



*Thèse présentée pour obtenir le grade
de Docteur de l'Université de Strasbourg*

Mention : Biologie

Ecole Doctorale des Sciences de
la Vie et de la Santé

Année 2010

N°668

**ÉTUDE DES MECANISMES REGULATEURS DE L' APOPTOSE
LYMPHO-MONOCYTAIRE INDUITE PAR LE CHOC SEPTIQUE
CHEZ L'HOMME : ROLE DE LA PROTEINE C ACTIVEE**

Directeur de Thèse : Monsieur le Professeur OUDET

Co-Directeur de Thèse : Monsieur le Professeur SCHNEIDER

Soutenue publiquement le 22 septembre 2010

par Pascal BILBAULT

Membres du Jury :

Monsieur le Professeur Rémi NEVIERE

Département de Physiologie

Lille

Rapporteur Externe

Monsieur le Professeur Eric ROUPIE

Département des Urgences

Caen

Rapporteur Externe

Monsieur le Professeur Raoul HERBRECHT

Département d'Onco-Hématologie

Strasbourg

Rapporteur Interne

Monsieur le Professeur Pierre OUDET

Laboratoire de Biologie Moléculaire

Strasbourg

Directeur de Thèse

REMERCIEMENTS

A notre Directeur de Thèse, Monsieur le Professeur Pierre OUDET, qui a bien voulu nous accueillir au sein de son laboratoire de Biologie Moléculaire. Nous vous remercions pour la confiance que vous nous avez accordée tout au long de ces années, malgré notre présence qui fut parfois en pointillé. Vous nous avez enseigné la réflexion et la curiosité scientifique que nous n'oublierons pas. Vous nous avez fait l'honneur de diriger notre thèse et nous en sommes très touchés.

A notre Co-Directeur de Thèse, Monsieur le Professeur Francis SCHNEIDER, qui a été notre guide dans le long apprentissage de la Réanimation Médicale et qui nous a ouvert à la recherche clinique avec patience et obstination. Qu'il en soit remercié et que ce travail soit l'occasion de lui exprimer toute notre reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Rémi NEVIÈRE, que nous remercions pour l'intérêt que vous portez à ce travail et de l'honneur que vous nous faites en le jugeant.

A Monsieur le Professeur Eric ROUPIE, qui a bien voulu siéger dans notre jury, nous en sommes reconnaissants de l'honneur que vous nous faites.

A Monsieur le Professeur Raoul HERBRECHT, à qui nous exprimons toute notre gratitude pour avoir accepté de juger ce travail. Qu'il en soit remercié.

A Monsieur le Professeur Jacques KOPFERSCHMITT, à qui nous adressons nos sincères remerciements pour nous avoir permis et soutenu dans nos travaux de recherche.

A Madame Marie-Pierre GAUB, à qui nous exprimons nos profonds remerciements pour votre encadrement scientifique, votre soutien et la confiance que vous nous avez apportée nous permettant de réaliser ce travail.

A Thomas LAVAUX, que nous remercions sincèrement pour sa collaboration essentielle dans l'approche biologique et à son compagnonnage à la « pailleasse ».

A Madame le Docteur Anne LAUNOY, pour sa collaboration sans faille dans l'inclusion des patients du service de Réanimation Chirurgicale de Monsieur le Professeur POTTECHER, et en souvenir de nos débuts en Réanimation.

Nous remercions particulièrement tous les chercheurs et techniciennes du Laboratoire de Biologie Moléculaire de l'Hôpital de Hautepierre pour leur aide tant scientifique que technique et leur grande disponibilité.

Tous nos remerciements vont aussi aux Personnels Médical et Paramédical du Pôle Urgences et Réanimation Médicale de l'Hôpital de Hautepierre, en souvenir de moments partagés.

A tous mes Maîtres des différentes Facultés de Médecine, pour leur enseignement et plus particulièrement, Monsieur le Professeur Jean Daniel TEMPE, pour m'avoir formé à la Réanimation Médicale

Mes remerciements s'adressent aussi à :

Lydie, pour son soutien moral de tous les instants,

Flore,

La mémoire de mon père,

Toute ma famille et belle-famille qui m'entoure

Céline pour son assistance technique

SOMMAIRE

Introduction.....	14
--------------------------	-----------

Partie I :

Le choc septique et sa physiopathologie

1. Le choc septique	16
1.1. Définition du choc septique et des états septiques graves.....	16
1.2. Epidémiologie.....	18
1.3. Physiopathologie.....	18
1.4. Concepts et questions actuels	22
1.5. Clinique.....	25
1.6. Traitements	26
1.7. Conclusion	27
2. Modèles expérimentaux dans le sepsis	27
2.1. Modèles humains	27
2.2. Modèles animaux.....	28
2.2.1. Rôle de l'espèce.....	28
2.2.2. Modèles endotoxémiques	28
2.2.3. Modèles d'invasion par des bactéries vivantes.....	28
2.2.4. Modèles chirurgicaux	29
2.2.5. Modèles animaux et leur relevance clinique	29
3. Coagulation et choc septique.....	30
3.1. Modifications générales de la coagulation au cours du choc septique.....	30
3.2. Le système de la protéine C.....	31
4. Activation de la voie NF-kB dans le sepsis	34
4.1. Voie de signalisation NF-kB.....	34
4.2. NF-kB dans le CS	37

5. Mort cellulaire	38
5.1. Introduction.....	38
5.2. Phases d'induction et d'activation	40
5.2.1. Voie extrinsèque.....	40
5.2.2. Voie intrinsèque.....	42
5.2.3. Relation structure/activité.....	45
5.2.4. Etudes fonctionnelles par souris KO	45
5.3. Phase d'exécution	46
5.4. Etudes fonctionnelles.....	47
5.5. Apoptose caspase indépendante	47
6. Implication du système immunitaire à la phase aiguë du choc septique	48
6.1. Introduction.....	48
6.2. Immunité innée ou « naturelle »	48
6.3. Acteurs cellulaires	48
6.4. Acteurs humoraux.....	50
6.5. Immunité acquise ou adaptative	50
6.6. Acteurs cellulaires	50
6.7. Lymphocytes T	50
6.8. Lymphocytes B.....	51
6.9. Coopération lymphocytaire T et B	52
6.10. Intrication entre l'immunité innée et l'immunité adaptative.....	52
7. Apoptose dans le système immunitaire lors du sepsis.....	53
7.1. Apoptose dans le développement du système immunitaire.....	53
7.2. Système immunitaire dans le choc septique	54
7.3. Apoptose lymphocytaire	54
7.4. Apoptose des monocytes/macrophages.....	55
7.5. Apoptose des cellules dendritiques.....	55
7.6. Apoptose des polynucléaires neutrophiles	55
7.7. Mutations des récepteurs Toll.....	56

DEUXIEME PARTIE:

Influence de la protéine C activée sur les réactions inflammatoires et immunitaires induites par le choc septique

Introduction.....	58
1. Objectifs de notre travail.....	60
1.1. Premier objectif : exploration de l'apoptose lympho-monocytaire dans le choc septique <i>in vivo</i> chez l'Homme	61
1.2. Deuxième objectif : rhPCa et apoptose lympho-monocytaire chez l'homme en choc septique.....	72
1.3. Troisième objectif : rhPCa et expression intracellulaire de cytokines de l'inflammation dans les cellules lympho-monocytaires	84
1.4. Quatrième Objectif : première approche par transcriptomique des modulations d'expressions géniques lors du choc septique.....	98
1.4.1. Introduction	98
1.4.2. Transcriptome : principes.....	99
1.4.3. Objectif de l'étude	101
1.4.4. Patients et méthodes	102
1.4.5. Résultats	104
<i>1.4.5.1. Caractéristiques du transcriptome au moment du diagnostic de choc septique.....</i>	<i>104</i>
• <i>Base de données Biocarta</i>	<i>105</i>
• <i>Base de données David.....</i>	<i>108</i>
• <i>Base de données Ingenuity®</i>	<i>112</i>
• <i>Base de données STRING database (v8.3).....</i>	<i>114</i>
<i>1.4.5.2. Analyse des gènes différemment exprimés chez les patients en choc septique traités ou non par la rhPCa....</i>	<i>123</i>
2. Discussion.....	128
3. Conclusion et perspectives.....	134
Bibliographie	136

Liste des Tableaux

Tableau 1 : *Quelques dates clés dans la recherche sur le choc septique*

Tableau 2 : *Consensus international sur les définitions des états septiques.*

Tableau 3 : *Résumé des essais thérapeutiques immuno-modulateurs dans le CS chez l'homme.*

Tableau 4 : *Les différents membres de la super-famille Bcl-2.*

Tableau 5 : *Evolution en fonction du temps des taux de cellules mononuclées circulantes dans le CS, in vivo, chez l'homme.*

Tableau 6 : *Caractéristiques cliniques des patients, publication n°1.*

Tableau 7 : *Liste des gènes fonctionnels significativement surexprimés à la phase initiale du CS chez l'homme, selon l'analyse de la base de données DAVID.*

Tableau 8 : *Liste des gènes fonctionnels significativement sous-exprimés à la phase initiale du CS chez l'homme, selon l'analyse de la base de données DAVID.*

Tableau 9 : *10 premiers gènes sur-exprimés selon la base de données Ingenuity®.*

Tableau 10 : *10 premiers gènes biologiques sous-exprimés selon la base de données Ingenuity®.*

Tableau 11 : *Gènes dont l'expression a été significativement différente entre T1 et T2 dans le groupe rhPCa+, comparé au groupe contrôle rhPCa-.*

Liste des Figures

Figure 1 : Schéma de l'état pro-coagulant induit par le sepsis.

Figure 2 : Relations possibles entre infection, syndromes septiques et les principaux mécanismes physiologiques connus comme engagés dans le choc septique.

Figure 3 : Statut immunitaire des patients en choc septique en fonction du temps.

Figure 4 : Relation schématique entre la réponse immunitaire et le décès lors du choc septique.

Figure 5 : Perte de l'homéostasie de la coagulation au cours du choc septique.

Figure 6 : Représentation cristallographique de la protéine C activée.

Figure 7 : Modulation par la PCa du phénotype de la cellule.

Figure 8 : Schéma simplifié des voies canoniques (A) et non-canonique (B) d'activation de NF- κ B.

Figure 9 : Schéma comparatif entre cellule en apoptose et nécrose.

Figure 10 : Schéma d'activation de la voie extrinsèque à partir du récepteur Fas.

Figure 11 : Schéma d'activation de la voie intrinsèque.

Figure 12 : Schéma d'interaction entre les DAMPs et les récepteurs Toll.

Figure 13 : Coopération lymphocytaire T et B.

Figure 14 : Niveau d'expression de Bcl-2 dans les cellules mononuclées circulantes, en fonction du temps, chez des patients en choc septique, comparés à des patients non septiques.

Figure 15 : Evolution des taux de lympho-monocytes circulants avec ou sans rhPCa

Figure 16 : Evolution du rapport Bax/Bcl-2 dans le groupe rhPCa comparé au groupe contrôle sans rhPCa à l'inclusion et 36h après.

Figure 17 : Evolution du rapport Bax/Bcl-2 dans le groupe rhPCa comparé au groupe contrôle sans rhPCa à l'inclusion et 36h après.

Figure 18 : Evolution de l'expression de l'ARNm de l'IFN-gamma, TNF- α et IL-10 dans les lympho-monocytes circulants de patients en choc septique traités ou non avec de la rhPCa.

Figure 19 : Evolution de l'expression de l'ARNm de l'IFN-gamma, TNF- α et IL-10 dans les lympho-monocytes circulants des patients en choc septique survivants, traités avec de la rhPCa et non traités.

Figure 20 : Evolution de l'expression de l'ARNm de l'IFN-gamma, TNF- α et IL-10 dans les lympho-monocytes circulants des patients en choc septique décédés, traités avec de la rhPCa et non traités.

Figure 21 : Comparaison d'évolution de l'expression de l'ARNm de l'IFN- γ , TNF- α et IL-10 dans les lympho-monocytes circulants de patients en choc septique suivant le critère vivant/décès, traités avec de la rhPCa et non traités.

Figure 22 : Schéma simplifié de l'étude du transcriptome par puces à ADN.

Figure 23 : Cartographie des gènes sur-exprimés dans la base de données STRING.

Figure 24 : Cartographie des gènes sous-exprimés dans la base de données STRING

Figure 25 : Résumé des 5 premières maladies, fonctions cellulaires et fonctions physiologiques impliquées à la phase initiale du choc septique par rapport à un groupe de sujets sains (base de données Ingenuity).

Figure 26 : Interaction des gènes sur-exprimés de patients en choc septique comparé à un groupe contrôle de patients normaux (base de données String).

Figure 27 : Représentation des interactions des transcrits sur-exprimés par rapport au groupe témoin de patients sains dans Cytoscape®.

Figure 28 : Liste des quinze premières voies de signalisation impliquées chez les gènes significativement sur-exprimés (par rapport au groupe témoin) dans KEGG.

Figure 29 : Détail de la voie de signalisation Jak/STAT dans KEGG.

Figure 30 : Interaction des gènes sous-exprimés de patients en choc septique, par apport à un groupe contrôle de patients normaux (base de données String).

Figure 31 : Représentation par Cytoscape® des interactions des gènes sous-exprimés de patients en choc septique, par apport à un groupe contrôle de patients normaux.

Figure 32 : Liste des quinze premières voies de signalisation impliquées chez les gènes significativement sous-exprimés (par rapport au groupe témoin) dans KEGG.

Figure 33 : Détail de la voie de signalisation du TCR dans KEGG.

Figure 34 : Détail du nœud d'interactions le plus concentré dans le groupe de gènes sous-exprimés de patients en choc septique, par apport à un groupe contrôle de patients normaux (base de données String).

Figure 35: Voies de signalisation induites dans le nœud principal du groupe de gènes sous-exprimés de patients en choc septique, par apport à un groupe contrôle de patients normaux dans KEGG.

Figure 36 : Voie de signalisation de la maladie de Parkinson impliquée dans le nœud d'interaction principal du groupe de gènes sous-exprimés de patients en choc septique, dans KEGG.

Figure 37 : Représentation des expressions de 9 gènes significativement différentes entre T1 et T2 dans le groupe rhPCa+, comparées au groupe contrôle rhPCa-.

Figure 38 : Dendrogramme représentant les niveaux élevés ou diminués d'expression des gènes chez 20 patients en choc septique à l'inclusion.

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyriboNucléique
ADNc	Acide désoxyriboNucléique Complémentaire
Ag	Antigène
AICD	Apoptosis Induced Cell Death
AIF	Apoptosis Inducing Factor
APAF	Apoptosis Protease Activating factor
ARN	Acide RiboNucléique
ATP	Adénosine TriPhosphate
BCL-2	B Cell Lymphoma 2
BCR	B Cell receptor
BH	Bcl-2 homology domain
CARD	Caspase recruitment Domain
CED	Caenorhabditis elegans death
CMH	Complexe Majeur d’Histocompatibilité
CPA	Cellule présentatrice de l’antigène
CRP	Protéine C réactive
CYT	Cytochrome
DAMP	Danger-Associated Molecular Pattern
DD	Death Domain
DED	Death Effector Domains
EDTA	Acide éthylène diamine tétracétique
EPCR	Endothelial protein C receptor
ERK	Extracellular signal-regulated protein kinase
FADD	FAS-Associated Death Domain Protein
FASL	FAS Ligand
FGF-2	Fibroblast growth factor 2
FLIP	FLICE Inhibitory Protein
HDL	High density lipoprotein
HLA	Human leukocyte antigen

HMBS	HydroxyMethyl-Bilane Synthase
ICAM	Intracellular Cell Adhesion Molecule
IκB	Inhibitor of kapa B
IKK	IχB kinase
IL	Interleukine
INF-γ	Interferon gamma
IP3	Inositoll,4,5 Triphosphate
JNK	c-Jun NH2-terminal Kinase
LOD	Logistic Organ Dysfunction
LPR	Lymphoprolifération
LPS	lipopolysaccharide
LRR	Leucine Rich Repeats
LTe	Lymphocyte T cytotoxique
MAPK	Mitogen-actived protein kinase
MAPKK	MAP kinase kinases
MIF	Macrophage migration Inhibitory Factor
NF-κB	Nuclear Factor kappa B
NK	Natural Killer
NO	Nitric Oxyde
PAF	Platelet Activating Factor
PAI1	Plasminogen Activator Inhibitor 1
PAMP	Protein-Associated Molecular Pattern
PAR	Protease Activated Receptor
PCa	Protéine C Activée
PCR	Polymerase Chain reaction
PCT	Procalcitonine
PI	Phosphatidylinositol 4,5 biphosphate
PKC	Protéine Kinase C
PPR	Protein Pattern Receptor
PT	Permeability transition

PTK	Protéine Tyrosine Kinase
PTPC	Permeability transition Pore Complex
RasGRP	Ras guanyl-nucleotide-releasing protein
RHD	Rel Homology Domain
rhPCa	Protéine C Activée recombinante humaine
SAM	Sterile Alpha Motif
SH2	Src Homology 2
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
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
TLR	Toll-Like Récepteurs
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNF-R	Tumor Necrosis factor Receptor
TPA	tissue Plasminogen Activator
TRADD	TNF-like receptor apoptosis mediating protein
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
VDAC	Voltage Dependent Anion Channel
Wnt	combinaison de Wg (wingless) et Int

INTRODUCTION

Le diagnostic et le traitement des infections graves sont une préoccupation quotidienne en milieu de Réanimation et d'Urgences.

Malgré les nombreux progrès réalisés en microbiologie et infectiologie, le choc septique (CS) (manifestation la plus grave des états infectieux) présente toujours une mortalité de 35 – 50 % en dépit d'une prise en charge de plus en plus optimisée.

Cette relative « impuissance » que les cliniciens ont devant ce syndrome est probablement liée à la découverte tardive des rôles fondamentaux de l'inflammation et de l'immunité dans l'initiation et l'amplification des mécanismes biologiques induit par la rencontre entre un microbe et son hôte.

Nous nous proposons dans une première partie de résumer les données actuelles concernant les mécanismes physiopathologiques induits lors du CS, puis dans une deuxième partie de présenter notre démarche de recherche sur les mécanismes de l'apoptose de cellules immunes induites par le CS chez l'Homme avec la recherche de marqueurs précoces de gravité et du rôle potentiel de la protéine C activée sur la réaction inflammatoire et la réponse immunitaire observées dans ce syndrome.

PARTIE I :

Le choc septique et sa physiopathologie

1. Le choc septique :

Depuis Hippocrate (IV^{ème} siècle av J.C.), la fièvre est considérée comme le signe cardinal de l'infection. Depuis, l'Histoire est jalonnée d'étapes décisives dans la compréhension et le traitement des états infectieux, rapportées dans une revue récente de Annane et coll. ¹. Nous n'en retiendrons que 6 principales au regard de notre travail, résumées dans le Tableau 1.

1888	Pfeiffer	Concept de choc endotoxinique mortel
1933	Boivin et Mesrobeanu	Caractérisation biochimique de l'endotoxine
1956	Hinshaw	Première description physiopathologique du choc septique
1985	Beutler et Cerami	Rôle du TNF- α dans le mécanisme du choc endotoxinique
1988	Sorensen	Description de prédisposition génétique à l'infection
1996	Stüber	Découverte de polymorphismes génétiques associés à la gravité de l'infection

Tableau 1 : Quelques dates clés dans la recherche sur le choc septique

Bien que l'avènement des antibiotiques depuis Flemming (1929) ait considérablement transformé le pronostic des infections dans les pays développés, la relation hôte-pathogène est éminemment complexe avec l'exploration de la réaction inflammatoire et de ces mécanismes mis en jeu lors de l'infection grave. Dans cette partie nous verrons successivement la définition du CS, son épidémiologie, sa physiopathologie et son traitement actuel.

1.1. Définition du choc septique et des états septiques graves :

Ce n'est que récemment qu'un consensus international a statué sur la relation entre infection et réaction inflammatoire induite (syndrome inflammatoire de réponse systémique ou SIRS).

Ceci a conduit à définir cliniquement trois stades liés à l'intensité de l'inflammation induite: le syndrome septique (ou sepsis), syndrome septique sévère et le CS². Ces définitions sont régulièrement actualisées dont la dernière publication date de 2008³. Ces définitions sont fondamentales à connaître pour bien classer et stratifier les patients afin de mieux les traiter (et de comparer les mêmes patients dans les études de recherche). Les dernières définitions publiées sont reportées en Annexe 1. Les relations entre l'infection, le SIRS et le sepsis sont représentées sur le Tableau 2.

Syndrome de Réponse inflammatoire Systémique (SIRS) (au moins 2 critères)	<ul style="list-style-type: none"> - Température > 38,3°C ou < 36°C - Pouls > 90 c/min - Fréquence respiratoire > 20 c/min ou PaO₂< 32mmHg - Glycémie > 7,7 mmol/L - Leucocytes > 12 000/mm³ ou < 4 000/mm³ ou > 10% f. immatures - Altération des fonctions supérieures - Temps de recoloration capillaire > 2s - Lactatémie > 2 mmol/L
Sepsis	- SIRS et infection identifiée ou présumée
Sepsis grave	<ul style="list-style-type: none"> - Sepsis avec lactates > 4 mmol/L ou - Hypotension artérielle (PAS<90mmHg) avant remplissage ou - Dysfonction d'organe (une seule suffit): <ul style="list-style-type: none"> • respiratoire: PaO₂/FiO₂ < 300 • rénale: créatininémie > 176 µmol/L • coagulation: INR > 1,5 • hépatique: INR > 4, bilirubine > 34 µmol/L • thrombopénie: < 100 000/mm³ • fonctions supérieures: CGS < 13
Choc septique	- Sepsis grave avec hypotension artérielle malgré un remplissage vasculaire optimal (20-40mL/kg)

Tableau 2 : Consensus international sur les définitions des états septiques. PaO₂ : pression partielle en oxygène ; PAS : pression artérielle systolique ; FiO₂ : fraction inspirée en oxygène ; INR : international normalized ratio ; CGS : coma Glasgow score. D'après³.

Le point de vue du Clinicien à destination du Biologiste est d'expliquer que la gravité de l'infection est bien sûr liée l'agent causal, bactéries aérobies/anaérobies, virus, champignons et parasites et leurs éventuels résistances aux agents anti-infectieux. Mais surtout, la mortalité du syndrome septique est plus liée à l'induction et au contrôle des réactions inflammatoires et immunitaires induites par l'agent pathogène causal.

Le point de vue du Biologiste à destination du Clinicien est la nécessité de développer des systèmes modèles (animaux, culture cellulaire) pour approcher les mécanismes inflammatoires, immunitaires, d'apoptose induits par le CS. Les systèmes modèles ont leur apport à confronter à une connaissance de plus en plus approfondie de la « vraie vie », mais aussi ils doivent évoluer pour analyser les mécanismes hypothétiques invoqués.

1.2. Epidémiologie :

L'incidence du sepsis est en augmentation constante depuis 40 ans et représente 50 à 150 cas par an pour 100 000 habitants avec un coût annuel de 17 mds de dollar ⁴. En France on estime à 75 000 patients par an hospitalisés pour CS, ce qui représente 5 fois plus que les décompensations d'insuffisance cardiaque ⁵. Ce syndrome devient la cause principale de décès dans les services de Réanimation occidentaux avec un taux de mortalité de 30 à 50 % ce qui représente 200 000 décès /an aux US ⁶ et en Europe ⁷. Enfin le CS arrive en 3^{ème} position pour les décès, toutes maladies confondues, dans les pays développés égalant l'infarctus du myocarde ⁴.

1.3. Physiopathologie :

Le CS résulte d'une succession d'évènements biologiques dus à la rencontre et à la multiplication d'un agent infectieux (bactéries, virus, champignons ou parasites) avec un hôte, entraînant l'apparition de défaillances d'organes (hypo-perfusion tissulaire, altération de la membrane alvéolo-capillaire, altération de la contractilité cardiaque, insuffisance rénale/hépatique aiguës) qui vont évoluer vers le décès du patient.

Cette rencontre induit une initiation de la réponse immunitaire, d'abord innée puis spécifique ^{8 9 10, 11}. Les connaissances actuelles sont issues des études expérimentales (cultures cellulaires, modèles murins de péritonite ou de pneumonie) dont les résultats sont en partie retrouvés dans les études *in vivo* chez l'humain en CS ¹².

Dans le cas des bactéries (et notre travail se limitera exclusivement à ces agents infectieux) cette activation est déclenchée par plusieurs composants tels que des produits internes (protéines, fragments d'ADN) ou des composants de parois : l'acide lipotéichoïque pour les bactéries cocci gram+ ou le lipopolysaccharide (ou endotoxine) pour les bactéries gram-.

Certains germes (en particulier *Staphylococcus spp*) ont des déterminants génétiques capables de déjouer les mécanismes de défense par des gènes de virulence (appelé virulome) ¹³ et par des « genomics islands » ou petites séquences distinctes d'ADN qui, dans certaines circonstances, agissent de concert pour exprimer des toxines ou des molécules d'adhérences ¹⁴. Les toxines bactériennes (trois types connus), produites par certains sérotypes de bactérie seulement, sont capables de perforer les membranes cellulaires (membranes externes, organelles, mitochondries) et ce, de façon très rapide. Enfin certaines toxines produites par *Streptococcus spp* ou *Staphylococcus aureus* sont aussi appelées, super-antigènes, car elles sont capables d'activer les lymphocytes T CD4+ cinq fois plus intensément qu'un antigène conventionnel, responsables alors du syndrome de choc toxinique (« *toxic shock syndrome* »), létal en moins de 48 h ¹⁵. Récemment a été décrit la possibilité pour les bactéries de communiquer entre elles par l'intermédiaire d'un capteur de densité ou *quorum sensing* ¹⁶ pour coordonner leurs actions invasives en particulier en sécrétant un biofilm en surface des épithéliums ou sur des corps étrangers (cathéters, sondes urinaires...) qui empêche l'opsonisation bactérienne ¹⁷.

Concernant la réponse immunitaire à l'infection, les acteurs principaux sont : les leucocytes et leurs dérivés tissulaires, l'endothélium vasculaire et les médiateurs de l'inflammation (pro- ou anti-inflammatoires).

Les leucocytes vont migrer vers le tissu infecté par chimiotaxisme induit par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (cf infra) et la myélopoïèse, en particulier la lignée myéloïde, va être stimulée ¹⁸. Les différentes lignées leucocytaires participent de différente façon à la lutte anti-infectieuse. Les polynucléaires neutrophiles (PNN), premières cellules immunes sur le site de l'infection, jouent un rôle d'attaquants en phagocytant et digérant la bactérie par la sécrétion de protéases cytotoxiques (élastases, peroxydases...) et de radicaux libres ¹⁹. Mais ils secrètent aussi des facteurs chimiotactiques (tels que C5a, HMGB-1, MIP-1alpha) afin de recruter d'autres cellules inflammatoires sur le site tels que les monocytes.

Les autres principales cellules immunitaires activées sont les lymphocytes et monocytes qui ont un rôle de trigger de la réaction immune tant innée d'abord qu'adaptative ensuite. Une avancée importante dans la compréhension du syndrome septique a été la découverte que ces cellules immunitaires mouraient très rapidement par une activation précoce et intense de la mort cellulaire programmée ou apoptose ^{9 20}.

Ce phénomène d'apoptose induit par le CS fait l'objet d'intenses recherches et sera plus détaillé dans le chapitre « Apoptose dans le système immunitaire ». Déjà nous notons que dans ce phénomène d'apoptose, la mitochondrie semble avoir une place essentielle¹.

L'endothélium vasculaire joue un rôle primordial dans le CS car il est l'interface entre les tissus et les cellules de l'inflammation circulantes entraînant des effets cellulaires et humoraux. Il participe au recrutement et à l'activation des leucocytes par expression de molécules d'adhésion (ICAM, VCAM, intégrines) puis de diapédèse pour que celles-ci atteignent le tissu lésé, sous l'effet d'intégrines et de chémokines (> 40 connues). Une des caractéristiques principale de l'endothélium « septique » est la perte de ces propriétés physiologiques anti-coagulantes et pro-fibrinolytiques pour devenir pro-coagulant essentiellement en activant la voie extrinsèque.

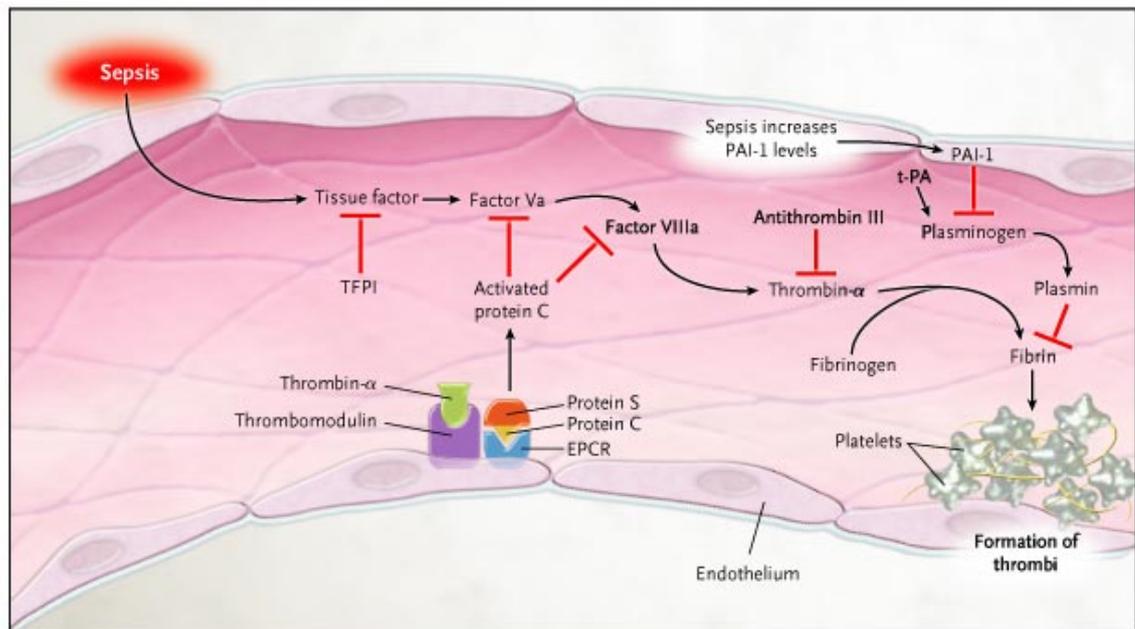


Figure 1 : Schéma de l'état pro-coagulant induit par le sepsis. TFPI :tissue factor pathway inhibitor ; PAI-1 : plasminogen activator inhibitor-1; t-PA :tissue plasminogen activator ; EPCR: endothelium protein C receptor. D'après²¹.

Ces perturbations de l'homéostasie de la coagulation sont responsables d'une coagulation intra-vasculaire disséminée (CIVD), bien caractérisée depuis 1998 par Mammen et col²². Cette CIVD est responsable de micro-thrombi capillaires qui, associées aux troubles vasomoteurs, entraînent une hypoperfusion tissulaire et la défaillance d'organes. Sommairement la coagulation est activée par la voie extrinsèque par libération du facteur tissulaire, sécrétion de molécules d'adhésion des plaquettes (ICAM, VCAM, E-sélectines...). Il existe aussi une diminution de synthèse de protéines thrombomodulatrices telle que la thrombomoduline qui normalement inhibe la thrombine. Dans le sepsis la thrombine est activée et elle active à son tour la protéine C qui est un puissant inhibiteur du facteur V de la voie intrinsèque. Cette protéine C et son récepteur endothélial sont consommés massivement dans le sepsis. Tous ces effets sont majorés par la sur-production endothéliale de NO par les NOS inductibles qui induit une vasoplégie intense et qui est « résistante » aux agents vasopresseurs (dopamine, noradrénaline, adrénaline). Cet état « d'anergie capillaire » rend compte de la perte de pression endoluminale, de débit de perfusion diminué et donc de la diminution de la délivrance d'oxygène aux tissus.

Le système nerveux central joue lui aussi un rôle dans la modulation de la réponse inflammatoire par la voie cholinergique qui, pour Tracey et col.²³, réalise un véritable arc réflexe anti-inflammatoire. Le système parasympathique est capable de freiner la sécrétion de cytokines par l'activation des récepteurs cholinergiques des macrophages²⁴. Cependant cette découverte n'a pas à ce jour d'impact clinique.

Récemment des études ont montré qu'il existe une composante génétique dans la réponse au sepsis par l'existence de polymorphisme de gènes codant pour des protéines de l'inflammation (TNF- α , IL-6, CRP) et de la coagulation (protéine C) dont certains ont été identifiés comme intervenant dans le pronostic, essentiellement les récepteurs Toll^{25, 26}. De plus le vieillissement de notre population, responsable du phénomène d'immuno-sénescence²⁷, est à l'origine d'une augmentation de l'incidence des infections dans les pays industrialisés.

La Figure 2 propose un résumé des mécanismes physiopathologiques intriqués dans les syndromes septiques.

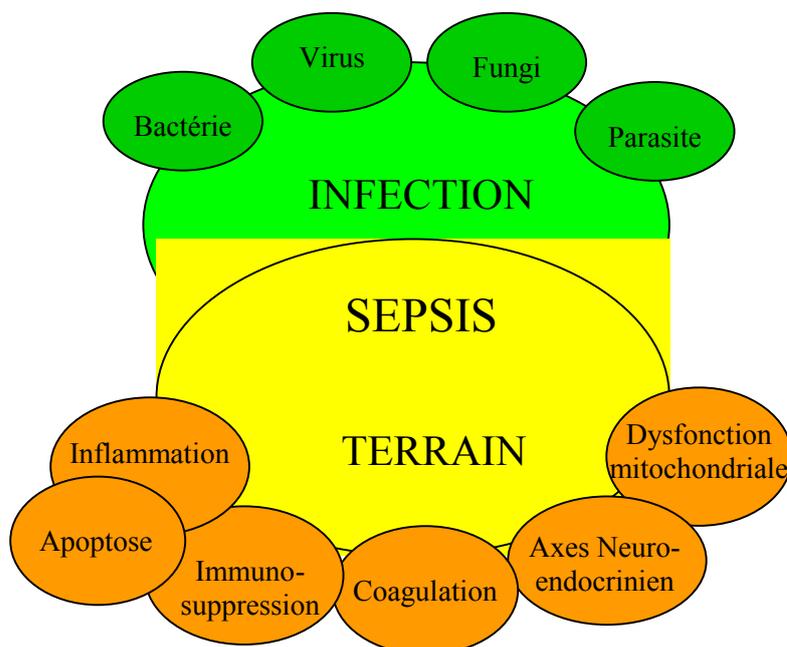


Figure 2 : Relations possibles entre infection, syndromes septiques et les principaux mécanismes physiologiques connus comme engagés dans le choc septique.

1.4. Concepts et questions actuels :

Le syndrome septique peut être considéré comme un modèle d'inflammation aiguë²⁸ mais, son caractère multifactoriel avec activation de multiples voies de signalisations et la diversité des origines de l'infection, rendent ce syndrome éminemment complexe. Pour augmenter la difficulté, les modèles expérimentaux tant *in vitro* que *in vivo* sur animaux sont tous très imparfaits dans leurs tentatives d'explications physiopathologiques et qu'ils ont tous échoués dans la recherche de nouveaux traitements. Il n'existe pas UN modèle expérimental de sepsis mais DES modèles selon l'agent pathogène, l'organe initial infecté et le terrain immunitaire/inflammatoire du patient²⁹. Par conséquent les résultats des expériences sur ces modèles sont transférables avec précaution chez l'humain et rendent donc indispensable les études, longues et difficiles, chez l'Homme.

Depuis 25 ans aucun nouveau traitement dans le CS n'a apporté la preuve de son efficacité (Tableau 3) excepté l'utilisation de la protéine C activée recombinante humaine³⁰.

Pathway	Mediators	Treatment	Results of RCTs
Innate immunity	Superantigens: TSST-1	Anti-TSST-1	Not evaluated
	Streptococcal exotoxins (e.g., streptococcal pyrogenic exotoxin A)	Antistreptococcal exotoxins	Not evaluated
	Lipopolysaccharide (endotoxin)	Antilipopolysaccharide ⁹	Negative
	TLR-2, TLR-4	TLR agonists ¹⁰ and antagonists	Not evaluated
Adaptive immunity	Monocytes, macrophages	GM-CSF, interferon gamma ¹¹	Not evaluated
	Neutrophils	G-CSF [†]	Not evaluated
Proinflammatory pathway	B cells (plasma cells and immunoglobulins)	IgG	Not evaluated
	CD4+ T cells (Th1, Th2)		
	TNF- α	Anti-TNF- α ^{12,14}	Negative
	Interleukin-1 β	Interleukin-1-receptor antagonist ¹⁵	Negative
	Interleukin-6	Interleukin-6 antagonist	Not evaluated
	Prostaglandins, leukotrienes	Ibuprofen, ¹⁶ high-dose corticosteroids ¹⁷	Negative
	Bradykinin	Bradykinin antagonist ¹⁸	Negative
	Platelet-activating factor	Platelet-activating factor acetyl hydrolase ¹⁹	Negative
	Proteases (e.g., elastase)	Elastase inhibitor [‡]	Negative
	Oxidants	Antioxidants (e.g., N-acetylcysteine) ²⁰	Not evaluated
Procoagulant pathway	Nitric oxide	Nitric oxide synthase inhibitor ²¹	Negative
	Decreased protein C	Activated protein C ³	Positive
	Decreased protein S	Protein S ²²	Not evaluated
	Decreased antithrombin III	Antithrombin III ²³	Negative
	Decreased tissue factor-pathway inhibitor	Tissue factor-pathway inhibitor ²⁴	Negative
	Increased tissue factor	Tissue factor antagonist ²⁵	Not evaluated
	Increased plasminogen-activator inhibitor 1	Tissue plasminogen activator	Not evaluated
Antiinflammatory	Interleukin-10	Interleukin-10 [‡]	Not evaluated
	TNF- α receptors	TNF- α receptors ¹³	Negative
Hypoxia	Hypoxia-inducing factor 1 α , vascular endothelial growth factor	Early, goal-directed therapy ²	Positive
		Supernormal oxygen delivery Erythropoietin ²⁶	Negative Not evaluated
Immunosuppression or apoptosis	Lymphocyte apoptosis	Anticaspases ²⁷	Not evaluated
	Apoptosis of intestinal epithelial cells	Anticaspases ²⁷	Not evaluated
Endocrine	Adrenal insufficiency	Corticosteroids ²⁸	Mixed results [‡]
	Vasopressin deficiency	Vasopressin ²⁹	Not evaluated

Tableau 3 : Résumé des essais thérapeutiques immuno-modulateurs dans le CS chez l'homme. D'après²¹.

Actuellement, le CS est considéré comme évoluant en deux phases : la première pro-inflammatoire liée à la réaction immunitaire innée de l'hôte induite par l'agent pathogène durant environ 2-3 jours, suivi d'une deuxième phase anti ou hypo-inflammatoire de durée plus longue (5-7 jours). Si cette dernière dure trop longtemps ou est trop profonde, le patient est à haut risque d'évoluer vers une défaillance multi-viscérale (Figure 3) ³¹.

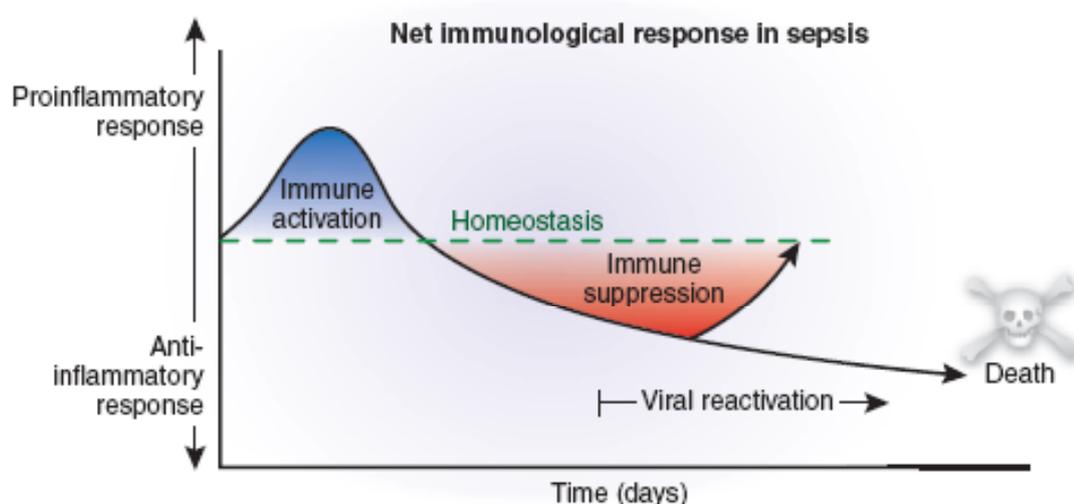


Figure 3 : Statut immunitaire des patients en choc septique en fonction du temps : la phase initiale pro-inflammatoire (48 - 72 h) est suivie d'une seconde phase d'immunosuppression plus longue (7 à 10 jours). D'après³¹.

Le décès survient maintenant peu fréquemment (10 - 15 %) à la phase initiale pro-inflammatoire qui dure 48 – 72 h (sauf en cas de purpura fulminans ou de choc toxique plus lié à une toxine sécrétée par la bactérie qu'à la bactérie elle-même) mais surtout lors de cette deuxième phase appelée aussi « immunoparalysie » qui elle dure plus longtemps entre sept et dix jours ^{32, 33}. Ces deux phases sont résumées sur la Figure 4, avec les objectifs thérapeutiques qui y sont associés.

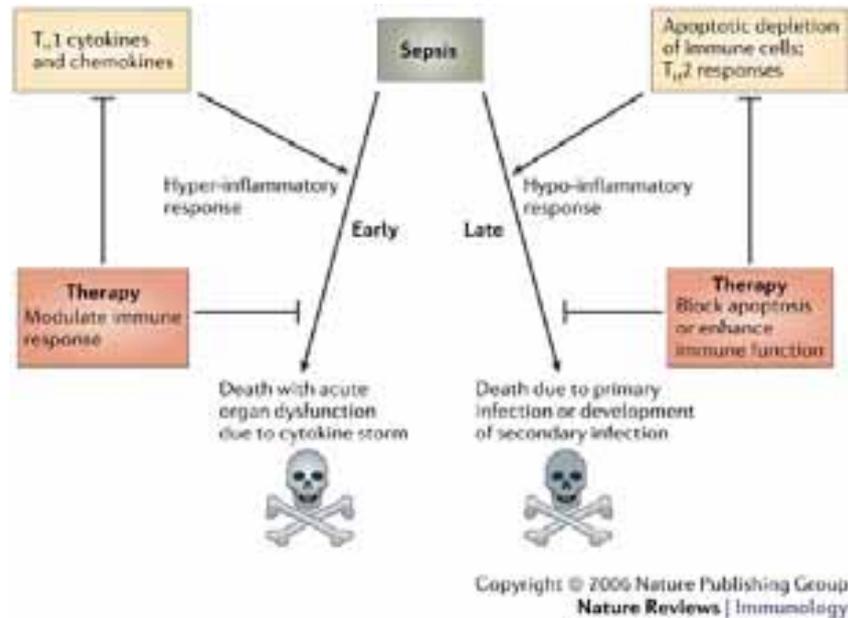


Figure 4 : Relation schématique entre la réponse immunitaire et le décès lors du choc septique. D'après³⁴.

Un problème majeur est de savoir reconnaître ces deux phases : pro puis anti-inflammatoire. Comment caractériser l'état immunitaire d'un patient lors de sa prise en charge et lors de son suivi ? Le patient est-il en phase pro ou anti-inflammatoire ? Quand la première se finit et commence la deuxième ? Les cytokines semblaient des candidats idéals mais devant leur extrême variabilité et labilité de sécrétion et les résultats contradictoires publiés, elles ne peuvent être actuellement employées en clinique. Cependant une équipe propose d'utiliser les dosages du TNF et de l'IL-1 pour caractériser la phase inflammatoire et des HMGB-1 pour la phase anti-inflammatoire (Ulloa,2005). Cette hypothèse reste à être validée.

1.5. Clinique :

Elle est essentiellement basée sur la reconnaissance des signes d'inflammation aiguë (ou SRIS) et la recherche d'un foyer infectieux. Ce dernier est d'origine pulmonaire (40 %), abdomino-pelvien (20 %), génito-urinaire (10 %), méningé (5 %), cutané (5 %) et parfois inconnu¹.

Afin de mieux caractériser et stratifier cliniquement les patients tant sur leur terrain que sur la dysfonction d'organes un nouveau score prédictif de mortalité a été développé en 2001 : le système PIRO pour Predisposition, Infection, Response et Organ dysfunction³⁵. Son utilisation vient d'être validée à une plus large échelle³⁶ mais n'est pas encore utilisée en routine.

1.6. Traitements :

Il associe deux volets fondamentaux à réaliser conjointement : la lutte contre l'agent infectieux et le maintien des fonctions vitales. Le troisième volet, qui en est encore à ses balbutiements, est la modulation de l'immunité du patient.

L'antibiothérapie probabiliste guidée par les conférences de Consensus ³ puis adaptée dans un second temps selon les résultats des prélèvements (hémocultures, examen des urines, lavage broncho-pulmonaire, plaie...), doit être débutée sans délai (< 3 h après l'admission du patient). Tout retard et/ou erreur d'administration des antibiotiques augmente le taux de décès ³⁷.

Le second aspect est le traitement supportif qui associe oxygénation (avec recours à la ventilation mécanique si nécessaire), un remplissage vasculaire rapide, l'utilisation d'agents vasopresseurs avec un monitoring invasif. L'importance de la rapidité et de l'intensité de ce traitement a été démontré par Rivers et al en 2001 ³⁸ avec une réduction de la mortalité à 28 jours de 16 %.

Enfin, sur le plan immunomodulation, force est de constater que tous les essais (une quinzaine), chez l'Homme, ont échoué (revue in ²¹). Des espoirs avaient été suscités par deux traitements d'utilisation courante : l'insuline et l'hydrocortisone. Ainsi van den Berghe et al ³⁹ a publié un effet bénéfique sur la mortalité d'un strict contrôle glycémique des patients de réanimation, mais l'étude multicentrique mondiale Nice Sugar vient d'en invalider les résultats ⁴⁰. Annane et al avait suggéré l'effet bénéfique sur la mortalité de petites doses d'hydrocortisone (100 mg, quatre fois/24h sur cinq jours, associés à de la fludrocortisone). Néanmoins, l'étude multicentrique internationale Corticus n'a pas retrouvé ses conclusions ⁴¹. Seule, à ce jour, la protéine C activée recombinante (Xigris®), associée au traitement supportif précédemment décrit, a démontré une réduction de 6,1 % de la mortalité (à 28 j) dans un essai multicentrique paru en 2001 ³⁰ puis confirmée par plusieurs autres études ^{42 43 44 45}. Depuis, ce traitement fait parti des recommandations internationales de bonne pratique dans le CS ³ et selon les indications/contre-indications de l'Autorisation de Mise sur le Marché en France.

1.7. Conclusion :

Le CS est une préoccupation majeure dans les services de Réanimation des pays développés et représente un véritable enjeu de Santé Public. Une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques fait peu à peu le jour grâce à une recherche intensive mais ce syndrome reste particulièrement complexe et sans marqueur fiable. Ceci fait que la mortalité reste la même depuis bientôt quarante ans, malgré quelques avancées thérapeutiques, dans les traitements symptomatiques. De grands espoirs sont fondés sur des traitements étiogéniques, en particulier ceux modulant l'immunité induite lors de l'interaction pathogène/hôte.

2. Modèles expérimentaux dans le sepsis :

L'objectif initial et principal des modèles expérimentaux est de savoir comment décèdent les patients de CS. Comme pour les autres pathologies, la recherche a pour but aussi de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques et *in fine* de trouver des armes thérapeutiques.

2.1. Modèles humains :

L'exposition humaine à des composants bactériens est théoriquement la plus proche voie d'analyse biologique *in vivo* de la pathogénie induite par le sepsis. Trois méthodes ont été décrites (chez l'homme sain) explorant ses effets systémiques ou régionaux en injectant par voie intraveineuse, sous-cutanée ou pulmonaire (aérosol) des composants bactériens tels que le LPS ou endotoxine d'*E Coli* ⁴⁶. Sur le plan thérapeutique, une seule étude concernant la PCa a été réalisée sur un modèle humain d'endotoxinémie et qui n'a pas objectivé de modification par rapport au contrôle (coagulation, inflammation, activation leucocytaire) ⁴⁷. Naturellement ces modèles humains, sur volontaires sains, sont limités par des considérations éthiques qui en limite donc les développements.

2.2. Modèles animaux :

2.2.1. Rôle de l'espèce :

L'espèce murine est l'animal de laboratoire le plus utilisé pour plusieurs raisons. La première est pratique car les souris ou rats sont de petites tailles et bon marché. La deuxième raison tient au fait qu'il existe des possibilités de transformation génétiques avec génération de souris transgénique ou Knock Out spécifique pour un ou plusieurs gènes. Mais leur petite taille empêche de réaliser des prélèvements sanguins répétés sans compensation vasculaire par remplissage. Par ailleurs les études hémodynamiques cardiaques et pulmonaires sont difficilement transposables à l'homme.

Les animaux de plus grande taille (chèvre, cochon, primate) sont plus proches de l'humain mais ils sont lourds à mettre en œuvre et nécessitent des autorisations spéciales (primates). Ils sont réservés à des études thérapeutiques précliniques (cochons) ou à des études spécifiques (zoonoses pour les primates).

2.2.2. Modèles endotoxémiques :

Ils furent les premiers modèles utilisés en injectant par voie intraveineuse ou intra-péritonéale de LPS d'*E Coli*⁴⁸ ou de *Salmonella abortus equi*⁴⁹. Ce modèle se fait en une dose unique et avec des doses très largement supérieures à celles observées chez l'humain (x250). Ces modèles ont révélé les manifestations cardio-vasculaires induites par le sepsis à sa phase initiale mais ils sont incapables de refléter les réactions au-delà de 24 – 48 h et notamment la dépression immunitaire.

2.2.3. Modèles d'invasion par des bactéries vivantes :

Ils varient largement selon la voie d'infection (orale, intraveineuse, intra-péritonéale, pulmonaire) et le type de germe (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E coli*, *Klebsiella pneumoniae*). Ces modèles ont permis d'explorer les relations hôtes-pathogènes mais ils sont hétérogènes (péritonite-septicémie-pneumonie) et ne sont relevant que de l'espèce bactérienne étudiée. Il n'y a pas un CS mais plusieurs en fonction de l'agression externe et de la mobilisation des réactions de l'organisme.

2.2.4. Modèles chirurgicaux ⁵⁰ :

L'inoculation intra-péritonéale est le plus ancien modèle qui a permis de décrire les manifestations cardio-vasculaires et leucocytaires du CS avec une mortalité pas trop précoce.

La ligature avec ponction caecale est considérée comme le modèle de référence tant chez le rat que la souris ⁵¹. Il présente l'avantage de réaliser un sepsis d'origine polymicrobien avec une durée dans le temps suffisante pour pouvoir explorer les différentes phases du sepsis. Mais la variation du calibre de l'aiguille à ponction, la qualité du remplissage et de la correction de l'hypothermie post-procédure interfère avec la survie ⁵².

Plus récemment a été proposée la pose de stent sur le côlon ascendant qui permet d'observer la survenue de défaillance multiviscérale. Mais ce modèle est aussi tributaire de variations de procédure (taille du stent) qui altèrent la survie ⁵³.

2.2.5. Modèles animaux et leur relevance clinique :

Les modèles expérimentaux animaux sont fondamentaux dans la recherche de nouvelles données physiopathologiques et aussi dans l'analyse toxicologique et pharmacologique de nouveaux médicaments. Mais il existe des différences importantes entre ces modèles animaux et l'homme. La première est la sévérité de l'agression qui est prolongée chez l'homme avec des doses moindres que chez l'animal (x 250 chez la souris par rapport à l'homme ⁵⁴). Puis le genre (sexe féminin plus résistant), et l'absence de standardisation de la réanimation dans les expérimentations animales, influent sur la survie. Enfin il faut signaler que tous les modèles animaux utilisés se font sur de jeunes animaux en bonne santé et qu'ils ne reflètent donc pas le terrain préexistant de la plus part de nos patients infectés ⁵⁵. Ces remarques expliquent peut être pourquoi depuis 20 ans, les nouveaux traitements ont des résultats prometteurs en phase préclinique mais qui ne se sont pas confirmés chez l'homme [revue in ⁵⁶].

Comme nous le voyons, le syndrome septique est particulièrement complexe et pour améliorer la transposition des résultats entre animaux et humains les modèles expérimentaux doivent être plus adaptés à la réalité clinique ⁵⁰ et plus représentatifs des conditions humaines ⁵⁷.

3. Coagulation et choc septique :

3.1. Modifications générales de la coagulation au cours du choc septique

Les défaillances d'organes observées au cours du sepsis sont dues à l'inflammation aiguë liée à l'infection comme exposé précédemment mais aussi à la formation et au dépôt de fibrine dans la microcirculation avec constitution de microthrombi intra-tissulaires. La mise en évidence d'une corrélation entre les marqueurs d'activation de la coagulation et un état septicémique date de 1968⁵⁸ mais c'est seulement au début des années 2000 que cette observation s'est révélée être un aspect physiopathologique fondamental dans le CS⁵⁹. De plus les anomalies biologiques de la coagulation précèdent l'apparition des signes cliniques de sepsis et leur prolongation dans le temps est corrélée au nombre de défaillances d'organes et du taux de décès⁶⁰.

L'activation de la coagulation dans le CS est due à l'expression de facteur tissulaire (FT) à la surface de l'endothélium vasculaire et aussi au niveau des monocytes circulants agressés par les composants bactériens, induisant alors la formation de thrombine. La voie de signalisation NF-kB est ensuite activée avec production par le monocyte de cytokines pro-inflammatoires et de molécules d'adhésion (ICAM)⁶¹. Parallèlement l'activité fibrinolytique qui devrait s'activer est en fait inhibée par la libération du *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1) par l'endothélium vasculaire septique.

Une autre caractéristique importante du sepsis est qu'il induit une dégradation excessive et une diminution de synthèse hépatique de protéines inhibitrices de la coagulation comme l'anti-thrombine, le *tissue factor pathway inhibitor* (TFPI) et la protéine C, inhibiteur des facteurs Va et VIIIa⁶². La consommation de ces facteurs ne permet plus de limiter la génération de thrombine et donc entraîne l'extension des thrombi.

Ainsi au cours du CS il existe une perte de l'homéostasie de la coagulation avec constitution d'un état pro-coagulant (Figure 5).

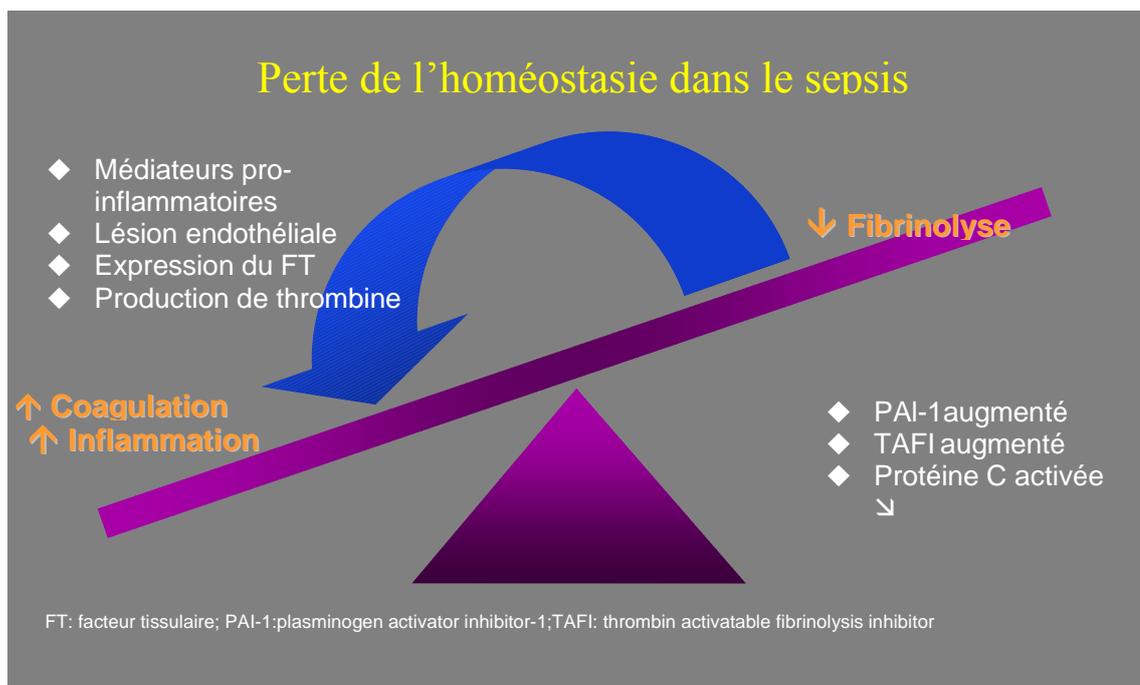


Figure 5 : Perte de l'homéostasie de la coagulation au cours du choc septique.
D'après⁵⁹

3.2. Le système de la protéine C :

L'action anticoagulante de la PCa est connue depuis les travaux de Seegers et col publiés en 1960²² mais c'est seulement depuis une quinzaine d'année que ses mécanismes d'action commencent à être connus. La protéine C est une vitamine K dépendante sérine-protéase de 461 acides aminés sécrétée par le foie à l'état de zymogène inactif (PC) à simple chaîne contenant une séquence amino-terminale suivi du pro-peptide. La forme circulante se présente sous forme de deux zymogènes avec une chaîne légère (21kDa) et une chaîne lourde (41kDa) reliée par un pont di-sulfure entre Cys183 et Cys320. Le zymogène circulant est activée par la thrombine en présence d'une protéine endothéliale, la thrombomoduline, par clivage protéolytique d'un petit peptide de 12 AA (Asp200-Arg211). La structure de la PCA contient une chaîne légère avec un domaine riche en acide gamma-carboxyglutamique (Gla) qui assure la fonction anticoagulante, et deux *epidermal growth factor-like* molécules. La chaîne lourde contient un domaine protidique trypsine-serine like⁶³. Il existe 169 mutations différentes décrites qui expliquent des déficits ou résistance à la PCa, responsable de thrombophilie⁶⁴.

Une représentation tri-dimensionnelle de la PCa est portée sur la Figure 6⁶³.

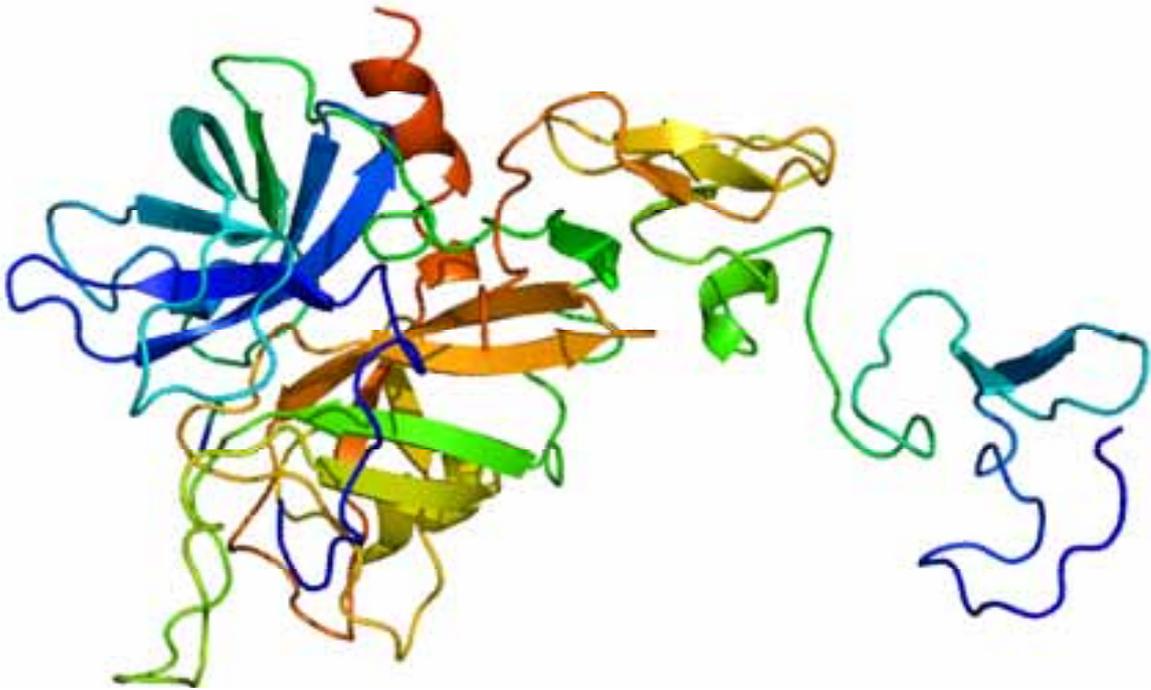


Figure 6 : Représentation cristallographique de la protéine C activée. Les rubans plans représentent les feuillets bêta et le ruban rouge l'hélice alpha. D'après ⁶³.

L'activation par le complexe thrombine/thrombomoduline est augmentée d'un facteur 20 lorsque la PCa est fixée au niveau d'un récepteur découvert initialement au niveau de l'endothélium, l'*endothelial protein C receptor* ou EPCR ⁶⁵. Depuis d'autres études ont montré que l'EPCR est exprimée aussi par d'autres cellules telles que les monocytes et cellules dendritiques et qu'il existe sous forme circulante ⁶⁶. Une fois activée la protéine C (PCa) inhibe la génération de thrombine en dégradant par protéolyse les facteurs Va et VIIIa, avec un co-facteur, la protéine S. La PCa circule à l'état basal dans le sang à une concentration très faible avec une demi-vie courte de 15 – 30 min ⁶⁷. Physiologiquement la PCa est inhibée par l'alpha-1 protéinase inhibiteur, l'alpha-2-macroglobuline et par un inhibiteur plasmatique spécifique (PC inhibiteur) ⁶⁶. Enfin, la PCa exerce une action pro-fibrinolytique en inhibant l'action de PAI1 ⁶⁸.

Dans le CS, la PCa est consommée lors de « l'emballement » de la coagulation appelé coagulation intraveineuse disséminée (CIVD), par diminution de synthèse hépatique, par inhibition des protéases et par diminution de synthèse hépatique de son co-facteur la protéine S ⁶⁹. Par ailleurs, les cytokines pro-inflammatoires (IL-6) diminuent l'expression de la TM diminuant ainsi l'activation de la PC native. La sévérité du déficit en PCa (< 40 % niveau physiologique) dans le CS est un facteur prédictif de décès dans la cohorte de patients de l'étude Prowess ⁷⁰.

Mais la PCa exerce aussi d'autres effets tels qu'anti-inflammatoire et anti-apoptotique. Les effets anti-inflammatoires s'exercent au niveau des cellules endothéliales et des leucocytes. Au niveau de l'endothélium, la PCa réduit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6), diminue l'expression de molécules d'adhésion et le *rolling* des leucocytes (adhérence puis passage à travers l'endothélium vasculaire). Ainsi la PCa maintient l'intégrité de fonction de la barrière endothéliale ⁷¹. Au niveau des leucocytes, la PCa diminue aussi la synthèse de cytokines pro-inflammatoires par des monocytes stimulés par du LPS ⁷². Les mécanismes expliquant ces effets ne sont qu'imparfaitement connus. Il semble cependant que l'EPCR joue un rôle central, en particulier l'EPCR circulant qui est capable de désactiver les neutrophiles ⁷³ et aussi par le fait que l'EPCR, par lui-même, exerce des activités anti-inflammatoires ⁷⁴. Un autre mécanisme d'action est lié à l'activation par la PCa du *protease activated receptor 1* (PAR-1) transmembranaire qui conduit à l'activation de voies signalisation intracellulaire ⁷⁵. Il semble que, *in vitro*, l'activation concomitante de ces deux récepteurs (EPCR et PAR-1) soient indispensables aux effets anti-inflammatoires de la PCa ⁷⁶ ainsi qu'à la réduction de mortalité observée dans un modèle de péritonite murin ⁷⁷. Par ailleurs, la PCa peut bloquer expérimentalement la translocation nucléaire de NF-kB (cf Figure 7), empêchant alors la production de cytokines pro-inflammatoires ^{78 79}. Ces études sont corroborées par celles chez la souris transgénique, déficiente pour la PCa, où l'induction d'une endotoxémie (par LPS) s'accompagne d'une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires significativement plus élevées que dans le groupe sauvage ^{80 81}.

Les activités anti-apoptotiques de la PCa ont d'abord été découvertes *in vitro* sur culture cellulaire ⁸² puis *in vivo* dans des modèles murins d'ischémie cérébrale ⁸³. Les mécanismes d'action n'en sont qu'imparfaitement connus. Dans l'agression cérébrale par hypoxie, la PCa réduit l'activité de p53 et de Bax tout en augmentant l'activité anti-apoptotique de Bcl-2 au niveau des cellules endothéliales ⁸³.

La Figure 7 résume les effets vasculaires actuellement connus de la PCa.

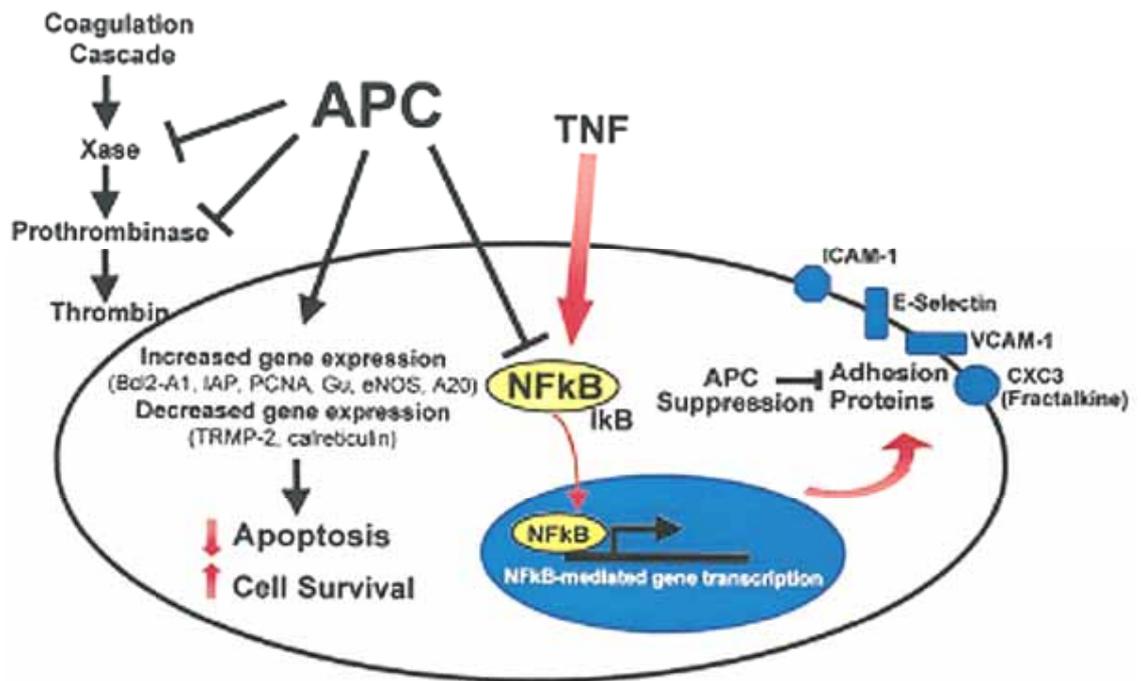


Figure 7 : La PCa (ou APC sur la Figure) module le phénotype de la cellule endothéliale en inhibant l'action de la thrombine, en exerçant des actions anti-apoptotiques et en réprimant l'expression de NF-κB diminuant alors la synthèse de protéines pro-inflammatoires telles que les molécules d'adhésion. D'après ⁸⁴.

Ainsi le système de la protéine C est à l'interface entre l'endothélium vasculaire, la coagulation et la réponse de l'immunité innée dans les syndromes infectieux graves ⁸⁵ et ce système exerce une action cytoprotectrice ⁷¹.

4. Activation de la voie NF-κB dans le sepsis

4.1. Voie de signalisation NF-κB :

NF-κB pour Nuclear Factor κB est une famille de facteurs de transcription ubiquitaire qui reconnaissent une séquence ADN appelée site κB comprenant la séquence suivante : 5'-GGGRNWYYCC-3' où R est une purine, Y une pyrimidine, N un nucléotide et W adénine ou thymidine ⁸⁶. Il existe 5 membres classés en deux groupes en fonction de leurs similitudes structurales.

Le premier groupe comprend RelA (ou p65), RelB (ou p50) et REL (c-Rel) qui peuvent former des homo ou hétérodimères (Rel pour *reticuloendothelious viral oncogene*).

Ils sont présents dans le cytosol sous forme inactive car lié à un inhibiteur : Ikb⁸⁷. Le second groupe comprend NF-kB1 (ou p105) et NF-kB2 (ou p100). Ils sont synthétisés sous forme inactive et doivent être clivés au niveau de leur extrémité C-terminal pour actif. Un grand nombre de stimuli (> 500) peuvent activer cette famille de molécules : composés bactériens, viraux, parasitaires, fongiques, cytokines ou d'ADN, toxiques chimiques, physiques ou voies physiologiques.

Il existe deux voies d'activation de NF-kB : l'une dite canonique et l'autre non-canonique. Un schéma de ces deux voies est représenté sur la Figure 8.

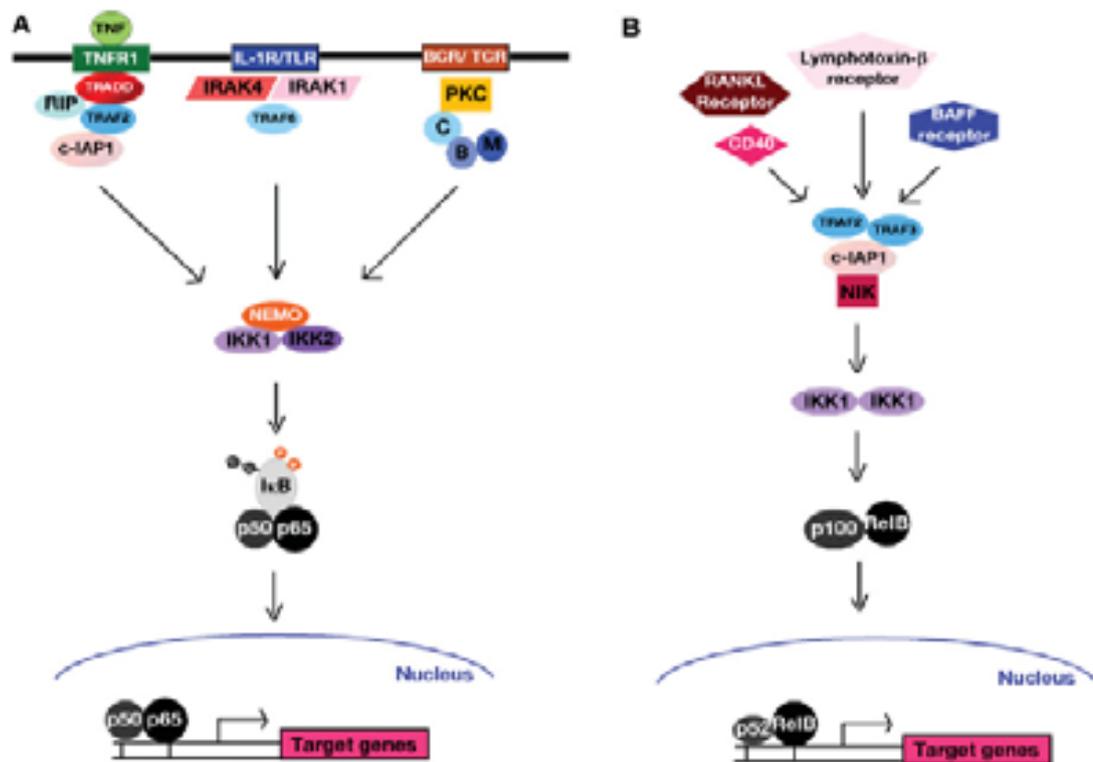


Figure 8 : Schéma simplifié des voies canonique (A) et non-canonique (B) d'activation de NF-kB. (A) La voie canonique est activée par un récepteur de l'inflammation (TNF, TLR ou BCR) puis transmet par des protéines adaptatrices pour activer le complexe IKK. Ce dernier active Ikb (phosphorylation) entraînant la libération du dimère p50-p65 de NF-kB qui va s'accumuler dans le noyau et activer la transcription. (B) La voie non-canonique est engagée par certains membres de la famille du TNF (Lymphotoxin B, BAFF) ou par un activateur direct de NF-kB (RANKL) qui vont activer NIK. Ce dernier va phosphoryler IKK1 qui lui-même va cliver p100 en p52. Le complexe p52-RelB ainsi formé va migrer dans le noyau et activer la transcription nucléaire. IKK : Ikb kinase ; Ikb : inhibitor of NF-kB ; BAFF : B-cell activating factor ; RANKL : receptor activator of NF-kB ligand ; NIK : NF-kB inducing kinase. D'après⁸⁸.

La voie d'activation canonique dans les cellules immunes est classiquement activée par les cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 entre autres), l'activation des récepteurs Toll et l'engagement des TCR pour ne parler que des principaux ⁸⁹. Cette voie joue un rôle dans l'initiation de l'immunité innée comme dans le développement et la maturation des cellules immunitaires tant innée qu'adaptative ⁹⁰.

La voie non canonique de NF- κ B est activée par certains membres de la super famille du TNF- α comme la lymphotoxine- β , BAFF (B-cell activating factor) et le système RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand). Cette voie joue un rôle important dans le développement des organes lymphoïdes secondaires comme les ganglions, les plaques de Peyer et la rate, permettant le développement et la maturation des lymphocytes et de l'ostéoclastose ⁹¹. Concernant le développement des lymphocytes B il est sous la dépendance de la voie non canonique initiée par BCR and BAFF récepteurs mais la maturation nécessite une coopération des deux voies canonique (A) et non canonique (B) ⁹². L'ostéoclastose et sa régulation sont sous la dépendance de p52 and P50 ⁹³.

La régulation du système NF- κ B est complexe mais son principal régulateur (inhibiteur) est IKK (I κ B kinase), agissant au niveau de IKK ou des sous-unités de NF- κ B. ⁹⁴. De plus la voie NF- κ B ne fonctionne pas isolément mais elle est au carrefour d'autres voies de transcription/régulation qui s'exercent au niveau protéine/protéine ou au niveau des modifications post-transcriptionnelles ⁹⁵.

Pour preuve de l'importance de cette voie, la perte de fonction de NF- κ B est à l'origine de plusieurs maladies génétiques telles que des maladies inflammatoires cutanées liées à l'X (*incontinentia pigmenti*) due à une forme erronée de la protéine NEMO ⁹⁶.

A l'inverse une sur-expression de NF- κ B peut se voir dans certains cancers par acquisition de résistance aux agents pro-apoptotiques, de pouvoirs d'angiogénèse et métastatiques accrus ⁹⁷. NF- κ B peut aussi être à l'origine de pathologies inflammatoires chroniques telles que la polyarthrite chronique, la maladie de Crohn, l'insulino-résistance dans le diabète de type II, des maladies neuro-dégénératives (Parkinson, Alzheimer) et dans le syndrome de détresse respiratoire aigu ^{98 99}.

4.2. NF-kB dans le choc septique :

Le CS induit par les composants bactériens via la voie Toll et les cytokines, une induction de la voie de signalisation NF-kB. Ceci est particulièrement vrai pour les cellules mononuclées de patients septiques où le niveau d'expression de NF-kB, et sa prolongation dans le temps, présente une corrélation avec la mortalité ¹⁰⁰.

Dans les modèles murins de CS, des inhibiteurs chimiques de NF-kB, naturel comme le NO ou de synthèse, augmentent la survie ^{101 102}. Par ailleurs les molécules (comme les lactones) qui, expérimentalement, augmentent la survie ou qui protègent du sepsis, exercent leur action en inhibant la voie NF-kB ¹⁰³ et c'est le cas pour la rhPCa, seule molécule pharmacologique validée dans le CS chez l'homme ¹⁰⁴. Un autre exemple est IL-10 qui exerce ces propriétés anti-inflammatoires par inhibition de NF-kB ^{105 106}. Expérimentalement, lorsque qu'on induit une « tolérance » au sepsis sur des cellules ou des souris, cela passe par une répression de NF-kB ¹⁰⁷. Le mécanisme connu est une augmentation d'activité de IκB ¹⁰⁸, de p50 et p52 ¹⁰⁹ avec le switch de la forme hétérodimère p50/p65 en forme homodimère ¹⁰⁹.

Quelle est l'importance de l'activation de la voie de signalisation NF-kB dans le CS ? Une possibilité est que NF-kB est la voie de signalisation de la plupart des cytokines/marqueurs pro-inflammatoires. Or l'activation de l'inflammation est une des caractéristiques de la phase précoce du CS ¹⁰⁴. Les études sur des souris déficientes pour NF-kB objectivent qu'elles deviennent résistantes au choc endotoxinique ¹¹⁰.

Bloquer ou freiner la voie NF-kB permet de corriger les perturbations majeures du CS que sont les atteintes cardio-vasculaires, l'augmentation de perméabilité membranaire, l'activation et l'infiltration tissulaire des neutrophiles, l'hyper-coagulation et l'évolution vers la défaillance multiviscérale ^{111 112}.

5. Mort cellulaire

5.1. Introduction :

La mort cellulaire est un phénomène naturel qui survient de différentes façons : par mort cellulaire programmée (apoptose, autophagie) ou par accident (nécrose ou aussi appelée oncosis). Une revue récente pluridisciplinaire vient d'en préciser les termes ¹¹³. Le mode de mort le plus étudié est l'apoptose. Ce mot vient du grec qui signifie « chute des feuilles d'un arbre en automne ». Ce terme a été introduit la première fois en Médecine par JFR Kerr en 1972 ¹¹⁴ pour décrire des condensations de chromatines nucléaires ou « corps apoptotiques » qui sont une des caractéristiques histologiques de l'apoptose. Ce phénomène est physiologique dans la biologie du développement des mammifères et des plantes et il participe au maintien de l'homéostasie cellulaire (balance entre la prolifération et la différenciation). Si la mitose existait sans mort cellulaire, un homme de 80 ans aurait 2 tonnes de tissus lymphoïdes et 16 km de long d'intestin ! ¹¹⁵.

L'apoptose intervient aussi dans différentes pathologies soit par excès comme lors de maladies neuro-dégénératives (maladies de Parkinson, d'Alzheimer et de Charcot), lors de l'exposition au VIH ou par défaut dans certains cancers (en cas de mutation sur p53 ou Bcl-2) ou lors de maladie auto-immune (diabète de type I, leucoencéphalite dégénérative) ¹¹⁶. De plus certains toxiques ou agents « stressants » cellulaires peuvent induire l'apoptose : radicaux libres, fragments d'ADN, alcools, radiations ionisantes...

Ce phénomène associe plusieurs modifications physiques et biochimiques qui intéressent la membrane plasmique, le cytoplasme et le noyau. Brièvement, après un stimulus, qui peut être extrinsèque ou intrinsèque, la cellule s'isole (perdant le contact avec ces cellules voisines) et se rétracte. Dans le cytoplasme, le réticulum endoplasmique se dilate et forme des vésicules et vacuoles. Le noyau se transforme par condensation de la chromatine en petites masses puis se fragmente en petits brins de 180pb par les endonucléases pour former la classique « échelle d'ADN » en électrophorèse sur gel d'agarose. La cellule se désintègre alors en une multitude de petits « paquets cellulaires » encapsulés ou corps apoptotiques. Ces corps apoptotiques sont alors phagocytés par les cellules voisines sans induire de réaction inflammatoire, à la différence de la nécrose, caractéristique importante. Ce phénomène est 20 fois plus rapide qu'une mitose. La Figure 9 représente un schéma simplifié de ce phénomène.

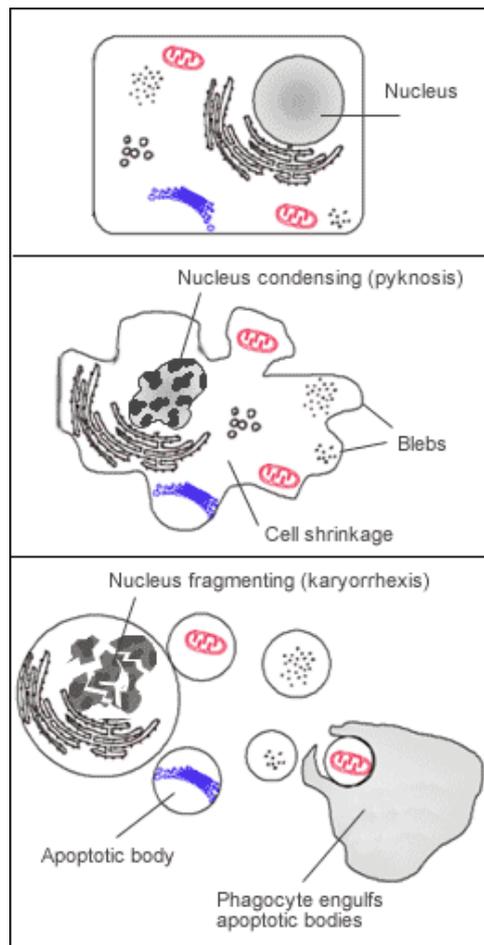


Figure 9 : La partie supérieure représente une cellule normale. La partie moyenne représente la cellule en début d'apoptose avec une condensation de la chromatine, un rétrécissement du corps cellulaire et la formation de vésicules périphériques. La partie inférieure représente la cellule en fait d'apoptose avec la fragmentation de son noyau, la formation de corps apoptotiques contenant des débris cellulaires et la phagocytose de ces corps par les cellules phagocytaires (comme par exemple des macrophages). (Source : Wikipedia).

La connaissance des mécanismes de régulation doit beaucoup aux études sur un nématode hermaphrodite, *Cænorhabditis Elegans*, dont le séquençage du génome vient d'être récemment fini (1 090 cellules somatiques dont 131 en apoptose lors de son développement). Les études génétiques ont montré que la mort cellulaire programmée est sous la dépendance de seulement deux loci (*ced-3* et *ced-4*, *ced* pour *Cænorhabditis Elegans death*) avec un troisième (*ced-9*) qui l'inhibe ¹¹⁷. Une très grande partie des gènes impliqués chez ce nématode sont conservés jusqu'à l'Homme. Une revue récente rapporte les correspondances entre les gènes du nématode et ceux humains ¹¹⁸.

Classiquement le phénomène d'apoptose se déroule en trois phases : l'induction, l'activation et l'exécution ¹¹⁹.

5.2. Phases d'induction et d'activation :

Il existe deux voies classiques d'induction : la voie extrinsèque activée par des stimuli extérieurs à la cellule faisant intervenir des récepteurs membranaires et la voie intrinsèque, activée par des signaux de stress intracellulaires dont la mitochondrie est le chef d'orchestre. Cependant il existe des interactions entre ces deux voies.

5.2.1. Voie extrinsèque :

Elle est activée par des « signaux de mort » comme des fragments de bactéries (LPS, acide lipotéchoïque), des cytokines, du NO...qui activent des récepteurs membranaires. Ces récepteurs sont typiquement ceux de la super famille du TNF : Fas (ou CD95 ou Apo-1), TNFR-I, TNFR-II et TRAIL. Ceux ci comportent deux parties : une extérieure à la membrane pour fixer le ligand circulatoire et l'autre intracellulaire (ou Death Domain) induisant les voies d'activation intracellulaires (cf infra). Les récepteurs sont des protéines transmembranaires de type I avec un domaine extracellulaire possédant une à six régions riches en cystéine permettant la liaison à leur ligand. La partie intracellulaire comporte une région conservée au cours de l'évolution de 80 acides aminés (Death Domain) qui s'associe à un complexe intracellulaire comprenant soit FADD (Fas-Associated Death Domain protein) qui forme avec la pro-caspase-8, le DISC (Death_Induced Signaling Complex), soit TRADD (TNFR-Associated Death Domain). Les ligands de la famille du TNF comprennent une quinzaine de membres (TNF- α , FasL, TRAIL, lymphotoxine, CD30L...). Ces ligands sont principalement des protéines transmembranaires de type II (extrémité C-terminale extracellulaire) et certains existent sous formes circulantes (TNF- α , FasL).

Un exemple de récepteur au TNF est reporté sur la Figure 10.

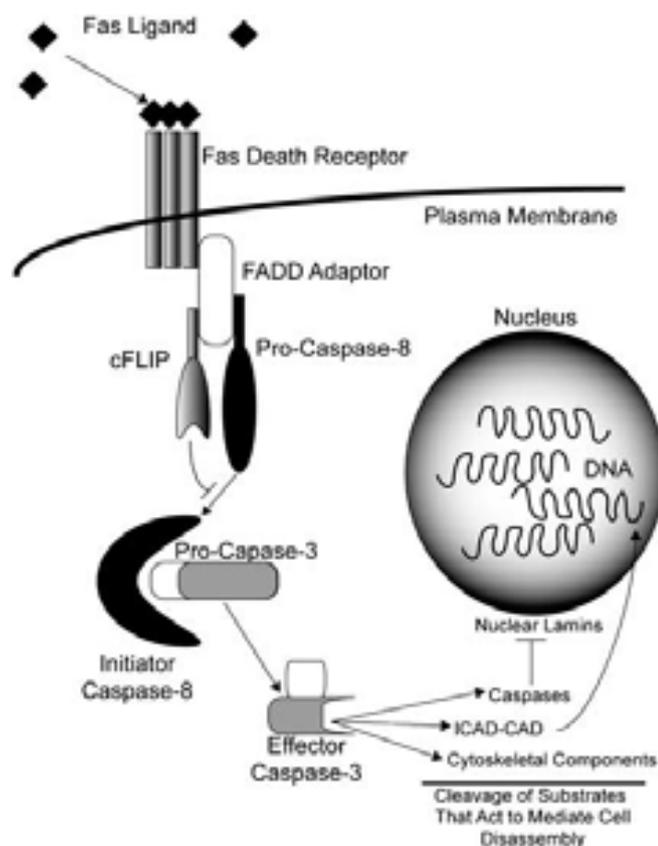


Figure10 : Schéma d'activation de la voie extrinsèque à partir du récepteur Fas. FADD : Fas-associated death domain ; cFLIP : cellular FLICE-like inhibitory protein ; (I)CAD: (inhibitor) caspase-activated DNase. D'après ¹²⁰ ..

Afin d'apprécier leur rôle fonctionnel pour un organisme, des études chez des souris knockout (KO) ont été réalisées. Ainsi les souris déficientes pour Fas sont viables à la naissance mais rapidement développent un syndrome lympho-prolifératif rapidement mortel ¹²¹. Par ailleurs ces souris sont sensibles aux infections à *Listeria monocytogenes* ¹²². Concernant TNF-RI, les souris KO sont viables mais certains organes lymphoïdes sont manquants : ganglions, plaques de Peyer intestinales. Ainsi ces souris sont particulièrement sensibles aux infections intracellulaires et en cas de péritonite. Cependant elles sont insensibles au choc endotoxinique par LPS ¹²². Les souris TNF-RII ^{-/-} ne présentent pas d'atteinte du système immunitaire ¹²². Les souris TNF- α ^{-/-} présentent les mêmes caractéristiques que lors de déficit du TNFR-I ¹²². Les souris TRAIL ^{-/-} sont viables mais présentent des défenses anti-tumorales réduites. Concernant les infections, ces souris ne présentent pas de déficit immunitaire et donc sans altération de la réponse à l'infection ¹²².

5.2.2. Voie intrinsèque :

La voie intrinsèque ou voie mitochondriale est activée par un stress cellulaire comme le stress oxydatif ou par des médicaments cytotoxiques (bléomycine, sels de platines, taxanes...). Le signal active des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 induisant au niveau de la membrane externe de la mitochondrie une perte de potentiel membranaire qui permet une ouverture des pores de transition de perméabilité (pore PT). Ces pores sont des canaux transmembranaires qui ont des caractéristiques différentes selon le versant membranaire : canal de type VDAC sur la membrane externe et de type ANT sur le versant interne. La perméabilisation de la membrane externe mitochondriale, sous contrôle de Bax et Bak. Les deux protéines changent alors de conformation en devenant des multimères homo-oligomérisés qui s'insèrent dans toute la membrane externe, formant une protéine géante qui sert de pore perméable ¹²³. Ce pore entraîne alors la libération de substances physiologiquement localisées dans l'espace inter-membranaire comme le cytochrome C (composant de la chaîne respiratoire), l'Apaf-1, la procaspase 9, l'AIF, Smac et l'endonucléase G pour ne citer que les principaux ¹²⁴.

Une fois activées dans le cytosol les trois premières molécules (cytochrome C, Apaf-1 et pro-caspase-9) forment l'apoptosome qui va cliver et activer la caspase-9 puis les caspase-3 et -7 conduisant à la mort cellulaire.

Un schéma résumant cette voie est reporté sur la Figure 11.

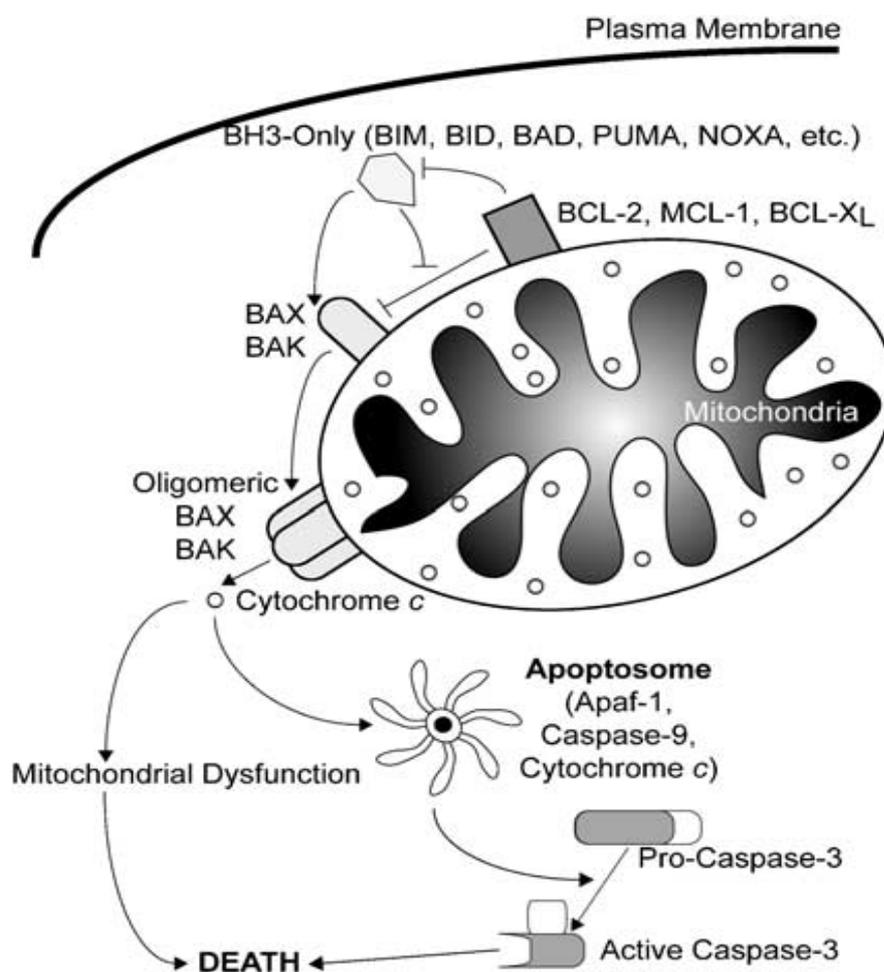


Figure 11 : Schéma d'activation de la voie intrinsèque. *Apaf-1* : apoptosis protease-activating factor-1. D'après ¹²⁰.

Bcl-2, le membre prototype de la grande famille Bcl-2 a été découvert comme étant le résultat d'une translocation chromosomique [t(14;18)(q32;q31)] lors de lymphome folliculaire B chez l'Homme, entraînant sa surexpression ¹²⁵. Depuis cette famille ne cesse de s'agrandir pour avoir une quinzaine de membres classés en anti-apoptotique ou pro-apoptotique. Tous ses membres contiennent de 1 à 4 BH domaines (BH1 à BH4).

Une liste de ces différents membres est reportée sur le Tableau 4.

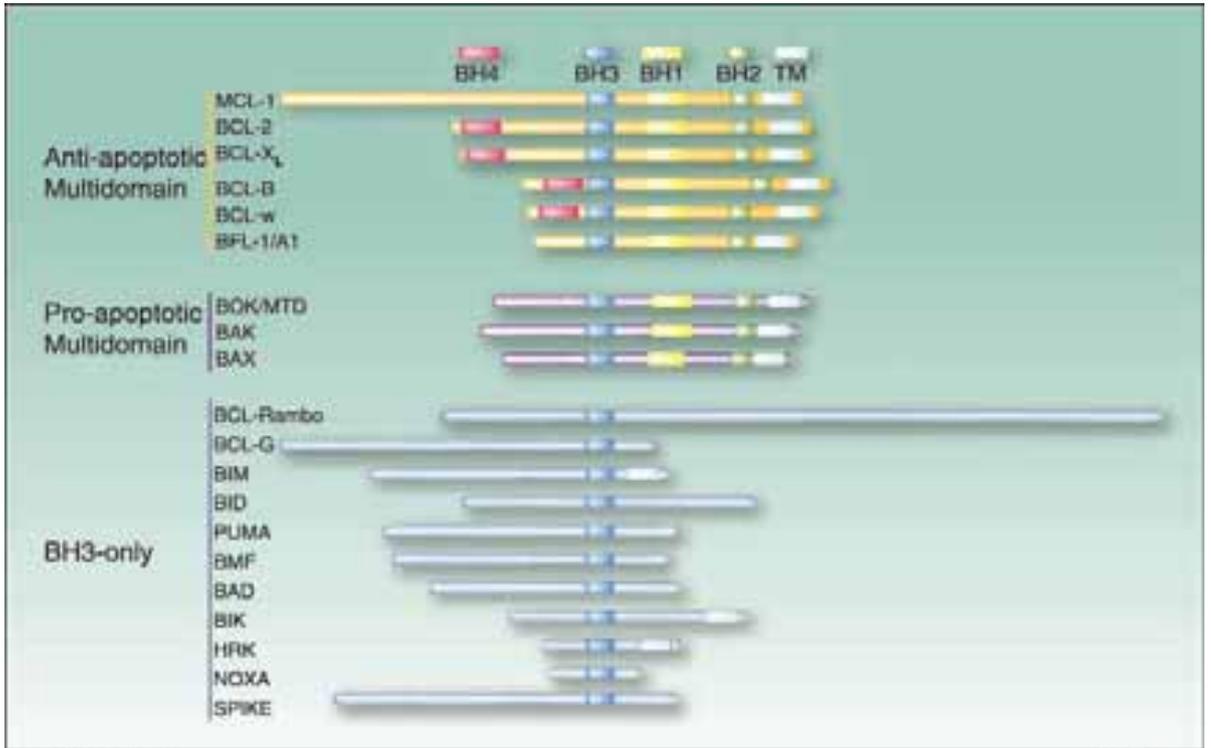


Tableau 4 : Les différents membres de la super-famille *Bcl-2*. Structure, présence des domaines BH et activité pro- ou anti-apoptotique. D'après ¹²⁶.

Les protéines anti-apoptotiques (telles que Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Mcl-1) sont localisées, sous forme d'hétérodimères, dans la membrane de la mitochondrie empêchant la perméabilisation membranaire mitochondriale (MMP) et bloquant la sortie du cytochrome C ¹²⁶. Par contraste, les membres pro-apoptotiques sont soit cytosolique comme Bax (mais migre vers la membrane externe de la mitochondrie lors de son activation) ou fixé à la membrane externe mitochondriale comme Bak. Les membres « BH3-only » sont cytosoliques et exercent leur activité anti-apoptotique de deux façons : soit en inhibant Bcl-2 ou Bcl-xl par Bad ou Mcl-1 par Noxa, soit en activant Bax et Bak ¹²⁷.

Il existe une inter-connexion entre les voies extrinsèque et intrinsèque, représentée par un membre de la BH3-only famille : Bid. En effet ce dernier, stocké dans le cytosol sous forme inactive, est activé par la caspase-8 pour prendre une forme tronquée (tBid) qui va activer Bax/Bak libérant du cytochrome c dans le cytosol ¹²⁸ (cf Figure 11).

De plus, le groupe BH3-only contient un membre (Beclin 1) qui agit non pas comme pro-apoptotique mais activant un autre mécanisme de mort cellulaire qu'est l'autophagie ¹²⁹.

A l'état basal, Beclin 1 est inhibé par son interaction avec Bcl-2 et Bcl-xl. Cette protéine est la preuve d'interaction entre l'apoptose et l'autophagie et que la super-famille Bcl-2 joue un rôle au-delà de l'apoptose ¹³⁰.

5.2.3. Relation structure/activité :

Les membres de la famille Bcl-2 (sauf Bad et Bid) possèdent un domaine transmembranaire leur permettant de s'arrimer aux membranes de la mitochondrie, du réticulum endoplasmique et du noyau, formant alors de véritables canaux ioniques ¹³¹. Plus particulièrement Bcl-xl est capable de former un pore qui en analyse tridimensionnelle ressemble à la toxine diphtérique ¹³².

La fonctionnalité des protéines de cette famille est en grande partie liée à leur capacité de dimérisation pour former des homo ou hétéro-dimères. Ainsi la dimérisation se fait au niveau de BH1 et BH2 pour former des homodimères et par BH3 pour les hétérodimères. La balance survie/mort est sous l'influence de la proportion de dimères formés : ainsi s'il y a plus d'homodimères Bax ou Bak formés par rapport aux homodimères Bcl-2, il y aura mort cellulaire et vice versa ¹³³.

5.2.4. Etudes fonctionnelles par souris KO :

Les souris Bcl-2 -/- sont viables à la naissance mais meurent rapidement en quelques semaines. Elles sont incapables de maintenir l'homéostasie de leur système immunitaire avec une apoptose massive des cellules lymphoïdes du thymus et de la rate ¹³⁴. La délétion Bcl-xl est létale par apoptose diffuse multi-organique, en particulier de toutes les cellules hématopoïétiques ¹³⁵.

Concernant Bax et Bak, leur délétion est viable mais elles présentent des malformations et sont stériles ¹³⁶. Les souris Bim-/- présentent des malformations du système immunitaire avec prolifération de la lignée lymphoïde et des macrophages ¹³⁷.

Concernant les autres membres de la famille Bcl-2, leurs délétions n'induisent pas de malformation ni de modification fonctionnelle importante.

5.3. Phase d'exécution

La phase finale irréversible ou exécutive est sous la dépendance de protéines protéolytiques spécifiques appelées caspases pour « cysteinyl aspartate-specific proteinase », qui lorsqu'elles deviennent actives, sont des marqueurs d'apoptose.. Cette famille de protéines est née de la découverte du gène *ced-3* chez *Cænorhabditis Elegans* qui présente une homologie avec l'interleukine-1 β -converting enzyme (ICE ou caspase 1) des mammifères. Cette caspase n'a pas d'action connue dans l'apoptose mais elle est le chef de file d'une dizaine d'autres caspases. Elles sont classiquement divisées en deux groupes : apoptotique (caspase-2, -3, -6, -7, -8, -9 et -10) et pro-inflammatoire (caspase-1, -4, -5 et -14). Le groupe apoptotique peut être sub-divisé en « initiateur » (caspase-8, -9, -10) et « exécuteur » (caspase-3, -6 et -7). Enfin le sous-groupe « initiateur » peut lui-même être subdivisé en extrinsèque (caspase-8, et -10) et intrinsèque (caspase-9) ¹³⁸.

Elles ont en commun être secrétées sous forme de pro-enzyme ou zymogène (30 à 50kD) inactive, formées de trois parties : un domaine NH2 terminal, une grande sous-unité (20kD) et une petite sous unité de 10kD. La grande et la petite sous-unité forme un hétéro-dimère qui associé à un autre hétéro-dimère forment une caspase. Il existe deux sites catalytiques qui fonctionnent indépendamment. Pour être actives, les caspases doivent être clivées au niveau du domaine NH2 terminal ou appelé pro-domaine (de taille variable), séparant la grande de la petite sous-unité ¹³⁸. Concernant les caspases « initiatrices » elles sont dimérisées au niveau d'une plateforme d'activation qui concentre plusieurs pro-caspases (recrutées après un signal apoptotique), comme le DISC pour la caspase-8 et -10, par leur pro-domaine qui contient des DED permettant leur liaison aux molécules adaptatrices FADD ou TRADD ^{139, 140}. Pour les caspases « exécutrices », elles sont activées par les caspases « effectrices » entraînant leurs dimérisation, L'activité protéolytique des caspases est spécifique par reconnaissance de résidus Asp en position P1 ¹⁴¹. Une fois activées, les caspases vont pouvoir s'auto-activer ou activer d'autres caspases conduisant à une cascade d'activation, amplifiant alors le signal de mort.

Du fait du caractère irréversible de la protéolyse, les caspases sont finement régulées par trois mécanismes : inhibition par des inhibiteurs naturels (présents chez certains virus) ou de synthèse (spécifique ou global), prévention de l'activation (FLIP empêche la pro-caspase 8 de se fixer au DISC) et dégradation par le protéasome ¹³⁸.

Après activation les caspases vont déstructurer la cellule en détruisant la lamina nucléaire (membrane liée à la membrane nucléaire qui lie la chromatine) entraînant une condensation de la chromatine. Elles clivent aussi des protéines du cytosquelette (gelsoline), des protéines de réparation et de réplication nucléaires (replication factor C) ¹⁴².

5.4. Etudes fonctionnelles :

Les souris caspase8^{-/-} ne sont pas viables, mourant in utero de malformations cardiaques et présentent une myélopoïèse bloquée ¹⁴³.

Les caspases les plus importantes sur le plan fonctionnel sont la 3 et la 9. En effet les souris csapases-3^{-/-} et -9^{-/-} meurent rapidement après la naissance (une à trois semaines) par de profondes et multiples malformations en particulier cérébrales. Au niveau du tissu immunitaire, les neutrophiles et les lymphocytes T n'entrent plus en apoptose ¹⁴⁴.

Pour les autres caspases, leur délétion n'entraîne pas de conséquence majeure sur la vie dans les modèles murins.

5.5. Apoptose caspase indépendante :

Par des études utilisant des peptides inhibiteurs non-sélectifs des caspases (zVAD-fmk), il a été montré que, malgré l'inhibition de toutes les caspases, Bax pouvait encore induire la mort cellulaire. Mais cette mort cellulaire n'avait pas tout à fait les mêmes caractéristiques histologiques (en particulier par l'absence de dégradation de l'ADN), faisant évoquer plutôt un mécanisme proche de l'autophagie ¹²⁶.

6. Implication du système immunitaire à la phase aiguë du choc septique

6.1. Introduction :

Le système immunitaire a notamment pour fonction ultime la défense de l'organisme contre l'intrusion et /ou l'invasion par d'autres organismes. Dans ce travail, ces « autres organismes » sont des agents infectieux (bactérie, virus, champignons, parasites), en y associant les cellules tumorales, tous étant considérés comme pathogènes. Classiquement l'on distingue deux types d'immunité : innée ou acquise.

6.2. Immunité innée ou « naturelle » :

C'est elle qui est la première ligne de défense et qui s'est construite depuis des millions d'années à travers l'évolution des espèces. L'objectif principal de cette phase est de reconnaître l'envahisseur rapidement (quelques secondes à quelques heures) comme « non-soi » et de s'en débarrasser ou de le neutraliser. Ainsi se sont formées au fil du temps des cellules spécialisées de type phagocytaire qui ont à leur surface des molécules capables au premier contact de reconnaître un intrus, d'avoir une adhérence intercellulaire et d'envoyer des signaux de danger.

6.3. Acteurs cellulaires :

Les cellules phagocytaires (polynucléaires neutrophiles, monocytes/macrophages, cellules dendritiques, cellules natural killer) issues de la lignée myéloïde sont une population hétérogène aux fonctions variées capable de se différencier sous l'effet de cytokines. Leur principal mode de fonctionnement est d'absorber puis de digérer le pathogène par libération d'enzymes au sein des lysosomes mais aussi par production de radicaux libres.

La détection des micro-organismes envahisseurs est sous la dépendance de récepteurs de reconnaissance spécifiques ou PRR (Pattern Recognition Receptor) dont les plus connus sont les récepteurs Toll. Initialement découvert chez la *Drosophile* comme facteur polarisant durant l'embryogénèse¹⁴⁵, les récepteurs Toll participent aussi dans la défense antibactérienne et antifongique¹⁴⁶.

Les *Toll-like receptors* furent identifiés aussi chez l'Homme comme des protéines transmembranaires de type I avec un domaine externe riche en leucine et un domaine intracellulaire homologue avec le récepteur pour l'IL-1 (IL-1R). Leur fonction est de reconnaître rapidement le type d'intrus par un système de reconnaissance basé sur des molécules qui sont restées conservées au cours de l'évolution. Il existe 12 récepteurs connus à ce jour.

Cette reconnaissance est liée aux microbes qui possèdent des structures essentielles à leurs survies (composants de paroi/membranaires, acide nucléique) qui sont conservées ou non-évolutives au cours de l'évolution comme le lipopolysaccharide, le peptidoglycane, l'acide lipotéchoïque, les lipopeptides, les flagellines ou l'ARN viral. Ces structures sont appelées PAMP pour Pathogen-Associated Molecular Patterns.

Dans notre travail, ceux qui nous concernent sont les TLR4 pour les bactéries gram négatif et les TLR2 pour les bactéries gram positif (Figure 12).

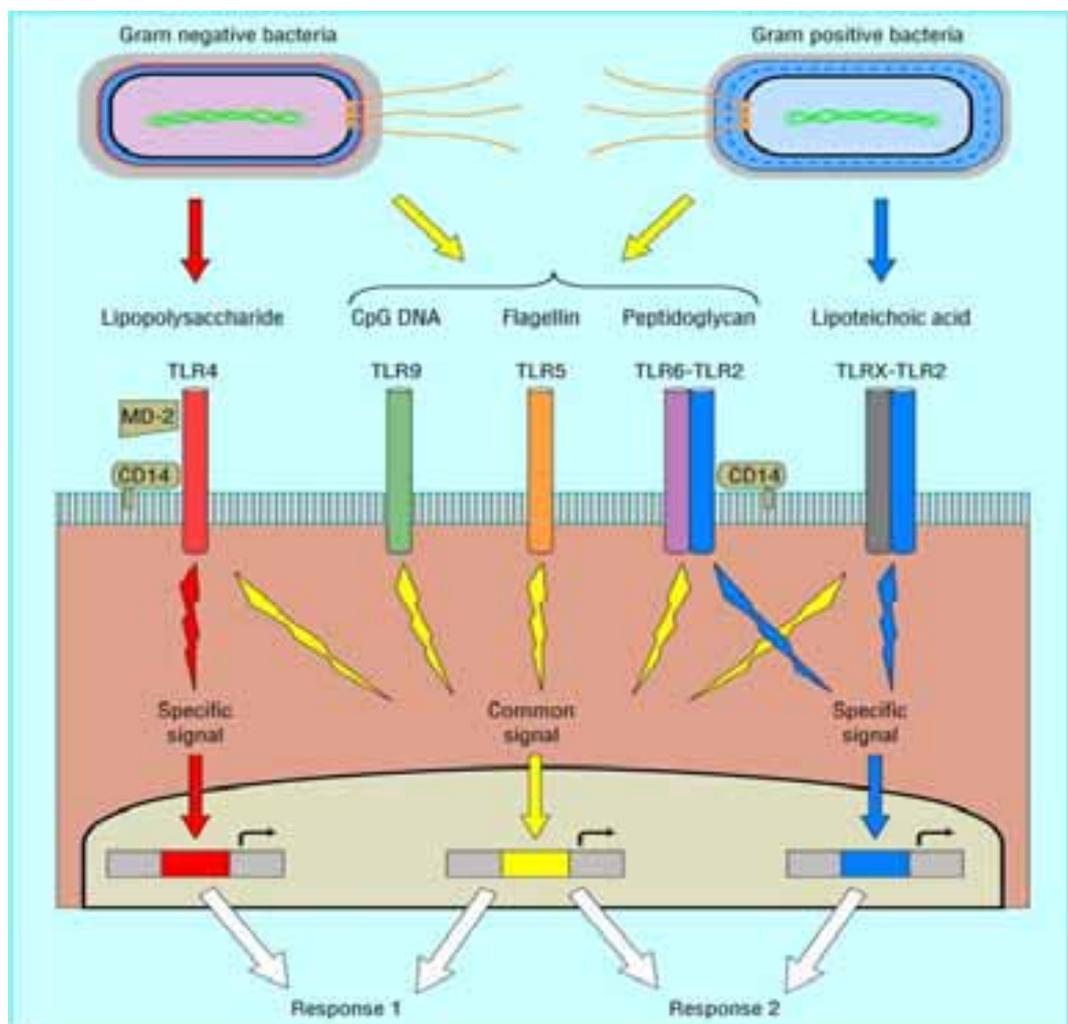


Figure 12 : Schéma d'interaction entre les DAMPs et les récepteurs Toll. DAMPs : Danger Associated Molecular Pattern ; TLR : Toll like receptor.. D'après ¹⁴⁷.

6.4. Acteurs humoraux :

L'intrusion de pathogène dans l'organisme déclenche rapidement une activation du complément (voie des lectines, voie alterne), une activation de la coagulation (cf infra) et une multitude de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires initialement puis anti-inflammatoires, ainsi que de facteurs chémo-attractants. La résultante est l'induction d'une phase inflammatoire avec synthèse hépatique des protéines de la phase aiguë (C reactive protein) et des modifications circulatoires au niveau du tissu infecté. L'effet immédiat au niveau vasculaire est une vasodilatation, un recrutement des cellules phagocytaires avec adhérence aux parois vasculaires et diapédèse. Cette dernière permet aux cellules phagocytaires de se rendre sur le théâtre infectieux pour réaliser leurs missions.

6.5. Immunité acquise ou adaptative :

Cette immunité fait suite à la précédente dans l'évolution mais joue aussi de concert avec elle dans la lutte contre les pathogènes. Sa caractéristique principale est sa haute spécificité et sa faculté de mémoriser l'information.

6.6. Acteurs cellulaires :

Les cellules effectrices de l'immunité acquise sont les lymphocytes T et B qui ont une demi-vie normale de 28j¹⁴⁸.

6.7. Lymphocytes T :

Les lymphocytes T sont les plus sophistiqués des cellules immunitaires avec pour fonction un rôle d'orchestration de la réponse immunitaire et une attaque « personnalisée » contre les microbes en particulier intracellulaires (virus). On peut distinguer les lymphocytes T selon leurs récepteurs ($\alpha\beta$) ou ($\gamma\delta$), selon leurs molécules de surfaces CD4+ ou CD8+ et leurs sous-populations ou selon leurs fonctions (régulateurs, tueurs, sécréteurs de cytokines).

Au cours de leur maturation les lymphocytes T acquièrent un récepteur de surface ou T cell receptor (TCR) qui leur permettra de reconnaître un motif moléculaire antigénique ou épitope spécifique. Ainsi à un lymphocyte T donné correspond un TCR donné pour un épitope donné. Mais pour couvrir l'ensemble des molécules possiblement reconnaissables, les lymphocytes ont acquis la possibilité d'un réarrangement génique qui est fait de séquences variables et fixes ¹⁴⁹.

Les lymphocytes T CD4+ sont activés par les cellules de présentation de l'antigène ou CPA (macrophage, cellule dendritique). Après ce stimulus, ces lymphocytes vont induire des différenciations chez les lymphocytes CD8+, les cellules NK et les macrophages en induisant une production de cytokines ou réponse de type Th1 pro-inflammatoire (TNF- α , IFN- γ , IL-2) et vont aussi activer les lymphocytes B pour la coopération intercellulaire par un autre profil de réponse de type Th2 anti-inflammatoire (IL-4, IL-5, IL-10) (cf infra).

Les lymphocytes T CD8+, une fois activés, deviennent cytotoxiques entraînant une lyse de la cellule porteuse de l'antigène reconnu par libération de cytotoxines (perforines, granzymes). Une fraction des lymphocytes T activés va devenir des lymphocytes T mémoire.

6.8. Lymphocytes B :

Leur rôle bien connu est la production d'anticorps mais aussi la collaboration avec les lymphocytes T CD4+. Comme pour les lymphocytes T, les lymphocytes B présentent des récepteurs membranaires de surface, BCR (B cell receptor). Ce récepteur leur permet de reconnaître un épitope qui peut être de nature autre que protéique : polysaccharidique, lipo-polysaccharidique ou lipo-peptidique. Les lymphocytes B ont aussi la possibilité de réaliser un arrangement génique leur permettant d'obtenir des centaines de milliers de BCR différents afin de produire autant d'immunoglobines spécifiques ¹⁵⁰. Ce processus prend entre 5 et 10 jours.

6.9. Coopération lymphocytaire T et B :

Elle est essentielle au bon fonctionnement de l'immunité spécifique. Elle est brièvement rappelée dans la Figure 13.

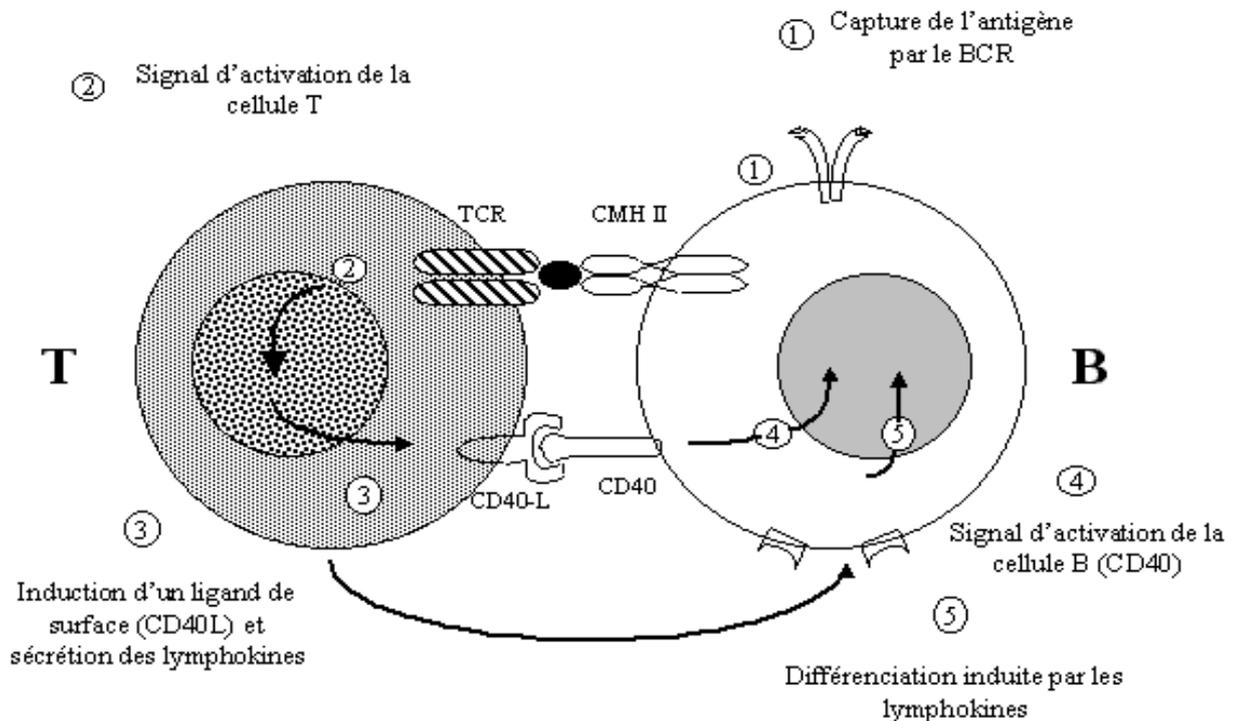


Figure 13 : Coopération lymphocytaire B et T. TCR : T cell receptor ; BCR : B cell receptor ; CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

6.10. Intrication entre l'immunité innée et l'immunité adaptative :

Comme nous venons de le voir ci-dessus, les cellules phagocytaires de l'immunité innée telles que les macrophages et les cellules dendritiques sont indispensables à la présentation des antigènes/maturation aux lymphocytes B et T. Plus spécialement, les cellules dendritiques jouent un rôle prépondérant dans l'activation de l'immunité innée. Dans un premier temps elles sont recrutées sur le site inflammatoire, dès les premières heures de l'agression, par des cytokines inflammatoires produites par les macrophages, participant alors à la phagocytose. Puis elles vont migrer vers les organes lymphoïdes secondaires en devenant mature par division cellulaire et en exprimant des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH II). Elles vont alors pouvoir exprimer des PAMP et migrer vers les organes lymphoïdes infectés et activer les lymphocytes T.

En complément, les anticorps sécrétés par les lymphocytes B vont fixer les antigènes en les opsonisant (avec des molécules du complément, selon le type d'anticorps) qui va permettre une meilleure phagocytose par les macrophages.

7. Apoptose dans le système immunitaire lors du sepsis

7.1. Apoptose dans le développement du système immunitaire :

Le programme génétique de l'apoptose est essentiel pour le développement et l'homéostasie du système immunitaire. Le développement embryonnaire de la lymphopoïèse est sous le contrôle de facteurs de croissances. L'apoptose s'assure alors que les récepteurs antigéniques exprimés par les lymphocytes soient fonctionnels et élimine alors les lymphocytes non-fonctionnels ou dangereux pour le soi. Durant le développement, ceci se fait par étapes avec des points de contrôle qui sont sous la dépendance des membres de la famille Bcl-2.. Si des aberrations surviennent dans ces contrôles de mort cellulaire, elles peuvent être à l'origine de maladies comme des déficits immunitaires, des maladies auto-immunes et des cancers ¹²⁰.

La survie et la maturation des progéniteurs T et B sont sous la dépendance de nombreuses cytokines (IL-2,-4,-7,-9,-15 et -21) ¹⁵¹. IL-7 semble la plus importante car elle active plusieurs voies de signalisation telles que Janus kinases (JAK-1 et -3), phosphoinoside-3 kinase, ras et MAP-kinases. Le premier exemple découvert d'apoptose lors du développement immunitaire et la privation de facteur de croissance tel que IL-7 dans le milieu et aussitôt un membre pro-apoptotique (BIM) s'active ¹⁵² pour entraîner la mort cellulaire. Mais expérimentalement, lors de privation d'IL-7, une sur-expression de Bcl-2 permet à la lymphopoïèse de continuer ¹⁵³. Une étape importante de la maturation des lymphocytes T est la formation du TCR. Le TCR est capable de devenir fonctionnel en quelques heures (12 h) après stimulation et s'il y a erreur / retard sur son apparition, les cellules sont non-viables ¹⁵⁴, mais par un mécanisme encore inconnu puisque c'est le membre anti-apoptotique A1 qui est activé sans connaître d'implication de membre pro-apoptotique ¹⁵⁴. Quasiment tous les membres de la famille Bcl-2 interviennent à un moment donné dans la lymphopoïèse [revue in ¹²⁰].

7.2. Système immunitaire dans le choc septique :

C'est à partir de 1994 que sont publiées les premières observations d'apoptose de tissus immuns (thymus) dans un modèle expérimental de péritonite chez la souris¹⁵⁵. En 1999 Hotchkiss et col¹⁵⁶ décrit lors d'autopsie de patients décédés de CS, une destruction des organes lymphoïdes (thymus, ganglions, intestins, rate) par apoptose et dans une moindre mesure le foie. L'apoptose cellulaire était mesurée par 3 méthodes : microscopie optique sur lame (coloration HE), microscopie avec immunofluorescence par méthode TUNEL et électrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN.

Au niveau circulatoire, le sepsis induit précocement (dans les 4 h) une lymphopénie touchant surtout la lignée T, par un mécanisme apoptotique, et le degré de lymphopénie est significativement associé à la mortalité¹⁵⁷.

Depuis lors il est clairement admis que le CS chez l'Homme induit une activation précoce (< 12 h) du phénomène apoptotique dans les tissus et cellules immuns^{12 34}.

7.3. Apoptose lymphocytaire :

Pour asseoir cette observation, des études expérimentales de CS chez la souris ont montré qu'en bloquant la voie des caspases par des inhibiteurs non-spécifiques (ZVAD-fmk), on améliorait la survie de 40 – 45 % en prévenant l'apoptose lymphocytaire¹⁵⁸. Mais ce peptide de synthèse n'est pas utilisable chez l'homme devant son manque de spécificité et ses trop grands effets toxiques¹⁵⁹. Une autre approche a été d'utiliser des siRNA pour Fas et IL-8 qui, toujours expérimentalement, réduisent la mortalité¹⁶⁰. Mais il existe deux difficultés majeures pour leur utilisation chez l'homme : d'une part nous ne connaissons pas les effets systémiques du blocage de la voie Fas (voie ubiquitaire) et d'autre part, dans les modèles expérimentaux, les siRNA étaient injectés en même temps que la réalisation de la péritonite/injection de LPS (ou dans les 30 min suivantes), ce qui est irréaliste en pratique.

Pour compléter le thème, en plus d'une diminution du nombre des lymphocytes T, ceux restant ont une fonctionnalité réduite par diminution d'expression de récepteurs d'activation comme CD3 et CD28¹⁶¹. De plus les cellules en apoptose produisent des cytokines anti-inflammatoires, participant à cet état d'anergie immunitaire^{162, 163}.

Enfin, il a été découvert récemment que les lymphocytes restant sur-expriment la fonction régulatrice Treg, fonction connue pour participer à la régulation (activation) de l'apoptose des monocytes et neutrophiles ¹⁶⁴.

La résultante de cette lymphopénie/anergie est qu'elle est clairement corrélée avec la mortalité et la survenue du syndrome de défaillance multi-viscérale ^{165 166 167}

7.4. Apoptose des monocytes/macrophages :

Le CS induit un excès d'apoptose dans les monocytes circulants et en les « désactivant », créant ainsi une véritable anergie cellulaire ¹⁶⁸. Les macrophages aussi présentent un excès d'apoptose en particulier ceux qui phagocytent les PNN apoptotiques, entraînant un changement de synthèse cytokinique par le macrophage : switch d'un profil de sécrétion de type TH-1 vers un profil TH-2 ¹⁶⁹.

7.5. Apoptose des cellules dendritiques :

Les cellules dendritiques, originaires du système réticulohistiocytaire, font partie des cellules présentatrices d'antigènes. Elles possèdent deux propriétés essentielles : capture de l'antigène et présentation aux lymphocytes T naïfs et intégration des signaux de la périphérie permettant l'orientation des lymphocytes T vers un état de différenciation Th1, Th2 ou Treg. Les cellules dendritiques exercent aussi un rôle important dans la dysfonction immunitaire observée lors du CS ¹⁷⁰. Elles aussi subissent une apoptose conduisant à leur réduction numérique au niveau de la rate, après avoir activé les lymphocytes CD4+ ¹⁷¹. Les mécanismes d'action sont encore inconnus.

7.6. Apoptose des polynucléaires neutrophiles :

Le rôle premier des polynucléaires neutrophiles (PNN) est l'élimination des pathogènes et la machinerie apoptotique ne sert qu'à assurer le renouvellement cellulaire et lors de la phase de résolution de l'inflammation ¹⁷². Ceci est particulièrement important en cas de pneumopathie où la séquestration prolongée des PNN est responsable de lésions pulmonaires irréversibles ¹⁷³. Cette augmentation de demi-vie des PNN dans le poumon est due à une diminution d'activation de l'apoptose ¹⁷⁴.

Cette diminution de l'apoptose est en partie expliquée par une induction de protéines anti-apoptotique comme IAP¹⁷⁵. Et dans des modèles murin de sepsis, l'augmentation de l'apoptose des PNN permet de réduire les dommages parenchymateux pulmonaires et la mortalité (de 20 % environ)^{176 177}.

7.7. Mutations des récepteurs Toll :

Depuis la découverte par Poltorak et col¹⁷⁸ que la résistance naturelle au LPS chez les souris C3H/HeJ était liée à une mutation du TLR4, des études ont montré que chez l'homme il existait aussi des mutations (hétéro- ou homozygote) de TLR4. Deux types de mutation sont actuellement connus : une substitution acide aspartique/glycine en position 299 (Asp299Gly) et une substitution thréonine/isoleucine en position 399 (Thr399Ile)¹⁷⁹. Dans les modèles animaux de CS (péritonite par ligature-ponction caecale) les déficiences de TLR4 sont associées à une augmentation de la survie¹⁸⁰. Mais chez l'homme, les mutations de TLR4 ne sont associées qu'à une plus grande prévalence d'infection à Gram négatif sans incidence sur la mortalité¹⁸¹. Concernant TLR2, les souris TLR2- sont plus sensibles aux infections à Gram positif¹⁸². Il existe deux types de mutations décrites pour ce TLR (R753E et R677W) responsables d'une augmentation de sensibilité aux infections à *Staphylococcus aureus* chez l'homme¹⁸³.

Même si l'incidence de ces mutations hétérozygotes est estimée à 9,4 % dans une population européenne¹⁸⁴, leurs rôles réels dans le pronostic du CS chez l'homme restent incertains, en partie du fait que dans les infections poly-microbiennes, plusieurs TLR sont engagés limitant donc les conséquences d'une mutation¹⁸⁵.

DEUXIEME PARTIE:

**Influence de la protéine C activée
sur les réactions inflammatoires
et immunitaires induites
par le choc septique**

INTRODUCTION

L'intrication entre l'activation de la coagulation et la réponse inflammatoire liée à l'infection est connue depuis une vingtaine d'années ¹⁸⁶. En particulier les cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α , IL-1 β et IL-6 induisent un état pro-coagulant avec une inhibition de la fibrinolyse physiologique secondaire. De plus la thrombine, facteur central de la coagulation, est capable d'induire plusieurs voies de signalisations inflammatoires ^{187 188}. La protéine C endogène exerce une action anticoagulante et pro-fibrinolytique mais elle peut aussi moduler l'inflammation dans des modèles expérimentaux de sepsis ¹⁸⁹. Dès l'admission en Réanimation de patients à haut risque de décès de CS, des études ont rapporté une déplétion profonde de protéine C, de l'ordre de 60 % ⁶⁹. Une étude expérimentale chez le babouin en CS (injection *d'E Coli*), a montré un effet protecteur de l'administration de protéine C activée ¹⁹⁰.

Quatre ans plus tard en 2001, la publication de l'étude de phase III PROWESS (*PROtein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis*) ³⁰, a permis l'utilisation en routine d'une protéine C activée recombinante humaine (rhPCa) ou encore dénommée drotrécogine alpha activée (DrotAA) (Xigris®) dans le CS chez l'homme. Cette étude multicentrique internationale randomisée en double aveugle, a comparé l'efficacité et la tolérance de la rhPCa en perfusion continue pendant 96 h [24 μ g/kg/h correspondant à un taux circulant moyen de 45ng/mL ⁷⁰] contre placebo chez 1 690 patients en CS depuis moins de 48 h. Le critère principal d'efficacité était la mortalité à 28 jours. Ce traitement par rhPCa a permis une réduction significative de la mortalité de 6,1 % (24,7 % pour le bras rhPCa versus 30,8 % pour le bras contrôle, p=0,005). Cette réduction absolue du risque de décès de 6,1 % se traduit en pratique par une vie sauvée pour 16 patients traités. Concernant les effets indésirables, la rhPCa induit significativement plus de complications hémorragiques nécessitant l'arrêt du traitement : 6,4% dans le groupe rhPCa versus 3,6 % dans le groupe contrôle (p = 0,009). Le nombre d'hémorragie à risque vitale ou nécessitant une transfusion de plus de trois culots globulaires deux jours de suite, était plus élevé dans le groupe rhPCa que dans le groupe contrôle (respectivement 3,5 % versus 2 %, p=0,06).

Cette première étude a été confirmée par l'étude ENHANCE (*ExtENded Evaluation of Recombinant HuMAN ActivatEed Protein C*)¹⁹¹, étude internationale de pratique clinique, ouverte et non contrôlée (2 378 patients inclus) qui a confirmé un taux de mortalité de 25,3 % à 28 jours des patients traités mais avec un taux significativement plus élevé d'effets adverses hémorragiques (6,4 % dans ENHANCE versus 3,5 % dans le bras rhPCa de PROWESS). Par ailleurs cette étude a montré que plus le traitement était appliqué tôt (ie < 24h) meilleure était la survie. Enfin une méta-analyse sur la sécurité d'emploi de la rhPCa (INDEPTH : *INtegrated Database for Evaluation of Severe SePsis and Drotrecogin alpha activated THerapy*) (dhainaut,2008), objectivait un nombre d'effets adverses identiques dans les deux groupes. Il existait cependant un taux de saignement significativement plus élevé dans le groupe traité par rhPCa (NB : cette étude était financée par le groupe pharmaceutique Lilly and C, Indianapolis, USA, propriétaire de Xigris®).

Cependant d'autres études, basées sur les mêmes indications/contre-indications et posologies, n'ont pas montré d'effet sur la mortalité en particulier l'étude RESOLVE (*REsearching severe Sepsis and Organ dysfunction in children: a gLobal perspectiVE*)¹⁹², étude prospective randomisée en double aveugle d'enfants en CS, sans que les auteurs puissent apporter une explication physiopathologique. Une autre étude (EXTEND pour *EXTENded drotrecogin alpha [activated] in patients with prolonged septic shock*)¹⁹³ dont l'objectif était d'explorer l'intérêt potentiel de donner 72 h de plus la rhPCa en cas d'insuffisance circulatoire persistante s'est révélée être négative en terme de bénéfice de survie. Une troisième étude, ADDRESS (*ADministration of DRotrecogin Alpha Activated in Early Stage Study Group*)¹⁹⁴ dont l'objectif était de traiter des patients septiques à faible risque de mortalité (ie avec une seule défaillance viscérale) par la rhPCa, n'objectiva pas de gain de survie mais en revanche une augmentation significative des événements hémorragiques graves.

C'est pourquoi il existe toujours un débat dans la littérature sur le bénéfice (augmentation de la survie de 6,1 %) / par rapport au risque (hémorragique grave autour de 6 %) de la rhPCa dans le CS¹⁹⁵⁻¹⁹⁷. Mais il est important de noter que ces événements hémorragiques graves n'entraînent pas de surmortalité, comme il est rappelé dans une récente étude rétrospective observationnelle (33 749 patients)¹⁹⁸.

Une question, non encore résolue, est quel est (sont) le(s) mécanisme(s) d'action qui conduisent aux résultats observés avec la rhPCa. Et comment s'exerce cette action : est-ce uniquement par son action anticoagulante ou plutôt par ses propriétés anti-inflammatoires ?

Parallèlement au déploiement de la rhPCa dans le monde (autorisation de mise sur le marché en France en 2002 et disponible dans notre Hôpital en 2003), d'autres molécules exerçant une action anticoagulante ont fait l'objet d'essais randomisés en double aveugle dans le CS chez l'homme. Mais aucune n'a eu d'effet sur la mortalité : que ce soit l'antithrombine III (Kyber-sept-trial)^{199, 86} ou un inhibiteur recombinant du facteur tissulaire (OPTIMIST trial)²⁰⁰. Par ailleurs il est intéressant de remarquer que l'héparine utilisée, seule à des doses curatives, n'a jamais fait, à ce jour, l'objet d'études prospectives randomisées efficacité-tolérance chez l'homme malgré des arguments expérimentaux animaux [revue in²⁰¹] et une étude rétrospective humaine objectivant une réduction significative de mortalité à 28 j de 4,1%²⁰².

C'est pourquoi des recherches s'effectuent sur des molécules ayant les mêmes propriétés anti-inflammatoires que la PCa mais sans activité anticoagulante. L'équipe de Griffin a réussi à construire deux vecteurs exprimant une protéine PCa mutée qui ne peut plus cliver le facteur V au niveau de l'Arg506, rendant alors impossible l'activation de ce facteur²⁰³. Expérimentalement sur culture cellulaire *in vitro*, ces deux PCa mutées (dénommées 3K3A-APC et 229/230-APC) ont une activité anticoagulante réduite (par rapport à celle de la PCa naturelle) tout en préservant une action anti-apoptotique comparable²⁰⁴. A notre connaissance, il n'existe pas d'étude humaine publiée à ce jour, ou en cours, avec ces molécules.

1. Objectifs de notre travail

Le point de départ de notre travail est l'observation que le CS induit une lymphomonopénie précoce (< 12h) et profonde (diminution > 40 %), et qui est plus importante chez les patients qui vont décéder¹⁵⁷. Cette diminution des lymphomonocytes circulants s'accompagne aussi, dans des modèles animaux de CS, d'une atteinte des organes lymphoïdes solides (rate, ganglions) avec une diminution du nombre de leurs cellules immunes liée à un excès d'apoptose²⁰. Ces observations expérimentales ont été confirmées chez l'Homme par Hotchkiss et col en 1999¹⁵⁶ sur des autopsies de 20 patients décédés de CS comparativement à des patients décédés d'affection cardiaque : il existait une élévation significativement plus importante du niveau d'apoptose des cellules lymphoïdes des ganglions, de la rate et des ganglions des plaques de Peyer du tissu intestinal. Depuis ces travaux précurseurs, le phénomène biologique de mort cellulaire est devenu un point cardinal dans la recherche sur le CS.

Dans les modèles expérimentaux de souris en CS sur péritonite, la même équipe de Hotchkiss et col²⁰⁵ objectiva que l'induction de l'apoptose dans le CS était due à une activation de la voie mitochondriale. Un des mécanismes les plus étudié dans les modèles expérimentaux est l'excès de répression du gène anti-apoptotique Bcl-2 dans les¹⁷⁴. Durant la même période, Hotchkiss et col ont montré sur un modèle de péritonite chez la souris transgénique qu'une surexpression de Bcl-2 augmentait la survie²⁰⁵. Aussi il a été décidé d'explorer la voie intrinsèque et notamment la variation d'expression de Bcl-2 dans les lympho-monocytes de patients en CS dans notre travail.

1.1. Premier objectif : exploration de l'apoptose lympho-monocytaire dans le choc septique *in vivo* chez l'Homme

Pour le début de notre travail nous nous sommes intéressés au mécanisme de cette apoptose lympho-monocytaire *in vivo* chez l'homme lors du CS. Pour cela nous nous sommes posés la question de savoir si cette apoptose était due à une dys-régulation pro-ou anti-apoptotique.

Pour ce faire nous avons conduit une étude prospective contrôlée dans le service de Réanimation Médicale de l'Hôpital de Hautepierre où nous avons inclus 20 patients qui ont présenté un CS nosocomial, c'est-à-dire qui est survenu dans le service. Nous savions donc exactement à quel moment le sepsis démarrait et ce pour tous les patients. Dès que les patients étaient en CS (selon les critères du Tableau 2, page 4), dans les 6 - 12 heures, nous avons réalisé un prélèvement sanguin pour mesurer le niveau d'expression de gènes pro-apoptotique (Bax) et anti-apoptotique (Bcl-2) par une technique de RT-PCR sur Light-Cycler avec la méthode « Fast Sart Sybr-Green® Master II » (laboratoire Roche). Après extraction de l'ARN total des cellules mononuclées circulantes par aliquots de 10⁶ cellules, l'expression des gènes étudiés était réalisée à partir d'un microgramme d'ARN total et rapportées à un gène de référence connu pour ne pas être influencé par le sepsis (HydroxyMethyl-Bylane-Synthase). Ces mesures étaient répétées à J1, J3 et J7. Les groupes contrôles étaient 10 patients de Réanimation sans sepsis (patients en coma) et un groupe de 14 sujets sains.

Les principaux résultats de notre travail sont :

- Une profonde baisse ($\approx 50\%$) du taux de cellules mononuclées circulantes et précoce (< 12 h). Lorsque l'on observe les sous-populations lymphocytaires, nous trouvons une baisse significative du taux de lymphocytes T, CD4+, CD8+ et NK, mais sans modification du taux de lymphocytes B (Tableau 5).

	G2 (baseline) (n=10)	G1 (baseline) (n=22)	G1 T1 (n=24)	G1 T2 (n=21)	G1 T3 (n=21)	G1 T4 (n=20)
Total WBCs (cells/mm ³)	11,035 \pm 2,885	10,773 \pm 3,251	14,788 \pm 8,730	12,371 \pm 3,251	11,071 \pm 2,849	10,720 \pm 3,433
PMNs (cells/mm ³)	8,452 \pm 2,868	8,424 \pm 2,670	12,395 \pm 8,778	9,975 \pm 3,132	8,674 \pm 2,600	8,260 \pm 2,709
Monocytes (cells/mm ³)	843 \pm 291	1,044 \pm 465	675 \pm 467*	652 \pm 210*	747 \pm 305*	671 \pm 426*
Lymphocytes (cells/mm ³)	1,642 \pm 337	1,861 \pm 259	909 \pm 274*	1,055 \pm 408*	1,299 \pm 501*	1,534 \pm 600*
Lymphocytes T (cells/mm ³)	1,286 \pm 351	1,407 \pm 191	650 \pm 247*	754 \pm 364*	946 \pm 396*	1,117 \pm 490*
Lymphocytes B (cells/mm ³)	172 \pm 64	171 \pm 60	153 \pm 114	172 \pm 143	174 \pm 154	201 \pm 130
Lymphocytes T CD4+ (cells/mm ³)	841 \pm 257	1,317 \pm 191	430 \pm 161*	487 \pm 214*	610 \pm 288*	646 \pm 297*
Lymphocytes T CD8+ (cells/mm ³)	435 \pm 121	396 \pm 89	214 \pm 109*	247 \pm 139*	319 \pm 185	402 \pm 246
Natural killer cells (cells/mm ³)	206 \pm 157	200 \pm 78	97 \pm 75*	135 \pm 81*	105 \pm 85*	151 \pm 100*

Tableau 5 : Evolution en fonction du temps des taux de cellules mononuclées circulantes dans le CS, in vivo, chez l'homme. ; G2 : taux d'une population de témoins sains ; G1 : baseline du groupe CS avant d'être infecté ; T1 : 6^{ième} -12^{ième} heure après le choc ; T2 : 24^{ième} heure ; T3 : 3^{ième} jour ; T4 : 7^{ième} jour.

- Une diminution significative et précoce (< 12 h) de l'expression de Bcl-2 chez les patients en CS (Figure 14).
- Une sous-expression significativement plus marquée de l'expression de Bcl-2 à la phase précoce (< 12 h) chez les patients qui vont décéder. Cette sous-expression de Bcl-2 est transitoire et réversible avec un retour à un niveau d'expression normal en 24 h (Figure 14).
- Le niveau d'expression de Bax est resté inchangé tout au long de l'étude et quelque soit le devenir des patients (données non montrées).

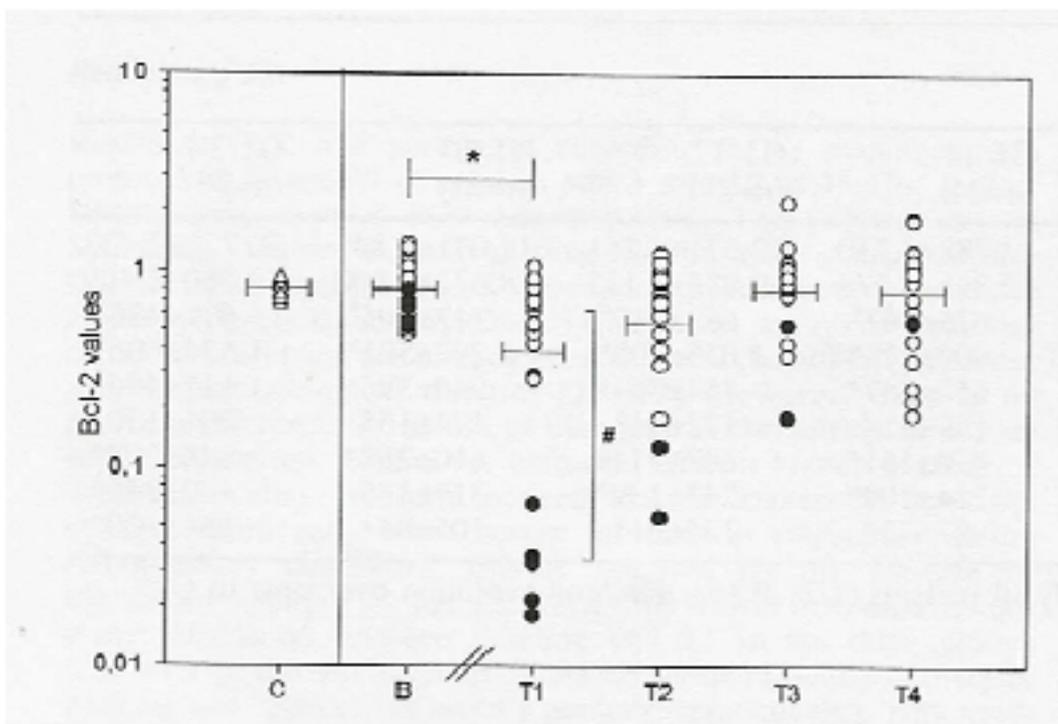


Figure 14 : Niveau d'expression de Bcl-2 dans les cellules mononuclées circulantes, en fonction du temps, chez des patients en CS (cercles), comparés à des patients non septiques (colonne C, triangle). Nous observons une diminution significative de l'expression de Bcl-2 chez les patients qui vont mourir (rond noir) et ce dès les premières heures suivant le CS, comparer aux survivants (rond ouvert). De plus il existe une valeur seuil de non chevauchement à T1 située à 0,1. L'expression de Bax quant à elle est restée stable (valeur non représentée). B : baseline du groupe CS avant d'être infecté ; T1 : 6^{ième} -12^{ième} heure après le choc ; T2 : 24^{ième} heure ; T3 : 3^{ième} jour ; T4 : 7^{ième} jour. La valeur de Bcl-2 est le rapport d'expression de Bcl-2 sur le gène rapporteur HBMS, avec une échelle logarithmique.

De ce travail préliminaire nous avons retrouvé la lympho-monopénie précoce et profonde induite par le CS *in vivo* chez l'homme en objectivant en plus une récupération en 24 – 72 h d'un niveau normal de lympho-monocytes circulants. Pour expliquer le phénomène précédent, nous avons retrouvé, *in vivo*, chez l'homme en CS les observations expérimentales murines où l'expression de Bcl-2 est fortement réprimée et ce, très précocement avant de revenir à la valeur initiale en cas de survie. Par ailleurs chez les patients, nos résultats objectivent un niveau seuil de sous-expression de Bcl-2 entre 6 et 12 h, prédictif de mortalité (*fold change* < 0,1). Nous avons enfin observé aussi que l'expression de Bax restait inchangée en fonction du temps et du devenir des patients.

Ce travail a fait l'objet de **la publication n°1** en 2004.

Pascal Bilbault
Thomas Lavaux
Abdeslam Lahlou
Béatrice Uring-Lambert
Marie-Pierre Gaub
Charline Ratomponirina
Nicolas Meyer
Pierre Oudet
Francis Schneider

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

Received: 29 July 2003
Accepted: 26 November 2003
Published online: 13 January 2004
© Springer-Verlag 2004

This work was supported by the Délégation à la Recherche Clinique des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (PHRC Régional 2001-Grant 2629). Pascal Bilbault and Thomas Lavaux contributed equally to this study.

P. Bilbault · F. Schneider (✉)
Services de Réanimation Médicale,
Hôpital de Hautepierre,
Avenue Molière, 67098 Strasbourg, France
e-mail:
Francis.Schneider@chru-strasbourg.fr
Tel.: +33-3-88127906
Fax: +33-3-88127908

T. Lavaux · M.-P. Gaub ·
C. Ratomponirina · P. Oudet
Services de Biochimie
et de Biologie Moléculaire,
Hôpitaux Universitaires et Faculté de
Médecine de l'Université L. Pasteur,
Strasbourg, France

A. Lahlou · B. Uring-Lambert
Services d'Immunologie et d'Hématologie,
Hôpitaux Universitaires et Faculté
de Médecine de l'Université L. Pasteur,
Strasbourg, France

N. Meyer
Département de statistiques,
Hôpitaux Universitaires et Faculté
de Médecine de l'Université L. Pasteur,
Strasbourg, France

Abstract Objective: To assess the levels of expression of the antiapoptotic gene Bcl-2 and the proapoptotic gene Bax in circulating mononuclear cells (CMNC) harvested during the course of severe sepsis (SS) in formerly non-immunocompromised patients undergoing hospital-acquired infection, in parallel to cytokine levels. **Design:** Prospective study. **Setting:** Intensive care unit.

Participants: A total of 24 patients without immunodeficiency undergoing standard goal-directed therapy for nosocomial SS, 10 critically ill patients without sepsis, and 10 healthy controls. **Interventions:** Blood was collected before infection and within 12 h, 1, 3 and 7 days after fever onset, to determine plasma concentrations of IL-6, IL-10, TNF-alpha, C-reactive protein, whole blood cell counts, lymphocyte subsets, annexin V labelling for apoptosis, and Bax and Bcl-2 relative RNA expression by real-time polymerase chain reaction. **Results:** SS patients displayed increased cytokine concentrations, TNF-alpha being significantly increased at full-blown sepsis. Within 12 h after onset of infection, lymphocyte counts were lower in SS patients than in critically ill controls ($p=0.001$), and this phenomenon was

marked in CD4+ and CD8+ subsets ($p<0.001$). This was associated with enhanced apoptosis in CMNC ($15.7\pm 8.7\%$ vs $3.4\pm 2.1\%$, $p<0.001$) and a significant down-expression of the Bcl-2 gene throughout the study ($p<0.05$). In contrast, the expression of Bax did not change significantly. Within 12 h of fever onset, non-survivors expressed a 10-fold down-expression of Bcl-2 when compared to survivors ($p<0.001$). **Conclusions:** An early transient down-expression of the gene Bcl-2 occurred in CMNC harvested from SS patients who died despite intensive care. In contrast, the expression of the gene Bax did not change significantly.

Keywords Apoptosis · Bcl-2 gene expression · Lymphocyte subpopulations · Outcome · Severe sepsis · Human

Introduction

Severe sepsis (SS) is a major problem not only because it increases hospital stays and related costs, but also because it dramatically worsens the prognosis for hospital-acquired infection. Death from serious infection can occur as a result of inherited or acquired immunodeficiency, but many apparently non-immunocompromised patients experience SS even though appropriate intensive care is performed. The question has therefore arisen as to the importance of a paralysis of the patients' immune system occurring as a consequence of SS itself [1]. There is no general agreement on the definition of such an "immunoparalysis" which is considered to be the result of an imbalance between the pro-inflammatory and anti-inflammatory reactions triggered by infection at the acute phase of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) [1, 2]. Different studies have underlined that an altered functioning of lymphocytes [3] or monocytes [4] is involved in this phenomenon, and may thereby explain a proneness towards weaker defence.

Excess of apoptosis has been identified in experimental SS [5] as a detrimental factor for survival affecting different cells types, including lymphocytes. Blockade of apoptosis has been shown to improve outcome after septic challenges in animals [6], and experimental overexpression of antiapoptotic factors as well [7, 8]. In patients who died of sepsis, a lymphocyte apoptosis has been reported in the spleen, and a loss of circulating lymphocytes as well, reinforcing the hypothesis of an involvement of apoptosis-induced lymphopenia [3]. Apoptosis is known to be regulated by two major pathways: the first involving the superfamily of tumor necrosis factor (TNF) receptor members, and the second under the control of the B cell lymphoma 2 (Bcl-2) gene family members, with either pro-apoptotic or anti-apoptotic functions [9, 10]. Corresponding levels of expression of the pro-apoptotic protein Bax and the anti-apoptotic protein Bcl-2 is a regulation system for cell survival following an apoptotic stimulus [11]. Drugs assumed to influence the Bcl-2/Bax ratio are now available, and the Bcl-2/Bax rheostat could therefore become a new target for therapeutic interventions.

Although the involvement of Bcl-2 and Bax in sepsis has already been reported in animal models [7], it has infrequently been investigated under standardised conditions in humans. Therefore, to assess the potential role of Bax and Bcl-2 in the immune dysfunction occurring at the acute phase of human SS, we have studied the relative quantification of the gene expressions in circulating mononuclear cells (CMNC) before infection, and then until death or recovery in patients undergoing an episode of hospital-acquired SS. We have also searched for a potential difference in the kinetics of the expression of Bax and Bcl-2 over time to learn whether it could be associated with the outcome in comparison to the levels

of cytokines that have already been shown to be involved in severe sepsis.

Materials and methods

Patients

This study was approved by our institutional review board for human research: 44 adults without any condition known to be associated with documented inherited or acquired immunodeficiency were included prospectively. Special attention was paid to exclude patients having undergone treatment known to interfere with Bax or Bcl-2 expression such as immunosuppressive drugs (steroids, immunosuppressors or antineoplastic chemotherapy). Our study population was divided into three groups:

- 24 consecutive patients (9 women and 15 men, mean age 64 ± 16 years) admitted for non-septic reasons in our ICU, and who later (>7 days) developed nosocomial SS according to standard criteria [12]. They were treated with both adequate antibiotics as soon as fever started and standard goal-directed therapy [13]: mean arterial pressure >65 mm Hg, central venous pressure >8–12 mmHg, urine output >0.5 ml/kg h⁻¹.
- 10 non-septic critically ill patients (4 women and 6 men, mean age 58.7 ± 19.8 years), randomly chosen because hospitalised simultaneously to those with nosocomial SS.
- 10 healthy controls (5 women and 5 men, mean age of 41.4 ± 7.2 years) used as an internal control for biological measurements.

The clinical characteristics of the patients are shown in Tables 1 and 2. The SAPS II (Table 1) score was recorded for each patient on admission in the ward [14], as well as a LOD score on inclusion in the study [15].

Protocol of the measurements

For SS patients, five time points were defined: baseline (at least 7 days before onset of infection), T1 within 12 h after the onset of infection according to the rise of fever, at the moment when criteria for SIRS were simultaneously present for the first time, 24 h later (T2), 72 h later (T3) and 7 days later (T4). At each time point, plasma cytokine concentrations were measured, CMNC counted, and Bax and Bcl-2 RNA relative expressions quantified.

For the control groups, blood samples were processed as in SS patients.

Plasma cytokine concentrations

Plasma was separated by centrifugation at 500 g for 10 min at 4°C, and stored at -80°C until processed. Plasma IL-10 concentrations were measured using a specific enzyme-linked immunosorbent assay (Bender MedSystems, Vienna, Austria; sensitivity 2 pg/ml) using an automated system (EliMax 3000 DiaSorin, France). Plasma IL-6 and TNF- α concentrations were evaluated using a chemoluminescent immunometric assay (DPC, Paris, France) and the ratio IL-10/TNF- α was calculated.

Lymphocyte sub-population counts

Lymphocytes were determined by flow cytometry (Becton Dickinson FacsCalibur, Rungis, France) using fluorescent monoclonal specific antibodies (Becton Dickinson, Rungis, France). T-lymphocyte subsets were selected with antibodies against CD3, CD4

Table 1 Characteristics of the severe sepsis patients

Patient No.	Diagnosis on admission	SAPS II	LOD score	Sources of infection	Isolates	Outcome
1	Pancreatitis	43	8	Venous line infection	<i>S. epidermidis</i>	S
2	OHCA	57	4	Pneumonia	<i>P. aeruginosa</i> <i>Staphylococcus spp</i>	S
3	OHCA	32	5	Pneumonia	<i>P. aeruginosa</i> <i>S. marcescens</i>	S
4	Metabolic coma	44	4	Urinary tract infection	<i>P. aeruginosa</i>	S
5	Stroke	38	11	Cholecystitis	NA	D
6	Congestive heart failure	44	8	Pneumonia	<i>A. baumannii</i>	D
7	Pulmonary oedema	78	9	Urinary tract infection	<i>Acinetobacter spp</i>	S
8	Chronic liver failure	80	9	Pneumonia	<i>M. morgani</i>	D
9	Chronic liver failure	87	7	Digestive tract	<i>P. aeruginosa</i>	S
10	Status epilepticus	39	5	Aspiration pneumonia	NA	S
11	Chronic liver failure	50	9	Urinary tract infection	<i>E. coli</i>	S
12	Trauma	76	9	Wound infection	<i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli, Proteus pemei</i>	D
13	Acute renal failure	46	12	Digestive tract	<i>E. coli</i>	D
14	COPD	52	4	Pneumonia	<i>K. pneumoniae</i>	S
15	Congestive heart failure	45	6	Pneumonia	<i>S. aureus</i>	S
16	Stroke	52	6	Pneumonia	<i>P. aeruginosa</i>	S
17	Boerhave syndrome	20	4	Mediastinitis	<i>K. pneumoniae</i>	S
18	Congestive heart failure	55	10	Pneumonia	<i>S. aureus</i>	D
19	Partial mesenteric ischemia	87	15	Pneumonia	<i>S. aureus</i>	S
20	Trauma	58	7	Venous line infection	<i>S. aureus</i>	D
21	Pneumonia	96	10	Venous line infection	<i>E. cloacae</i>	S
22	Self-poisoning	55	11	Lower respiratory tract infection	<i>S. marcescens</i>	S
23	Congestive heart failure	51	8	Lower respiratory tract infection	<i>C. albicans</i>	D
24	OHCA	45	10	Urinary tract infection	<i>A. baumannii</i>	D

SAPS II Simplified acute physiologic score on admission.

LOD Logistic organ dysfunction score at inclusion.

NA not available.

COPD Chronic obstructive pulmonary disease.

OHCA Out-of-hospital cardiac arrest.

S Survived.

D Died.

Table 2 Characteristics of the non-septic critically ill patients

Patient	Diagnosis	SAPS II	LOD score	Outcome
1	OHCA	58	6	S
2	Hanging	63	6	S
3	OHCA	47	6	S
4	OHCA	42	5	S
5	OHCA	85	4	S
6	Stroke	39	3	S
7	COPD	60	3	S
8	OHCA	67	6	S
9	Hypothermia	33	5	S
10	OHCA	75	5	S

COPD Chronic obstructive pulmonary disease.

OHCA Out-of-hospital cardiac arrest.

S Survived.

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).

Annexin V labelling for apoptosis

After red cell lysis (Immunoprep, Coulter), cells were centrifugated and incubated with 100 µl of calcium-enriched buffer, 5 µl of annexinV-FITC and 5 µl of propidium iodide (Immunotech). Cells were considered as undergoing apoptosis when annexin V positivity without iodide propidium labelling was detected.

Bax and Bcl-2 relative gene expressions

Cells

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 10⁶ cells.

Isolation of RNA and cDNA synthesis

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

Real-time PCR

Real-time PCR was performed according to the manufacturer's protocol (0.25 $\mu\text{mol/l}$ of primers and 3 mmol/l of MgCl_2 , 1 μl of DMSO 20%, 2 μl of PCR mix containing Taq polymerase and Sybrgreen reagent) in a 20 μl final volume with a thermocycler (LightCycler, Roche, France). For relative quantification, we chose HydroxyMethyl-Bilane Synthase (HMBS) as reference gene because its expression has already been shown to be reliable in cancer and in haematological diseases [16, 17]. However, there is no previous reference to the use of this gene in the setting of human sepsis. Therefore, with RNA extracted from a known number of cells (10^6 cells), we have noticed that its expression does not change significantly when severe infection is starting or during inflammatory conditions: this is assessed by the absence of significant changes in the Ct values of HMBS recorded in our study population between baseline and T1 in the three groups (23.7 \pm 1.1 in the septic group; 23.9 \pm 0.8 in the critically non-septic patients and 23.9 \pm 0.9 in healthy patients, respectively). This result confirmed in our study populations that septic conditions do not alter the expression of this gene allowing us to use it as a reference.

The primers (Genome Express, Montreuil, France) for the gene amplification were as follows:

- HMBS 5'-forward: CTGGTAACGGCAATGCGGCT
- HMBS 3'-reverse: GCAGATGGCTCCGATGGTGA
- Bax 5'-forward: ATCCAGGATCGAGCAGGGCG
- Bax 3'-reverse: ACTCGCTCAGCTTCTTGGTG
- Bcl-2 5'-forward: CCGCTACCGCCGCGACTTC
- Bcl-2 3'-reverse: AACAGAGGCCGCATGCTG).

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

Calculations of results

Gene expressions were performed using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method [18]. For a clearer presentation, we chose to represent the $1/2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ value in Fig. 2: thus, a decrease of expression leads to a value <1 and an increase of expression leads to a value >1. 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 Bax ($E=2.13$), Bcl-2 ($E=2.11$) and HMBS ($E=2.13$) with linear kinetics between respective Ct values. The ΔCt of Bcl-2 and Bax from the 10 healthy volunteers group was calculated as the mean of the 4 time points. The resulting values were 2.25 \pm 0.40 for ΔCt Bax (range 1.45–2.86) and 2.09 \pm 0.36 for ΔCt Bcl-2 (range 1.42–2.76).

Statistical analysis

Values are expressed as means \pm SEM. Kinetic data were studied with analysis of variance for repeated measurements. Where 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.

Results

Patients characteristics

No control patient died during the study but 5 out of the SS patients died from circulatory failure ($n=3$ after 1 day, $n=1$ after 3 days, and $n=1$ after 10 days) resulting in a 14-day mortality rate of 26%. On admission in the ICU, the SAPS II score did not significantly differ between SS and non-septic patients. Within the SS patients, the SAPS II score did not differ between survivors and non-survivors. In contrast, the LOD score recorded on entry in the study was significantly higher in SS than in non-septic patients (8.0 \pm 2.9 vs 4.9 \pm 1.2, $p=0.004$). The LOD score was not different in survivors and in non-survivors (7.9 \pm 3.0 vs 8.2 \pm 2.6; Tables 1 and 2). Although similar on baseline, the plasma CRP concentrations were significantly higher in SS patients when compared to non-septic critically ill patients ($p<0.001$) throughout the study (Table 3).

Table 3 Evolution of inflammatory markers over time

Inflammatory markers	G2 (baseline) (n=10)	G1 (baseline) (n=22)	G1 T1 (n=24)	G1 T2 (n=21)	G1 T3 (n=21)	G1 T4 (n=20)
CRP (mg/ml)	52 (48–67)	46 (42–102)	119 (75–192)*	117 (68–214)*	99 (58–164)*	71 (44–125)
TNF- α (pg/ml)	3 (0–8)	4 (0–4)	45 (21–68)*	8 (4–12)	4 (0–11)	0 (0–6)
IL-6 (pg/ml)	5 (0–12)	12 (0–11)	219 (128–2752)	46 (86–223)	26 (15–63)	15 (0–12)
IL-10 (pg/ml)	4 (0–2)	5 (0–3)	98 (54–87)	23 (14–32)	11 (4–18)	2 (0–3)
IL10/TNF- α ratio	1.1 (0.8–1.5)	1.1 (0.7–1.4)	3.1 (1.5–4.1)*	1.5 (0.5–2.5)	1.1 (0.5–2.1)	1.1 (0.8–1.3)

Biological characteristics of SS patients (G1) and non-septic critically ill patients (G2) at baseline, and evolution over time in G1.

CRP C Reactive protein.

WBCs White blood cells.

PMNs Polymorphonuclear cells.

Values are mean and median (interquartile range) for inflammatory markers.

* $p<0.05$.

* $p<0.01$ when compared to G1 baseline values.

Table 4 Evolution of cell counts over time

	G2 (baseline) (n=10)	G1 (baseline) (n=22)	G1 T1 (n=24)	G1 T2 (n=21)	G1 T3 (n=21)	G1 T4 (n=20)
Total WBCs (cells/mm ³)	11,035±2,885	10,773±3,251	14,788±8,730	12,371±3,251	11,071±2,849	10,720±3,433
PMNs (cells/mm ³)	8,452±2,868	8,424±2,670	12,395±8,778	9,975±3,132	8,674±2,600	8,260±2,709
Monocytes (cells/mm ³)	843±291	1,044±465	675±467*	652±210*	747±305*	671±426*
Lymphocytes (cells/mm ³)	1,642±337	1,861±259	909±274*	1,055±408*	1,299±501*	1,534±606*
Lymphocytes T (cells/mm ³)	1,286±351	1,407±191	650±247*	754±364*	946±396*	1,117±496*
Lymphocytes B (cells/mm ³)	172±64	171±60	153±114	172±143	174±154	201±130
Lymphocytes T CD4+ (cells/mm ³)	841±257	1,317±191	430±161*	487±214*	610±288*	646±297*
Lymphocytes T CD8+ (cells/mm ³)	435±121	396±89	214±109*	247±139*	319±185	402±246
Natural killer cells (cells/mm ³)	206±157	200±78	97±75*	135±81*	105±85*	151±100*

Biological characteristics of SS patients (G1) and non septic critically ill patients (G2) at baseline, and evolution over time in G1.

CRP C Reactive Protein.

WBCs White blood cells.

PMNs Polymorphonuclear cells.

Values are mean ±SE for cell counts.

**p*<0.05.

**p*<0.01 when compared to G1 baseline values.

Plasma cytokine concentrations

Plasma TNF-alpha, IL-6 and IL-10 concentrations are shown in Table 3. Although critically ill patients did not demonstrate clinical signs of infection they disclosed increased cytokine plasma concentrations when compared to healthy controls (data not shown). At T1, there was a significant increase of TNF-alpha in SS patients when compared to non-septic critically ill patients (*p*<0.001). Although increased when compared to healthy controls concentrations, neither IL-6 nor IL-10 were significantly different between SS and critically ill non-septic patients.

At T1 the calculated ratio of IL-10 to TNF-alpha showed a significant increase in the SS patients (Table 3); furthermore this increase was significantly higher in SS patients who ultimately died (2.8±1.7 in survivors versus 5.1±2.4 in non-survivors, *p*<0.05).

White blood cell counts

Total white blood cells, polymorphonuclear cells and monocytes were not significantly different between SS and non-septic critically ill patients throughout the study (Table 4). As far as lymphocytes are concerned, throughout the study, there was a significant decrease of total lymphocytes (*p*=0.001), total T-cells (*p*<0.001), CD4+ (*p*<0.001) and CD8+ (*p*=0.005) cell counts in SS patients (G1) when compared to non-septic critically ill patients (G2). Among the SS patients, at T1, survivors displayed higher total lymphocytes counts, T lymphocytes counts CD4+ and CD8+ than non-survivors (*p*<0.001, Fig. 1).

This was associated with enhanced CMNC apoptosis (3.4±2.1% vs 15.7±8.7%, *p*<0.001), not significantly different between survivors and non-survivors (data not shown).

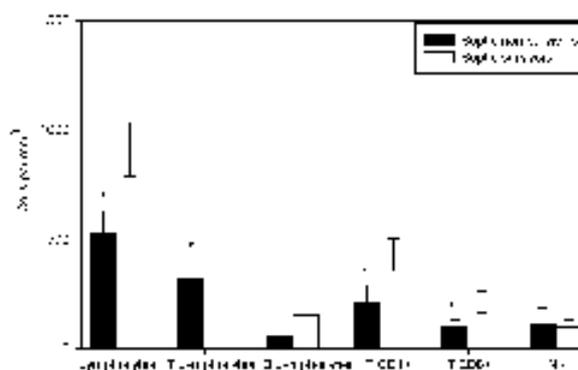


Fig. 1 Lymphocyte counts among SS patients at T1. Non-survivors (*n*=5) displayed weaker total lymphocytes counts than survivors (*n*=19), with significantly less T lymphocytes, T CD4+ and T CD8+ cells, whereas there were no differences among B lymphocytes and NK cells. Histograms are means, and lines 95% confidence intervals (**p*< 0.001)

Bax and Bcl-2 relative gene expressions

As far as the expression of Bax is concerned, we did not observe any significant difference between SS and non-septic patients at any time (data not shown).

At baseline, the expression of Bcl-2 was not significantly different between SS and non-septic critically ill patients. Throughout the study, SS patients displayed a significant decrease of the mean Bcl-2 expression when compared with non-septic patients (*p*<0.05, Fig. 2). Moreover, there was a significant correlation between the individual Bcl-2 values at T1, and the corresponding absolute counts of T-lymphocytes, T-CD4+ and T-CD8+ (*r*²=0.665, *p*<0.0001, *r*²=0.707, *p*<0.0001 and *r*²=0.595, *p*<0.0001, respectively). There was no correlation with B-

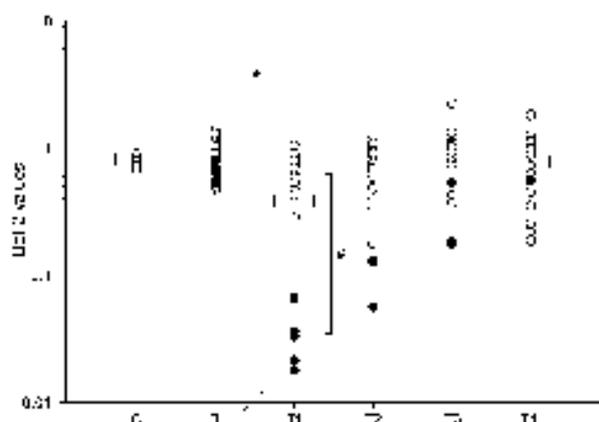


Fig. 2 Quantification of Bcl-2 relative gene expression in SS patients and in non-septic critically ill patients. The quantification was performed at different time points: *B* baseline value ($n=24$), *T1* within 12 h after the beginning of SS ($n=24$), *T2* after 24 h ($n=21$), *T3* after 72 h ($n=21$) and *T4* after 7 days ($n=20$). For a clearer representation, values recorded in the non-septic critically ill patients ($n=10$) are only shown at baseline (*C*) because they did not change significantly over time. Bcl-2 values are circles (*open circles* survivors, *closed circles* non-survivors). Results are expressed as a ratio of mean values obtained in healthy controls. Please note that the y-axis has a logarithmic scale. Individual values and means of each group are shown ($*p=0.006$ versus baseline, and $\#p<0.0001$ for the comparison of survivors versus non-survivors at *T1*)

lymphocytes and NK cell counts. At *T1*, non-survivors expressed a 10-fold decrease of Bcl-2 when compared to survivors ($p<0.001$, Fig. 2), without any overlapping of the values and with a clear cut-off value (0.1 in logarithmic scale).

Discussion

We report on a strong time-dependent down-expression of the anti-apoptotic Bcl-2 gene in CMNC harvested from patients who developed hospital-acquired SS despite appropriate antibiotics and full intensive care. In contrast, we did not notice any change in the expression of the pro-apoptotic gene Bax. In addition, the Bcl-2 gene down-expression was associated with both a significant decrease in T-cell counts and an increase of annexin V labelling.

Previous studies [1, 19] have addressed the issue of immune disturbances in human SS with conflicting results as far as CMNC are concerned [3, 20]. Plasma concentrations of biological markers of SIRS also have turned out to be of poor interest in the evaluation of the immune response of septic patients [21, 22], except for the ratio IL-10 to TNF- α , which has been associated with fatal outcome in febrile patients with community-acquired infection [23]. Accordingly, in our hands, there was no

significant relationship between the plasma cytokines concentrations and the CMNC counts or mortality. This is why we sought for another approach to detect as early as possible a serious evolution of SS patients. In our opinion the evaluation of such an approach must include baseline parameters, and then a continuous monitoring of the data. Former prospective studies performed on Bcl-2 expression did not provide information on the time elapsed from fever onset to the moment of blood sampling for tests [24]. This is why, in our patients under continuous clinical monitoring, we have considered gene expressions not only on a basis of instantaneous values but also over time: this permits the assessment a kinetic profile of expression from baseline to recovery or death. Whereas this information does not seem of importance for the gene Bax, in our study it turns out to be critical for the gene Bcl-2: this had never been pointed out formerly. In agreement with others [24], we record changes as late as 48 h after onset of fever, but we establish that the maximal change in expression is detectable within 12 h after onset of fever. An additional data is that a relative gene expression is relevant only if absent at baseline, which would otherwise open the possibility of a constitutive or an acquired defect of expression: such a status is obviously excluded in our patients, given the baseline status. Finally, in keeping with the simultaneity of the expression of the genes and the infection-induced cytokines release, it can reasonably be expected that there was no other triggering factor of transient Bcl-2 down expression than sepsis itself.

Our main finding is the Bcl-2 gene down expression in CMNC at onset of SS. Bcl-2 is expressed in immature cell populations and is involved in cell differentiation. Few studies have quantified the Bcl-2 expression in the lymphoid system in human sepsis [3, 24]. In addition, this was usually performed at the protein level which occurs later than the RNA upregulation. In our study, we can reasonably ascribe the Bcl-2 down expression at least partially to an increased production of TNF and IL-6 which have previously been reported to trigger cell apoptosis [25]. Other mechanisms can not be ruled out but warrant further investigations. The time dependence observed between the Bcl-2 expression and the decrease of T cell total counts and subsets is also in favour of this hypothesis and it is in accordance with data recorded in Bcl-2 deficient mice which show markedly decreased lymphocytes cells while other hematopoietic cells are unaffected. In these mice, among lymphocytes, T CD8+ were the first to disappear followed by T CD4+, whereas B cells were less affected [26]. These data suggest a role of the decrease of the T cells in the *in vivo* deactivation of part of the immune system. This link between lymphopenia and infection had already been noticed in nosocomial complications among trauma patients [27]. However, the lack of apparent impact of Bcl-2 on B-lymphocytes deserves further investigations because a lower level of B-cells might be expected in nonsurvivors patients accord-

ing to former findings [3]. In addition, the Bcl-2 down expression occurs before shock and subsequent multiple organ failure have occurred. Simultaneously, the number of CMNC decreases whereas their annexin-V labeling increases, which supports the hypothesis of increased apoptosis within these cells. In our patients, the CD4+ and CD 8+ T lymphocytes are more affected than NK cells or B-lymphocytes which were previously shown to undergo apoptosis in humans only when multiple organ failure had occurred [3, 28].

The pro-apoptotic protein Bax is essential for a normal development of tissues and a lack of Bax is responsible for multiple developmental defects [29]. Moreover, this protein is required for stress-induced cell death in ischemia-reperfusion injury [10]. To our knowledge, the expression of Bax has not been studied in sepsis. For reasons that deserve to be investigated, an increased expression of Bax was not observed in our septic patients although it might have been involved in a loss of lymphocytes. However, even in the presence of an unchanged expression of Bax, the decrease of Bcl-2 led us to use the Bax to Bcl-2 ratio which had previously been described as a rheostat triggering apoptosis [11].

Our data have potentially consequences in terms of immuno-modulation attempts in SS patients. Because the relative level of down expression of Bcl-2 seems reliably greater in nonsurvivors than in survivors, with a clear cut

off point, the evaluation of this marker would allow for a monitoring of infection-associated "immunoparalysis" in previously immunocompetent patients. However, it can be expected that therapeutic interventions on these gene expressions would only be beneficial if performed during specific time windows. It is interesting to note that an automated RT-PCR technique would allow to rapidly identify early in the course of infection those patients with the highest risk of death, thus opening the way to treat them with commercially available drugs influencing the Bcl-2 gene upregulation, such as activated protein C [30].

Although prospective and having involved consecutive patients, our investigation has limitations related to its design. It was not powered to detect an influence of Bax or Bcl-2 up regulation on mortality but is an exploratory work on factors potentially involved in resistance to serious infection. Additional studies are therefore warranted to extend our data to other populations with SS and to check for the expression of several other genes of the Bcl-2 family (such as Bak or Bcl-xl).

In conclusion, recorded in specific conditions of hospital-acquired SS, the dramatic Bcl-2 gene down expression reported here in CMNC of formerly non-immunocompromised patients deserves further investigation to confirm its suitability as a means of early detection of outcome in larger populations of patients with serious infection.

References

- Munford RS, Pugin J (2001) Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. *Am J Respir Crit Care Med* 163:316-321
- Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA (1997) Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest* 112:235-243
- Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD et al. (1999) Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* 27:1230-1251
- Docke WD, Randow F, Syrbe U et al. (1997) Monocyte deactivation in septic patient: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat Med* 3:678-681
- Hotchkiss RS, Swanson PE, Cobb JP, Jacobson A, Buchman TH, Karl IE (1997) Apoptosis in lymphoid and parenchymal cells during sepsis: findings in normal and T and B cell-deficient mice. *Crit Care Med* 25:1298-1307
- Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE et al. (1999) Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:14541-14546
- Hotchkiss RS, Swanson PE, Knudson CM et al. (1999) Over expression of Bcl-2 in transgenic mice decreases apoptosis and improves survival in sepsis. *J Immunol* 162:4148-4156
- Coopersmith CM, Stanley PE, Davis CG, Arriot DR, Buchman TG, Karl IE, Hochkin RS (2002) Inhibition of intestinal epithelial apoptosis and survival in a murine model of pneumonia-induced sepsis. *JAMA* 287:1716-1721
- Kroemer G (1997) The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med* 3:614-620
- Cory S, Adams JM (2002) The Bcl-2 family: regeneration of the cellular life or death switch. *Nat Rev Cancer* 2:647-656
- Korsmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ, Merry DE, Oltvai ZN (1993) Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an antioxidant pathway and cell death. *Cancer Biol* 4:327-330
- American College of Chest Physicians/ Society of Critical Care Medicine Consensus Conference (1992) Definition for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* 101:1644-1655
- Rivers E, Nguyen B, Haustad S et al. for the Early Goal-Directed Therapy Collaborative Group (2001) Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 345:1368-1377
- Le Gall JR, Lermeshow S, Saunier F (1993) A new simplified acute physiology score (SAPS II) based on European/North American multicenter study. *JAMA* 270:2957-2963
- Le Gall JR, Klar J, Lermeshow S, Saunier F, Alberti C, Artigas A, Teres D for the ICU Scoring Group (1996) The logistic organ dysfunction system. A new way to assess organ dysfunction in the intensive care unit. *JAMA* 276:802-810
- Vandesompece J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paep A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3:1-12

17. Cassinat B, Zassadowski F, Balitrand N et al. (2000) Quantitation of minimal residual disease in acute promyelotic leukemia patients with t(15;17) translocation using real-time RT-PCR. *Leukemia* 14:324-328
18. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25:402-408
19. Bone RC (1996) Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome and the multiple organ dysfunction syndrome. *Ann Intern Med* 125:680-687
20. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE et al. (2001) Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in human. *J Immunol* 166:6952-6963
21. Pinsky OR, Vincent JL, Device J, Alegre M, Kahn RJ, Dupont E (1993) Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple system organ failure and mortality. *Chest* 103:565-575
22. Presterl E, Staudinger T, Pettermann M et al. (1997) Cytokine profile and correlation to the Apache III and MPM II scores in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 156:825-832
23. Van Dissel JT, Van Langevelde P, Westendorp RG, Kwappenberg K, Frolich M (1998) Anti-inflammatory cytokine profile and mortality in febrile patients. *Lancet* 351:950-953
24. Adrie C, Bachelet M, Vayssier-Taussat M et al. (2001) Mitochondrial membrane potential and apoptosis peripheral blood monocytes in severe human sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 164:389-395
25. Oberholzer C, Oberholzer A, Claresalzer M, Moldawer LL (2001) Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration. *FASEB J* 15:879-892
26. Nakayama K, Nakayama KI, Negishi I, Knida K, Santa H, Loh DY (1994) Targeted disruption of *Bcl-2a/b* in mice: occurrence of grey hair, polycystic kidney disease, and lymphocytopenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:3700-3704
27. Menges T, Engel J, Welters J et al. (1999) Changes in blood lymphocyte count after multiple trauma: association with post-traumatic complications. *Crit Care Med* 27:733-740
28. Le Tulzo Y, Pangault C, Gacoin A et al. (2002) Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. *Shock* 18:487-494
29. Knudson CM, Tung KSK, Tourtelotte WG, Brom AJ, Korsmeyer SJ (1995) Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science* 270:96-99
30. Cheng T, Liu D, Griffin JH, Fernandez JA et al. (2003) Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective. *Nat Med* 9:338-342

Depuis, ces résultats ont été confirmés par une autre équipe européenne au niveau protéique par une technique de cytométrie en flux avec détection de Bcl-2 par anticorps fluorescents ²⁰⁶. Ces auteurs ont aussi mis en évidence par ailleurs une sur-expression de Bim et Bid, membres du sous-groupe BH3-only.

1.2. Deuxième objectif : rhPCa et apoptose lympho-monocytaire chez l'homme en choc septique

L'objet second de notre travail a été d'observer si la rhPCa utilisée chez l'homme en CS, au dosage thérapeutique recommandé, avait une influence sur l'apoptose des cellules sanguines mononuclées circulantes à la phase initiale du choc septique, comme suggérées par les études expérimentales ⁸² et d'examiner quelles expressions de gènes pro- et/ou anti-apoptotiques étaient potentiellement modifiées par cette molécule.

La rhPCa est une thérapeutique innovante qui améliore le pronostic des patients en CS par ses propriétés anticoagulantes mais vraisemblablement aussi par des propriétés anti-inflammatoires (cf supra).

Mais la rhPCa exerce aussi, *in vitro*, une activité anti-apoptotique. Ainsi les études *in vitro* sur des cultures cellulaires de cellules endothéliales neuronales humaines mise en hypoxie où l'on observe une sur-expression de Bax, p53 et une répression de Bcl-2, la rhPCa normalise le rapport Bax/Bcl-2 et réduit l'activité de la caspase 3 ⁸³. Une autre étude *in vitro* sur des cultures cellulaires de cellules de cordon ombilical (lignée Huvec) soumises à un agent inducteur d'apoptose (staurosporine, 1 μ M) Joyce et col ⁸² ont montré que la rhPCa réduisait l'expression des sous-unités p50 et p52 de NF-kB avec une diminution de sécrétion de TNF- α et de molécules d'adhésion (ICAM, VCAM, E-Selectin). De plus la rhPCa diminue significativement le niveau d'apoptose cellulaire (mesuré par cytométrie en flux) avec augmentation d'expression de gènes codant pour la protéine A1 homologue de Bcl-2 et la protéine inhibitrice de l'apoptose (IAP) (expression mesurée par technique de *microArray* Affymetrix™).

L'objectif de cette étude a été d'observer *in vivo* si la rhPCa diminuait l'apoptose des lympho-monocytes circulants de patients en CS en influençant sur les facteurs pro- ou anti-apoptotiques, dans les conditions usuelles d'utilisation.

36 patients en CS ont été inclus prospectivement dans deux services réanimations de l'Hôpital de Hautepierre et répartis en deux groupes : 20 dans le groupe rhPCa et 16 dans le groupe contrôle (qui n'ont pas reçu de la rhPCa par contre-indication). Les prélèvements sanguins étaient réalisés lorsque l'indication d'un traitement par rhPCa était posée (temps T1) et 36 heures après (temps T2).

Outre les caractéristiques cliniques, nous avons :

- a. quantifié les sous-populations lymphocytaires,
- b. dosé des cytokines pro- et anti-inflammatoires (respectivement TNF- α , IL-6 et IL-10)
- c. extrait l'ARN total sur des aliquots de 10^6 cellules puis mesurer par méthode RT-qPCR l'expression des gènes pro-apoptotique Bax et anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xl en exprimant les résultats sous forme de ratio Bax/Bcl-2 et Bax/Bcl-xl [le ratio Bax/Bcl-2 est considéré comme un rhéostat inducteur d'apoptose, comme rapporté dans la littérature²⁰⁷].

Les principaux résultats sont :

- Le niveau d'apoptose lympho-monocytaire, mesuré par cytométrie en flux (Annexine V) était comparable à T1 dans les deux groupes ($12 \pm 6,4$ % groupe rhPCa versus $10,4 \pm 3,4$ %groupe contrôle), significativement plus élevé que chez les témoins sains ($3,4 \pm 2,1$ %, $p < 0,001$, test de Mann-Whitney). A T2, le taux d'apoptose reste stable dans le groupe traité ($11,7$ % $\pm 5,3$) alors qu'il augmente significativement dans le groupe non traité ($16,2$ % $\pm 7,6$ %, $p < 0,001$, test de Mann-Whitney).

- Nous avons observé une restauration d'un nombre significativement plus élevé de lymphocytes totaux à T2 (1.133 ± 0.681 ; cell $10^6/\text{mL}$) versus T1 (0.537 ± 0.309) comparé au groupe contrôle ($p < 0.05$) mais sans effet sur le taux circulant de sous-populations CD4+ et CD8+ à T2. Les monocytes circulants augmentent aussi significativement entre T2 et T1 (respectivement, 0.746 ± 0.541 vs 0.311 ± 0.35 ; cell $10^6/\text{mL}$) dans le groupe rhPCa+ versus groupe contrôle ($p = 0,005$), (Figure 15).

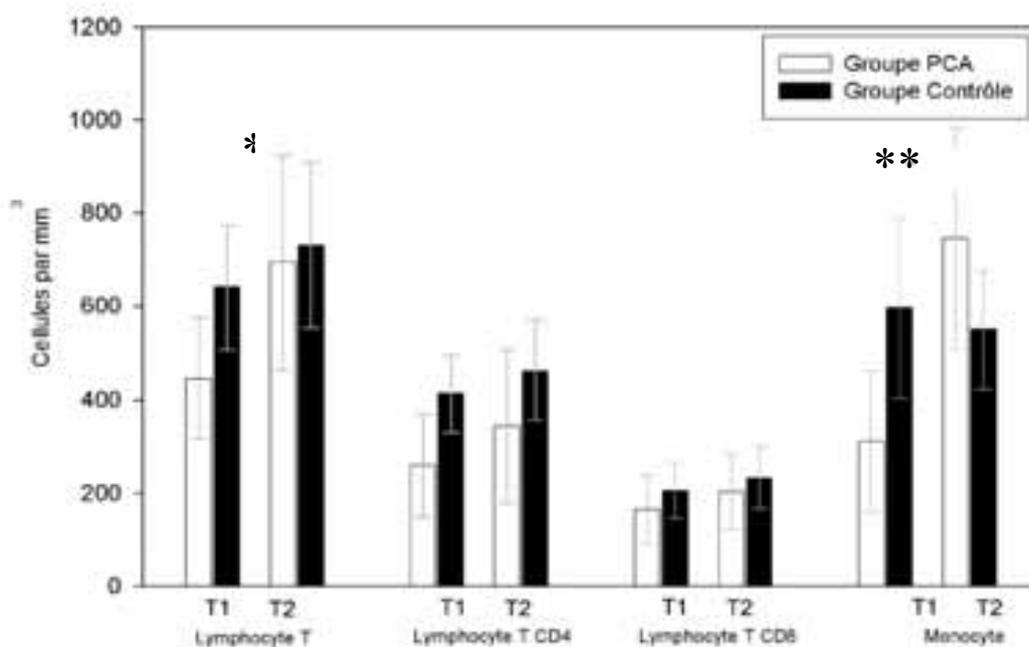


Figure 15 : Evolution des taux de lympho-monocytes circulants avec ou sans rhPCA (T1 : diagnostic du CS et inclusion des patients ; T2 : après 36h d'évolution ; PCA : protéine C activée ; * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, test Mann-Whitney)

- Pour les deux groupes nous n'avons pas observé de variations significatives de Bax, intra et intergroupes. En revanche, il existait une augmentation significative de Bcl-2 dans le groupe traité à T2 par rapport à T1 ($p = 0,023$, test de Mann-Whitney). Nous avons aussi observé une corrélation positive entre l'expression de Bcl-2 et le taux d'apoptose lymphocytaire à T2 dans le groupe rhPCa ($r^2 = 0,64$, $p = 0,023$, test de corrélation de Spearman). Concernant Bcl-xl nous n'avons pas observé de variation significative entre les groupes traité et non-traité aux différents temps de l'étude.

- Nous avons calculé les ratios Bax/Bcl-2 et Bax/Bcl-xl et observé alors qu'ils évoluaient différemment selon les groupes. Dans le groupe contrôle nous observons une augmentation significative du ratio Bax/Bcl-2 entre T1 et T2 (respectivement, 1,31 vs 1,81, $p=0,013$, test de Mann-Whitney) alors que ce même ratio diminuait significativement dans le groupe rhPCa (respectivement, 0,91 vs 0,39, $p < 0,029$, test de Mann-Whitney). La comparaison d'évolution entre les groupes (par analyse de la variance) était significativement différente ($p < 0,001$) (Figure 16).

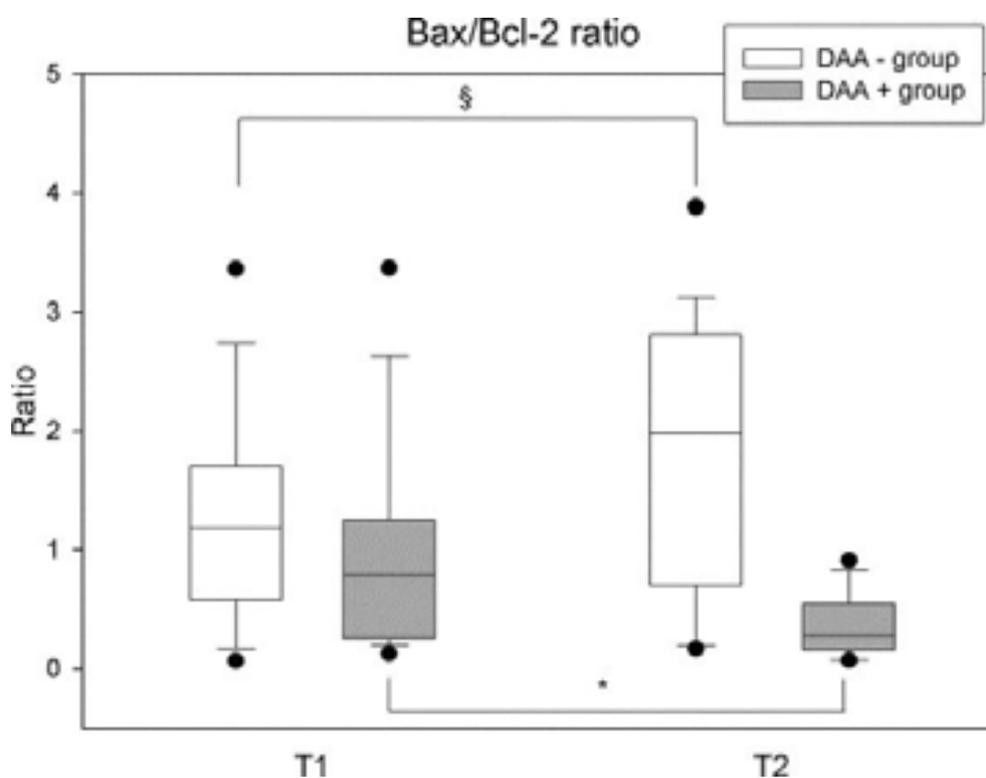


Figure 16 : Evolution du rapport Bax/Bcl-2 dans le groupe rhPCa (DAA+) comparé au groupe contrôle sans rhPCa (DAA-) à l'inclusion T1 et 36h après T2.

- Concernant le rapport Bax/Bcl-x1, il diminuait entre T1 et T2 dans les deux groupes mais avec une diminution significativement plus importante dans le groupe traité (respectivement, 1,31 vs 1,22, NS ; 2 vs 0,68, $p < 0,001$, test de Mann-Whitney) (Figure 17).

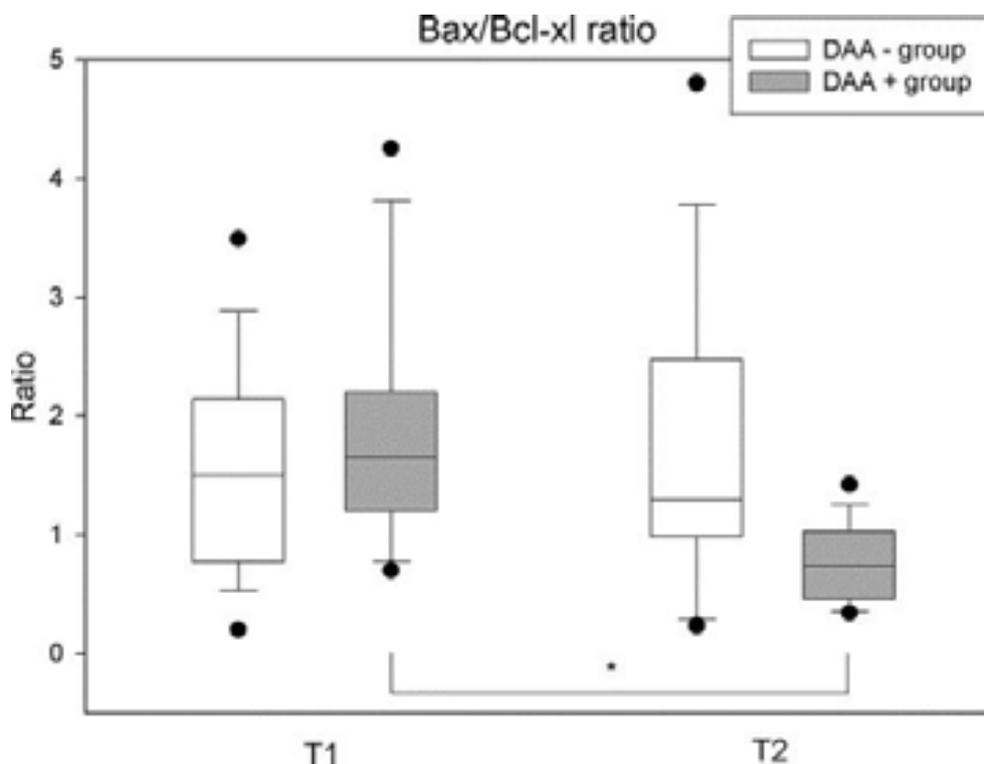


Figure 17 : Evolution du ratio Bax/Bcl-x1 dans le groupe rhPCa (DAA+) comparé au groupe contrôle sans rhPCa (DAA-) à l'inclusion T1 et 36h après T2.

De cette étude *in vivo* de patients en CS, nous pouvons en conclure que la rhPCa diminue significativement l'apoptose des cellules mononuclées circulantes, ce qui participe, en partie, à une élévation du nombre de lympho-monocytes sanguins disponibles. Cette étude confirme les données obtenues *in vitro* et précise que la rhPCa exerce des effets sur l'expression de gènes anti-apoptotiques en restaurant l'activité de Bcl-2.

Ce travail a fait l'objet de la **publication n°2** en 2007 dans la revue Critical Care Medicine.

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

Pascal Bilbault, MD; Thomas Lavaux, PharmD; Anne Launoy, MD; Marie P. Gaub, PhD; Nicolas Meyer, MD; Pierre Oudet, MD; Thierry Pottecher, MD; Albert Jaeger, MD; Francis Schneider, MD

Objective: Drotrecogin alpha (activated) (DAA), or recombinant human activated protein C, is a new treatment in sepsis-induced multiple organ failure, leading to significant reduction in the mortality rate, thanks to its anticoagulant properties. It has been suggested that DAA has anti-inflammatory and antiapoptotic effects in sepsis animal models. This study investigates the potential actions of DAA on circulating mononuclear cells apoptosis in human septic shock.

Design: Prospective, cohort study.

Setting: Two intensive care wards and two research laboratories in a university hospital.

Patients: Twenty-two septic shock patients with DAA treatment (DAA+), 19 septic shock patients without DAA treatment (DAA-), and 14 healthy controls were successively enrolled, but only 20 DAA+ and 16 DAA- patients fulfilled criteria for statistical analysis.

Interventions: Blood samples were collected at inclusion and 24 hrs later.

Measurements and Main Results: Circulating mononuclear cell apoptosis levels were assessed by flow cytometry with annexin V, and variations of the apoptotic rheostats (Bax/Bcl-2 and Bax/Bcl-xl

ratios) were analyzed by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. Apoptosis was significantly increased in septic shock patients (DAA+, $12 \pm 6.4\%$; DAA-, $10.4 \pm 5\%$) vs. healthy patients ($3.4 \pm 2.1\%$, $p < .001$). Twenty-four hours after DAA infusion, apoptosis was significantly lower in the DAA+ group compared with DAA- ones (respectively, $11.7 \pm 5.3\%$ and $16.2 \pm 7.6\%$, $p < .001$). At inclusion, DAA+ and DAA- groups showed comparable Bax/Bcl-2 ratio (DAA+, 0.92 ± 0.9 ; DAA-, 1.32 ± 0.87) and Bax/Bcl-xl ratio (DAA+, 2 ± 1.04 ; DAA-, 1.31 ± 0.93). In contrast, 24 hrs later we observed a significant decrease in these ratios, indicating an antiapoptotic effect in the DAA+ group (Bax/Bcl-2, 0.39 ± 0.27 ; Bax/Bcl-xl, 0.68 ± 0.36) compared with the DAA- group (Bax/Bcl-2, 1.81 ± 1.1 ; Bax/Bcl-xl, 1.22 ± 0.92 , $p = .001$ and $p = .039$, respectively).

Conclusions: *In vivo*, in human septic shock, DAA has anti-apoptotic effects on circulating mononuclear cells, assessed by a significant decrease of both the Bax/Bcl-2 and Bax/Bcl-xl ratios. (Crit Care Med 2007; 35:69-75)

KEY WORDS: activated protein C; sepsis; septic shock; apoptosis; Bcl-2 family; programmed cell death

Sepsis is the leading cause of death in critically ill patients (1). Every year, it affects 750,000 Americans with >200,000 deaths (1). Moreover, sepsis-related deaths have increased by 9% (every year) between

1979 and 2000, despite supportive intensive care (2). In the past decade, the pathophysiology of the sepsis syndrome was thought to be related to hyperinflammatory response (e.g., interleukin [IL]-6, IL-1, tumor necrosis factor [TNF]- α) (3), based on the concept of a delayed hypoinflammatory phase during the multiple organ dysfunction syndrome and sepsis-induced death (4). However, numerous trials aimed at attenuating the effects of these mediators failed to provide any significant improvement (reviewed in 5).

The main mechanism of immune dysfunction was identified as an excess of apoptosis-induced loss of cells involved in the adaptive immune system (5). Apoptosis or programmed cell death is a ubiquitous phenomenon for tissue homeostasis, and disorders of apoptosis have been linked to the pathogenesis of numerous diseases including cancer, inflammatory diseases, and neurologic disorders. It is

worth noting that autopsy observations in patients who died with multiple organ dysfunction syndrome revealed a significant increase of apoptosis in hemopoietic tissues like spleen and nodes and in the intestinal epithelial cells (6). Moreover, a recent study in humans revealed that the serum level of nucleosomes, which is a specific marker for apoptosis, is correlated with the outcome of sepsis (7). These data are consistent with animal models of sepsis which have shown that sepsis induces excessive lymphocyte apoptosis in several organs (8, 9) and that the prevention of lymphocyte cell death improves survival (10).

Apoptosis is known to be regulated by two major pathways. The first one involves death receptors and their ligands like members of the TNF superfamily, and the second one acts through the mitochondria under the control of the B cell lymphoma 2 (Bcl-2) family members. Proteins of the lat-

From Service de Réanimation Médicale (PB, AJ, FS), Laboratoire de Biologie Moléculaire (TL, MPG, PO), and Service de Réanimation Chirurgicale (AL, TP), Hôpitaux Universitaires, and School of Medicine, University L. Pasteur (TL, MPG, PO, FS, NM), Strasbourg, France.

This study was supported by the Grant n°2629 of the Programme Hospitalier Régional de Recherche Clinique 2001.

The authors have not disclosed any potential conflicts of interest.

Address request for reprints to: Pascal Bilbault, MD, Service de Réanimation Médicale, Hôpitaux Universitaires, Strasbourg, France. E-mail: pascal.bilbault@chru-strasbourg.fr.

Copyright © 2006 by the Society of Critical Care Medicine and Lippincott Williams & Wilkins

DOI: 10.1097/01.CCM.0000251133.26979.F4

ter family have either antiapoptotic (Bcl-2, Bcl-xl ...) or proapoptotic (Bax, Bak, Bid ...) functions (11) and the balance between Bax and Bcl-2 and Bcl-xl is critical for the regulation of cell survival (12). In animal sepsis models, Hotchkiss et al. (13) demonstrated that Bcl-2 expression is a potential target for therapeutic interventions. Likewise, it was reported in patients with septic shock that Bcl-2 expression is down-regulated early in circulating lymphomonocyte cells (CMNCs), with a significant correlation with the mortality rate (14).

Drotrecogin alpha (activated) (DAA), or recombinant human activated protein C, is a novel beneficial therapy for sepsis that has proven a 6.1% reduction of all-cause 28-day absolute mortality in septic shock patients. Hence, DAA is now usually used a safe treatment (15). A major mechanism of action of DAA is likely to be related to its anticoagulant properties. Indeed, other physiologic anticoagulant agents, such as antithrombin III and tissue factor pathway inhibitor, are less efficient than DAA for the treatment of sepsis (4), suggesting an involvement of one or more signaling pathways other than nuclear factor- κ B to account for the promising results of DAA in sepsis (16). Recently, an *in vitro* study conducted on human brain endothelial cell lines exposed to hypoxia indicated that DAA down-regulates the proapoptotic factor Bax and conversely up-regulates the antiapoptotic factor Bcl-2 (17). In another *in vitro* study on cultured endothelial cells, DAA directly reduced nuclear factor- κ B expression and functional activities and modulated apoptotic pathways such as the up-regulation of the inhibitor of apoptosis (18). However, to our knowledge, no such analysis has been performed in humans before.

On this basis, the aim of the current work was to evaluate the potential effect of DAA on sepsis-induced lymphocytes apoptosis in patients. For this purpose, we measured the level of CMNCs and the variation of apoptosis in relation to the balance between anti- and proapoptotic agents, before and after the onset of infusion of DAA in patients with septic shock.

MATERIALS AND METHODS

Patients

This study was approved by our institutional review board for human research. Special attention was paid to exclude patients having inherited or acquired immunodeficiency or who were under treatments that interfere with Bcl-2 family members, such as chronic

steroid use, immunosuppressors, or antineoplastic chemotherapy (19). 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 (20). Clinical evaluation of patients was based on the Simplified Acute Physiology Score II (21) at admission and the Logistic Organ Dysfunction score at inclusion (22). Patients were treated with both adequate antibiotics as soon as fever started and standard goal-directed therapy (23): mean arterial pressure >65 mm Hg, central venous pressure >8 – 12 mm Hg, urine output >0.5 mL/kg/hr. Patients were followed for 28 days or until death or discharge from hospital.

Because DAA reduces mortality rate in septic shock, it was not possible to conduct a randomized study (one arm with DAA and the second arm without) for ethical reasons. Therefore, our study population was divided into two cohorts:

19 patients admitted for nonseptic reasons in our intensive care unit, who later (>7 days) developed nosocomial septic shock according to standard criteria (24) between January 2003 and November 2003. These patients are referred to as the DAA- group. Three patients were excluded from statistical analysis due to exclusion criteria (death within 24 hrs before the second time point for blood tests, called the T2 point).

22 consecutive patients admitted for septic shock with criteria of inclusion in the DAA protocol between December 2003 (date of the introduction of DAA in our hospital) and December 2004. These patients are the DAA+ group. Two patients were excluded from statistical analysis due to exclusion criteria (severe thrombopenia).

In addition, 14 healthy people (seven women and seven men, average age of 40.6 ± 5.4 yrs) were enrolled, and blood samples were processed just as for DAA+ patients as controls for the biological measurements and for normal value calculations.

Blood Collections

Whole blood was collected with a venous or arterial catheter into three EDTA tubes (5 mL) and into one tube without EDTA; the samples were processed immediately. For DAA+ group, two time points were defined: baseline before infusion of DAA (T1) with a variable interval between the onset of shock, and 24–30 hrs later (T2). At each time point, plasma cytokine concentrations were dosed, CMNCs were counted, and Bax, Bcl-2, and Bcl-xl RNA relative expressions were quantified. For the DAA- group, baseline (T1) was defined at 12–18 hrs after the onset of fever and shock and T2 as 24–30 hrs later.

Plasma Cytokine Concentrations

Plasma was prepared by centrifugation of blood vials at $500 \times g$ for 10 mins at 4°C and stored in small aliquots at -80°C until analysis. Plasma IL-10 concentrations were measured using a specific enzyme-linked immunosorbent assay (Bender MedSystems, Vienna, Austria; sensitivity 2 pg/mL) using an automated system (EtiMax3000 DiaSorin, France). Plasma IL-6 and TNF- α concentrations were evaluated using a chemoluminescent immunometric assay (DPC, Paris, France). For each sample, the ratio IL-10/TNF- α was calculated. Plasma IL-8 analysis was performed using the CBA Human Inflammation Kit (BD Biosciences, San Jose, CA) according to the manufacturer's instructions. Plasma procalcitonin was measured using an immunoluminometric assay with a sensitivity of 0.3 ng/mL (ILMA, Brahms, Hennigsdorf, Germany).

Lymphocyte Subpopulation Counts

Lymphocyte subpopulations were determined by flow cytometry (FacsCalibur, Becton Dickinson, Rungis, France) 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 with anti-CD19 and the natural killer cells with anti-CD16 and anti-CD56. The absolute cell counts were obtained by mixing calibrated beads with the blood samples (Becton Dickinson Trucount, Rungis, France).

Annexin V Labeling for Apoptosis

After red cell lysis (Immunoprep, Beckmann Coulter, Fullerton, CA), the remaining cells were recovered by centrifugation and incubated 10 mins at room temperature with 100 μL of calcium-enriched buffer, 5 μL of annexin V (Annexin V-FITC; Immunotech, Beckmann Coulter, Marseille, France) following the manufacturer's protocols, and 5 μL of propidium iodide (Immunotech, Beckmann Coulter, Marseille, France) for immediate analysis by flow cytometry (FacsCalibur, Becton Dickinson, Rungis, France). Cells were considered as undergoing apoptosis when a positive signal for annexin V without propidium iodide labeling was detected.

Bax, Bcl-2, and Bcl-xl Relative Gene Expressions

Cells. Twenty milliliters of blood was drawn on EDTA, and CMNCs were isolated by Ficoll gradient centrifugation (Eurobio, Les Ulis, France). Aliquots of 10^6 cells were stored at -80°C .

Isolation of RNA and Complementary DNA (cDNA) Synthesis. Total RNA was isolated using RNeasy columns (Qiagen, Valencia, CA) and eluted in 33 μ L. The cDNA synthesis reaction was performed using the AMV reverse transcriptase kit (Roche Diagnostics, Meylan, France) according to the manufacturer's protocols.

Quantitative-Polymerase Chain Reaction Amplification. Real-time polymerase chain reaction (PCR) was performed according to the manufacturer's protocols (0.25 μ M of primers, 3 mM MgCl₂, 1 μ L of DMSO 20%, 2 μ L of PCR mix containing Taq polymerase and Sybrgreen reagent) in a 20- μ L final volume using a thermocycler (LightCycler, Roche, France). For relative quantification, we used the hydroxymethylbilane synthase (HMBS) as housekeeping gene, since the expression of this gene has already been shown to be a reliable standard in cancer and in hematologic diseases (25). In our case, we found that HMBS expression did not change significantly at infection start or in inflammatory conditions as assessed by measurement of the threshold cycle (Ct) value (cf *infra*) of HMBS, as already reported (26).

The primers (Genome Express, MTeuil, France) for cDNA amplification were as follows: HMBS (5'-forward: CTGGTAACGGGAATGCGGGCT; 3' reverse GCAGATGGCTCCGATGGTGA); Bax (5'-forward: ATCCAGATCGAGCAGGGCG; 3'-reverse: ACTCGCTCAGCTTCTTGGTG); Bcl-2 (5'-forward: CCGCTACCGCCGGGACTTC; 3'-reverse: AAACAGAGGCCGATGCTG) and Bcl-xl (5'-forward: ACCACCTAGGCCTTG; 3'-reverse: CTGGTCAATTCGGACTG).

The HotStart Taq polymerase (Roche Diagnostics, Meylan, France) was activated by being heated at 95°C during 8 mins. All duplicate PCRs were performed for 40 cycles, the denaturation step of 20 secs was performed at 95°C, the hybridization step of 20 secs was performed at 61°C, and the elongation step of 20 secs was performed at 72°C. Fluorescent signal from each PCR reaction was collected as peak-normalized values and plotted vs. the cycle number. Amplifications were compared by their Ct values estimated by the software (Roche, France). All the experiments were repeated at least twice.

Calculations. Gene expression quantifications were performed using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (26). The Ct value is defined as the number of PCR cycles required for the fluorescence signal to exceed the detection threshold value to the difference between the Ct value of the target gene and the Ct value of the reference gene in a sample. The correlation between the Ct value and number of copies was determined individually for each primer set by calculating the efficiency of the reaction. The relative gene quantification is based on the prerequisite that PCR amplification efficiency (E) is identical to the reference and target genes, with a variation of $E = 10^{-1/\text{slope}} < 0.05$. In our hands, serial dilutions of 50 ng

Table 1. Characteristics of septic shock patients treated (DAA+) or not (DAA-) with drotrecogin alpha (activated)

	DAA+ (n = 20)	DAA- (n = 16)	p
Age, yrs	62.2 \pm 15	64.6 \pm 16	NS
Male gender, %	45	56	NS
SAPS II	62.7 \pm 16.3	57.5 \pm 16.2	NS
LOD score	10.85 \pm 3.7	8.69 \pm 3.1	NS
Source of infection			
Pneumonia	8 (0.4)	10 (0.625)	NS
Peritonitis	8 (0.4)	1 (0.06)	NS
Urinary tract infection	2 (0.1)	2 (0.125)	NS
Wound infection	1 (0.05)	2 (0.125)	NS
Others	1 (0.05)	1 (0.06)	NS
Outcome, % who died	40	37	NS

NS, not significant; SAPS II, Simplified Acute Physiology Score on admission; LOD score, logistic organ dysfunction on inclusion.

Data are expressed as mean \pm SD or percentage of patients (%). p values denote comparison between DAA+ group and DAA- group.

to 0.5 ng of HeLa cDNA showed comparable efficiencies for Bax (E = 2.13), Bcl-2 (E = 2.11), Bcl-xl (E = 2.09), and HMBS (E = 2.13) with linear kinetics between respective Ct values. The ΔCt of Bcl-2, Bax, and Bcl-xl from the 14 healthy volunteers group was calculated as the average of the four time points. The resulting values (mean \pm SD) were 3.53 ± 0.59 for ΔCt Bax, 3.92 ± 0.76 for ΔCt Bcl-2, and 4.81 ± 0.64 for ΔCt Bcl-xl. In quantitative relative PCR, Ct values of targeting genes (Bax, Bcl-2, and Bcl-xl) are compared with Ct value of the reference gene, the housekeeping gene (HMBS), and normalized with our healthy control population by calculating relative concentration from $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{reference}})_{\text{patient}} - (Ct_{\text{reference}} - Ct_{\text{target}})_{\text{healthy control}}} = 2^{-(\Delta Ct_{\text{patient}} - \Delta Ct_{\text{healthy control}})}$ where Ct target is the Ct value of a gene of interest and Ct reference is the Ct value of the housekeeping gene. For a clearer presentation, we chose to represent the Bax/Bcl-2 and Bax/Bcl-xl ratios. Thus, a decrease of these ratios, compared with the baseline level, will correspond to an antapoptotic signal.

Statistical Analysis

Values are expressed as mean \pm SD. Where necessary, nonparametric comparisons of the mean were performed (Mann-Whitney U test or Wilcoxon test as required). Kinetic data were studied with the analysis of variance for repeated measurements, whereas non-Gaussian values were analyzed after a logarithmic transformation. Correlations between continuous variables were performed using Spearman's rank correlation tests. We considered $p < .05$ as significant. All statistical calculations were performed using a commercially available statistical software (SPSS 11.5 Lead Technologies).

RESULTS

Patients

Thirty-six patients were enrolled in the statistical analysis: 20 with septic shock treated with DAA (average age 62.2 ± 15 yrs; range, 20–81 yrs) and 16 with septic shock without DAA treatment (average age 64.6 ± 16 yrs; range, 45–83 yrs). A septicemia was present in 55% of patients in the DAA+ group vs. 56% in the DAA- group (not significant). Patient's characteristics are given in Table 1. On inclusion at T1, there were no significant differences between the two groups for the Simplified Acute Physiology Score II and the Logistic Organ Dysfunction scores or for the outcome.

Plasma Cytokine Concentrations

Inflammatory laboratory levels in the two groups are given in Table 2. At baseline (T1), there was no difference for the different cytokines between groups. TNF- α was increased at T1 and T2 in the DAA+ group, but without a significant difference. However, there was a significant decrease at T2 vs. T1 ($p = .002$) in the DAA- group. The DAA+ group did not show any significant difference over time for IL-10, in contrast to the DAA- group, which showed a significant decrease at T2 vs. T1 ($p = .0018$). Nevertheless, the ratio IL-10 to TNF- α did not vary significantly throughout the study in both groups. IL-6 had increased in the two groups but without any statistical difference over time. Only IL-8 showed a significant reduction at T2 vs. T1 in the

Table 2. Evolution of inflammatory biomarkers over time

Biomarkers	DAA+ (n = 20)		DAA- (n = 16)	
	T1	T2	T1	T2
CRP, mg/L	154.2 (85-281)	136.7 (36-293)	114.5 (55-157)	125.5 (31-237)
TNF- α , pg/mL	47.7 (7-199)	45.8 (4-239)	23.6 (4-58)	11.2 (2-45) ^a
IL-10, pg/mL	217.6 (7-1244)	158.1 (5-1441)	46.9 (2-181)	16 (2-54) ^a
IL-10/TNF- α ratio	3.34	2.51	3.34	2.52
IL-6, pg/mL	1702 (93-4986)	1124 (12-4986)	1717 (45-12,752)	580 (8-4968)
IL-8, pg/mL	710 (38-1673)	344 (29-1645) ^b	—	—

DAA+, drotrecogin alpha (activated)-treated septic shock patients; DAA-, control septic shock patients without DAA treatment; T1, baseline; T2, 24-30 hrs later; CRP, C-reactive protein; TNF, tumor necrosis factor; IL, interleukin.

^a*p* < .01 between T1 and T2; ^b*p* < .05 between T1 and T2. Data are given as mean (range).

Table 3. Evolution of cell count over time

Cells, $\times 10^9/L$	DAA+ (n = 20)		DAA- (n = 16)	
	T1	T2	T1	T2
WBCs	12.275 \pm 7.401	11.705 \pm 6.035	11.95 \pm 6.541	10.889 \pm 4.473
PMNs	11.612 \pm 6.68	9.724 \pm 0.369	9.693 \pm 6.02	8.949 \pm 4.604
Monocytes	0.311 \pm 0.35	0.746 \pm 0.541 ^{a,b}	0.596 \pm 0.438	0.549 \pm 0.288
Lymphocytes	0.537 \pm 0.309	1.133 \pm 0.681 ^c	0.943 \pm 0.461	1.111 \pm 0.499 ^d
Lymphocytes T	0.446 \pm 0.296	0.694 \pm 0.523 ^c	0.641 \pm 0.304	0.730 \pm 0.406
Lymphocytes B	0.126 \pm 0.112	0.117 \pm 0.107	0.101 \pm 0.83	0.111 \pm 0.085
Lymphocytes T CD4+	0.259 \pm 0.251	0.344 \pm 0.373	0.414 \pm 0.192	0.463 \pm 0.241
Lymphocytes T CD8+	0.165 \pm 0.166	0.203 \pm 0.186	0.206 \pm 0.136	0.233 \pm 0.154
Natural killer cells	0.055 \pm 0.08	0.049 \pm 0.047	0.099 \pm 0.08	0.106 \pm 0.096

DAA+, drotrecogin alpha (activated)-treated septic shock patients; DAA-, control septic shock patients without DAA treatment; T1, baseline; T2, 24-30 hrs later; WBCs, total white blood cells; PMNs, polymorphonuclear cells.

^a*p* < .001 between T1 and T2; ^b*p* = .002 between groups; ^c*p* = .003 between T1 and T2; ^d*p* < .05 between T1 and T2; ^e*p* = .011 between T1 and T2. Data are given as mean \pm SD.

DAA+ group (*p* < .03). In the DAA+ group, the procalcitonin profile was statistically the same over time (data not shown).

White Blood Cell Count

The total amount of white blood cells and polymorphonuclear cells was not significantly different in the two groups throughout the study (Table 3). For total lymphocyte count, there was a significant increase between T1 and T2, only in the DAA+ group (*p* = .001). With regard to the T-lymphocyte count, we observed a significantly higher level at T2 vs. T1 (*p* = .003) in the DAA+ group only. As far as monocytes are concerned, we observed a significantly lower level at T1 in the DAA+ group (*p* = .002) but a significant increase at T2 vs. T1 (*p* < 0.001) only in the DAA+ group.

CMNC apoptosis was significantly increased at inclusion in both DAA+ and

DAA- groups vs. healthy controls (respectively, 12 \pm 6.4%, 10.4 \pm 5%, 3.4 \pm 2.1%, *p* < .001). In addition, at T2, the kinetic profile of the studied groups was different. Indeed, we have observed a significant increase of CMNC apoptosis in the DAA- group (16.2 \pm 7.6%) compared with a stable level of apoptosis in the DAA+ group (11.7 \pm 5.3%, *p* < .001) (Fig. 1).

Bax, Bcl-2, Bcl-xl Relative Gene Expression

At baseline, we did not observe any significant difference between DAA+ and DAA- groups for all three gene expressions (i.e., Bax, Bcl-2, Bcl-xl).

Concerning Bax expression, we did not observe any significant variation in the DAA+ group between T1 and T2 (1.47 \pm 2.58 and 1.90 \pm 1.84, respectively) and in the DAA- group at T1 and T2 (3.09 \pm

3.38 and 2.53 \pm 2.17, respectively) and for the intergroup comparison.

For Bcl-2 expression, we found a significant increase between T1 and T2 (2.64 \pm 2.47 vs. 5.03 \pm 3.74, respectively, *p* = .023) in the DAA+ group, whereas the values were not significantly different in the DAA- group (T1, 3.65 \pm 3.13; T2, 2.91 \pm 3.56). Moreover, the comparison of the time course profile in both groups pointed out a significant increase in the DAA+ group (*p* = .017). It is worth noting that we observed a significant correlation between CMNC apoptosis and the level of Bcl-2 expression, at T2 in the DAA+ group (*r*² = .64; *p* = .023).

For Bcl-xl expression, like for Bax, we did not observe any significant variation in the DAA+ group between T1 and T2 (1.86 \pm 2.52 vs. 2.90 \pm 2.84, respectively) and in the DAA- group at T1 and T2 (4.41 \pm 5.42 vs. 4.2 \pm 3.91, respectively).

To better understand these results, we determined the balance between pro- and antiapoptotic factors by calculating the Bax/Bcl-2 and Bax/Bcl-xl ratios, which have both previously been described as rheostats triggering cells apoptosis (15, 16). These data are shown in Figures 2 and 3, respectively. There was a significant decrease of the Bax/Bcl-2 ratio (0.92 \pm 0.9 vs. 0.39 \pm 0.2, 7 respectively, *p* = .029) between T1 and T2 in the DAA+ group, whereas in the DAA- group, this ratio had significantly increased (T1, 1.32 \pm 0.87 vs. T2, 1.81 \pm 1.1, *p* = .013). Moreover, when we compared the time course profile of the Bax/Bcl-2 ratio by a multivariate analysis, the result was quite different between DAA+ and DAA- groups (*p* = .001). Consistent with the differences in Bax/Bcl-2 ratio between DAA+ and DAA- groups, the Bax/Bcl-xl ratio had also significantly decreased in the DAA+ group between T1 and T2: 2.0 \pm 1.04 vs. 0.68 \pm 0.35 (*p* < .001); unlike the DAA- group, the values were not statistically different (respectively, 1.31 \pm 0.93 and 1.22 \pm 0.92). When we compared the time course profile of this ratio between groups, there was a significant difference (*p* = .039).

DISCUSSION

Here, we provide evidence that DAA has antiapoptotic effects *in vivo* on human CMNC in septic shock. This report is in line with data obtained *in vitro* and *in vivo* in experimental animals and further suggests that DAA probably has a broader influence on human diseases than previ-

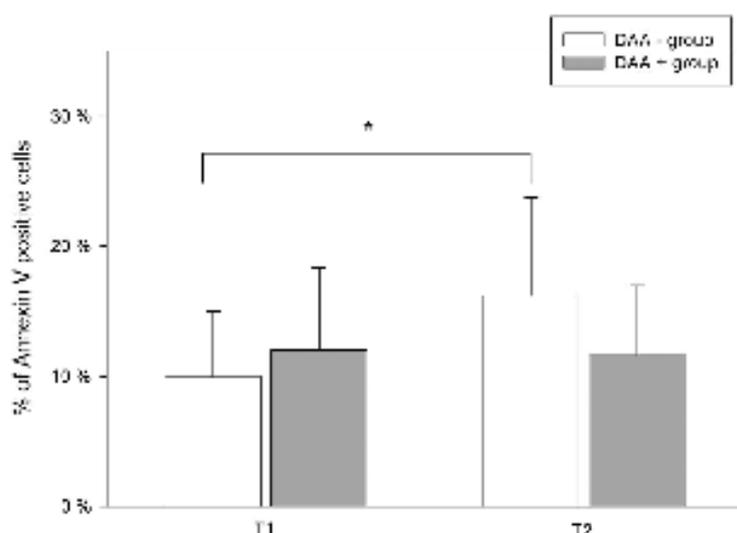


Figure 1. Evolution of annexin V labeling in circulating lympho-monocyte cells in the drotrecogin alpha (activated) treated (DAA+) group (gray bars) and in the group without drotrecogin alpha (activated) treatment (DAA-) (white bars) at time 1 (baseline) (T1) and time 2 (24–30 hrs later) (T2). In DAA+ group, annexin V labeling is not significantly different at both T1 and T2, in contrast to DAA- group, in which the increase of labeling is significant between T1 and T2 ($p < .001$). For each group and time, the mean values are expressed as percentage of annexin V positive cells.

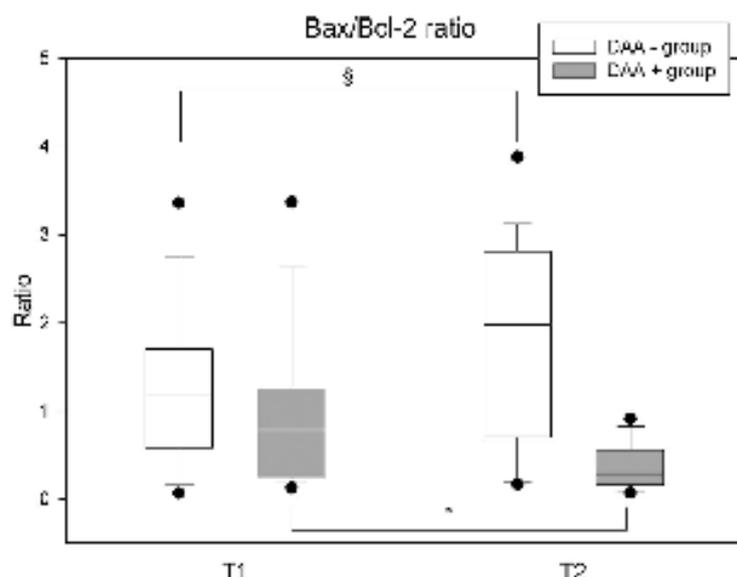


Figure 2. Evolution of the Bax/Bcl-2 ratio in the drotrecogin alpha (activated) treated (DAA+) group and in the group without drotrecogin alpha (activated) treatment (DAA-) at time 1 (baseline) (T1) and time 2 (24–30 hrs later) (T2). At T1, this ratio was not significantly different, but at T2, the Bax/Bcl-2 ratio increased significantly in the DAA- group ($\$p = .013$), whereas it decreased significantly in the DAA+ group ($*p = .029$). Box plot values of each group are shown.

ously thought from clinical experience in septic shock.

Despite considerable progress in basic knowledge and in the use of new therapeutic targets, septic shock remains a disease with high mortality risk. The theories and knowledge about the pathophysiology of

this condition have considerably changed in the past decade. Previous theories speculated on the role of proinflammatory cytokines (e.g., TNF- α , IL-1) as helpful mediators, but strategies aimed at amending these cytokines have all failed (5). Today, the pathogenesis of sepsis is

considered as a cascade of interactions between immune cells with a dynamic time course, which is not yet well understood (27). Only the IL-10/TNF- α ratio was associated with fatal outcome in febrile patients with community-acquired infection (28). Indeed in our study, despite their high levels, plasma cytokines did not show any significant relationship between CMNC and mortality. However, our results are consistent with those reported from the PROWESS trial (29) and with those of two experimental human studies in which the infusion of a low dose of endotoxin did not lead to any change of soluble cytokines levels (30, 31). In an *in vitro* study on human endothelial cells, Joyce et al. (18) showed that DAA inhibits cytokine signaling, including TNF- α induction. In other studies, DAA reduced TNF- α and IL-6 release after LPS challenge (32, 33). These results were not observed in our *in vivo* study, probably because of the different model used: human sepsis with different onsets of stress in the present work compared with staurosporine apoptosis induction in an *in vitro* cell culture model.

Today, it is well known that in severe sepsis and septic shock, there is a deep leukopenia, especially through lympho-monocyte loss, due to an up-regulation of apoptosis (9, 34, 35). Prevention of lymphocyte cell death by caspase inhibitors and overexpression of Bcl-2 in transgenic mice improves survival (10, 13). Some authors suggested that apoptosis of innate immune cells in sepsis could be a new target for therapeutics (36). As far as apoptosis is concerned, Joyce et al. (18) observed a decrease of cell death in *in vitro* cultures, linked to the up-regulation of both Bcl-2 and inhibitor of apoptosis protein expressions. In the present *in vivo* study, we found a significant decrease of CMNC apoptosis only in the DAA treated patients, and this decrease of CMNC apoptosis was correlated to a significant increase of the antiapoptotic Bcl-2 expression and to a slight increase of Bcl-xl expression, although not significant ($p = .21$), at 24 hrs of sepsis onset.

The proapoptotic protein Bax is essential during the fetal development, and lack of its expression is responsible for multiple development defects (37). Some apoptotic stimuli (e.g., hypoxia, ultraviolet radiation, growth factor deprivation) are known to enhance Bax activity (38). In both DAA+ and DAA- groups, we did not observe any significant alteration of

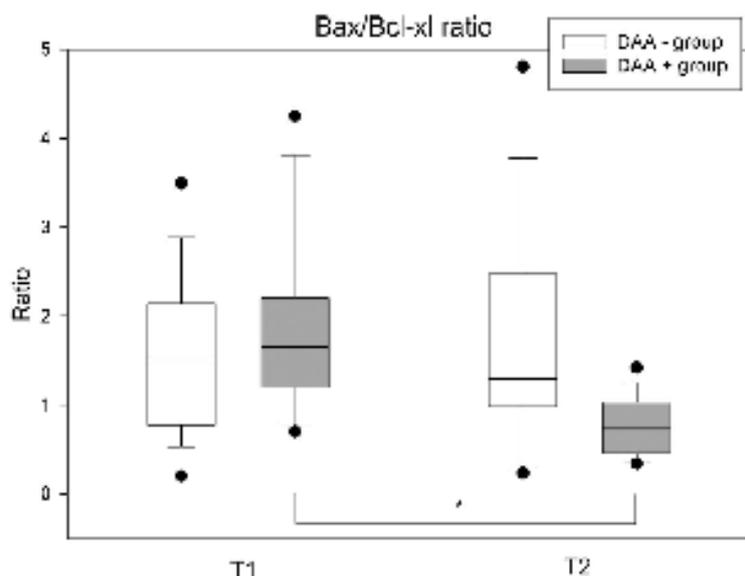


Figure 3. Evolution of the Bax/Bcl-xl ratio in the drotrecogin alpha (activated) treated (DAA+) group and in the group without drotrecogin alpha (activated) treatment (DAA-) at time 1 (baseline) (T1) and time 2 (24–30 hrs later) (T2). Only in the DAA+ group, this ratio shows a significant variation with a decrease at T2 vs. T1 (* $p < .001$). Box plot values of each group are reported.

Bax expression, as reported in a previous study (14).

Bcl-xl protein, another important antiapoptotic protein, inhibits mitochondrial swelling following cell-death stimuli (39), although the mechanism of Bcl-xl's protective action remains elusive (40). Recently, in a culture of embryonic rat septal neurons under prolonged oxygen-glucose depletion, overexpression of Bcl-xl was shown to block delayed cell death presumably by increasing mitochondria activity (41). Taken together, these results suggest that in human sepsis, DAA leads to a reduction of CMNC apoptosis, as previously reported in animal studies.

Despite the interesting results reported here, our study has some limitations. One concern is that open surgery itself can increase lymphocyte apoptosis, as suggested by a previous report including only gastric or esophageal carcinoma (42). In our study, only nine patients (eight in DAA+ vs. one in DAA-) had peritonitis and were operated. Three of these nine patients received DAA and were analyzed before (24–48 hrs) surgery (with DAA resumption afterward) and only five patients were analyzed after surgery (12 hrs). All biological data of these five patients did not differ significantly from the rest of the DAA+ group (Table 1, and data not shown), indicating that all DAA+ patients were eligible for statistical

analysis. Another limitation could be that this study did not randomize either group. Related to the documented clinical efficiency of DAA, a double-blinded study could no longer be performed after the publication of the PROWESS study, for ethical reasons. This is why we could only perform a cohort study from that moment. Accordingly, we prospectively included all the consecutive patients we received. For reasons linked to the design of the study, the time point of blood sampling could not be exactly the same in the two groups, but we performed these samplings at the same time point as far as the onset of septic shock is concerned. This is why, when taking into account the infection onset, it can reasonably be accepted to compare these patients in a study involving critical care patients, even though not all the former had similar characteristics as in an experimental study on animals.

To our knowledge, the present study describes for the first time in human sepsis-induced injury that the Bax/Bcl-xl ratio is significantly decreased upon DAA treatment, which is thought to prevent CMNC apoptosis. Thus, the decrease of the two major gene ratios (i.e., Bax/Bcl-2 and Bax/Bcl-xl) could be one of the molecular basis of the antiapoptotic action of DAA on CMNC in human sepsis. Yet, the mechanism of action of DAA on CMNC is still not known. We can hypothesize a

direct interaction of a membrane receptor as shown in endothelial cells (endothelial protein C receptor) with monocytes, since these cells also express the endothelial protein C receptor on their surface, but not with lymphocyte subpopulations (43). Why Bax expression does not change in septic conditions whereas it is up-regulated by other proapoptotic stimuli (e.g., hypoxia) is still an open question. Finally, this *in vivo* study provides evidence that beneficial effects of DAA on survival in human sepsis are dependent not only on its anticoagulant activity but also on an antiapoptotic activity through antiapoptotic gene expression regulation. This may represent a new way to select patients who could benefit from activated protein C during severe infection, as suggested recently (44).

REFERENCES

1. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, et al: Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated cost of care. *Crit Care Med* 2001; 29:1303–1310
2. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, et al: The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003; 348:1546–1554
3. Debets JM, Kampmeijer R, van der Linden MP, et al: Plasma tumor necrosis factor and mortality in critically ill septic patients. *Crit Care Med* 1989; 17:489–494
4. Mundford RS, Pugin J: Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:316–321
5. Hotchkiss RS, Karl IE: The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003; 348:138–150
6. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, et al: Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* 1999; 27:1230–1251
7. Zeeleder S, Zwart B, Willemin WA, et al: Elevated nucleosomes levels in systemic inflammation and sepsis. *Crit Care Med* 2003; 31:1947–1951
8. Hotchkiss RS, Swanson PE, Cobb JP, et al: Apoptosis in lymphoid and parenchymal cells during sepsis: Findings in normal and T and B cell-deficient mice. *Crit Care Med* 1997; 25:1298–1307
9. Hotchkiss RS, Chang KC, Swanson PE, et al: Caspase inhibitors improve survival in sepsis: A critical role of the lymphocyte. *Nat Immunol* 2000; 1:496–501
10. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, et al: Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:14541–14546
11. Kroemer G: The proto-oncogene Bcl-2 and

- its role in regulating apoptosis. *Nat Med* 1997; 3:614–620
12. Korsmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ, et al: Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an antioxidant pathway and cell death. *Semin Cancer Biol* 1993; 4:327–332
 13. Hotchkiss RS, Swanson PE, Knudson CM, et al: Over expression of Bcl-2 in transgenic mice decreases apoptosis and improves survival in sepsis. *J Immunol* 1999; 162: 4148–4156
 14. Bilbault P, Lavaux Th, Lahlou A, et al: Transient Bcl-2 gene down-expression in circulating mononuclear cells of severe sepsis patients who died despite appropriate intensive care. *Intensive Care Med* 2004; 30:408–415
 15. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, et al: Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001; 344:699–709
 16. Griffin JH, Zlokovic B, Fernandez JA: Activated protein C: potential therapy for severe sepsis, thrombosis, and stroke. *Semin Hematol* 2002; 39:197–205
 17. Cheng T, Liu D, Griffin JH, et al: Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective. *Nat Med* 2003; 9:338–342
 18. Joyce DE, Gelbert L, Ciaccia A, et al: Gene expression profile of antithrombotic protein C defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. *J Biol Chem* 2001; 276:11199–11203
 19. Debatin KM, Poncet D, Kroemer G: Chemotherapy: Targeting the mitochondrial cell death pathway. *Oncogene* 2002; 21:8786–8803
 20. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992; 101:1644–1655
 21. 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* 1993; 270:2957–2963
 22. 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* 1996; 276:802–810
 23. Rivers E, Nguyen B, Haustad S, et al: Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2001; 345:1368–1377
 24. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, et al: CDC definitions for nosocomial infections. *Am J Infect Control* 1988; 16:128–140
 25. Vandesompece J, De Preter K, Pattyn F, et al: Accurate normalisation of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; 3:1–12
 26. Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 2001; 25:402–408
 27. Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM: Septic shock. *Lancet* 2005; 365:63–78
 28. Van Dissel JT, Van Langvelde P, Westendorp RG, et al: Anti-inflammatory cytokine profile and mortality in febrile patients. *Lancet* 1998; 351:950–953
 29. Dhainaud JF, Yann SB, Margolis BD, et al: Drotrecogin alfa (activated) (recombinant human activated protein C) reduces host coagulopathy response in patients with severe sepsis. *Thromb Haemostasis* 2003; 90:642–653
 30. Derhaschnig U, Reiter R, Knöbl P, et al: Recombinant human activated protein C (rhAPC; drotrecogin alfa [activated]) has minimal effect on markers of coagulation, fibrinolysis, and inflammation in acute human endotoxemia. *Blood* 2003; 102: 2093–2098
 31. Kalil AC, Coyle SM, Um JY, et al: Effects of drotrecogin alfa (activated) in human endotoxemia. *Shock* 2004; 21:222–229
 32. White BJ, Schmidt M, Murphy C, et al: Activated protein C inhibits lipopolysaccharide induced nuclear translocation of NF-kappaB and TNF-alpha production in the THP-1 monocytic cell line. *Br J Haematol* 2000; 110:130–134
 33. Iba T, Kidokoro A, Fukunaga M, et al: Activated protein c improves the visceral microcirculation by attenuating the leukocyte-endothelial interaction in a rat lipopolysaccharide model. *Crit Care Med* 2005; 35:368–372
 34. Wesche DE, Lomas-Neira JL, Perl M, et al: Leukocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock. *J Leukoc Biol* 2005; 78: 325–337
 35. Hotchkiss RS, Osmon SB, Chang KC, et al: Accelerated lymphocyte death in sepsis occurs by both the death receptor and mitochondrial pathways. *J Immunol* 2005; 174: 5110–5118
 36. Oberholzer C, Oberholzer A, Clare-Salkler M, et al: Apoptosis in sepsis: A new target for therapeutic exploration. *FASEB J* 2001; 15: 879–892
 37. Knudson CM, Tung KSK, Tourtelotte WG, et al: Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science* 1995; 270:96–99
 38. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, et al: Proapoptotic BAX and BAK: A requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 2001; 292:727–730
 39. Van der Heiden MG, Chandel NS, Williamson EK, et al: Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* 1997; 91:627–637
 40. Gupta S, Knowlton A: HSP60, Bax, apoptosis and the heart. *J Cell Mol Med* 2005; 9:51–58
 41. Panicker KS, Nonner D, Barrett JN: Overexpression of Bcl-xL protects septal neurons from prolonged hypoglycemia and from acute ischemia-like stress. *Neuroscience* 2005; 135:73–80
 42. Nishiguchi K, Okuda J, Toyoda M, et al: Comparative evaluation of surgical stress of laparoscopic and open surgeries for colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 2001; 44: 223–230
 43. Joyce DE, Nelson DR, Grinnell BW: Leukocytes and endothelial cell interactions in sepsis: Relevance of the protein C pathway. *Crit Care Med* 2004; 32(5 Suppl):S280–S286
 44. Carlet J: Prescribing indications based on successful clinical trials in sepsis: A difficult exercise. *Crit Care Med* 2006; 34:525–529

1.3. Troisième objectif : rhPCa et expression intracellulaire de cytokines de l'inflammation dans les cellules lympho-monocytaires

Parallèlement nous avons étudié l'expression intracellulaire de cytokines pro-et anti-inflammatoires chez ces mêmes cellules. En effet nous savons, qu'au niveau sérique, l'analyse des variations de sécrétions des différentes cytokines mesurables (en général par méthode ELISA) n'apporte pas d'information sur la gravité ni le pronostic du CS. Aussi, nous nous sommes intéressés à l'expression transcriptionnelle intracellulaire sur les lympho-monocytes circulants de patients en CS afin d'observer si la rhPCa exerçait une variation d'expression de cytokines connues pour être impliquées dans la réponse inflammatoire du CS.

Les cytokines sont des médiateurs intercellulaires fondamentaux pour déclencher, modifier ou arrêter la réponse inflammatoire et en particulier celle induite par le sepsis. De nombreuses cytokines sont impliquées dans cette réponse (> 20) qui ont des cibles cellulaires et effets physiologiques différents et encore imparfaitement connus. Les dosages sériques (méthode ELISA) de ces cytokines sont disponibles et ont permis d'améliorer notre compréhension de la physiopathologie du CS. Néanmoins, leurs quantification et/ou profil évolutif au niveau sérique n'a pas, à ce jour, d'impact sur le diagnostic ni sur le monitoring du CS en clinique humaine²⁰⁸.

L'objectif de ce travail a été d'explorer si la rhPCa pouvait induire des modifications de transcription de cytokines au niveau des cellules mononuclées circulantes, *in vivo*, dans le sepsis chez l'homme.

Nous avons inclus rétrospectivement 32 patients en CS, 16 dans le bras rhPCa et 16 le bras contrôle (patients contre-indiqués pour la rhPCa). Les patients étaient appareillés pour les données démographiques, gravité et origines du sepsis. Comme l'étude précédente, les prélèvements sanguins étaient réalisés à l'introduction de la rhPCa (temps T1) et 36 heures après (temps T2).

Nous avons quantifié :

- les sous-populations lympho-monocytaires,
- le taux sérique (méthode ELISA) de trois cytokines circulantes : TNF- α , I et IL-10,
- l'expression intracellulaires de ces 3 cytokines au niveau des lympho-monocytes circulants par méthode RT-qPCR sur ARN total extrait de ces cellules (aliquots de 10^6 cellules). Les résultats sont exprimés en médiane avec interquartile [25-75] et la variation d'expression est représentée par le ratio (T2-T1)/T1.

Nous avons observé les résultats suivants :

- Les sous populations lymphocytaires CD4+ et CD8+ étaient identiques dans les deux groupes à T1 ainsi que leur évolution à T2.
- Les dosages sériques de TNF- α , IFN- γ et IL-10 ne présentaient pas de différence significative d'évolution entre les groupes traité et non traité aux différents temps de l'étude.
- Une diminution d'expression de l'IFN- γ à T2 dans le groupe rhPCa mais qui n'était pas observée dans le groupe contrôle (respectivement, -0,34 [- 0,62 ; + 1,54] vs + 1,41 [+0,35 ; +5,87], $p = 0,008$, test de Mann-Whitney) (Figure 18).

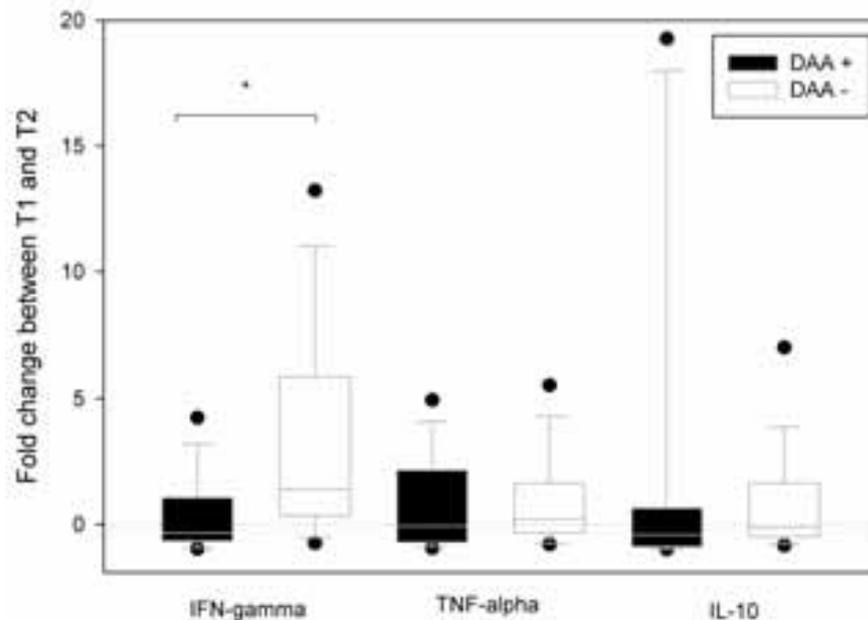


Figure 18 : Evolution de l'expression de l'ARNm de l' IFN- γ , TNF- α et IL-10 dans les lympho-monocytes circulants de patients en CS, traités avec de la rhPCa ($n=16$) et non traités ($n=16$) entre l'inclusion (T1) et après 36h d'évolution (T2). La variation d'expression (ou fold change) des cytokines est calculée par le rapport (T2-T1) / T1. (*: $p=0.008$ comparer au groupe contrôle, Mann-Whitney test).

- Lors de l'analyse des sous-groupes survivants / décédés, nous avons observé une diminution significative dans le groupe traité rhPCa de l' IFN- γ (- 0,65 [- 0,93 ; -0,48] vs + 0,7[- 0,04 ;+ 1,26], p = 0,01 test de Mann-Whitney) et de l'IL-10 (- 0,78 [- 0,92 ; - 0,6] vs - 0,18[- 0,68 ; + 0,46], p= 0,038 test de Mann-Whitney) (Figure 19).

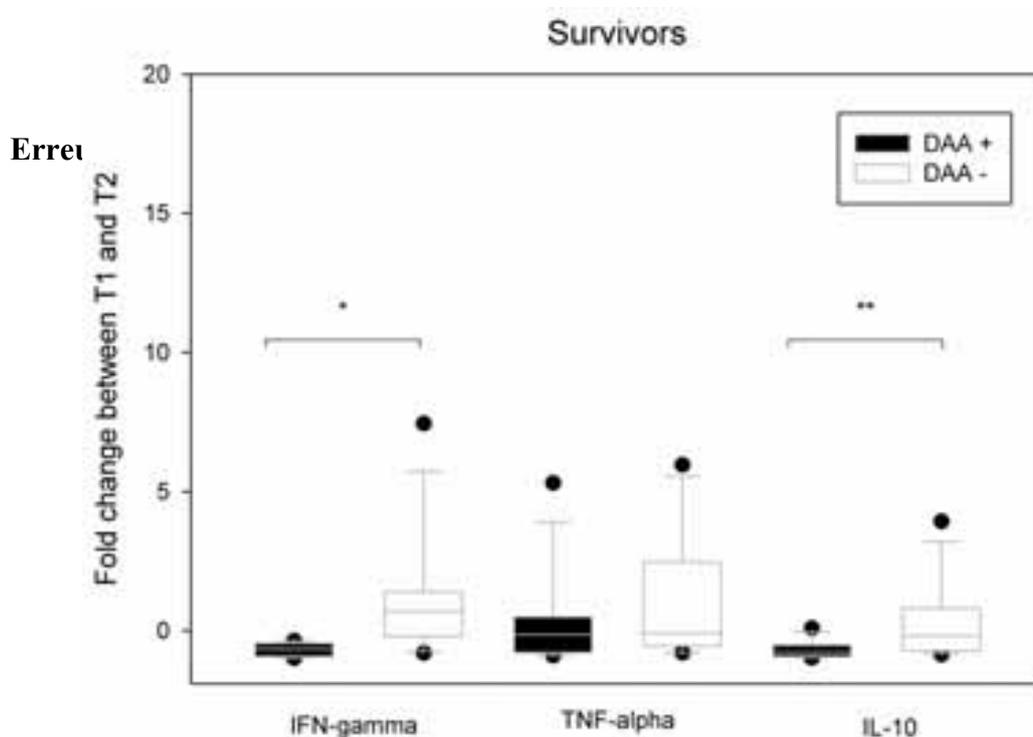


Figure 19 : Evolution de l'expression de l'ARNm de l'IFN- γ , TNF- α et IL-10 dans les lympho-monocytes circulants des patients en CS survivants, traités avec de la rhPCa et non traités, entre l'inclusion (T1) et après 36h d'évolution (T2). La variation d'expression (ou fold change) des cytokines est calculée par le rapport (T2-T1) / T1. (*: p=0.01, **: p=0.038, Mann-Whitney test)

- Chez les patients décédés il n'existe pas de variation significative entre le groupe rhPCa et le contrôle (Figure 20).

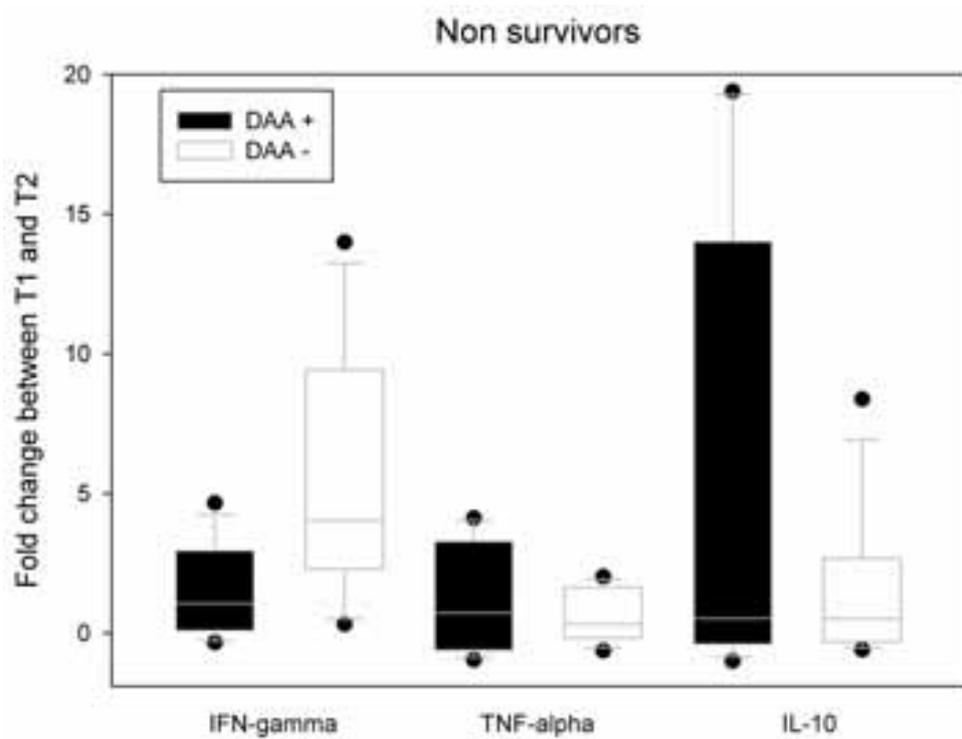


Figure 20 : Evolution de l'expression de l'ARNm de l'IFN- γ , TNF- α et IL-10 dans les lympho-monocytes circulants des patients en CS décédés, traités avec de la rhPCa et non traités, entre l'inclusion (T1) et après 36h d'évolution (T2). La variation d'expression (ou fold change) des cytokines est calculée par le rapport $(T2-T1) / T1$.

- De plus dans le groupe rhPCa il existe, chez les patients qui vont survivre par rapport aux décédés, une diminution significative des niveaux d'expression de l'IFN- γ (- 0,65 [- 0,14 ; - 0,78] vs + 1,07 [+ 0,22 ; +2,79], $p < 0,001$ test de Mann-Whitney) et de l'IL-10 (-0,78 [-0,92 ; -0,06] vs +0,54 [-0,35 ; +11,52] $p = 0,038$ test de Mann-Whitney) (Figure 21).

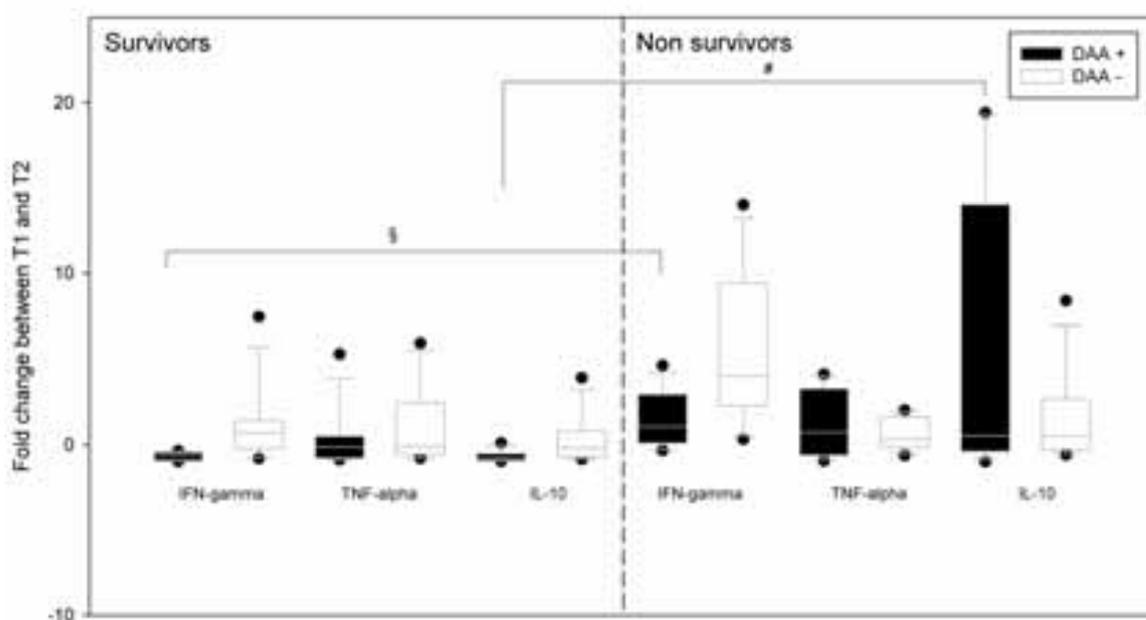


Figure 21 : Comparaison d'évolution de l'expression de l'ARNm de l'IFN- γ , TNF- α et IL-10 dans les lympho-monocytes circulants de patients en CS suivant le critère vivant/décès, traités avec de la rhPCa et non traités, entre l'inclusion (T1) et après 36h d'évolution (T2). La variation d'expression (ou fold change) des cytokines est calculée par le rapport $(T2 - T1) / T1$. (§: $p = 0.038$, #: $p < 0.001$ respectivement, Mann-Whitney test).

- Enfin, concernant l'expression du TNF- α , nous n'avons observé aucune variation significative d'expression entre les groupes et quelque soit le devenir des patients.

Ces résultats sont, à notre connaissance, les premiers disponibles à partir d'étude *in vivo* chez l'Homme. Ils sont cependant partiellement discordants avec ceux observés *in vitro* où la rhPCa augmente la sécrétion d'IL-10 sur des monocytes humains stimulés par le LPS ²⁰⁹. Mais il nous semble important de noter que la concentration de rhPCa employée dans l'étude de Toltl et col (120 ng/mL) est trois fois supérieure au dosage utilisé en clinique (cf introduction).

Néanmoins nous avons constaté que la rhPCa induit une élévation significative d'expression de l'IL-10 chez les patients qui vont décéder, suggérant qu'il existe des patients « répondeurs » à la rhPCa et d'autres non. Pachot et col²¹⁰ ont examiné, sur sang total (tube PAXgène), l'expression de plusieurs cytokines dont l'IL-10 chez des patients en CS comparée à une population de sujets sains. Leurs résultats objectivèrent une augmentation significativement plus importante de l'expression de l'IL-10 (et de HMGB-1) chez les patients non-survivants. Nos résultats sont en accord avec ceux-ci où nous avons observé un taux significativement plus élevé d'expression de l'IL-10 dans le groupe rhPCa qui vont décéder et une même tendance dans le groupe contrôle. Les auteurs précédents ont utilisé de l'ARN issus de tube PAXgène (sang total) considéré comme plus stable que l'ARN issus de tubes EDTA²¹¹. Cette dernière étude n'a cependant étudié la stabilité des ARN qu'à température ambiante (22°C) ou à -80°C sur des durées longues (de un à cinq jours) et pas à +4°C sur des durées courtes (< 8 h) comme dans notre étude. Nos conditions expérimentales apparaissent correspondre aux variations observées sur l'ARN total. L'isolement des lympho-monocytes et l'extraction de l'ARN n'aurait pas modifié les quantités relatives d'ARN synthétisées.

Ainsi nos résultats mettent en évidence une action intracellulaire de la rhPCa avec modulation d'expression cytokinique sur les lympho-monocytes circulants dans le CS chez l'homme. De plus la rhPCa induit une diminution significative d'expression d'IFN- γ et d'IL-10 chez les patients qui vont survivre, suggérant que l'expression génique d'IFN- γ et d'IL-10 au niveau des cellules mononuclées circulantes pourrait être un marqueur d'efficacité de la rhPCa *in vivo*.

Ce travail est en révision à la revue Critical Care.

IL-10 gene down-expression in circulating mononuclear cells after 36h infusion of drotrecogin- α activated: a pilot study

Thomas LAVAUX¹ (PharmD, PhD), Pascal BILBAULT² (MD), Anne LAUNOY³ (MD), Marie-Pierre GAUB¹ (PharmD, PhD), Pierre OUDET¹ (MD), Francis SCHNEIDER² (MD).

¹ Biochemistry and Molecular Biology.

² Intensive Care Unit,

³ Department of Anesthesiology,

Hôpital de Hautepierre, Hôpitaux Universitaires et Université de Strasbourg, France

Correspondence:

Pascal Bilbault, Service de Réanimation Médicale, Hôpital de Hautepierre, avenue Molière, 67098 Strasbourg Cedex, France.

E-mail: pascal.bilbault@chru-strasbourg.fr

Key words: drotrecogin- α (activated); gene expression; interferon gamma; interleukin-10; protein C activated; septic shock; outcome.

ABSTRACT:

Introduction: To investigate the gene expression of interferon-gamma (IFN- γ), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interleukin-10 (IL-10) in circulating mononuclear cells harvested from septic shock patients on drotrecogin- α activated (DAA) in order to determine whether this treatment has any effect on the inflammation phase.

Methods: We have conducted a prospective cohort study in two intensive care departments. Blood samples were collected at inclusion (T1) and 36h later (T2) to measure plasma cytokines and the changes in intracellular TNF- α , IL-10 and IFN- γ mRNA expressions using RT-qPCR. Thirty two septic shock patients were included: 16 with DAA at 24 μ g/kg/h/96h (DAA+) and 16 control (DAA-) eligible but contraindicated for DAA because of low platelet count.

Results: The basal characteristics were similar in both groups: mortality (50%), plasma cytokine concentrations, and baseline IFN- γ , TNF- α and IL-10 mRNA expressions (DAA+ vs. DAA-). At T2, there was a significant IFN- γ gene down-regulation in DAA+ but not in DAA- patients (-0.34 [-0.62;+1.54] vs. +1.41 [+0.35;+5.87], p=0.008). In survivors, DAA administration was associated with a down-expression of both IFN- γ (-0.65 [-0.93;-0.48] vs. +0.7 [-0.04;+1.26], p=0.01) and IL-10 (-0.78 [-0.92;-0.6] vs. -0.18 [-0.68;+0.46], p=0.038). In nonsurvivors, DAA infusion was associated with IL-10 over-expression when compared with survivors (+0.54 [-0.35;+11.52] vs. -0.78 [-0.92;-0.6], p<0.001).

Conclusion: In this study, lack of IL-10 gene down-expression despite a 36-h infusion of DAA is an ominous sign in septic shock patients suggesting that DAA is not able to reverse outcome. Our results show that DAA significantly decreases anti-inflammatory cytokines expression in septic shock patients and IL-10 or IFN- γ gene down-expression could be markers of DAA response.

Introduction:

To improve outcome, continuous infusion of drotrecogin- α activated (DAA) is recommended over 96h at a rate of 24 μ g/kg/h in septic shock patients as early as possible [1]. This dosage has raised cost / effectiveness concerns. Yet, since DAA has been made commercially available, *in vitro* studies have highlighted many more properties for this molecule and it can no longer be ignored [2]. A convenient biomarker of its “best use” would be welcome to select patients who could truly benefit from this treatment. This test has never been done for several reasons: (1) single and serial measurements of plasma concentrations of inflammation biomarkers are inconsistent and do not reliably predict outcome in septic patients [3], and (2) since the effect of infused DAA probably changes according to the endogenous concentration of activated protein C at any given moment, it is currently difficult to know if patients are responding to this drug and whether DAA dosage should be adapted when treatment is started without monitoring its plasma concentration over 96h—a complicated and expensive procedure.

In addition, there are methodological pitfalls in septic shock trials relating to the diversity of sources of infection and the exact time it started. Also, the inflammatory response triggered by pathogen-associated molecular patterns through Toll-like receptors (TLR) activates a fast response by the nuclear factor κ B (NF- κ B) pathway. Because the cellular signaling of TLRs can be modified by polymorphism [4] and the subunits of NF- κ B expression may be affected by DAA [5], participants in DAA clinical trials should have TLRs and NF- κ B expressions as similar as possible so that groups can be appropriately compared. Only then will genes targeted by the NF- κ B complex be expressed on a sound basis of comparison. Although, conclusions would be more reliable, large clinical trials taking all these parameters into account would be much too expensive.

This study was conducted in real-life conditions of septic shock management to address the following question: does DAA have any tangible effect on the early pro-inflammatory response to septic shock, measured as a change in TNF- α (TNF- α), interferon-gamma (INF- γ), and interleukin-10 (IL-10) mRNA expressions in circulating mononuclear cells (CMNCs) harvested from patients and true controls? If so, this would provide an early indication of improvement, and perhaps a DAA efficiency biomarker.

Patients, Materials and Methods:

This study was approved by our institutional review board for human research and informed written consent was obtained from each participant. Patients with inherited or acquired immunodeficiency were excluded.

Over 1 year, we included 16 consecutive patients following the criteria of septic shock according to the definition of the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference [6] treated with DAA (DAA+ group) with the standard dosage (24 μ g/kg/h/96h, with a mean plasma concentration of 45ng/mL of DAA [2]), and 16 patients as a control group fulfilling septic shock criteria and eligible for DAA but contraindicated (platelet count <30,000/mm³ and/or uncontrolled bleeding).

We defined T1 as the moment within 12h after fulfilling septic shock criteria and before giving DAA; T2 was set 36h later. The Simplified Acute Physiology Score II [7], the Logistic Organ Dysfunction score [8] and 28-day mortality were recorded. Plasma concentrations of IL1-beta, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, TNF- α , IL-10, IFN- γ and IL-12 were measured (CBA Human inflammation kit, BD Biosciences, San José, CA, USA) and lympho-monocytes subpopulations determined by flow cytometry (Becton Dickinson, Rungis, France).

Aliquots of 20 ml of whole 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 and quantitative real-time PCR were performed with a gene reporter (HMBS) as reported [9]. The primers for NF- κ B sub-units (p50, p65 and I κ B α) were purchased from Genome Express, Montreuil, France. For cytokines transcriptional expression (TNF- α , IL-10 and IFN- γ) QuantiTect Primer Assays primers (Qiagen, Courtaboeuf, France) were used. Gene expression was assessed using the 2-DDCT method as reported [10]. The TLR-2 (G2408A) and TLR-4 (A12874G and C13174T) polymorphisms were detected using a hybridization probe assay according to reported method [4].

Statistical analysis:

T1 and T2 gene expressions are expressed according to previous studies [6]. Values are expressed as means \pm SD or as median and interquartile range [25-75]. For cytokines gene expression, results are expressed as fold change calculated as the ratio (T2-T1)/T1. Kinetic data were studied with analysis of variance for repeated measurements (Friedman's two-way analysis). Comparisons of the mean were made by non-parametric tests (Mann-Whitney U-test or Kruskal-Wallis). Association with the genotype was sought with logistic regression. $p < 0.05$ was considered as significant.

Results:

Clinical and basic biological characteristics (Table 1)

Clinical characteristics of the groups are shown in Table 1. No difference between DAA+ group and control group was found concerning SAPS II (respectively 62.7 ± 2.8 vs 61.5 ± 3.7), LOD score (respectively 9.3 ± 0.8 vs 8.4 ± 0.8) and ICU stay (respectively 32.9 ± 8.8 vs 54.2 ± 19.3 days). Source of infection, types of germ and number of septicaemia were statistically non significant between the two groups (Table 1). Mortality rate was 50% in both groups.

TLRs polymorphisms

To assess whether TLRs polymorphism had a role in DAA response, we searched for TLR-2 and TLR-4 polymorphisms in the DAA+ and DAA- groups. Results are indicated in Table 1. No significant difference of distribution was found between DAA group and control group regarding TLR-2 or TLR-4 polymorphisms. Concerning TLR-4 we observed a similar prevalence of the double mutation Asp299Gly Thr399Ile in both DAA and control groups (Table 1) as previously described [11].

Lymphocyte subsets

No statistical change was found between the DAA+ or DAA- groups 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).

Pro and anti-inflammatory cytokine profiles

To establish Th1/Th2 profiles, several cytokines were measured in serum at T1 and T2: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, TNF- α , IL-10, IFN- γ and IL-12. Only IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , IL-10, IFN- γ showed values above detection threshold. No significant change of cytokine profile was found over time between both studied groups and regarding TLR-4 or TLR-2 polymorphisms (Table 2). Concerning TNF- α , IL-10, IFN- γ , we did not find any correlation with their intracellular mRNA expression and their serum level throughout the study.

Evolution of intracellular mRNA expressions (Figures 1 and 2)

From T1 to T2, the fold changes of mRNA expressions of p50, p65, and I κ B α NF- κ B subunits were not significantly different between groups or between survivors and non survivors (data not shown).

At T1, IFN- γ , TNF- α and IL-10 mRNA expressions were similar in both groups (DAA+ vs. DAA-). At T2, there was a significant IFN- γ gene down-regulation in DAA+ but not in DAA- patients: -0.34 [-0.62;+1.54] vs. +1.41 [+0.35;+5.87] respectively, $p=0.008$ (Figure 1).

When we analysed the survival/non-survival subgroups, we found that in the survivors DAA administration was associated with a down-expression of both IFN- γ (-0.65 [-0.93;-0.48] vs. + 0.7 [-0.04;+1.26], $p=0.01$) and IL-10 (-0.78 [-0.92;-0.6] vs. -0.18 [-0.68;+0.46], $p=0.038$) (Figure 2A). In non survivors, there was no significant difference of expression for the three cytokines expression with or without DAA (Figure 2B). Nevertheless, in non survivors, DAA infusion was associated with IL-10 over-expression (+0.54 [-0.35;+11.52] vs. -0.78 [-0.92;-0.6], $p=0.038$) and IFN- γ over-expression (+1.07 [+0.22;+0.79] vs. -0.65[-0.14;-0.78], $p<0.001$) when compared with survivors (Figure 2C). Finally, there were no differences between groups for TNF- α gene expression whatever the outcome.

Discussion:

In our septic shock patients with clinical and biological characteristics as similar as possible to real-life conditions, a continuous infusion of DAA resulted in changes worthy of note in the IFN- γ gene expression, suggesting that the drug had an early anti-inflammatory influence, yet IL-10 was not significantly reduced. Moreover, when survival is also considered, IL-10 dampens the pro-inflammatory reaction of early septic shock in survivors, whereas it fails to do so in non survivors at the same point of treatment. The lack of IL-10 gene expression decrease by CMNCs is associated with an ominous outcome even if full supportive treatment is provided. These data suggest that: (1) DAA infusion interferes *in vivo* with IFN- γ and IL-10 gene expressions through NF- κ B-independent modulation, (2) continued IL-10 and IFN- γ gene expression despite a 36-h infusion of DAA may indicate that a standard dosage of DAA fails to affect outcome.

Increased plasma concentrations of cytokines such as IFN- γ , TNF- α or IL-10 is a hallmark of septic shock and has negative consequences for recovery, although no clinically relevant thresholds have been proposed [3,12]. However, data on plasma cytokine concentrations do not seem to determine outcome because the exact onset of sepsis-driven cytokines release is usually not clearly definable in septic patients [13]. Therefore, in this study we checked cytokine gene expression by CMNCs, and confirm that changes to them occur without consequences on plasma levels in accordance with previous studies [14]. The most significant drawbacks of this approach are the routine availability of the RT-qPCR technique in a hospital laboratory and the time required to obtain the lab test result, which nevertheless takes a few hours (<6h) with commercially available techniques of molecular biology.

Our data are in partial accordance with *in vitro* studies that claim that DAA up-regulates IL-10 in LPS-stimulated human monocytes [15]. Yet *in vitro* the DAA concentration required is significantly higher (120ng/mL) than that achieved *in vivo* with standard infusion (45 to 52ng/mL) [2,16]. In our setting, IL-10 gene expression was dramatically increased in non surviving patients given DAA suggesting either a greater IL-10 gene up regulation by DAA in patients with poor prognosis, or simply that DAA has no effect on high IL-10 up regulation by sepsis itself. Since the baseline gene expression levels were not significantly different between groups whatever the outcome and treatment, we suggest that DAA has an influence that is not necessarily powerful.

One of the limitations of our study is that it is underpowered but our hypothesis can not be tested in a random fashion in a large population of patients since DAA availability can not be refused in the absence of contraindication for ethical reasons. Furthermore, in septic shock DAA may actually require a higher infusion rate than the standard one to reach cellular efficiency (ie: dampening IL-10 gene expression). Conversely, DAA may have no effect on patients with continuous IL-10 expression despite a 36h infusion. Hence, maintaining DAA for 96h as recommended would be questionable. In both situations, the level of IL-10 up regulation in CMNCs after 36h DAA infusion may become a biomarker of efficiency. The time required to obtain the IL-10 gene expression ratio is technically feasible during the working hours of the laboratory: consequently, in a patient infused 36h with a T2 test indicating a lack of IL-10 and IFN- γ gene down-regulation, the standard DAA dosage could be reduced after approximately the half scheduled dosage has been infused (which would result in a 50% saving of the drug). This warrants confirmation by a prospective randomized placebo study including only patients with IL-10 over expression.

Conclusion:

If IL-10 and/or IFN- γ gene down expression fail to occur despite 36h of DAA infusion in septic shock patients, maintaining treatment for 96h as recommended becomes questionable. IL-10 and IFN- γ gene expressions by CMNCs could become a biomarker of DAA efficiency in this setting.

Key messages:

- drotrecogin- α (activated) has early anti-inflammatory effects at the transcriptional level on circulating mononuclear cells
- Checking the transcriptome of cytokines/chemokines in immune cells could be a new approach for monitoring the effect of drotrecogin- α (activated) in sepsis

Author's contributions:

TL and PB contributed to conception, analysis and interpretation of data. AL contributed to acquisition of data. PB and FS wrote the manuscript. MPG revisited it for biological contents. FS and PO have given final approval.

Competing interests:

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgement

The authors acknowledge a partial support from the 2001-2629 grant of the regional Projet Hospitalier de Recherche Clinique.

References

1. 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.** *N Engl J Med* 2001, **344**:699-709.
2. Macias WL, Yan SB, Williams MD, Um SL, Sandusky DE, Ballard DW, Planquois JM: **New insights into the protein C pathway: potential implications for the biological activities of drotrecogin alfa (activated).** *Crit Care* 2005, **9**:S38-S45.
3. Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM: **Septic shock.** *Lancet* 2005 **365**:63-78.
4. Salomao R, Martins PS, Brunialti MK, Fernandes Mda L, Martos LS, Mendes ME, Gomes NE, Rigato O: **TLR signalling pathway in patients with sepsis.** *Shock* 2008, **30**:S73-S77.
5. 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* 2002, **30**:S288-S293.
6. 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* 2003, **31**:1250-1256.
7. Le Gall JR, Lemeshow S, Saunier F: **A new simplified acute physiology score (SAPS II) based on European/North American multicenter study.** *JAMA* 1993, **270**:2957-2963.
8. Le Gall JR, Klar J, Lemeshow S, Saulnier F, Alberti C, Artigas A, Teres D: **The logistic organ dysfunction system. A new way to assess organ dysfunction in the intensive care unit.** *JAMA* 1996, **276**:802-810.
9. 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* 2007, **35**:69-75.
10. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method.** *Methods* 2001, **25**:402-408.
11. 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* 2002, **162**:1028-1032.
12. Scumpia PO, Moldawer LL: **Biology of interleukin-10 and its regulatory roles in sepsis syndrome.** *Crit Care Med* 2005, **33**:S468-S471.
13. Pierrakos C, Vincent JL: **Sepsis biomarkers: a review.** *Crit Care* 2010, **14**:R15.
14. Kox WJ, Volk T, Kox SN, Volk HD: **Immunomodulatory therapies in sepsis.** *Intensive Care Med* 2000, **26**:S124-S128.
15. Toltl LJ, Beaudin S, Liaw PC, Canadian Critical Care Translational Biology Group: **Activated protein C up-regulates IL-10 and inhibits tissue factor in blood monocytes.** *J Immunol* 2008, **181**:2165-2173.
16. Levy H, Small D, Heiselman DE, Riker R, Steingrub J, Chen R, Qualy RL, Darstein C, Mongan E: **Obesity does not alter the pharmacokinetics of drotrecogin alpha (activated) in severe sepsis.** *Ann Pharmacother* 2005, **39**:262-267.

	DAA + (n=16)	DAA – (n=16)	p
Age (yr)	67.4 \bar{y} 4.0	67.9 \bar{y} 2.7	NS
SAPS II	62.7 \pm 2.8	61.5 \pm 3.7	NS
LOD score	9.3 \pm 0.8	8.4 \pm 0.8	NS
Septicaemia [n (%)]	9 (56 %)	11 (69 %)	NS
ICU stay (days)	32.9 \pm 8.8	54.2 \pm 19.3	NS
Mortality at Day 28 [n (%)]	7 (43%)	8 (50 %)	NS
Type of bacterium : n (%)			
Gram-positive	8 (50 %)	6 (37 %)	
Gram-negative	5 (31 %)	6 (37 %)	NS
Others (fungi)	3 (19 %)	6 (37 %)	
Source of infection : n (%)			
Pneumonia	6 (37%)	9 (56%)	
Peritonitis	5 (31 %)	2 (12.5%)	NS
Others	5 (31%)	4 (25%)	
Toll-like receptors genotyping: n			
Genotype of TLR-2 (Arg753Arg/Arg753Gln/Gln753Gln)	16/0/0	16/0/0	NS
Genotype of TLR-4 (Asp299Asp/Asp299Gly/Gly299Gly)	12/4/0	15/1/0	NS
Genotype of TLR-4 (Thr399Thr/ Thr399Ile/Ile399Ile)	12/4/0	15/1/0	NS

Table 1 Patient characteristics. Data are means +/- SD. The respective p values result from the non-parametric Kruskal-Wallis test, while associations with the genotype were searched with logistic regression. SAPS II : Simplified Acute Physiology Score II on admission; LOD score: Logistic Organ Dysfunction score; TLRs: Toll like receptors; NS: non significant.

	DAA+ n=16		DAA- n=16		p
	T1	T2	T1	T2	
TNF-alpha (pmol/mL)	15.6[13-22.4]	6.6[2-11.4]	48[29-66]	35[21.1-85]	NS
IL-1(pmol/mL)	32.1[17.1-54.1]	30.1[16-31]	39.6[20.8-58.3]	110.3[88.2-132.3]	NS
IL-6(pmol/mL)	824.5[161.5-507.5]	140,7[38,8-265]	1885[1102.1-2500]	533.2[52-1992.8]	NS
IL-8(pmol/mL)	623[102.5-2348.3]	110[31.6-159.8]	402.3[289.1-754.1]	103.1[67.3-256.4]	NS
IL-10(pmol/mL)	47[26.2-54]	12.4[8.6-23.3]	90[44.8-1048.8]	26.7[8.8-201.1]	NS
IFN- γ (pmol/mL)	5[3-25]	2[2-3]	16[5.3-24]	2[2-3]	NS

Table 2 Serum cytokines level of DAA+ and control groups. Data are expressed as median [IQR 25-75]. DAA+: septic shock patients treated with DAA. DAA-: septic shock patients contraindicated to rhAPC treatment. T1: time-point before DAA infusion; T2: time-point 36h after infusion of DAA. The p value: analysis of variance for repeated data (T1 and T2). NS: non significant.

Fig. 1 Evolution of IFN- γ , TNF- α and IL-10 mRNA expressions in CMNCs from DAA + (n=16) and DAA- patients (n=16) between inclusion (T1) and after a 36h DAA infusion (T2). Box and whiskers plots show median and interquartile range [25-75]. Fold change is calculated as the ratio (T2-T1)/T1. DAA: drotrecogin alpha activated. IFN- γ expression is significantly reduced in the DAA+ group (*: p=0.008, Mann-Whitney test) than in the control group.

Fig. 2 Evolution of IFN- γ , TNF- α and IL-10 mRNA expressions in CMNCs from DAA + (n=16) and DAA- patients (n=16) between inclusion (T1) and after a 36 h DAA infusion (T2). Box and whiskers plots show median and inter quartile range [25-75]. Fold change is calculated as the ratio (T2-T1)/T1. DAA: drotrecogin- α activated.

- A. In survivors (n=8) there is a significant lower expression of IFN- γ in the DAA+ group (*: p=0.01, Mann-Whitney test) and also a significant decrease of IL-10 expression in survivors (DAA+ group) than in survivors of controls DAA- (**: p=0.038, Mann-Whitney test).
- B. B. In non-survivor groups (n=8) there is no significant difference of cytokines expression between DAA+ and control groups.
- C. C. When we compare survivors versus non survivors, there is a significant over-expression for both IFN- γ and IL-10 in DAA+ non survivors compared to DAA+ survivors (§: p= 0.038, #: p < 0.001 respectively, Mann-Whitney test).

1.4. Quatrième Objectif : première approche par transcriptomique des modulations d'expressions géniques lors du choc septique

A partir des connaissances actuelles (cf Première Partie) et de nos propres résultats, il apparaît très vraisemblable que plusieurs mécanismes sont différemment mobilisés suivant les sous-populations cellulaires à différents temps de la progression du CS. Nous avons mentionné plus haut les mécanismes responsables de la microcirculation, réaction inflammatoire, phagocytose, nécrose...

A ce stade et tenant compte des données accumulées dans la littérature et les bases de données internationales, il est possible de mettre en œuvre une approche progressive plus systématique en confrontant les données multiples obtenues à grande échelle sur nos cohortes de patients aux résultats issus de la biologie des systèmes. Ceci à pour objectif immédiat de dégager un ensemble de marqueurs potentiels protéiques, génomiques, transcriptomiques ou lipidomiques utilisables et d'envisager l'impact de leur modulation dans des systèmes animaux puis chez l'homme.

Une première étape a été de quantifier les variations de plus de 45000 gènes *in vivo* dans le CS chez l'homme suite à l'administration de rhPCa à la posologie recommandée. Ceci fut réalisé par extraction de l'ARN des populations cellulaires analysées après hybridation et quantification de l'expression de l'ensemble des gènes sur des sondes spécifiques fixées sur un support solide.

Analyse transcriptionnelle par puce d'hybridation de l'expression génique induite par le choc septique chez l'Homme. Effets de la rhPCa.

1.4.1. Introduction :

Comme nous l'avons vu en première partie, la physiopathologie du CS est complexe et le reste encore malgré d'intenses recherches. L'analyse ou la recherche de marqueurs biologiques pris isolément par des techniques comme le dosage sérique par ELISA, l'analyse de protéines par Western Blot ou l'expression de gènes par RT-PCR ont permis des avancées partielles mais qui deviennent insuffisantes et soumises à des biais expérimentaux multiples. Aussi, la recherche de méthodes différentes d'analyse ayant une vue plus synthétique du syndrome septique est d'actualité.

Devant l'avancée des connaissances liées à la recherche sur le génome humain d'une part et d'autre part l'apparition de technologies miniaturisées de plus en plus performantes couplées à des protocoles expérimentaux et des modèles biomathématiques de plus en plus sophistiqués, de nouvelles techniques biologiques sont apparues récemment et qui peuvent être regroupées derrière les termes « omique » ou « ome » : génomique, protéomique, phéno-omique, métabolomique, lipidomique, transcriptome, intégratome et *diseasome*^{212 213}. Pour notre part nous avons choisi dans un premier temps l'analyse du transcriptome.

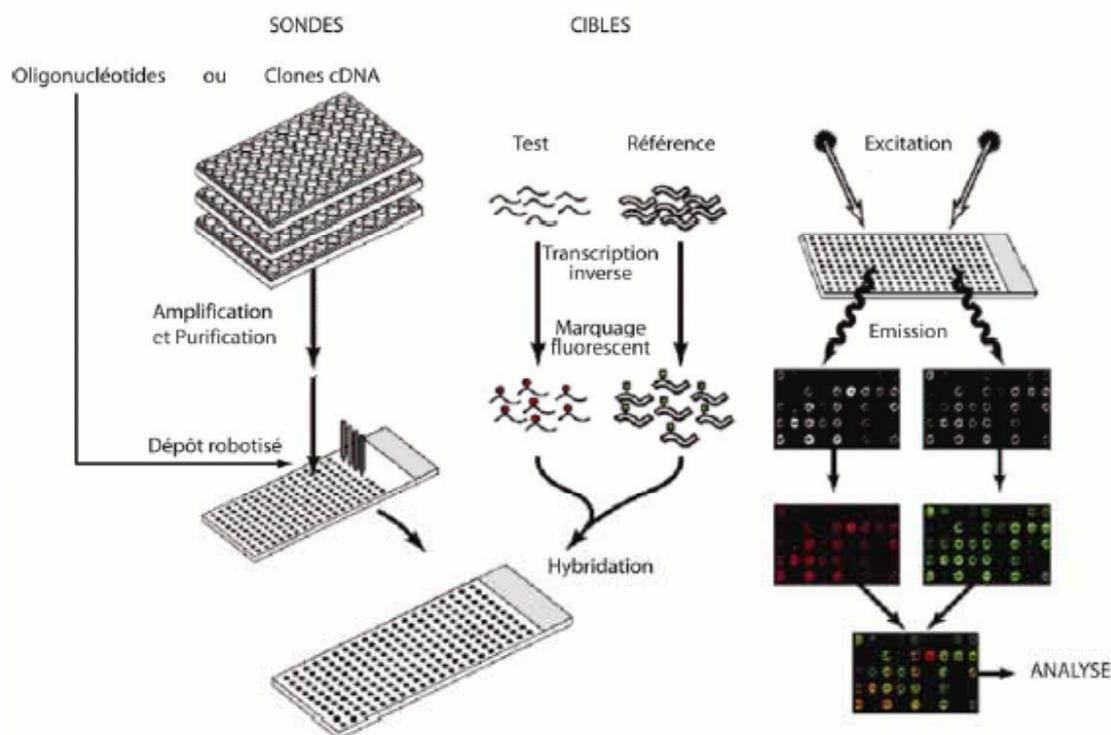
1.4.2. Transcriptome : principes

Le produit final de l'expression du matériel génétique est la formation de protéines qui vont exercer l'activité biologique. Mais l'information contenue dans l'ADN n'est pas transcrite directement : elle est d'abord transcrite en différents ARN qui secondairement produiront les protéines. Cette étape intermédiaire est elle-même régulée dans les cellules eucaryotes. L'analyse de l'ensemble des ARN présents dans une cellule à un instant donné se retrouve sous le terme de transcriptome. On distingue ainsi actuellement au moins deux types de régulation : d'abord la modulation quantitative du nombre d'ARN messagers transcrits contrôlés par des facteurs de transcriptions et des modifications épigénétiques mais plus encore la modulation qualitative des ARN produits (initiation, épissages alternatifs, terminaisons).

L'analyse des transcrits n'est pas nouvelle et débute par la réalisation d'hybridation selon la technique de *Northern blot*, réalisé généralement sur membrane de nitrocellulose ou analyse en phase liquide, permettant une analyse qualitative et semi-quantitative de l'ARN. Ces analyses sont réalisées après des copies des ARN sous forme d'ADN simple brin ou ADNc. Mais depuis la fin des années 90 et le développement de supports solides (*chip ou puce*) où sont fixés des sondes pour hybridation en phase solide, il est possible de condenser sur une plaque de quelques microns plusieurs dizaines de milliers de sondes nucléiques (oligonucléotides ou ADNc). Ainsi sont apparus d'abord les *arrays* (rangs ordonnés) sur membranes de nylon puis par miniaturisation les *micro-arrays* par implantation de sondes d'hybridation sur lame de verre.

Ces puces sur lames de verre planes peuvent aussi être maintenant réalisées sur des billes ou même sur fibre optique. Par ailleurs cette technologie ne s'applique pas qu'aux ARN mais aux ADN et protéines avec la mise en évidence de mutations²¹⁴.

Le principe de fonctionnement est assez simple : l'acide nucléique à amplifier est d'abord amplifié par PCR et marqué (traceur isotopique ou maintenant fluorochrome) puis hybridé sur la puce ADN. Après lavage, les hybrides sont repérés grâce au marquage par scanner puis interprétés par un logiciel spécifique (recherche et quantification d'expression, recherche de variation de séquences) (Figure 22).



Les sondes : les oligonucléotides ou clones d'ADNc sont déposés sur la lame de verre.

Les cibles : les cibles Test et Référence sont couplées à deux marqueurs fluorescents différents (par exemple, cyanine verte (Cy3) et cyanine rouge (Cy5)), puis assemblées pour former le mélange complexe et être hybridées aux sondes préalablement déposées.

La lecture : elle est réalisée par un scanner muni d'un microscope confocal, couplé à deux lasers, possédant des longueurs d'onde spécifiques aux marqueurs fluorescents. L'excitation et l'émission des fluorochromes produisent deux images en niveau de gris, qui sont converties en pseudo-couleur et fusionnées pour être analysées par un logiciel d'analyse d'images.

Figure 22 : Schéma simplifié de l'étude du transcriptome par puces à ADN.
D'après ²¹⁵

Dans notre travail nous avons utilisé des puces à ADN de la société Affymetrix qui sont des plaques miniatures de silice brevetées (*Genechip*®) sur lesquelles sont fixés des oligonucléotides de 25 bases synthétisés *in situ* par un procédé de photolithographie (technique des microprocesseurs) pouvant analyser 5 à 10 000 gènes par puce par 15 sondes différentes par gène.

Une des limitations de ce protocole est l'important bruit de fond qu'il convient de limiter par des contrôles stricts de qualité et des tests statistiques adaptés au volume et à la complexité des résultats obtenus²¹⁶. De plus les puces ne détectent que les variations importantes d'expression mais celles-ci ne sont pas forcément importantes sur le plan physiologique. Et enfin tout le matériel transcrit n'est pas traduit en protéines : on estime qu'environ 60 % des ARN sont traduits en protéine. Donc chaque expression différentielle de gène doit être confirmée par une analyse protéomique ou à défaut par mesure en RT-qPCR.

Enfin l'analyse du transcriptome, à ce jour, ne permet guère une étude globale d'expression de l'ensemble des transcrits notamment les gènes faiblement transcrits (du fait d'un bruit de fond élevé, de signaux plusieurs fois moyennés) mais rend possible une analyse ciblée de voies de signalisations ou métaboliques qui dans une situation clinique donnée peuvent représenter une signature de la pathologie concernée.

1.4.3. Objectif de l'étude :

Depuis moins de dix ans l'analyse transcriptomique s'est développée rapidement et faisant naître des espoirs d'avancées dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques des maladies. Poursuivant notre but d'étudier l'apoptose dans le CS et vus les résultats de la littérature ainsi que les nôtres qui montrent des données toujours plus nombreuses mais sommes toutes assez disparates, il nous a semblé intéressant d'utiliser cette nouvelle technologie de recherche. En effet l'analyse du transcriptome semble pouvoir donner une « vue d'ensemble » des phénomènes observés dans le CS, de pouvoir relier les voies biologiques entre elles et de pouvoir découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques. Notre but a été d'observer chez des patients en CS, les variations d'expression du transcriptome au moment du diagnostic, de suivre cette variation sur la période initiale de la réanimation et d'observer l'impact éventuel de la rhPCa sur ce transcriptome.

1.4.4. Patients et méthodes :

A partir de 2006, tout patient en CS inclus dans le travail précédent, avait un prélèvement sur tube PAXgène (laboratoire Qiagen) pour analyse des ARN totaux isolés des cellules nucléées circulantes (lympho-monocytes et polynucléaires). Les patients en CS présentaient tous une pneumopathie documentée. Notre groupe contrôle était obtenu par des patients en CS sur pneumopathie mais contre-indiqués à la rhPCa. Une fois prélevés les tubes PAXgène étaient stockés à -80°C jusqu'à analyse. Le protocole des prélèvements biologiques est le même que pour les études précédentes : temps T1 au moment du diagnostic de CS avec ou non (groupe contrôle) indication à l'utilisation de la rhPCa et le temps T2, 36h après. Les principales caractéristiques des patients sont colligées sur le Tableau 6.

	rhPCa + (n=10)	rhPCa - (n=10)	P
Age (an)	70 ± 13.4	67.1 ± 13.7	NS
Genre Féminin [n (%)]	3 (30 %)	5 (50 %)	NS
IGS II	62.7 ± 2.8	61.5 ± 3.7	NS
LOD score	9.1 ± 0.8	8.4 ± 0.8	NS
Traitements par vasopresseurs (n)	10	10	NS
Ventilation Mécanique (n)	10	10	NS
Septicémie [n (%)]	7 (70 %)	6 (60 %)	NS
Durée de séjour en Réanimation (jours)	31.9 ± 9.8	44.2 ± 11.3	NS
Mortalité à J28 [n (%)]	5 (50 %)	5 (50 %)	NS
Type de bactérie : n (%)			
Gram-positive	4 (40 %)	3 (30 %)	NS
Gram-negative	6 (60 %)	6 (60 %)	NS
Autres (fungi)	0 (0 %)	1 (10 %)	NS
Source d'infection : n			
Pneumonie	10	10	NS

dysfonction d'organes ; NS : non significatif.

Tableau 6 : Caractéristiques cliniques des patients : rhPCa : protéine C activée recombinante humaine ; IGS : indice de gravité simplifié ; LOD score : score de défaillance d'organes.

L'extraction de l'ARN était réalisée suivant le protocole recommandé par le kit RNA-easykit® (laboratoire Qiagen). Brièvement, l'ARN total de l'échantillon est traité l'échantillon par protéases et DNAses, élué sur colonne, puis précipité à l'éthanol. Il est conservé en suite à -80°C .

L'analyse du transcriptome a été faite par hybridation des ADNc correspondant sur puces HG-U133_Plus_2 (54675 sondes, Affymetrix Santa Clara, CA) sur la plateforme Biopuces de l'IGBMC, Pôle d'Innovation d'Illkirch. Des contrôles de qualités sont effectués sur le bio-analyseur Agilent en vérifiant que le rapport 28S/18S soit $>1,7$ et le RNA Integrity Number >7 , nous permettant alors de garder tous nos échantillons comme valides.

L'analyse bio-informatique a été réalisée au laboratoire de Bioinformatique et Génomique Intégratives de l'IGBMC pour la partie CS à T1 en utilisant un groupe contrôle les 48 patients sains issus de GEO, Gene Expression Omnibus du National Center for Biothechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>)²¹⁷. La plateforme protéomique CLIPP (CLInical Proteomic Plateform) de Dijon a réalisé l'analyse bioinformatique comparative comportant les données des patients traités ou non par la rhPCa.

L'objectif de cette analyse est de transformer l'intensité du signal en une valeur d'expression quantitative en tenant compte de l'ensemble des sondes. Pour ce faire, il existe des algorithmes qui permettent de « normaliser » ce signal. Il en existe trois principaux :

- MAS5 (MicroArray Suite, propriété d'Affymetrix),
- RMA (Robust Multichip Array Analysis)
- et le plus utilisé le GCRMA (Gene Chip Robust Multichip Array Analysis).

L'objectif de l'analyse bio-informatique est de mettre en évidence les variations significatives relatives à des mécanismes biologiques en augmentation ou diminution.. Puis différents tests statistiques sont utilisés (modèle ANOVA à 2 facteurs et algorithme Baysien empirique) pour comparer les variations d'expression (en moyenne) entre groupes avec un seuil de variation (ou *fold change*) retenu comme valide >2 .

1.4.5. Résultats :

1.4.5.1. Caractéristiques du transcriptome au moment du diagnostic de choc septique

L'analyse a été faite sur l'ensemble des patients, soit 20 patients au temps T1 comparer au groupe contrôle de la population de référence (patients sains). Nous avons observé 1 379 gènes significativement sur-exprimés (avec un *fold change* qui varie de + 2 à + 415) pour 1 859 significativement sous-exprimés (avec un *fold change* qui varie de - 2 à - 14).

Pour interpréter toutes ces données recueillies nous avons interrogé quatre banques de données structurées de transcriptomes accessibles sur le net :

- Biocarta Database (banque d'analyse de gènes et voies de signalisation, San Diego, USA ; <http://biocarta.com/>)
- David Bioinformatics database (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery du National Institute of Allergy and Infection, USA) ²¹⁸
- Ingenuity Pathways Analysis Knowledge Base (Ingenuity® Systems, Redwood City, CA, USA) ²¹⁹
- STRING database (banque de données d'interaction protéine-protéine ; <http://www.string-db.org/>) ²²⁰

Le groupe contrôle est représenté par un panel de 48 personnes saines, appareillées en âge et sexe issus de la base GEO. Pour les quatre bases de données, les recherches ont été effectuées exclusivement pour le genre *Homo sapiens*.

- *Base de données Biocarta :*

A partir des codes identifiants Affymetrix que nous avons téléchargés dans le logiciel d'exploitation de cette base, nous avons obtenu deux cartographies : l'une des gènes sur-exprimés (Figure 22) et l'autre sous-exprimés (Figure 23). Sur ces cartographies les gènes ont été classés en 3 groupes : processus biologiques, fonctions moléculaires et composants cellulaires. Chaque groupe est décliné en sous-groupe ou clusters fonctionnels. Pour les clusters significativement sur ou sous-exprimés figurent le nombre de gènes impliqués et le niveau de significativité. Globalement les clusters significativement surexprimés, par rapport au contrôle, sont : les organelles correspondants (réticulum endoplasmique, vésicule), des activateurs de la coagulation, les protéines de réparation et de façon moindre les mécanismes impliqués dans l'inflammation et des systèmes enzymatiques d'oxydo-réduction. Les clusters sous-exprimés sont : facteurs nucléaires et nucléolaires, facteurs de différenciation lymphocytaires, gènes du TCR et l'expression des ARN dont les ARN ribosomiaux.

Nos résultats suggèrent que l'activité transcriptionnelle est globalement diminuée dans les cellules sanguines circulante dans le CS.

Concernant la sur-expression relative des mécanismes d'oxydo-réduction, nous observons 76 gènes sur-exprimés en particulier ceux liés au métabolisme du fer et du zinc. Un seul gène de cette activité est réprimé, il s'agit d'une sous-unité nucléaires mitochondriale de la NADH déhydrogenase. Ces résultats sont en phase avec ceux obtenus par Gharib et col ²²¹ qui dans un modèle expérimental murin de pneumonie (injection intra-trachéal de LPS) retrouve ces mêmes activités enzymatiques comme troisième cluster sur-exprimé. Une raison évoquée est l'origine pulmonaire du sepsis, où les pneumonies induisent une augmentation de l'activité des cytochromes de la famille P450 ²²².

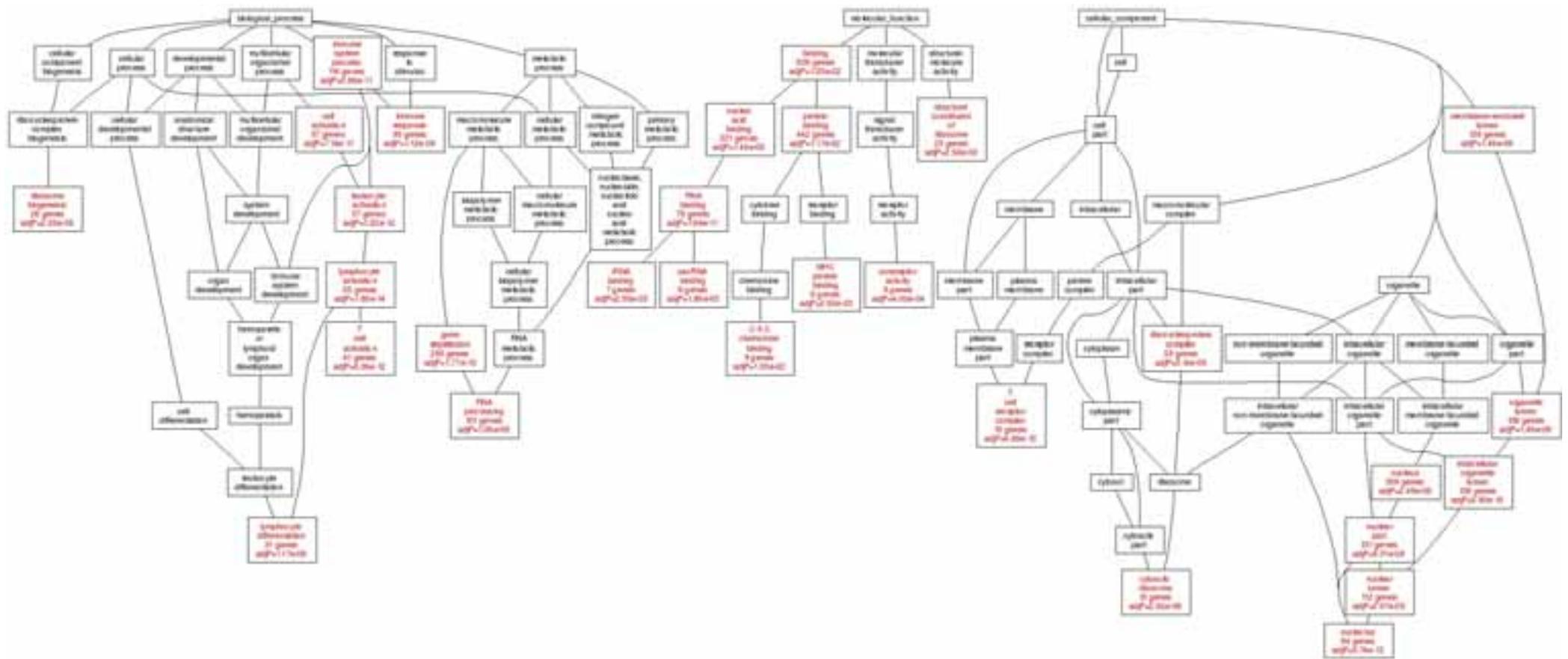


Figure 24 : Cartographie des activités dont les gènes sont significativement sous-exprimés dans la base de données Biocarta.

- *Base de données David :*

Selon la même procédure que précédemment, avec en plus une possibilité de restriction de classification (faible, modérée et élevée), 893 gènes sur-exprimés contre 989 gènes sous-exprimés ont été répertoriés par cette base de données. Concernant les sur-expressions de gènes, il existe 23 clusters classés avec un score d'enrichissement de 3,72 à 0,48. Puis nous avons analysé (filtre réglé sur « high similiraty score ») cette liste en recherchant les activités associées à ces gènes (« functional related genes »), et sélectionné 50 gènes (Tableau 7). Quand nous faisons la même procédure avec les gènes sous-exprimés nous obtenons 26 clusters, enrichis d'un facteur 15,12 à 2,93. La liste de gènes fonctionnels est de 60, reportée dans le Tableau 8.

#	Gene	Species	Kappa
1	TAO kinase 1	Homo sapiens	0,756
2	WNK lysine deficient protein kinase 1; hypothetical LOC100132369	Homo sapiens	0,746
3	MAP kinase interacting serine/threonine kinase 1	Homo sapiens	0,727
4	casein kinase 1, alpha 1	Homo sapiens	0,727
5	microtubule associated serine/threonine kinase family member 4	Homo sapiens	0,710
6	SFRS protein kinase 1	Homo sapiens	0,708
7	alpha-kinase 1	Homo sapiens	0,692
8	receptor-interacting serine-threonine kinase 3	Homo sapiens	0,682
9	G protein-coupled receptor kinase 6	Homo sapiens	0,674
10	interleukin-1 receptor-associated kinase 4	Homo sapiens	0,650
11	serine/threonine kinase 3 (STE20 homolog, yeast)	Homo sapiens	0,636
12	KIAA0232	Homo sapiens	0,604
13	feline sarcoma oncogene	Homo sapiens	0,595
14	chromosome 9 open reading frame 103	Homo sapiens	0,583
15	calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2, beta	Homo sapiens	0,583
16	Gardner-Rasheed feline sarcoma viral (v-fgr) oncogene homolog	Homo sapiens	0,581
17	inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase C	Homo sapiens	0,571
18	LIM domain kinase 2	Homo sapiens	0,562
19	BMX non-receptor tyrosine kinase	Homo sapiens	0,541
20	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 3	Homo sapiens	0,541
21	STE20-related kinase adaptor alpha	Homo sapiens	0,517
22	homeodomain interacting protein kinase 1	Homo sapiens	0,513
23	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 3	Homo sapiens	0,512
24	spermatogenesis associated 5-like 1	Homo sapiens	0,499
25	phosphoglycerate kinase 1	Homo sapiens	0,499
26	nemo-like kinase	Homo sapiens	0,499
27	ninein (GSK3B interacting protein)	Homo sapiens	0,487
28	PAP associated domain containing 4	Homo sapiens	0,474
29	dynein, cytoplasmic 1, light intermediate chain 2	Homo sapiens	0,456
30	5-oxoprolinase (ATP-hydrolysing)	Homo sapiens	0,448
31	ARP2 actin-related protein 2 homolog (yeast)	Homo sapiens	0,440
32	mitogen-activated protein kinase kinase 6	Homo sapiens	0,435
33	c-mer proto-oncogene tyrosine kinase	Homo sapiens	0,430
34	PX domain containing serine/threonine kinase	Homo sapiens	0,430
35	sterile alpha motif and leucine zipper containing kinase AZK	Homo sapiens	0,420
36	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 4	Homo sapiens	0,410
37	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5	Homo sapiens	0,408
38	twinfilin, actin-binding protein, homolog 2 (Drosophila)	Homo sapiens	0,407
39	phosphatidylglycerophosphate synthase 1	Homo sapiens	0,406
40	acyl-CoA synthetase short-chain family member 2	Homo sapiens	0,399
41	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3	Homo sapiens	0,399
42	kinesin family member 14	Homo sapiens	0,394
43	ubiquitin-conjugating enzyme E2R 2	Homo sapiens	0,387
44	protein kinase, AMP-activated, alpha 1 catalytic subunit	Homo sapiens	0,382
45	tudor domain containing 9	Homo sapiens	0,380
46	ribonuclease L (2',5'-oligoadenylate synthetase-dependent)	Homo sapiens	0,373
47	kinesin family member 3C	Homo sapiens	0,371
48	hexokinase 3 (white cell)	Homo sapiens	0,368
49	pyridoxal (pyridoxine, vitamin B6) kinase	Homo sapiens	0,367
50	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 1	Homo sapiens	0,354

Tableau 7 : Liste des gènes significativement surexprimés à la phase initiale du CS chez l'homme, selon l'analyse de la base de données DAVID. Kappa : niveau de corrélation (niveau maximal=1).

#	Gene	Species	Kappa
1	NOP16 nucleolar protein homolog (yeast)	Homo sapiens	0,818
2	nucleolar protein 11	Homo sapiens	0,799
3	coiled-coil domain containing 104	Homo sapiens	0,799
4	nucleolar protein 9	Homo sapiens	0,761
5	MAK16 homolog (S. cerevisiae)	Homo sapiens	0,692
6	glioma tumor suppressor candidate region gene 2; glioma tumor suppressor candidate region gene 2 pseudogene	Homo sapiens	0,666
7	TWIST neighbor	Homo sapiens	0,642
8	RRN3 RNA polymerase I transcription factor homolog (S. cerevisiae)	Homo sapiens	0,642
9	similar to ABT1-associated protein; ESF1, nucleolar pre-rRNA processing protein, homolog (S. cerevisiae)	Homo sapiens	0,642
10	ribosomal L1 domain containing 1	Homo sapiens	0,624
11	chromosome 2 open reading frame 37	Homo sapiens	0,615
12	tRNA splicing endonuclease 54 homolog (S. cerevisiae)	Homo sapiens	0,588
13	ribosomal RNA processing 1 homolog B (S. cerevisiae)	Homo sapiens	0,588
14	hypothetical gene supported by NM_014886; TGF beta-inducible nuclear protein 1	Homo sapiens	0,588
15	UTP3, small subunit (SSU) processome component, homolog (S. cerevisiae)	Homo sapiens	0,580
16	NOP14 nucleolar protein homolog (yeast)	Homo sapiens	0,571
17	SDA1 domain containing 1	Homo sapiens	0,562
18	tRNA splicing endonuclease 15 homolog (S. cerevisiae)	Homo sapiens	0,562
19	WD repeat domain 43	Homo sapiens	0,529
20	Ly1 antibody reactive homolog (mouse)	Homo sapiens	0,514
21	NOP56 ribonucleoprotein homolog (yeast)	Homo sapiens	0,499
22	NOP2 nucleolar protein homolog (yeast)	Homo sapiens	0,476
23	WD repeat domain 75	Homo sapiens	0,473
24	nucleolar protein 8	Homo sapiens	0,473
25	PRP39 pre-mRNA processing factor 39 homolog (S. cerevisiae)	Homo sapiens	0,473
26	M-phase phosphoprotein 10 (U3 small nucleolar ribonucleoprotein)	Homo sapiens	0,465
27	chromosome 14 open reading frame 169	Homo sapiens	0,461
28	Fanconi anemia, complementation group I	Homo sapiens	0,457
29	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit L	Homo sapiens	0,451
30	polyhomeotic homolog 1B (Drosophila); polyhomeotic homolog 1 (Drosophila)	Homo sapiens	0,449
31	DAZ associated protein 1	Homo sapiens	0,449
32	ubiquitin specific peptidase 36	Homo sapiens	0,438

33	transmembrane protein 109	Homo sapiens	0,432
34	cirrhosis, autosomal recessive 1A (cirhin)	Homo sapiens	0,421
35	FtsJ homolog 2 (E. coli)	Homo sapiens	0,409
36	IMP3, U3 small nucleolar ribonucleoprotein, homolog (yeast)	Homo sapiens	0,409
37	exosome component 6	Homo sapiens	0,399
38	GATA zinc finger domain containing 2B	Homo sapiens	0,399
39	N-acetyltransferase 10 (GCN5-related)	Homo sapiens	0,399
40	DIM1 dimethyladenosine transferase 1-like (S. cerevisiae)	Homo sapiens	0,399
41	WD repeat domain 3	Homo sapiens	0,384
42	ribosomal protein L3; similar to 60S ribosomal protein L3 (L4)	Homo sapiens	0,380
43	kelch-like 7 (Drosophila)	Homo sapiens	0,380
44	fibrillarin	Homo sapiens	0,377
45	NHP2 non-histone chromosome protein 2-like 1 (S. cerevisiae)	Homo sapiens	0,374
46	zinc finger, CCHC domain containing 17	Homo sapiens	0,374
47	polymerase (RNA) I polypeptide C, 30kDa	Homo sapiens	0,374
48	GAR1 ribonucleoprotein homolog (yeast)	Homo sapiens	0,374
49	NHP2 ribonucleoprotein homolog (yeast)	Homo sapiens	0,374
50	vaccinia related kinase 1	Homo sapiens	0,374
51	Opa interacting protein 5	Homo sapiens	0,372
52	ribosomal protein S25 pseudogene 8; ribosomal protein S25	Homo sapiens	0,368
53	ceramide kinase-like	Homo sapiens	0,367
54	RRS1 ribosome biogenesis regulator homolog (S. cerevisiae)	Homo sapiens	0,367
55	TH1-like (Drosophila)	Homo sapiens	0,363
56	ets variant 6	Homo sapiens	0,359
57	ribosomal protein L36; ribosomal protein L36 pseudogene 14	Homo sapiens	0,358
58	pyrin and HIN domain family, member 1	Homo sapiens	0,357
59	chromosome 1 open reading frame 149	Homo sapiens	0,352
60	ribosomal protein L5 pseudogene 34; ribosomal protein L5 pseudogene 1; ribosomal protein L5	Homo sapiens	0,350

Tableau 8 : Liste des gènes significativement sous-exprimés à la phase initiale du CS chez l'homme, selon l'analyse de la base de données DAVID. Kappa : niveau de corrélation (niveau maximal=1).

- Base de données Ingenuity® :

Nous avons appliqué la même procédure que précédemment sur cette base de données avec le logiciel IPA v5.2 sous licence de Ingenuity® System, Inc, USA. Dans une première étape, 5 fonctions prépondérantes ont été identifiées pour les classes suivantes : maladies, fonctions cellulaires et fonctions physiologiques avec leur niveau de significativité et le nombre de molécules impliquées modifiées par le CS versus patients sains (Figure 25).

Summary of Analysis - CS_TOUT_VS_T0Norm - 2010-05-18 05:44 PM

Top Bio Functions

Diseases and Disorders		
Name	p-value	# Molecules
Infectious Disease	7,83E-24 - 1,10E-02	239
Respiratory Disease	7,83E-24 - 3,11E-09	93
Inflammatory Response	6,66E-13 - 1,70E-02	178
Connective Tissue Disorders	3,09E-08 - 1,63E-02	258
Dermatological Diseases and Conditions	3,09E-08 - 3,12E-03	85
Molecular and Cellular Functions		
Name	p-value	# Molecules
Cellular Development	7,72E-15 - 1,64E-02	200
Cellular Function and Maintenance	3,88E-12 - 1,54E-02	101
Cell Death	7,41E-12 - 1,60E-02	337
Protein Synthesis	8,68E-11 - 4,49E-03	74
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	3,23E-06 - 1,55E-02	169
Physiological System Development and Function		
Name	p-value	# Molecules
Hematological System Development and Function	1,46E-13 - 1,70E-02	180
Hematopoiesis	1,46E-13 - 1,54E-02	95
Cell-mediated Immune Response	4,68E-12 - 1,54E-02	77
Immune Cell Trafficking	3,23E-08 - 1,70E-02	92
Cardiovascular System Development and Function	1,21E-04 - 1,12E-02	16

© 2000-2010 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved. 

Figure 25 : Résumé des 5 premières classes de gènes correspondant soit à des : maladies, fonctions cellulaires ou fonctions physiologiques impliquées à la phase initiale du CS par rapport à un groupe de sujets sains. (p-value : seuil de significativité statistique ; #: nombres de molécules modifiées).

Plus finement, 865 processus biologiques sont modifiés entre le temps T0 de notre cohorte et le groupe contrôle. L'Annexe 3 visualise les 10 premiers processus biologiques et/ou maladies auxquels sont associés les fonctions biologiques et molécules (ainsi que le nombre de molécules impliquées dans chaque fonction biologique). Enfin, le niveau de significativité est reporté pour chaque fonction.

Si l'on distingue les gènes sur- et sous-exprimés nous obtenons respectivement : 12 et 853 gènes. Pour simplifier les représentations, seulement les 10 premiers gènes sur- et sous-exprimés sont reportés sur les Tableaux 9 et 10.

© 2000-2010 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Symbol	Synonym(s)	Entrez Gene Name
IL1R2	CD121b, CDW121B, DECOY R2, IL-1R type II, IL1RB, MGC47725	interleukin 1 receptor, type II
MKNK1	2410048M24Rik, MGC112775, MNK1	MAP kinase interacting serine/threonine kinase 1
MAP2K6	MAPK KINASE 6, MAPKK6, MEK6, MGC93287, MKK6, MKK6BE, PRKMK6, SAPKK3	mitogen-activated protein kinase kinase 6
IRAK3	4833428C18Rik, AI563835, ASRT5, FLJ13601, IRAK-M	interleukin-1 receptor-associated kinase 3
MEF2A		
(includes EG:4205)	A430079H05Rik, ADCAD1, M-S EF2A, Mef2a, RSRFC4, RSRFC9	myocyte enhancer factor 2A
IL1R1	CD121A, CD121b, D2S1473, IL-1R-alpha, IL-iR, IL1R, IL1RA, INTERLEUKIN 1 BETA RECEPTOR, MGC129154, P80	interleukin 1 receptor, type I
IL1A	IL-1, IL1-ALPHA, IL1F1, Interleukin-A	interleukin 1, alpha
MAPK14	CRK1, CSBP, CSBP1, CSBP2, CSPB1, EXIP, Hog, MAPK p38, MGC102436, MGC105413, MXI2, P38, P38 KINASE, P38 Map Kinase, p38 Mapk alpha, P38-ALPHA, p38-RK, p38/Hog1, p38/Mpk2, P38/RK, p38a, p38Hog, p38MAPK, PRKM14, PRKM15, RK, SAPK2A	mitogen-activated protein kinase 14
CREB5	CRE-BPA, D430026C09Rik, RGD1566107	cAMP responsive element binding protein 5
MAP3K5		
(includes EG:4217)	7420452D20Rik, APOPTOSIS SIGNAL REGULATED KINASE 1, ASK, ASK1, Map3k5, MAPKKK5, MEKK5, MGC141518, MGC141519, RGD1306565	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5

Tableau 9 : 10 premiers gènes sur-exprimés (classés par ordre décroissant de +42,2 à +3,4) dans le CS à T1 par rapport aux sujets sains, selon la base de données Ingenuity®.

Symbol	Synonym(s)	Entrez Gene Name
ACP5	ACID PHOSPHATASE 5, MGC117378, Pap, TRACP, Tracp 5b, TRAP, TTRRAP, Uteroferrin	acid phosphatase 5, tartrate resistant
CD3E	AI504783, CD3, CD3-EPSILON, CD3A, FLJ18683, T3E, TCRE	CD3e molecule, epsilon (CD3-TCR complex)
CD3G	CD3-GAMMA, Ctg-3, FLJ17620, FLJ17664, FLJ79544, FLJ94613, MGC138597, T3G	CD3g molecule, gamma (CD3-TCR complex)
XCL1	AI661682, ATAC, Cytokine SCM-1, LPTN, LTN, LYMPHOTACTIN, SCM-1, SCM-1-alpha, SCM-1A, SCYC1	chemokine (C motif) ligand 1
TRA@	FLJ22602, MGC117436, MGC182949, MGC182955, MGC22624, MGC23964, MGC71411, OTTMUSG00000015028, PT ALPHA, TCR ALPHA, Tcra, TCRD, TEA, TRA	T cell receptor alpha locus
NOV	C130088N23Rik, CCN3, IGFBP-RP3, IGFBP9, NOVH	nephroblastoma overexpressed gene
IGHD	FLJ00382, FLJ46727, MGC27165, MGC29633	immunoglobulin heavy constant delta
SH2D1B	EAT-2A, EAT2, RGD1563935, Sh2d1b1	SH2 domain containing 1B
FLT3LG	FL, FLT3 LIGAND, Flt3l, FMS-RELATED TYROSINE KINASE 3 LIGAND, Ly72L	fms-related tyrosine kinase 3 ligand
FCER1A	FC ALPHA RECEPTOR 1, Fc Epsilon R1, FC EPSILON R1 ALPHA, FC EPSILON RI, FCE1A, FcERI, Fcr-5, Iger01, IGERA, RATIGER01	Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; alpha polypeptide
MALAT1	2210401K01RIK, 9430072K23RIK, AI647968, HCN, NCRNA00047, NEAT2, PRO1073, PRO2853	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-protein coding)

Tableau 10 : 10 premiers gènes biologiques sous-exprimés (classés par fold change décroissant de -9,42 à -7,96) dans le CS à T1 par rapport aux sujets sains, selon la base de données Ingenuity®.

- Base de données STRING database (v8.3) :

Une approche complémentaire consiste à prendre en compte les liens identifiés entre les protéines correspondantes aux gènes identifiés et l'ensemble des connaissances. Cinq critères sont ainsi utilisés : proximité des gènes dans le génome, existence prouvée d'une co-expression, existence expérimentale d'interactions moléculaires, association mentionnée dans les bases de publications scientifiques et existence de gènes fusionnés dans certains organismes.

Concernant les 1 379 gènes surexprimés, en utilisant un degré de restriction élevé (*very high*), nous avons obtenu 153 nœuds d'interactions avec 171 liens entre eux (Figure 26).

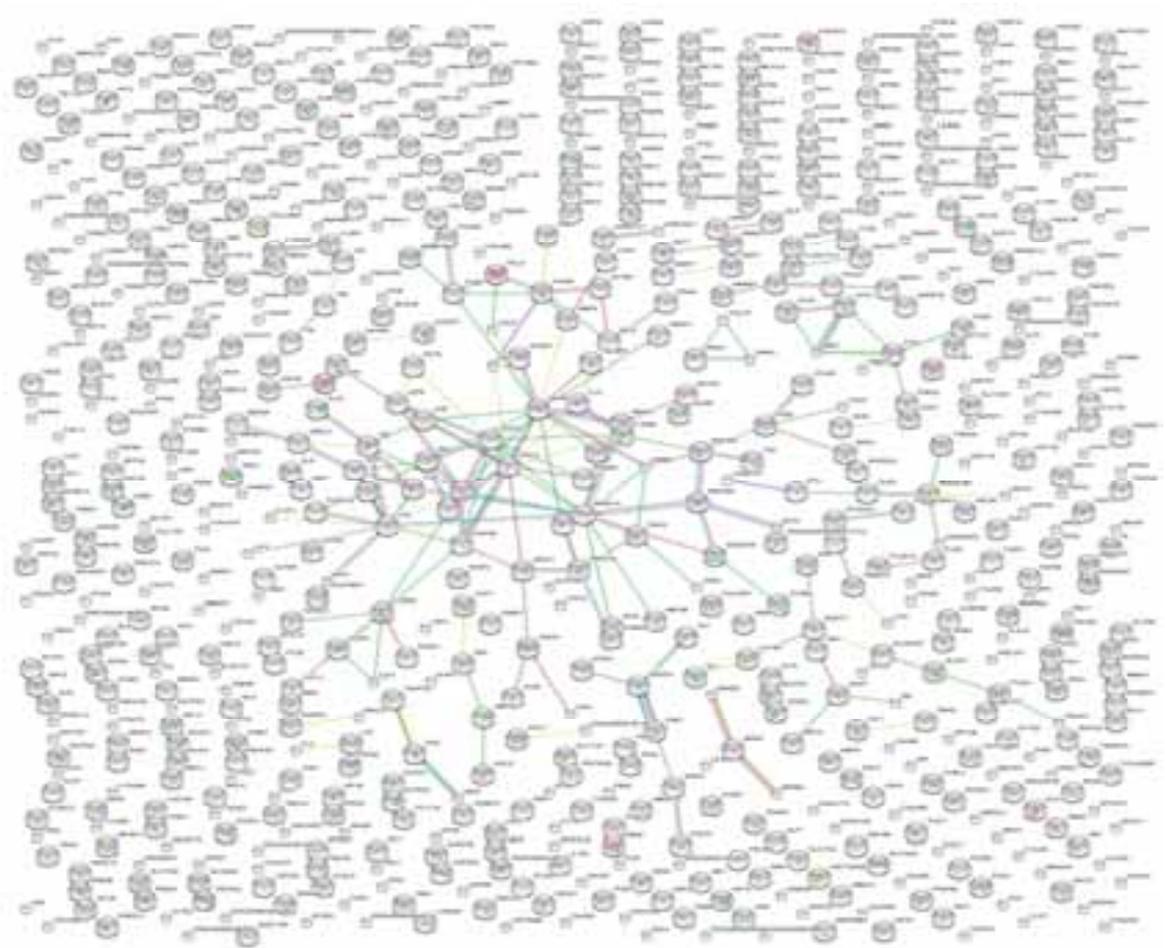


Figure 26 : Interaction des gènes sur-exprimés de patients en choc septique (comparé à un groupe contrôle de patients normaux). Chaque bulle représente un gène : petite bulle pour gène seulement, grosse bulle pour gène avec à l'intérieur sa protéine identifiée. La légende des couleurs indique les critères d'identification : : bleu pour homologie, vert pour gènes voisins, rouge pour gènes de fusion, noir pour co-expression, jaune pour textminig.

Puis nous avons utilisé la plateforme interactive Cytoscape® pour accéder aux différentes données issues des principales bases de données géniques, transcriptomiques et protéomiques dont la plus connue est l'encyclopédie descriptive et fonctionnelle du génome KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome). Ainsi nous avons obtenu une simplification visuelle des résultats (Figure 27).

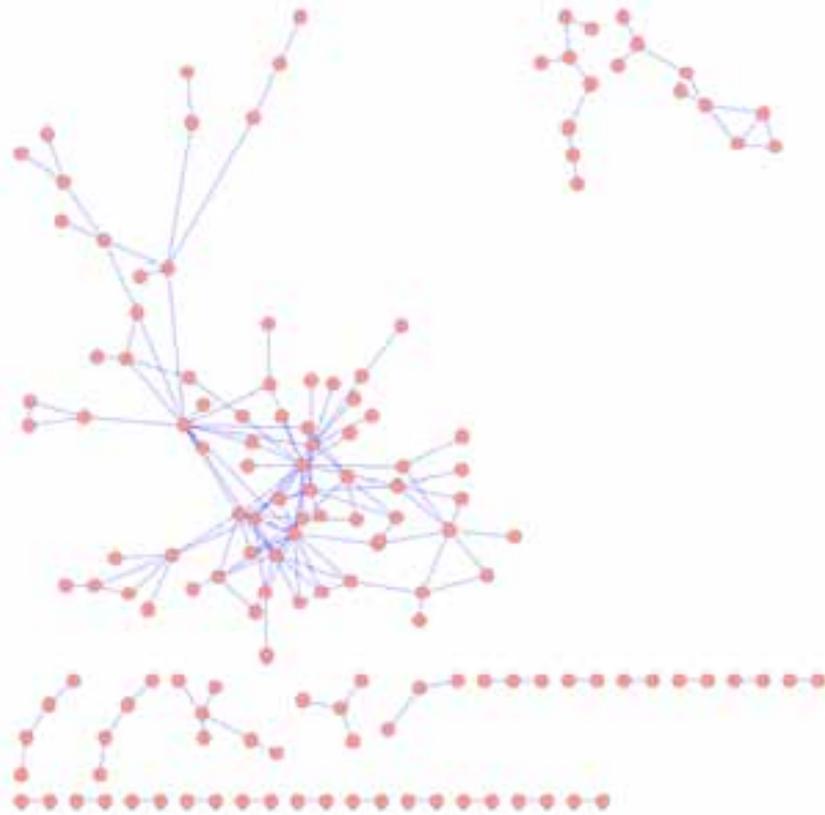


Figure 27 : Représentation des interactions des transcrits sur-exprimés (par rapport au groupe témoin de patients sains) dans Cytoscape®. Rond rouge : transcrit, sur lequel on peut, en ligne, cliquer dessus pour faire apparaître le nom de la protéine et avoir accès au protéome ; ligne bleu : interaction décrite entre deux transcrits.

Avec l'analyse par KEGG, nous avons obtenu 41 voies de signalisation impliquées, dont nous avons montré que les quinze premières (Figure 28).

Show all objects

- ko04630 Jak-STAT signaling pathway (9)
- ko05200 Pathways in cancer (5)
- ko04062 Chemokine signaling pathway (5)
- ko04060 Cytokine-cytokine receptor interaction (4)
- ko05144 Malaria (3)
- ko04120 Ubiquitin mediated proteolysis (3)
- ko04920 Adipocytokine signaling pathway (3)
- ko04510 Focal adhesion (3)
- ko04810 Regulation of actin cytoskeleton (2)
- ko04670 Leukocyte transendothelial migration (2)
- ko04660 T cell receptor signaling pathway (2)
- ko04012 ErbB signaling pathway (2)
- ko04144 Endocytosis (2)
- ko05221 Acute myeloid leukemia (2)
- ko05220 Chronic myeloid leukemia (2)

Figure 28 : Liste des quinze premières voies de signalisation impliquées chez les gènes significativement sur-exprimés (par rapport au groupe témoin) dans KEGG. Entre-parenthèse, le nombre d'expression de gènes impliqués.

On constate immédiatement que les mécanismes responsables de l'inflammation concernent plus de 21 gènes (voie Jak-STAT, chémokine, interactions cytokines-cytokines et adipocytokines signalisation).

Chaque voie de signalisation peut être détaillée comme dans l'exemple de la première voie (en nombre de gènes impliqués), la voie Jak/STAT (Figure 29).

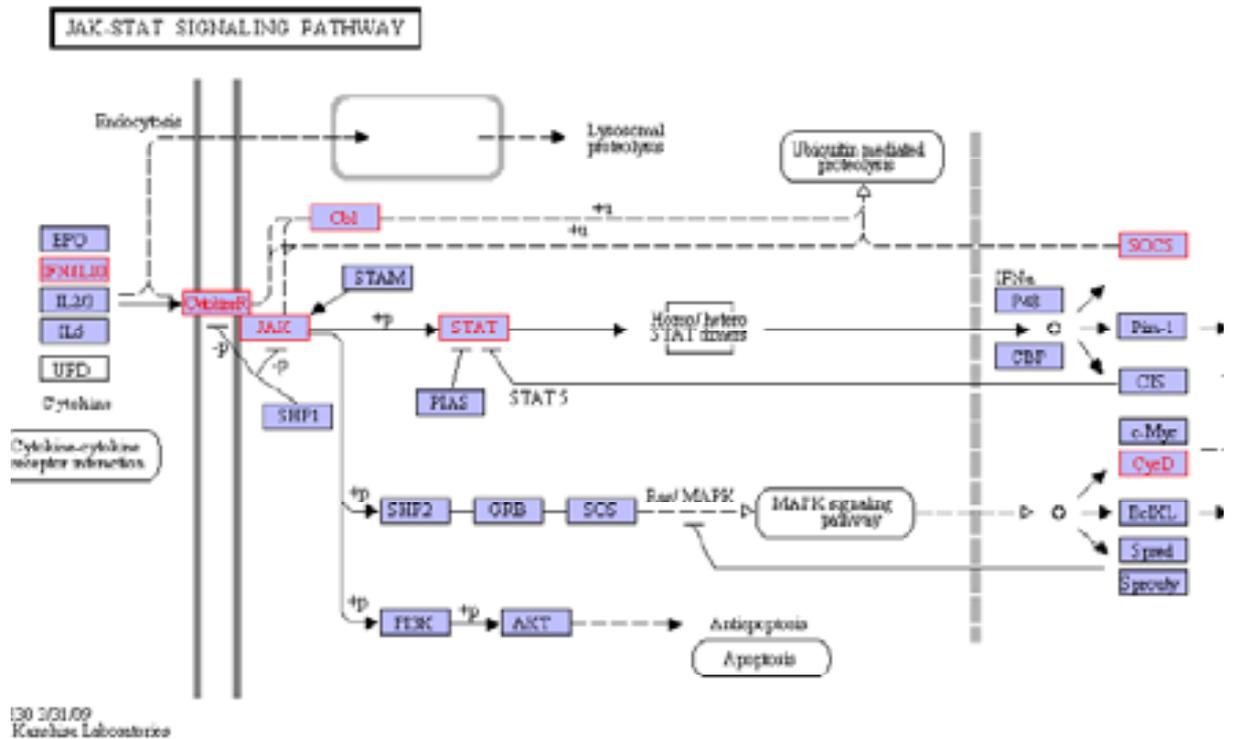


Figure 29 : Détail de la voie de signalisation Jak/STAT dans KEGG. En bleu figure les gènes impliqués dans cette voie de signalisation, en violet encadré de rouge les gènes impliqués et retrouvés dans notre étude, en encadré blanc les voies de signalisation.

Concernant les 1 879 gènes sous-exprimés, en utilisant le même degré de restriction élevé (*very high*), nous avons obtenus 392 nœuds et 1 203 liens entre eux (Figure 30).

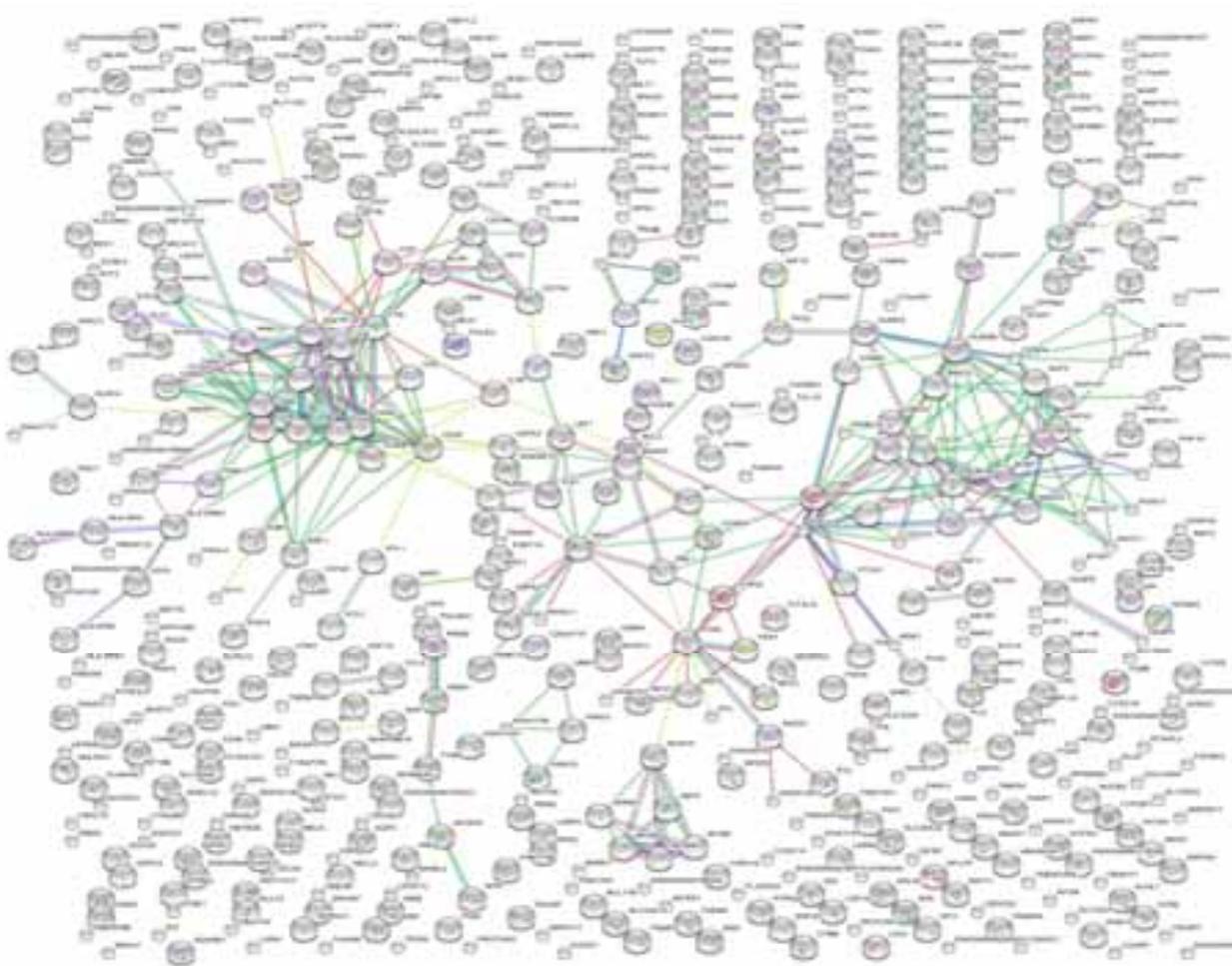


Figure 30 : Interaction des gènes sous-exprimés de patients en CS, par rapport à un groupe contrôle de 48 patients normaux. Chaque bulle représente un gène : petite bulle pour gène seulement, grosse bulle pour gène avec à l'intérieur sa protéine identifiée. Les traits de couleurs indiquent les critères d'identification des gènes : bleu pour homologie, vert pour gènes voisins, rouge pour gènes de fusion, noir pour co-expression, jaune pour textminig.

Par KEGG, nous avons une simplification de la représentation mais qui fait apparaître plusieurs nœuds différents (Figure 31).



Figure 31 : Représentation par Cytoscape® des interactions des gènes sous-exprimés de patients en CS, par apport à un groupe contrôle de patients normaux. Rond rouge : transcrit, sur lequel on peut, en ligne, cliquer dessus pour faire apparaître le nom de la protéine et avoir accès au protéome ; ligne bleu : interaction décrite entre deux transcrits.

Cette figure objective plusieurs nœuds de connexions entre différents gènes (environ 6) en faveur d'une intense sous-expression de gènes induite par le CS.

Avec l'analyse par KEGG, nous avons obtenu 30 voies de signalisation impliquées, dont nous avons montré que les quinze premières (Figure 32).

Show all objects

- ko04660 T cell receptor signaling pathway (16)
- ko04110 Cell cycle (13)
- ko04640 Hematopoietic cell lineage (12)
- ko01100 Metabolic pathways (10)
- ko05200 Pathways in cancer (10)
- ko04111 Cell cycle - yeast (10)
- ko05340 Primary immunodeficiency (10)
- ko04650 Natural killer cell mediated cytotoxicity (9)
- ko04010 MAPK signaling pathway (9)
- ko04060 Cytokine-cytokine receptor interaction (9)
- ko04062 Chemokine signaling pathway (8)
- ko04514 Cell adhesion molecules (CAMs) (8)
- ko05210 Colorectal cancer (7)
- ko04612 Antigen processing and presentation (7)
- ko04510 Focal adhesion (7)
- ko04630 Jak-STAT signaling pathway (6)

Figure 32 : Liste des quinze premières voies de signalisation impliquées chez les gènes significativement sous-exprimés (par rapport au groupe témoin) dans KEGG. Entre-parenthèse : le nombre d'expression de gènes impliqués.

Cette analyse confirme bien la dépression des mécanismes immunitaire (voie du TCR, cycle cellulaire et hématopoïèse).

Chaque voie de signalisation peut être détaillée comme dans l'exemple de la première voie (en nombre de gènes impliqués), le TCR (Figure 33).

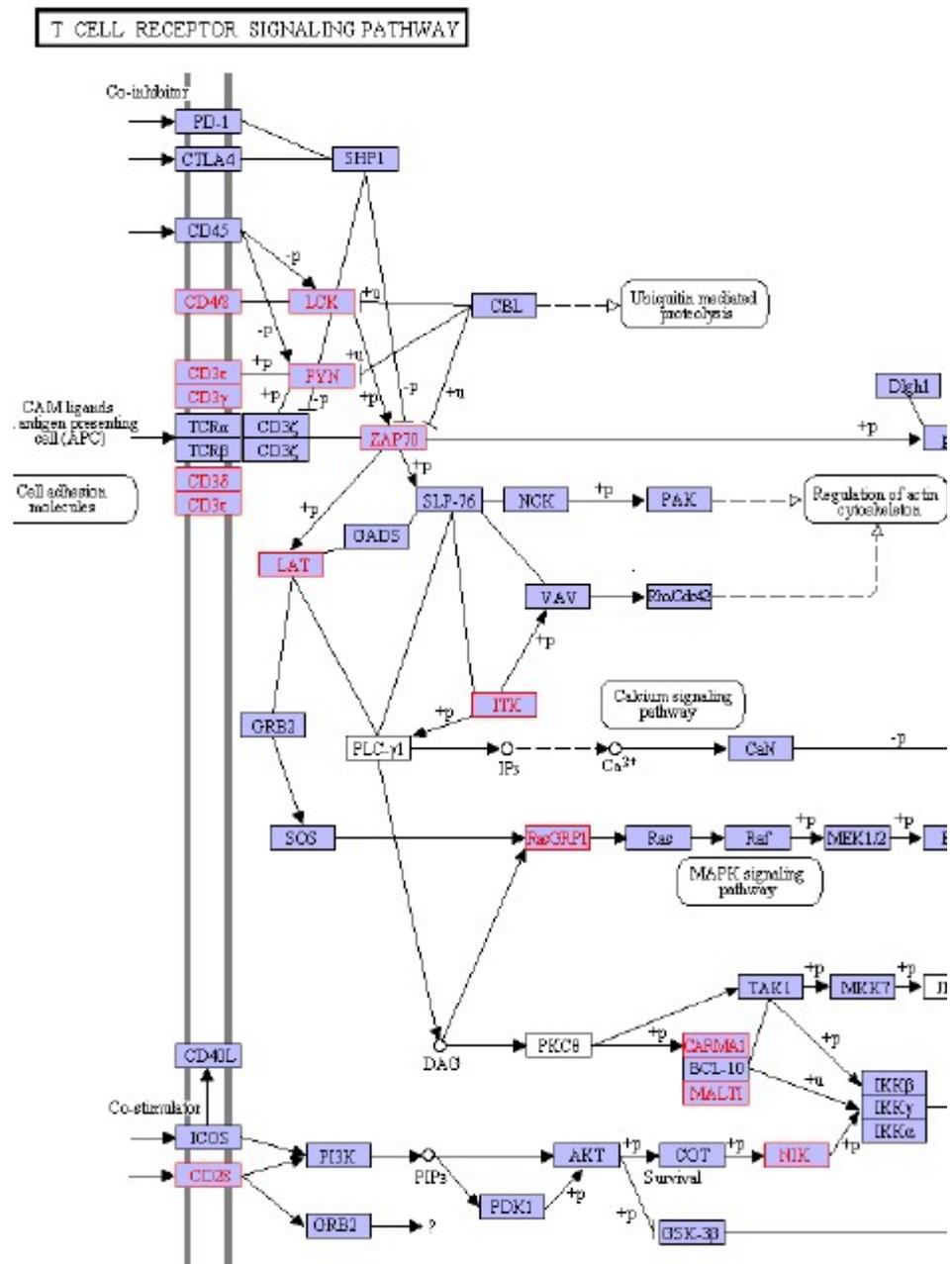


Figure 33 : Détail de la voie de signalisation du TCR dans KEGG. En bleu figure les gènes réprimés dans cette voie, en violet encadré de rouge les gènes impliqués et retrouvés dans notre étude, en encadré blanc les voies de signalisation.

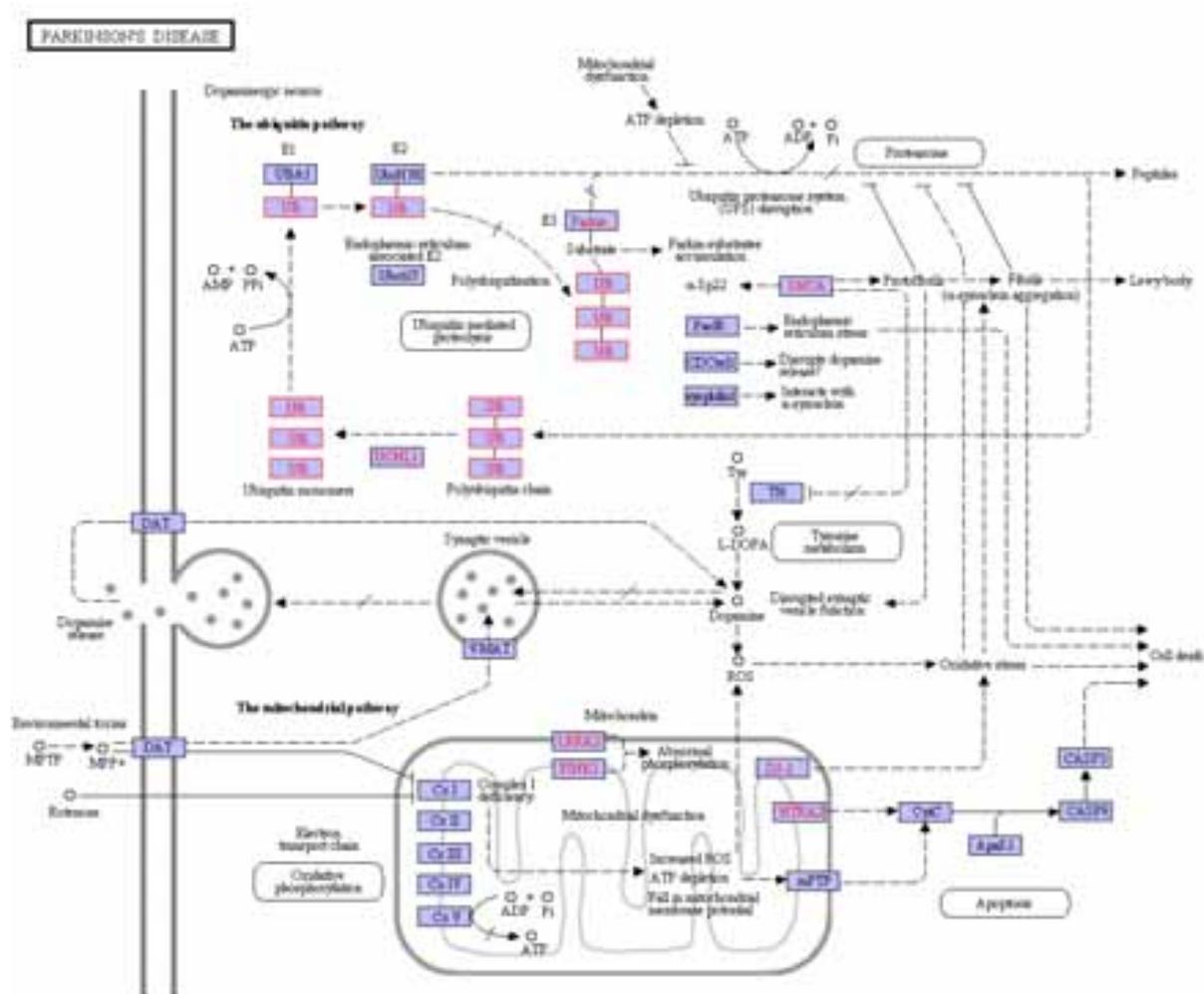


Figure 36 : Voie de signalisation de la maladie de Parkinson impliquée dans le nœud d'interaction principal du groupe de gènes sous-exprimés de patients en CS. En bleu figure les gènes impliqués dans cette voie, en violet les gènes impliqués et retrouvés dans notre étude, en encadré blanc les voies de signalisation.

1.4.5.2. Analyse des gènes différemment exprimés chez les patients en choc septique traités ou non par la rhPCa :

Cette plateforme a utilisé d'autres tests statistiques (T-test pour données appariées pondéré par la méthode Benjamini-Hochberg pour limiter les faux-positifs) pour mettre en évidence des gènes responsables d'activités modulées par le traitement.

Dans le groupe traité par la rhPCa :

- 9 gènes ont une variation significative entre les temps T1 et T2, comparé au groupe contrôle (groupe rhPCa-) (Tableau 11)
- 4 gènes sont sur-exprimés contre 5 sous-exprimés (Figure 37).

Identifiant	Nom du gène
202815_s_at	hexamethylene bis-acetamide inducible 1
202708_s_at	histone cluster 2, H2be
224724_at	sulfatase 2
228929_at	deoxyribonuclease I
219295_s_at	procollagen C-endopeptidase enhancer 2
222421_at	ubiquitin-conjugating enzyme E2H (UBC8 homolog, yeast)
205040_at	orosomucoïd 1
224391_s_at	sialic acid acetyltransferase
204388_s_at	monoamine oxidase A

Tableau 11 : Gènes dont l'expression a été significativement différente entre T1 et T2 dans le groupe rhPCa+, comparé au groupe contrôle rhPCa-.

Une première analyse bibliographique des gènes cités dans le Tableau 11, fait apparaître que l'hexamethylene bis-acetamide inducible 1 est un facteur inhibiteur de la transcription (facteur b d'élongation) qui contrôle la RNA polymérase II ²²³. L'histone cluster 2 (H2b) fait partie avec H2a, H3 et H4 des histones qui contrôlent la structure de la chromatine et des nucléosomes. Toute modification d'activité/fonction des histones interfère avec la réplication, transcription et réparation de la chromatine, objectivant l'importance de ces molécules ²²⁴. La sulfatase 2 est une enzyme extracellulaire qui module la signalisation cellulaire en interférant avec les facteurs de croissance. Cette enzyme est capable de promouvoir la voie de signalisation Wnt et d'inhiber la voie du FGF-2, deux voies induites lors de certains cancers (poumon, pancréas et hépatocarcinome) ²²⁵. La deoxyribonuclease 1 (Dnase I) est une enzyme responsable de coupure d'ADN simple brin, dont la diminution d'activité a été récemment corrélée avec l'activation de la voie Fas et l'excès d'apoptose observés dans le lupus érythémateux ²²⁶. Le procollagen-C-endopeptidase enhancer 2 intervient dans le métabolisme du cholestérol, en particulier le HDL, en stimulant l'apo-lipoprotéine A1 ²²⁷. Son rôle dans les maladies inflammatoires et les cancers n'est pas clairement démontré.

L'ubiquitination est un phénomène biologique universel chez les eucaryotes, dont le rôle est la protéolyse médiée une cascade d'enzymes : E1, E2 et E3. Ce système intervient dans plusieurs processus biologiques dont l'apoptose, la transcription de l'ADN, le cycle cellulaire, l'inflammation et la réponse immunitaire ²²⁸. L'orosomucoïde est une protéine plasmatique qui appartient au groupe des protéines de la phase aiguë de l'inflammation liée à l'infection. La synthèse de cette protéine est sous la dépendance de cytokines, en particulier de l'IL-1, IL-6 et du TNF- α . Son rôle physiologique n'est pas clairement déterminé bien que récemment il ait été montré que cette protéine intervient dans l'homéostasie de l'inflammation du tissu adipeux ²²⁹. L'acétylcholinestérase sialique intervient dans les mécanismes de tolérance des lymphocytes B, au niveau du BCR en le réprimant ²³⁰. Enfin la monoamine oxydase est une enzyme du métabolisme neuronal qui prévient l'apoptose neuronale en maintenant le potentiel de membrane mitochondrial des neurones. La diminution d'activité ou l'inhibition de la monoamine oxydase entraîne un excès d'apoptose des neurones, constatation qui est une des caractéristiques des maladies neuro-dégénératives comme la maladie de Parkinson ²³¹.

Ainsi il est à noter que chacun de ces gènes a déjà été identifié comme participant à la réaction au stress cellulaire ou au mécanisme de mort cellulaire. Une analyse plus approfondie est nécessaire pour rendre compte des variations observées.

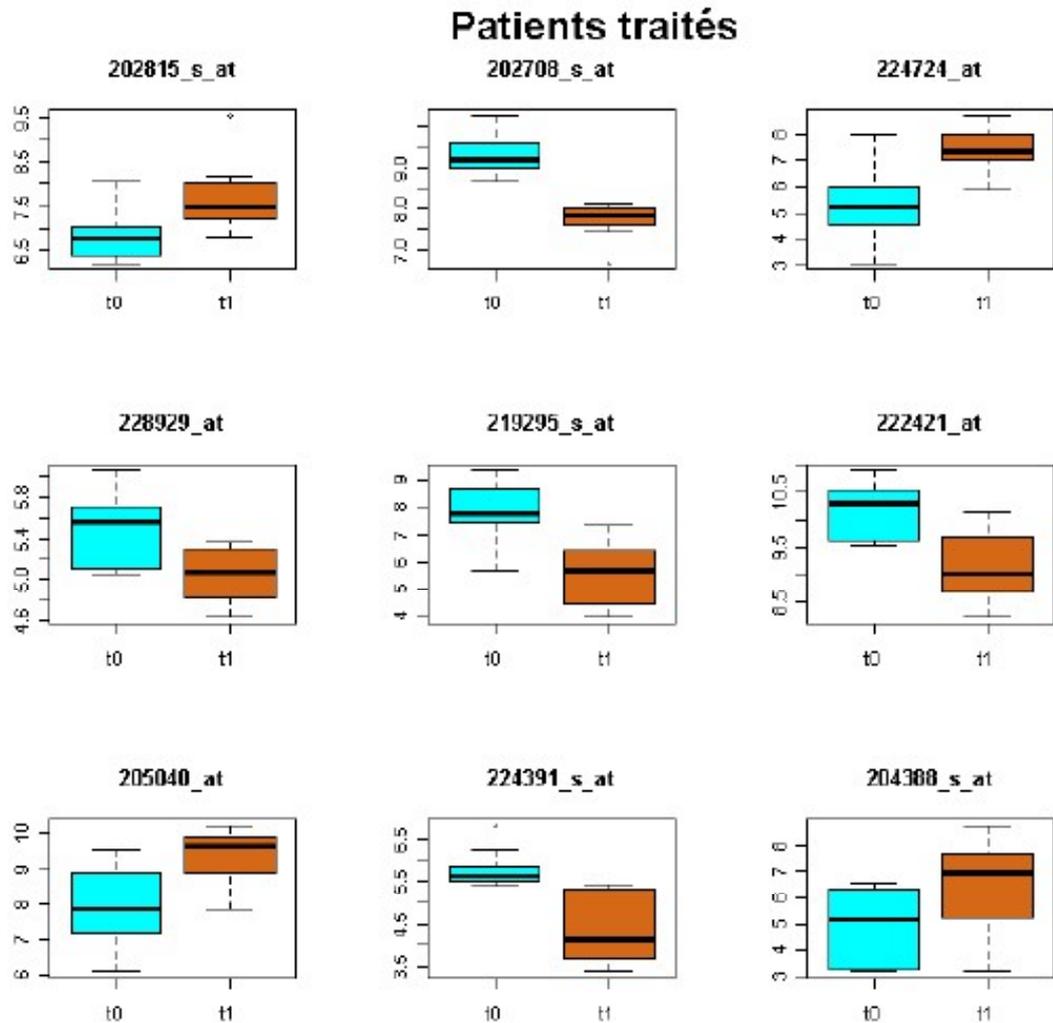


Figure 37 : Représentation des expressions de 9 gènes significativement différentes entre T1 et T2 dans le groupe rhPCa+, comparées au groupe contrôle rhPCa-. Les références des gènes sont rapportées dans le Tableau 11.

Concernant la survie des patients du groupe rhPCa+, il n'a pas été mis en évidence de modification significative d'expression de gène en comparaison entre le sous-groupe de patients rhPCA+ décédés versus le sous-groupe de patients rhPCA- décédés. Une vue d'ensemble de l'analyse sur la survie avec ou sans rhPCa est reportée sur le dendrogramme de la Figure 38. Il peut être envisagé que les mécanismes permettant la restauration des fonctionnalités du système immunitaire ont été mobilisés avant le traitement et privilégiés dans certains cas par l'administration de rhPCa.

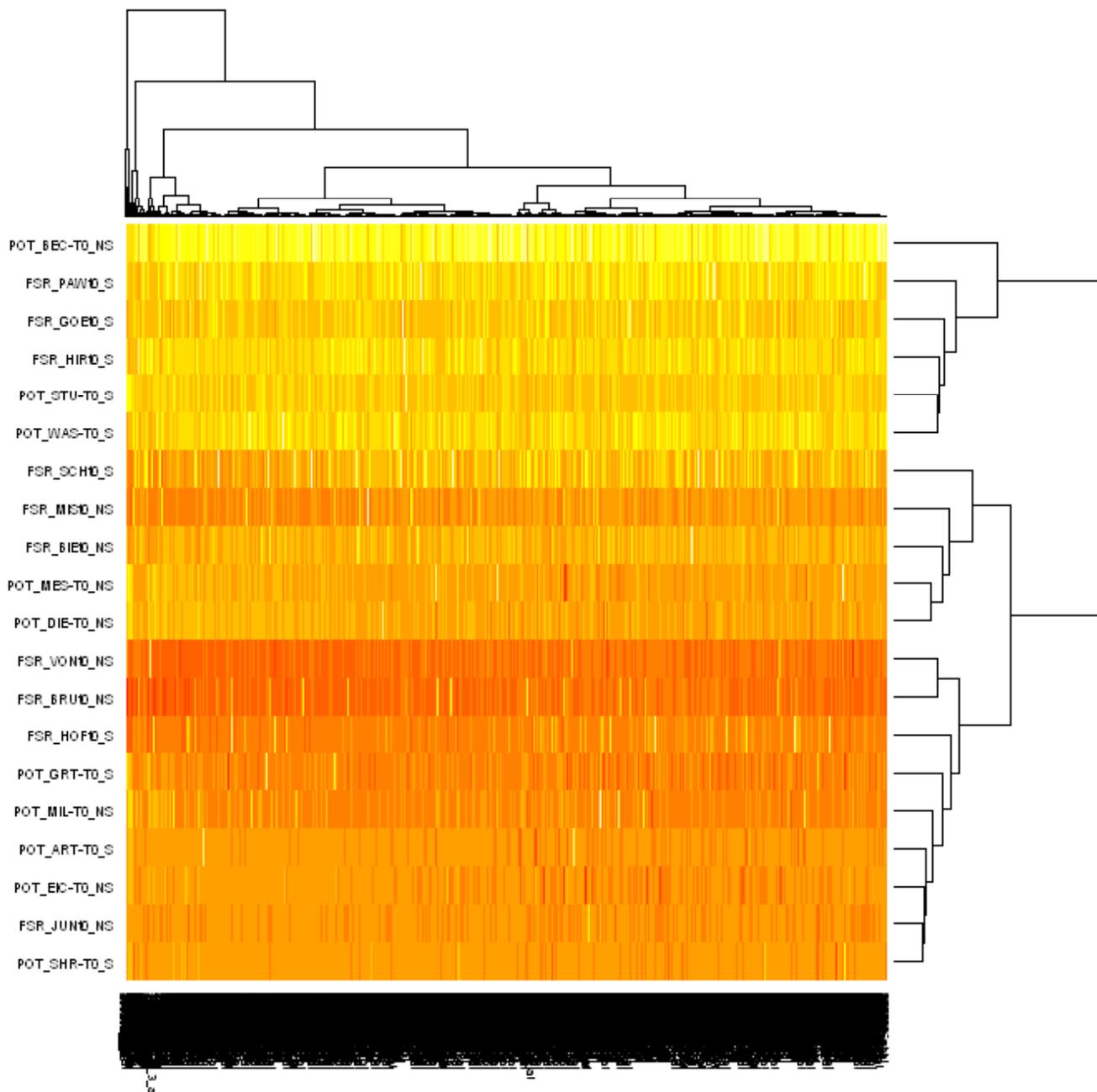


Figure 38 : Dendrogramme représentant les niveaux élevés (rouge) ou diminué (jaune) d'expression des gènes chez 20 patients en choc septique à l'inclusion (T0 sur la figure). Figure en ordonné gauche le caractère survie (S) ou non-survie (NS) ainsi que la présence du traitement par rhPCa (FSR) ou non (POT). En abscisse figure l'ensemble des 54675 gènes étudiés. En ordonné droite figure le regroupement des patients en fonction de leur profil d'expression. Nous voyons qu'il n'existe pas de regroupement franc entre survivants rhPCa+ (identifiés FSR et S) et décédés rhPCa- (identifiés POT et NS).

2. Discussion :

Concernant la première partie de résultats sur le CS au temps T1, une première analyse des 3 bases de données d'expressions de gènes objective qu'elles ont des abords et des rendus de résultats différents mais nous pouvons voir cependant des concordances :

1. le CS chez l'homme à la phase précoce induit de nombreuses variations d'expression de gènes avec une nette tendance générale à la sous-expression, par le nombre de gènes et la puissance statistique rattachée.
2. Les processus biologiques sur-exprimés les « plus visibles » sont la réaction inflammatoire avec l'activation des cytokines, en particulier IL-1 (et ses récepteurs), avec l'activation de MAP kinases et des enzymes du métabolisme (kinases, transférases, oxido-réductases)
3. les processus biologiques les plus sous-exprimés nous semblent être les systèmes d'activation/différentiation des lymphocytes avec en particulier le TCR, les activités ribosomales, nucléaires et cytosoliques (surtout dans la base David) et l'activité des organelles (membranaire et cytosolique).

Ces résultats sont à comparer avec ceux de la littérature. Le premier travail sur le transcriptome dans le sepsis remonte à 2006, par l'équipe de Suffredini et col²³² qui étudia, chez huit volontaires sains, les effets de l'injection de LPS d'*E Coli* sur sang total durant les 24 premières heures, confrontés à un groupe contrôle (injection de sérum physiologique). Ils observèrent des modifications très rapides du transcriptome (dès 6h) avec une normalisation à la 24^{ème} heure. 439 gènes étaient sur-exprimés versus 428 sous-exprimés. Les 5 premiers gènes sur-exprimés étaient : facteur V, CD63, MER tyrosine kinase, activin A et Janus kinase. Les 5 premiers gènes réprimés étaient : transketolase, ribosomal protein S19, MEC binding protein 2, Rac/Cdc42 et small nuclear ribonucleoprotein. Ils ont aussi réalisé 12 RT-qPCR de gènes dont l'expression était significativement modifiée pour confirmer leurs résultats.

Nous n'avons retrouvé que la sous-expression ribosomale comme gènes communs. Ceci peut être dû au profil de l'étude : injection unique de LPS avec normalisation en 24 h contre foyer infectieux persistant et premier prélèvement à la 36^{ème} heure.

Puis une équipe australienne ²³³ réalisa une étude du transcrit (18 664 gènes) sur uniquement les polynucléaires neutrophiles de 44 patients en sepsis (dans les 24 h après le diagnostic mais 20 % de prélèvements négatifs et nombre de CS inconnu) qui objectiva 50 « signatures géniques » classées en trois clusters : fonction mitochondriale et fonction immunitaire qui sont réprimées et réponse inflammatoire qui est augmentée. Ces clusters ont été validés dans une autre cohorte de 30 patients en sepsis. 19 expressions de ces gènes ont été retrouvées dans notre étude. Ce faible nombre de gènes en commun peut être expliqué par le fait que nous avons travaillé sur du sang total (granulocytes et lympho-monocytes) et que notre population est plus homogène bien que plus petite (tous les patients sont en CS).

Plus proche de notre étude est le travail réalisé par Tang et col ²³⁴, qui analysa, sur une cohorte de 35 patients en sepsis sévère, le transcriptome à la recherche là aussi d'une signature moléculaire du sepsis. En utilisant la même puce Affimetrix que nous mais uniquement sur les lympho-monocytes circulants et avec un *fold change* de 1,5, ils ont objectivé 138 expressions de gènes significativement modifiées, groupées en quatre clusters. Deux sont sur-exprimés : apoptose et transduction du signal, réponse inflammatoire ; deux autres réprimés : activation lymphocytaire et fonction immune. Ces résultats sont comparables aux nôtres. Lorsque l'on regarde les gènes sélectionnés par les auteurs (par *fold change* élevé), nous pouvons constater des similitudes avec nos résultats comme reporté sur le Tableau 12.

Gene Symbol	Biological Process/Molecular Function	Nos Résultats
SYNJ1	Synaptic vesicle endocytosis	X
PICALM	Protein complex assembly	X
MFAP3	Structural protein	X
CARD12	Apoptosis	X
APAF1	Apoptosis	X
PLCG2	Transmembrane signaling	
PIK3CG	Transmembrane signaling	
ELMOD2	Apoptosis	X
C1GALT1C1	Transferase activity	
COL4A3BP	Transferase activity	X
FBXO33	Post-translational protein modification	X
ATP13A	ATPase activity	X
GNB4	Transmembrane signaling	
SAR1B	Intra-cellular protein transport	
SSFA2	Unknown	
PTPN1	Activation of the (MAPK) cascades	
IL10RB	Anti-inflammatory cytokines	X
MAPK6	Activation of the (MAPK) cascades	X
CTSC	Activation of serine proteinases in immune cells	X
PLA2G7	Inflammatory response	X
SOCS1	Regulation of cytokine signalling	X
S100A8	Inflammatory response	X
GNA12	Transmembrane signalling	X
DCK	Pyrimidine metabolism	
EIF3S9	Translation initiation	
DDX24	RNA metabolism	X
TNFSF8	Inflammatory response	X
IL27RA	Regulation of lymphocyte activity	X
DOHH	Chromosome condensation	
MAPK8IP2	T cell activation	X
BCL2	Suppress apoptosis	
GP1BB	Immune function	
SQSTM1	Regulation of immune response	
SCT	Secretin	
ISYNA1	Phospholipid biosynthesis	
LTK	Tyrosine kinase signaling pathway	
JSRP1	Excitation-contraction coupling	
TFRC	Transferrin receptor	X
DCBLD2	Protein binding	

Tableau 12 : Comparaison des expressions de gènes significativement modifiées dans le CS dans l'étude de Tang et col²³⁴. X : gènes communs avec nos résultats.

Bien que pédiatrique et donc différente de notre cohorte, Wong HR et col²³⁵ ont publié une étude importante du transcriptome (en utilisant les mêmes puces) dans une double population d'enfants en sepsis sévère ou en CS. 1 867 gènes ont une expression modifiée dans le CS comparé aux 606 gènes dans le sepsis, dont 381 en commun. Ceci suggère que la survenue du choc dans le sepsis soit bien une entité spécifique et qu'il ne faut pas « mélanger » le CS avec les autres états septiques (sepsis, sepsis sévère), comme parfois nous l'observons dans la littérature.

Puis les auteurs ont analysé les 381 gènes communs, pour diminuer, après tests statistiques à 136 puis à 35 en prenant un *fold change* >2. 23 gènes sont communs avec notre étude, reportés sur le tableau 13.

RESULTATS de L'ETUDE de WONG ⁸⁸	NOS RESULTATS
Cyclin B2	X
CD200 molecule	X
CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant	X
CD79a molecule, immunoglobulin-associated alpha	X
CD86 molecule	X
class II, major histocompatibility complex, transactivator	X
Erk	
histone deacetylase 9	
Histone h3	
Major histocompatibility complex, class II, DM alpha	X
Major histocompatibility complex, class II, DM beta	X
Major histocompatibility complex, class II, DO alpha	X
Major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1	X
Major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1	X
Major histocompatibility complex, class II, DR alpha	X
Major histocompatibility complex, class II, DR beta 1	X
hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM)	X
IFN-B	X
immunoglobulin heavy constant mu	
Jnk	
low density lipoprotein receptor	X
myocyte enhancer factor 2C	X
MCH Class II	X
MCH Class II B	X
Mhc2	
P38 MAPK	
protocadherin 9	
proteinase 3	
resistin	X
TGF-B	X
transforming growth factor, beta-induced, 68kDa	X
tribbles homolog 1 (Drosophila)	
ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1	X

Tableau 13 : Comparaison des expressions de gènes dans le CS chez l'enfant (d'après Wong HR et col⁸⁸) versus notre travail. X : expression de gène commune avec notre cohorte

Enfin, les auteurs n'ont pas analysé les 1 310 autres gènes mis en évidence dans le groupe CS, sans donner d'explications dans leur article.

Une autre publication s'approche de notre travail, à savoir celle de Howrylak et col²³⁶ qui rechercha une signature moléculaire lors de la survenue d'une atteinte pulmonaire au cours du sepsis. 13 patients en sepsis sévère avec atteinte respiratoire (mais seulement 1/3 des patients avaient une infection pulmonaire) comparativement à un groupe contrôle de 20 patients en sepsis sans atteinte respiratoire. Avec les mêmes puces que dans notre étude, cette équipe a objectivé un groupe de huit gènes statistiquement discriminant à 88,9 % lors de l'atteinte respiratoire dans le sepsis. Ces gènes sont reportés sur le tableau 14 ainsi que la concordance avec notre étude.

	↓ ↑	Nos résultats
Ferritin, heavy polypeptide 1	-	-
ADP – ribosylation factor 3	↓	X
BTG family, member 2	↓	X
NAD(P)H dehydrogenase, quinone 2		-
Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	↑	X
Patatin-like phospholipase domain containing 2	↑	X
Aminopeptidase-like 1	↓	X
CREB/ATF bZIP transcription factor	↓	X

Tableau 14 : Liste des 8 expressions de gènes significativement modifiées en cas d'atteinte respiratoire lors du sepsis. Seule l'expression des gènes p21 et Cip a été validée par une cohorte de contrôle (RT-qPCR). D'après²³⁶ X signifie que nous retrouvons ce gène dans notre étude, ↓↑ signifie respectivement une expression diminuée ou augmentée dans notre cohorte.

Ainsi nous retrouvons une très grande partie des gènes associés à l'atteinte respiratoire dans le sepsis. Ceci montre la robustesse de notre approche expérimentale. Nous n'avons pas en revanche d'explication pour les deux expressions manquantes (ferritine et NADPH), qui n'ont cependant pas été vérifiées dans une cohorte de contrôle.

Enfin dans notre travail, sous réserve de confirmation sur une autre cohorte, nous observons que le CS pourrait à la fois induire une répression de l'activation des leucocytes et en particulier des lymphocytes T mais aussi induire une activation de la différenciation des lymphocytes naïfs vers les lymphocytes T régulateurs (*Treg*). Cette différenciation est médiée par l'activation de la voie de signalisation Jak/STAT, comme Egwuagu et col viennent de le rapporter récemment ²³⁷. STAT3, protéine clé dans cette activation, exerce une action anti-inflammatoire en participant à la régulation de la croissance cellulaire, de l'apoptose et de la transcription de cytokines de l'inflammation (IFN- γ , HMG-B1). La surexpression de STAT3 est impliquées dans la genèse de maladies inflammatoires intestinales et neuronales (uvéite) ²³⁸. Dans le sepsis, cette voie de signalisation vient récemment d'être mise en évidence sans pour autant spécifier STAT3 ²³⁹.

Concernant la deuxième partie sur les mécanismes induits par la rhPCa dans le CS, nous sommes surpris du faible niveau d'expression significativement modifié. Parmi les 9 transcrits, tous appartiennent au métabolisme et à l'inflammation non spécifique excepté l'histone 2B, qui est fortement réprimé. Ce gène est possiblement intéressant car il participe à la transcription de la chromatine, fonction centrale dans le contrôle des voies biologiques.

La recherche de données dans la littérature, n'a donné à ce jour, aucun résultat publié ni accessible sur Medline.

3. Conclusion et perspectives

L'étude du transcriptome à la phase initiale du CS, lors de pneumonie chez l'homme, révèle de profondes variations d'expressions sur les leucocytes circulants comparées à une population de témoins sains. Ces variations sont dans les deux sens, sur- et sous-expression, avec une nette tendance, selon les bases de données, à une plus intense sous-expression en nombre de gènes. Nos résultats sont cohérents à ceux publiés dans la littérature y compris dans une population pédiatrique.

Même si le nombre de gènes exprimés de façon différentes est élevé, cette première approche est dépendante des traitements statistiques élaborés et des bases de données structurées utilisées qui oblige à approfondir l'approche expérimentale et à augmenter le nombre d'inclusion. Cependant, il nous semble que l'activité de plusieurs voies biologiques doit être vérifiée par d'autres techniques et sur une autre population :

1. la sous-expression de l'activation des TCR, par cytométrie en flux, comme un travail expérimental récent vient de le suggérer *ex vivo*²⁴⁰ et au niveau de la sous-population CD4+, la sur-expression de STAT3 qui détermine la différenciation en lymphocytes T régulateurs
2. la répression de l'activité ribosomale (par RT-qPCR)
3. la sur-expression de l'activité cytoplasmique

De plus, ponctuellement plusieurs protéines nous semblent intéressantes à vérifier telles que la transferrine et des protéines dont l'activité est calcium dépendante (S100, calmoduline). L'accès à des systèmes animaux transformés doit permettre d'aborder les mécanismes du CS sur la différenciation lymphocytaire et la régulation de la mort cellulaire.

Concernant les effets potentiels non connus de la rhPCa dans le CS chez l'homme nous n'avons trouvé qu'un petit groupe de gènes liés directement ou indirectement au stress et à la mort cellulaire, qui s'ils sont confirmés dans une autre cohorte, pourrait faire partie d'une « signature moléculaire » de la PCa dans le CS, *in vivo* chez l'Homme. Par ailleurs, l'existence d'inhibiteur voir d'activateur de ses fonctions ouvre de nouvelles possibilité expérimentales. Pour ce qui est de l'effet de la rhPCa sur la mortalité, nous n'avons pas pu mettre en évidence de variation significative de gènes. Probablement la taille de notre échantillon est très insuffisante pour mettre en évidence un effet d'une molécule qui ne réduit la mortalité que de 6,1 %, soit un patient sur 15. Comme mentionné, une explication possible serait l'enclenchement d'un mécanisme précoce qui serait modulé par la protéine C activée.

Enfin, grâce à l'émergence de nouvelles approches des modifications épigéniques, la mise en évidence de variants protéiques, les approches lipidomiques (comme nouveaux messagers dans le choc septique) ainsi que l'existence de modèles animaux mutés conditionnels doit permettre d'analyser les hypothèses de travail fruit de cette étude.

BIBLIOGRAPHIE

1. Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM. Septic shock. *Lancet* 2005;365(9453):63-78.
2. Bone RC, Sibbald WJ, Sprung CL. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest* 1992;101(6):1481-3.
3. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Intensive Care Med* 2008;34(1):17-60.
4. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003;348(16):1546-54.
5. Mebazaa A, Payen D. [Severe infections: not a minute to lose for a major national priority]. *Presse Med* 2006;35(3 Pt 2):511-2.
6. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001;29(7):1303-10.
7. Annane D, Aegerter P, Jars-Guincestre MC, Guidet B. Current epidemiology of septic shock: the CUB-Rea Network. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168(2):165-72.
8. Clumeck N, George C. Immunological aspects to severe bacterial sepsis. *Intensive Care Med* 1981;7(3):109-14.
9. Ayala A, Herdon CD, Lehman DL, Ayala CA, Chaudry IH. Differential induction of apoptosis in lymphoid tissues during sepsis: variation in onset, frequency, and the nature of the mediators. *Blood* 1996;87(10):4261-75.
10. Hawiger J. Innate immunity and inflammation: a transcriptional paradigm. *Immunol Res* 2001;23(2-3):99-109.
11. van der Poll T, Opal SM. Host-pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infect Dis* 2008;8(1):32-43.
12. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003;348(2):138-50.
13. Novick RP. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol* 2003;48(6):1429-49.
14. Hacker J, Kaper JB. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* 2000;54:641-79.
15. Proft T, Sriskandan S, Yang L, Fraser JD. Superantigens and streptococcal toxic shock syndrome. *Emerg Infect Dis* 2003;9(10):1211-8.

16. Bassler BL. Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell* 2002;109(4):421-4.
17. Cerca N, Jefferson KK, Oliveira R, Pier GB, Azeredo J. Comparative antibody-mediated phagocytosis of *Staphylococcus epidermidis* cells grown in a biofilm or in the planktonic state. *Infect Immun* 2006;74(8):4849-55.
18. Chandra R, Villanueva E, Feketova E, et al. Endotoxemia down-regulates bone marrow lymphopoiesis but stimulates myelopoiesis: the effect of G6PD deficiency. *J Leukoc Biol* 2008;83(6):1541-50.
19. Alves-Filho JC, de Freitas A, Spiller F, Souto FO, Cunha FQ. The role of neutrophils in severe sepsis. *Shock* 2008;30 Suppl 1:3-9.
20. Hotchkiss RS, Swanson PE, Cobb JP, Jacobson A, Buchman TG, Karl IE. Apoptosis in lymphoid and parenchymal cells during sepsis: findings in normal and T- and B-cell-deficient mice. *Crit Care Med* 1997;25(8):1298-307.
21. Russell JA. Management of sepsis. *N Engl J Med* 2006;355(16):1699-713.
22. Mammen EF, Yoshinari M, Seegers WH. Platelet cofactors as plasma components of the intrinsic blood clotting mechanisms. *Thromb Diath Haemorrh* 1960;5:38-49.
23. Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature* 2002;420(6917):853-9.
24. Wang H, Yu M, Ochani M, et al. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 2003;421(6921):384-8.
25. Mira JP, Cariou A, Grall F, et al. Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. *Jama* 1999;282(6):561-8.
26. Sutherland AM, Walley KR. Bench-to-bedside review: Association of genetic variation with sepsis. *Crit Care* 2009;13(2):210.
27. Opal SM, Girard TD, Ely EW. The immunopathogenesis of sepsis in elderly patients. *Clin Infect Dis* 2005;41 Suppl 7:S504-12.
28. Rodriguez S, Chora A, Goumnerov B, et al. Dysfunctional expansion of hematopoietic stem cells and block of myeloid differentiation in lethal sepsis. *Blood* 2009;114(19):4064-76.
29. Bhatia M, He M, Zhang H, Moochhala S. Sepsis as a model of SIRS. *Front Biosci* 2009;14:4703-11.
30. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001;344(10):699-709.
31. Hotchkiss RS, Coopersmith CM, McDunn JE, Ferguson TA. The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression. *Nat Med* 2009;15(5):496-7.
32. Docke WD, Randow F, Syrbe U, et al. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat Med* 1997;3(6):678-81.

33. Munford RS, Pugin J. Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163(2):316-21.
34. Hotchkiss RS, Nicholson DW. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol* 2006;6(11):813-22.
35. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med* 2003;29(4):530-8.
36. Rubulotta F, Marshall JC, Ramsay G, Nelson D, Levy M, Williams M. Predisposition, insult/infection, response, and organ dysfunction: A new model for staging severe sepsis. *Crit Care Med* 2009;37(4):1329-35.
37. Kumar A, Roberts D, Wood KE, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med* 2006;34(6):1589-96.
38. 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(19):1368-77.
39. van den Berghe G, Wouters P, Weekers F, et al. Intensive insulin therapy in the critically ill patients. *N Engl J Med* 2001;345(19):1359-67.
40. Finfer S, Chittock DR, Su SY, et al. Intensive versus conventional glucose control in critically ill patients. *N Engl J Med* 2009;360(13):1283-97.
41. Sprung CL, Annane D, Keh D, et al. Hydrocortisone therapy for patients with septic shock. *N Engl J Med* 2008;358(2):111-24.
42. Wheeler A, Steingrub J, Schmidt GA, et al. A retrospective observational study of drotrecogin alfa (activated) in adults with severe sepsis: comparison with a controlled clinical trial. *Crit Care Med* 2008;36(1):14-23.
43. Kanji S, Perreault MM, Chant C, Williamson D, Burry L. Evaluating the use of Drotrecogin alfa (activated) in adult severe sepsis: a Canadian multicenter observational study. *Intensive Care Med* 2007;33(3):517-23.
44. Vincent JL, Laterre PF, Decruyenaere J, et al. A registry of patients treated with drotrecogin alfa (activated) in Belgian intensive care units--an observational study. *Acta Clin Belg* 2008;63(1):25-30.
45. Payen D, Sablotzki A, Barie PS, et al. International integrated database for the evaluation of severe sepsis and drotrecogin alfa (activated) therapy: analysis of efficacy and safety data in a large surgical cohort. *Surgery* 2007;141(4):548-61.
46. Fiuza C, Suffredini AF. Human models of innate immunity: local and systemic inflammatory responses. *J Endotoxin Res* 2001;7(5):385-8.
47. O'Brien JM, Jr., Abraham E. New approaches to the treatment of sepsis. *Clin Chest Med* 2003;24(4):521-48, v.

48. Martich GD, Boujoukos AJ, Suffredini AF. Response of man to endotoxin. *Immunobiology* 1993;187(3-5):403-16.
49. Engelhardt R, Mackensen A, Galanos C. Phase I trial of intravenously administered endotoxin (*Salmonella abortus equi*) in cancer patients. *Cancer Res* 1991;51(10):2524-30.
50. Nemzek JA, Hugunin KM, Opp MR. Modeling sepsis in the laboratory: merging sound science with animal well-being. *Comp Med* 2008;58(2):120-8.
51. Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4(10):854-65.
52. Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, et al. Cecal ligation and puncture. *Shock* 2005;24 Suppl 1:52-7.
53. Lustig MK, Bac VH, Pavlovic D, et al. Colon ascendens stent peritonitis--a model of sepsis adopted to the rat: physiological, microcirculatory and laboratory changes. *Shock* 2007;28(1):59-64.
54. Copeland S, Warren HS, Lowry SF, Calvano SE, Remick D. Acute inflammatory response to endotoxin in mice and humans. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005;12(1):60-7.
55. Esmon CT. Why do animal models (sometimes) fail to mimic human sepsis? *Crit Care Med* 2004;32(5 Suppl):S219-22.
56. Perel P, Roberts I, Sena E, et al. Comparison of treatment effects between animal experiments and clinical trials: systematic review. *Bmj* 2007;334(7586):197.
57. Dyson A, Singer M. Animal models of sepsis: why does preclinical efficacy fail to translate to the clinical setting? *Crit Care Med* 2009;37(1 Suppl):S30-7.
58. Corrigan JJ, Jr., Ray WL, May N. Changes in the blood coagulation system associated with septicemia. *N Engl J Med* 1968;279(16):851-6.
59. Vervloet MG, Thijs LG, Hack CE. Derangements of coagulation and fibrinolysis in critically ill patients with sepsis and septic shock. *Semin Thromb Hemost* 1998;24(1):33-44.
60. Dhainaut JF, Shorr AF, Macias WL, et al. Dynamic evolution of coagulopathy in the first day of severe sepsis: relationship with mortality and organ failure. *Crit Care Med* 2005;33(2):341-8.
61. Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal* 2001;13(2):85-94.
62. Levi M, de Jonge E, van der Poll T. Rationale for restoration of physiological anticoagulant pathways in patients with sepsis and disseminated intravascular coagulation. *Crit Care Med* 2001;29(7 Suppl):S90-4.
63. Mather T, Oganessyan V, Hof P, et al. The 2.8 Å crystal structure of Gla-domainless activated protein C. *Embo J* 1996;15(24):6822-31.

64. Reitsma PH, Poort SR, Bernardi F, et al. Protein C deficiency: a database of mutations. For the Protein C & S Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost* 1993;69(1):77-84.
65. Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Mollica JS, Ferrell GL, Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(19):10212-6.
66. Esmon CT. The protein C pathway. *Chest* 2003;124(3 Suppl):26S-32S.
67. Gruber A, Griffin JH. Direct detection of activated protein C in blood from human subjects. *Blood* 1992;79(9):2340-8.
68. Rezaie AR. Vitronectin functions as a cofactor for rapid inhibition of activated protein C by plasminogen activator inhibitor-1. Implications for the mechanism of profibrinolytic action of activated protein C. *J Biol Chem* 2001;276(19):15567-70.
69. Fourrier F, Chopin C, Goudemand J, et al. Septic shock, multiple organ failure, and disseminated intravascular coagulation. Compared patterns of antithrombin III, protein C, and protein S deficiencies. *Chest* 1992;101(3):816-23.
70. Macias WL, Yan SB, Williams MD, et al. New insights into the protein C pathway: potential implications for the biological activities of drotrecogin alfa (activated). *Crit Care* 2005;9 Suppl 4:S38-45.
71. Mosnier LO, Yang XV, Griffin JH. Activated protein C mutant with minimal anticoagulant activity, normal cytoprotective activity, and preservation of thrombin activable fibrinolysis inhibitor-dependent cytoprotective functions. *J Biol Chem* 2007;282(45):33022-33.
72. Grey ST, Tsuchida A, Hau H, Orthner CL, Salem HH, Hancock WW. Selective inhibitory effects of the anticoagulant activated protein C on the responses of human mononuclear phagocytes to LPS, IFN-gamma, or phorbol ester. *J Immunol* 1994;153(8):3664-72.
73. Kurosawa S, Esmon CT, Stearns-Kurosawa DJ. The soluble endothelial protein C receptor binds to activated neutrophils: involvement of proteinase-3 and CD11b/CD18. *J Immunol* 2000;165(8):4697-703.
74. Xu J, Qu D, Esmon NL, Esmon CT. Metalloproteolytic release of endothelial cell protein C receptor. *J Biol Chem* 2000;275(8):6038-44.
75. Riewald M, Petrovan RJ, Donner A, Mueller BM, Ruf W. Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. *Science* 2002;296(5574):1880-2.
76. Mosnier LO, Griffin JH. 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(Pt 1):65-70.

77. Kerschen EJ, Fernandez JA, Cooley BC, et al. Endotoxemia and sepsis mortality reduction by non-anticoagulant activated protein C. *J Exp Med* 2007;204(10):2439-48.
78. Yuksel M, Okajima K, Uchiba M, Horiuchi S, Okabe H. Activated protein C inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha production by inhibiting activation of both nuclear factor-kappa B and activator protein-1 in human monocytes. *Thromb Haemost* 2002;88(2):267-73.
79. Brueckmann M, Hoffmann U, De Rossi L, et al. Activated protein C inhibits the release of macrophage inflammatory protein-1-alpha from THP-1 cells and from human monocytes. *Cytokine* 2004;26(3):106-13.
80. Levi M, Dorffler-Melly J, Reitsma P, et al. Aggravation of endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation and cytokine activation in heterozygous protein-C-deficient mice. *Blood* 2003;101(12):4823-7.
81. Lay AJ, Donahue D, Tsai MJ, Castellino FJ. Acute inflammation is exacerbated in mice genetically predisposed to a severe protein C deficiency. *Blood* 2007;109(5):1984-91.
82. Joyce DE, Gelbert L, Ciaccia A, DeHoff B, Grinnell BW. Gene expression profile of antithrombotic protein c defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. *J Biol Chem* 2001;276(14):11199-203.
83. Cheng T, Liu D, Griffin JH, et al. Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective. *Nat Med* 2003;9(3):338-42.
84. Looney MR, Matthay MA. Bench-to-bedside review: the role of activated protein C in maintaining endothelial tight junction function and its relationship to organ injury. *Crit Care* 2006;10(6):239.
85. Dhainaut JF, Yan SB, Joyce DE, et al. Treatment effects of drotrecogin alfa (activated) in patients with severe sepsis with or without overt disseminated intravascular coagulation. *J Thromb Haemost* 2004;2(11):1924-33.
86. Hoffmann JN, Wiedermann CJ, Juers M, et al. Benefit/risk profile of high-dose antithrombin in patients with severe sepsis treated with and without concomitant heparin. *Thromb Haemost* 2006;95(5):850-6.
87. Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 2002;109 Suppl:S81-96.
88. Wong ET, Tergaonkar V. Roles of NF-kappaB in health and disease: mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci (Lond)* 2009;116(6):451-65.
89. Schulze-Luehrmann J, Ghosh S. Antigen-receptor signaling to nuclear factor kappa B. *Immunity* 2006;25(5):701-15.
90. Matsumoto M, Yamada T, Yoshinaga SK, et al. Essential role of NF-kappa B-inducing kinase in T cell activation through the TCR/CD3 pathway. *J Immunol* 2002;169(3):1151-8.
91. Dejardin E. The alternative NF-kappaB pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development. *Biochem Pharmacol* 2006;72(9):1161-79.

92. Mackay F, Browning JL. BAFF: a fundamental survival factor for B cells. *Nat Rev Immunol* 2002;2(7):465-75.
93. Vaira S, Johnson T, Hirbe AC, et al. RelB is the NF-kappaB subunit downstream of NIK responsible for osteoclast differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(10):3897-902.
94. Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8(1):49-62.
95. Perkins ND. Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. *Oncogene* 2006;25(51):6717-30.
96. Smahi A, Courtois G, Vabres P, et al. Genomic rearrangement in NEMO impairs NF-kappaB activation and is a cause of incontinentia pigmenti. The International Incontinentia Pigmenti (IP) Consortium. *Nature* 2000;405(6785):466-72.
97. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100(1):57-70.
98. Liu J, Lin A. Wiring the cell signaling circuitry by the NF-kappa B and JNK1 crosstalk and its applications in human diseases. *Oncogene* 2007;26(22):3267-78.
99. Pasparakis M. Regulation of tissue homeostasis by NF-kappaB signalling: implications for inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol* 2009;9(11):778-88.
100. Bohrer H, Qiu F, Zimmermann T, et al. Role of NFkappaB in the mortality of sepsis. *J Clin Invest* 1997;100(5):972-85.
101. Reynaert NL, Ckless K, Korn SH, et al. Nitric oxide represses inhibitory kappaB kinase through S-nitrosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(24):8945-50.
102. Ikezoe T, Yang Y, Heber D, Taguchi H, Koeffler HP. PC-SPES: a potent inhibitor of nuclear factor-kappa B rescues mice from lipopolysaccharide-induced septic shock. *Mol Pharmacol* 2003;64(6):1521-9.
103. Sheehan M, Wong HR, Hake PW, Zingarelli B. Protective effects of isohelenin, an inhibitor of nuclear factor kappaB, in endotoxic shock in rats. *J Endotoxin Res* 2002;8(2):99-107.
104. Brown MA, Jones WK. NF-kappaB action in sepsis: the innate immune system and the heart. *Front Biosci* 2004;9:1201-17.
105. Sawa T, Corry DB, Gropper MA, Ohara M, Kurahashi K, Wiener-Kronish JP. IL-10 improves lung injury and survival in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J Immunol* 1997;159(6):2858-66.
106. Fan XH, Hayamizu K, Yahata H, et al. Emergence of anti-inflammatory monocytes in long-term surviving hosts of IL-10-transduced liver allografts. *Cytokine* 2001;13(3):183-7.

107. Medvedev AE, Kopydlowski KM, Vogel SN. Inhibition of lipopolysaccharide-induced signal transduction in endotoxin-tolerized mouse macrophages: dysregulation of cytokine, chemokine, and toll-like receptor 2 and 4 gene expression. *J Immunol* 2000;164(11):5564-74.
108. Shames BD, Meldrum DR, Selzman CH, et al. Increased levels of myocardial I κ B- α protein promote tolerance to endotoxin. *Am J Physiol* 1998;275(3 Pt 2):H1084-91.
109. Bohuslav J, Kravchenko VV, Parry GC, et al. Regulation of an essential innate immune response by the p50 subunit of NF- κ B. *J Clin Invest* 1998;102(9):1645-52.
110. Acton RD, Dahlberg PS, Uknis ME, et al. Differential sensitivity to *Escherichia coli* infection in mice lacking tumor necrosis factor p55 or interleukin-1 p80 receptors. *Arch Surg* 1996;131(11):1216-21.
111. Greten FR, Eckmann L, Greten TF, et al. IKK β links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* 2004;118(3):285-96.
112. Mora AL, LaVoy J, McKean M, et al. Prevention of NF- κ B activation in vivo by a cell-permeable NF- κ B inhibitor peptide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;289(4):L536-44.
113. Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams J, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ* 2009;16(8):1093-107.
114. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26(4):239-57.
115. Brunner T, Arnold D, Wasem C, Herren S, Fruttschi C. Regulation of cell death and survival in intestinal intraepithelial lymphocytes. *Cell Death Differ* 2001;8(7):706-14.
116. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995;267(5203):1456-62.
117. Ellis HM, Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 1986;44(6):817-29.
118. Hengartner MO, Horvitz HR. Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Genet Dev* 1994;4(4):581-6.
119. Knudson CM, Korsmeyer SJ. Bcl-2 and Bax function independently to regulate cell death. *Nat Genet* 1997;16(4):358-63.
120. Opferman JT. Apoptosis in the development of the immune system. *Cell Death Differ* 2008;15(2):234-42.
121. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995;267(5203):1449-56.
122. Yeh WC, Hakem R, Woo M, Mak TW. Gene targeting in the analysis of mammalian apoptosis and TNF receptor superfamily signaling. *Immunol Rev* 1999;169:283-302.

123. Pagliari LJ, Kuwana T, Bonzon C, et al. The multidomain proapoptotic molecules Bax and Bak are directly activated by heat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(50):17975-80.
124. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 2001;292(5517):727-30.
125. Tsujimoto Y, Gorham J, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science* 1985;229(4720):1390-3.
126. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 2007;87(1):99-163.
127. Galonek HL, Hardwick JM. Upgrading the BCL-2 network. *Nat Cell Biol* 2006;8(12):1317-9.
128. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004;116(2):205-19.
129. Liang XH, Jackson S, Seaman M, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 1999;402(6762):672-6.
130. Levine B, Sinha S, Kroemer G. Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy* 2008;4(5):600-6.
131. Akao Y, Otsuki Y, Kataoka S, Ito Y, Tsujimoto Y. Multiple subcellular localization of bcl-2: detection in nuclear outer membrane, endoplasmic reticulum membrane, and mitochondrial membranes. *Cancer Res* 1994;54(9):2468-71.
132. Muchmore SW, Sattler M, Liang H, et al. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 1996;381(6580):335-41.
133. Sedlak TW, Oltvai ZN, Yang E, et al. Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(17):7834-8.
134. Veis DJ, Sorenson CM, Shutter JR, Korsmeyer SJ. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 1993;75(2):229-40.
135. Motoyama N, Wang F, Roth KA, et al. Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science* 1995;267(5203):1506-10.
136. Lindsten T, Ross AJ, 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(6):1389-99.
137. Bouillet P, Metcalf D, Huang DC, et al. Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* 1999;286(5445):1735-8.
138. Pop C, Salvesen GS. Human caspases: activation, specificity, and regulation. *J Biol Chem* 2009;284(33):21777-81.

139. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 1995;81(4):505-12.
140. Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 1995;81(4):495-504.
141. Howard AD, Kostura MJ, Thornberry N, 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(9):2964-9.
142. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998;281(5381):1312-6.
143. Varfolomeev EE, Schuchmann M, Luria V, 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(2):267-76.
144. Kuida K, Zheng TS, Na S, et al. Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature* 1996;384(6607):368-72.
145. Norris JL, Manley JL. Selective nuclear transport of the *Drosophila* morphogen dorsal can be established by a signaling pathway involving the transmembrane protein Toll and protein kinase A. *Genes Dev* 1992;6(9):1654-67.
146. Hoffmann JA, Reichhart JM. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat Immunol* 2002;3(2):121-6.
147. Bochud PY, Calandra T. Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. *Bmj* 2003;326(7383):262-6.
148. Scott JL, McMillan R, Marino JV, Davidson JG. Leukocyte labeling with 51 chromium. IV. The kinetics of chronic lymphocytic leukemic lymphocytes. *Blood* 1973;41(1):155-62.
149. Sebзда E, Mariathasan S, Ohteki T, Jones R, Bachmann MF, Ohashi PS. Selection of the T cell repertoire. *Annu Rev Immunol* 1999;17:829-74.
150. Melchers F, ten Boekel E, Seidl T, et al. Repertoire selection by pre-B-cell receptors and B-cell receptors, and genetic control of B-cell development from immature to mature B cells. *Immunol Rev* 2000;175:33-46.
151. Steinke JW, Borish L. 3. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117(2 Suppl Mini-Primer):S441-5.
152. von Freeden-Jeffry U, Solvason N, Howard M, Murray R. The earliest T lineage-committed cells depend on IL-7 for Bcl-2 expression and normal cell cycle progression. *Immunity* 1997;7(1):147-54.
153. Akashi K, Kondo M, von Freeden-Jeffry U, Murray R, Weissman IL. Bcl-2 rescues T lymphopoiesis in interleukin-7 receptor-deficient mice. *Cell* 1997;89(7):1033-41.
154. Mandal M, Borowski C, Palomero T, et al. The BCL2A1 gene as a pre-T cell receptor-induced regulator of thymocyte survival. *J Exp Med* 2005;201(4):603-14.

155. Wang SD, Huang KJ, Lin YS, Lei HY. Sepsis-induced apoptosis of the thymocytes in mice. *J Immunol* 1994;152(10):5014-21.
156. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* 1999;27(7):1230-51.
157. 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(6):487-94.
158. Hotchkiss RS, Chang KC, Swanson PE, et al. Caspase inhibitors improve survival in sepsis: a critical role of the lymphocyte. *Nat Immunol* 2000;1(6):496-501.
159. Schotte P, Declercq W, Van Huffel S, Vandenabeele P, Beyaert R. Non-specific effects of methyl ketone peptide inhibitors of caspases. *FEBS Lett* 1999;442(1):117-21.
160. Banz A, Pontoux C, Papiernik M. Modulation of Fas-dependent apoptosis: a dynamic process controlling both the persistence and death of CD4 regulatory T cells and effector T cells. *J Immunol* 2002;169(2):750-7.
161. Scumpia PO, Delano MJ, Kelly-Scumpia KM, et al. Treatment with GITR agonistic antibody corrects adaptive immune dysfunction in sepsis. *Blood* 2007;110(10):3673-81.
162. Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 1997;390(6658):350-1.
163. Green DR, Beere HM. Apoptosis. Gone but not forgotten. *Nature* 2000;405(6782):28-9.
164. Venet F, Pachot A, Debard AL, et al. Human CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes inhibit lipopolysaccharide-induced monocyte survival through a Fas/Fas ligand-dependent mechanism. *J Immunol* 2006;177(9):6540-7.
165. Pellegrini JD, De AK, Kodys K, Puyana JC, Furse RK, Miller-Graziano C. Relationships between T lymphocyte apoptosis and anergy following trauma. *J Surg Res* 2000;88(2):200-6.
166. Laudanski K, Miller-Graziano C, Xiao W, et al. Cell-specific expression and pathway analyses reveal alterations in trauma-related human T cell and monocyte pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(42):15564-9.
167. Bandyopadhyay G, De A, Laudanski K, et al. Negative signaling contributes to T-cell anergy in trauma patients. *Crit Care Med* 2007;35(3):794-801.
168. Williams MA, Withington S, Newland AC, Kelsey SM. 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(5):1421-33.
169. Fadok VA, McDonald PP, Bratton DL, Henson PM. Regulation of macrophage cytokine production by phagocytosis of apoptotic and post-apoptotic cells. *Biochem Soc Trans* 1998;26(4):653-6.
170. Efron P, Moldawer LL. Sepsis and the dendritic cell. *Shock* 2003;20(5):386-401.

171. Efron PA, Martins A, Minnich D, et al. Characterization of the systemic loss of dendritic cells in murine lymph nodes during polymicrobial sepsis. *J Immunol* 2004;173(5):3035-43.
172. Wesche DE, Lomas-Neira JL, Perl M, Chung CS, Ayala A. Leukocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock. *J Leukoc Biol* 2005;78(2):325-37.
173. Ayala A, Chung CS, Lomas JL, et al. Shock-induced neutrophil mediated priming for acute lung injury in mice: divergent effects of TLR-4 and TLR-4/FasL deficiency. *Am J Pathol* 2002;161(6):2283-94.
174. Hotchkiss RS, Dunne WM, Swanson PE, et al. Role of apoptosis in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Science* 2001;294(5548):1783.
175. Mica L, Harter L, Trentz O, Keel M. Endotoxin reduces CD95-induced neutrophil apoptosis by cIAP-2-mediated caspase-3 degradation. *J Am Coll Surg* 2004;199(4):595-602.
176. Sookhai S, Wang JJ, McCourt M, Kirwan W, Bouchier-Hayes D, Redmond P. A novel therapeutic strategy for attenuating neutrophil-mediated lung injury in vivo. *Ann Surg* 2002;235(2):285-91.
177. Weaver JG, Rouse MS, Steckelberg JM, Badley AD. Improved survival in experimental sepsis with an orally administered inhibitor of apoptosis. *Faseb J* 2004;18(11):1185-91.
178. 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(5396):2085-8.
179. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 2000;25(2):187-91.
180. Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 1999;11(1):115-22.
181. 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* 2002;162(9):1028-32.
182. Takeuchi O, Hoshino K, Akira S. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J Immunol* 2000;165(10):5392-6.
183. Lorenz E, Mira JP, Cornish KL, Arbour NC, Schwartz DA. A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. *Infect Immun* 2000;68(11):6398-401.
184. Feterowski C, Emmanuilidis K, Miethke T, et al. Effects of functional Toll-like receptor-4 mutations on the immune response to human and experimental sepsis. *Immunology* 2003;109(3):426-31.
185. Weighardt H, Holzmann B. Role of Toll-like receptor responses for sepsis pathogenesis. *Immunobiology* 2007;212(9-10):715-22.

186. Esmon CT, Taylor FB, Jr., Snow TR. Inflammation and coagulation: linked processes potentially regulated through a common pathway mediated by protein C. *Thromb Haemost* 1991;66(1):160-5.
187. Salgado A, Boveda JL, Monasterio J, et al. Inflammatory mediators and their influence on haemostasis. *Haemostasis* 1994;24(2):132-8.
188. Cavaillon JM, Adib-Conquy M, Fitting C, Adrie C, Payen D. Cytokine cascade in sepsis. *Scand J Infect Dis* 2003;35(9):535-44.
189. Esmon CT. The protein C anticoagulant pathway. *Arterioscler Thromb* 1992;12(2):135-45.
190. Taylor FB, Jr., Chang A, Esmon CT, D'Angelo A, Vigano-D'Angelo S, Blick KE. Protein C prevents the coagulopathic and lethal effects of *Escherichia coli* infusion in the baboon. *J Clin Invest* 1987;79(3):918-25.
191. Vincent JL, Bernard GR, Beale R, et al. Drotrecogin alfa (activated) treatment in severe sepsis from the global open-label trial ENHANCE: further evidence for survival and safety and implications for early treatment. *Crit Care Med* 2005;33(10):2266-77.
192. Nadel S, Goldstein B, Williams MD, et al. Drotrecogin alfa (activated) in children with severe sepsis: a multicentre phase III randomised controlled trial. *Lancet* 2007;369(9564):836-43.
193. Dhainaut JF, Antonelli M, Wright P, et al. Extended drotrecogin alfa (activated) treatment in patients with prolonged septic shock. *Intensive Care Med* 2009;35(7):1187-95.
194. Abraham E, Laterre PF, Garg R, et al. Drotrecogin alfa (activated) for adults with severe sepsis and a low risk of death. *N Engl J Med* 2005;353(13):1332-41.
195. Eichacker PQ, Natanson C. Recombinant human activated protein C in sepsis: inconsistent trial results, an unclear mechanism of action, and safety concerns resulted in labeling restrictions and the need for phase IV trials. *Crit Care Med* 2003;31(1 Suppl):S94-6.
196. Eichacker PQ, Natanson C. Increasing evidence that the risks of rhAPC may outweigh its benefits. *Intensive Care Med* 2007;33(3):396-9.
197. Poole D, Bertolini G, Garattini S. Errors in the approval process and post-marketing evaluation of drotrecogin alfa (activated) for the treatment of severe sepsis. *Lancet Infect Dis* 2009;9(1):67-72.
198. Lindenauer PK, Rothberg MB, Nathanson BH, Pekow PS, Steingrub JS. Activated protein C and hospital mortality in septic shock: a propensity-matched analysis. *Crit Care Med* 2010;38(4):1101-7.
199. Warren BL, Eid A, Singer P, et al. Caring for the critically ill patient. High-dose antithrombin III in severe sepsis: a randomized controlled trial. *Jama* 2001;286(15):1869-78.

200. Abraham E, Reinhart K, Opal S, et al. Efficacy and safety of tifacogin (recombinant tissue factor pathway inhibitor) in severe sepsis: a randomized controlled trial. *Jama* 2003;290(2):238-47.
201. Cornet AD, Smit EG, Beishuizen A, Groeneveld AB. The role of heparin and allied compounds in the treatment of sepsis. *Thromb Haemost* 2007;98(3):579-86.
202. Zarychanski R, Doucette S, Fergusson D, et al. Early intravenous unfractionated heparin and mortality in septic shock. *Crit Care Med* 2008;36(11):2973-9.
203. Gale AJ, Tsavaler A, Griffin JH. Molecular characterization of an extended binding site for coagulation factor Va in the positive exosite of activated protein C. *J Biol Chem* 2002;277(32):28836-40.
204. Mosnier LO, Gale AJ, Yegneswaran S, Griffin JH. Activated protein C variants with normal cytoprotective but reduced anticoagulant activity. *Blood* 2004;104(6):1740-4.
205. Hotchkiss RS, Swanson PE, Knudson CM, et al. Overexpression of Bcl-2 in transgenic mice decreases apoptosis and improves survival in sepsis. *J Immunol* 1999;162(7):4148-56.
206. Weber SU, Schewe JC, Lehmann LE, et al. Induction of Bim and Bid gene expression during accelerated apoptosis in severe sepsis. *Crit Care* 2008;12(5):R128.
207. Korsmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ, Merry DE, Oltvai ZN. Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin Cancer Biol* 1993;4(6):327-32.
208. Adrie C, Pinsky MR. The inflammatory balance in human sepsis. *Intensive Care Med* 2000;26(4):364-75.
209. Toltl LJ, Beaudin S, Liaw PC. Activated protein C up-regulates IL-10 and inhibits tissue factor in blood monocytes. *J Immunol* 2008;181(3):2165-73.
210. 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(1):61-9.
211. Rainen L, Oelmueller U, Jurgensen S, et al. Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. *Clin Chem* 2002;48(11):1883-90.
212. Lavrik IN, Eils R, Fricker N, Pforr C, Krammer PH. Understanding apoptosis by systems biology approaches. *Mol Biosyst* 2009;5(10):1105-11.
213. Grimaldi D, Claessens YE, Mira JP, Chiche JD. Beyond clinical phenotype: the biologic integratome. *Crit Care Med* 2009;37(1 Suppl):S38-49.
214. Marshall A, Hodgson J. DNA chips: an array of possibilities. *Nat Biotechnol* 1998;16(1):27-31.
215. Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* 1999;21(1 Suppl):10-4.
216. Bassett DE, Jr., Eisen MB, Boguski MS. Gene expression informatics--it's all in your mine. *Nat Genet* 1999;21(1 Suppl):51-5.

217. Edgar R, Domrachev M, Lash AE. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res* 2002;30(1):207-10.
218. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 2009;4(1):44-57.
219. Gusev Y, Schmittgen TD, Lerner M, Postier R, Brackett D. Computational analysis of biological functions and pathways collectively targeted by co-expressed microRNAs in cancer. *BMC Bioinformatics* 2007;8 Suppl 7:S16.
220. Snel B, Lehmann G, Bork P, Huynen MA. STRING: a web-server to retrieve and display the repeatedly occurring neighbourhood of a gene. *Nucleic Acids Res* 2000;28(18):3442-4.
221. Gharib SA, Liles WC, Matute-Bello G, Glenney RW, Martin TR, Altemeier WA. Computational identification of key biological modules and transcription factors in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173(6):653-8.
222. Simmonds AC, Ghanayem BI, Sharma A, et al. Bioactivation of 1,1-dichloroethylene by CYP2E1 and CYP2F2 in murine lung. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;310(3):855-64.
223. Lau J, Lew QJ, Diribarne G, et al. Ubiquitination of HEXIM1 by HDM2. *Cell Cycle* 2009;8(14):2247-54.
224. Chandrasekharan MB, Huang F, Sun ZW. Histone H2B ubiquitination and beyond: Regulation of nucleosome stability, chromatin dynamics and the trans-histone H3 methylation. *Epigenetics* 2010;5(6).
225. Rosen SD, Lemjabbar-Alaoui H. Sulf-2: an extracellular modulator of cell signaling and a cancer target candidate. *Expert Opin Ther Targets* 2010.
226. Tinazzi E, Puccetti A, Gerli R, et al. Serum DNase I, soluble Fas/FasL levels and cell surface Fas expression in patients with SLE: a possible explanation for the lack of efficacy of hrDNase I treatment. *Int Immunol* 2009;21(3):237-43.
227. Zhu J, Gardner J, Pullinger CR, Kane JP, Thompson JF, Francone OL. Regulation of apoAI processing by procollagen C-proteinase enhancer-2 and bone morphogenetic protein-1. *J Lipid Res* 2009;50(7):1330-9.
228. Scheper J, Guerra-Rebollo M, Sanclimens G, et al. Protein-protein interaction antagonists as novel inhibitors of non-canonical polyubiquitylation. *PLoS One* 2010;5(6):e11403.
229. Lee YS, Choi JW, Hwang I, et al. Adipocytokine orosomuroid integrates inflammatory and metabolic signals to preserve energy homeostasis by resolving immoderate inflammation. *J Biol Chem* 2010;285(29):22174-85.
230. Pillai S, Cariappa A, Pirnie SP. Esterases and autoimmunity: the sialic acid acetyltransferase pathway and the regulation of peripheral B cell tolerance. *Trends Immunol* 2009;30(10):488-93.

231. Yi H, Akao Y, Maruyama W, Chen K, Shih J, Naoi M. Type A monoamine oxidase is the target of an endogenous dopaminergic neurotoxin, N-methyl(R)salsolinol, leading to apoptosis in SH-SY5Y cells. *J Neurochem* 2006;96(2):541-9.
232. Talwar S, Munson PJ, Barb J, et al. Gene expression profiles of peripheral blood leukocytes after endotoxin challenge in humans. *Physiol Genomics* 2006;25(2):203-15.
233. Tang BM, McLean AS, Dawes IW, Huang SJ, Lin RC. The use of gene-expression profiling to identify candidate genes in human sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176(7):676-84.
234. Tang BM, McLean AS, Dawes IW, Huang SJ, Lin RC. Gene-expression profiling of peripheral blood mononuclear cells in sepsis. *Crit Care Med* 2009;37(3):882-8.
235. Wong HR, Cvijanovich N, Allen GL, et al. Genomic expression profiling across the pediatric systemic inflammatory response syndrome, sepsis, and septic shock spectrum. *Crit Care Med* 2009;37(5):1558-66.
236. Howrylak JA, Dolinay T, Lucht L, et al. Discovery of the gene signature for acute lung injury in patients with sepsis. *Physiol Genomics* 2009;37(2):133-9.
237. Egwuagu CE. STAT3 in CD4+ T helper cell differentiation and inflammatory diseases. *Cytokine* 2009;47(3):149-56.
238. Murray PJ. STAT3-mediated anti-inflammatory signalling. *Biochem Soc Trans* 2006;34(Pt 6):1028-31.
239. Hotson AN, Hardy JW, Hale MB, Contag CH, Nolan GP. The T cell STAT signaling network is reprogrammed within hours of bacteremia via secondary signals. *J Immunol* 2009;182(12):7558-68.
240. Unsinger J, Kazama H, McDonough JS, Hotchkiss RS, Ferguson TA. Differential lymphopenia-induced homeostatic proliferation for CD4+ and CD8+ T cells following septic injury. *J Leukoc Biol* 2009;85(3):382-90.