPCA ( $r^2=0,640$ ,  $p = 0,023$ ). Enfin, nous avons cherché à préciser l'implication de la rhAPC sur l'inflammation et sur les récepteurs Toll-like, responsables de la reconnaissance des bactéries Gram + et Gram -, dont la voie de signalisation est le facteur de transcription NF- $\kappa$ B. L'évolution des profils Th1/Th2 est comparable avec ou sans traitement par rhAPC, la diminution significative du taux d'IFN- $\gamma$  associée à un ratio IL-10/TNF- $\alpha$  élevé orientant le profil vers une réponse Th2. La rhPCA provoque une augmentation significative de l'expression des sous-unités activatrices de NF- $\kappa$ B que sont p50 et p65/RelA (respectivement 39,9 % et 81,3%,  $p < 0,05$ ), sans augmentation de I $\kappa$ Ba. En revanche nous n'observons pas de corrélation entre le niveau d'expression des gènes de NF- $\kappa$ B et les concentrations de cytokines plasmatiques ou les polymorphismes des récepteurs TLR-2 ou 4. Ces résultats confirment l'importance de la dérégulation de Bcl-2 à la phase initiale du choc septique et apporte la preuve des effets anti-apoptotiques de la rhPCA *in vivo* chez des malades en choc septique, par une induction de NF- $\kappa$ B au niveau transcriptionnel dont l'importance fonctionnelle reste à préciser.

**Mots clés :** apoptose ; protéine C activée ; choc septique ; RT-QPCR ; inflammation, lymphocyte, immunité.