

ÉCOLE DOCTORALE ED 414 – Sciences de la vie et de la santé
EA 3072 – Mitochondrie, stress oxydant et protection musculaire

THÈSE

présentée par :

Xavier DELABRANCHE

soutenue le : **12 juillet 2013**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Biologie**

Microparticules membranaires au cours des états septiques graves : aspects cellulaires, physiopathologiques et cliniques

THÈSE dirigée par :

M. MEZIANI Ferhat
Mme. TOTI Florence

Professeur, Université de Strasbourg
Professeur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme TESSE Angelle
M. ANGLÈS-CANO Eduardo

Maître de Conférence, Université de Nantes
Directeur de Recherches, Université René Descartes – Paris 5

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M. BILBAULT Pascal
M. LEVY Bruno

Professeur, Université de Strasbourg
Professeur, Université de Nancy

Président du Jury

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mes directeur et co-directeur de thèse, Monsieur Ferhat MEZIANI et Madame Florence TOTI pour la direction de ces travaux et les résultats obtenus, mais aussi à Madame Fatiha ZOBARI pour sa patience, sa disponibilité et son expertise dans le domaine de l'analyse des microparticules.

Viennent ensuite toutes les personnes ayant participé à l'élaboration ou à la réalisation de ces travaux : Pierre ASFAR, Asaël BERGER, Julie BOISRAMÉ-HELMS, Su DEGIRMENCI, Dominique DESPREZ, Jean-Marie FREYSSINET, Christian GACHET, Lélia GRUNEBAUM, Philippe GUIOT, François LANZA, Thierry LAVIGNE, Grégory MEYER, Yoganaden MOOTIEN.

Enfin je voudrais exprimer ma gratitude envers Madame Angela TESSE, Messieurs Eduardo ANGLÈS-CANO, Pascal BILBAULT et Bruno LEVY pour avoir accepté de juger ce travail.

À

Ma famille,

Mes amis,

Monsieur le Professeur Jean-Daniel TEMPÉ,

Mes collègues de travail au sein des services de réanimation médicale de Strasbourg (Hautepierre et
Nouvel Hôpital Civil) et Mulhouse,

Et mes compagnons de route : Hector, Johann Sebastian, Gustav, Claudio, Richard, Philip, Arnold,
Giuseppe, Piotr Illich, Antonio, Béla, Igor, Wolfgang Amadeus, Modest...

LA PRIEURE

N'allez pas croire que ce fauteuil soit un privilège de ma charge, comme le tabouret des duchesses ! Hélas ! par charité pour mes filles qui en prennent si grand soin, je voudrais m'y sentir à mon aise. Mais il n'est pas facile de retrouver d'anciennes habitudes depuis si longtemps perdues, et je vois bien que ce qui devrait être un agrément ne sera jamais plus pour moi qu'une humiliante nécessité.

BLANCHE

Il est doux, ma Mère, de se sentir si avancée dans la voie du détachement qu'on ne saurait plus retourner en arrière.

LA PRIEURE

Ma pauvre enfant, l'habitude finit par détacher de tout. Mais à quoi bon, pour une religieuse, être détachée de tout, si elle n'est pas détachée de soi-même, c'est-à-dire de son propre détachement ? (*Un silence.*) Je vois que la sévérité de notre Règle ne vous effraie pas ?

BLANCHE

Elle m'attire.

LA PRIEURE

Oui, oui, vous êtes une âme généreuse. (*Silence.*) Retenez pourtant que les obligations les plus légères en apparences sont bien souvent, dans la pratique, les plus pénibles. On franchit une montagne mais on bute sur un caillou. [...] Me répondez-vous dès maintenant si je vous demande quelle idée vous vous faites de la première obligation d'une Carmélite ?

BLANCHE

C'est de vaincre la nature.

LA PRIEURE

Fort bien. Vaincre et non pas forcer, la distinction est de conséquence. À vouloir forcer la nature, on ne réussit qu'à manquer de naturel, et ce que Dieu demande à ses filles, ce n'est pas donner chaque jour la comédie à Sa Majesté, mais de le servir. Une bonne servante est toujours où elle doit être et ne se fait jamais remarquer.

BLANCHE

Je ne demande qu'à passer inaperçue...

LA PRIEURE, *souriante, avec une pointe d'ironie.*

Hélas ! cela ne s'obtient qu'à la longue, et le désirer trop vivement ne facilite pas la chose... [...] Oh ! oui, vous brûlez de prendre la dernière place. Méfiez-vous encore de cela, mon enfant... À vouloir trop descendre on risque de passer la mesure. Or, en humilité comme en tout la démesure engendre l'orgueil, et cet orgueil-là est mille fois plus subtil et dangereux que celui du monde, qui n'est le plus souvent que vaine gloriole... (*Un silence.*) Qui vous pousse au Carmel ?

BLANCHE

Votre Révérence m'ordonne-t-elle de parler tout à fait franchement ?

LA PRIEURE

Oui.

BLANCHE

Hé bien, l'attrait d'une vie héroïque.

LA PRIEURE

L'attrait d'une vie héroïque, ou celui d'une certaine manière de vivre qui vous paraît – bien à tort – devoir rendre l'héroïsme plus facile, le mettre pour ainsi dire à la portée de la main ?...

BLANCHE

Ma Révérende Mère, pardonnez-moi, je n'ai jamais fait de tels calculs.

LA PRIEURE

Les plus dangereux de nos calculs sont ceux que nous appelons des illusions...

BLANCHE

Je puis avoir des illusions. Je ne demanderais pas mieux qu'on m'en dépouille.

LA PRIEURE

Qu'on vous en dépouille... (*Elle appuie sur les trois mots.*) Il faudra vous charger seule de ce soin, ma fille. Chacune à trop à faire de ses propres illusions. [...] De grandes épreuves vous attendent, ma fille...

BLANCHE

Qu'importe, si Dieu me donne la force.

LA PRIEURE

Ce qu'il veut éprouver en vous ce n'est pas votre force, mais votre faiblesse... (*Silence.*) [...] Qui s'aveugle volontairement sur le prochain, sous prétexte de charité, ne fait souvent rien d'autre que de briser le miroir afin de ne pas se voir dedans. Car l'infirmité de notre nature veut que ce soit d'abord en autrui que nous découvriions nos propres misères. [...] Vous pleurez ?

BLANCHE

Je pleure moins de peine que de joie. Vos paroles sont dures, mais je sens que de plus dures encore ne sauraient briser l'élan qui me porte vers vous.

LA PRIEURE

Il faudrait le modérer sans le briser. Croyez-moi, c'est une mauvaise manière de rentrer dans notre Règle que de s'y jeter à corps perdu, ainsi qu'un pauvre homme poursuivi par des voleurs.

BLANCHE

Je n'ai pas d'autre refuge, en effet.

LA PRIEURE

Notre Règle n'est pas un refuge. Ce n'est pas la Règle qui nous garde, ma fille, c'est nous qui gardons la Règle. (*Long silence.*)

Georges BERNANOS (1888-1948), Dialogues des Carmélites, Deuxième tableau, scène I.
In Œuvres romanesques, suivies de Dialogues des Carmélites, NRF, bibliothèque de la Pléiade (N°155), pages1581-7

“But as to risings, I can tell you why.
It is on contradiction that they grow.
It seemed the best thing to be up and go.
Up was the heartening and the strong reply.
The heart of standing is you cannot fly.”

William EMPSON (1906-1984), *Aubade*.
In Anthologie bilingue de la poésie anglaise, NRF, bibliothèque de la Pléiade (N°519), pages 1280-5

RÉSUMÉ

RÉSUMÉ

« Microparticules membranaires au cours des états septiques graves : aspects cellulaires, physiopathologiques et cliniques »

Ce travail porte sur le rôle des microparticules procoagulantes (MPs) générées par les cellules vasculaires en réponse à un état septique. Après une introduction rappelant la structure et les propriétés des microparticules et la réponse de l'hôte à un agent pathogène, en particulier en terme d'activation de la coagulation, nous rapportons nos travaux expérimentaux et cliniques. Le premier travail a été réalisé sur un modèle cellulaire de vésiculation induite par le LPS. Il nous a permis de caractériser le transfert fonctionnel du complexe CD14/TLR4 à différents types cellulaires in-vitro y compris dépourvus du récepteur au LPS. Ainsi, les MPs monocytaires pourraient avoir d'abord un rôle d'amplification de la réponse inflammatoire par effet auto/paracrine en augmentant le nombre de récepteurs mais aussi dans la réponse anti-inflammatoire secondaire en participant à l'apoptose lymphocytaire. Le second travail a été réalisé chez l'animal de laboratoire. Après induction d'un choc septique par ligature-perforation cœcale, nous avons observé une amélioration hémodynamique en réponse à la perfusion de protéine C activée associée à une modulation du phénotype des MPs générées. Réinjectées à des rats naïfs, les MPs issues des rats septiques traités par protéine C activée développaient une vasoplégie moins profonde et une réaction inflammatoire tissulaire diminuée. Enfin, nous avons réalisé une étude prospective sur 3 services de réanimation médicale portant sur 100 patients en choc septique. Nous avons ainsi pu caractériser la présence d'une concentration élevée de microparticules procoagulantes, avec une variation phénotypique en présence de coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) : réduction du contingent plaquettaire au profit des MPs d'origine leucocytaires qui deviennent prépondérantes et témoignent d'une activation leucocytaire accrue, et surtout une activation des cellules endothéliales avec génération de MPs porteuses d'endogline (CD105). En analyse multivariée, la présence de MPs CD105⁺ était fortement associée à la CIVD ; ces MPs étant présentes dans le plasma avant le diagnostic biologique de CIVD, elles pourraient constituer un marqueur précoce de l'atteinte endothéliale au cours du choc septique. Ce travail a fait l'objet d'un dépôt de brevet et de l'obtention d'un fond de maturation.

SUMMARY

“Membrane microparticles during severe septic challenge: cellular, pathophysiological and clinical aspects”

This work focused on procoagulant microparticles shed after vascular cells stress during sepsis. The first part gives an overview on MPs and host response during pathogen challenge. The first lab experimental work confirms direct and functional transfer of CD14/TLR4 LPS sensor by MPs shed to target cells after monocytic THP-1 challenge by LPS. CD14-MPs amplify LPS-induced apoptosis in monocytes but also prompted lymphocyte apoptosis and could play a role in secondary anti-inflammatory response. Then, septic shock was induced in rats after caecal ligation and puncture. Activated protein C (APC) infusion improved haemodynamic parameters and alter septic microparticulate content. Infused in naïve rats, APC-treated MPs were associated with reduced hypotension and inflammatory response, confirming cytoprotective effect of both APC and APC-induced MPs. Finally, we performed a clinical prospective study in 3 medical ICU in France. Patients referred for septic shock had an increased level of circulating procoagulant MPs regardless disseminated intravascular coagulopathy (DIC) diagnosis. Nevertheless, DIC patients evidenced a specific pattern with lower platelet-MPs, increased leucocyte-MPs and specific endothelial cells activation with endoglin (CD105) shedding. In multiple logistic regression analysis, CD105-MPs were strongly associated with DIC and were evidenced before DIC diagnosis according to routine laboratory assays.

An L-shaped line graphic consisting of a vertical line on the left and a horizontal line extending to the right, both starting from the same point on the left side of the page.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

RÉSUMÉ	7
Résumé	8
Summary	9
SOMMAIRE	10
Sommaire	11
Liste de figures	14
Liste des tableaux	15
Liste des abréviations	16
INTRODUCTION	18
Microparticules : un nouvel acteur dans la réponse de l'hôte à l'agression	19
Remodelage membranaire et microparticules	22
• Vésicules : caractéristiques chez le pathogène et chez l'hôte	22
• Remodelage membranaire et émission de microparticules	27
- <i>Asymétrie de la membrane plasmique, maintien et rupture</i>	27
- <i>Phospholipides membranaires et mécanismes de remodelage</i>	30
- <i>Réorganisation du cytosquelette</i>	32
- <i>Vésiculation membranaire</i>	33
• Propriétés des microparticules	34
- <i>Structure</i>	34
- <i>Rémanence et clairance</i>	35
- <i>Détection, quantification et détermination de l'origine cellulaire des MPs</i>	36
- <i>Fonction des microparticules</i>	39
- <i>Microparticules en physiologie et en pathologie</i>	40
Réponse de l'hôte à l'infection	44
• Définitions	44
• Reconnaissance des pathogènes et signalisation	45
- <i>Reconnaissance des « signaux de danger »</i>	46
- <i>Signalisation induite par le LPS</i>	48
- <i>Autres médiateurs de l'inflammation : stress oxydant et monoxyde d'azote (NO)</i>	50
- <i>Autres médiateurs de l'inflammation : histones et NETs</i>	52

• Hémostase comme réponse de l'hôte à l'agression	55
- <i>Des cellules et des protéines</i>	56
- <i>Infection et initiation de l'hémostase</i>	61
- <i>Propagation et dépassement des capacités de régulation</i>	64
- <i>Fibrinolyse</i>	67
- <i>Diagnostic de la coagulation intravasculaire disséminée</i>	68
Microparticules, infection et choc septique	71
• Microparticules et réponse inflammatoire	71
• Effets des microparticules sur l'homéostasie vasculaire	73
• Effets des microparticules sur la coagulation	75
• Les microparticules : marqueurs pronostiques ?	77
• Les microparticules : cibles thérapeutiques ?	78
• Conclusion	80
OBJECTIFS	82
TRAVAUX PERSONNELS	84
Article 1 : Microparticles deliver CD14/TLR4 to tune monocyte and T-lymphocyte inflammatory reponse: a new insight in host-response to endotoxin	85
Article 2 : Pharmacological modulation of procoagulant microparticles improves hemodynamic dysfunction during septic shock in rats	126
Article 3 : Microparticles are new biomarkers of septic shock-induced disseminated intravascular coagulopathy	169
Article 4 : Endothelial microparticles as early sensors of septic shock-induced DIC: a new cell-base diagnosis approach	192
DISCUSSION	202
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	215
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	219

ANNEXES	235
Annexe 1 : Bench-to-bedside review: Circulating microparticles - a new player in sepsis?	236
Annexe 2 : Are microparticles reliable deleterious effectors in septic coagulopathy?	245
Annexe 3 : Microparticles and infectious diseases	257

LISTE DES FIGURES

1.	Exosomes et microparticules	24
2.	Régulation de l'asymétrie lipidique au sein des membranes lipidiques	28
3.	Rôle du calcium dans l'exposition de la PhtdSer	32
4.	Remodelages membranaires et du cytosquelette conduisant à la libération des MPs	34
5.	Test prothrombinase	38
6.	Répertoire impliqué dans la communication intercellulaire	39
7.	Voies de transfert intercellulaire des informations portées par les MPs	40
8.	Signalisation induite par les TLRs et les NLRs	48
9.	Voies de sécrétion de l'IL-1 β	50
10.	Formation des NETs	53
11.	Structure schématique des différents facteurs de la coagulation	59
12.	Initiation de l'hémostase	62
13.	Thrombino- et fibrinoformation	65
14.	Régulation de l'hémostase	67
15.	Fibrinolyse et protéolyse	68
16.	Implication des MPs dans le choc septique	81

LISTE DES TABLEAUX

I.	Caractéristiques principales des différentes MVs	23
II.	Clairance des MPs <i>in vivo</i>	36
III.	Méthodes d'analyse des MPs	37
IV.	Marqueurs de surface des MPs vasculaires en fonction de la cellule émettrice	38
V.	Ligands des TLRs	47
VI.	Scores diagnostiques de CIVD	70

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABC	<i>ATP-Binding Cassette transporter</i>	Transporteur lipidique dépendant de l'ATP
ADAMTS13	<i>a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13</i>	
ADP	<i>Adenosine DiPhosphate</i>	Adénosine diphosphate
Anx-A5	<i>Annexin-5</i>	Annexine-5
APC	PCa <i>Activated Protein C</i>	Protéine C activée
AT	<i>Antithrombin</i>	Antithrombine
ATP	<i>Adenosine TriPhosphate</i>	Adénosine Triphosphate
CARS	<i>Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome</i>	Syndrome de Réponse Anti-inflammatoire Compensatoire
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>	Cluster de Différentiation
CLR	<i>C-type Leptin Receptor</i>	Récepteur de la Leptine de type C
DDi	<i>D-dimers</i>	D-dimères
DIC	<i>Disseminated Intravascular Coagulopathy</i>	
	CIVD	Coagulation Intravasculaire Disséminée
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>	Acide Désoxyribonucléique
EDRF	<i>Endothelium Derived Relaxing Factor (NO)</i>	
		Facteur de relaxation derive de l'endothélium (NO)
eNOS	<i>endothelial NO-Synthase</i>	NO-synthétase endothéliale
EPCR	<i>Endothelial Protein C Receptor</i>	Récepteur endothélial de la protéine C
F1+2	<i>Prothrombin fragments 1+2</i>	Fragments 1+2 de la prothrombine
FII/FIIa	<i>Prothrombin/Thrombin</i>	Prothrombine/Thrombine
FM	<i>Fibrin Monomers</i>	Monomères de fibrine
GPI	<i>Glycerophospho-inositol (anchor)</i>	Glycérophospho-inositol (ancree)
GPV	<i>Platelet glycoprotein V</i>	Glycoprotéine V plaquettaire
HMWK	<i>High Molecular Weight Kininogen</i>	Kininogène de haut poids moléculaire
IL-10	<i>Interleukin-10</i>	Interleukine-10
IL-1 β	<i>Interleukin-1β</i>	Interleukine-1 β
IL-6	<i>Interleukin-6</i>	Interleukine-6
IL-8	<i>Interleukin-8</i>	Interleukine 8
iNOS	<i>inducible NO-Synthase</i>	NO-synthétase inductible
IRF	<i>Interferon Regulatory Factor</i>	Facteur de regulation de l'Interféron
ISTH	<i>International Society for Thrombosis and Haemostasis</i>	
LBP	<i>LPS-Binding Protein</i>	Protéine liant le LPS
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>	Lipopolysaccharide
MCP-1	<i>Macrophage Chemoattractant Protein-1</i>	
miRNA	<i>microRibonucleic Acid</i>	Acide Ribonucléique microscopique

MMP	<i>Metalloproteinase</i>	Métalloprotéinase
MPO	<i>Myeloperoxidase</i>	Myéloperoxydase
MPs	<i>Microparticles</i>	Microparticules
mRNA	<i>messenger Ribonucleic Acid</i>	Acide Ribonucléique messenger
MVs	<i>Microvesicles</i>	Microvésicules
NETs	<i>Neutrophil Extracellular Traps</i>	Pièges extracellulaires issus des neutrophiles
NF-κB	<i>Nuclear Factor κB</i>	Facteur de transcription nucléaire κB
NLRs	<i>Nucleotide oligomerization domain (NOD)-like Receptors</i>	Récepteur de type NOD
NO	<i>Nitric Oxide</i>	Monoxyde d'azote
P ₄ -ATPase	<i>ATPase de type P4</i>	Transporteur lipidique dépendant de l'ATP
PAD4	<i>PeptidylArginine Deiminase 4</i>	Peptidylarginine désaminase 4
PAI-1	<i>Plasminogen Activator Inhibitor-1</i>	Inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type 1
PAMPs	<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>	Motif moléculaire associé au pathogène
PAR	<i>Protease-Associated Receptor</i>	Récepteur associé aux protéases
PC	<i>Protein C</i>	Protéine C
PF4	<i>Platelet Factor 4</i>	Facteur 4 plaquettaire
PhtdChol	<i>Phosphatidylcholine</i>	Phosphatidylcholine
PhtdEth	<i>Phosphatidylethanolamine</i>	Phosphatidyléthanolamine
PhtdSer	<i>Phosphatidylserine</i>	Phosphatidysérine
PK	<i>Prekallikrein</i>	Prékallicroïne
PLA ₂	<i>Phospholipase A₂</i>	Phospholipase A ₂
PLD	<i>Phospholipase D</i>	Phospholipase D
polyP	<i>Polyphosphates</i>	Polyphosphates
PRRs	<i>Pattern Recognition Receptors</i>	Récepteurs des motifs de reconnaissance
PS	<i>Protein S</i>	Protéine S
RLRs	<i>RIG-I like Receptors</i>	Récepteurs de type RIG-I
SIRS	<i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i>	Syndrome de Réponse Inflammatoire Systémique
SOCE	<i>Store-Operated Calcium Entry</i>	
TAFI	<i>Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor</i>	Inhibiteur de la fibrinolyse activable par la thrombine
TAT	<i>Thrombin-Antithrombin complex</i>	Complexe thrombine-antithrombine
TF	<i>Tissue Factor</i>	Facteur Tissulaire
TLRs	<i>Toll-like Receptors</i>	Récepteurs de type Toll
TM	<i>Thrombomodulin</i>	Thrombomoduline
TNFα	<i>Tumor Necrosis Factor α</i>	Facteur de nécrose des tumeurs α
tPA	<i>tissue-type Plasminogen Activator</i>	Activateur de type tissulaire du plasminogène
TXA ₂	<i>Thromboxane A₂</i>	Thromboxane A ₂
uPA	<i>urinary-type Plasminogen Activator</i>	Activateur de type urinaire du plasminogène
vWF	<i>von Willebrand Factor</i>	Facteur von Willebrand



INTRODUCTION

MICROPARTICULES : UN NOUVEL ACTEUR DANS LA RÉPONSE DE L'HÔTE À L'AGRESSION

Tout organisme vivant est perpétuellement soumis à des agressions du milieu extérieur et doit donc mettre en œuvre des mécanismes de défense plus ou moins élaborés pour assurer sa pérennité, sa survie et sa descendance. Ces mécanismes, pour certains communs à l'ensemble du monde vivant, pour d'autres apparus au cours de l'évolution et donc spécifiques à certaines branches de la phylogénie, se sont raffinés pour aboutir à des systèmes d'une extrême efficacité et d'une très grande robustesse, leur déficience se traduisant par une survie restreinte. Ce n'est que très tardivement sur cette échelle que l'Homme a essayé de soulager les souffrances de ses congénères, puis a caressé l'utopie de guérir au-delà de simplement prendre soin. C'est l'objet de la médecine et le devoir du médecin. Son champ d'intervention ne doit donc pas « aller contre » les mécanismes de défense du patient agressé, mais au contraire l'accompagner dans cette « réponse » en limitant ses excès. Seule une étude approfondie de ses mécanismes permettra d'améliorer ses connaissances, source de nouveaux soins prodigués au patient.

La vésiculation membranaire et la génération de microparticules (MPs) sont des phénomènes ubiquitaires, finement régulés, permettant de disséminer des molécules bio-actives (protéines membranaires ou internes, acides nucléiques) à d'autres cellules. La première description a été faite par Wolf en 1967 (Wolf, 1967) malgré l'hypothèse d'un « constituant plasmatique », pouvant correspondre aux MPs, évoquée en 1946 (Chargaff & West, 1946). Les microparticules circulantes proviennent des différentes cellules du compartiment vasculaire après stimulation et sont donc un reflet de l'activation cellulaire. La formation des MPs associe deux phénomènes principaux : une externalisation au niveau du feuillet externe de la membrane plasmatique d'un aminophospholipide, la phosphatidylsérine, avec perte de l'asymétrie, et une modification du cytosquelette aboutissant à un « bourgeonnement » de la membrane et finalement l'émission de la MPs (Zwaal & Schroit, 1997).

Les MPs peuvent interagir avec des cellules cibles ou être éliminées, principalement par le système réticulo-endothélial. Une concentration accrue, ou une contribution cellulaire différente, a été caractérisée au cours de certaines situations pathologiques, principalement thrombo-emboliques mais aussi au cours des pathologies infectieuses, inflammatoires, tumorales (Distler *et al*, 2005 ; Morel *et al*, 2011a ; Owens & Mackman, 2011 ; van der Pol *et al*, 2012 ; Roos *et al*, 2010 ; Inal *et al*, 2012 ; Barteneva *et al*, 2013). Leur rôle au cours du choc septique a été également étudié tant sur des modèles expérimentaux qu'en clinique (Nieuwland *et al*, 2000 ; Joop *et al*, 2001 ; Aras *et al*, 2004 ; Soriano *et al*, 2005 ; Perez-Casal *et al*, 2005 ; Mostefai *et al*, 2008 ; Meziani *et al*, 2010 ; Mortaza *et al*, 2009 ; Mastronardi *et al*, 2011 ; Reid & Webster, 2012). En effet, les MPs portent à leur surface de la PhtdSer, et constituent ainsi une surface activée procoagulante car elle permet l'assemblage des facteurs de la coagulation porteurs de charges négatives par l'intermédiaire des résidus γ -carboxylés et du calcium ionisé (Zwaal & Schroit, 1997 ; Hugel *et al*, 2005). Le syndrome de Scott est un désordre hémorragique rare caractérisé par l'impossibilité d'externaliser de la PhtdSer et d'émettre des MPs, rendant compte du rôle fondamental de la PhtdSer et des MPs (Toti *et al*, 1996). Au-delà de la simple description de la présence de MPs au cours des états septiques graves, différentes équipes se sont intéressées à comprendre la place des MPs dans la physiopathologie. Tout d'abord, Satta et coll. ont montré la présence de facteur tissulaire (TF), initiateur de la coagulation, sur les MPs émises par des monocytes en réponse au LPS (Satta *et al*, 1994).

Notre travail de thèse a porté sur les caractéristiques des MPs au cours des états septiques graves, en se fondant sur l'hypothèse qu'elles sont des marqueurs pathogènes. Le manuscrit articule des données de recherche expérimentale et des données de recherche clinique. Le premier article est centré sur l'endotoxémie et les MPs et présente un modèle animal chez le rat et des modèles de communication intercellulaire entre monocyte et lymphocyte permettant d'explorer la modulation de la réponse cellulaire au LPS par les MPs monocytaires ainsi que les conséquences du transfert de CD14/TLR4 via les MPs sur la réponse inflammatoire. Le second article porte sur l'effet hémodynamique des MPs et sa modulation pharmacologique par la protéine C activée dans un modèle de rats septiques par péritonite induite par ligature-cæcale-perforation. Le troisième est un travail de recherche translationnelle réalisée chez des patients en choc septique admis dans 3 services de réanimation médicale permettant de mettre en évidence

un profil particulier des MPs chez les patients développant une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD). Dans ce dernier travail, les MPs sont présentées comme un outil d'exploration du rôle des cellules vasculaires dans l'équilibre hémostatique au cours du choc septique et de la séquence des activations cellulaires qui conduisent à la CIVD. Les résultats obtenus montrent l'intérêt des MPs circulantes pour le diagnostic précoce et le suivi de la résolution de la CIVD au cours du choc septique et pour l'identification de patients les plus à-même de répondre aux traitements modulateurs de l'hémostase en réanimation ce qui a conduit à un dépôt de brevet. Cette approche cellulaire pourrait permettre de « sélectionner » les patients les plus à-même de répondre aux traitements modulateurs de l'hémostase en réanimation.

REMODELLAGE MEMBRANAIRE ET MICROPARTICULES

La vésiculation membranaire est un processus de remodelage de la membrane plasmique aboutissant au bourgeonnement et à la libération d'une vésicule de moins de 1 µm de diamètre, ceinte par la membrane cellulaire et contenant des éléments du contenu cytoplasmique au point d'émission (Hugel *et al*, 2005). Il est intéressant de remarquer que les remodelages membranaires et la génération de microvésicules (MVs) sont observés avec des intensités diverses dans toutes les cellules eucaryotes, y compris les levures. Ce phénomène est étroitement régulé car il sert de signal dans différents processus allant de la reconnaissance par le système réticulo-endothélial à l'initiation de processus complexes nécessitant des interactions spécifiques entre la cellule et la matrice ou le milieu environnant comme l'angiogenèse, la différenciation cellulaire ou l'hémostase (Morel *et al*, 2004 ; Hugel *et al*, 2005 ; Mause & Weber, 2010 ; Owens & Mackman, 2011).

VÉSICULES : CARACTÉRISTIQUES CHEZ LE PATHOGENE ET CHEZ L'HÔTE

Les microvésicules (MVs) constituent une classe très large décrite dans tout le règne animal et regroupant des entités très différentes selon l'organisme unicellulaire ou selon l'organe ou le compartiment cellulaire (Delabranche *et al*, 2012).

Des MVs de 50 à 100 nm ont été isolées à partir de levures, de protozoaires, de virus et de bactéries. Elles sont associées à des mécanismes d'apoptose chez les levures, mais aussi impliquées dans les phénomènes d'invasion de l'hôte. Les MVs issues de la membrane externe des bactéries (OMV ou *outer membrane vesicles*) favorisent la dissémination du lipopolysaccharide (LPS) des bactéries gram-négatives (Kulp & Kuehn, 2010). Enfin, on sait qu'au cours du cycle viral, certains virions sont expulsés dans des vésicules de la membrane plasmique de l'hôte ce qui les protègent probablement d'une détection immédiate par les systèmes de défense immunitaires (Callahan *et al*, 2003). Il est intéressant de noter que les MPs qui

pourtant exhibent de la PhtdSer, un signal de reconnaissance des cellules vieillissantes, échappent transitoirement au système réticulo-endothélial en raison de leur faible taille et restent accessibles à la détection dans le plasma plus longtemps que la cellule apoptotique (Frey & Gaipf, 2011). Il existe également des MVs émises par les cellules infectées par des virus et qui constituent une voie de dissémination du matériel nucléaire viral et ainsi d'infestation de nouvelles cellules. Ces MVs proviennent de la membrane plasmique mais ne présentent pas de remodelage membranaire ; elles sont dénommées VPLs pour Virus-like Particles (Johnson & Chiu, 2000).

Chez l'hôte eucaryote du pathogène, les MVs et leurs rôles tant en physiologie qu'en physiopathologie est en cours d'élucidation. Les MVs d'origine endosomique libérées par fusion avec la membrane plasmique sont nommées « exosomes » tandis que celles formées après remodelage membranaire et échange de lipides entre les feuillettes interne et externe de la membrane plasmique sont dénommées « ectosomes » ou microparticules (MPs) (Hugel *et al*, 2005 ; György *et al*, 2011 ; van der Pol *et al*, 2012). Cependant dans les premières publications elles sont aussi parfois désignées comme microvésicules. Exosomes et MPs ont des origines cellulaires, contenus et propriétés différentes (Tableau I et Figure 1). Dans la suite de notre travail, le terme de microparticules ne concernera que ces entités cellulaires.

Tableau I. Caractéristiques principales des différentes MVs (d'après György *et al*, 2011).

	Exosomes	Microparticules (MPs)
Taille	50-100 nm	100-1000 nm
Génération	Exocytose	Bourgeonnement
Isolement	Ultracentrifugation Densité 1,13-1,19 g/mL	Centrifugation Filtration
Détection	Microscopie électronique Cytométrie en flux	Microscopie électronique Cytométrie en flux Test fonctionnel après capture
Source cellulaire	Cellules immunitaires et tumorales	Cellules vasculaires (cellules endothéliales, plaquettes, leucocytes, hématies)
Marqueurs	CD63 (tétraspanine), CD81, CD9, LAMP1, TSG101	PhtdSer, TF, marqueurs cellulaires spécifiques de la lignée

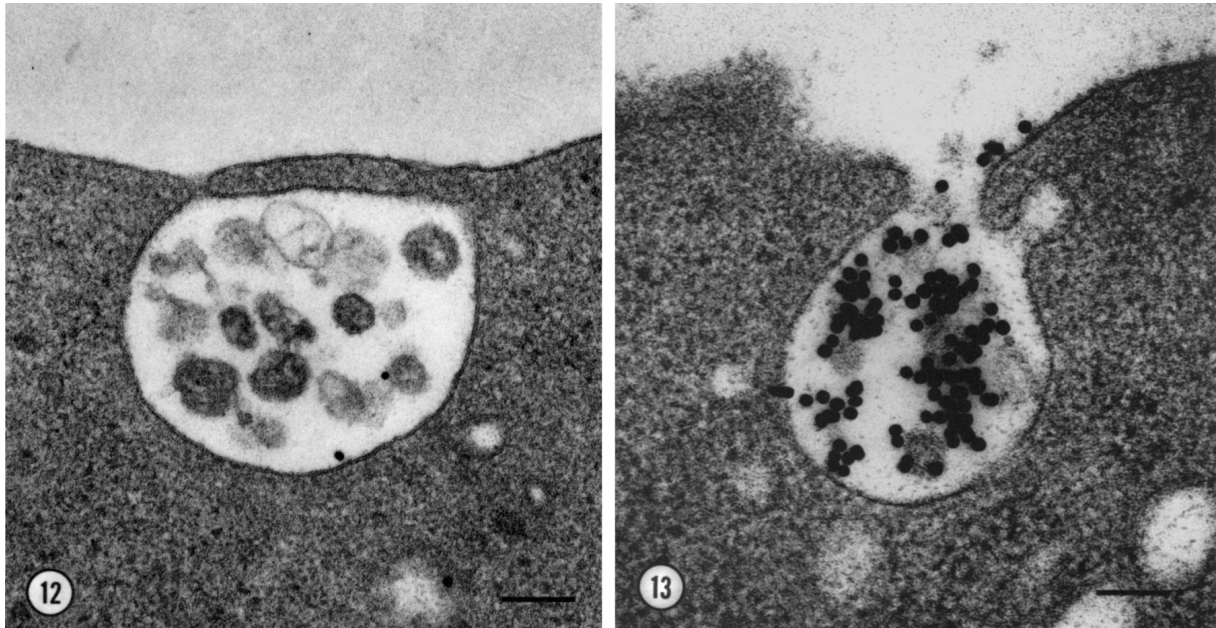


Figure 1a. Exosome fusionnant à la membrane puis libérant son contenu (Harding *et al*, 2013)

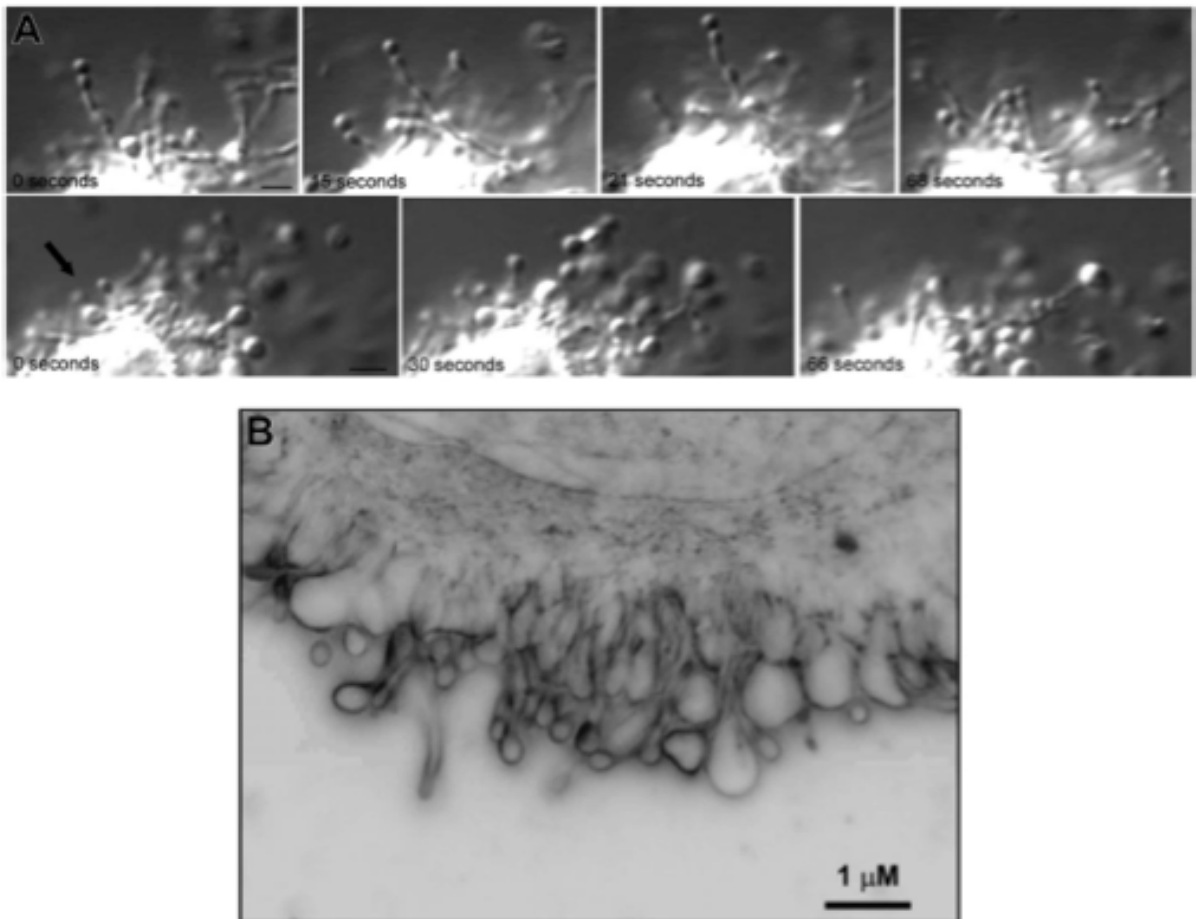


Figure 1b. Vésiculation membranaire à la surface d'un mégacaryocyte (Flaumenhaft *et al*, 2010).

Ainsi, ces dernières années, un rôle des microparticules a été évoqué dans d'autres compartiments que le compartiment vasculaire comme le foie, le LCR ou la synovie. Même si les mécanismes d'interactions restent encore peu décryptés et semblent différer selon les types cellulaires, la MP est maintenant reconnue comme une navette cellulaire transmettant des signaux biologiques de la cellule stressée parentale qui l'émet à une cellule cible (Morel *et al*, 2004).

Dans la littérature, la distinction entre les différentes MVs n'est pas toujours présente. De plus, la lecture est compliquée par l'évolution des termes employés, la diversité des techniques d'isolement ou le choix des méthodes de caractérisation. À titre d'exemple, le terme de MPs est parfois jugé inapproprié puisque la taille des MPs est inférieure au micromètre, et le terme de nanoparticules membranaires reste peu usité tandis que le terme microvésicules, plus ancien, peut être employé pour désigner des MPs ou des vésicules libérées par des cellules non vasculaires ou cancéreuses (Janowska-Wieczorek *et al*, 2005). C'est en raison de leurs propriétés généralement procoagulantes, que nous nous sommes spécifiquement intéressés aux microparticules (MPs) et à leur rôle au cours de la réponse de l'hôte à l'infection.

Les MPs circulantes proviennent principalement des différentes cellules du compartiment vasculaire. Une concentration accrue de MPs circulantes, généralement combinée à une origine cellulaire différente, a été associée à des situations pathologiques le plus souvent thrombotiques mais aussi dégénératives ou inflammatoires. La rapidité du transfert des MPs aux cellules cibles et de leur élimination par le système réticulo-endothélial déterminera la quantité et le profil phénotypique des MPs circulantes.

De fait, les MPs circulantes constituent un réservoir dynamique d'effecteurs cellulaires dont les caractéristiques varient avec le stress et la réponse vasculaire, au sens large du terme (Morel *et al*, 2004). En effet, si les MPs portent à leur surface de la PhtdSer, et parfois TF, deux entités procoagulantes, elles véhiculent aussi des protéines anticoagulantes comme la thrombomoduline ou le récepteur endothélial de la protéine C (EPCR) (Satta *et al*, 1997 ; Perez-Casal *et al*, 2005). Les propriétés anticoagulantes des MPs sont généralement dépassées en cas de stress important, comme celui induit par le LPS dans les monocytes par exemple (Satta *et al*, 1997).

Si la pertinence physiopathologique des propriétés procoagulantes des MPs a été validée par l'association au risque thrombotique (Morel *et al*, 2006a), peu de données en clinique humaine permettent d'affirmer leur rôle hémostatique. Les observations initiales suggéraient que les MPs constituent une surface procoagulante supplémentaire pour les réactions de la coagulation (Howard *et al*, 1988) et il a été montré dans des modèles animaux que les MPs d'origine leucocytaire porteuses de TF s'intègrent rapidement au thrombus. Un gain de fonction a également été démontré chez des souris hémophiles manipulées génétiquement pour libérer des taux accrus de MPs (Hrachovinová *et al*, 2003).

La seule pathologie permettant d'établir le rôle hémostatique des remodelages de la membrane plasmique et de la libération des MPs est le syndrome de Scott (Toti *et al*, 1996). Cela se traduit par des hémorragies en situation provoquée uniquement. Un autre syndrome moins clairement défini et ne touchant que l'absence d'émission de microparticules (dysvésiculation) a été rapporté mais les données restent fragmentaires (Castaman *et al*, 1997). Dans la dernière décade, le rôle de MPs porteuses de TF a été fortement suggéré dans l'initiation et dans la propagation des réactions procoagulantes (Butenas *et al*, 2009). En effet, les MPs constitueraient la source d'une activité circulante du TF dont l'activité est probablement potentialisée par la présence de PhtdSer, un mécanisme connu et récemment associé à une possible déencryption de site actif du TF (Zwicker *et al*, 2009). Le TF est l'initiateur cellulaire de la cascade de la coagulation. Son expression est inductible à la surface des cellules endothéliales et des monocytes, en présence de LPS notamment (Satta *et al*, 1994 ; Aras *et al*, 2004).

Différents modèles expérimentaux ont permis d'explorer le rôle des MPs dans la survenue des manifestations cliniques du choc septique. Ainsi, il a été démontré que l'injection de MPs issues de rats septiques étaient capable d'induire une réponse inflammatoire et une vasoplégie chez des rats naïfs mais aussi que les MPs issues d'animaux ou de patients septiques étaient capables de moduler la production de radicaux libres ou de prostaglandines sur des cultures cellulaires (Mostefai *et al*, 2008 ; Meziani *et al*, 2008 ; Mortaza *et al*, 2009 ; Mastronardi *et al*, 2011). In-vitro Satta et coll. ont montré la présence de TF sur les MPs émises par des monocytes en réponse au LPS et évaluer leurs propriétés pro- et anticoagulantes (Satta *et al*, 1994). Puis Nieuwland et coll. ont rapporté la présence de MPs porteuses de TF au cours du

purpura fulminans des méningococcémies chez l'homme (Nieuwland *et al*, 2000). Ce travail permettait d'associer directement la présence de MPs et la survenue d'une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD), stade évolutif ultime de l'activation de l'hémostase au cours des états infectieux graves.

REMODELAGE MEMBRANAIRE ET ÉMISSION DE MPs

Asymétrie de la membrane plasmique, maintien et rupture

La membrane plasmique est composée d'une bicouche de phospholipides en structure lamellaire intégrant également du cholestérol et des protéines (transmembranaires ou associées par des ancras glycosyl-inositol phosphates (Singer & Nicholson, 1972 ; Engelman, 2005). Les phospholipides sont majoritairement des glycérophospholipides mais aussi de la sphingosine. Au sein de la membrane plasmique, la présence de cholestérol assure la stabilité mécanique de la membrane qui mesure environ 5 nm d'épaisseur (Janmey & Kinnunen, 2006). La membrane plasmique est donc constituée d'environ 50 % de protéines (moyenne 100 kDa) se mouvant dans 50 % de lipides (0,7 kDa en moyenne).

La membrane plasmique au repos est caractérisée par une répartition asymétrique des phospholipides. Le feuillet externe est composé principalement de phosphatidylcholine et de sphingomyéline alors que le feuillet interne contient des phospholipides anioniques tels que la phosphatidylsérine et la phosphatidyléthanolamine (Bretscher, 1972 ; Verkleij *et al*, 1973 ; Devaux, 1991). La fluidité de la membrane résulte des mouvements latéraux dans le plan de la membrane assurant la possibilité de se réorganiser sous forme d'entités fonctionnelles ou radeaux lipidiques ou rafts, permettant de focaliser certains ensembles macromoléculaires (récepteurs, canaux ioniques, etc.) (Engelman, 2005). Les échanges de lipides entre les feuillet interne et externe (diffusion transverse ou « flip-flop »), spontanés sont rares et lents. Par contre, après stimulation cellulaire les échanges sont rapides de l'ordre de la minute ou moins dans le cas de la plaquette. Ces échanges sont dépendants de l'ATP et s'accompagnent de transports ioniques.

On distingue ainsi principalement trois types de transporteurs lipidiques : les flippases, les floppases et les scramblases (Coleman *et al*, 2013). Ces protéines sont insérées dans la membrane plasmique et assurent les échanges de lipides entre les deux feuillettes (Figure 2). Dans une membrane au repos, le flux net de phospholipides anioniques sera orienté vers le feuillet interne et sous la dépendance d'une activité flippase qui rapatrie tout phospholipide anionique vers le feuillet interne. Dans la membrane stimulée ce sont les activités des floppases et des scramblases (moins spécifiques car elles brassent indifféremment les lipides dont le cholestérol) qui prédomineront. Malgré des arguments en faveur d'une flippase spécifique de PhtdSer, notamment apportés par la mesure des flux de phospholipides dans le syndrome de Scott, son identification reste compliquée par le fait que de nombreuses protéines membranaires, comme MDR ou ABC-A1 se comportent comme des scramblases occasionnelles.

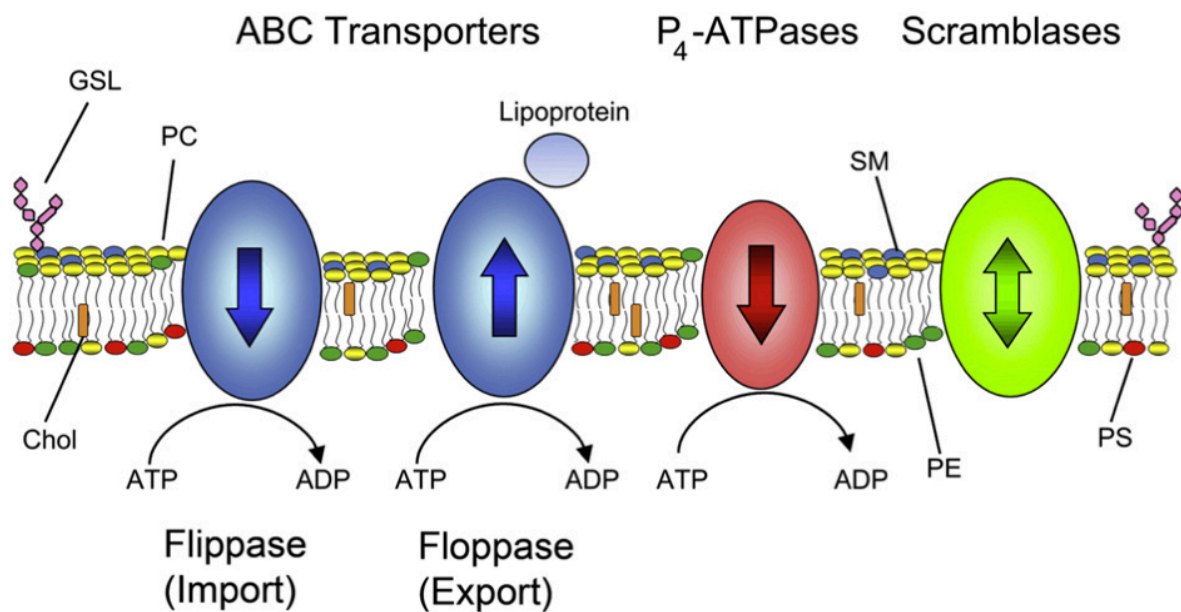


Figure 2. Régulation de l'asymétrie lipidique au sein des membranes biologiques (Coleman *et al*, 2013). La répartition des lipides est assurée par trois familles de transporteurs : les transporteurs de type ABC, les P₄-ATPases et les scramblases. La plupart des transporteurs ABC catalysent de manière dépendante de l'ATP le transport de lipides du feuillet cytoplasmique vers le feuillet externe au sein de la bicouche lipidique membranaire alors que les P₄-ATPases agissent dans le sens opposé. Les transporteurs ABC peuvent permettre l'efflux de lipides vers des lipoprotéines telles que l'Apo-A1 dans le cas d'ABCA1 ou vers les micelles biliaires. Quelques transporteurs ABC peuvent se comporter comme des importateurs ou flippases, transportant les phospholipides dans la même direction que les P₄-ATPases. Les scramblases en sont pas dépendantes de l'ATP et agissent en supprimant l'asymétrie par diffusion aléatoire des lipides au sein des deux feuillettes de la membrane. (PC, phosphatidylcholine ; PS, phosphatidylsérine ; PE, phosphatidyléthanolamine ; SM, sphingomyéline ; GSL, glycosphingolipide ; Chol, cholestérol.)

- Les *flippases* permettent le transport de PhtdSer et PhtdEth du feuillet externe vers le feuillet interne de la membrane plasmique contre un gradient de concentration (Figure 2). Elles ont été initialement identifiées comme faisant partie des ATPases de type P4 « P₄-type flippase ». Récemment certains transporteurs ABC ont été reconnus comme ayant une activité flippase. Chez les mammifères, les deux principales P₄-ATPases sont ATP8a1 et ATP8a2. Leur rôle fondamental est de rappatrier les phospholipides anioniques (essentiellement PhtdSer) du feuillet externe dans le feuillet cytoplasmique, préservant ainsi la cellule de la reconnaissance par le système réticulo-endothélial et limitant les réactions résultant des interactions du milieu environnant avec la PhtdSer.
- Les *floppases* sont des protéines transmembranaires permettant la translocation de phospholipides du feuillet interne (cytoplasmique) vers le feuillet externe de la membrane. Le transport de la PhtdChol serait assuré par la protéine ABCB4. Chez un des patients Scott, un déficit résultant d'un défaut de maturation et d'expression à la membrane a été mis en évidence. ABCA1 est normal chez les autres patients
- Les *scramblases* sont des transporteurs catalysant les échanges spontanés entre les feuilletes. Elles sont dépendantes non pas de l'ATP mais des ions calcium (Ca²⁺) et participent à la perte de l'asymétrie en facilitant l'externalisation de PhtdSer au cours de l'apoptose ou de l'activation cellulaire. De plus, elles sont peu spécifiques et de nombreuses protéines comme MDR, ABC-A1 ou la MRP ont des activités floppases occasionnelles du fait même de leur propriété de transporteur et de leur concentration dans la cellule.
- Des études récentes ont impliqués l'anoctamine TMEM16-F dans le transport de la PhtdSer en réponse à la stimulation du feuillet externe vers le feuillet interne. En effet des mutations du gène ont été retrouvées chez différents patients (Kunzelmann *et al*, 2013).

De nombreuses études chez la levure et dans les cellules eucaryotes cherchent à élucider les rôles et fonctions de ces différents transporteurs. Elles sont compliquées par le fait que chaque lignée cellulaire possède un outillage propre et une composition membranaire particulière qui déterminent l'amplitude et la rapidité du flip-flop.

Phospholipides membranaires et mécanismes de remodelage

La nature chimique des phospholipides, de par leur morphologie ou leur charge électrique, peut influencer la courbure de la membrane, ses interactions avec les protéines membranaires ou les autres membranes. Ces deux éléments sont fondamentaux pour comprendre la génération de microparticules.

La courbure de la membrane est nécessaire à la formation des vésicules, qu'elles soient externes (MPs) ou internes (endosome ou vésicule d'endocytose). Ce changement de courbure est facilité par les mouvements de phospholipides et leur structure. Ainsi, la courbure résulte des différences entre les volumes coniques occupés par les phospholipides : la « tête » polaire de la phosphatidyléthanolamine est par exemple plus petite que le diamètre de sa base occupée par les acides gras hydrophobes.

Toutefois, les interactions lipides-protéines pourraient jouer un rôle prépondérant dans la courbure de la membrane à l'image des protéines possédant un domaine particulier de type BAR (Bin-Amphiphysin-Rvs) permettant de s'assembler entre elles pour former des dimères en forme de banane ou en forme de cigare orientant la courbure au cours de la pinocytose (Mim & Unger, 2012). Elles présentent également des charges positives facilitant leur liaison avec PhtdSer mais leur implication dans la génération de MP n'a pas été établie. Les rafts, domaines fonctionnels riches en sphingosides, en glycolipides et en cholestérol et qui constituent des plateformes de signalisation cellulaire ont été impliqués dans la vésiculation membranaire.

Outre le flip-flop, la formation transitoire de pores lors de l'activation cellulaire constitue des zones de fusion entre les deux feuillettes de la membrane plasmique, facilitant les échanges de phospholipides et donc l'externalisation de PhtdSer.

La réponse cellulaire fait intervenir de nombreux mécanismes finement régulés et coordonnés. Le *rôle fondamental du calcium* a été très tôt reconnu avec l'apparition d'une importante vésiculation des érythrocytes en réponse à un traitement par ionophore calcique (A23187). Pour qu'il y ait remaniement membranaire, il faut que l'élévation de calcium soit importante et soutenue (Martinez *et al*, 2001). Elle se traduit alors par

une externalisation de PhtdSer et une activation simultanée des calpaïnes impliquées dans la dégradation du cytosquelette au niveau des zones membranaires « fragilisées », favorisant ainsi le bourgeonnement et la génération de microparticules (Figure 3) (Morel *et al*, 2011b).

L'augmentation intracellulaire des concentrations de calcium ionisé (Ca^{2+}) peut correspondre soit à une entrée par l'intermédiaire de canaux ioniques (par exemple P2X_1 au niveau de la plaquette) (Varga-Szabo *et al*, 2009) soit par libération à partir du réticulum endoplasmique en réponse à un agoniste et suivi d'une entrée de Ca^{2+} ; ce dernier phénomène est dénommé SOCE pour store-operated calcium entry (Munnix *et al*, 2003). Ce mécanisme assure la restauration des stocks intracellulaires suite à une forte stimulation et à l'élévation prolongée des concentrations de calcium dans le cytoplasme. Les SOCE sont essentiellement représentées par deux protéines, STIM1 (*stromal-interacting molecule 1*) et Orai1 qui interagissent en réponse à la stimulation de la PI3 kinase et à la libération des stocks de calcium du réticulum (Varga-Szabo *et al*, 2008 ; Gilio *et al*, 2010). Leur rôle dans l'activation cellulaire a été notamment mise en évidence dans la réponse apoptotique chez les patients Scott et dans la génération des microparticules (Morel *et al*, 2011b), et l'activation plaquettaire (Heemskerk *et al*, 2013).

Au niveau cellulaire, les mitochondries jouent également un rôle dans l'externalisation de PhtdSer par l'intermédiaire de la dépolarisation de sa membrane externe et faisant intervenir le pore de transition (MPTP) (Lopez *et al*, 2008). Après ouverture des MPTP, une augmentation de la concentration cytosolique de Ca^{2+} associée au passage cytochrome c favorise l'activation des caspases et des calpaïnes. Cette voie de signalisation serait modulable par la cyclosporine A qui en se liant à la cyclophiline D inhiberait l'ouverture MPTP, du moins dans les plaquettes (Leytin *et al*, 2009 ; Morel *et al*, 2011b).

Toutefois, le calcium n'est pas le seul ion impliqué dans l'externalisation de PhtdSer. *Les canaux potassiques sensibles au calcium* (Ca^{2+} -sensitive K^+ channel, Gardos channels) sont également mis en jeu après stimulation plaquettaire par la thrombine ou le collagène (Wolfs *et al*, 2006). Une entrée massive de sodium par l'intermédiaire d'un échange Na^+/H^+ au niveau membranaire a également été évoqué dans la

régulation de l'activité de la scramblase plaquettaire. On peut noter que Anoctamine 1 la molécule canonique des anoctamines est un canal potassique calcium dépendant (Kunzelmann *et al*, 2011).

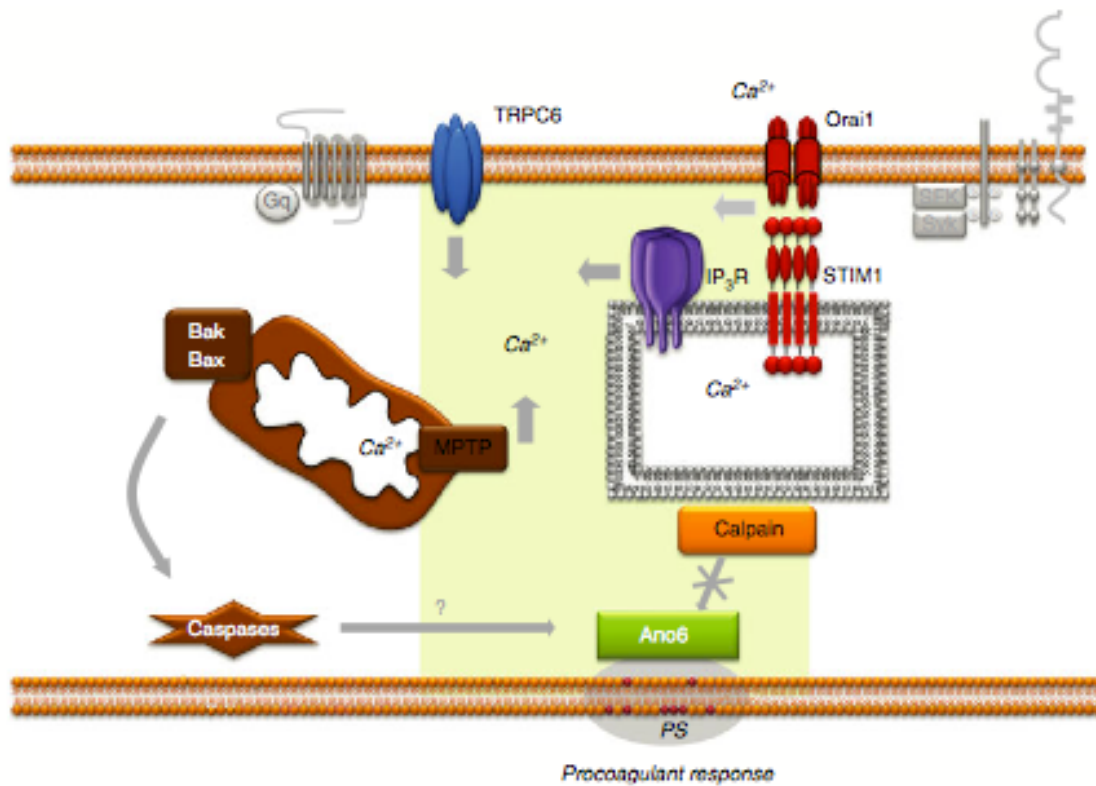


Figure 3. Rôle du calcium dans l'exposition de la PhtdSer (Heemskerk *et al*, 2013).

Les mécanismes favorisant l'exposition de la PhtdSer comprennent une mobilisation du Ca^{2+} contenu dans le réticulum endoplasmique par l'intermédiaire des récepteurs de l'IP₃ (IP₃R), une entrée de Ca^{2+} médiée par SOCE (canaux STIM1 – stromal-interacting molecule 1, et Orai1), et éventuellement une vidange depuis la mitochondrie par l'intermédiaire des pores de transition (MPTP) dans les cellules apoptotiques. La concentration élevée de Ca^{2+} permet d'activer une protéase, la calpaïne. L'anoctamine 6 (Ano6) récemment identifiée comme mutée dans le syndrome de Scott favoriserait l'interaction avec les protéines à activités floppases et scramblases.

Réorganisation du cytosquelette

Le cytosquelette intervient dans le maintien de l'asymétrie de la répartition des phospholipides et de la forme cellulaire (Fox *et al*, 1991 ; Cauwenberghs *et al*, 2006). La protéolyse partielle du cytosquelette par les calpaïnes favorise la libération des MPs. Les calpaïnes appartiennent à une famille d'enzymes intracellulaires contenant une activité de type cystéine-protéase dépendante du calcium. L'activation des calpaïnes nécessite la liaison d'une dizaine d'ions Ca^{2+} par molécule (Campbell & Davies, 2012). Une concentration de 30 à près de 350 μ M est nécessaire pour obtenir 50 % de l'activité maximale alors que la concentration cytoplasmique est de l'ordre du nanomolaire. Seule une entrée massive de Ca^{2+} est donc

susceptible de créer une concentration locale permettant une activation transitoire des calpaïnes, puis elles reprennent une forme quiescente. Les cibles préférentielles des calpaïnes seraient la filamine-1, la gélosine, la taline et la myosine (Fox *et al*, 1991 ; Flaumenhaft *et al*, 2010).

En cas d'apoptose, se traduisant aussi par une externalisation de PhtdSer, on observe une activation des caspases. La caspase-3 est capable de cliver ROCK I, une protéine de type Rho-kinase, elle-même impliquée dans la phosphorylation des chaînes légères de myosine et ainsi d'induire la contraction de la membrane cellulaire et la génération de MPs au cours de l'apoptose (Coleman *et al*, 2002 ; Sebbagh *et al*, 2001 ; Kunzelmann *et al*, 2004). En présence de thrombine, on observe une activation de la caspase-2 clivant ROCK II, modulant l'émission de MPs en l'absence d'apoptose (Sebbagh *et al*, 2005).

Vésiculation membranaire

Le déclenchement des processus précédemment décrits nécessite un signal d'activation cellulaire. Il est variable en fonction du type cellulaire mais plus encore en fonction du micro-environnement. Ainsi, l'inflammation par l'intermédiaire de ses médiateurs que sont les cytokines, et particulièrement l'IL-1 β , le TNF α , mais aussi les signaux de danger (PAMP et DAMP) est capable d'induire une activation cellulaire (MacKenzie *et al*, 2001). Les produits membranaires bactériens tels que le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries gram-négatives ou l'acide lipoteichoïque des bactéries gram-positives sont reconnus par des récepteurs de l'immunité innée de type Toll (respectivement TLR4 et TLR2) portés par les cellules monocytaires et activent la signalisation intracellulaire cellulaire. D'une manière générale, les mécanismes d'activation cellulaire médiés par des récepteurs mettant en jeu des protéines « détectrices » des variations calciques comme la calmoduline et des signaux de phosphorylation et déphosphorylation protéique régulant l'activité de protéines effectrices. Au niveau des plaquettes, l'externalisation de la PhtdSer et la vésiculation sont rapidement initiés permettant la mise en contact de la surface catalytique de la PhtdSer pour l'assemblage des facteurs de la coagulation γ -carboxylés et favorisant la libération des MPs en quelques minutes.

L'ensemble de ces phénomènes est résumé sur la figure 4.

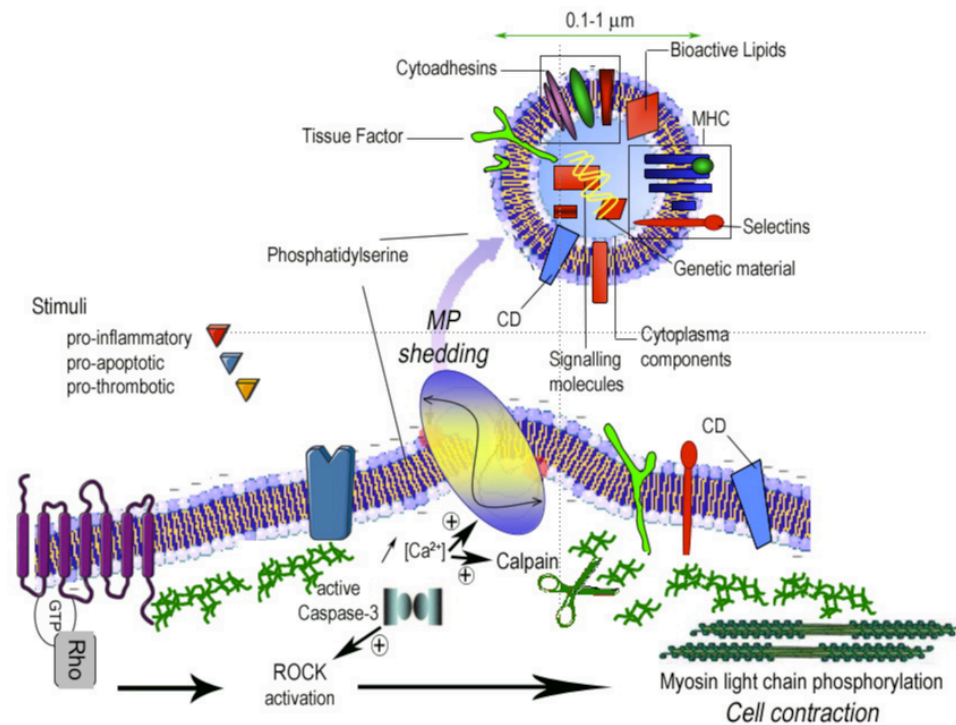


Figure 4. Remodelage membranaire conduisant à la libération des MPs (Bakouboula *et al*, 2011).

PROPRIÉTÉS DES MICROPARTICULES

Structure

Les MPs sont donc constituées d'une membrane externe issue de la membrane plasmique de la cellule-mère avec une perte de l'asymétrie des phospholipides et la présence de PhtdSer sur le feuillet externe. Cette membrane comporte diverses protéines permettant de caractériser l'origine cellulaire ; celles-ci gardent une organisation sous forme de rafts protéo-lipidiques (Zwaal & Schroit, 1997 ; Hugel *et al*, 2005). Par ailleurs, les MPs contiennent une petite quantité de cytoplasme et peuvent donc véhiculer des cytokines (c'est la voie de sécrétion de l'IL-1 β), diverses protéines ainsi que des fragments d'acides nucléiques, en particulier des miRNA (MacKenzie *et al*, 2001, Mause & Weber, 2010).

Les MPs ont une forme le plus souvent irrégulière et un diamètre de 100 à 1000 nm, le plus souvent autour de 200-250 nm. La forme et le diamètre semblent dépendre de l'origine cellulaire mais surtout du

stimulus à l'origine de la vésiculation. Les MPs de petite taille (<150 nm) se différencient des exosomes par la technique de purification (centrifugation contre ultracentrifugation pour les exosomes) mais aussi sur la présence de PhtdSer alors que les tétraspanines (CD63) ou HSP73 sont absentes (Hugel *et al*, 2005 ; György *et al*, 2011 ; van der Pol *et al*, 2012).

Rémanence et clairance

Les MPs émises par la cellule peuvent avoir un effet autocrine ou paracrine local ou bien être déversées dans la circulation sanguine. Leur demi-vie semble être de l'ordre de quelques minutes à plusieurs heures, mais sa mesure est difficile et semble dépendre du modèle utilisé (Rautou & Mackman, 2012). Quoique porteuses de PhtdSer connue comme un signal d'élimination par le système réticulo-endothélial, les MPs semblent « échapper » transitoirement à cette voie d'élimination, possiblement en raison de leur faible diamètre et donc d'une exposition insuffisante signaux de reconnaissance pour l'englobement par les macrophages. De plus, du fait de leur petite taille, les MPs peuvent diffuser dans l'interstitium.

La lactadhérine, ou MFG-E8 – milk fat globule-EGF protein 8 comporte un site de fixation à PhtdSer (discoidin I-like domain) et un site RGD capable de lier les intégrines. Elle permet ainsi d'opsoniser les cellules apoptotiques mais aussi les MPs par l'intermédiaire de la liaison à PhtdSer, et aux intégrines (en particulier $\alpha v \beta 3$) des cellules phagocytaires (peptide RGD) facilitant leur élimination. Dasgupta et coll. ont ainsi montré le rôle de lactadhérine dans l'épuration des MPs plaquettaires. En effet, des souris knock-out (*Mfge8^{-/-}*) présentaient une augmentation du taux circulant de MPs plaquettaire et un phénotype procoagulant réversible lors de la supplémentation en lactadhérine (Dasgupta *et al*, 2009). Une autre voie d'élimination des MPs a également été décrite faisant intervenir Del-1 (developmental endothelial locus-1). Del-1 peut également lier PhtdSer d'une part et $\alpha v \beta 3$ d'autre part et permettre ainsi la clairance des MPs, en particulier endothéliales. Il semble que ces deux mécanismes d'élimination n'interviennent pas dans les mêmes circonstances, la seconde étant par exemple prédominante en cas d'endotoxémie chez la souris (Dasgupta *et al*, 2012). Ces données ont été synthétisées dans le tableau II (Rautou & Mackman, 2012).

Tableau II. Clairance des MPs *in vivo* (Rautou & Mackman, 2012).

Type de MPs	Organes impliqués				Cellules impliquées	Molécule impliquée	Cinétique
	Rate	Foie	Poumon	Reins			
PMP	+++	ND	ND	ND	Macrophages	Lactadhérine	5 min.
PMP	++	++	++	ND	C endothéliales	Del-1 (sauf rate)	5 min.
RMP	+/-	+++	+/-	+/-	C de Kupffer	PhtdSer	5 min. (80%)
EMP	+++	++	++	-	Monocytes / Macrophages	ND	5 min.
C. tumorale	++	ND	ND	ND	ND	ND	Jusqu'à 30 min.

ND, non déterminé ; PMP, MPs plaquettaires ; RMP, MPs érythrocytaires ; EMP, MPs endothéliales.

Détection, quantification et détermination de l'origine cellulaire des MPs

Les MPs peuvent être mises en évidence dans le sang mais aussi dans la plupart des liquides biologiques. Leur détection nécessite le plus souvent une étape d'isolement et de concentration source de multiples risques d'erreur (contamination par des débris cellulaires, élimination, génération à partir des cellules de l'échantillon) et une étape de conservation (congélation) susceptible de modifier les propriétés des MPs. La phase pré-analytique revêt donc une importance majeure dans la qualité et la fiabilité des résultats. Une publication récente du comité de standardisation de l'ISTH vient de préciser la phase pré-analytique (Lacroix *et al*, 2013). Les recommandations portent sur le prélèvement (garrot peu serré, rejet des premiers millilitres de sang), le choix de l'anticoagulant (citrate de sodium 0,109 M, sans adjonction), la centrifugation afin d'obtenir du plasma pauvre en plaquettes (double centrifugation de 15 min. à 2500 x g) et la congélation immédiate de l'aliquote à -80°C, au mieux après avoir plongé l'échantillon dans l'azote liquide (-176°C). À côté de cette procédure « optimale », sont définies des procédures « acceptables » (1 ou 2 paramètres non respectés) et « douteuses » ; ces dernières pourraient rendre les conclusions des études sujettes à caution.

La quantification et la détermination de l'origine cellulaire des MPs ne fait pas l'objet d'un consensus, voire reste l'objet de controverses (Jy *et al*, 2004). Schématiquement, on peut opposer des méthodes d'imagerie directe ou indirecte et des tests fonctionnels ne permettant pas une numération (Tableau III).

Tableau III. Méthodes d'analyse des MPs (d'après Barteneva *et al*, 2013).

Méthode	Quantification	Phénotypage	Taille	Limites
Microscopie électronique	Limitée	Limitée ¹	Oui	Artéfacts lors de la préparation des échantillons
Tests fonctionnels	Oui	Oui ²	Non	Accessibilité de la PhtdSer ou de la molécule active portée par les MPs
Microscopie de force atomique (AFM)	Limitée	Limitée ³	Oui	Artéfacts (débris cellulaires et protéines)
Dispersion de la lumière (NTA)	Oui	Non	Oui	Artéfacts (débris cellulaires et protéines)
Western blot	Semi-quantitatif	Oui	Non	Échantillon > 10 µg
Spectrométrie de masse	Non	Oui (extraction des protéines)	Non	Échantillon > 10 µg
Cytométrie en flux	Oui	Oui	Limitée	Agrégats, diamètre < 300 nm
Imagerie par cytométrie	Oui	Oui	Non	Fluorescence des MPs

¹Annexine-5 et anticorps monoclonaux spécifiques marqués par des billes d'or de différents diamètres (jusqu'à 3 marquages simultanés) ; ²Remplacement de l'annexine-5 par des anticorps monoclonaux biotinylés ; ³Développement de surfaces recouvertes d'anticorps monoclonaux spécifiques.

Le test prothrombinase a été développé au laboratoire (Figure 5) (Aupeix *et al*, 1997). Dans sa description *princeps*, il repose sur la capture des MPs grâce à l'affinité de la PhtdSer pour l'annexine-5 biotinylée fixée sur une plaque de microtitration recouverte de streptavidine. Les MPs se fixent sur l'annexine-5 par l'intermédiaire de la PhtdSer. Les MPs ainsi immobilisées deviennent le support de la réaction prothrombinase après adjonction de 106 pM de FXa, 250 pM de FVa, 3,5 µM FII et 2,2 mM CaCl₂. Ces concentrations sont déterminées afin que la quantité de PhtdSer soit le facteur limitant de la génération de thrombine. pNAPEP0216, substrat chromogène clivé spécifiquement par la thrombine générée, permet la quantification cinétique sur 3 min. à l'aide d'un spectrophotomètre thermostaté (Versamax, Molecular Device, Workingham, Beckshire, UK). Les résultats sont exprimés en nanomolaire d'équivalent phosphatidylsérine (nM éq. PhtdSer) par comparaison à une courbe de référence réalisée à l'aide de liposomes synthétiques de composition connue (33 % w/w PhtdSer et 67 % w/w PhtdChol) et de concentration connue. Ce test, dans une version dérivée, a été commercialisé sous le nom de *Zymuphen*TM *MP activity assay* (Hyphen BioMed, Neuville-sur-Oise, France).

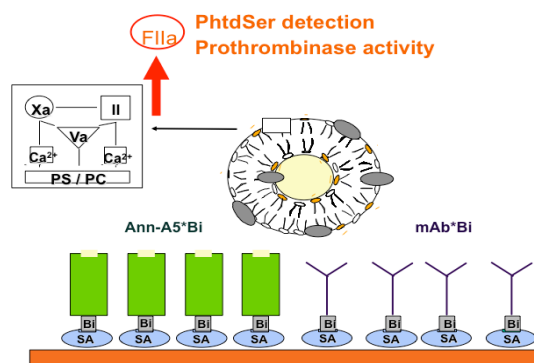









Figure 5. Test prothrombinase (d'après Aupeix *et al*, 1997).

À gauche quantification des MPs totales sur Ann-A5*Bi et à droite phénotypage par anticorps monoclonal spécifique mAb*Bi. SA : streptavidine, Bi : biotine, PS/PC : PhtdSer/ PhtdChol, Xa : facteur X activé, Va : facteur V activé, II : facteur II (prothrombine), FIIa : thrombine.

La détermination de l'origine cellulaire peut être réalisée en utilisant un anticorps biotinylé à la place de l'annexine-5. Les principaux anticorps utilisés pour les cellules du compartiment vasculaire sont résumés dans le tableau IV.

Tableau IV. Marqueurs de surface des MPs vasculaires en fonction de la cellule émettrice (d'après McVey *et al*, 2012).

MP	Cellule parentale	Antigènes membranaires
PMP	Plaquettes 	CD31, CD40L, CD41a, CD42a, CD42b, CD61, CD62P, CD63, CD107a, fibrinogène, vWF
MegMP	Mégacaryocyte 	CD41, CD184, laminine A
LMP	Lymphocyte 	CD3, CD4, CD8, CD11b, CD16, CD19, CD21, CD45, CD66b
MMP	Monocyte 	CD14, CD142, CD144, CD162, TLR4
RMP	Érythrocyte 	CD31, CD235a, IgG, complément
NMP	Granulocyte neutrophile 	CD11a, CD11b, CD15, CD16, CD35, CD49, CD59, CD62L, CD66b, CD142
EMP	Cellule endothéliale 	CD31, CD34, CD51, CD54, CD62E, CD63, CD105, CD106, CD142, CD144, CD146

Fonction des microparticules

Les MPs ont été impliquées dans de nombreux phénomènes physiologiques et pathologiques (Mause & Weber, 2010). On peut distinguer leur action en fonction du mode de transfert de l'information :

- MPs vecteurs de molécules de signalisation, capables d'aller activer des récepteurs spécifiques sur la cellule cible,
- MPs vecteurs directs de messagers par transfert de leur matériel (protéines, lipides, miRNA) à la cellule cible.

Les MPs présentent la particularité de concentrer de très nombreux messagers dans une entité très petite, disposant à sa surface d'un important arsenal de molécules pouvant lui permettre de se lier spécifiquement ou non à des cellules cibles, et capables d'avoir une action autocrine ou paracrine, ou au contraire de disséminer dans le flux sanguin et d'atteindre des cibles éloignées. Ainsi, elles constituent de véritables cargos participant à un réseau de communication intercellulaire. Une synthèse de ces molécules actives est représentée sur la figure 6.

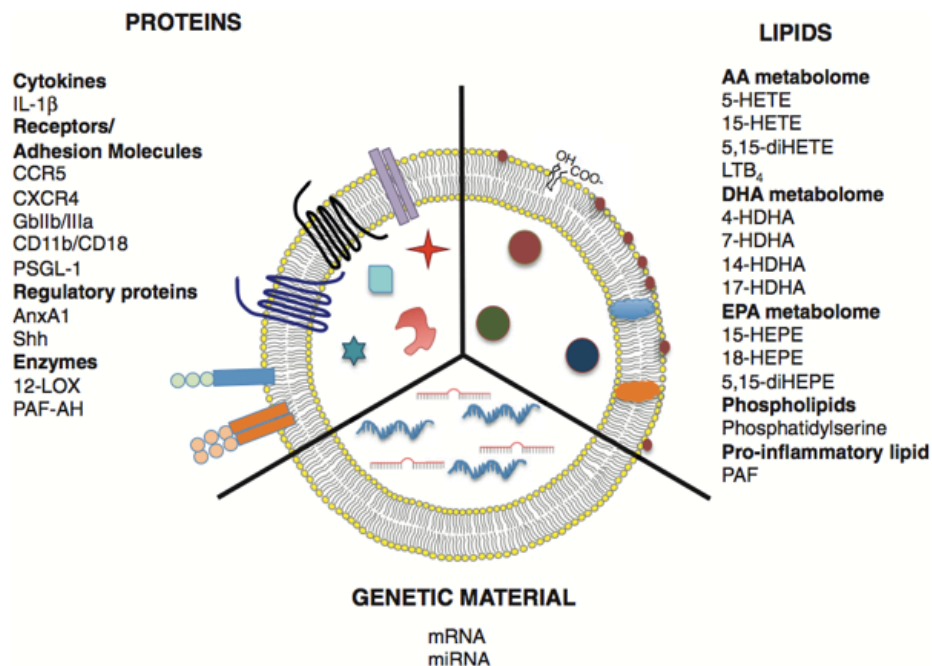


Figure 6. Répertoire impliqué dans la communication intercellulaire (Norling & Dalli, 2013).

12-LOX : 12-lopo-oxygénase ; AnxA1 : annexine-1 ; CCR5 : C-C chemokine receptor type 5 ; CXCR4 : C-X-C chemokine receptor type 4 ; CD11b/CD18a : intégrine α IIb β 2 ; GPIIbIIIa : intégrine α IIb β 3 ; LTB₄ : leucotriène B₄ ; HETE : acide hydroxy-eicosatétraénoïque ; HDHA : acide hydroxy-docosahexaénoïque ; HEPE : acide hydroxy-eicosapentaénoïque ; PFA : facteur activant les plaquettes (platelet activating factor) ; PAF-AH : PAF acétylhydroxylase ; PSGL-1 : P-selectin glycoprotein ligand 1 ; Shh : sonic hedgehog.

En fonction du type de message transmis, les mécanismes hypothétiques d'interaction avec la cellule cible sont variables et peuvent être illustrés schématiquement sur la figure 7.

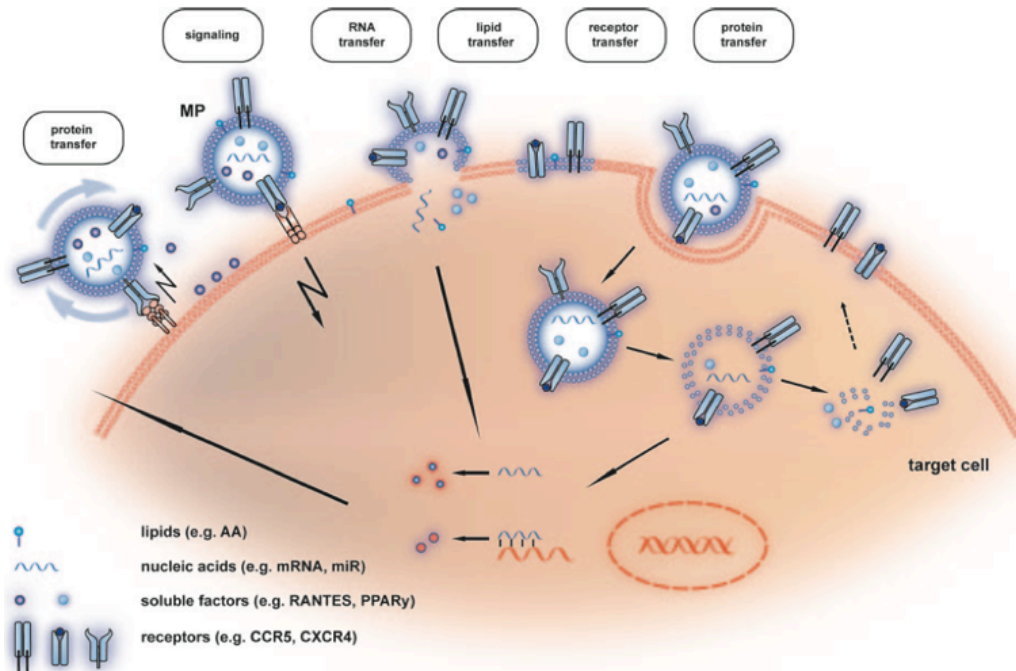


Figure 7. Voies de transfert intercellulaire des informations portées par les MPs (Mause & Weber, 2010).

Les médiateurs solubles (IL-1 β , RANTES, etc.) relargués par les MPs peuvent être délivrés à la cellule cible par interaction transitoire ou définitive puis les molécules associées à la membrane induisent une réponse cellulaire spécifique. Les MPs peuvent également transférer à la cellule cible des constituants membranaires (par exemple l'acide arachidonique – AA), des récepteurs (CXCR4, CCR5) ou des acides nucléiques cytosoliques (mRNA, miRNA) par fusion membranaire ou après internalisation. Certains constituants des MPs (PPAR γ , miR-126) ainsi intégrés induisent une reprogrammation de la cellule cible alors que les molécules associées à la membrane des MPs peuvent être recyclées voire présentées à la surface de la cellule.

MPs en physiologie et en pathologie

Les MPs jouent donc un rôle majeur dans la communication intercellulaire en pouvant interagir avec la cellule cible de différentes manières. Des revues récentes font un recensement des pathologies impliquant les MPs : cancers, leucémies, maladies auto-immunes, pathologies cardio-vasculaires, maladies infectieuses, transplantation, maladies neuro-dégénératives (Burnier *et al*, 2009 ; Owens & Mackman, 2011 ; Delabranche *et al*, 2012 ; Inal *et al*, 2012 ; Barteneva *et al*, 2013).

Activité procoagulante des MPs

Cette propriété a été à l'origine de leur découverte. Elle repose d'une part sur la présence d'un phospholipide anionique à leur surface, la PhtdSer, mais aussi de molécules initiatrices. TF, principal activateur physiologique de la génération de thrombine a très tôt été caractérisé à la surface des MPs (Satta *et al*, 1994). Il a été démontré que les TF⁺-MPs constituaient la forme circulante du facteur tissulaire (blood borne-TF) alors que le facteur tissulaire clivé, dépourvu de phospholipides, était sans action procoagulante. De plus, les TF⁺-MPs sont capables d'être intégrées dans des cellules cibles telles que les plaquettes mais aussi les granulocytes neutrophiles (Egorina *et al*, 2008). La présence de TF « natif » à la surface de ces cellules n'a jamais été démontrée, même s'il semble que les mégacaryocytes soient capables d'exprimer le gène *TF*, avec la possibilité pour les plaquettes d'emporter le mRNA correspondant et permettre ainsi une synthèse intraplaquettaire de TF. Un travail expérimental récent a confirmé la possibilité de générer de la thrombine à la surface des MPs plaquettaires indépendamment de TF (et de FVIIa) mais de manière dépendante de FXII (activé par les polyphosphates plaquettaires ou bactériens) (van der Meijden *et al*, 2012). De plus, les MPs plaquettaires peuvent présenter à leur surface des intégrines ($\alpha\text{IIb}\beta_3$) et du facteur von Willebrand (vWF) pouvant être transférés à des cellules cibles, ainsi que de la P-sélectine (CD62P) capable d'activer d'autres plaquettes et des leucocytes. L'activité pro-coagulante des MPs plaquettaires serait 50 à 100 fois supérieure à celles des plaquettes activées et pourraient rendre compte de la faible incidence des manifestations hémorragiques au cours des thrombopénies consécutives à une activation plaquettaire : microangiopathies thrombotiques telles que le PTT/SHU (purpura thrombotique thrombocytopénique / syndrome hémolytique et urémique) (Kelton *et al*, 1992 ; Jimenez *et al*, 2001), la pré-éclampsie et le HELLP syndrome (haemolysis, elevated liver enzymes, low platelets) (Bretelle *et al*, 2003 ; Meziani *et al*, 2006) ou la CIVD (Nieuwland *et al*, 2000).

En pathologie, il a été clairement établi une corrélation entre la présence de MPs circulantes et la survenue d'événements thrombotiques : athérome, infarctus du myocarde et accident vasculaire cérébral ; syndrome des antiphospholipides ; purpura fulminans des méningococcies ou des fièvres hémorragiques ; paludisme (Mallat *et al*, 2000 ; Héloire *et al*, 2003 ; Werner *et al*, 2006 ; Nieuwland *et al*, 2000 ; Feldmann & Geisbert, 2011 ; Combes *et al*, 2005). Deux pathologies érythrocytaires sont également associées à une vésiculation

membranaire accrue et à des manifestations thrombotiques : l'hémoglobinurie paroxystique nocturne et les anémies hémolytiques (y compris au cours de la drépanocytose) (Hugel *et al*, 1999 ; Wun *et al*, 1998).

Autres actions des MPs dans l'hémostase

L'association des MPs avec une *activité anticoagulante* a été récemment mise en évidence par Perez-Casal et coll. (Perez-Casal *et al*, 2005). Elle est liée à la présence de protéine C activée à la surface de MPs porteuses du récepteur EPCR. Ces MPs (APC-EPCR⁺-MPs) pourraient donc disséminer un potentiel anticoagulant (inhibition de FVa) mais aussi cytoprotecteur (par activation de PAR-1) (Perez-Casal *et al*, 2009 ; Perez-Casal *et al*, 2011).

Il a également été montré que les MPs participaient à une *activité fibrinolytique/protéolytique*. Les MPs leucocytaires peuvent présenter à leur surface u-PA (activateur du plasminogène de type urinaire) et son récepteur cellulaire u-PAR tandis que les MPs endothéliales porteraient préférentiellement t-PA (activateur tissulaire du plasminogène) (Lacroix *et al*, 2007). Ces MPs sont le support de l'activation du plasminogène en plasmine, responsable d'une activité fibrinolytique, mais aussi de l'activation des métalloprotéinases matricielles (MMP – *matrix metalloproteinases*). Il s'agit d'endopeptidases extracellulaires dépendantes du zinc, sécrétées ou membranaires. Elles sont responsables d'une activité protéolytique et du remodelage de la substance interstitielle, participant à la cicatrisation, à la néovascularisation mais aussi à la tumorigénèse et la survenue de métastases. La présence de uPA-MPs serait capable de renforcer l'activation du plasminogène liée à une surface catalytique, la fibrine ; cela a permis de définir le cross-talk fibrinolytique (Dejouvencel *et al*, 2010).

Il semble donc exister au sein du vaisseau des MPs procoagulantes d'une part et des MPs anticoagulantes et profibrinolytiques d'autre part permettant un équilibre dépendant du degré d'activation cellulaire et du micro-environnement.

Transfert de matériel génétique : reprogrammation cellulaire

Le transfert direct de mRNA à une cellule cible lui permet de synthétiser des protéines fonctionnelles qu'elle n'exprimait pas génétiquement. Il a été ainsi démontré la possibilité de transférer des facteurs de transcription des cellules souches embryonnaires vers des cellules progénitrices hématopoïétiques et de permettre leur différenciation (Ratajczak *et al*, 2006 ; Yuan *et al*, 2009). Il a été également montré que des MPs issues de cellules cancéreuses pouvaient induire des métastases, par exemple dans le cas de cancer du poumon, en « transformant » les cellules cibles (Castellana *et al*, 2010 ; Camussi *et al*, 2011).

Par ailleurs, les miRNA (micro-RNA non codant) sont capables de modifier l'expression de certains gènes au sein des cellules cibles.

RÉPONSE DE L'HÔTE À L'INFECTION

DÉFINITIONS

L'*infection* déclenche une réponse de l'hôte qui se traduit dans un premier temps par un *syndrome de réponse inflammatoire systémique* (SIRS – systemic inflammatory response syndrome) caractérisé par au moins deux signes parmi (Levy *et al*, 2003) :

- une fièvre ($\geq 38,5^{\circ}\text{C}$) ou une hypothermie ($< 36^{\circ}\text{C}$),
- une tachycardie ($> 90/\text{min.}$) en l'absence de traitement bradycardisant,
- une polypnée ($> 20/\text{min.}$) ou une $\text{PaCO}_2 < 32 \text{ mmHg}$ ou le recours à la ventilation artificielle (en dehors de l'anesthésie),
- une hyperleucocytose ($> 12 \text{ G/L}$) ou une leucopénie ($< 4 \text{ G/L}$) ou la présence de plus de 10 % de formes immatures.

Le diagnostic de *sepsis sévère* est retenu devant l'association d'une infection suspecte ou prouvée, d'un SIRS et de signes d'hypoperfusion avec apparition de défaillances d'organes. Celles-ci se définissent par :

- une hypoxémie avec $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 300 \text{ mmHg}$,
- une oligurie ($< 0,5 \text{ mL/kg/h}$ pendant 2 heures),
- une hypotension artérielle avec une pression artérielle systolique inférieure à 90 mmHg ou de plus de 40 mmHg par rapport à la pression artérielle habituelle, ou une pression artérielle moyenne inférieure à 70 mmHg, des marbrures, une peau moite et froide
- une obnubilation, une confusion ou un coma,
- une atteinte de l'hémostase avec thrombopénie ($< 100 \text{ G/L}$) ou allongement des temps de coagulation (TP $< 63\%$),
- une hyperbilirubinémie ($> 70 \mu\text{mol/L}$).

Le *choc septique* complique le sepsis sévère. Il s'agit de la forme la plus grave de la réponse de l'hôte à un micro-organisme pathogène qui se caractérise par une réponse inflammatoire systémique intense responsable d'une vasoplégie profonde se traduisant par une hypoperfusion des organes et une dette en oxygène, aggravée par une augmentation importante de la demande métabolique, et aboutissant à un syndrome de défaillance multiviscérale (Annane *et al*, 2005). Le choc septique reste un motif fréquent d'admission en réanimation. Malgré la prise en charge étiologique et symptomatique, la mortalité reste élevée, de l'ordre de 30 à 40 %. L'incidence est d'environ 50 cas pour 100 000 habitants par an. Le choc septique représentait 1495 des 10941 (13,7 %) admissions réalisées sur 2 ans dans 14 services de réanimation français participant au réseau EPISS ; le taux de mortalité toutes causes confondues à J28 était de 42 % (Quenot *et al*, 2013). Une meilleure compréhension des mécanismes de la réponse inflammatoire est fondamentale pour améliorer le pronostic des patients qui nous sont confiés.

Un des premiers mécanismes mis en action pour conter ces différentes étapes est basé sur le *syndrome de réponse anti-inflammatoire compensatoire* (CARS – compensatory anti-inflammatory response syndrome). Ce syndrome correspond à une immunoparalysie par apoptose lymphocytaire et réorientation de la production vers des cytokines de type « anti-inflammatoires ». Elle se traduit par une anergie cutanée et favorise la survenue d'infections secondaires (Bone, 1996 ; Abid-Conquy & Cavaillon, 2009).

SIRS et CARS ne sont en fait pas exclusifs et coexistent dans le temps et dans l'espace chez un même patient au cours de l'infection rendant difficile l'appréciation de l'état « inflammatoire » et donc sa modulation. Plus que l'intensité de la réponse (inflammatoire ou anti-inflammatoire), c'est sa diffusion qui semble être le moteur sepsis (Abid-Conquy & Cavaillon, 2009 ; Seeley *et al*, 2012).

RECONNAISSANCE DES PATHOGÈNES ET SIGNALISATION

Un exposé approfondi de cette reconnaissance n'est pas l'objet premier de notre travail et nous nous contenterons d'en rappeler les principaux traits. En pénétrant dans l'organisme de l'hôte, le micro-

organisme déclenche une réponse cellulaire et moléculaire non spécifique et « innée » visant à limiter sa diffusion et à l'éliminer. Il est dès à présent fondamental de souligner que ce n'est pas une résistance particulière ou une pathogénicité accrue de l'agent infectieux mais bien plus un excès de cette première ligne réponse qui est responsable de la réponse inflammatoire systémique à l'origine du choc septique (Kumar *et al*, 2013).

Reconnaissance des « signaux de danger »

La réponse de l'hôte repose sur la détection de divers signaux de danger, les PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) reconnus par différents récepteurs, les PRR (*pattern recognition receptors*) (Janeway, 1989). Ceux-ci « enclenchent » la réponse inflammatoire permettant la reprogrammation génétique des cellules immunitaires, la production de cytokines et chémokines pro-inflammatoires, le recrutement des leucocytes et des plaquettes, l'activation de la coagulation et du système du complément. L'ensemble de ces effecteurs cellulaires et moléculaires vise à contenir l'infection et à détruire l'agent pathogène.

Les récepteurs de type PRR sont exprimés à la surface des cellules immunitaires et des « barrières » que représentent les cellules endothéliales et épithéliales ; ils se répartissent en cinq catégories :

- *TLRs* ou Toll-like receptors, les mieux connus. On les distingue en membranaires (1, 2, 4, 5 et 6) et en intracellulaires, au niveau des endosomes et du réticulum endoplasmique (3, 7, 8 et 9). Les principaux ligands sont repris dans le tableau V (Medzhitov *et al*, 1997 ; Medzhitov, 2001),
- *NLRs* ou Nucleotide oligomerization domain (NOD)-like receptors (Opitz *et al*, 2004; Ye & Ting, 2008),
- *RLRs* ou RIG-I like receptors (Creagh & O'Neill, 2006),
- *CLRs* ou C-type lectin receptors (Kumar *et al*, 2013),
- *DNA sensing molecules*.

De manière schématique, les TLRs et les NLRs sont impliqués dans la détection des bactéries et des protozoaires, les RLRs et les DNA-sensors dans celles des virus et les CLR dans celles des mycobactéries et des levures.

Après activation par les PAMPs, les PRRs initient des cascades de signalisation intracellulaire ayant pour but d'activer différents facteurs de transcription tels que NF- κ B ou les facteurs de régulation de l'interféron (IRFs); ces mécanismes communs aboutissent à une réponse antimicrobienne avec production de peptides antimicrobiens, de cytokines pro-inflammatoires, de chémokines et d'interférons de type I. Ces voies de signalisation sont schématisées sur la figure 8. Une description détaillée pourra être trouvée dans des revues récentes (Song & Lee, 2012 ; Kumar *et al*, 2012)

Tableau V. Ligands des TLRs.

Récepteur	Ligand	Pathogène	Adaptateur	Type cellulaire
TLR1	Triacyl-lipopeptides	Bactéries	MyD88	Monocytes/macrophages Lymphocytes B Cellules dendritiques
TLR2	Glycolipides Lipopeptides Lipoprotéines Acide lipoteicoïque HSP70 Zymosan (β -glucan)	Bactéries Bactéries Bactéries Bactéries gram (+) Cellules Levures	MyD88	Monocytes/macrophages Cellules dendritiques Plasmocytes
TLR3	ADN double brin	Virus	TRIF	Cellules dendritiques Lymphocytes B
TLR4	LPS HSP Fibrinogène	Bactéries gram (-) Cellules Cellules	MyD88/TRIF/TRAM	Monocytes/macrophages Lymphocytes B Cellules dendritiques Mastocytes Épithélium intestinal
TLR5	Flagelline	Bactéries	MyD88	Monocytes/macrophages Cellules dendritiques Épithélium intestinal
TLR6	Diacyl-lipopeptides	Mycoplasmes	MyD88	Monocytes/macrophages Lymphocytes B Mastocytes
TLR7	ARN simple brin	Virus	MyD88	Monocytes/macrophages Lymphocytes B
TLR8	ARN simple brin	Virus	MyD88	Monocytes/macrophages Cellules dendritiques
TLR9	CpG méthylé Oligodéoxynécléotides	Bactéries Virus	MyD88	Monocytes/macrophages Cellules dendritiques

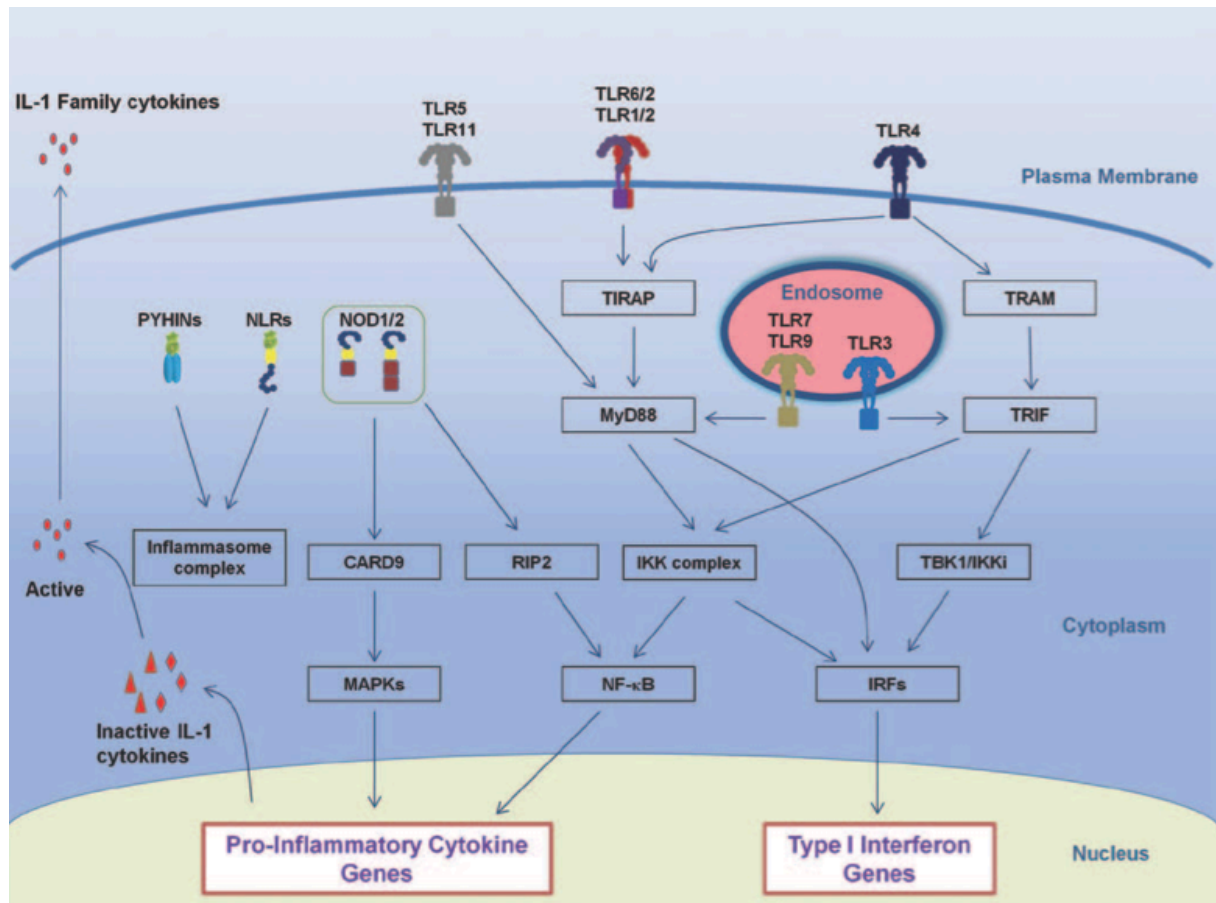


Figure 8. Signalisation induite par les TLRs et les NLRs (Kumar *et al*, 2012).

Au niveau des monocytes/macrophages et des cellules dendritiques, les récepteurs TLR1/2, TLR2/6 et TLR4 recrutent MyD88 par l'intermédiaire de TIRAP alors que TLR5 et TLR11 recrutent directement MyD88 conduisant à l'activation de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ par l'intermédiaire du complexe IKK. De plus, TLR4 recrute également TRIF par l'intermédiaire de TRAM alors que TLR3 recrute directement TRIF ; TRIF active les kinases TBK1/IKKi et le complexe IKK permettant la phosphorylation des IRFs et de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ respectivement. TLR7 et TLR9 activent les IRFs par l'intermédiaire de MyD88. Les NLRs cytosoliques (NOD1 et NOD2) initient le recrutement de RIP2 et de CARD9 qui vont aller activer $\text{NF-}\kappa\text{B}$ et la voie des MAPKs pour induire la transcription des gènes des cytokines de la famille de l'IL-1. Les PRRs impliqués dans l'assemblage de l'inflammasome tels que les NLRs (NLRP3, NLRC4-NAIPs, NALP1 et NLRP6) et les PYHINs (AIM2 et IFI16) forment un complexe multiprotéique permettant l'activation des cytokines de la famille de l'IL-1.

Signalisation induite par le LPS

Le lipopolysaccharide (LPS) est un des constituants de la paroi externe des bactéries gram-négatives impliqué dans la pathogénicité mais est aussi une molécule clef de la signalisation bactérienne. Libéré dans le plasma, il circule principalement lié à une protéine de transport, la LBP (LPS binding protein), qui permet sa présentation à son récepteur au niveau des cellules cibles, CD14 (Le Roy D *et al*, 2001). CD14 est une protéine de 55 kDa ancrée dans la membrane des cellules myéloïdes par une ancre GPI (glycérophospho-inositol). CD14 est couplé à TLR4 par l'intermédiaire d'une protéine adaptatrice MD-2.

Le complexe LPS/CD14/MD-2/TLR4 initie alors les voies de signalisation par TRAM/TRIF et TIRAP. L'expression de nombreux gènes est alors augmentée, avec une synthèse et une expression accrue de récepteurs membranaires (CD14, P2X₇, TF), de cytokines et chémokines (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, MCP-1), de facteurs de transcription (p50, c-Rel, Egr-1, IRF-1) mais aussi d'enzymes tels iNOS (NO-synthétase inducible) (Guha & Mackman, 2001 ; Jerela, 2007 ; Park *et al*, 2009 ; Tsukamoto *et al*, 2010 ; Kumar *et al*, 2012).

Par ailleurs, une forme soluble de CD14 (sCD14) a été décrite dans le plasma des patients en choc septique. Son taux est corrélé à la gravité du choc, mais les concentrations les plus élevées semblent avoir un effet protecteur en assurant la capture du LPS qui est alors éliminé par le système réticulo-endothélial après incorporation avec des lipoprotéines (Gluck *et al*, 2001 ; Kitchens *et al*, 2001). sCD14 est libéré de la membrane après clivage de son ancre GPI par la phospholipase A₂ (Fourcade *et al*, 1995).

P2X₇ est un récepteur ubiquitaire prurinergique à ATP qui se comporte à la fois comme un canal ionique (influx de Ca²⁺ et Na⁺ principalement) dès les premières millisecondes de stimulation, puis comme un pore membranaire laissant passer des molécules jusqu'à 900 Da après quelques secondes (Di Virgilio, 1995 ; Chiao *et al*, 2013). P2X₇ présente un site de liaison au LPS et est impliqué dans l'immunité innée en permettant la formation de l'inflamosome NALP3, la maturation et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1 β et IL-18 mais aussi la libération de NO (Ferrari *et al*, 2006 ; Davis *et al*, 2011). P2X₇ intervient dans la maturation de la pro-IL-1 qui nécessite également la présence d'espèces réactives de l'oxygène et de la caspase 1 (ou IL-1 β converting enzyme – ICE). Dès 2001, une sécrétion rapide d'IL-1 β contenue dans des MPs a été mise en évidence, et P2X₇ est impliqué dans le processus de vésiculation rapide (de l'ordre de la minute) de manière calcium-dépendante (MacKenzie *et al*, 2001). De plus, il intervient dans la sécrétion de l'IL-1 β qui peut se faire sous manière « conventionnelle » (sécrétion) ou au contraire de manière non conventionnelle, sous forme d'exosomes ou de MPs (Dubyak, 2012). P2X₇ a également été impliqué dans la phagocytose mais aussi dans l'activation de la phospholipase D (PLD) et de la phospholipase A₂ (PLA₂) (El Ouaaliti *et al*, 2012). Les voies de sécrétion de l'IL-1 β sont schématisées sur la figure 9.

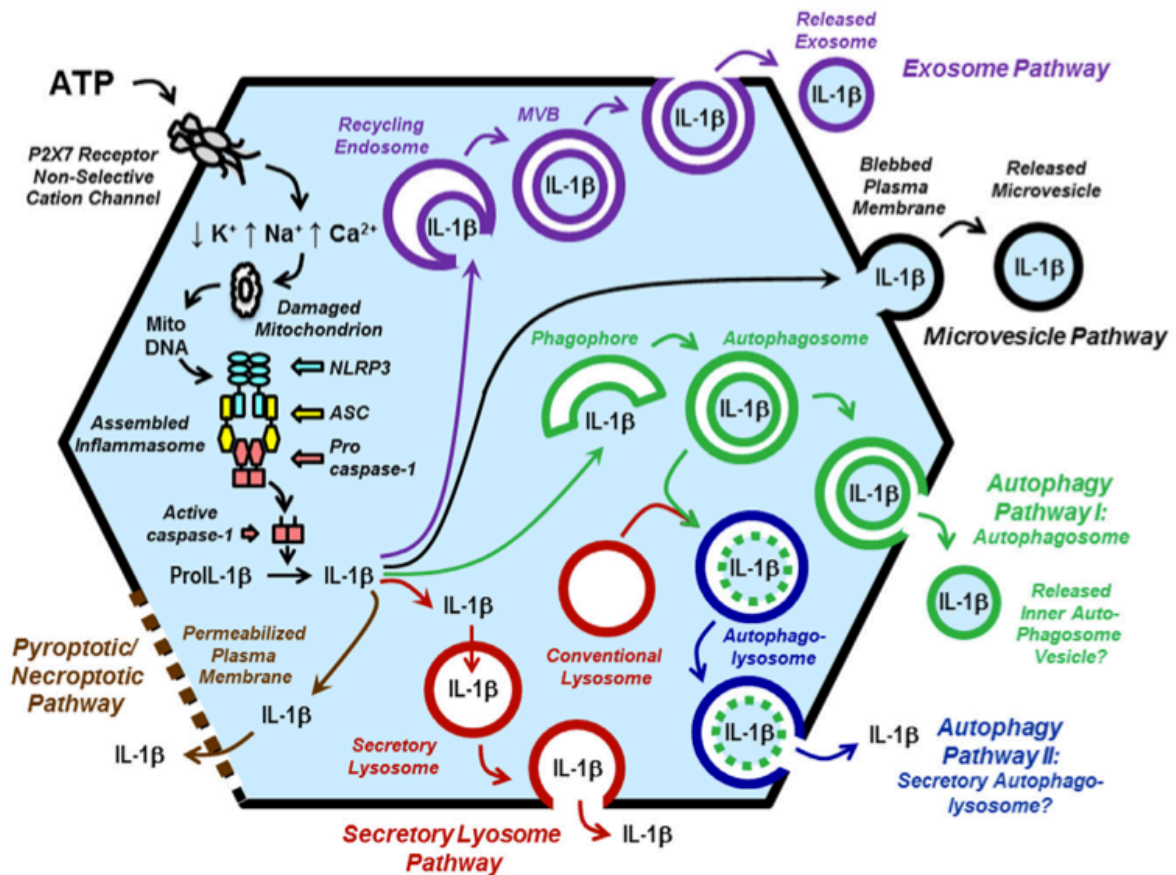


Figure 9. Voies de sécrétion de l'IL-1 β (Dubyak, 2012).

La partie gauche de la cellule représente la formation de l'inflammasome NLRP3/ASC/procaspase 1. L'accumulation de caspase 1 permet la conversion de la pro-IL-1 β en IL-1 β . La partie droite représente les quatre voies « non conventionnelles » de sécrétion de l'IL-1 β : (i) exosomes ; (ii) microparticule ; (iii) deux variantes de la voie de l'autophagocytose impliquant l'exocytose d'autophagosome ou d'autophagolysosome ; (iv) lysosome. Une 5^{ème} voie est représentée par une sécrétion après perméabilisation de la membrane plasmique.

Autres médiateurs de l'inflammation : stress oxydant et monoxyde d'azote (NO)

Au cours du métabolisme anaérobie, l'oxygène est utilisé au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale pour permettre la production d'ATP à partir de divers substrats. L'oxygène est une molécule pouvant donner lieu à la génération de petites quantités de *dérivés réactifs de l'oxygène*, les ROS (reactive oxygen species), contenant un électron libre non apparié. Ces dérivés comprennent des radicaux libres (radical superoxyde O₂⁻, hydroxyl HO[•], monoxyde d'azote NO) et des dérivés non radicalaires (peroxyde d'hydrogène H₂O₂, peroxyde d'azote ONOO⁻). Quand ils s'accumulent ou sont produits en grande quantité, ces ROS peuvent interagir avec des acides nucléiques, des protéines ou des lipides et perturber leur fonction. La protection des tissus est assurée principalement par des enzymes et des piègeurs

éboueurs (« scavengers ») de radicaux libres, en particulier les superoxydes dismutases et les catalases, les vitamines C et E et le glutathion. Au cours du SIRS, il existe à la fois une surproduction de radicaux libres par différents mécanismes et une déplétion des systèmes antioxydants ou de leurs cofacteurs, conduisant à un débordement des mécanismes de défense et au stress oxydatif. La NADPH oxydase des polynucléaires et des macrophages stimulés produit au cours du « *burst* oxydatif » de grandes quantités d'anion superoxyde nécessaire à la phagocytose.

Le *monoxyde d'azote*, initialement décrit sous le nom d'EDRF (endothelium-derived relaxing factor), résulte de la transformation de la L-arginine en L-citruline par l'arginine désaminase ou NO synthétase, en présence de NAD(P)H, d'oxygène et de nombreux autres cofacteurs (Furchgott *et al*, 1984 ; Taddei *et al*, 2003 ; Vincent *et al*, 2003 ; Barbato & Tzeng, 2004). Il existe trois formes de NO synthétases (NOS) : deux sont constitutives, la nNOS présente essentiellement au niveau neuronal et impliquée dans la neurotransmission et la eNOS exprimée par les cellules endothéliales et musculaires lisses vasculaires, les cardiomyocytes et les plaquettes (Vincent *et al*, 2003 ; Wheacraft *et al*, 2003 ; Barbato & Tzeng, 2004) ; la troisième est inductible (iNOS) par certaines cytokines ou les endotoxines bactériennes et est présente au niveau des macrophages, et plus faiblement au niveau des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses vasculaires et des adipocytes (Cho *et al*, 1992 ; Morris & Billiar, 1994 ; Titheradge, 1999 ; Aliev *et al*, 2000 ; Walford & Loscalzo, 2003). Le NO est un radical très lipophile lui permettant de diffuser librement au travers des membranes cellulaires ; sa demi-vie est de quelques secondes et ne peut donc avoir qu'une action de proximité (Cauwels, 2007). Le NO est à la fois une molécule de régulation du tonus vasculaire physiologique (eNOS) et un acteur de la défense non spécifique au cours de l'agression par un pathogène (iNOS). La production massive de NO par iNOS en réponse à l'infection facilite la phagocytose, induit l'expression de gènes anti-inflammatoires, prévient l'adhésion leucocytaire et l'agrégation plaquettaire, entraîne une vasodilatation artérielle diminuant la postcharge cardiaque facilitant ainsi l'augmentation de la délivrance périphérique en oxygène, prévient la vasoconstriction de l'artère rénale en réponse à l'activation du système rénine-angiotensine-aldostérone et limite le stress oxydatif. Toutefois, si la stimulation de iNOS persiste, ces effets bénéfiques vont être contrebalancés par l'induction d'une vasoplégie profonde

avec hypotension artérielle résistante au remplissage vasculaire et nécessitant le recours aux vasopresseurs, définition du choc septique (Cauwels, 2007).

Autres médiateurs de l'inflammation : histones et NETs

Les polynucléaires neutrophiles ont un rôle majeur dans la défense anti-bactérienne par l'intermédiaire de la phagocytose. Cependant, leur rôle ne se limite pas à la phagocytose et il a été démontré depuis le début des années 2000 un rôle dans la protection vis-à-vis des germes intracellulaires (virus, mycobactéries), dans la régulation de la réponse immunitaire adaptative (en particulier de l'interaction avec les lymphocytes B de la zone marginale au sein de la rate), dans la libération du contenu des granules sous l'influx d'ions et de l'émission des NETs (Neutrophil Extracellular Traps) associant chromatine et d'histones lors de la NETose. Ainsi, la fonction des neutrophiles dépasse largement la seule défense anti-bactérienne pour toucher l'athéro-sclérose, l'allergie ou encore la thrombose (pour revue : Amulik B *et al*, 2012 ; Mócsai, 2013).

La NETose a été décrite en 2004 (Brinkmann *et al*, 2004) et correspond à une forme de mort cellulaire avec déroulement de la chromatine, perméabilisation de la membrane nucléaire puis cellulaire avec libération d'un maillage de filaments d'ADN associés à des histones et divers enzymes, dont l'élastase (Brinkmann & Zychlinsky, 2012). Au cours de la réponse anti-infectieuse, les mécanismes contribuant à l'émission de NETs sont nombreux et sont partiellement dépendants de l'agent pathogène (pour revue : Branzk & Papayannopoulos, 2013). Les NETs forment donc un filet permettant d'entraver « physiquement » la dissémination à côté de l'action enzymatique des diverses protéines associées. Ainsi, la NETose semble jouer un rôle fondamental dans la prévention des infections fongiques invasives (Gow *et al*, 2012). La NETose (figure 10) peut se faire par mort cellulaire de manière lente (quelques heures) ; elle est irréversible et dépend de la génération de ROS par la NADPH oxydase Nox2 (Brinkmann *et al*, 2004 ; Fuchs *et al*, 2007). La myéloperoxydase (MPO) est également impliquée dans ce phénomène en générant de l'hypochlorite et d'autres ions halogénés à partir de H₂O₂ obtenue par réaction de l'ion superoxyde

avec H₂O (Metzler *et al*, 2011 ; Akong-Moore K *et al*, 2012). La MPO s'associe avec la chromatine et favorise sa relaxation par un mécanisme non enzymatique, potentialisé par l'élastase (Papayannopoulos *et al*, 2010). La décondensation de la chromatine semble également facilitée par la citrullination des histones à partir de l'arginine sous l'action de la peptidylarginine-désaminase 4 (PAD4) (Neeli *et al*, 2008 ; Neeli *et al*, 2009). Mais il existe une autre voie de NETose, rapide (quelques minutes à une heure), à partir de cellules vivantes ; celle-ci est observée au cours des infections par des bactéries gram-positives. On observe alors le relargage de vésicules contenant la chromatine décondensée et des protéines antibactériennes granulaires s'associant pour former les NETs. TLR2 (impliqué dans la reconnaissance de l'acide lipoteicoïque) et l'opsonisation par la fraction C3 du complément semblent nécessaires (Pilszczek *et al*, 2010). Les neutrophiles anucléés conservent leur fonction de phagocytose, celle-ci ne dépendant pas de la synthèse de nouvelles protéines.

Les différentes modalités de NETose sont représentées sur la figure 10.

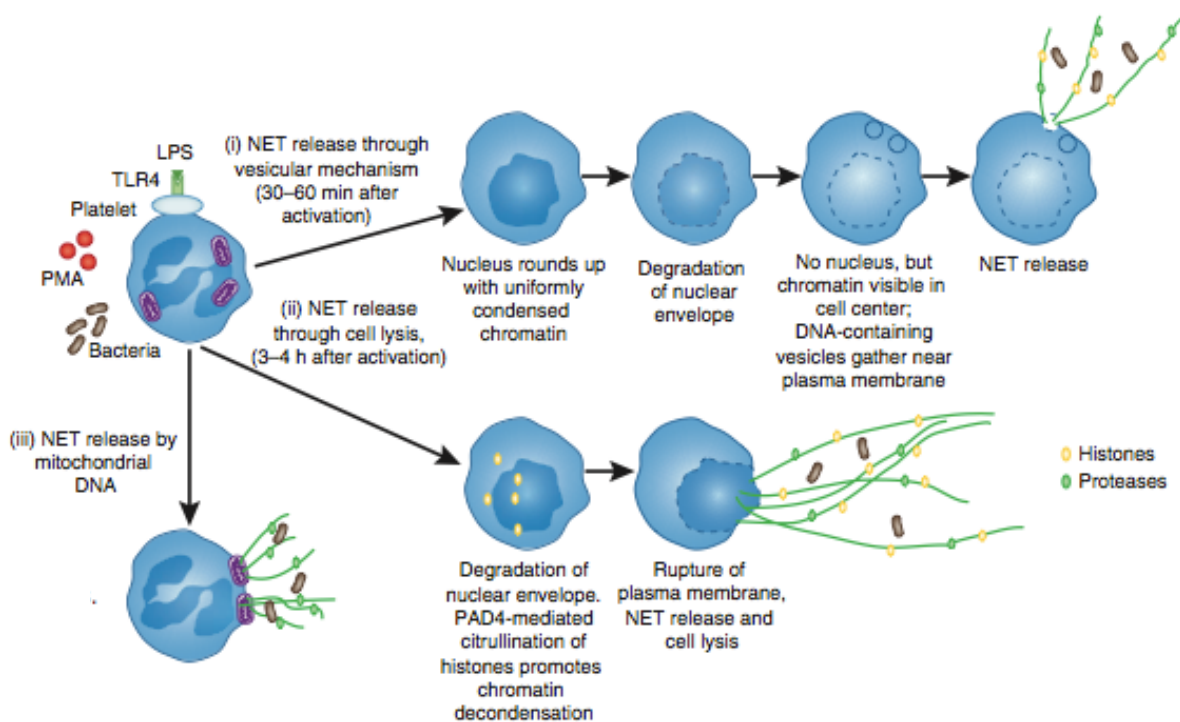


Figure 10. Formation des NETs (Phillipson & Kubes, 2011)

(i) Les NETs peuvent être relargués à partir de vésicules. Les neutrophiles s'arrondissent et présentent une chromatine uniformément condensée puis la membrane nucléaire se rompt. Au sein du cytoplasme de ces cellules, on peut observer de petites vésicules proches de la membrane plasmique contenant de l'ADN. Ces vésicules peuvent fusionner à la membrane et libérer les acides nucléiques qui vont piéger les bactéries. (ii) Les NETs peuvent également être relargués après lyse cellulaire selon un mécanisme plus long que le précédent. La membrane nucléaire est dégradée et on observe une décondensation de la chromatine après citrullination des histones par la PAD4 (peptidylarginine-désaminase 4). (iii) Les NETs pourraient être également d'origine mitochondriale.

Les NETs semblent éliminés par endocytose au niveau des macrophages (de manière dépendante de la cytochalasine D) alors que la DNase I à des concentrations physiologiques ne suffisait pas à les dégrader mais favorisait l'endocytose (Farrera & Fadeel, 2013). Dans ce travail, les auteurs ont également montré l'importance de la fraction C1q dans la facilitation des NETs par opsonisation. Les NETs sont alors dégradés par les lysosomes mais n'induisent pas la production de cytokines pro-inflammatoires. À l'opposé, les NETs potentialisent la réponse inflammatoire et la production de cytokines après stimulation par le LPS (Farrera & Fadeel, 2013).

Les histones s'assemblent pour former les nucléosomes et sont indispensables à la condensation et à la décondensation de la chromatine en fonction du cycle cellulaire. Depuis les années 1940 les histones sont connus pour leurs propriétés bactéricides (Miller *et al*, 1942 ; Hirsch, 1958). La présence d'histones extranucléaires a été montrée dans le cytoplasme et à la surface des cellules (pour revue : Parseghian & Luhrs, 2006) mais aussi au sein des NETs (Urban *et al*, 2009). Le mécanisme d'action des histones en tant qu'agent anti-infectieux n'est pas encore totalement élucidé mais semble lié à la charge électrique (cationique) permettant une liaison aux membranes microbiennes et participant soit à leur lyse soit l'ouverture de pores laissant pénétrer d'autres agents cytotoxiques. Les histones ont également une action cytotoxique sur les cellules eucaryotes (Xu *et al*, 2009 ; Gupta *et al*, 2010 ; Saffarzadeh *et al*, 2012) et pourraient participer directement à la pathogénie du sepsis (Xu *et al*, 2009). Récemment, il a été établi une corrélation entre taux d'histones circulants après un traumatisme (non thoracique) et survenue d'un syndrome de détresse respiratoire aiguë et la gravité évaluée par le score SOFA (Abrams *et al*, 2013). Dans ce travail, il a également été montré une cytotoxicité directe des histones sur des cellules endothéliales en culture, mais surtout une atteinte respiratoire spécifique chez des souris associant œdème lésionnel, alvéolite hémorragique, thromboses microvasculaires et accumulation de neutrophiles ; ces lésions étaient prévenues par un anticorps anti-histone confirmant leur pathogénicité (Abrams *et al*, 2013).

Enfin, les leucocytes ont été incriminés dans les processus thrombotiques par l'intermédiaire des NETs et des histones dans plusieurs études. Tout d'abord, il a été montré que les plaquettes activées par le collagène pouvaient provoquer la libération de nucléosomes à partir de neutrophiles, mais aussi diverses

protéases. Les nucléosomes peuvent se lier et inhiber l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire TFPI et ainsi favoriser l'extension du thrombus, les neutrophiles étant « recrutés » au site de la lésion endothéliale (Massberg *et al*, 2010). Ces liens entre immunité innée et thrombose médiés par les NETs ont été renforcés par la mise en évidence d'une diminution de l'activation de la protéine C par le complexe thrombine-thrombomoduline (Ammollo *et al*, 2011) mais aussi par une activation des plaquettes impliquant TLR2 et TLR4 (Semeraro *et al*, 2011) et finalement de thromboses (Fuchs *et al*, 2011). Enfin, la citrullination des histones par l'intermédiaire de la PAD4 est un mécanisme fondamental dans la survenue de thromboses veineuses chez la souris (Martinod *et al*, 2013) mais aussi dans la stabilité du caillot (Longstaff *et al*, 2013), et ouvre de nouvelles voies de recherches thérapeutiques.

L'HÉMOSTASE COMME RÉPONSE DE L'HÔTE À L'AGRESSION

Pour expliquer la dérégulation de la coagulation au cours de la réponse de l'hôte, pouvant aller jusqu'à un tableau de CIVD caractérisée par des manifestations thrombotiques et hémorragiques. La présence de cytokines pro-inflammatoires modifie le profil de la membrane cellulaire. D'un profil anticoagulant, elle devient pro-coagulante par l'expression de facteurs pro-coagulants et antifibrinolytiques à leur surface (Bick, 2003 ; Aird, 2005 ; Levi, 2007 ; Levi, 2010). Ce profil s'entretient, par l'action de la thrombine, de FXa et du complexe FT-FVIIa qui agissent sur les cellules endothéliales par l'intermédiaire de récepteurs. Les récepteurs PAR-1, 3 et 4 sont activés par la thrombine, PAR-2 est activé par le complexe FT-FVIIa. Ces récepteurs couplés à une protéine G sont importants dans le processus de modification du profil des cellules endothéliales, ils participent à l'augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires, de médiateurs de l'inflammation et de molécules d'adhésion pour les cellules immunitaires. De même, la diminution de la protéine C activée participe à l'augmentation du phénomène pro-inflammatoire de CIVD, comme la diminution de l'antithrombine qui possède des propriétés anti-inflammatoires.

L'hémostase est « née » il y a plus de 350 millions d'années comme l'un de ces mécanismes de défense ancestraux (Davidson *et al*, 2003). Le mot « hémostase » vient du grec et signifie littéralement « sang figé »

(Αἷμα et Στασις). À côté de cette définition étymologique – et finalement « fonctionnelle », il faut entendre par ce terme tous les éléments rhéologiques, cellulaires et moléculaires qui permettent l'écoulement fluide du sang dans les vaisseaux ainsi que l'arrêt du saignement et la réparation vasculaire en cas de lésion. Actuellement, l'hémostase doit être envisagée comme une coopération cellulaire et moléculaire dans le compartiment vasculaire mais aussi périvasculaire finement régulée dont les champs sont l'intégrité vasculaire, la défense innée et la tumorigénèse (Versteeg *et al*, 2013). L'objet de ce chapitre ne sera pas de couvrir toute la physiologie de l'hémostase, mais de se focaliser sur les mécanismes de défense face à un micro-organisme afin de comprendre le rôle fondamental de la « réponse hémostatique » et ses conséquences.

Il est connu depuis de nombreuses années que des saignements diffus, en nappe, sont associés à un plasma incoagulable et à une thrombopénie; cette pathologie, dénommée syndrome de défibrination s'observe aussi bien au cours d'états septiques graves (purpura fulminans) que de polytraumatismes ou de lésions obstétricales. Ce syndrome fait suite à une phase d'activation intense et disséminée de la coagulation avec la survenue de (micro-)thromboses diffuses, permettant de regrouper ces manifestations « contradictoires » sous le nom générique des coagulations intravasculaires disséminées (CIVD) (Bick, 2003). Les manifestations cliniques sont diverses, elles résultent soit de la thrombose des microvaisseaux soit d'un syndrome hémorragique par consommation des facteurs de la coagulation. Nous aborderons successivement la physiopathologie, les manifestations cliniques puis nous exposerons les différents outils à la disposition des cliniciens pour faire le diagnostic de CIVD.

Des cellules et des protéines

L'arbre vasculaire se distribue en un réseau artériel (constitué successivement d'artères distributives puis résistives), capillaire (assurant les échanges métaboliques) et veineux. La structure des vaisseaux comporte de la lumière vers la périphérie trois tuniques, l'endothélium, la média et l'intima.

L'*endothélium* est composé d'une couche de cellules endothéliales reposant sur une membrane basale. S'il n'existe qu'un seul type de cellule endothéliale, celle-ci prend des phénotypes très différents en fonction de sa localisation sur l'arbre vasculaire, en particulier en fonction de la nature de la pression, des forces de cisaillement et des turbulences. La cellule endothéliale est globalement pavimenteuse et assure un « dallage » vasculaire avec une face luminale et une face basale. La face endoluminale est directement au contact du sang et doit donc avoir des propriétés anti-adhérentes, anti-aggrégantes et anticoagulantes tout en disposant d'un arsenal sophistiqué pour répondre à l'agression. Ces propriétés sont essentiellement dévolues au glycosaminoglycane (GAG), résidus glucidiques formant une véritable interface entre le flux sanguin et la membrane lipidique. Toute lésion du GAG va faciliter l'adhésion des cellules circulantes et l'activation de la cellule endothéliale. Le GAG « trappe » aussi un certain nombre de molécules telles que l'albumine ou l'antithrombine. Par ailleurs, la cellule endothéliale sécrète une ADPase, des prostaglandines (en particulier la PGI₂) et du monoxyde d'azote (NO) qui ont des propriétés antiadhésives et vasodilatatrices. Elle exprime également à sa surface la thrombomoduline, qui une fois liée à la thrombine sont catalyseurs de l'activation de la protéine C et du TAFI (thrombin activatable fibrinolysis inhibitor) et l'EPCR récepteur à la protéine C (endothelial protein C receptor) (Vallet & Wiel, 2001 ; Aird, 2007 ; van Hinsbergh, 2011).

À l'opposé, le *sous-endothélium*, non exposé au flux sanguin sauf en cas de lésion endothéliale, a une action procoagulante. En effet, il contient du facteur tissulaire dont la densité est variable selon l'organe concerné (densité plus élevée dans le cerveau et le péricarde), du collagène de type III et IV mais aussi un réseau de thrombospondine et de collagène de type VI qui permettent ainsi l'adhésion des cellules telles les monocytes et les plaquettes (Vallet & Wiel, 2001).

La média contient les *cellules musculaires lisses* ainsi qu'une matrice de fibres d'élastine (dans les artères distributives) et de collagène. Les cellulaires musculaires lisses assurent la régulation du tonus sous l'influence de divers médiateurs. Ceux-ci peuvent être endovasculaires (circulants ou produits localement par les cellules endothéliales ou les cellules adhérentes à l'endothélium) ou provenir de l'adventice (terminaisons nerveuses ou fibroblastes). Les principaux facteurs augmentant le tonus vasculaire

(vasoconstriction) sont l'endothéline, la vasopressine, l'adrénaline, la noradrénaline mais aussi la thrombine, le thromboxane A₂ (TXA₂) ou certaines prostaglandines (PGF₂) ; les facteurs de relaxation (vasodilatation) sont le monoxyde d'azote (synthétisé sous l'action des eNOS ou des iNOS) et la prostacycline (PGI₂) (Vallet & Wiel, 2001 ; Aird, 2007 ; van Hinsbergh, 2011).

Les *plaquettes* sont des éléments cellulaires dépourvus de noyau issus de la fragmentation des mégacaryocytes médullaires. Les plaquettes contiennent des granules denses (ADP, ATP, sérotonine, Ca²⁺, histamine) et des granules α (PF₄, β -thromboglobuline), des lysosomes, des mitochondries ainsi que des brins d'ARN messager leur conférant une faculté de synthèse malgré l'absence de noyau. Il existe un système canaliculaire connecté (échanges entre le cytosol et le milieu extracellulaire) et un système tubulaire dense (lieu de stockage du calcium). Ces systèmes associés à des réseaux de microfibrilles donnent à la cellule sa forme discoïde au repos et lui permettent de la modifier selon les besoins. Les glycoprotéines GPIa et GPIIa (ou $\alpha_2\beta_1$) et GPIIb (CD 36) sont impliquées dans l'adhésion au collagène. La GPIb comporte un site récepteur du vWF et participe également à l'adhésion mais aussi à l'activation en formant le complexe GPIb-IX-V. La GPIIb-IIIa (ou $\alpha_{IIb}\beta_3$) est capable de lier le fibrinogène au niveau de la sous-unité α_{IIb} après activation et participe à l'agrégation. Les plaquettes portent des TLRs, en particulier TLR2 et TLR4 impliqués dans la réponse immune lors de certaines infections bactériennes et peuvent synthétiser et sécréter IL-1 β au cours de processus inflammatoire. gC1q-R est le récepteur de C1q produit par l'activation de la cascade du complément en réponse à l'infection bactérienne. Enfin, on retrouve également un récepteur de la portion Fc des anticorps, en particulier Fc γ RIIa (récepteur des IgG de faible affinité) jouant un rôle important dans l'agrégation secondaire à l'agression bactérienne, en association ou non avec les récepteurs du complément. Les plaquettes contiennent des protéines adhésives (fibrinogène, fibronectine, thrombospondine, vWF), divers facteurs de la coagulation (FV, FVII, FXI, FXIII, kininogènes, PS, plasminogène, PAI-1, TFPI) et des facteurs mitogéniques (PDGF, TGF) (Cox *et al*, 2011).

Les *monocytes* sont circulants quelques jours avant de se transformer en macrophages dans les tissus. Les monocytes jouent un rôle important dans l'hémostase, étant capables d'exprimer à leur surface du TF

après stimulation par la CRP, l'IL-6 mais aussi en réponse au LPS et lors de la stimulation par des plaquettes activées. On observe alors un remaniement membranaire avec externalisation de PhtdSer et une vésiculation (Satta *et al*, 1994 ; Satta *et al*, 1997). TF et son environnement phsospholipidique anionique permettent alors l'(auto)activation de FVII et initient la génération de thrombine à la surface des monocytes mais aussi des MPs qui disséminent un potentiel procoagulant. Les monocytes expriment également EPCR et peut lier PC/PCa avec un effet cytoprotecteur, anti-apoptotique et anti-inflammatoire. Ils expriment également t-PA, u-PAR et PAI-1.

Les *granulocytes neutrophiles*, de part leur sécrétion d'enzymes actifs tels des élastases, ont également un rôle dans l'hémostase (clivage d'ADAMTS13). De plus, on peut observer la présence de TF au niveau membranaire ; son origine reste discutée même si un transfert par l'intermédiaire des MPs semble être actuellement favorisé plutôt qu'une synthèse *de novo* (Egorina *et al*, 2008).

Les diverses familles de protéines de la coagulation (Figure 11) :

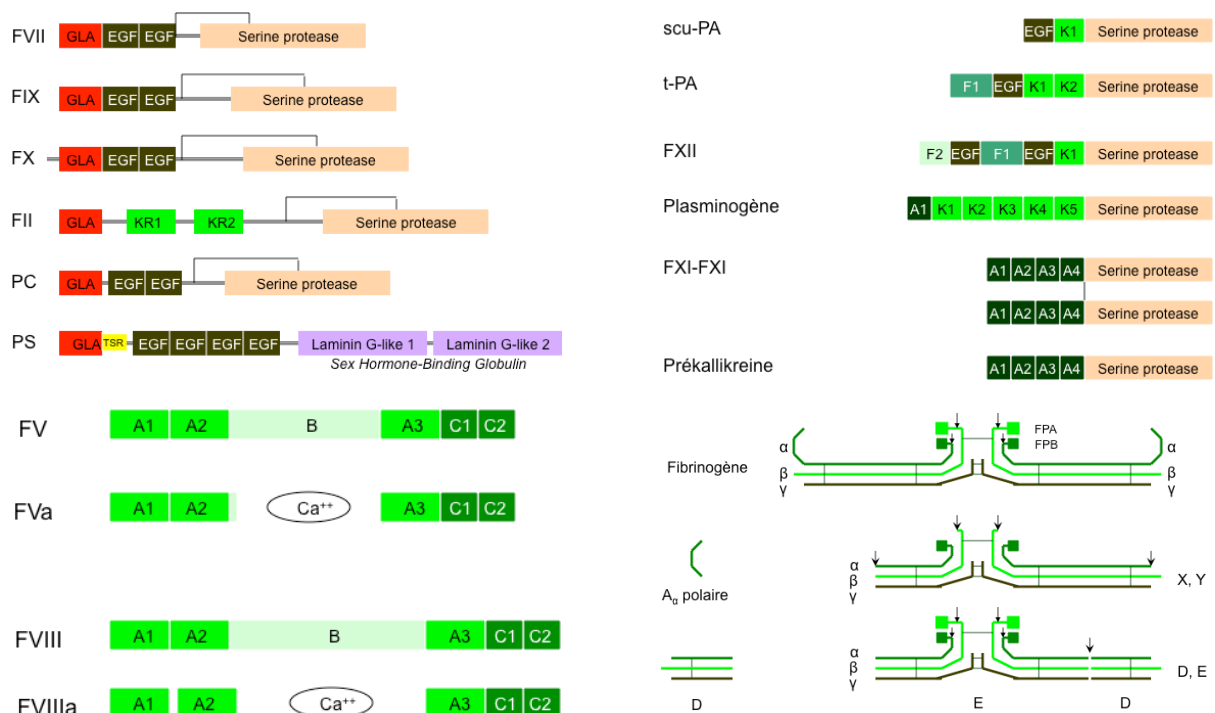


Figure 11. Structure schématique des différents facteurs de la coagulation (d'après MC. Guillin).

- Le facteur tissulaire (TF).
- Les protéines vitamine K-dépendantes ont un domaine GLA lié à la γ -carboxylation de résidus Gln ; ces résidus γ -carboxylés sont ainsi chargés négativement ce qui permet la focalisation au niveau des cellules activées (PhtdSer) par l'intermédiaire de Ca^{2+} . On distingue l'effecteur final, la prothrombine (FII), les facteurs d'amplification (FIX et FX), le facteur d'initiation (FVII), les facteurs de régulations (PC, PS, PZ) ; un analogue de la PS, dénommé gas-6 est impliqué dans l'inflammation mais également dans l'activation de la coagulation en cas d'hyperthermie par l'intermédiaire des protéines de choc thermique (HSP60).
- Les cofacteurs, FV et FVIII.
- Les protéines de la phase « contact » mais aussi de la fibrinolyse (FXII, FXI, t-PA, u-PA).
- Le fibrinogène.
- Les serpinines (pour *serine protease inhibitor*) sont capables d'inhiber les enzymes ayant une activité sérine-protéase comme de nombreux facteurs de la coagulation. Il s'agit de l'antithrombine (AT), inhibant FIIa, mais aussi FVII, FX et FIX, l' α_2 -antiplasmine (plasmin), le CI-inhibiteur (CIq, FXIIa, FXIa).
- D'autres protéines jouent également un rôle dans l'hémostase tel que le facteur von Willebrand (vWF) sécrété par la cellule endothéliale sous forme de polymères de très haut poids moléculaire (ULvWF) clivé par une protéase spécifique, ADAMTS13. ULvWF est responsable d'une adhésion en présence de forces de cisaillement élevées. ADAMTS13 est inhibée par la thrombine et par l'élastase des granulocytes neutrophiles (en cas de lésion vasculaire) mais peut également être dégradé par des (auto-)anticorps avec constitution d'un tableau de purpura thrombotique thrombocytopénique (Lam *et al*, 2007 ; Moake, 2009).
- Deux récepteurs membranaires ont une grande importance dans la régulation de l'hémostase et de la fibrinolyse, la thrombomoduline (TM) et le récepteur endothélial à la protéine C (EPCR). TM peut lier la thrombine et agir comme cofacteur, permettant à celle-ci d'acquérir un potentiel anticoagulant en clivant la PC présentée par EPCR mais aussi le TAFI (thrombin activatable fibrinolysis inhibitor), carboxypeptidase B hydrolysant les résidus lysine-terminaux de la fibrine, empêchant ainsi la fixation de la plasmin et retardant la fibrinolyse (Moser *et al*, 2010).

- Enfin, on a le facteur XIII ou stabilisant de la fibrine permettant de ponter les monomères de fibrine et ainsi permettre la constitution du réseau de fibrine. Ce facteur existe sous deux formes, l'une circulante d'origine hépatique et de structure $\alpha_2\beta_2$ (pFXIII), l'autre intraplaquettaire (d'origine mégacaryocytaire) et monocytaire et de type β_2 (cFXIII). pFXIII nécessite une première activation par la thrombine liée aux monomères de fibrine (qui jouent le rôle de facteur) puis par Ca^{2+} alors que cFXIII ne requiert que Ca^{2+} pour son activation (Muszbek *et al*, 2011).

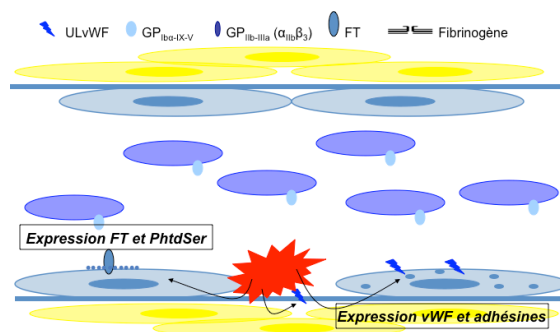
Infection et initiation de l'hémostase

Lors d'une lésion vasculaire, la matrice sous-endothéliale expose des molécules de collagène et du facteur von Willebrand, puissants agonistes plaquettaires par l'intermédiaire de GP_{VI} et $GP_{Ib\alpha-IX-V}$. Un changement de morphologie de la plaquette survient avec contraction du cytosquelette aboutissant au relargage du contenu des granules α (ADP) et des granules denses. Les facteurs de coagulation présents dans la plaquette, adsorbés dans les canalicules plaquettaires ou synthétisés par le mégacaryocyte (FV, FXI, TF, cFXIII), sont alors relargués dans l'environnement péri-plaquettaire. Enfin, on note une boucle d'amplification par activation endogène (inside-out) de la $GP_{IIb-IIIa}$. La liaison du fibrinogène à $GP_{IIb-IIIa}$ permet le « pontage » des plaquettes entre-elles, c'est-à-dire l'agrégation (Lane *et al*, 2005).

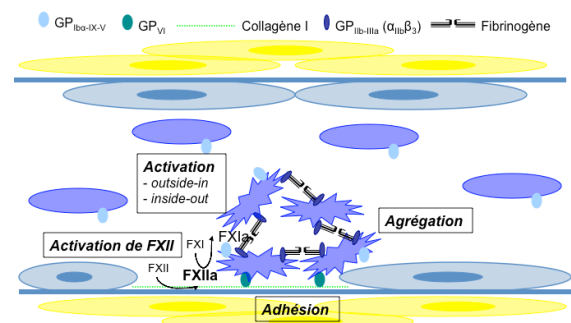
L'activation des cellules présentes permet une modification de la composition des membranes cellulaires, en particulier un passage sur le feuillet extracellulaire de phospholipides membranaires anioniques procoagulants, la phosphatidylsérine étant la plus connue (Zwaal & Schroit, 1997). La mise en relation de la phosphatidylsérine et du facteur tissulaire permet l'auto-activation du facteur (F)VII présent à proximité. Le complexe binaire ainsi formé (FT-FVIIa) active FX et FIX en FXa et FIXa localement. La faible quantité de FXa permet alors la génération d'une très faible quantité de thrombine (FIIa), incapable de transformer du fibrinogène en fibrine, mais responsable de l'activation des cofacteurs FV et FVIII en FVa et FVIIIa respectivement ; la thrombine est également capable de renforcer l'activation plaquettaire par l'intermédiaire de différents récepteurs tels que la $GP_{Ib\alpha-X-V}$ (et ainsi d'activer FXI en FXIa) et de récepteurs activés par les protéases (PAR-1 et PAR-3) (Lane *et al*, 2005). ULvWF est relargué, permettant

l'adhésion des plaquettes sous une force de cisaillement élevée alors que sa protéolyse par ADAMTS13 est fortement inhibée localement par la thrombine (Figure 12 a-c) (Lam *et al*, 2007).

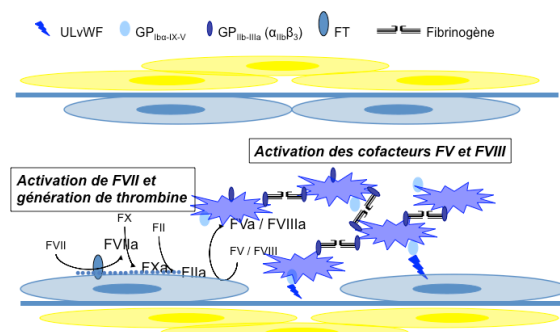
Les bactéries sont capables de libérer des polyphosphates (polyP), polymères linéaires de phosphates inorganiques fortement chargés négativement. Les polyP bactériens (environ 200 résidus) agissent en activant la phase contact (FXII/FXIIa et PK), FXIIa pouvant activer FXI ou FIX, accélèrent l'activation du FV, favorisent la polymérisation des molécules de fibrine en un gel de fibrine insoluble plus dense et plus compact et renforcent l'activation de GPIb-FXI par FIIa. Les polyP plaquettaires (80-100 résidus) facilitent l'activation de FV et renforçant l'activation de FXI par FIIa (Figure 12d) (Choi *et al*, 2011 ; Morrissey, 2012 ; Morrissey *et al*, 2012 ; Lam *et al*, 2013).



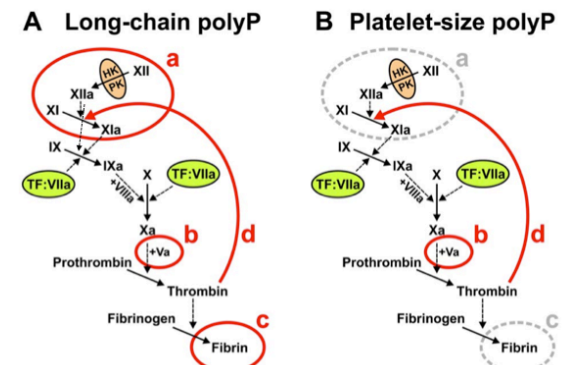
(a) Lésion endothéliale



(c) Activation par le collagène de type I



(b) Activation de FVII par TF et des plaquettes



(d) Rôles des polyP (d'après Morrissey)

Figure 12. Initiation de l'hémostase.

La voie d'activation par la phase contact est initiée lors de la présence de composants bactériens comme le LPS, la protéine M du *Streptomyces pyogenes*. Les surfaces cellulaires chargées négativement, activées par ces bactéries, permettent une augmentation de la concentration de FXI, FXII, de la PK et du HMWK. Il s'en

suit une auto-activation de la coagulation par l'intermédiaire de l'activation initiale par FXII (en présence de Zn^{2+} et non de Ca^{2+}) qui active ensuite la prékallicroïne en kallicroïne et l'activation du FXI. Puis le kininogène de haut poids moléculaire est clivé. FXIa clive FIX, qui rentre dans la boucle d'activation classique de la coagulation (Nickel & Renné, 2012).

Lors de l'infection, les micro-organismes sont également capables d'utiliser la réponse de l'hôte pour leur propre développement et leur survie, et en ce sens, peuvent « corrompre » les systèmes de défense pour les utiliser contre l'hôte. Les bactéries gram-négatives expriment au niveau de leur membrane externe des aspartyl-protéases ou omptines (Yun & Morrissey, 2009). Par exemple, Pla (sécrétée par *Yersinia pestis*) active la génération de thrombine par une activation directe de FVII en FVIIa et une inhibition de TFPI. Il se forme alors une coque de fibrine autour des bactéries qui sont ainsi protégées de la phagocytose. Une fois une croissance bactérienne suffisante obtenue, Pla active la fibrinolyse et la protéolyse de la matrice interstitielle par activation directe du plasminogène, dégradation de PAI-1 et de TAFI et inhibition de l' α_2 -antiplasmine (Kastrup *et al*, 2008). Une mutation du gène du plasminogène (Ala⁶⁰¹→Thr) est responsable d'une activité fibrinolytique réduite à 10 % de l'activité basale ; cette mutation assure une « sélection positive » avec une moindre sensibilité à la peste (Degen *et al*, 2007 ; Rijken & Lijnen, 2009). PgtE sécrétée par *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* et Kop sécrétée par *Klebsiella pneumoniae* sont responsables d'une inhibition spécifique de PAI-1 (Haiko *et al*, 2010). InhA1, une métalloprotéase à zinc sécrétée par *Bacillus anthracis* (agent de l'anthrax), est capable d'activer FX en Fxa et FII en FIIa (indépendamment de FXIIa et de TF-FVIIa) avec dépôts intravasculaires de fibrine, mais aussi dégradation d'ADAMTS13 favorisant l'adhésion plaquettaire. Parallèlement, on observe une dégradation de vWF favorisant l'hémorragie (maladie de Willebrand induite) (Chung *et al*, 2008).

La CIVD est caractérisée par un excès d'exposition du facteur tissulaire et sa dissémination dans l'organisme. Il déclenche ensuite l'activation de la coagulation donnant lieu à la génération de thrombine qui se trouve elle aussi produite en excès. L'interaction entre les bactéries d'une part et les cellules de l'immunité et de l'endothélium d'autre part qui donne lieu à une réponse cytokinique pro-inflammatoire explosive responsable d'une intense activation cellulaire dans le compartiment vasculaire avec

surexpression de TF par ces cellules qui en temps normal n'en expriment pas à leur surface (monocytes, plaquettes) auquel s'ajoute une possible activation directe par l'intermédiaires des polyP bactériens (Langer & Chavakis, 2009 ; Morrissey *et al*, 2012). La génération de MPs porteuses de TF (cellules endothéliales et monocytes) mais aussi de GPIb α (plaquettes) participe à la dissémination d'un potentiel procoagulant (Satta *et al*, 1994, Østerud & Bjorkild, 2012 ; van der Meijden *et al*, 2012). Les lipoprotéines de faible densité fournissent également une surface lipidique propice à la cascade de la coagulation.

Propagation et dépassement des capacités de régulation

La *phase de propagation* de la coagulation est caractérisée par une focalisation et une accélération de la cascade décrite dans le paragraphe précédent. Le complexe formé à la surface de la plaquette, GP_{Ib α} -FXIa-PhtdSer-Ca²⁺, permet l'activation de FIX, avec un rendement supérieur à celui formé par le complexe F^T-FVIIa-PhtSer-Ca²⁺. FIXa s'associe à son cofacteur FVIIIa (complexe « tenase ») pour générer une grande quantité de Fxa. De même, Fxa se lie à Fva pour former le complexe prothrombinase et ainsi aboutir à la formation de quantité importante de thrombine (FIIa) (Figure 13a) (Lane *et al*, 2005 ; Wolberg & Campbell, 2008 ; Matafonov *et al*, 2011).

Quand la concentration de thrombine est suffisante, elle protéolyse le fibrinogène soluble en monomère de fibrine soluble et en fibrinopeptides A et B. La thrombine active FXIII lors de la formation du complexe FIIa-Fibrine-FXIII. Le gel de fibrine est stabilisé par le FXIIIa en formant des liaisons covalentes entre les chaînes γ de deux monomères de fibrine adjacents et les chaînes α de plusieurs monomères. FXIIIa permet également de lier le caillot de fibrine à des protéines du sous-endothélium (Figure 13b) (Mosesson, 2005 ; Lord, 2011 ; Huang & Lord, 2013 ; Muszbeck *et al*, 2011).

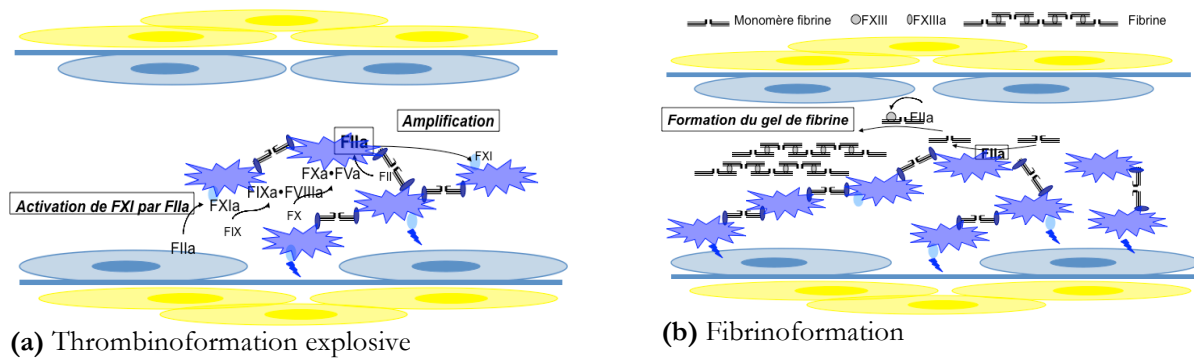


Figure 13. Thrombino- et fibrinoformation.

Trois systèmes de régulation principaux sont mis en place dès l'initiation ; le premier inhibe l'initiation de la génération de thrombine par l'intermédiaire du TFPI (inhibiteur de la voie du facteur tissulaire), le deuxième vise à limiter l'amplification en dégradant Fva (Pca), le dernier assurant la focalisation en inhibant la thrombine circulante (AT).

Le TFPI, synthétisé par les cellules endothéliales et les mégacaryocytes, fixe Fxa libre (non lié à la membrane) en formant ainsi un complexe TF-FVII-TFPI-Fxa empêchant la génération de FVIIa. La protéine S renforce cette inactivation en augmentant le rendement du TFPI et permettrait de localiser son action sur le TF présent à la surface plaquettaire en augmentant l'affinité du TFPI pour les membranes plaquettaires (Figure 14a) (de Jonge *et al*, 2000 ; Hackeng *et al*, 2009). Sa concentration diminue au cours des CIVD, avec une diminution du rapport FT/TFPI, ce qui affaiblit d'autant le rétrocontrôle de cette molécule sur le facteur tissulaire présent en excès. Une équipe japonaise a prouvé que cette diminution est secondaire à une sécrétion par les cellules de l'inflammation d'enzymes qui ont pour effet une dégradation du TFPI en plus grande proportion que les facteurs inducteurs de la coagulation (Okajima, 2001).

Parallèlement, FIIa peut se lier à un récepteur spécifique, la thrombomoduline, entraînant la formation d'un complexe TM-FIIa capable de cliver la protéine C (PC), elle-même liée à son récepteur endothélial (EPCR) pour générer de la protéine C activée (Pca ou APC). La protéine C activée se lie à son cofacteur la protéine S pour former un nouveau complexe Pca-PS-PhtdSer-Ca²⁺ dégradant Fva en Fva_i ; ce complexe en présence de FV clive FVIIIa en FVIIIa_i. Il en résulte globalement un arrêt de la génération de thrombine par « disparition » des cofacteurs (Figure 14b) (Lane *et al*, 2005). L'atteinte endothéliale avec

l'acquisition d'un phénotype pro-inflammatoire, procoagulant et antifibrinolytique se traduit par une diminution de la synthèse de la thrombomoduline et du récepteur endothélial de la protéine C, ce qui contribue au défaut d'activation de la protéine C et par voie de conséquence au dysfonctionnement de la voie de régulation des protéines C et S avec absence d'inhibition de Fva et de FVIIIa mais aussi perte de l'effet anti-apoptotique et cytoprotecteur médié par l'activation des récepteurs PAR (Rezaie, 2010 ; Mosnier *et al*, 2007 ; Sarangi *et al*, 2010). Il faut toutefois noter un pic précoce de protéine C activée au cours de la CIVD.

L'antithrombine permet de limiter la diffusion de molécules de thrombine dans la circulation. Elle agit par captation de molécules solubles de thrombine et par formation de complexe thrombine-antithrombine. Ce mécanisme d'inhibition est potentialisé par les héparanes sulfates ou les héparines (Quinsey *et al*, 2004). Il est également régulé dans le temps. Face à plusieurs substrats, la thrombine suit la loi d'action de masse et va donc activer plus fréquemment le substrat le plus abondant. Cela se traduit par l'activation de FXI avec une boucle d'auto-amplification à la phase initiale (afflux de plaquettes non activées au site de la lésion endothéliale). Quand la quantité de thrombine générée devient importante et que le réseau de fibrine se densifie, l'apport de nouveaux substrats (fibrinogène ou plaquettes) diminue ; la thrombine va alors se lier à l'antithrombine captée par le glycocalix des cellules endothéliales intactes à proximité de la lésion initiale, et ainsi former des complexes thrombine-antithrombine (TAT) inactifs (Lane *et al*, 2005). Parallèlement, la thrombine libre dans le flux est inhibée par l'AT circulante ; cette action étant considérablement amplifiée en présence d'héparines (Figure 14c). La focalisation dévolue à l'antithrombine est également profondément altérée au cours de la CIVD. On observe d'une part une disparition du glycocalix des cellules endothéliales activées/lésées, avec une perte de l'action des glycosaminoglycanes sur l'antithrombine et, d'autre part, sa synthèse est fortement réprimée au niveau génomique (protéine de la phase négative) (Aird, 2007).

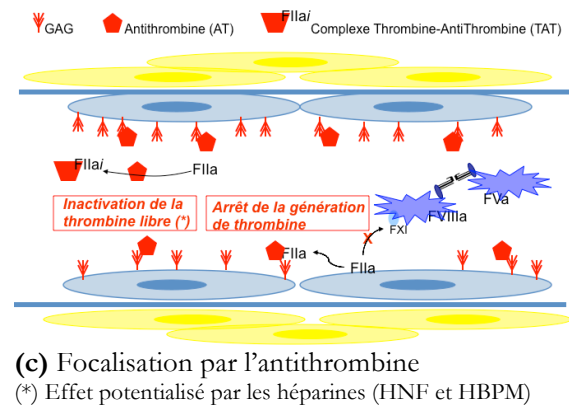
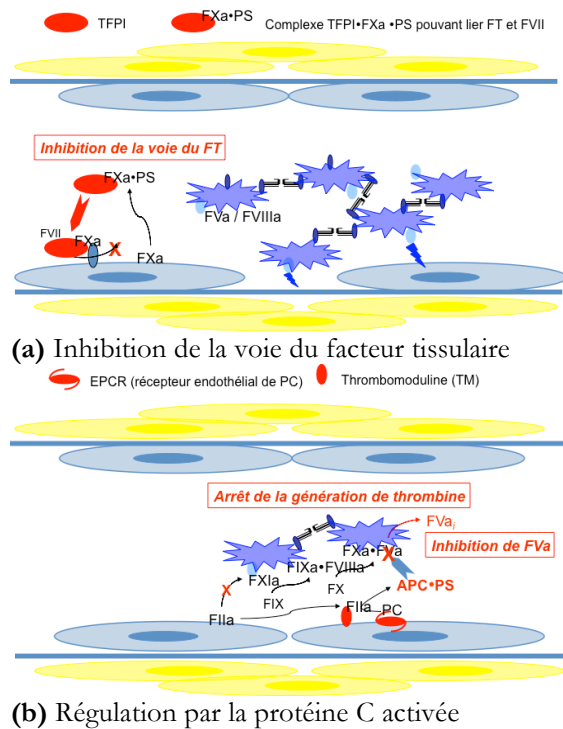


Figure 14. Régulation de l'hémostase.

Fibrinolyse

Le plasminogène circule sous forme inactivée, le t-PA est complexé à son inhibiteur PAI-1 prévenant l'activation du plasminogène en plasmine. Le t-PA présente une affinité supérieure pour la fibrine que pour PAI-1, entraînant la dissociation de ce complexe en présence d'un gel de fibrine, avec une activité augmentée plusieurs centaines de fois. Il se forme alors un complexe t-PA/plasminogène/fibrine. La fixation du plasminogène à la fibrine, favorise son activation en plasmine par le t-PA ou par l'u-PA. La plasmine dégrade ensuite la fibrine par clivage protéolytique de la fibrine au niveau de l'extrémité C-terminale de la chaîne α , libérant les produits de dégradation de la fibrine (PDF), dont les D-dimères correspondant à deux fragments D provenant de 2 molécules de fibrine stabilisées par une molécule de FXIIIa (Anglès-Cano, 1994).

Cette fibrinolyse est restreinte à la surface de la fibrine par la formation d'un complexe plasmine- α_2 -antiplasmine dès que la plasmine est circulante (Figure 14) (Schaller & Gerber, 2011). Il existe également une régulation par le TAFI, qui est activé par le complexe thrombine-thrombomoduline. En effet, le

TAFIa (ou carboxypeptidase B) favorise la dégradation des résidus lysine de la fibrine ce qui limite la fixation de la plasmine et retarde ainsi la fibrinolyse (Figure 15) (Morser *et al*, 2010). La CIVD se traduit par une fibrinolyse retardée par l'augmentation de PAI-1 secrété par les cellules endothéliales et les plaquettes activées (avec diminution du t-PA) et par l'activation du TAFI (Zeerleder *et al*, 2006).

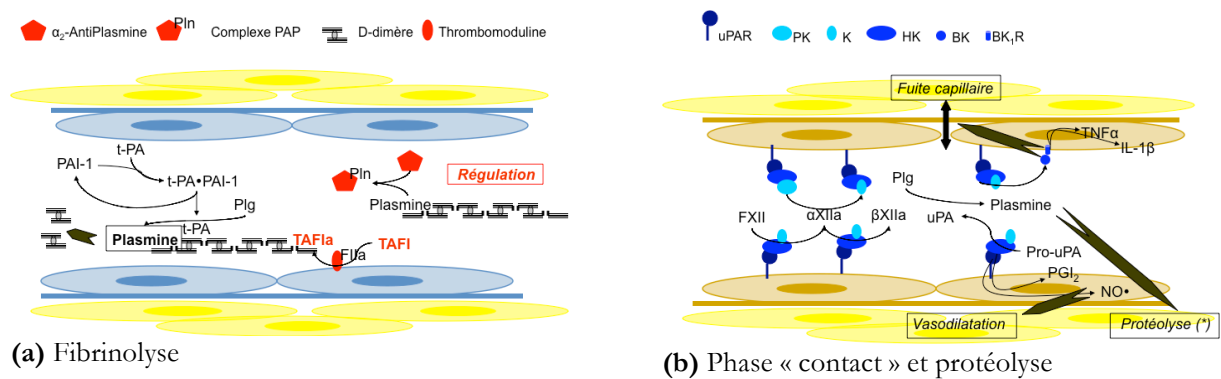


Figure 15. Fibrinolyse et protéolyse.

Diagnostic de la coagulation intravasculaire disséminée

Les manifestations secondaires à la CIVD sont très variées en fonction du degré de la perturbation de la coagulation et du stade de la maladie. Lors de la phase thrombotique, les microthromboses peuvent avoir un retentissement clinique et biologique, un état confusionnel est rapporté lors de la présence de microthrombi au niveau cérébral, leur présence au niveau rénal entraîne une insuffisance rénale dont le diagnostic étiologique peut être masqué dans le contexte de choc septique ; cette atteinte rénale est parfaitement caractérisée et passe par la dégradation locale d'ADAMTS13 et par les polymères de très haut poids moléculaire du facteur von Willebrand (UlvWF) (Ono *et al*, 2006). Au niveau cutané, des lésions purpuriques peuvent apparaître, à savoir des lésions millimétriques ne cédant pas à la vitropression ; plus tardivement, des lésions ischémiques extensives, dites « en carte de géographie » peuvent participer à cette atteinte cutanée. Les extrémités peuvent être le siège de lésions nécrotiques pouvant entraîner des pertes de substances. Le purpura fulminans peut entraîner une nécrose hémorragique cutanée, une ischémie des extrémités et enfin une hémorragie méningée qui est la manifestation clinique la plus sévère.

Plus tardivement, survient une phase hémorragique. Cliniquement, il s'agit au niveau cutané de l'apparition de bulles hémorragiques, d'ecchymoses spontanées, de pétéchies cédant à la vitropression et de saignements en nappe au niveau des points de ponction ou d'origine digestive sans lésion organique objectivée. L'hémorragie est due à la consommation des facteurs de la coagulation, à la thrombopénie, à une diminution importante du taux de fibrinogène, auxquels s'ajoute une activation de la fibrinolyse par génération de plasmine.

Il n'y a pas de critère définitif pour porter le diagnostic de CIVD ce qui rend très difficile toute étude clinique (Wada *et al*, 2013). La CIVD est une des manifestations observées au cours de certaines pathologies que nous venons d'exposer, et la recherche préalable de cette pathologie est indispensable pour évoquer le diagnostic (Bick, 2003).

C'est la concordance de l'analyse clinique (incluant le diagnostic principal) et de la biologie qui permet d'orienter le diagnostic de CIVD. Les analyses biologiques sont donc une étape incontournable du diagnostic, nécessitant une grande rigueur dans la réalisation des tests et dans leur interprétation. Il a été proposé de recourir au calcul de scores pour aider au diagnostic. Ces scores ne doivent donc être appliqués que lorsque la situation clinique est susceptible d'entraîner une CIVD, et leur interprétation devient difficile en cas d'insuffisance hépatocellulaire. (En cas de traitement par antivitamine K, on pourra remplacer le TP par FV.) La société internationale d'hémostase et thrombose (ISTH – International Society on Thrombosis and Haemostasis) et la société de médecine intensive japonaise (JAAM – Japanese Association for Acute Medicine) ont proposé des scores de CIVD respectivement en 2001 (Taylor *et al*, 2001) et 2005 (Gando *et al*, 2005) révisée en 2006 (Gando *et al*, 2006). Les critères diagnostiques sont proches et résumés dans le tableau VI.

Tableau VI. Scores diagnostiques de CIVD (Taylor *et al*, 2001 ; Gando *et al*, 2006).

	ISTH Overt (2001) (5 / 8)		JAAM (2006) (4 / 8)	
SIRS			[0]	< 3
			[1]	≥ 3
Platelets (G/L)	[0]	> 100	[0]	> 120
	[1]	50 to 99	[1]	80 to 119
	[2]	< 50	[3]	< 80
			[1]	-30%
			[3]	-50%
Prothrombin Time (%)	[0]	> 64	[0]	> 64
	[1]	35 à 64	[1]	< 64
	[2]	< 35		
Fibrinogen (g/L)	[0]	> 1,0		
	[1]	< 1,0		
D-Dimers (µg/mL)	[0]	< 0,5	[0]	< 5,0
	[2]	0,5 à 4,0	[1]	5,0 à 15,0
	[3]	> 4,0	[3]	> 15,0

MICROPARTICULES, INFECTION ET CHOC SEPTIQUE

Nous avons vu dans les chapitres précédents les mécanismes conduisant à l'activation cellulaire avec l'induction d'un remodelage membranaire et finalement la génération de MPs comme vecteurs de la coagulation intravasculaire disséminée et de l'inflammation (voie de sécrétion d'IL-1 β). Dans ce chapitre, nous allons revoir les différentes études fondamentales, expérimentales ou cliniques ayant étudié l'implication des MPs au cours du choc endotoxinique ou du choc septique. Nous reprendrons principalement les données que nous avons préalablement publiées, reproduits en annexe :

- Meziani F, Delabranche X, Asfar P, Toti F. Bench-to-bedside review: Circulating microparticles – a new player in sepsis? Crit Care 2010 ;14 :236,
- Delabranche X, Berger A, Boisramé-Helms J, Meziani F. Microparticles and infectious diseases. Méd Mal Infect 2012 ;42 :335-43,

MICROPARTICULES ET RÉPONSE INFLAMMATOIRE

Au cours des infections à bacilles gram-négatifs, la réponse inflammatoire induite par le LPS constitue un des principaux mécanismes de défense de l'hôte contre l'agent pathogène. Dans le plasma, le LPS est reconnu par les monocytes et macrophages. Il est transporté par la protéine de liaison LBP jusqu'à son récepteur. Le complexe LPS-LBP interagit avec le CD14, une glycoprotéine de surface exprimée par les cellules myéloïdes, co-récepteur de Toll-like Receptor 4 (TLR4). La formation d'un complexe CD14/TLR4 par l'intermédiaire de la protéine membranaire adaptatrice MD2 initie la transduction du signal avec sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, expression du FT et activation de l'apoptose (Guha & Mackman, 2001).

Dans le monocyte, le LPS active en effet de nombreuses voies de signalisation intracellulaires, dont les voies I κ B kinase (IKK)-NF- κ B et des MAPK (mitogen-activated protein kinases), ERK1 et 2 (extracellular signal-regulated kinases), JNK (c-Jun N-terminal kinase) et p38 (Guha & Mackman, 2001). Dans le vaisseau, les microparticules contribueraient à l'amplification de cette réponse inflammatoire au LPS par différentes voies. En effet, chez les animaux traités par du LPS, les concentrations en microparticules leucocytaires circulantes sont augmentées et il a été démontré *in vitro* que les microparticules leucocytaires favorisent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-6) par les cellules endothéliales (Mesri & Altieri, 1999). Les mécanismes d'amplification de la réponse monocytaire pourraient être relayés par le récepteur P2X₇. En effet, l'activation du récepteur P2X₇ induit un influx calcique rapide et majeur, stimulant la translocation de la PhtdSer sur le feuillet externe de la membrane cellulaire et aboutissant à la vésiculation membranaire (Dubyak, 2012). De plus, suite à un stimulus pro-inflammatoire initial, MacKenzie *et al.* ont montré que l'activation du récepteur P2X₇ serait à l'origine de l'exportation d'IL-1 β mature dans les microparticules monocytaires. L'IL-1 β délivrée par les microparticules a une action paracrine sur les récepteurs de l'IL-1 des cellules avoisinantes, favorisant la libération de cytokines et contribuant ainsi à une première boucle d'amplification de la réponse inflammatoire (Dubyak, 2012 ; MacKenzie *et al.*, 2001). En effet, l'activation endothéliale par les monocytes est dépendante de la concentration en IL-1 β et promeut la synthèse et l'expression de molécules d'adhésion (ICAM-1 : intercellular adhesion molecule-1, VCAM-1 : vascular cell adhesion molecule-1) et de E-sélectine, favorisant l'adhésion leucocytaire (Jia *et al.*, 2011).

La contribution des récepteurs P2X₇ à la réponse inflammatoire est multiple et les interactions avec les MPs restent encore à explorer, notamment au cours de l'extravasation des lymphocytes T vers les sites d'inflammation, mécanisme dans lequel les microparticules ont été impliquées [30] (Qu & Dubyak, 2009). De manière intéressante, il a été proposé que les plaquettes, qui possèdent les récepteurs TLR4, soient capables sous l'effet du LPS d'exporter de l'IL-1 β dans les microparticules et de participer au couplage inflammation- thrombose en favorisant la production d'ICAM-1 par les cellules endothéliales (Brown & McIntyre, 2011).

Enfin, les MPs peuvent contenir d'autres protéines impliquées dans les processus inflammatoires, notamment celles constitutives de l'inflammasome, une plateforme fonctionnelle de la réponse innée qui est activée par la reconnaissance de motifs moléculaires particuliers des pathogènes. L'activation de l'inflammasome déclenche la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, favorise la maturation de l'IL-1 β et peut conduire à la mort cellulaire par pyroptose. La composition de l'inflammasome, essentiellement décrit dans les cellules granulocytaires, varie avec le signal inducteur (LPS, cristaux d'acide urique, composantes virales et bactériennes diverses). Parmi les éléments constitutifs de cet assemblage oligomérique, il y a des récepteurs comme NLRP3 (nucleotide-binding domain, leucine rich repeat containing protein) ou certaines caspases pro-inflammatoires comme les caspases 5 et 1 (Furlan-Freguia *et al*, 2011).

EFFETS DES MICROPARTICULES SUR L'HOMÉOSTASIE VASCULAIRE

Les microparticules, en tant que bio-effecteurs, pourraient intervenir dans la genèse de la dysfonction cardio-circulatoire caractérisant le choc septique, notamment en agissant sur la régulation du tonus vasculaire. Les microparticules endothéliales circulantes, dont la concentration est peu importante à l'état physiologique, sont augmentées dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires (syndrome coronarien aigu, hypertension artérielle sévère, syndrome métabolique, insuffisance rénale terminale, diabète de type 1...); elles constituent un marqueur d'activation, voire d'apoptose, mais aussi de dysfonction endothéliale (Densmore *et al*, 2006 ; Chironi *et al*, 2010). Dans le compartiment vasculaire, les microparticules circulantes sont capables d'agir à la fois sur les cellules endothéliales qui constituent une surface d'interaction importante (Boulanger *et al*, 2001 ; Martin *et al*, 2004 ; Tesse *et al*, 2005) et parfois sur les cellules musculaires lisses (Tesse *et al*, 2005 ; Pfister, 2004) avec une action possible sur la réactivité vasculaire, notamment via une régulation de la production cellulaire de monoxyde d'azote (NO), vasodilatateur puissant, antiagrégant plaquettaire et facteur de survie essentiel pour les cellules endothéliales (Martinez *et al*, 2005). Au cours de la prééclampsie, les concentrations circulantes des microparticules lymphocytaires et granulocytaires sont augmentées (VanWijk *et al*, 2003). Ces dernières

sont capables d'induire une hyporéactivité vasculaire chez les souris gestantes, via une augmentation de l'expression de la NO synthétase inductible (iNOS) avec surproduction de NO et réduction de la contraction vasculaire, qui va contrecarrer l'augmentation de la synthèse de métabolites vasoconstricteurs dérivant de la cyclo-oxygénase 2 (COX-2) (Meziani *et al*, 2008 ; Tesse *et al*, 2007). Chez les patients diabétiques, coronariens ou insuffisants rénaux, il a également été montré que les microparticules diminuent la biodisponibilité du NO et sont à l'origine d'une dysfonction endothéliale et d'une altération de la relaxation vasculaire NO-dépendante (Boulanger *et al*, 2001), par diminution et/ou inhibition de la NO synthétase endothéliale (eNOS) (Tesse *et al*, 2005 ; Amabile *et al*, 2005).

Certaines microparticules pourraient également promouvoir l'importante vasoplégie observée au cours du sepsis (Mortaza *et al*, 2009 ; Morel *et al*, 2006a). L'inoculation des microparticules « septiques » chez le rat sain entraîne une diminution significative de la pression artérielle moyenne sans variation significative des débits carotidien et portal. Le transfert d'acide arachidonique pourrait induire l'expression de la COX-2 et la production de prostacycline impliquée dans la vasodilatation et l'inhibition de l'activation plaquettaire (Barry *et al*, 1999). Plus récemment, il a été montré que des microparticules d'origine lymphocytaire étaient capables d'induire une hyporéactivité vasculaire en induisant la synthèse, dans la média, de iNOS et de COX-2 (Martin *et al*, 2004).

De plus, certaines microparticules plaquettaires, porteuses d'anion superoxyde pourraient être impliquées dans la dysfonction endothéliale en augmentant le stress oxydant et en diminuant la biodisponibilité du NO (Soriano *et al*, 2005 ; Brodsky *et al*, 2004). Janiszewski *et al*. ont en effet montré que les microparticules plaquettaires induisent la génération d'espèces réactives de l'oxygène par les cellules endothéliales et musculaires lisses et produisent elles-mêmes de l'anion superoxyde, *via* la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase (Janiszewski *et al*, 2004). Ces espèces réactives de l'oxygène pourraient par ailleurs être directement impliquées dans l'induction de l'apoptose cellulaire au niveau vasculaire.

Enfin, Pfister *et al.* ont montré que les microparticules d'origine plaquettaire produisent du thromboxane- A_2 , métabolite vasoconstricteur dérivé de l'acide arachidonique et puissant vasoconstricteur, et peuvent ainsi participer à la régulation du tonus vasculaire (Pfister, 2004).

EFFETS DES MICROPARTICULES SUR LA COAGULATION

Les infections graves, comme le choc septique, sont caractérisées par une activation de la coagulation, avec globalement un état procoagulant et anti-fibrinolytique. On peut observer la formation de thrombi dans la microcirculation en cas de dérégulation, aggravant ainsi les dysfonctions viscérales par défaut de perfusion. Cet état procoagulant est lié à une activation cellulaire intense *via* l'induction de cytokines pro-inflammatoires et des modifications phénotypiques de l'endothélium vasculaire, qui prend alors un caractère pro-adhésif, pro-inflammatoire et pro-thrombotique (Annane *et al.*, 2005). En outre, les polyphosphates bactériens favoriseraient une activation de la phase « contact » de la coagulation et une inhibition de la fibrinolyse réactionnelle, pouvant prendre la forme d'une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) et se traduisant sur le plan biologique par une thrombopénie, une consommation des facteurs et l'augmentation des D-dimères. De récentes études montrent que la survenue d'une CIVD dans un choc septique est précurseur de syndrome de défaillance multiviscérale (Dhainaut *et al.*, 2005).

Au cours du sepsis, les processus hémostatiques sont cependant nécessaires à la défense de l'hôte contre l'agent pathogène et seule une production excessive de thrombine peut mener à la dysfonction viscérale. L'activation des réactions de coagulation au cours du sepsis permet de limiter la croissance et la dissémination de l'agent pathogène, constituant ainsi un mécanisme de défense au même titre que l'immunité innée ou l'activation du complément (Delabranche *et al.*, 2012). Les microparticules qui augmentent la surface d'interaction avec les éléments circulants ont alors un effet bénéfique, en favorisant les liaisons récepteurs/ligands et le recrutement des cellules (plaquettes, monocytes, neutrophiles) au site initial de la lésion vasculaire et de la réaction inflammatoire locale.

Les microparticules ont un potentiel procoagulant intrinsèque du fait de PhtdSer, constituant une surface catalytique pour l'assemblage des facteurs de la coagulation vitamine K-dépendants, démontré dans différentes pathologies (Dignat-George *et al*, 2004). Dans la coagulopathie du choc septique, le TF porté par les microparticules monocytaires constituerait une deuxième entité procoagulante portée par les microparticules et jouerait donc un rôle clé dans l'initiation et la propagation de la cascade de la coagulation (Lane *et al*, 2005). Il a été montré que les microparticules monocytaires participent à la dissémination d'un potentiel procoagulant en exprimant le TF à leur surface (Nieuwland *et al*, 2000 ; Morel *et al*, 2006a ; Geisbert *et al*, 2003 ; Satta *et al*, 1994). La génération de thrombine est possible à la surface des microparticules porteuses du TF de façon indépendante du FXII (phase contact). Ces microparticules, et leur capacité à promouvoir la génération de thrombine, ont été rapportées dans l'infection au méningocoque, mais aussi après injection de LPS chez des individus sains. Dans ce dernier cas, une augmentation forte et transitoire des concentrations en microparticules porteuses du TF est observée trois à quatre heures après l'injection de LPS et s'accompagne d'une monocytopenie transitoire, suggérant que les microparticules constitueraient alors le support principal de la réponse procoagulante dépendante du FT (Nieuwland *et al*, 2000 ; Morel, 2006a). Enfin, dans un modèle de thrombose carotidienne, les souris invalidées pour les récepteurs P2X₇ sont protégées de la thrombose, tandis que l'activation des récepteurs conduit à l'émission de microparticules porteuses de FT actif chez la souris sauvage, soulignant l'importance de cette voie dans la génération d'un état procoagulant indépendamment de l'infection (Furlan-Freguia *et al*, 2011).

Au cours du sepsis, les microparticules plaquettaires favoriseraient une génération accrue de thrombine dépendant, elle, de l'activation du FXI (plaquettaire) par la thrombine et du FXII activé par les polyphosphates bactériens (Perez-Casal *et al*, 2005 ; Meziani *et al*, 2008). Ces dernières réactions sont indépendantes du FT, car elles restent possibles après déplétion en FVII, confirmant ainsi le rôle de la phase contact en pathologie, mais pas en physiologie (van der Meijden *et al*, 2012). On peut noter également que les microparticules endothéliales circulantes contribuent à la formation de larges agrégats plaquettaires dans certaines atteintes cardiovasculaires (Héloire *et al*, 2003). Enfin les microparticules,

qu'elles soient endothéliales ou leucocytaires, participeraient au couplage entre inflammation et thrombose (Leroyer, 2010 ; Distler *et al*, 2006).

Les microparticules sont également impliquées dans la régulation de la coagulation et de la fibrinolyse, notamment en exprimant un activateur du plasminogène de type urokinase et son récepteur ; leur rôle dans le choc septique reste à définir (Dejouvenel *et al*, 2010). Enfin, les microparticules monocytaires et endothéliales portent à leur surface de la thrombomoduline nécessaire à l'activation de la protéine C par la thrombine et le récepteur de la protéine C, EPCR (Satta *et al*, 1997). Bien que les microparticules monocytaires induites par le LPS soient globalement procoagulantes en raison du FT qui prédomine sur l'activité de la thrombomoduline (Satta *et al*, 1997), les capacités cytoprotectrices des microparticules endothéliales et monocytaires dépendront de la loi d'action de masse, c'est-à-dire de la quantité de microparticules nécessaires au déclenchement d'une réaction pro- ou anticoagulante dans la cellule cible (Delabranche *et al*, 2010). On peut par exemple noter que les microparticules de neutrophiles participent à la protection endothéliale en délivrant de l'annexine A1, une protéine cytoplasmique anti- inflammatoire (Morel *et al*, 2009 ; Dalli *et al*, 2010 ; Dalli *et al*, 2013).

LES MICROPARTICULES : MARQUEURS PRONOSTIQUES ?

De nombreuses études cliniques cherchent à définir l'intérêt des microparticules en tant que marqueur d'une altération cellulaire, elle-même caractéristique d'un état pathologique. Cette approche est fondée sur l'idée que les microparticules circulantes reflètent le stress des cellules vasculaires, mais aussi une atteinte tissulaire lorsqu'elles sont émises par les vaisseaux de l'organe lésé dans la circulation systémique. Ainsi, leur détection précoce permettrait un meilleur « monitoring » des patients lorsque les méthodes diagnostiques plus invasives ne sont pas applicables. Les concentrations plasmatiques des microparticules ont initialement été explorées dans des pathologies cardiovasculaires ou métaboliques associées à des désordres thrombotiques ou à des atteintes tissulaires (infarctus du myocarde, rejet de greffe, athéro-thrombose, diabète, etc.).

Plusieurs équipes ont montré que les microparticules peuvent constituer un marqueur pronostique en termes de morbi-mortalité. Cela est plus particulièrement démontré pour les microparticules endothéliales qui pourraient représenter un marqueur de dysfonction endothéliale dans les pathologies cardiovasculaires. Dans l'hypertension artérielle pulmonaire par exemple, Amabile *et al.* ont mis en évidence que les microparticules endothéliales porteuses de E-sélectine (CD62E) constituent un marqueur pronostique de mortalité à un an et pourraient ainsi permettre de stratifier les patients selon leur gravité (Amabile *et al.*, 2009). De même, chez le patient présentant une insuffisance rénale chronique au stade terminal, le taux de microparticules endothéliales est corrélé au risque de survenue d'événement cardiovasculaire sévère (Amabile *et al.*, 2012). Elles permettraient également d'évaluer le risque cardiovasculaire chez les insuffisants cardiaques chroniques (Nozaki *et al.*, 2010) et les insuffisants coronariens (Sinning *et al.*, 2011), ou encore le risque d'accident vasculaire ischémique chez les patients présentant des facteurs de risque cardiovasculaire (Jung *et al.*, 2011).

Au cours des maladies infectieuses, les cytokines et chémokines ou les endotoxines bactériennes, comme le LPS, sont capables d'induire la génération de microparticules spécifiques qui pourraient potentiellement jouer un rôle clé dans le processus d'interaction hôte-pathogène (Delabranche *et al.*, 2012). Par ce biais, elles pourraient probablement influencer le pronostic de la pathologie. Dans le sepsis, les microparticules n'ont cependant pas encore été identifiées comme marqueur pronostique.

LES MICROPARTICULES DANS LE SEPSIS : CIBLES THÉRAPEUTIQUES ?

Les microparticules sont de véritables médiateurs de la communication intercellulaire et participent à de nombreuses boucles d'amplification de la réponse vasculaire. À ce titre, elles apparaissent comme des cibles thérapeutiques potentielles dans différentes situations pathologiques, mais aussi comme des marqueurs pour le suivi des patients et de leur traitement. Les taux plasmatiques et les profils phénotypiques des microparticules peuvent être utilisés comme des marqueurs diagnostiques ou pronostiques dans certaines pathologies (Baron *et al.*, 2012). La concentration circulante de microparticules

totales n'est pas toujours modifiée en situation pathologique, mais l'augmentation d'un type particulier de micro- particules peut se révéler spécifique d'une atteinte cellulaire ou tissulaire donnée, et de ce fait, constituer par exemple un marqueur d'efficacité de traitement. Ainsi, il a été montré qu'un traitement par statines chez des patients diabétiques ou souffrant d'artériopathie permet de diminuer le taux de microparticules plaquettaires porteuses de protéines d'adhésion (GPIIIa, P-sélectine) ou procoagulantes (FII) (Sommeijer *et al*, 2006 ; Mobarrez *et al*, 2011). De même, un traitement par glitazone, un ligand de PPAR- γ , dans le syndrome métabolique, diminue le taux de microparticules endothéliales (Esposito *et al*, 2006). Enfin, in-vitro, un traitement par glitazone serait capable de moduler l'effet des microparticules monocytaires, en diminuant leurs effets pro-inflammatoires (production d'espèces réactives de l'oxygène, libération de cytokines et activation du NF- κ B) (Bardelli *et al*, 2012). De nombreux essais cliniques sont actuellement en cours, afin d'évaluer les microparticules comme biomarqueur de l'efficacité de différents traitements (Martinez *et al*, 2011).

Dans un autre domaine, en réponse à un traitement par protéine C activée recombinante humaine, des microparticules porteuses du récepteur endothélial de la protéine C, l'EPCR, sont générées, véhiculant un potentiel anticoagulant, capable de retarder la formation de thrombine, et également anti-apoptotique (Perez-Casal *et al*, 2005). Ces microparticules pourraient avoir un effet bénéfique dans le choc septique en diminuant la réponse inflammatoire. La protéine C activée est en effet une enzyme anticoagulante et profibrinolytique puissante, capable d'inactiver Fva et FVIIIa et le TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor) (Sennoun *et al*, 2009a ; Sennoun *et al*, 2009b ; Levy *et al*, 2010 ; Perez-Casal *et al*, 2011), sans avoir apporté la preuve de son bénéfice sur la mortalité des patients en choc septique (Mosnier *et al*, 2007).

L'utilisation des microparticules comme agent pharmacologique reste un champ d'investigation ouvert. La difficulté réside à la fois dans les connaissances restreintes des mécanismes de clairance et des processus de régulation des concentrations circulantes des microparticules (Rautou & Mackman, 2012). Un traitement pharmacologique ayant pour cible les microparticules pourra intervenir sur la capacité des cellules à émettre des microparticules pour tenter de restreindre la dissémination du message biologique qu'elles véhiculent. Martinez *et al*. ont par exemple mis en évidence que les microparticules porteuses de la

protéine « Sonic hedgehog » stimulent la néovascularisation des processus tumoraux. Des microparticules issues de cellules déficientes en cette protéine pourraient constituer un leurre noyant le message délétère véhiculé par les microparticules endogènes aux cellules avoisinantes, ralentissant ainsi le développement tumoral (Martinez *et al*, 2006 ; Martinez *et al*, 2011).

Plusieurs médiateurs de réponse cellulaire peuvent contribuer au remodelage de la membrane plasmique et à la libération des microparticules incluant différents transporteurs et canaux calciques, l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale ou des processus caspase-dépendants (Mause & Weber, 2010). Ces voies peuvent constituer des cibles pharmacologiques et donc moduler l'effet des microparticules dans la coagulation, le remodelage vasculaire et la fibrinolyse, voire le message qu'elles disséminent sous forme d'ARNm ou de protéines (Zernecke *et al*, 2009).

Enfin, les microparticules en tant qu'entités circulantes sont capables de véhiculer des protéines et ligands solubles. Ce paramètre doit être pris en compte à la fois pour la mesure et la caractérisation des microparticules circulantes, mais aussi pour déterminer l'intérêt et les doses efficaces d'un traitement ciblant les microparticules.

CONCLUSION

Au cours du sepsis, l'interaction hôte-pathogène est à l'origine de la génération de microparticules par vésiculation membranaire avec un phénotype spécifique. Les microparticules constituent un pool de messagers intercellulaires et par ce biais pourraient jouer un rôle dans la physiopathologie du sepsis et du choc septique. Elles sont notamment capables d'induire une hypotension artérielle, et de disséminer un potentiel procoagulant. Leur rôle dans la physiopathologie de certaines maladies infectieuses, en fonction de l'agent pathogène impliqué, reste peu exploré. Elles constituent enfin un marqueur pronostique dans de nombreuses pathologies et une cible thérapeutique potentielle qui mérite d'être explorée, particulièrement

dans le sepsis où elles cumulent des effets pro-inflammatoires, procoagulants et pro-apoptotiques (Figure 16).

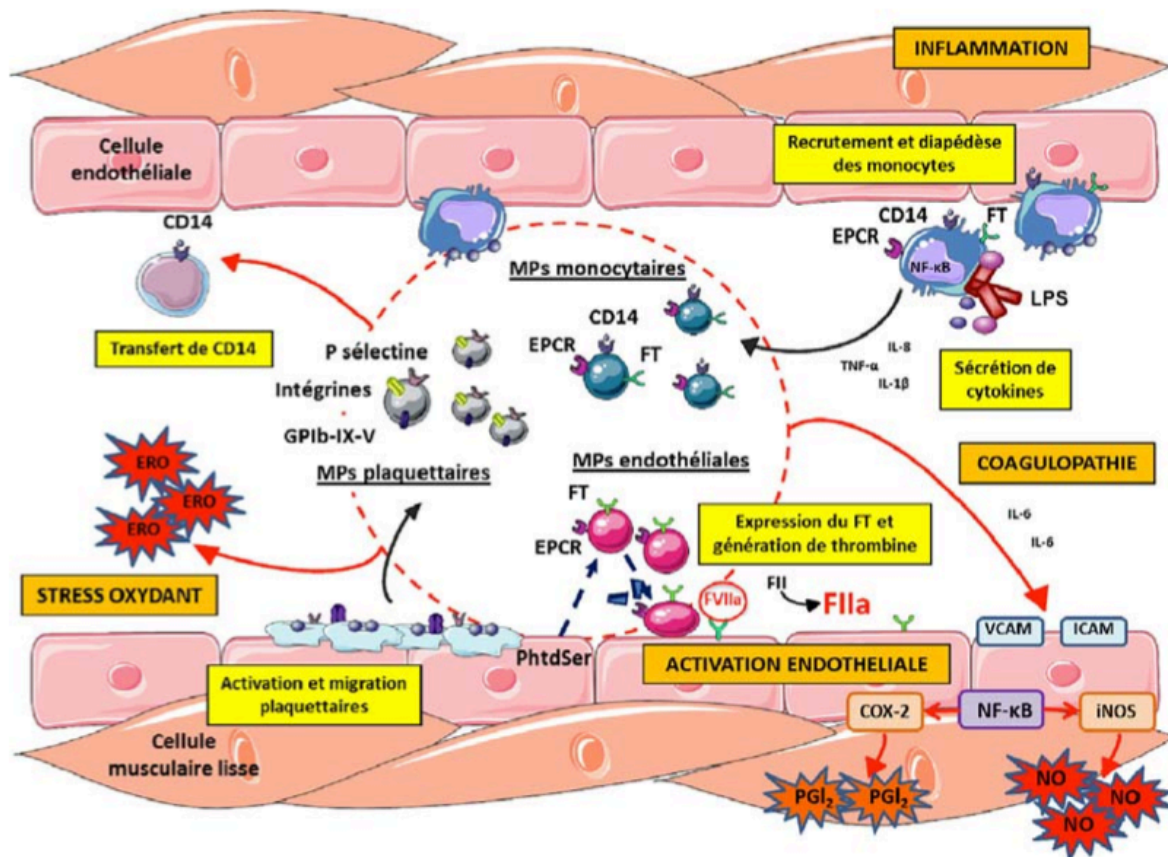


Figure 16. Implications des MPs dans le choc septique.

Au cours du choc septique, l'interaction hôte-pathogène est responsable de la génération de microparticules procoagulantes d'origine endothéliale, plaquettaire, érythrocytaire et granulocytaire. Ces microparticules interviennent dans la régulation de l'homéostasie vasculaire. Il a été démontré dans différentes pathologies inflammatoires que les microparticules sont à l'origine d'une dysfonction endothéliale et d'une altération de la relaxation vasculaire NO-dépendante, induisent l'expression de la de iNOS et de la COX-2 et la production de prostacycline, impliquée dans la vasodilatation et l'inhibition de l'activation plaquettaire, et l'inhibition de la eNOS. Les microparticules porteuses d'anion superoxyde pourraient également augmenter le stress oxydant et diminuer la biodisponibilité du NO en induisant la génération d'espèces réactives de l'oxygène par les cellules endothéliales et musculaires lisses, et en produisant elles-mêmes de l'anion superoxyde. De plus, les microparticules jouent un rôle clé dans la régulation de la coagulation et pourraient intervenir dans la coagulopathie du choc septique : en exprimant la PtdSer à leur surface, les microparticules permettent l'assemblage des facteurs de la coagulation vitamine K-dépendants et la génération de thrombine ; les microparticules monocytaires et endothéliales portent à leur surface de la thrombomoduline nécessaire à l'activation de la protéine C par la thrombine et le récepteur de la protéine C, EPCR. Enfin, les microparticules monocytaires participent à la dissémination d'un potentiel procoagulant en exprimant le FT à leur surface. CD14 : cluster de différenciation 14 ; COX-2 : cyclo-oxygénase 2 ; EPCR : endothelial protéine C récepteur, récepteur de la protéine C ; ERO : espèces réactives de l'oxygène ; FII : prothrombine ; FIIa : thrombine ; FT : facteur tissulaire ; FVIIa : facteur VII activé ; GPIIb : glycoprotéine IIb ; ICAM-1 : intercellular adhesion molecule-1, molécule d'adhésion intercellulaire 1 ; IL-1 β : interleukine-1 bêta ; IL-6 : interleukine-6 ; IL-8 : interleukine-8 ; iNOS : NO synthétase inducible ; LPS : lipopolysaccharides ; MPs : microparticules ; NF- κ B : facteur de transcription nucléaire-kappa B ; NO : monoxyde d'azote ; PGI₂ : prostacycline ; PtdSer : phosphatidylsérine ; TNF- α : facteur de nécrose tumorale-alpha ; VCAM-1 : vascular cell adhesion molecule-1, molécule d'adhésion cellulaire vasculaire 1.



OBJECTIFS

OBJECTIFS

Le premier travail, réalisé au laboratoire, a visé à développer un modèle d'étude des propriétés effectrices des MPs monocytaires dans des conditions de stress induit par le LPS. Ce travail complète les observations du Pr Meziani portant sur l'effet hémodynamique des microparticules générées pendant un choc septique chez le rat (Mortaza *et al*, 2008). L'hypothèse était que les MPs étaient capables de transférer le récepteur du LPS (CD14/TLR4) sous sa forme fonctionnelle à des cellules cibles, monocytaires ou éventuellement dépourvues de ce récepteur, et ainsi de leur conférer une aptitude à répondre au LPS. Ainsi, elles pourraient être considérées comme des effecteurs vasculaires ayant des effets hémodynamiques durant le choc septique. Les résultats ont de plus montré que les MPs sont dans les conditions d'endotoxémie capables de mobiliser la voie NF- κ B dans les cellules cibles.

Le second travail a consisté à étudier le rôle d'un modulateur pharmacologique de l'hémostase et de l'inflammation endothéliale, la protéine C activée durant un choc septique polymicrobien par ligature-perforation caecale chez le rat réanimé. Il a confirmé l'impact de choc septique sur les cellules vasculaires reflété par une modification du phénotype des microparticules circulantes chez les rats traités. De plus il a permis d'évaluer l'effet hémodynamique de ces MPs injectées à des rats naïfs.

Enfin, les travaux de recherche clinique ont consisté à approcher l'atteinte vasculaire par la quantification et le phénotypage des MPs au cours du choc septique chez l'homme. La confrontation des paramètres de l'hémostase et des variations des MPs a été pratiquée de manière approfondie pour explorer la séquence des événements cellulaires et plasmatiques dans le développement et la résolution des mécanismes de CIVD.

TRAVAUX PERSONNELS

**Microparticles deliver CD14/TLR4 to tune monocyte and T-lymphocyte
inflammatory response: A new insight in host-response to endotoxin**

(Microparticles tune endotoxin response)

Xavier Delabranche^{1,2,3} (MD), Julie Boisramé-Helms^{1,2,3} (MD), Asaël Berger^{1,2} (MD), Satar Mortaza⁴ (MD), Fatiha Zobairi^{2,5} (BMSc), Michel Hasselmann¹ (MD), Pierre Asfar⁴ (MD, PhD), Ferhat Meziani^{1,3} (MD, PhD), Florence Toti^{2,5} (PhD)

En préparation

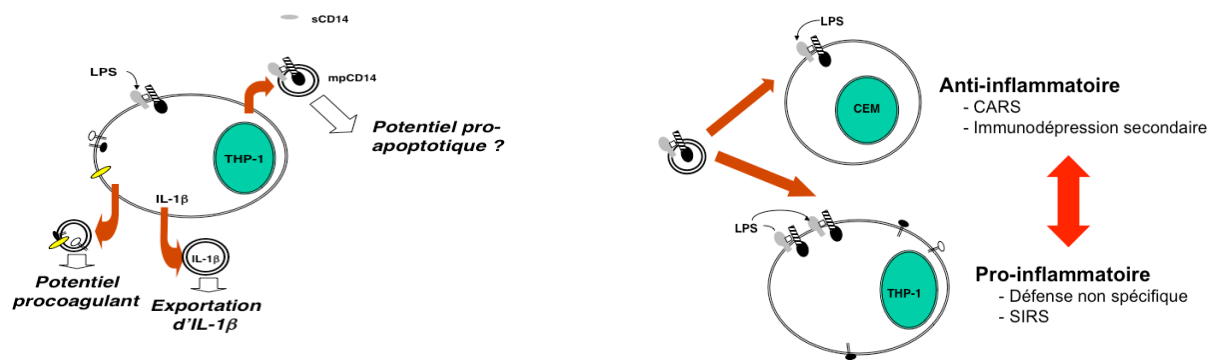
Ce premier travail expérimental a consisté en l'étude in-vitro du rôle possible des MPs dans l'amplification de la réponse au stress endotoxique. Les MPs ont été produites à partir de cellules monocytaires immortalisées, les cellules THP-1, en réponse au lipopolysaccharide (LPS) dans des conditions standardisées et l'étude de leurs propriétés effectrices dans un modèle de communication intercellulaire en système autologue (THP-1) ou sur des lymphocytes T4 immortalisés (CEM) ne possédant pas le complexe CD14/TLR4, récepteur du LPS.

Dans un premier temps, les conditions de génération des MPs en réponse au LPS ont été établies. La concentration de LPS [15 µg/mL] et la durée d'incubation (18 heures) ont été dictées par la recherche d'une optimisation de la génération des MPs tout en veillant à ne pas induire d'apoptose massive pouvant conduire à la nécrose. Le transfert de CD14 *via* ces MPs à des monocytes préalablement traités par un anticorps bloquant a été obtenu ; ce transfert est fonctionnel car il permettait de restaurer une réponse au LPS alors que la forme soluble de CD14 (sCD14) n'avait aucune efficacité. Ce transfert était inhibé par un traitement préalable des cellules cibles par l'annexine-5 (Anx-A5). Les MPs par elles-mêmes n'étaient pas capable d'induire une réponse apoptotique des cellules cibles, mais potentialisaient l'effet du LPS. L'IL-1β, sécrétée sous forme microparticulaire (MacKenzie *et al*, 2001), avait un effet amplificateur, mais à un degré moindre que les MPs permettant d'infirmer une contribution massive de l'IL-1β dans cette amplification.

Pour confirmer la fonctionnalité du transfert de CD14/TLR4 j'ai utilisé des cellules rapportrices particulières transfectées avec un gène rapporteur de l'activation de NF-κB, le gène de la phosphatase alcaline embryonnaire sécrétoire (SEAP) elle-même détectable dans le surnageant par une réaction colorimétrique. L'absence d'effet inducteur propre des MPs ou de la forme soluble de CD14 en l'absence de LPS, a été confirmée grâce aux cellules exprimant CD14/TLR4 (HEK-hTLR4TM). De même, l'absence de génération de phosphatase par des cellules n'exprimant pas CD14/TLR4 (HEK-Null2TM) traitées par le LPS ou les MPs seules indiquait que les MPs ne délivraient aucun message inflammatoire. Par contre, l'activation de NF-κB en réponse au LPS était observable si les cellules HEK-Null2TM avaient été préalablement mises en contact de MPs démontrant que c'est le transfert du récepteur via les MPs qui a permis de déclencher la voie de signalisation en réponse au LPS

De façon similaire, le transfert de CD14 sur des lymphocytes T4 (CEM) n'exprimant pas CD14/TLR4 a été détecté par immunomarquage ainsi que la possibilité d'induire une apoptose modeste en réponse au LPS via ces MPs. Des expériences complémentaires sont actuellement en cours pour confirmer ces résultats par mise en évidence par immuno-empreinte de l'expression de phospho-I- κ B et de NF- κ B dans les cellules THP-1 et CEM en réponse aux MPs et au LPS.

Les MPs émises par le monocyte en réponse au LPS peuvent donc disséminer un pouvoir procoagulant par l'intermédiaire de MPs porteuses de facteur tissulaire, permettre la sécrétion de l'IL-1 β sous forme microparticulaire mais aussi libérer des MPs porteuses de CD14. Celles-ci sont capables d'avoir une action amplificatrice et pro-inflammatoire (monocytes), anti-inflammatoire (lymphocytes) et inhibitrice (capture du LPS circulant).



Ces résultats ont fait l'objet d'une communication affichée au XXIIIème congrès de l'International Society on Thrombosis and Haemostasis (Kyoto, 23 au 28 juillet 2011) : [Delabranche X](#), Boisramé-Helms J, Berger A, Haas E, Zobairi F, Hasselmann M, Meziani F, Toti F. Microparticles (MPs) convey CD14 from monocytes to leukocytes and amplify lipopolysaccharide (LPS)-induced apoptosis in cellular crosstalk models. XXIIIrd congress of the International Society for Thrombosis and Haemostasis, Kyoto 23-28 July 2011, *J Thromb Haemost* 2011.

Microparticles deliver CD14/TLR4 to tune monocyte and T-lymphocyte inflammatory response: A new insight in host-response to endotoxin

(Microparticles tune endotoxin response)

Xavier Delabranche^{1,2,3} (MD), Julie Boisramé-Helms^{1,2,3} (MD), Asaël Berger^{1,2} (MD), Satar Mortaza⁴ (MD), Fatiha Zobairi^{2,5} (BMSc), Michel Hasselmann¹ (MD), Pierre Asfar⁴ (MD, PhD), Ferhat Meziani^{1,3} (MD, PhD), Florence Toti^{2,5} (PhD)

¹Service de Réanimation Médicale, Nouvel Hôpital Civil, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg (France)

²Institut d'Immunologie et d'Hématologie, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, Strasbourg (France)

³Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, UMR 7213 CNRS, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, Illkirch (France)

⁴Laboratoire HIFIH UPRES EA 3859 ; IFR 132 Université d'Angers. Angers (France)

⁵INSERM U770, Faculté de Médecine, Université Paris-Sud 11. Le Kremlin Bicêtre (France)

Abstract: 150 words

Text: 3487 words

Correspondence and requests for reprints should be addressed to:

Ferhat Meziani

Service de Réanimation Médicale – Nouvel Hôpital Civil

1, place de l’Hôpital

F-67091 STRASBOURG cedex (France)

Phone : +33 (0) 369 550 434 ; Fax : +33 (0) 369 551 859

E-mail : ferhat.meziani@chru-strasbourg.fr

Disclosure of conflict of interest:

The authors state that they have no conflict of interest

Sources of support :

This work was supported in part by the Association pour le Développement de la Recherche et de l’Enseignement en Réanimation (Strasbourg, France).

This work was presented, in part, at the 23rd congress of the International Society of Thrombosis and Haemostasis, Kyōtō (Japan), July 2011 and at the 40th congress of the Société de Réanimation de Langue Française, Paris-la Défense (France), Janvier 2012

Abstract

Microparticles (MPs) are systemic bioactive cell stress markers. We designed *in vivo* and *in vitro* experimental endotoxinic models to assess the role of MPs. Thirty Wistar rats were challenged or not with LPS; endotoxemic and control pools of plasma MPs were isolated. After inoculation to naïve rats, only endotoxemic but not control MPs induced hypotension. *In vitro*, THP-1 cells were stimulated by LPS to generate MPs (MP_{SC}). MP_{SC} amplified LPS-induced apoptosis and restored CD14 labeling in THP-1 pre-treated with anti-CD14 blocking antibody. MP_{SC} alone did not promote NF-κB activation in HEK-Null2™ reporting cells deprived of CD14/MD2/TLR4 receptors. Strikingly, LPS prompted NF-κB activation in MP_{SC}-treated cells demonstrating that MP_{SC} delivered functional LPS sensors. The transfer was also evidenced in lymphocytic CEM cells that do not express CD14/TLR4. Our findings show that MPs generated after LPS challenge deliver CD14/TLR4 to tune monocyte and T-lymphocyte inflammatory response and play a detrimental hemodynamic effects.

Key words:

Microparticles. Endotoxin. CD14/TLR4. Apoptosis. Inflammation. HEK-Blue™ reporting cells.

Introduction

Lipopolysaccharide-induced inflammatory response occurs as one of host-defense mechanisms during gram-negative infection. Sepsis evolves to septic shock when disequilibrium supervenes in the control of the inflammatory response [1]. In plasma, LPS is conveyed to its cellular receptors by the LPS binding protein (LBP) [2]. LPS-LBP complexes trigger CD14, a 55 kDa glycerophosphoinosityl- (GPI)-anchored glycoprotein expressed by myeloid cells. Expression of CD14 and of its membrane signaling partner, toll-like receptor 4 (TLR4), on neutrophils is enhanced during sepsis culminating in CD14 exposure in septic shock patients [3]. In monocytes, TLR4 and the membrane MD-2 adaptor protein enable CD14-mediated LPS signaling, secretion of pro-inflammatory cytokines, expression of tissue factor (TF) and apoptosis [4, 5]. CD14/MD-2/TLR4 and P2X₇, an occasional receptor to LPS, are also involved in IL-1 β synthesis and maturation by caspase 3 [6].

Microparticles (MPs) are plasma membrane submicron fragments released from stressed cells following membrane remodeling with lipid exchange between inner and outer leaflet. They constitute reliable indicators of cell apoptosis and stress in various pathophysiological conditions [7, 8] and have been demonstrated to be quantitative markers [9, 10]. Circulating MPs constitute a dynamic pool of bioactive effectors of various cell origins and properties, albeit at times controversial, but generally associated with pro-inflammatory and pro-apoptotic cell response in cardiovascular and degenerative disorders [11]. Indeed, MPs may disseminate biological signals to target cells through the delivery of membrane or embedded moieties. For instance, leukocyte-derived MPs may act as inflammatory mediators when circulating at high concentration [12]. In sepsis, the cellular origins as well as levels of MPs have been a source of debate [13, 14]. For instance, MPs bearing TF from LPS-stimulated monocytes promote TF and IL-6 up-regulation in endothelial cells [15, 16] and convey mature IL-1 β which is rapidly released through secondary P2X₇ receptor stimulation [17].

We recently demonstrated that MPs can play a detrimental hemodynamic effect during experimental peritonitis-induced shock in rats, pointing at a possible vascular function targeted by MPs [18]. Indeed, depending on their cellular origin, MPs modulate vascular tone through different pathways [19]. Interestingly, MPs from lymphocytes impair endothelium-dependent relaxation in small conductance arteries while inducing vascular hyporeactivity through Fas-Fas ligand mediated NF- κ B activation in smooth muscle cells [20].

In the present work, we aimed to assess the *in vivo* and *in vitro* role of MPs generated during LPS challenge in monitored rats and in cellular crosstalk models. In one side *in vivo* experiments were designed to examine the hemodynamic effect of circulating MPs generated during endotoxemic shock. In the other side, *in vitro* experiments were designed to investigate monocyte MPs as modulators of pro-inflammatory and pro-apoptotic responses in bystander cells and as eventual shuttles contributing to TLR4-mediated signal in the crosstalk between monocytes and lymphocytes. Data obtained suggest a specific hypotensive action of MPs in endotoxemic rats and that MPs from LPS-treated monocytes elicit enhanced apoptosis and NF- κ B signaling in target cells through the transfer of functional LPS sensors.

Material and methods

Material and reagents

Cell culture reagents and media were from Bio-Whittaker (Walkerville, MD, USA). Fetal calf serum (FCS), certified endotoxin-free by the limulus amoebocyte lysate test, was from GIBCO-Life Technologies (Cergy-Pontoise, France). Lipopolysaccharide (LPS, *E. coli* serotype O127:B7), phospholipids and streptavidin were from Sigma-Aldrich (L'isle d'Abeau, Chesne, France). IL-1 β was from Calbiochem (San Diego, CA, USA). Monoclonal anti-CD14 antibodies, recombinant soluble CD14 and LBP were from R&D System[®] (Abingdon, UK). Human serum albumin (©) was provided by LFB (Lille, France). Antibodies and control immunoglobulins were from Beckman-Coulter (Brea, CA, USA), Jackson (Suffolk, UK) and Invivogen (Toulouse, France). HEK-Blue Null2[™] and hTLR4[™] cells were from Invivogen.

Animals

The study was performed with the approval of the French Agriculture Office in conformity with the European legislation for research involving animals. Male Wistar rats (234 ± 35 g), subjected to non-lethal intraperitoneal (*ip*) injection of LPS (30 mg/kg) were used in this study. These animals developed endotoxemic shock (confirmed by measuring low mean arterial blood pressure) within 16 hours after LPS injection, compared to control rats *ip* injected with vehicle. Microparticles were collected and two different pools of concentrated MPs, endotoxemic (termed E-MPs) and control (C-MPs), were constituted. For the second phase of the experiment, two groups of 15 naïve rats were administered an intravenous infusion of similar concentrations of MPs from the two different pools (5.6 and 7.5 pmol eq. phosphatidylserine, respectively). Hemodynamic parameters were evaluated during 240 minutes. (See supplementary data).

Cell culture

THP-1 (ATCC TIB-202) human monocyte leukemia cells from the American Type Culture Collection (Rockville, MR, USA) were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% (v/v) FCS, 1 mM sodium pyruvate, 100 mM non-essential amino acids, 10 µg/mL gentamycin, 20 µM β-mercaptoethanol. CEM (ATCC CLL-119) human chronic lymphocytic T-CD4⁺ leukemic cells were cultured in X-VIVO 15 medium. THP-1 and CEM (7.5 × 10⁵ cells/mL) were challenged or not with LPS (*E. coli* serotype O127:B7) (15 µg/mL). In certain experiments, recombinant IL-1β (0.2 to 12.5 ng/mL) or recombinant soluble CD14 (sCD14) (0.1 to 9 µg/mL) was used. The upper values were chosen as they represent frequently reported concentrations in septic shock patients.

In vitro generation of microparticles from THP-1 for cross-talk experiments

THP-1 (10⁶ cells/mL) were cultured with 15 µg/mL LPS for 18 hours to generate large amounts of MPs (referred as MP_SC) and bearing CD14 adhesion molecules and high procoagulant activity [16, 21]. Cross-talk experiments were calibrated on the basis of MP_SC concentrations assessed by exposed phosphatidylserine in stock suspension. Target cells were incubated with sterile MP_SC (5 to 100 nM eq. PhtdSer) for 4 hours at 37°C. The supernatant was removed by centrifugation at 600 × g for 7 min. to eliminate unbound MP_SC and MP-targeted cells were further cultured in fresh medium for 18 h at 37°C in the presence of 15 µg/mL LPS. In certain experiments, a CD14 blocking antibody was then applied (0.5 µg/10⁶ cells) during 4 hours before crosstalk.

Isolation of microparticles

Microparticles were recovered from rat blood and cell supernatants after a double centrifugation step to remove cells and debris, centrifuged at 13,000 × g for 45 min. and

concentrated in NaCl 0.9% or sterile Hank's balanced salt solution. MPs were measured by capture onto insolubilized Annexin-5, and their phosphatidylserine (PhtdSer) content assessed by prothrombinase assay [22]. Results were standardized and expressed as nanomolar PhtdSer equivalents (nM eq. PhtdSer) for 7.5×10^5 cells by reference to a standard curve constructed with liposomes [10]. (See supplementary data)

Measurement of apoptosis

Apoptosis was assessed by flow cytometry using DNA fragmentation by propidium iodide (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) labeling in ethanol-permeabilised cells [23]. (See supplementary data)

CD14 analysis

Quantification of membrane-bound CD14 (mCD14) was achieved by flow cytometry using monoclonal antibodies. Cell labeling was assessed using an EPIC fluorescent microscope (Delascience, USA) with SpotTM software (Diagnostic instruments, Sterling Heights, MI, USA). Soluble CD14 (sCD14) was measured in cell supernatants deprived or not of MPs by centrifugation (13,000 x g for 1 hour) using commercial Quantikine[®] ELISA hCD14, R&D systems[®] (Abington, UK). A prothrombinase assay with antiCD14 antibody was performed to quantify CD14 on MPs. (See supplementary data).

Analysis of TLR4-mediated NF- κ B activation

HEK-BlueTM Serum Embryonic Alkaline Phosphatase (SEAP) reporting cell lines (Invivogen, Toulouse, France) engineered to sense TLR4-mediated NF- κ B activation were cultured in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FCS and specific antibiotics. Both HEK-Null2 deprived of TLR4 sensor and control HEK-hTLR4 cells were seeded in microplates in the presence of MPs (100 nM eq. PhtdSer) and challenged by LPS. After a 20-hour

incubation, 20 μL of cell supernatant were mixed with 180 μL of Quanti-Blue™ and incubated for 30 min. at 37°C. NF- κB activation was assessed at 650 nm and expressed as optical density (OD). (See supplementary data).

Statistic

In vitro experiments were performed at least three to twelve times. The non-parametric Kruskal-Wallis test was used for comparison of *in vitro* measurements between the groups. When a significant intergroup difference was found, subsequent Dunn post hoc tests were performed. Hemodynamic data were compared using a repeated measurements analysis for comparison of multiple paired data. Pairwise comparisons among groups were performed using a Tukey-Kramer adjustment for *p* values. All values are presented as mean \pm SD for *n* experiments, with *n* representing the number of experiments. All statistics were performed with the Statview™ software (version 5.0; SAS Institute, Cary, NC). $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Endotoxemic (E-MPs) but not control (C-MPs) microparticles decrease mean arterial pressure

Animal experiments establish a biologic plausibility of endotoxemic MPs in our animal model: All animals were alive at 240 minutes and we observed that compared to those inoculated with C-MPs, rats inoculated with E-MPs exhibited significantly decreased MAP and aortic blood flow and a significantly increased heart rate ($p < 0.05$) (Table I).

MPs_C amplify LPS-induced apoptosis in monocytes

LPS induced significant apoptosis (Figure 1A) and MP generation (1.10 ± 0.03 vs. 0.74 ± 0.05 nM eq. PhtdSer / $7.5 \cdot 10^5$ cells; $n=6$, $p < 0.05$) in THP-1 monocytes. MPs_C (5 nM eq. PhtdSer) alone were not able to induce apoptosis in the absence of LPS, thus excluding a direct transfer of significant amounts of LPS *via* MPs_C. LPS-induced apoptosis was greatly increased by MPs_C pre-treatment whereas soluble IL-1 β was significantly less efficient ($p < 0.05$) (Figure 1A). MPs-depleted THP-1 supernatants had no effect on apoptosis and do not enhance LPS response (data not shown).

MPs_C released from LPS-challenged monocytes convey bioactive CD14

The presence of CD14 on MPs released from LPS-challenged THP-1 cells was confirmed by the detection of CD14⁺-MP in supernatants (0.18 ± 0.03 nM eq. PhtdSer / $7.5 \cdot 10^5$ cells), representing 25% of total MPs_C. Cross-talk assays showed that CD14 labeling and LPS-induced apoptosis were restored by CD14⁺-MPs while sCD14 was ineffective in THP-1 cells pretreated by a CD14 blocking antibody, thus confirming the delivery of a functional CD14 sensor (Figure 1B).

MPs_C transfer functional CD14/TLR4 and induce LPS-dependent NF-κB activation in HEK-Blue™ reporting cells

NF-κB activation by LPS was established as a dose-dependent following challenge in HEK-hTLR4™ cells but not in HEK-Null2™ cells (Figure 2A). As a control, it was verified that activation was possible by TNF-α in both cell lines (0.76±0.04 OD vs. 0.13 and 0.34±0.05 OD vs. 0.06 OD respectively).

MPs_C (100 nM eq. PhtdSer) prompted NF-κB activation in HEK-hTLR4™ challenged by LPS-EK™ (0.37±0.01 OD vs. 0.27±0.02 OD; n=3, *p*<0.05). Although eliciting lower values, MP treatment restored NF-κB activity after LPS challenge in HEK-Null2™, indicating the transfer of functional CD14/TLR4 complex (0.16±0.04 OD vs. 0.06±0.01 OD; n=3, *p*<0.05) (Figure 2B).

The bioactive soluble form of CD14 is bound to MPs_C

In LPS-treated monocyte supernatants, CD14 reached 170 pg / 1 mL / 10⁶ cells corresponding to 0.24 pmol of CD14⁺-MPs. Truly soluble CD14 was undetectable (< 125 pg/mL) in MP-depleted supernatants by ELISA whereas all CD14 content was measured in the MP pellet demonstrating that CD14 released from LPS-treated cells was entirely conveyed by MPs. sCD14 was not able to enhance apoptosis. Moreover, higher sCD14 concentrations (9 μg/mL) as reported in septic patients, significantly lowered LPS response (*p*<0.05) (Figure 3A). In LPS-treated monocytes, apoptosis appeared to follow a U-shaped curve when pretreated by low concentrations of MPs_C with optimal efficacy at 5nM eq. PhtdSer, returning to baseline at 10 nM indicating receptor competition in LPS binding (Figure 3B). Control experiments with liposomes using identical concentrations (5-100 nM eq. PhtdSer) showed no effect, confirming the CD14-dependent effect of MPs (not shown).

T lymphocytes become responsive to LPS when targeted by MP_{sC}

Because CD14 is not expressed by lymphocytes, we investigated whether MP_{sC} from monocytes could promote lymphocyte apoptosis. *In vitro* control experiments revealed that LPS-challenge (2-100 µg/mL) did not produce significant apoptosis in human T-CD4⁺ lymphocyte CEM cells (Figure 4A). Supplementation by LBP (5 to 20,000 ng/mL) did not promote apoptosis after LPS challenge and the lack of LBP in the medium did not appear to be a limitation in LPS-induced response (data not shown).

In cross-talk assays, preliminary experiments using MP_{sC} concentrations up to 100 nM showed that 20 nM eq. PhtdSer were sufficient to reach a plateau in MP-mediated CEM apoptosis. Indeed, MP_{sC} favored CEM membrane remodeling and promoted apoptosis in response to LPS (Figure 4A) and the transfer of both CD14 and TLR4 was evidenced (Figure 4B).

When MP interaction with CEM was abolished by pre-treatment with 50 µg/mL of annexin-5 (a high affinity ligand to PhtdSer), CD14 labeling returned to baseline values (0.4%). Moreover, liposome suspensions (20 nM eq. PhtdSer) did not promote apoptosis, indicating that lipid transfer was not involved in the initiation of CEM LPS-induced apoptosis (Table II). Altogether, compared to monocytes, these data suggest that higher MP_{sC} concentrations are required for the delivery of CD14 to lymphocytes.

Discussion

Microparticles are now recognized as biological effectors and pathogenic markers in various diseases including inflammatory disorders [24]. Sparse data indicate that circulating MPs are conveyors of bioactive forms of plasma proteins such as TF, FAS and IL-1 β , whereas their truly soluble forms remain inactive or less efficient in the bloodstream [17, 25, 26]. Putative mechanisms of MP-mediated transfer of information could rely on (i) membrane-associated receptors/molecules, (ii) transfer of bioactive lipids and (iii) circulating signaling modules [27].

Based on our previous study, we confirm herein that circulating MPs in LPS-challenged rats also exert detrimental hemodynamic effects in \odot recipients, suggesting deleterious pro-inflammatory effects on vascular cells [18]. In order to gain further insight into the role of MPs in LPS-induced insults, the main aim of present work, we designed an *in vitro* MP-mediated crosstalk model from LPS-stimulated monocytes to monocytes and lymphocytes as target cells. The present results show that MPs deliver membrane-bound elements of the LPS triggering system. To our knowledge, these data are the first demonstration of a functional membrane interactome transfer triggering response to LPS.

Different mediators harbored by MPs have been proposed in the propagation of apoptosis and inflammation to neighboring cells, among which are embedded IL-1 β [17]. In our *in vitro* experiments, exogenous soluble IL-1 β but not MP_{S_C}-depleted cell supernatants amplified LPS apoptosis in monocytes, although to a lesser extent than LPS-induced MPs from THP-1. Moreover, direct “death signal” delivery like caspase 1 by MPs as reported by Sarkar *et al.* [28] was ruled out since no apoptosis could be detected by treatment with MPs alone or in NF- κ B-dependent induction in HEK-Blue™ reporting cells. Altogether, these data favor the contribution of MP-embedded rather than truly soluble IL-1 β as mediators in the triggering of enhanced LPS response in our model.

Soluble CD14 is released from its GPI-anchor by endothelial secretory phospholipase A₂ (sPLA₂) in septic patients [29], with high plasma concentration being a marker of worsened prognosis [30]. Nevertheless, high sCD14 levels have been claimed to be cytoprotective *in vivo* through the formation of sCD14-LPS complexes that could be trapped by plasma lipoproteins [31]. We examined the role of MP-bound CD14 or sCD14 in the response of monocyte cells challenged by LPS.

In our cellular cross-talk model, exogenous sCD14 did not deliver any apoptotic message, however monocyte cytoprotection against LPS was observed at high concentrations, suggesting competition with CD14⁺-MPs in LPS binding. Of note, moderate concentrations of MPs (10 nM eq. PhtdSer) partially protected monocytes from apoptosis through LPS deprivation. Both observations suggest that mpCD14 and sCD14 share cytoprotective abilities. Nevertheless, in the absence of LPS, very high levels of MPs (50-100 nM eq. PhtdSer) remained unable to induce NF-κB activation in reporter HEK-hTLR4TM cells showing that MPs did not deliver LPS but solely its receptors to target cell. These results are consistent with those obtained in THP-1 and clearly indicate that minute remaining amounts of LPS, eventually harbored by MPs isolated from LPS-stimulated monocytes, do not trigger apoptosis. Our findings thus support a primary role of CD14/TLR4 MP transfer in the amplification of apoptosis.

LPS Binding Protein (LBP) is a critical acute phase protein transporting and presenting plasma LPS to CD14 and enabling dimerization of TLR4 receptor. LBP may also modify the balance between LPS circulating in plasma or bound to MPs [32, 33]. In our cellular model, recombinant LBP added to culture media at concentrations ranging from 5 to 20,000 ng/mL, failed to modify cellular responses to LPS challenge regardless of the presence of exogenous MPs. Because these cellular models proved to be LBP-independent, our data are thus not a reflection of LBP deficiency. Conversely, we cannot exclude an eventual role of LBP in the

course of sepsis. Our *in vitro* results also confirm a functional transfer of LPS sensors by MPs to target cells thereby promoting enhanced apoptosis and prompting NF- κ B pathways in cells challenged by LPS. MPs or LPS alone remain ineffective, suggesting that MPs do not deliver a direct pro-apoptotic message but rather allow functional LPS sensors to be included into the host cell machinery [34]. Moreover, LPS is not conveyed at the MP surface in sufficient amounts to initiate a cell response in T cells that are deprived of LPS receptor and insensitive to LPS challenge.

In the course of sepsis, consequences of functional CD14/MD-2/TLR4 transfer could be dual with respect to monocyte environment. At the onset of the host defense response, CD14⁺-MPs could prove beneficial through enhanced LPS response prompting inflammatory pathways at the site of infection. LPS sequestration and its cytoprotective effects would occur at high local MP concentrations, similarly to the reported effects of high amounts of circulating sCD14 in septic patients.

Although a well-described event in late sepsis, T-helper apoptosis remains poorly understood. Recently, the possible behavior of MPs as cellular shuttles during sepsis was suggested by the evidence of the delivery of active tissue factor, known to be borne by circulating MPs, from LPS-stimulated monocytes to granulocytes [35]. Based on our *in vitro* data, the transfer of CD14/MD-2/TLR4 to T-helper lymphocytes recruited at infection sites in the course of sepsis could be facilitated by higher monocyte MP concentrations when inflammation is a culminating event. Such MP-mediated propagation is in accordance with the clinical observation of an overwhelmed anti-inflammatory control in the spreading of secondary hospital-acquired infections in critically ill patients [36].

Altogether, our data suggest that MPs released from LPS-stimulated monocytes are pathogenic messengers in the amplification of leukocyte responses to LPS challenge and in the propagation of NF- κ B pathways.

MPs may also target intricate pathways leading to initiation of thrombin generation as well as cardiac and vascular dysfunction, thus raising the question of their mode of action in the course of sepsis. Indeed, pharmacological modulation of MPs in sepsis has been described. Calpain inhibition by calpastatin [37] and recombinant human Activated Protein C (APC) manipulation [38-40] revealed antithrombotic and cytoprotective effects eliciting the emerging role of MP release during sepsis.

Study limitations

As we previously detailed MP vascular effects during a peritonitis-induced shock model [18], our present endotoxinic *in vivo* model was performed only to assess hemodynamic parameters with the main purpose of attempting to understand MP abilities during this challenge. Furthermore, given the duration of rat monitoring, we chose to measure carotid flow rather than aortic blood flow in order to minimize surgical stress.

Several reports state that a proportion of circulating MPs may not expose PhtdSer while others argue on a defective detection [41, 42]. Furthermore, endotoxemia leads to increased levels of circulating 103characterize that might possibly blunt the clearance of MPs in mice [43]. Because our concern was pro-apoptotic features of MPs and in view of the above considerations, we chose to calibrate our model using the PhtdSer content of washed MP_C determined by functional assay, and verified that no effect was observed in target cells after treatment by MP-depleted supernatant. Nevertheless, MP_C were collected by centrifugation from the supernatant of monocyte cells and we cannot exclude that they contain a proportion of MPs that do not expose PhtdSer. This work was limited to the study of the delivery of LPS sensors by monocyte derived MPs and we cannot conclude on the incidence of MPs from other cell origin on the hemodynamic parameters. Although MPs appear as the sole conveyor of bioactive CD14 in our cellular model, the question remains as to whether circulating CD14

is truly soluble (sCD14) or borne by MPs (mpCD14) in septic patients. Indeed, all CD14 detected in cell supernatants by ELISA was MP-linked in our study, probably because monocytes are unable to secrete sPLA₂ thereby limiting the cleavage of CD14 from its GPI-anchor.

Conclusion

We have developed MP-mediated crosstalk models that allow the assessment of interactions between monocytes and lymphocytes under LPS challenge. In our hands, MPs prompted and amplified monocyte apoptosis through the membrane transfer of CD14 and were able to tune the LPS inflammatory response in target cells. Our data raise the question of the proportion of CD14⁺-MPs relative to truly soluble CD14 in the circulating pool of plasma CD14 previously reported in septic patients and of their respective contribution as possible LPS scavengers. The observed MP abilities are consistent with *in vivo* LPS inoculation-induced hypotension recorded in our rat model and suggest that MPs shed from monocytes could contribute to the development of inflammation that characterizes sepsis and septic shock.

Acknowledgments

The authors thank Pierre Pothier for English editing and Philippe Baltzinger for figure format editing.

References

1. Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM. Septic shock. *Lancet* **2005**; 365:63-78.
2. Jerala R. Structural biology of the LPS recognition. *Int J Med Microbiol* **2007**; 297:353-63.
3. Tansho-Nagakawa S, Ubagai T, Kikuchi-Ueda T *et al.* Analysis of membrane antigens on neutrophils from patients with sepsis. *J Infect Chemother* **2012**.
4. Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal* **2001**; 13:85-94.
5. Guha M, O'Connell MA, Pawlinski R *et al.* Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor alpha expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression. *Blood* **2001**; 98:1429-39.
6. Chiao CW, Tostes RC, Webb RC. P2X7 receptor activation amplifies lipopolysaccharide-induced vascular hyporeactivity via interleukin-1 beta release. *J Pharmacol Exp Ther* **2008**; 326:864-70.
7. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol* **1967**; 13:269-88.
8. Morel O, Jesel L, Freyssinet JM, Toti F. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2011**; 31:15-26.
9. Baj-Krzyworzeka M, Majka M, Pratico D *et al.* Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. *Exp Hematol* **2002**; 30:450-9.

10. Aupeix K, Hugel B, Martin T *et al.* The significance of shed membrane particles during programmed cell death in vitro, and in vivo, in HIV-1 infection. *J Clin Invest* **1997**; 99:1546-54.
11. Bal L, Ederhy S, Di Angelantonio E *et al.* Circulating procoagulant microparticles in acute pulmonary embolism: A case-control study. *Int J Cardiol* **2009**.
12. Morel O, Toti F, Hugel B, Freyssinet JM. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. *Curr Opin Hematol* **2004**; 11:156-64.
13. Soriano AO, Jy W, Chirinos JA *et al.* Levels of endothelial and platelet microparticles and their interactions with leukocytes negatively correlate with organ dysfunction and predict mortality in severe sepsis. *Crit Care Med* **2005**; 33:2540-6.
14. Meziani F, Delabranche X, Asfar P, Toti F. Bench-to-bedside review: circulating microparticles--a new player in sepsis? *Crit Care* **2010**; 14:236.
15. Mesri M, Altieri DC. Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway. *J Biol Chem* **1999**; 274:23111-8.
16. Satta N, Freyssinet JM, Toti F. The significance of human monocyte thrombomodulin during membrane vesiculation and after stimulation by lipopolysaccharide. *Br J Haematol* **1997**; 96:534-42.
17. MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E *et al.* Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity* **2001**; 15:825-35.
18. Mortaza S, Martinez MC, Baron-Menguy C *et al.* Detrimental hemodynamic and inflammatory effects of microparticles originating from septic rats. *Crit Care Med* **2009**; 37:2045-50.

19. Janiszewski M, Do Carmo AO, Pedro MA *et al.* Platelet-derived exosomes of septic individuals possess proapoptotic NAD(P)H oxidase activity: A novel vascular redox pathway. *Crit Care Med* **2004**; 32:818-25.
20. Tesse A, Martinez MC, Hugel B *et al.* Upregulation of proinflammatory proteins through NF-kappaB pathway by shed membrane microparticles results in vascular hyporeactivity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2005**; 25:2522-7.
21. Satta N, Toti F, Feugeas O *et al.* Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. *J Immunol* **1994**; 153:3245-55.
22. Hugel B, Zobairi F, Freyssinet JM. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* **2004**; 2:1846-7.
23. Schmid I, Uittenbogaart CH, Giorgi JV. Sensitive method for measuring apoptosis and cell surface phenotype in human thymocytes by flow cytometry. *Cytometry* **1994**; 15:12-20.
24. Morel O, Toti F, Hugel B *et al.* Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2006**; 26:2594-604.
25. Butenas S, Orfeo T, Mann KG. Tissue factor in coagulation: Which? Where? When? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2009**; 29:1989-96.
26. Martin S, Tesse A, Hugel B *et al.* Shed membrane particles from T lymphocytes impair endothelial function and regulate endothelial protein expression. *Circulation* **2004**; 109:1653-9.
27. Mause SF, Weber C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ Res* **2010**; 107:1047-57.
28. Sarkar A, Mitra S, Mehta S, Raices R, Wewers MD. Monocyte derived microvesicles deliver a cell death message via encapsulated caspase-1. *PLoS One* **2009**; 4:e7140.

29. Fourcade O, Simon MF, Viode C *et al.* Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell* **1995**; 80:919-27.
30. Gluck T, Silver J, Epstein M *et al.* Parameters influencing membrane CD14 expression and soluble CD14 levels in sepsis. *Eur J Med Res* **2001**; 6:351-8.
31. Kitchens RL, Thompson PA, Viriyakosol S, O'Keefe GE, Munford RS. Plasma CD14 decreases monocyte responses to LPS by transferring cell-bound LPS to plasma lipoproteins. *J Clin Invest* **2001**; 108:485-93.
32. Park BS, Song DH, Kim HM *et al.* The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* **2009**; 458:1191-5.
33. Tsukamoto H, Fukudome K, Takao S, Tsuneyoshi N, Kimoto M. Lipopolysaccharide-binding protein-mediated Toll-like receptor 4 dimerization enables rapid signal transduction against lipopolysaccharide stimulation on membrane-associated CD14-expressing cells. *Int Immunol* **2010**; 22:271-80.
34. Bosshart H, Heinzelmann M. Targeting bacterial endotoxin: two sides of a coin. *Ann N Y Acad Sci* **2007**:1-17.
35. Egorina EM, Sovershaev MA, Olsen JO, Osterud B. Granulocytes do not express but acquire monocyte-derived tissue factor in whole blood: evidence for a direct transfer. *Blood* **2008**; 111:1208-16.
36. Adib-Conquy M, Cavaillon JM. Compensatory anti-inflammatory response syndrome. *Thromb Haemost* **2009**; 101:36-47.
37. Zafrani L, Gerotziafas G, Byrnes C *et al.* Calpastatin controls polymicrobial sepsis by limiting procoagulant microparticle release. *Am J Respir Crit Care Med* **2012**; 185:744-55.

38. Perez-Casal M, Downey C, Fukudome K, Marx G, Toh CH. Activated protein C induces the release of microparticle-associated endothelial protein C receptor. *Blood* **2005**; 105:1515-22.
39. Perez-Casal M, Thompson V, Downey C *et al.* The clinical and functional relevance of microparticles induced by activated protein C treatment in sepsis. *Crit Care* **2011**; 15:R195.
40. Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S *et al.* Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood* **2000**; 95:930-5.
41. Horstman LL, Jy W, Jimenez JJ, Bidot C, Ahn YS. New horizons in the analysis of circulating cell-derived microparticles. *Keio J Med* **2004**; 53:210-30.
42. Rautou PE, Mackman N: Deletion of microvesicles from the circulation: *Circulation*. 2012 Apr 3;125(13):1601-4. Epub 2012 Mar 2.
43. Aziz M, Jacob A, Matsuda A, Wang P. Review: milk fat globule-EGF factor 8 expression, function and plausible signal transduction in resolving inflammation. *Apoptosis* **2011**; 16:1077-86.

Figure legends

Figure 1. Effect of LPS-induced MPs (or MP_{sC}) and exogenous IL-1 β on THP-1 sensitivity to LPS. Apoptosis was assessed in THP-1 challenged overnight by 15 μ g/mL LPS (*E. coli* O127:B7). ■ with LPS, □ without LPS. Apoptosis was assessed by the degree of hypodiploid DNA.

- A. MPs amplify THP-1 apoptosis in response to LPS.** THP-1 (7.5×10^5 cells/mL) were pretreated 4 hours with 5 nM eq. PhtdSer MP_{sC} or 12.5 ng/mL IL-1 β . (n=6-12; * $p < 0.05$ vs. control; # $p < 0.05$ vs. without LPS and \$ $p < 0.05$ vs. control + LPS.)
- B. CD14 borne by MPs is delivered to THP-1 cells and prompts apoptosis in response to LPS.** Cells were pre-treated or not by a blocking ms α -hCD14 antibody (0.5 μ g/ 10^6 cells). Restoration of cell labeling and LPS sensitivity was examined after treatment by 5 nM eq. PhtdSer MPs or 9 μ g/mL sCD14. CD14 labeling was evidenced by flow cytometry using ms α -hCD14-PE antibody (1 μ g/ 10^6 cells). Apoptosis was quantified for each condition in cells challenged or not by LPS (n=3; * $p < 0.05$ vs. control; # $p < 0.05$ vs. without LPS.)

Figure 2. LPS from *E. coli* induces dose response NF- κ B activation in HEK-hTLR4TM reporting cells and targets NF- κ B activation in HEK-Null2TM deprived of LPS sensors when treated by monocyte MPs.

- A. LPS from *E. coli* induces dose response NF- κ B activation in HEK-hTLR4TM reporting cells.** Reporter cells were challenged overnight by 15 μ g/mL LPS (*E. coli* O127:B7, 5 to 20 μ g/mL) and NF- κ B activation was measured by Quanti-Blue colorimetric assay in HEK-Null2TM ● or HEK-hTLR4TM ■ supernatants (n=3; * p <0.05 vs. without LPS.)
- B. MP_SC from LPS-stimulated monocytes enhance NF- κ B activation in HEK-hTLR4TM and restore HEK-Null2TM response.** HEK-Null2TM were treated or not by 100 nM eq. PhtdSer MPs and challenged by 100 ng/mL ultrapure LPS-EKTM ■ or not □. NF- κ B activity was measured by Quanti-BlueTM colorimetric assay (n=3; * p <0.05 vs. control; # p <0.05 vs. without LPS.)

Figure 3. Modulation of THP-1 apoptosis by MP_{sC} and truly soluble CD14. MP_{sC} were isolated from LPS-stimulated monocytes and THP-1 were pre-treated 4 hours before overnight challenge by 15 µg/mL *E. coli* LPS (O127:B7). ■ With, □ without LPS.

A. Low incidence of sCD14 on THP-1 apoptosis. THP-1 (7.5×10^5 cells/mL) were simultaneously treated by recombinant sCD14 (0.1, 3.0 and 9.0 µg/mL) and LPS. (n=3 ; * $p < 0.05$ vs. Control ; # $p < 0.05$ vs. Without LPS.)

B. Dose-response curve of THP-1 in response to MP_{sC}. THP-1 cells were pretreated 4 hours by 5-100 nM eq. PhtdSer MPs before LPS challenge. Apoptosis was measured by hypodiploid DNA (n=3; * $p < 0.05$ vs. no MPs).

Figure 4. MP_{SC} from LPS-stimulated monocytes induce sensitivity to LPS in target lymphocytes and deliver CD14 to the cell membrane. CEM cells were pretreated 4 hours with monocyte MP_{SC} before challenge by 15 µg/mL *E. coli* LPS (O127:B7). Apoptosis was measured by the degree of hypodiploid DNA. ■ With, □ without LPS.

A. Effect of MP_{SC} on target CEM. CEM cells (7.5×10^5 cells/mL) were pre-treated with 20 nM eq. PhtdSer. (n=6-9 ; * $p < 0.05$ vs. Control ; # $p < 0.05$ vs. Without LPS.)

B. Delivery of CD14/TLR4 to lymphocyte cells by monocyte MP_{SC}. Double labeling of MP-targeted CEM cells by ms α -hCD14-PE and ms α -hCD4-FITC antibodies ($0.5 \mu\text{g}/10^6$ cells and $0.25 \mu\text{g}/10^6$ cells respectively) assessed by flow cytometry. Left panel: control without MP treatment; medial panel: after incubation with 20 nM eq. PhtdSer MP_{SC} (one experiment representative of 3). Right panel: Double labeling of MP-targeted CEM cells by ms α -hCD14-FITC ($0.5 \mu\text{g}/10^6$ cells) and ms α -hTLR4-PE antibodies ($0.5 \mu\text{g}/10^6$ cells) assessed by fluorescent microscopy (x80).

Figure 1

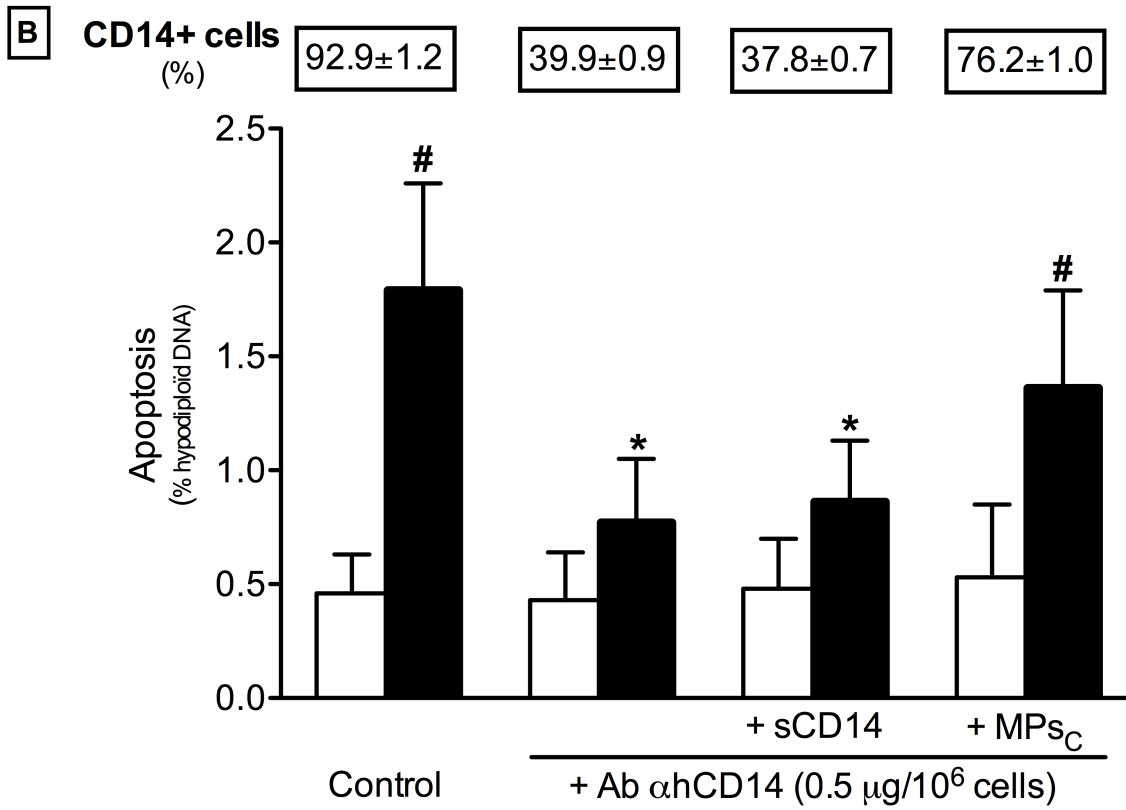
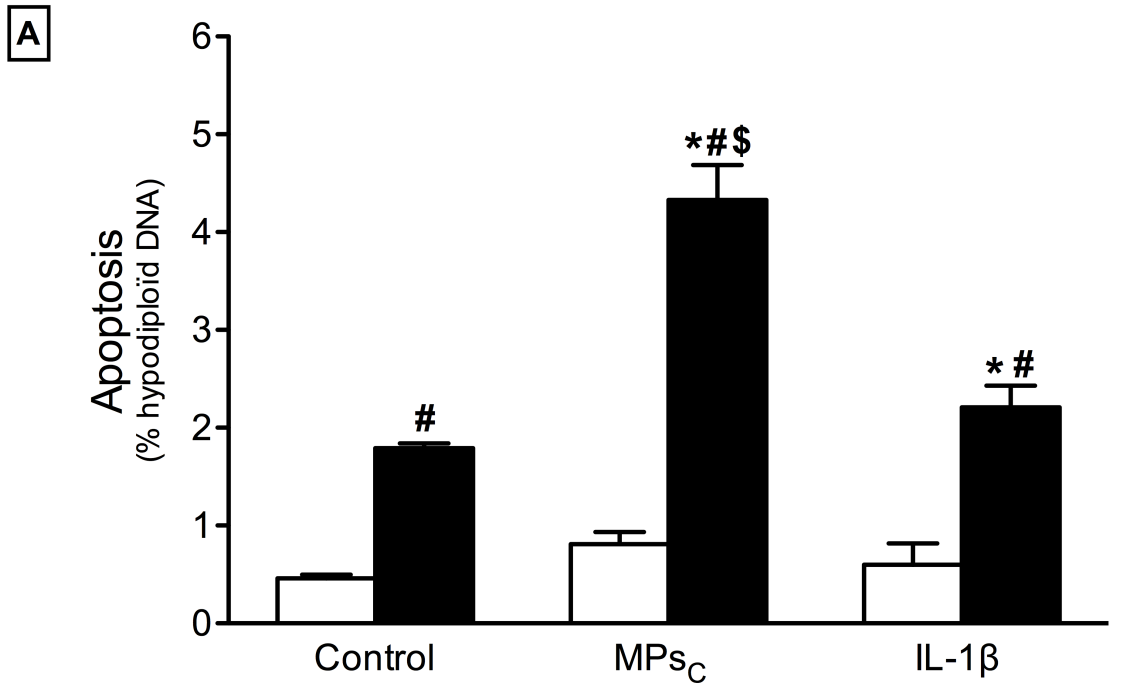


Figure 2

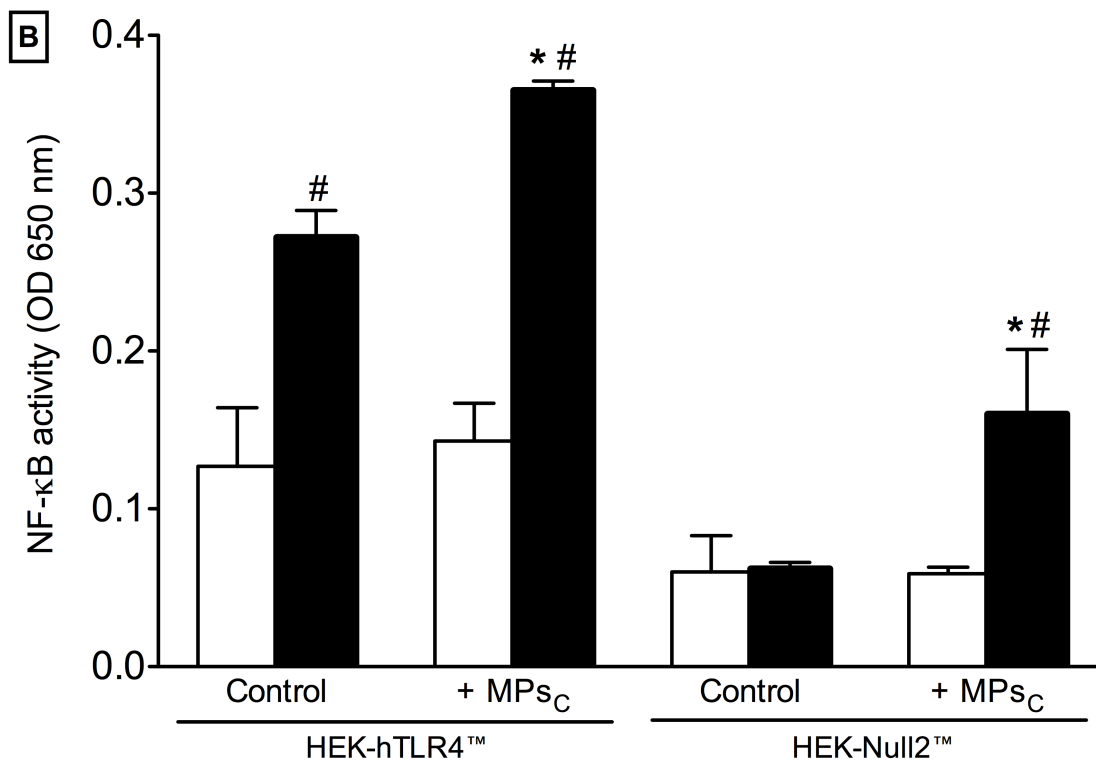
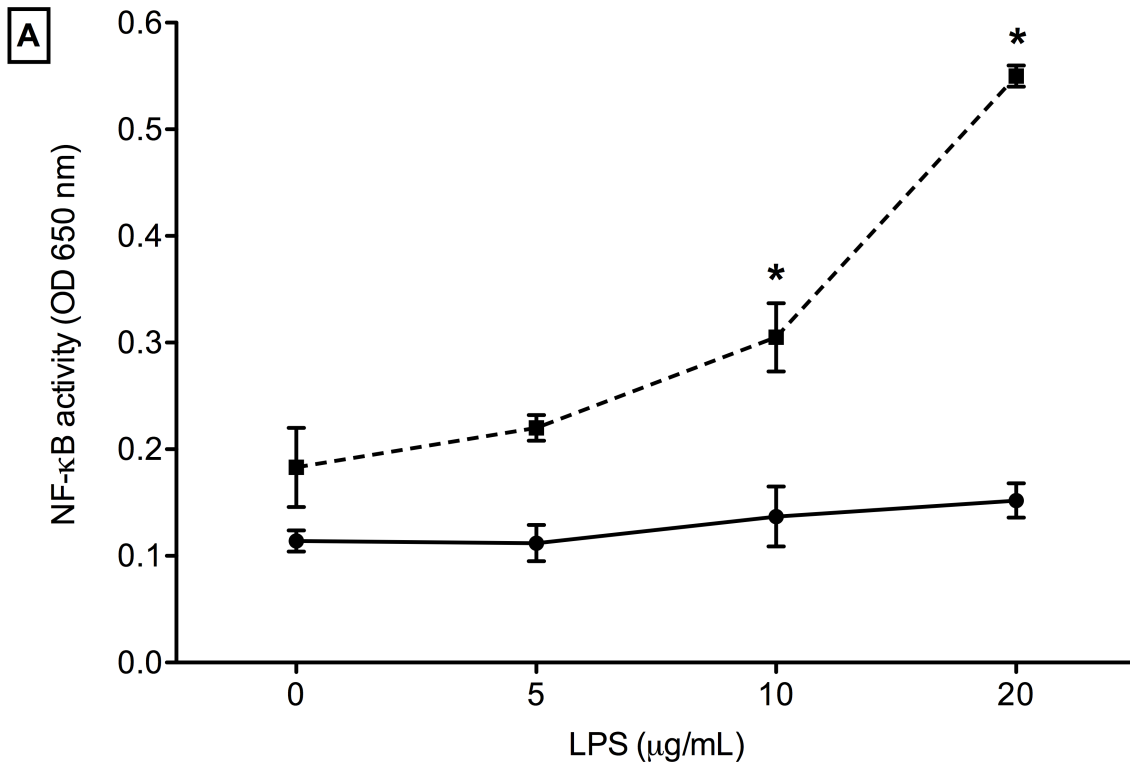


Figure 3

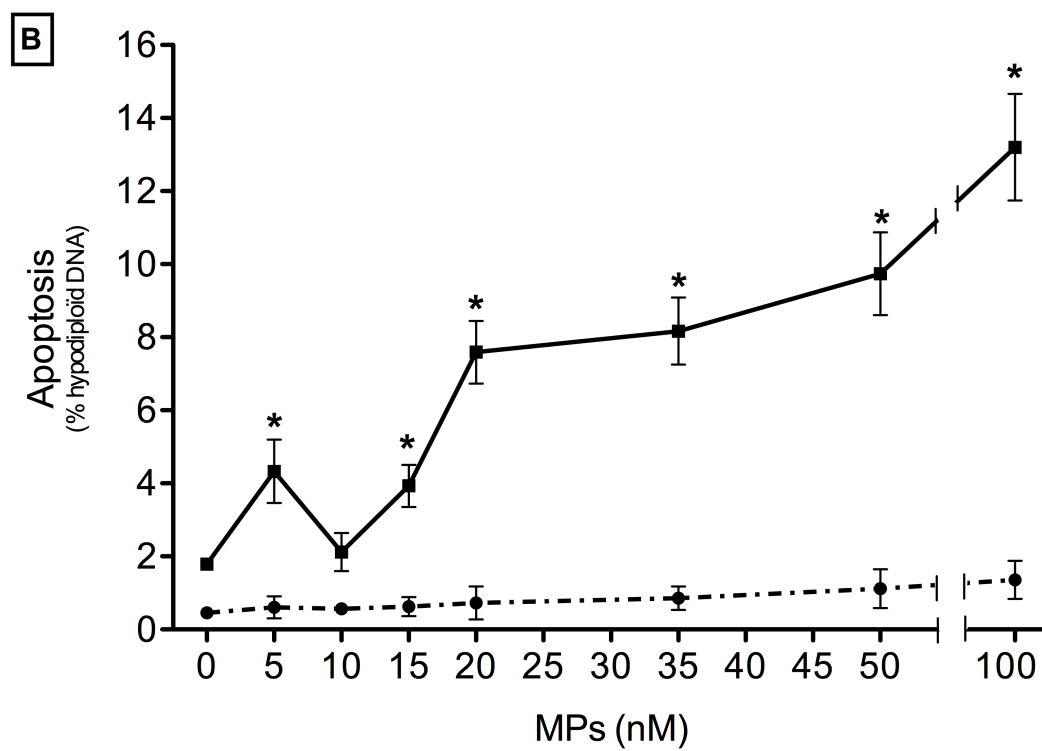
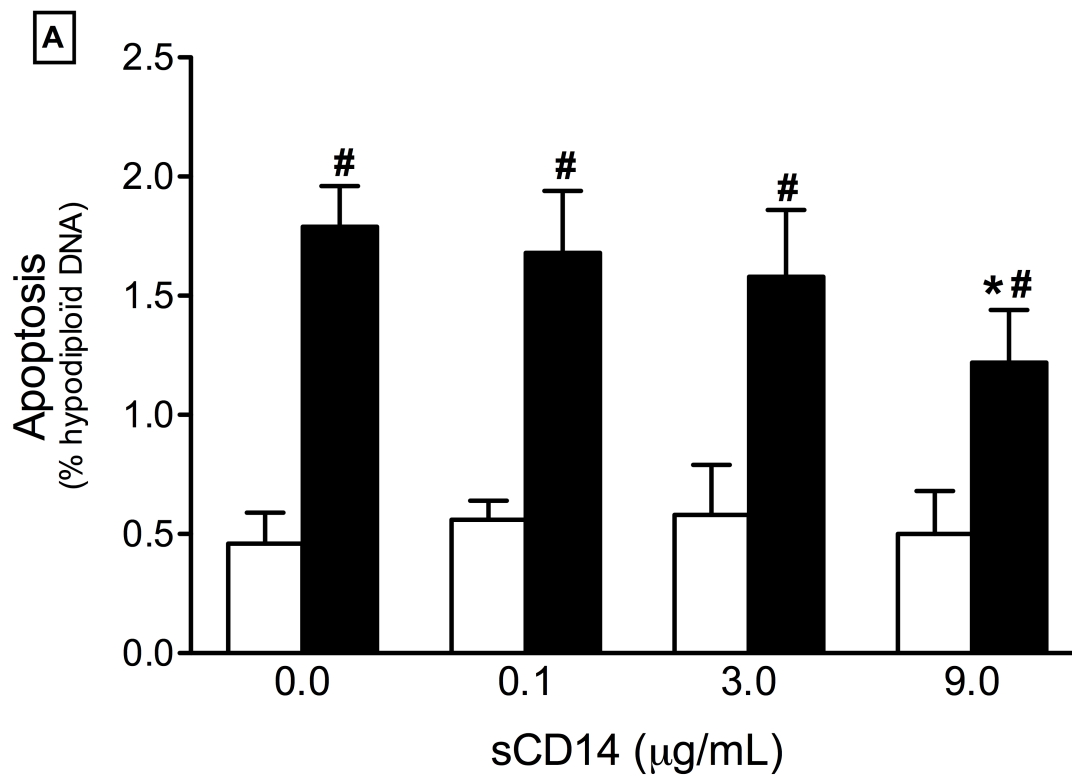


Figure 4

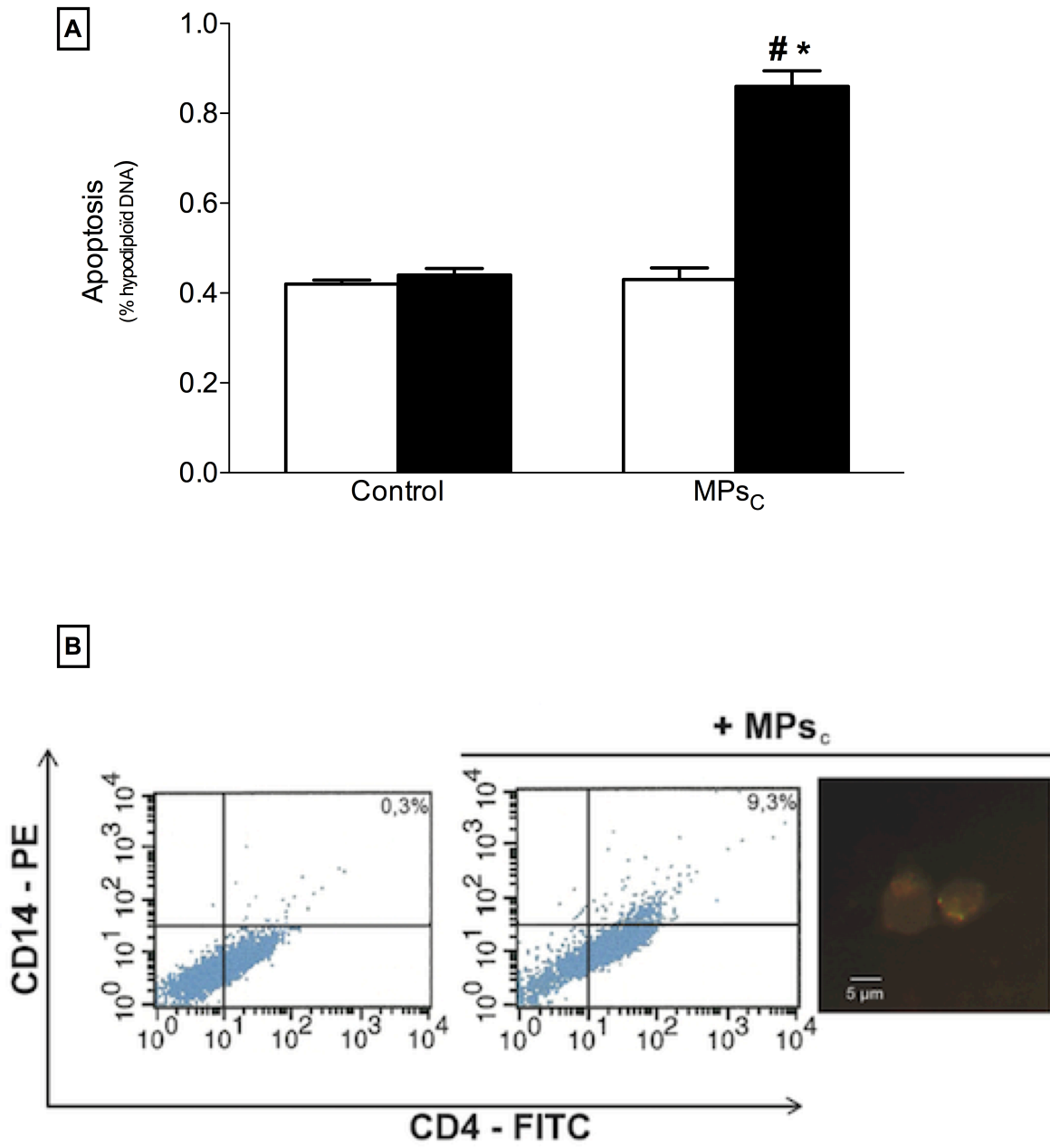


Table I. Hemodynamic characteristics of MPs-challenged rats

	C-MPs (n=15)	E-MPs (n=15)
Mean Arterial Pressure (mmHg)		
- Baseline	129 ± 10	131 ± 8
- 240 min.	120 ± 6	95 ± 9* [#]
Heart Rate (beat/min.)		
- Baseline	424 ± 57	392 ± 45*
- 240 min.	455 ± 47 [#]	415 ± 9* [#]
Carotid Blood Flow (mL/min.)		
- Baseline	4.0 ± 2.2	3.4 ± 1.2*
- 240 min.	4.5 ± 1.8	2.5 ± 1.3* [#]

Table E $p < 0.05$ vs. Control ; [#] $p < 0.05$ vs. Baseline

Table II. Specific monocyte MP-mediated (MPs_C) transfer of CD14 to CEM cells and effects on LPS-induced apoptosis

	No MPs _C		+MPs _C [20 nM]		+ Liposomes [20 nM]	
	Control	+ LPS	Control	+ LPS	Control	+ LPS
CD14 (% cells)	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1	8.5 ± 0.7*	8.6 ± 0.4*	0.5 ± 0.0	0.4 ± 0.1
Apoptosis (% DNA)	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.1	0.9 ± 0.1* [#]	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0

Table E $p < 0.05$ vs. no MPs; [#] $p < 0.05$ vs. without LPS.

Microparticles deliver CD14/TLR4 to tune monocyte and T-lymphocyte inflammatory response: A new insight in host-response to endotoxin

Xavier Delabranche^{1,2,3} (MD), Julie Boisramé-Helms^{1,2,3} (MD), Asaël Berger^{1,2} (MD), Satar Mortaza⁴ (MD), Fatiha Zobairi^{2,5} (BMSc), Michel Hasselmann¹ (MD), Pierre Asfar⁴ (MD, PhD), Ferhat Meziani^{1,3} (MD, PhD), Florence Toti^{2,5} (PhD)

Supplementary data

Material and methods

Animals

In a first step, wistar rats are randomly challenged by intraperitoneal (*ip*) infusion of a non-lethal dose of 30 mg/kg endotoxin (lipopolysaccharide *E. coli* O127:B7, Sigma, St Louis, MO) or placebo (NaCl 0.9%) and are allowed to recover overnight. About 16-20 hours later, rats are anesthetized with *ip* xylazine (0,4 mg/kg; Novartis) in combination with ketamine (80 mg/kg) and sufentanil (0.1 µg subcutaneously) for analgesia. The right carotid artery is cannulated to monitor mean arterial pressure (MAP) to confirm a hypodynamic state with a MAP of <70 mmHg defined as “shock time” in LPS challenged rats and an unchanged MAP placebo group. Thereafter, blood is taken on citrate from carotid artery for MP isolation.

MPs are isolated after a double centrifugation step at 600 x g for 7 min. to remove cells and debris, centrifuged at 13,000 x g for 45 min. and concentrated in 1 mL sterile NaCl 0.9%. MPs from endotoxemic and control rats are pooled, and a same amount of either E-MPs (7.5 pmol eq. PhtdSer) or C-MPs (5.6 pmol eq. PhtdSer) is given to recipient.

In a second step, naïve rats are anesthetized as above, the trachea is cannulated and lungs are ventilated. The right carotid artery is cannulated to monitor MAP and heart rate, the right jugular vein is cannulated for MPs and drug administration. The 122haracterized carotid is gently exposed, and a transit-time ultrasound flow probe is attached to continuously measure blood flow which is assumed to be a reflection of cardiac output. Then 1 mL E-MPs or C-MPs are infused by vein and the rat is monitored during 240 min. before sacrifice by lethal dose of anesthetics.

Liposomes

Synthetic vesicles or liposomes were prepared by mixing phosphatidylcholine (PhtdChol) and phosphatidylserine (PhtdSer) in a molar ratio of 2:1 in chloroform. Then, chloroform is

evaporated under continuous nitrogen flux to ensure liposome formation. Liposomes are suspended in TRIS buffer (Tris 50 nM, NaCl 150 nM, pH 7.5) with 2% (w/v) n-octylglucoside and dialyzed against TRIS buffer at 4°C during 48-72 hours. Concentration is assessed by prothrombinase assay.

Quantification of microparticles

MPs were measured by capture onto insolubilized Annexin-5, and their phosphatidylserine (PhtdSer) content measured by prothrombinase assay using a microtitration plate reader equipped with kinetics software as described elsewhere. In this assay, blood clotting factors (11.2 pM Fxa, 33.3 pM FVa and 1.2 μM FII) and calcium (2.2 mM CaCl₂) concentrations are set to ensure that PhtdSer is the rate-limiting parameter in the generation of soluble thrombin from prothrombin. Results were expressed as nanomolar PhtdSer equivalent (nM eq. PhtdSer) then standardized for 7.5×10^5 cells to ensure comparison by reference to a standard curve constructed with liposomes of known composition and concentration. In this purified assay, the presence of TF on captured MPs does not alter values corresponding to PhtdSer content, and FVa was in excess. In some experiments, capture can be performed with a biotinylated antibody insolubilized on 123 characterize on microtitration plate.

Flow cytometry

Samples were analyzed using a Beckton Dickinson FACScan flow cytometer (San Jose, CA, USA). Data acquisition (10,000 events per sample) and analysis were carried out using Cell Quest software (Becton Dickinson). The light scatter and fluorescence channels were set as logarithmic gains. The forward light scatter setting was E-01, with a threshold at 52.

CD14 analysis

Quantification of membrane-bound CD14 (mCD14) was achieved by flow cytometry using monoclonal antibodies. Five hundred microliters of cell suspension at 10^6 cells/mL in Hanks Balanced Saline Solution (HBSS) were incubated with 0.5 $\mu\text{g/mL}$ mouse anti-human anti-CD14 blocking monoclonal antibody (or IgG control) and mouse immunoglobulins (5% w/v) for 30 min. at 4°C, then washed thrice in HBSS-© 0.1% (w/v) and labeling was achieved by another 15 min. incubation at 4°C with either a PE- or FITC-secondary antibodies (0.5 and 1 $\mu\text{g/mL}$ respectively), or PE-streptavidin (0.4 $\mu\text{g/mL}$).

Analysis of TLR4-mediated NF- κ B activation

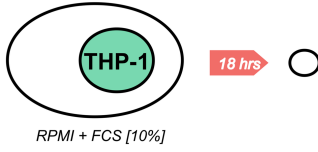
HEK-Blue™ Serum Embryonic Alkaline Phosphatase (SEAP) reporting cell lines (Invivogen, Toulouse; France) were cultured in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FCS and specific antibiotics (Zeomicin™ for Null2 or HEK Selection™ for TLR4). HEK-hTLR4™ stably expresses CD14, MD2 and TLR4 whereas HEK-Null2™ does not. Those cells were developed to study the mechanisms involved in TLR recognition and signaling and may be used to detect LPS contamination in cell cultures. Thus, according to the manufacturer, both cell lines were seeded in microplates in the presence 20 μL of MP_{sC} suspension at 100 nM eq. PhtdSer with 15 $\mu\text{g/mL}$ LPS. Controls were 20 μL of either 100 ng/mL TNF- α (positive control), HBSS (negative control) and 100 ng/mL LPS-EK™ (ultrapure LPS from *E. coli* used as positive control for HEK-hTLR4™ and negative for HEK-Null2™). After 20 hours incubation, 20 μL of cell supernatant were mixed with 180 μL of Quanti-Blue™ and incubated for 30 min. at 37°C. Induction of NF- κ B was evidenced by the reporter expression of SEAP by measuring the absorption at 650 nm and expressed as optical density (OD).

Figure 1

A

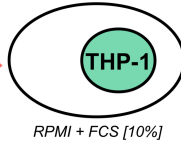
(a) Stress & production of MPs

+ LPS (*E. coli* O127:B7)

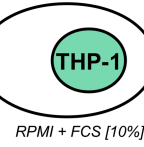


(b) MPs mediated crosstalk

5 nM PS
4 hrs



wash



≡ LPS

18 hrs Apoptosis

20 nM PS
4 hrs



wash

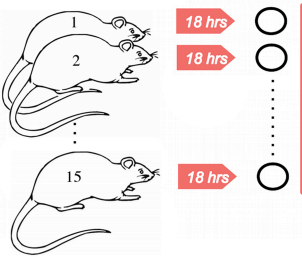


≡ LPS

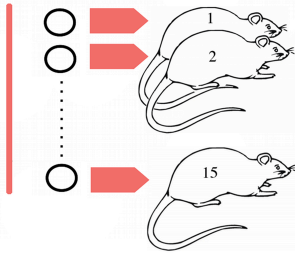
18 hrs Apoptosis

(a) Stress & production of MPs

+ Placebo (NaCl 0.9%)

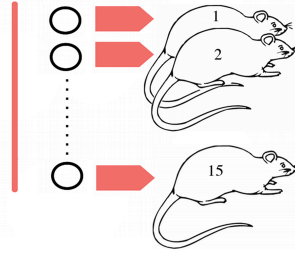
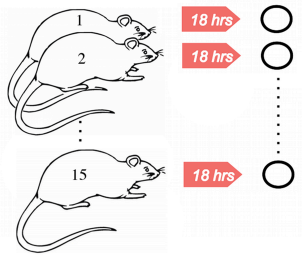


(b) MPs mediated crosstalk



(c) Analysis

+ LPS (*E. coli* O127:B7)



**Pharmacological modulation of procoagulant microparticles improves
hemodynamic dysfunction during septic shock in rats**

Short title: Microparticles manipulation in septic shock

J. Boisramé-Helms^{1,2*}, X. Delabranche^{1,2*}, S.E. Degirmenci², A. Berger^{1,2}, G. Meyer³, F. Zobairi³,
M. Burban³, H.A. Mostefai¹, B. Levy⁴, F. Toti³, F. Meziani^{1,2}

Thrombosis and Haemostasis

(soumis le 15/03/2013, révisé le 27/08/2013, accepté le 04/09/2013 – TH-13-04-0313.R1)

L'équipe a été à l'origine de la publication de plusieurs travaux expérimentaux sur le rôle des MPs issues de rats septiques dans le cadre d'un modèle de péritonite plurimicrobienne par perforation cœcale sur des rats naïfs. Ce travail visait à approfondir la compréhension de l'action des MPs en utilisant un modulateur pharmacologique, la protéine C activée chez l'animal réanimé.

La protéine C activée (Pca) est physiologiquement générée par clivage protéolytique de la protéine C présentée par son récepteur spécifique, l'EPCR (endothelial protein C receptor), par la thrombine (FIIa) lorsque celle-ci est liée à la thrombomoduline. La Pca a à la fois une action anticoagulante et une action cytoprotectrice, dépendante du micro-environnement : PhtdSer et protéine S dans le premier cas, cavéoline et EPCR dans le second. L'action anticoagulante passe par le clivage du Fva le rendant inactif et limitant son action cofacteur dans la génération explosive de thrombine par le complexe prothrombinase (Fva-Fxa) ; elle participe ainsi à la régulation de la phase d'amplification. L'action cytoprotectrice semble indépendante de l'action anticoagulante (Mosnier *et al*, 2004), et serait médiée par l'EPCR et par le clivage des récepteurs activés par les (sérine-)protéases (PAR). Des travaux récents de l'équipe de Mosnier ont permis de mieux préciser ce qui est longtemps apparu comme le paradoxe de PAR-1 : comment un même récepteur clivé par deux substrats pouvait avoir des actions diamétralement opposées. La démonstration de la présence de deux sites de clivage de PAR-1, l'un « canonique » au niveau du résidu Arg⁴¹ par la thrombine, l'autre « non canonique » au niveau de Arg⁴⁶ par aPC a permis de mieux comprendre cette dualité (Mosnier *et al*, 2012). Il en résulte ainsi deux néo-ligands N-terminaux interagissant différemment avec PAR-1. En réponse au clivage par la thrombine, le ligand commence par Ser⁴² activant alors la voie de ERK1/2 et RhoA alors qu'en réponse à APC le ligand généré débute par Asn⁴⁷ permettant le recrutement de β -arrestin-2, PI3K/Akt et Rac1 (Bouwens *et al*, 2013).

La Pca humaine recombinante (Drotrecogine alfa [activée], Xigris[®], Eli Lilly Inc., Indianapolis, MN, USA) a été commercialisée dans le cadre du traitement du choc septique après une première étude (PROWESS) montrant un bénéfice sur la mortalité (Bernard *et al*, 2001). De nombreuses études tant cliniques qu'expérimentales ou fondamentales ont montré le bénéfice de ce traitement sur l'inflammation, la coagulation intravasculaire disséminée, l'hémodynamique, mais aussi la neuroprotection. Toutefois, une

deuxième étude randomisée dans le choc septique (PROWESS SHOCK) n'a pas confirmé les résultats en termes de réduction de la mortalité et la molécule a été *de facto* retirée du marché (Ranieri *et al*, 2012). La molécule reste étudiée et un éditorial récent soulignait l'intérêt de poursuivre la recherche.

Le travail a donc comporté deux volets, d'une part la réalisation d'un choc septique expérimental par ligature-perforation cœcale réanimé avec traitement ou non par drotrécogine alfa [activée], puis d'autre part en la réinjection des MPs à des rats naïfs. Dans ce modèle, un bénéfice en terme hémodynamique chez les rats septiques traités a été observé parallèlement à une modulation du phénotype des MPs circulantes. De plus, les rats naïfs receveurs de MPs présentaient un profil hémodynamique différent des rats contrôles (moins hypotension) avec une réponse inflammatoire également distincte. L'ensemble des données confirment les effets biologiques de la molécule dans le contexte du choc septique sévère et la possibilité de moduler pharmacologiquement le phénotype des MPs.

Ce travail est en cours de révision à la demande de l'éditeur qui souhaiterait le voir compléter par une mesure de NF- κ B dans les artères mésentériques et le cœur des rats receveurs de MPs d'une part, et par la mise en évidence de l'EPCR au niveau des MPs d'autre part. Il a par ailleurs été accepté pour une communication orale au XXIV^{ème} congrès de l'International Society on Thrombosis and Haemostasis, Amsterdam 28/06 au 04/07/2013.

Pharmacological modulation of procoagulant microparticles improves haemodynamic dysfunction during septic shock in rats

Short title: *Microparticles manipulation in septic shock*

J. Boisramé-Helms^{1,2*}, X. Delabranche^{1,2*}, S.E. Degirmenci², A. Berger^{1,2}, G. Meyer³, F. Zobairi³, M. Burban³, H.A. Mostefai¹, B. Levy⁴, F. Toti³, F. Meziani^{1,2}

¹Service de Réanimation Médicale, Nouvel Hôpital Civil, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg (France)

²EA 3072 ; Faculté de médecine, Université de Strasbourg, Strasbourg (France)

³Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, UMR 7213 CNRS, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, Illkirch (France)

⁴Groupe CHOC, Equipe AVENIR Inserm ; Faculté de Médecine, Université de Nancy ; Vandoeuvre les Nancy (France).

Table E The two first authors contributed equally to this work.

Correspondence to:

Ferhat Meziani (MD, PhD)

Service de Réanimation Médicale – Nouvel Hôpital Civil

1, place de l'Hôpital

F-67091 STRASBOURG cedex (France)

Phone : +33 (0) 369 550 434 ; Fax : +33 (0) 369 551 859

E-mail : ferhat.meziani@chru-strasbourg.fr

The authors declare that they have no conflict of interest.

Funding source: this work has been supported by the French Society of Intensive Care (Société de Réanimation de Langue Française, SRLF) and the Association for Research Development in Intensive Care (Association pour le Développement de la Recherche En Réanimation, ADRER).

ABSTRACT

Background: Circulating microparticles play a pro-inflammatory and procoagulant detrimental role in the vascular dysfunction of septic shock.

Objectives: To investigate mechanisms by which a pharmacological modulation of microparticles could affect vascular dysfunction in a rat model of septic shock.

Methods: Septic or sham rats were treated by activated protein C (aPC) and resuscitated during four hours. Their microparticles were harvested and inoculated to another set of healthy recipient rats. Haemodynamic parameters were monitored, circulating total procoagulant microparticles assessed by prothrombinase assay, and their cell origin characterised. Mesenteric resistance arteries, aorta and heart were harvested for western blotting analysis.

Results: (a) The amount and phenotype of circulating microparticles were altered in septic rats with an enhanced endothelial, leucocyte and platelet contribution. (b) aPC treatment significantly reduced the generation of leucocyte microparticles and norepinephrine requirements to reach the mean arterial pressure target in septic rats. (c) Microparticles from untreated septic rats, but not from aPC-treated ones, significantly reduced the healthy recipients' mean arterial pressure. (d) Microparticle thromboxane content and aPC activity were significantly increased in aPC-treated septic rats. In inoculated naïve recipients, microparticles from aPC-treated septic rats prompted reduced NF- κ B and COX-2 arterial activation, blunted the generation of pro-inflammatory iNOS and secondarily increased platelet and endothelial microparticles.

Conclusion: In this septic shock model, increased circulating levels of procoagulant microparticles led to negative haemodynamic outcomes. Pharmacological treatment by aPC modified the cell origin and levels of circulating microparticles, thereby limiting vascular inflammation and favouring haemodynamic improvement.

KEY WORDS: activated protein C; haemodynamic dysfunction; inflammation; microparticles; septic shock.

INTRODUCTION

Septic shock is a systemic inflammatory syndrome leading to profound cell activation and multiple organ failure. Cytotoxic damages induced by infectious agents or derived products combine an intense systemic inflammation and a procoagulant and anti-fibrinolytic state and lead to cardiovascular dysfunction [1]. The endothelium becomes pro-adhesive, pro-inflammatory and prothrombotic, promotes uncontrolled thrombin generation, microthrombi and disseminated intravascular coagulation (DIC) [2]. Persistent hypotension and the occurrence of DIC in septic shock are precursors of vascular obliteration and multiple organ failure (3), leading to death within a few hours or days [1].

During septic shock, membrane remodelling and microparticles (MPs) shedding may mirror cell activation. MPs are plasma membrane 131characteriz fragments released into the extracellular space after membrane remodelling in response to several agents, like oxidative stress or pro-inflammatory mediators [4]. MPs behave as cellular effectors conveying cell-to-cell biological signals [5,6]. They bear the membrane characteristics of their parental cell allowing the determination of their cellular origin. Recent *in-vitro* and *in vivo* data suggest that MPs may participate in the pathogenesis of sepsis in multiple ways [7]. They are able to regulate vascular tone and are potent pro-inflammatory and procoagulant vascular mediators (8, 9). In addition, vascular MPs exhibit dual procoagulant properties. They bear phosphatidylserine (PhtdSer), a procoagulant phospholipid, and constitute an additional catalytic surface for the assembly of coagulation factors [10,11]. When derived from monocytes or endothelial cells, they can express tissue factor (TF), the cellular initiator of coagulation. Circulating MPs take part in numerous amplification loops contributing to thrombin generation and are able to transfer active TF to neighbouring cells [12]. Platelet-derived microparticles (GPIIb α -MPs) have been shown to increase thrombin generation after activation of factor (F)XI by thrombin, independently of the presence of the initiator complex TF-FVIIa [13].

Protein C is a vitamin K serine protease playing a key role in coagulation regulation. Activated protein C (aPC) inactivates FVa and FVIIIa in a negative feedback loop. The activation of circulating protein C requires the presence of two receptors at the endothelial cell surface: the endothelial protein C receptor (EPCR) and the thrombomodulin that modifies thrombin substrate specificity from fibrinogen to protein C [14]. Thus, thrombin switches from a procoagulant to an anticoagulant activity through the activation of EPCR-bound protein C. In septic shock, pro-inflammatory cytokines, such as tumour necrosis factor alpha (TNF- α), reduce thrombomodulin activity and consequently aPC generation [1]. Many reports suggest that recombinant human aPC may decrease the inflammatory response and control haemostasis *via* direct anticoagulant properties [15-17], thereby potentially preventing the onset of DIC [18].

However in the last decade, aPC has been shown to have cytoprotective properties and EPCR appears to be a major regulator of aPC function. Indeed, effects of cytoprotective-selective aPC mutants were evidenced in sepsis as well as in inflammation models [19], while anticoagulant-selective mutants were beneficial in thrombosis models [20]. aPC cytoprotective effects require colocalisation with thrombin receptor PAR-1 and target apoptosis, inflammation, and cell barrier function [21-23]. Recent data suggest a tight regulation of signalling pathways between thrombin and aPC activation of PAR-1 at the endothelial cell surface that modulates proinflammatory or cytoprotective responses [24]. Interestingly, aPC was also shown to favour the generation of endothelial MPs bearing the active form of EPCR [25,26].

The purpose of this study was to assess the MP-driven cardiovascular consequences of septic shock and their pharmacological modulation by human recombinant aPC, in order to establish whether MPs could constitute a therapeutic target.

MATERIALS AND METHODS

Animals, analgesia and anaesthesia

This study was performed with the approval of the Strasbourg Regional Committee of Ethics in Animal Experimentation (CREMEAS, AL/04/05/02/12).

Male Wistar rats (300-350 g) were used for all experiments. In a first set of experiments, septic rats secondary to a caecal ligation and puncture (CLP) and control rats (sham) were treated with 0.9% sodium chloride (NaCl 0.9%) or aPC (recombinant human aPC, drotrecogin alfa [activated], Eli Lilly, Indianapolis, MN, USA) (16 rats/group) and MPs were collected. In a second set of experiments, these MPs were inoculated to healthy rats.

During surgical procedures, rats were anaesthetised with isoflurane 1-2% (Baxter S.A.S, Maurepas, France) and analgesia was ensured by sufentanil (Mylan, Pittsburgh PA, USA) (0.1 µg/kg of body weight) administered subcutaneously. If necessary, inhaled anaesthesia was increased and sufentanil was reinjected (0.1 µg/kg of body weight; up to 0.5 µg/kg). Before skin incision, a subcutaneous injection of 0.1 mL lidocaine 1% (AstraZeneca, Rueil-Malmaison, France) was performed.

Caecal Ligation and Puncture Model

Rats underwent caecal ligation and puncture (CLP) as previously described [27]. Briefly, after shaving and under aseptic conditions, a 3-cm midline laparotomy was performed to allow exposure of the caecum. The caecum was partially ligated, perforated with an 18-gauge needle and gently squeezed to extrude a small amount of faeces from the perforation site. The caecum was then returned into the peritoneal cavity and the laparotomy was closed with 4.0 silk sutures. Before housing in their cages with free water and food access, all rats received a subcutaneous injection of NaCl 0.9% (30 mL/kg of body weight). Septic shock occurred

within 16–20 hours after CLP and was considered established on the basis of clinical criteria (lethargy, piloerection and glassy eyes). Sham rats underwent laparotomy and caecal exposure without further manipulation (Fig. 1).

Monitoring of septic rats, aPC treatment and blood harvesting

Once septic shock was established, rats were anaesthetised and analgesia was ensured as described above. Animals were tracheotomised and lungs ventilated throughout the experiment. The ventilator (Harvard Rodent Ventilator 683, Harvard Instruments, South Natick, MA, USA) was set to maintain a PaCO₂ of 40 mmHg and oxygen was added to maintain a PaO₂ of 100 mmHg. The right carotid artery was gently exposed and a transit-time ultrasound flow probe of 2.0 mm (Transonic Systems, Ithaca, NY, USA) was attached to it to continuously measure carotid blood flow (CBF). The left femoral artery was exposed and used to measure mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) and to collect blood samples. The rectal temperature was continuously monitored. Hydration was ensured by an intravenous continuous infusion of 0.9% sodium chloride at 0.8 mL/h.

After the surgical procedure, animals were allowed to stabilize for 30 minutes. Septic shock was further confirmed with a MAP below 90 mmHg and an elevated plasma lactate level (> 2 mmol/L). Rats were thereafter infused at identical rates with recombinant human aPC (33 µg/kg/h) or 0.9% sodium chloride. Fluid resuscitation of CLP rats was performed by a bolus of 0.9% NaCl (500 µL every 10 minutes when needed) and norepinephrine was infused to target a MAP above 100 mmHg. After 240 minutes treatment, rats were bled *via* the left carotid artery under sterile conditions and blood was anticoagulated using 13 mM sodium citrate tubes (Vacutainer™, Becton Dickinson; Le Pont de Claix, France). The presence of caecum necrosis and intra-abdominal pus was systematically checked. In sham rats, the absence of intra-abdominal infection was also systematically checked (Fig. 1).

Constitution of concentrated MP pools from septic and control rats

Four different pools of concentrated MPs were each made out of 16 different individuals of one specific experimental subset: aPC treated or untreated CLP rats (CLP-aPC and CLP-NaCl) and sham counterparts (sham-aPC and sham-NaCl). MPs were isolated by differential centrifugation. Briefly, blood samples withdrawn from each subset of rats were centrifuged for 15 min. at 800 x g to obtain platelet-rich plasma (PRP) that was immediately submitted to additional 2 min. centrifugation at 12,000 x g. Recovered platelet-poor plasma (PPP) was further centrifuged at 12,000 x g for 60 minutes to pellet MPs. MP pellets were washed and concentrated in Hanks Balanced Saline Solution (HBSS) without calcium or magnesium after 1 hour centrifugation at 12,000 x g. Final washed pellets were re-suspended in 500 µL of 0.9% NaCl and kept at 4°C for less than 2 weeks. All manipulations were performed under sterile conditions.

Monitoring of naïve recipient rats inoculated with washed MP concentrates

Healthy recipient rats, further referred to as “R-rats”, were anaesthetised and analgesia was ensured as described above. After 30 minutes of stabilisation, animals were randomly allocated to four groups (CLP-aPC-R, CLP-NaCl-R, sham-aPC-R and sham-NaCl-R) and inoculated with MPs collected from aPC treated or untreated CLP rats and their sham counterparts. The operators were blinded for MP administration. An identical amount of total MPs was infused to each individual, corresponding to the mean value of circulating MPs in one CLP-NaCl rat. Ten to 12 rats were inoculated in each subset. Rats were monitored as described above and haemodynamic parameters recorded during 4 hours. Thereafter, rats were bled and mesenteric resistance arteries (MRAs), aorta and heart were collected, quickly frozen and stored at -80°C for further western blot analyses (Fig. 1).

Microparticle quantification and characterisation of their cell origin

Total MPs in plasma or pellet suspensions were assessed after capture onto biotinylated annexin-5 insolubilised on covalently coated streptavidin multi-well plates (Roche, France) as described elsewhere [21]. MP samples (100 μ L/well) were incubated for 30 min at 37°C. After three washing steps, the amount of insolubilised MPs was measured by prothrombinase assay in standardised medium containing human coagulation factors (1.2 μ M FII, 33.3 pM FVa, 11.2 pM Fxa, 2.2 mM CaCl₂). Variations of absorbance of pNAPEP0216, a thrombin chromogenic substrate (1.52 mM final concentration, Cryopep, Montpellier, France), were detected in kinetic mode using a thermostated spectrophotometer set at 405 nm (VersaMax Molecular Device, USA). The absorbance values were converted into nanomolar phosphatidylserine equivalent (PhtdSer eq.) by reference to a calibration curve using synthetic vesicles (33% w/w PhtdSer and 67% w/w PhtdChol). In the prothrombinase assay, PhtdSer exposed by MPs is the rate limiting factor of the reaction leading to thrombin generation [28]. MP phenotype was assessed using biotinylated monoclonal antibodies instead of annexin-5. Antibodies (1 μ g/well) were directed against characteristic antigens borne by the parental cells: anti-CD61 for platelet GP_{IIIa} (β_3), anti-CD45 for leucocyte, anti-CD54 for endothelial cells (BioLegend, San Diego, CA, USA) and anti-glycophorin for erythrocytes (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). EPCR⁺-MPs were assessed using a polyclonal rabbit antibody against the extracellular domains of EPCR (FL-238, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), that was biotinylated and a polyclonal biotinylated control IgG (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany). Prothrombinase assay was performed as described above. Absorbance values obtained with irrelevant control antibodies of identical isotype were subtracted from those obtained with the specific antibody. Levels of endotoxin were assessed in all preparations of MPs with the Limulus Amebocyte Lysate kit QCL-1000

(Limulus Amebocyte Lysate, Endosafe Products & Services, Charles River Laboratories, France) and were below the detection threshold (<0.1 endotoxin units/mL).

Measurement of the aPC activity borne by microparticles

MP pellets from 300 μ l PPP (12,000 x g during 1 hour) were re-suspended in 500 μ L HBSS. After centrifugation (12000 x g, 1 hour, 4°C), washed MP pellets were re-suspended in 300 μ L HBSS. aPC activity was measured in 100 μ L of the final suspension using a specific chromogenic substrate pNAPEP1566 (0.75 mM, final concentration, Cryopep, Montpellier, France). Absorbance variations were measured at 405 nm at 37°C with a thermostated spectrophotometer and expressed as mOD/hr (Versamax). Values of aPC activity in MPs were expressed without normalisation and after normalisation to the mean concentration of total MPs or endothelial MPs circulating in each rat subset (CLP-aPC, CLP-NaCl, sham-aPC and sham-NaCl) and expressed in mOD/hr per 0.1 pmol PhtdSer.

Western blot analysis

Tissues from harvested MRAs, aortas and hearts were homogenized in lysis buffer (10 mM Tris-HCl, containing 1% sodium dodecyl 137haracte, 1 mM sodium orthovanadate, 2.5 mg/L leupeptin and 5 mg/L aprotinin, pH 7.4) using an Ultrasonic Processor (Bioblock Scientific, France). Lysates were centrifuged at 4°C. Fifty micrograms of supernatant were loaded on 9% SDS-PAGE gels and allowed to migrate in 192 mM glycine, 0.1% SDS 25 mM Tris buffer at 100 V using a Mini gel protean II system (Bio-Rad). Proteins were transferred onto polyvinylidene difluoride blotting membranes (Immobilon-P, Millipore) during 90 min. at 100V, 4°C, in 25 mM Tris, 192 mM glycine buffer containing 10% methanol. Membranes were washed in Tris-buffer saline (10 mM Tris-base, 100 mM NaCl, pH 7.5) containing 1 mM EDTA and 0.1% Tween-20 and further incubated 1 hour at room temperature in 20 mM

Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20, pH 8.0, containing 5% skimmed milk. Immunolabelling was performed by overnight incubation at 4°C with primary monoclonal IgG₁ directed against pIκB-α (1/500, Euromedex, Souffelweyersheim, France), NF-κB (1/1,000, Ozyme, Saint Quentin, France), COX-1 and COX-2 (1/1,000 Cayman Chemical Co, Ann Arbor, MI), iNOS (1/1,000, Beckton Dickinson), β-tubulin (1/10,000, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany). After 3 washing steps, labelling was detected by 1/5,000 dilution of rabbit HRP-linked anti-rat for 1 hour at room temperature. Labelling of β-tubulin was detected by 1/40,000 dilution of goat HRP-linked anti-rat IgG. Immunostaining was revealed by Amersham™ ECL™ Prime western blotting detection reagent (GE Healthcare) at ½ dilution. Quantification was performed by densitometry analysis using imageJ®. Densitometry values of blotted proteins expressed as β-tubulin ratio.

Quantification of thromboxane A₂

Thromboxane A₂ (TXA₂) was measured in MPs from sham or CLP rats using an immunoassay kit (ELISA) according to manufacturer's instructions (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA). Briefly, the MP suspension was submitted to three cycles of freezing/thawing and TXA₂ assessed in 50 μL of the supernatant of lysed MPs (12,000 x g, 5 min.). TXA₂ content was reported as a ratio of total MPs.

Statistical analysis

The inter-group comparison of haemodynamic parameters was performed by ANOVA repeated measures; the pairwise comparison was made using a Tukey-Kramer adjustment for p values. For dosages of MPs, aPC activity, proteins and TXA₂, a non-parametric analysis by Kruskal Wallis test with Dunn post hoc test was used. All statistics was performed with

Statview software (version 5.0, SAS Institute, Cary, NC, USA). A p value <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Peritonitis-induced septic shock alters generation of circulating microparticles

Sixteen to twenty hours after surgery, monitoring of the rats (CLP-NaCl rats compared to sham rats) showed that septic shock following CLP-induced peritonitis was characterised by a significant decrease of MAP and that rats required active resuscitation, with fluid challenge and norepinephrine infusion. Confirming the establishment of the shock, we also showed a significant increase in plasma lactate level (4.81 ± 0.30 vs. 1.41 ± 0.10 mmol/L, $p < 0.05$) and in HR (412 ± 14 vs. 362 ± 8 bpm, $p < 0.05$) and the collapse of CBF (5.9 ± 0.4 vs. 9.4 ± 0.4 mL/min, $p < 0.05$) in CLP-NaCl rats ($p < 0.05$) compared to sham-NaCl rats. After 240 min. (end of the experiment), CLP-NaCl rats had significantly decreased their MAP (59 ± 6 vs. 79 ± 3 mmHg at the beginning of the monitoring, $p < 0.05$) and CBF (4.3 ± 0.4 vs. 5.9 ± 0.4 , $p < 0.05$) in spite of active resuscitation, whereas the MAP of CLP-aPC rats (72 ± 10 vs. 76 ± 3) and their CBF (4.8 ± 0.4 vs. 5.3 ± 0.6) were not significantly different (Table 1).

At the end of the experiment, total procoagulant MPs circulated at higher levels in septic rats (CLP-NaCl) ($p < 0.05$ vs. sham-NaCl rats) and leucocyte, platelet and endothelial-derived MPs were increased to respectively a 9-fold, 3-fold, 4-fold range compared to sham rats (Table 1). Compared to CLP-NaCl rats, aPC infusion led to lower norepinephrine needs to reach MAP target in CLP-aPC rats (Table 1) ($p < 0.05$). Although aPC treatment increased platelet and endothelial-derived MPs in septic rats (CLP-aPC vs. CLP-NaCl, $p < 0.05$), it reduced the generation of total and leucocyte MPs ($p < 0.05$) (Table 1).

Microparticles convey aPC activity

MPs capture onto anti-EPCR antibody and prothrombinase test did not allow us to detect any signal, in any group of rats.

In order to establish a possible contribution of aPC bound to MPs, its activity was directly assessed in washed MP pellets from septic and sham donor rats using pNAPEP1566, a specific chromogenic substrate. An important activity was measured in MP concentrates from sham rats regardless of the treatment (aPC or NaCl). aPC activity was dramatically low in MP concentrates from untreated septic rats, but appeared partially restored by aPC treatment (table 2). These observations suggested that aPC is already borne in its active form by MPs circulating in healthy rats (sham).

To better understand the contribution of MPs as aPC conveyors, aPC activity values in MPs were normalised to the mean concentration of total or endothelial MPs circulating in each rat subset. Regardless of their cell origin, when exogenous aPC was infused to healthy rats, aPC activity borne by MPs was significantly increased, indicating that under physiological conditions circulating MPs expose free binding sites for aPC (sham-NaCl: 44.2 ± 5.5 vs. sham-aPC: 74.4 ± 4.9 mOD/hr per 0.1 pmol of PhtdSer, $p < 0.05$). Similarly, aPC activity is enhanced on aPC-treated septic rats' MPs (CLP-NaCl: 4.4 ± 0.5 vs. CLP-aPC: 15.3 ± 1.6 mOD/hr per 0.1 pmol of MPs, $p < 0.05$) (Fig. 2a). However, normalisation to endothelial MPs' concentrations, showed that aPC activity per endothelial MP was not different in CLP-NaCl and CLP-aPC rats (Fig. 2b), although still higher in sham-aPC vs. sham-NaCl rats (965.3 ± 86.1 and 398.1 ± 49.6 mOD/hr per 0.1 pmol of PhtdSer, respectively, $p < 0.05$) (Fig. 2b). These data suggest that exogenous aPC can be bound in its active form by circulating endothelial MPs as observed in sham rats. Since the amount of endothelial MPs is highly elevated in CLP-aPC, they also indicate that the number of bound active aPC per endothelial MP reaches a plateau in established septic shock (Table 2 and Fig. 2b).

Microparticle infusion alters the microparticle vascular reservoir in healthy recipients

Healthy recipients were inoculated with MPs isolated from the septic and control donors treated or not by aPC as described above. Circulating MPs were further measured in recipients 4 hours after the inoculation. Whatever the donor subset, inoculated MPs did not modify the amount of circulating procoagulant MPs in recipient rats (Table 3). However, MPs isolated from CLP-aPC donors led to a profound alteration in the MP phenotype of recipients (CLP-aPC-R) with a significant increase in platelet and endothelial MP levels ($p < 0.05$) (Table 3) that were still detectable after 4 hours.

Sepsis-like microparticle-driven hypotension in recipients is counterbalanced by enhanced thromboxane A₂ microparticle content

The haemodynamic consequences of MP inoculation were monitored in healthy recipients. While inoculation of MPs from untreated septic donors induced sepsis-like hypotension in CLP-NaCl-R rats with a significant decrease in CBF and increased HR after 240 min., MPs from CLP-aPC rats prevented MAP decrease in recipient rats (Table 3, Fig. 3). In order to understand how aPC may partially restore the haemodynamic parameters altered by septic MPs, we investigated the TXA₂ MP content of donor rats. This showed that high amounts of TXA₂ were measured in MPs harvested from CLP-aPC rats compared to other subsets (CLP-aPC MPs: 77.1 ± 11.4 pg/mL vs. sham-NaCl MPs: 39.8 ± 4.5 pg/mL, $p < 0.05$) (Fig. 4).

Microparticles as modulators of arterial and cardiac inflammation

The consequences of MP inoculation on inflammation (NF- κ B and phosphorylated I κ B- α) were investigated by Western Blotting in the aorta, MRAs and heart collected from R-rats. Cyclo-oxygenases and iNOS modulation by MPs were also investigated in recipient MRAs.

A significant increase in NF- κ B and phosphorylated I κ B- α expressions was observed in MRAs from CLP-NaCl-R compared to sham-NaCl-R recipients (3.60 ± 0.40 vs. 2.00 ± 0.11 arbitrary units –A.U.– for NF- κ B and 0.25 ± 0.03 vs. 0.15 ± 0.02 A.U. for pI κ B- α , $p < 0.05$) (Fig. 5a and 5c), suggesting that infusion of MPs from septic rats promotes inflammatory responses. A similar MP-mediated response was observed in heart tissues (CLP-NaCl-R: 0.38 ± 0.05 vs. sham-NaCl-R: 0.16 ± 0.02 A.U. for NF- κ B and CLP-NaCl-R: 0.51 ± 0.02 vs. sham-NaCl-R: 0.18 ± 0.02 A.U. for pI κ B- α , $p < 0.05$) (Fig. 5b and 5d). Interestingly, MPs from aPC-treated septic rats significantly limited NF- κ B and pI κ B- α expressions in the MRAs (CLP-aPC-R) compared to the levels measured in CLP-NaCl-R (NF- κ B: 1.60 ± 0.20 and pI κ B- α 0.07 ± 0.02 A.U. in CLP-aPC-R rats. $P < 0.05$) (Fig. 5a and 5c). This observation was confirmed in heart tissues (Fig. 5b and 5d) and in aorta extracts (data not shown).

MPs had no effect on COX-1 expression in the recipients' MRAs, whatever the donor subset (Fig. 6). A different pattern was observed for COX-2 expression. MPs from aPC-treated septic rats significantly reduced COX-2 expression in the MRAs from recipients compared to those infused with MPs isolated from untreated CLP-NaCl rats (CLP-aPC-R: 0.32 ± 0.07 vs. CLP-NaCl-R: 0.65 ± 0.10 A.U. $p < 0.05$) (Fig. 6). Conversely, while septic MPs from CLP-NaCl donors increased iNOS expression (CLP-NaCl-R: 4.28 ± 0.38 vs. sham-NaCl-R: 1.00 ± 0.49 A.U., $p < 0.05$), MPs isolated from aPC-treated septic rats significantly blunted this increase (CLP-aPC-R: 2.00 ± 0.42 A.U., $p < 0.05$) (Fig. 7). Altogether, these data suggest that septic MPs prompt pro-inflammatory responses in the MRAs, heart and aorta tissues, a deleterious property counteracted by aPC.

DISCUSSION

Cell membrane released MPs could prove to be an important contributor in the pathophysiology of septic shock, as they lie at the crossroad between inflammatory and procoagulant responses [8]. In sepsis, the link between inflammatory response, coagulation events and vascular tone remains difficult to assess due to overlapping sequences in cell activation and multiple amplification loops. In-vitro, MPs are able to interact with both endothelial and smooth muscle cells [29-31] and can be considered as a surrogate of systemic cellular activation and endothelial procoagulant state [32]. It was indeed reported that circulating MPs play a pro-inflammatory and procoagulant detrimental role in the vascular dysfunction of septic shock [9,32,33] and we recently assessed a specific MP pattern during septic shock-induced DIC in humans [34].

Our present data show that CLP-induced sepsis leads to the generation of procoagulant MPs of leucocyte, platelet and endothelial origin and that these MPs modulate the haemodynamic and vascular response. It was previously reported that endothelial MPs prompt endothelial dysfunction [29,35,36] and cause vascular hyporesponsiveness [29,36]. In addition, platelet MPs bear superoxide anion that favours oxidative stress and decreases NO bioavailability [35,37]. Indeed, platelet-derived MPs induce the generation of reactive oxygen species by endothelial and smooth muscle cells and produce superoxide anion *via* the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase [38].

Based on previous studies that evidenced distinct cytoprotective and anticoagulant properties of aPC, we chose to modulate MP generation by continuous aPC infusion in CLP-donor rats. Endothelial and platelet MPs were significantly increased in aPC treated CLP-rats, while circulating leucocyte MPs were decreased. aPC pharmacological modulation of MP phenotype further reveals the specific dual property of MPs in the interplay between

inflammatory and coagulant responses during septic shock, thus suggesting that MP could constitute another pathway for aPC cytoprotection. MPs behave as vascular effectors probably partly through their ability to convey aPC bound to MP-borne EPCR. Notably, EPCR⁺-MPs and aPC⁺-MPs would alter vascular cell responses as mirrored by the modified MP phenotype in CLP-aPC-R rats. In the present study, we failed to detect MP-borne EPCR, possibly due to the aPC being already bound to EPCR. Another hypothesis would be the absence of an efficient anti-EPCR antibody. To our knowledge, there are no published data of rat EPCR antibodies.

Thus, we investigated whether MPs from aPC treated rats (CLP-aPC) bore active aPC as previously reported by Pérez-Casal *et al.* in-vitro [25]. We used a chromogenic substrate to detect aPC activity on MPs and showed an increased activity after aPC treatment both in sham and CLP rats, confirming the MP-mediated effects observed after aPC treatment. The decrease in aPC activity in CLP rats could be due to a deficit in PC reported during septic shock (production decrease and consumption) [1], with subsequent decrease in aPC activity on total and endothelial MPs compared to sham rats. Our data are consistent with those from Pérez-Casal *et al.* [13,19]. The effect of aPC depends on its cofactors: anticoagulant (PhtdSer and protein S as cofactors) or cytoprotective (EPCR and caveolin as cofactors). Moreover, PAR-1 can mediate opposite effects regarding its agonist: pro-inflammatory with thrombin and cytoprotective with aPC [39]. Recent works by Mosnier *et al.* highlight molecular mechanisms surrounding the PAR-1 paradox. Canonical cleavage by thrombin (Arg41) generates a N-terminal tethered ligand that begins with Ser42 while non canonical cleavage by aPC (Arg46) results in a new N-terminal tethered ligand that begins with Asn47. Differential cleavage due to biased agonism results in two distinct downstream signalling pathways, G-protein, ERK1/2 and RhoA (thrombin) or β -arrestin-2, PI3K/Akt and Rac1 (aPC) [24,40]. EPCR-bound aPC limits PAR-1 activation by thrombin and promotes PAR-1

relocalisation out of raft domains [41]. Interestingly, it was reported that EPCR is able to bind FVII(a) with a similar affinity as (a)PC. EPCR-bound FVII/FVIIa acts as a FVIIa scavenger limiting thrombin generation [42]. Thus, one could speculate that EPCR⁺-MPs disseminate the above scavenging abilities and contribute to cytoprotection.

In the present study, while inoculation of MPs from septic rats dramatically impairs recipient blood pressure, inoculation of MPs from aPC-treated septic rats results in different haemodynamic and biological patterns. MPs from aPC-treated septic rats prevent blood pressure collapse in recipient rats, which highlights the potential role of these MPs in haemodynamic improvement in donor rats. Haemodynamic variations could partly involve PAR-1 [13], possibly contributing to platelet-derived MP effects as reported elsewhere [14,43].

Nevertheless, aPC alters the phenotype and properties of septic shock-induced procoagulant MPs, since their inoculation to healthy recipients leads to a significant enhancement in endothelial and platelet MP release [7,34] and alteration of arterial pressure. Furthermore, while inoculation of MPs from septic rats dramatically impaired recipient blood pressure, MPs from aPC-treated septic rats that bear aPC are enriched in TXA₂ and lead to opposite and protective haemodynamic effects. TXA₂ is produced by many cells in response to local stimuli and is efficient within a short distance around its synthesis site. In this context, Mostefai *et al.* reported that MPs from septic patients reduced vascular hyporesponsiveness and that these effects were associated with increased TXA₂ production [44]. Altogether, pharmacological modulation by aPC would contribute to partial restoration of the haemodynamic parameters altered by septic MPs and prevent hypotension through TXA₂ delivery by EPCR⁺-MPs conveying aPC [44].

MPs from septic aPC-treated rats (CLP-aPC) blunt NF-κB activation in the MRAs, aorta and heart of healthy recipient rats, thereby limiting the pro-inflammatory pathway and

haemodynamic dysfunction. Western blot analysis further revealed an enhanced expression of COX-2 in the MRAs and aorta during septic shock, which is consistent with a direct MP arachidonic acid delivery, leading to endothelial COX-2 up-regulation and prostacyclin production as previously reported in-vitro [45].

In spite of these interesting experimental data, notably establishing endothelial properties, recombinant human aPC would not improve patients' survival and has therefore been recently removed from the available pharmacological tools [46]. However, despite the alledged lack of effectiveness of aPC treatment in septic shock, the sole purpose of this study was to evaluate whether a cytoprotective treatment like aPC could modulate MP-mediated effects during septic shock.

CONCLUSION

This experimental work demonstrates that MPs modulate arterial dysfunction possibly by conveying cytoprotective aPC effects. Further studies are needed to establish the respective contribution of anticoagulant and cytoprotective properties of MPs-borne endogenous aPC in sepsis, and to determine whether MPs bearing EPCR constitute a pharmacological target in the acute phase of septic shock.

Acknowledgements:

- We also thank the Alsatian Association for Respiratory Failure Help at Home (Association Des Insuffisants Respiratoires Alsace Lorraine, ADIRAL) for its financial and material support.
- We thank Dr. D. Rottenberg for his English proofreading of the manuscript.

REFERENCES

1. Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM. Septic shock. *Lancet* 2005;365:63-78.
2. Boisramé-Helms J, Kremer H, Schini-Kerth V, et al. Endothelial dysfunction in sepsis. *Current Vascular Pharmacology* 2013;11:150-60.
3. Fourrier F. Severe sepsis, coagulation, and fibrinolysis: dead end or one way? *Crit Care Med* 2012;40:2704-8.
4. Morel O, Morel N, Jesel L, et al. Microparticles: a critical component in the nexus between inflammation, immunity, and thrombosis. *Seminars in immunopathology* 2011;33:469-86.
5. Mause SF, Weber C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ Res* 2010;107:1047-57.
6. Morel O, Toti F, Hugel B, et al. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. *Curr Opin Hematol* 2004;11:156-64.
7. Meziani F, Delabranche X, Asfar P, et al. Bench-to-bedside review: circulating microparticles--a new player in sepsis? *Crit Care* 2010;14:236.
8. Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, et al. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood* 2000;95:930-5.
9. Mortaza S, Martinez MC, Baron-Menguy C, et al. Detrimental hemodynamic and inflammatory effects of microparticles originating from septic rats. *Crit Care Med* 2009;37:2045-50.
10. Berckmans RJ, Nieuwland R, Boing AN, et al. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb Haemost* 2001;85:639-46.
11. Rautou PE, Vion AC, Amabile N, et al. Microparticles, vascular function, and atherothrombosis. *Circ Res* 2011;109:593-606.
12. Egorina EM, Sovershaev MA, Olsen JO, et al. Granulocytes do not express but acquire monocyte-derived tissue factor in whole blood: evidence for a direct transfer. *Blood* 2008;111:1208-16.
13. Van Der Meijden PE, Van Schilfgaarde M, Van Oerle R, et al. Platelet- and erythrocyte-derived microparticles trigger thrombin generation via factor XIIa. *J Thromb Haemost* 2012;10:1355-62.
14. Mosnier LO, Zlokovic BV, Griffin JH. The cytoprotective protein C pathway. *Blood* 2007;109:3161-72.

15. Montes R, Diez J, Hermida J. Activated protein C: reasons to believe. *J Thromb Haemost* 2012;10:1733-5.
16. Sennoun N, Baron-Menguy C, Burbun M, et al. Recombinant human activated protein C improves endotoxemia-induced endothelial dysfunction: a blood-free model in isolated mouse arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;297:H277-82.
17. Sennoun N, Meziani F, Dessebe O, et al. Activated protein C improves lipopolysaccharide-induced cardiovascular dysfunction by decreasing tissular inflammation and oxidative stress. *Crit Care Med* 2009;37:246-55.
18. 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;2:1924-33.
19. Kerschen EJ, Fernandez JA, Cooley BC, et al. Endotoxemia and sepsis mortality reduction by non-anticoagulant activated protein C. *The Journal of experimental medicine* 2007;204:2439-48.
20. Mosnier LO, Zampolli A, Kerschen EJ, et al. Hyperantithrombotic, noncytoprotective Glu149Ala-activated protein C mutant. *Blood* 2009;113:5970-8.
21. Russo A, Soh UJ, Trejo J. Proteases display biased agonism at protease-activated receptors: location matters! *Molecular interventions* 2009;9:87-96.
22. Rezaie AR. The occupancy of endothelial protein C receptor by its ligand modulates the PAR-1 dependent signaling specificity of coagulation proteases. *IUBMB Life* 2011;63:390-6.
23. Weiler H. Multiple receptor-mediated functions of activated protein C. *Hamostaseologie* 2011;31:185-95.
24. Mosnier LO, Sinha RK, Burnier L, et al. Biased agonism of protease-activated receptor 1 by activated protein C caused by noncanonical cleavage at Arg46. *Blood* 2012;120:5237-46.
25. Perez-Casal M, Downey C, Fukudome K, et al. Activated protein C induces the release of microparticle-associated endothelial protein C receptor. *Blood* 2005;105:1515-22.
26. Perez-Casal M, Thompson V, Downey C, et al. The clinical and functional relevance of microparticles induced by activated protein C treatment in sepsis. *Crit Care* 2011;15:R195.
27. Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, et al. Cecal ligation and puncture. *Shock* 2005;24 Suppl 1:52-7.
28. Hugel B, Zobairi F, Freyssinet JM. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* 2004;2:1846-7.

29. Boulanger CM, Scoazec A, Ebrahimian T, et al. Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. *Circulation* 2001;104:2649-52.
30. Pfister SL. Role of platelet microparticles in the production of thromboxane by rabbit pulmonary artery. *Hypertension* 2004;43:428-33.
31. Tesse A, Martinez MC, Hugel B, et al. Upregulation of proinflammatory proteins through NF-kappaB pathway by shed membrane microparticles results in vascular hyporeactivity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:2522-7.
32. Dignat-George F, Camoin-Jau L, Sabatier F, et al. Endothelial microparticles: a potential contribution to the thrombotic complications of the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 2004;91:667-73.
33. Joop K, Berckmans RJ, Nieuwland R, et al. Microparticles from patients with multiple organ dysfunction syndrome and sepsis support coagulation through multiple mechanisms. *Thromb Haemost* 2001;85:810-20.
34. Delabranche X, Boisrame-Helms J, Asfar P, et al. Microparticles are new biomarkers of septic shock-induced disseminated intravascular coagulopathy. *Intensive Care Med* 2013.
35. Brodsky SV, Zhang F, Nasjletti A, et al. Endothelium-derived microparticles impair endothelial function in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286:H1910-5.
36. Densmore JC, Signorino PR, Ou J, et al. Endothelium-derived microparticles induce endothelial dysfunction and acute lung injury. *Shock* 2006;26:464-71.
37. Soriano AO, Jy W, Chirinos JA, et al. Levels of endothelial and platelet microparticles and their interactions with leukocytes negatively correlate with organ dysfunction and predict mortality in severe sepsis. *Crit Care Med* 2005;33:2540-6.
38. Janiszewski M, Do Carmo AO, Pedro MA, et al. Platelet-derived exosomes of septic individuals possess proapoptotic NAD(P)H oxidase activity: A novel vascular redox pathway. *Critical care medicine* 2004;32:818-25.
39. Sen P, Gopalakrishnan R, Kothari H, et al. Factor VIIa bound to endothelial cell protein C receptor activates protease activated receptor-1 and mediates cell signaling and barrier protection. *Blood* 2011;117:3199-208.
40. Bouwens EA, Stavenuiter F, Mosnier LO. Mechanisms of anticoagulant and cytoprotective actions of the protein C pathway. *J Thromb Haemost* 2013;11 Suppl 1:242-53.
41. Bae JS, Yang L, Rezaie AR. Lipid raft localization regulates the cleavage specificity of protease activated receptor 1 in endothelial cells. *J Thromb Haemost* 2008;6:954-61.

42. Ghosh S, Pendurthi UR, Steinoe A, et al. Endothelial cell protein C receptor acts as a cellular receptor for factor VIIa on endothelium. *J Biol Chem* 2007;282:11849-57.
43. Bhattacharya A, Cohen ML. Vascular contraction and relaxation to thrombin and trypsin: thrombomodulin preferentially attenuates thrombin-induced contraction. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;295:284-90.
44. Mostefai HA, Meziani F, Mastronardi ML, et al. Circulating microparticles from patients with septic shock exert protective role in vascular function. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178:1148-55.
45. Barry OP, Kazanietz MG, Pratico D, et al. Arachidonic acid in platelet microparticles up-regulates cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin formation via a protein kinase C/mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J Biol Chem* 1999;274:7545-56.
46. Ranieri VM, Thompson BT, Barie PS, et al. Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock. *N Engl J Med* 2012;366:2055-64.

LEGEND TO TABLES AND FIGURES

Table 1: Characteristics of septic and control rats, clinical records from the onset of septic shock to the end of the experiment and effect of activated protein C. Septic (CLP-aPC, CLP-NaCl) and control (sham-aPC, sham-NaCl) rats, were treated by aPC (CLP-aPC, sham-aPC) or 0.9% sodium chloride (CLP-NaCl, sham-NaCl). The baseline was recorded 18 hours after CLP or sham surgery and rats were monitored during 4 hours (from the 18th to the 22nd hours). Circulating MPs were measured as nanomolar phosphatidylserine equivalents (nM eq. PhtdSer) at the end of the experiment (22nd hour). MAP: mean arterial pressure, HR: heart rate, bpm: beat per minute, CBF: carotid blood flow, NE: norepinephrine, BE: base excess, HCO₃⁻: bicarbonates. N=16 for each subset. Data are expressed as mean ± SD, p<0.05: * vs. sham-NaCl, & vs. sham-aPC, # vs. CLP-NaCl, \$ vs. CLP-aPC.

Table 2: Activated protein C activity borne by microparticles from sham and CLP donor rats. aPC activity was measured in washed MP concentrates using a specific chromogenic substrate (n=6). Variations in optical density are expressed as mOD/hr: aPC activity without any normalisation, aPC activity normalised to the content of total MPs or of endothelial MPs. aPC: activated protein C, CLP: caecal ligation and puncture, OD: optical density. Data are expressed as mean ± SD, * p<0.05 vs. sham-NaCl and sham-aPC, # vs. CLP-aPC, \$ vs. sham-NaCl.

Table 3: Monitoring of healthy recipient rats (R-rats) inoculated with microparticles from septic and control rats treated by activated protein C. Recipients were monitored during 4 hours following inoculation with MPs from septic (CLP-aPC, CLP-NaCl) and control (sham-aPC, sham-NaCl) rats, treated by aPC (CLP-aPC, sham-aPC) or by 0.9 %

sodium chloride (CLP-NaCl, sham-NaCl). The baseline was recorded before inoculation. Circulating MPs were measured as nanomolar phosphatidylserine equivalents (nM PhtdSer eq.) at the end of the experiment (4th hour). MAP: mean arterial pressure, HR: heart rate, bpm: beat per minute, CBF: carotid blood flow, Data are expressed as mean \pm SD, $p < 0.05$: * vs. baseline, # vs. sham-NaCl-R, & vs. sham-aPC-R, \$ vs. CLP-aPC-R.

Figure 1: Protocol design. Left panel: in a first set of experiments, CLP rats were treated during 4 hours with aPC or vehicle (0.9% sodium chloride) and resuscitated using fluid challenge and norepinephrine to target a MAP value over 100 mmHg. MPs were collected at the end of the monitoring. Right panel: in a second set of experiments, concentrated and washed MPs were inoculated to healthy recipient rats (R-rats). R-Rats were monitored during 4 hours and received only hydration. At the end of the record, blood samples, the MRAs and heart were harvested. Circulating recipients' MPs were quantified and their cell origin determined. aPC: activated protein C, CLP: caecal ligation and puncture, MPs: microparticles.

Figure 2: aPC activity borne by MPs from sham and CLP donor rats. aPC activity was measured in washed MP concentrates using a specific chromogenic substrate (n=6). Variations in optical density are expressed as mOD/hr (optical density) per 0.1 pmol of PhtdSer. aPC activity was normalised to the content of total MPs (2a) or endothelial MPs (2b).

aPC: activated protein C, CLP: caecal ligation and puncture, MPs: microparticles. Data are expressed as mean \pm SD; * $p < 0.05$ vs. sham-NaCl and sham-aPC, # vs. CLP-aPC, \$ vs. sham-NaCl.

Figure 3: Mean arterial pressure (MAP) in healthy recipient rats (R-rats). MAP was monitored during the 4 hours following microparticles inoculation. R-rats received MPs from sham-NaCl, sham-aPC, CLP-NaCl or CLP-aPC rats (n=10-12); data are expressed as mean \pm SD; * $p < 0.05$ vs. sham-NaCl-R, sham-aPC-R and CLP-aPC-R.

Figure 4: Thromboxane A₂ (TXA₂) content in microparticles isolated from donor rats and the effect of activated protein C. The TXA₂ content was measured by ELISA in MPs collected at the end of CLP-induced sepsis or in sham rats. The aPC treatment or the vehicle (0.9% NaCl) was applied during the 4 hours following the onset of septic shock. Septic rats underwent resuscitation (n=12 for each subset). Data are expressed as mean ± SD; * p<0.05 vs. sham-NaCl, sham-aPC and CLP-NaCl.

Figure 5: NF-κB p65/RelA and pIκB-α expressions in mesenteric resistance arteries (MRAs) and heart tissues of recipient rats inoculated with MPs: MRAs (a, c) and heart (b, d) tissue homogenates from sham-NaCl-R, sham-aPC-R, CLP-NaCl and CLP-aPC-R rats were collected 4 hours following MP inoculation and loaded on 9% SDS-PAGE gels. NF-κB p65/RelA and pIκB-α were identified by immunoblotting using specific antibodies. Densitometry images are representative of six separate blots and mean ± SD densitometry values are expressed in arbitrary units (A.U.) relative to β-tubulin content. * p<0.05 vs. sham-NaCl-R, sham-aPC-R and CLP-aPC-R.

Figure 6: COX-1 and COX-2 expression in mesenteric resistance arteries (MRAs) of recipient rats inoculated with MPs. MRAs tissue homogenates from sham-NaCl-R, sham-aPC-R, CLP-NaCl and CLP-aPC-R rats were collected 4 hours after MP inoculation and loaded on 9% SDS-PAGE gels. The expression of COX-1 and COX-2 was assessed by Western immunoblotting using specific antibodies. Densitometry images are representative of six separate blots and mean ± SD densitometry values are expressed in arbitrary units (A.U.) relative to β-tubulin content. # p<0.05 vs. CLP-NaCl-R.

Figure 7: iNOS expression in mesenteric resistance arteries (MRAs) of recipient rats inoculated with MPs. MRA lysates from healthy recipient rats (R-rats) were obtained 4 hours after MP inoculation and immunoblots performed to assess iNOS expression. Densitometry images are representative of six separate blots and mean \pm SD densitometry values are expressed in arbitrary units (A.U.) relative to β -tubulin content. * $p < 0.05$ vs. sham-NaCl-R, sham-aPC-R and CLP-aPC-R.

Table 1.

	Sham-NaCl	Sham-aPC	CLP-NaCl	CLP-aPC
Body Weight (g)	328 ± 8	336 ± 4	324 ± 6	328 ± 5
MAP (mmHg)				
Baseline	115 ± 5	110 ± 3	79 ± 3 ^{*&}	76 ± 3 ^{*&}
End of experiment	115 ± 3	114 ± 3	59 ± 6 ^{*&}	72 ± 10 ^{*&}
HR (bpm)				
Baseline	362 ± 8	341 ± 6	412 ± 14	386 ± 12
End of experiment	375 ± 9	341 ± 3	350 ± 33	376 ± 21
CBF (mL/min)				
Baseline	9.4 ± 0.4	8.5 ± 0.5	5.9 ± 0.4 ^{*&}	5.3 ± 0.6 ^{*&}
End of experiment	6.4 ± 0.5	6.6 ± 0.3	4.3 ± 0.4 ^{*&}	4.8 ± 0.4 ^{*&}
NaCl (mL/h)	0.9 ± 0	0.9 ± 0	3.1 ± 0.2 ^{*&}	2.5 ± 0.3 ^{*&}
NE (µg/kg/min)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	7.8 ± 0.4 ^{*&\$}	3.3 ± 0.7 ^{*&#}
BE (mM)	0.5 ± 0.2	0.2 ± 0.3	- 4.6 ± 0.2 ^{*&}	- 6.5 ± 1.7 ^{*&#}
HCO₃⁻ (mM)	24.4 ± 0.3	23.8 ± 0.2	17.6 ± 0.5 ^{*&}	16.7 ± 1.6 ^{*&}
Lactate (mmol/L)	1.41 ± 0.10	1.41 ± 0.10	4.81 ± 0.30 ^{*&}	5.35 ± 1.20 ^{*&}
Survival (min)	240 ± 0	240 ± 0	176 ± 15	213 ± 14
Death (number)	0	0	9 ^{*&\$}	5 ^{*&#}
Total MPs (nM)	6.3 ± 4.4	3.6 ± 1.4	24.6 ± 7.4 ^{*&}	13.6 ± 4.3 ^{&}
Platelet MPs CD61+ (nM)	1.2 ± 0.6	0.9 ± 0.5	3.9 ± 1.1 ^{*&\$}	5.8 ± 1.3 ^{*&#}
Leucocyte MPs CD45+ (nM)	0.7 ± 0.5	0.6 ± 0.3	6.2 ± 2.1 ^{*&\$}	2.9 ± 1.7 ^{*&#}
Endothelial MPs CD54+ (nM)	0.7 ± 0.4	0.3 ± 0.2	2.6 ± 1.0 ^{*&\$}	4.6 ± 0.8 ^{*&#}
Erythrocyte MPs (nM)	0.3 ± 0.4	0.6 ± 0.6	1.2 ± 1.6	1.0 ± 1.1

Table 2.

	Sham-NaCl	Sham-aPC	CLP-NaCl	CLP-aPC
Non-normalised aPC activity (mOD/hr)	278.7 ± 34.7	267.7 ± 17.6 [#]	118.8 ± 15.1 ^{*#}	207.6 ± 21.6 [*]
aPC activity (mOD/hr) normalised to total MPs	44.2 ± 5.5	74.4 ± 4.9 ^{S#}	4.4 ± 0.5 ^{*#}	15.3 ± 1.6 [*]
aPC activity (mOD/hr) normalised to endothelial MPs	398.1 ± 49.6	965.3 ± 86.1 ^{S#}	41.3 ± 4.6 ^{*#}	34.8 ± 4.8 [*]

Table 3.

	Sham-NaCl-R n=10	Sham-aPC-R n=10	CLP-NaCl-R n=12	CLP-aPC-R n=12
Body Weight (g)	320 ± 9	317 ± 11	314 ± 6	314 ± 10
MAP (mmHg)				
Baseline	116 ± 2	111 ± 2	118 ± 2	111 ± 3
End of experiment	107 ± 2	120 ± 4	83 ± 9 ^{*#&\$}	120 ± 6
HR (bpm)				
Baseline	360 ± 8	358 ± 12	364 ± 9	371 ± 5
End of experiment	385 ± 7	377 ± 11	410 ± 11 [*]	378 ± 9
CBF (mL/min)				
Baseline	8.4 ± 0.4	7.8 ± 0.5	6.9 ± 0.4	6.3 ± 0.6
End of experiment	7.4 ± 0.5	6.6 ± 0.3	3.3 ± 0.4 [*]	5.9 ± 0.4
Lactate (mmol/L)	1.2 ± 0.1	1.4 ± 0.1	0.6 ± 0.1	1 ± 0.1
Total MPs (nM)	7.4 ± 3.42	9.1 ± 7.0	9.4 ± 5.5	13.4 ± 3.6
Platelet MPs CD61+ (nM)	1.8 ± 0.8 ^{\$}	2.1 ± 1.4 ^{\$}	3.0 ± 0.9	4.5 ± 1.3 ^{#&}
Leucocyte MPs CD45+ (nM)	1.4 ± 0.7	1.3 ± 2.1	2.6 ± 1.7	2.9 ± 1.8
Endothelial MPs CD54+ (nM)	1.2 ± 0.8 ^{\$}	2.1 ± 1.3	1.2 ± 1.3 ^{\$}	2.7 ± 1.5
Erythrocyte MPs (nM)	0.3 ± 0.4	1.0 ± 1.4	0.2 ± 0.3	0.1 ± 0.3

Figure 1.

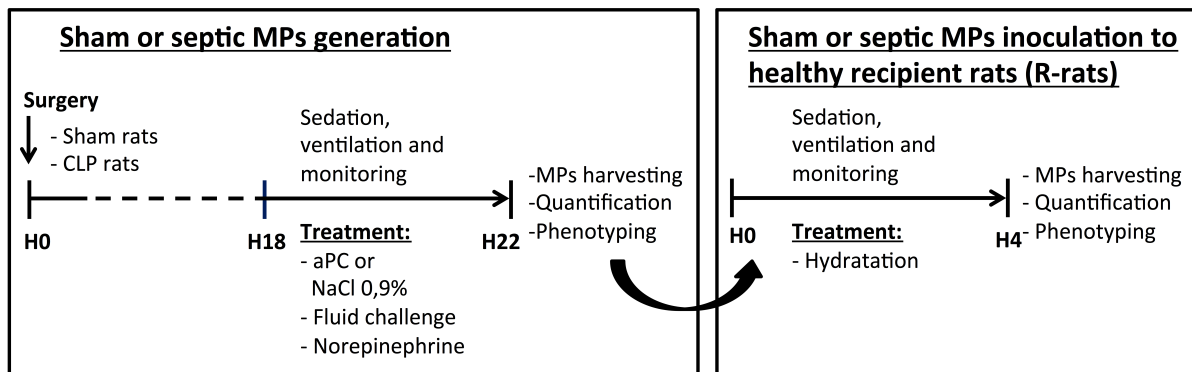


Figure 2.

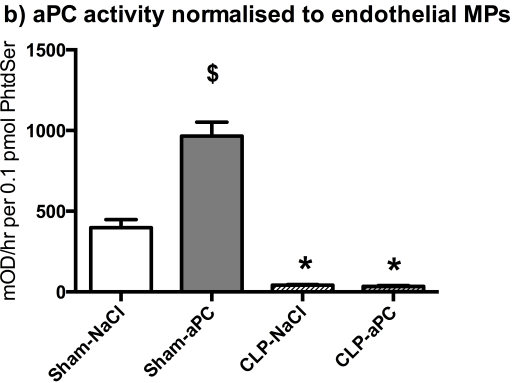
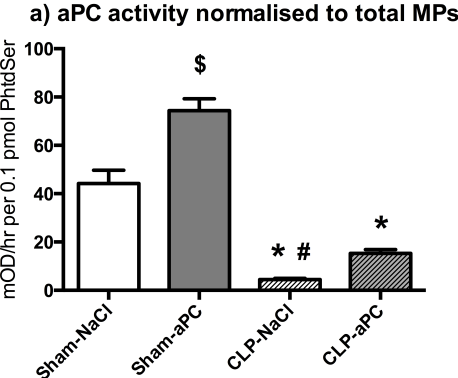


Figure 3.

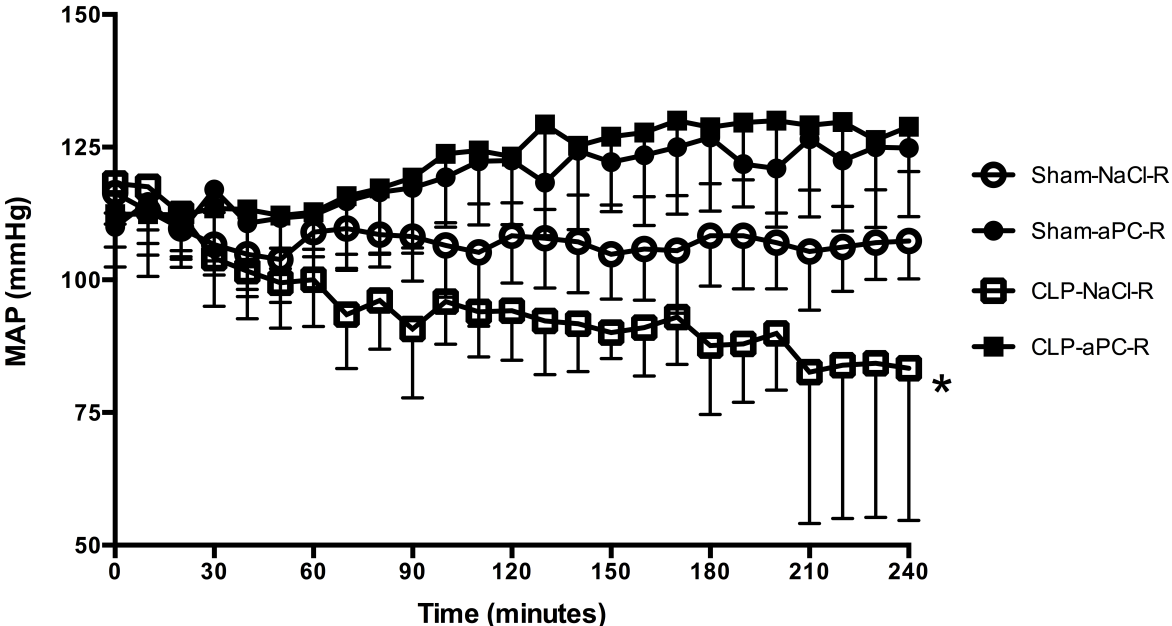


Figure 4.

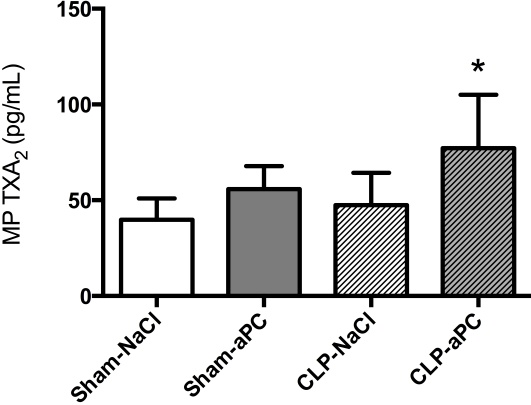


Figure 5.

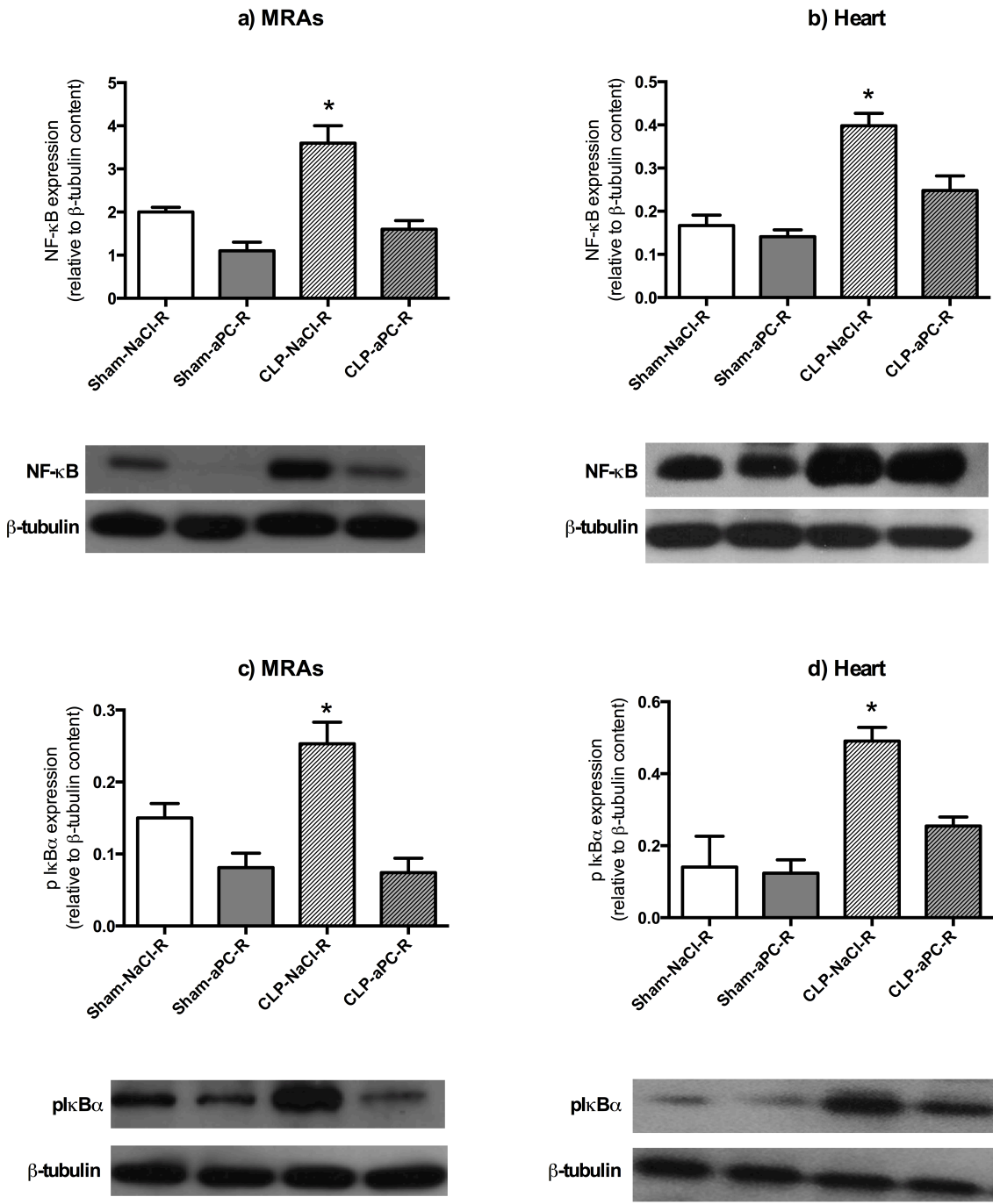


Figure 6.

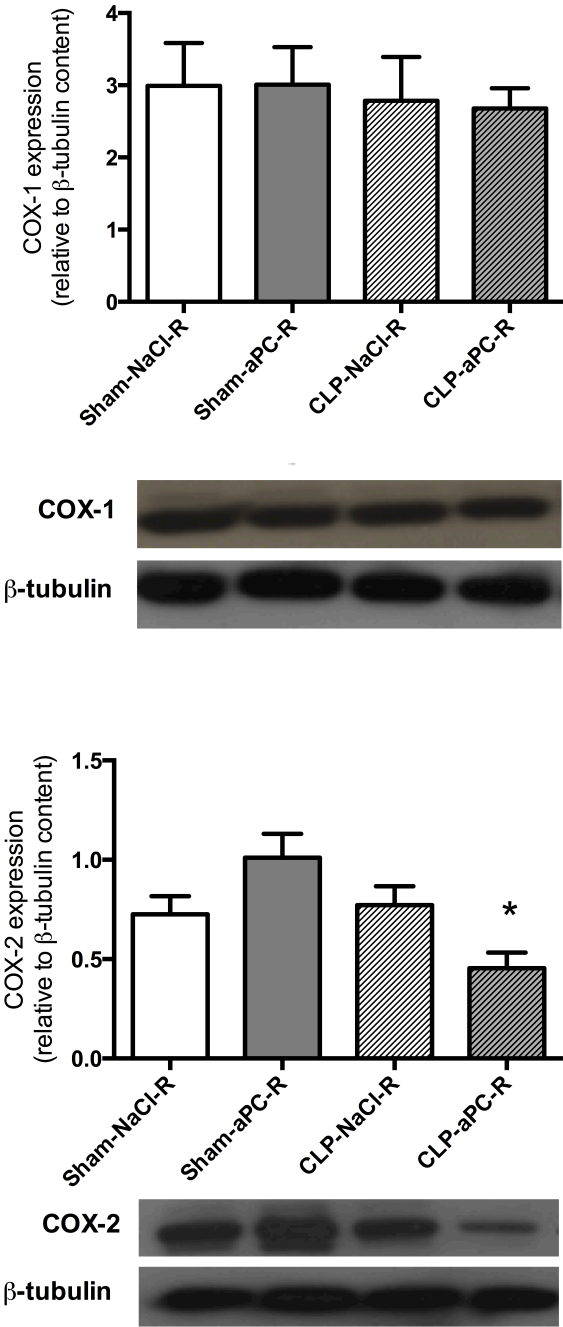
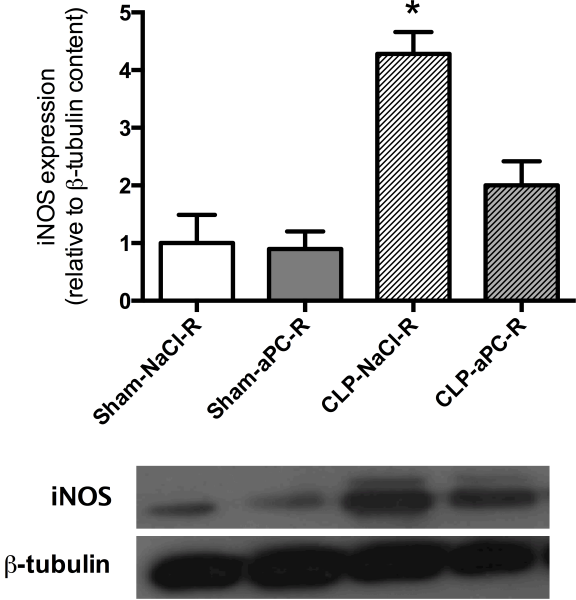


Figure 7.



EXTRA TABLES

What is known on this topic:

- Microparticles are cellular effectors conveying cell-to-cell biological signals.
- Microparticles play a pro-inflammatory and procoagulant detrimental role in the vascular dysfunction of septic shock.
- Recombinant human activated protein C induces the generation of endothelial microparticles bearing activated protein C and its receptor EPCR.
- Recombinant human activated protein C has anticoagulant and cytoprotective effects through EPCR signalling.

What this paper adds:

- Septic shock increases procoagulant microparticles generation *in vivo*.
- Activated protein C is borne by circulating microparticles.
- Activated protein C is able to reduce the generation of microparticles, alter their phenotype, thus modify vascular cell responses.
- Microparticles are relevant pharmacological targets when trying to modulate arterial pressure during septic shock.

**Microparticles are new biomarkers of septic shock-induced disseminated
intravascular coagulopathy**

Xavier DELABRANCHE^{1,2} (MD), Julie BOISRAMÉ-HELMS^{1,2} (MD), Pierre ASFAR³ (MD, PhD), Asaël BERGER^{1,2} (MD), Yoganaden MOOTIEN⁴ (MD), Thierry LAVIGNE⁵ (MD), Lélia GRUNEBAUM⁶ (MD), François LANZA⁷ (PhD), Christian GACHET⁷ (MD, PhD), Jean-Marie FREYSSINET⁸ (PhD), Florence TOTTE⁹ (PhD), Ferhat MEZIANI^{1,2} (MD, PhD)

Intensive Care Medicine 2013

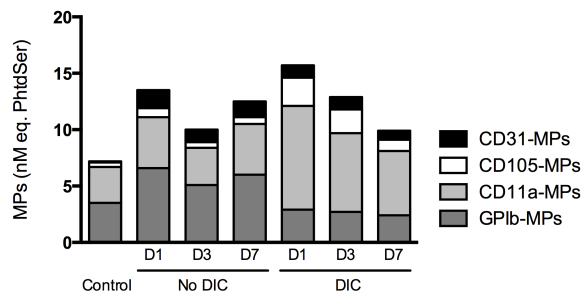
(accepté le 4 juin 2013 – doi :10.1007/s00134-013-2993)

Les MPs ont été dès 2000 associées à la coagulation intravasculaire disséminée dans un cadre nosologique particulier : le purpura fulminans et chez un nombre réduit de patients (Nieuwland *et al*, 2000). Il s'agit en effet d'une forme très particulière de CIVD du fait de la rapidité des manifestations thrombotiques et hémorragiques associant des lésions ischémiques diffuses, surtout nettes au niveau des extrémités (lésions en carte de géographie) et des lésions hémorragiques « en nappe » au niveau des points de ponction, résultant d'une défibrination complète. Le syndrome associé à une thrombopénie profonde, des temps de coagulations très allongés, un taux de fibrinogène bas et la présence de D-dimères à un titre très élevé. Ce syndrome est observé au cours des infections à *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Capnocytophaga canimorsus*, mais aussi fièvres hémorragiques liées aux virus Ebola et Marburg. Un tel tableau est heureusement rare car associé à une mortalité très élevée, mais aussi à des séquelles majeures avec amputations.

Au cours de ce travail, Nieuwland et ses collaborateurs mettaient clairement en évidence la présence de MPs procoagulantes au cours des méningococcémies associées à un purpura fulminans, mais n'apportaient pas d'informations sur les formes moins « sévères » de CIVD ni sur les patients présentant un choc septique sans CIVD. Ceci a été le point de départ de ce travail de recherche clinique où nous avons cherché à caractériser les MPs au cours du choc septique chez l'homme. Il a porté sur 100 patients admis dans 3 services français de réanimation médicale (CHU de Strasbourg – Nouvel Hôpital Civil, CHU d'Angers et CH de Mulhouse) pour choc septique ayant fait l'objet d'un projet hospitalier de recherche clinique (PHRC 2002 N°4649).

Nous avons ainsi pu d'une part confirmer l'activation de l'hémostase au cours du choc septique indépendamment du diagnostic de CIVD. De plus, il apparaît clairement que les paramètres usuels ne permettent pas le diagnostic de CIVD hormis en les associant au sein d'un score. L'utilisation de dosages plus spécifiques tels que les monomères de fibrine, l'antithrombine ou la protéine C ne permet pas de discriminer les populations à l'admission, et il a surtout été montré une évolution cinétique différente, avec un « retard » de correction à J3 des anomalies présentes à l'admission. Les MPs étaient augmentées chez les patients en choc septique, avec une valeur moyenne triple de celle observée chez des témoins sains.

Ainsi, les patients en CIVD, thrombopéniques, présentaient un taux de phospholipides procoagulants circulants maintenu, pouvant rendre partiellement compte de la faible incidence des manifestations hémorragiques au cours des CIVD « septiques ». De plus, on observait un changement phénotypique majeur : alors que la majorité des MPs étaient d'origine plaquettaire chez les sujets sains et les patients en



choc septique exempts de CIVD, la contribution plaquettaire diminuait au cours de la CIVD au *pro rata* de la thrombopénie. Par contre, on pouvait mettre en évidence une forte activation leucocytaire avec une augmentation de la vésiculation induite (CD11a-MPs/leucocytes) à

J1 et surtout l'apparition d'une hyperleucocytose majeure à J3 et J7 alors que l'activation revenait à une valeur basale, permettant ainsi de maintenir un contingent élevé de MPs leucocytaires au cours de l'évolution. Enfin, on observait une activation très précoce et spécifique de l'endothélium avec une forte augmentation des MPs porteuses de l'endogline (CD105-MPs), protéine clef de l'angiogenèse et de l'ischémie-reperfusion. Parallèlement, l'apoptose endothéliale (CD31-MPs) semblait moins marquée en présence de CIVD.

Ces résultats, bien que préliminaires, soulignent l'importance d'une approche cellulaire de l'hémostase et non plus uniquement « biochimique » qui pourrait contribuer à une meilleure compréhension de l'atteinte vasculaire au cours du choc septique. Un brevet d'innovation pour le diagnostic et le suivi de la CIVD au cours du choc septique utilisant les MPs a été déposé avec le soutien des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, l'Université de Strasbourg et la STAT Connectus.

La publication dans *Intensive Care Medicine* s'est accompagnée de celle d'un éditorial (Zafrani *et al*, 2013) et d'une mise au point sur le rôle de l'endothélium au cours du choc septique (Levi & van der Pol, 2013).

Xavier Delabranche
Julie Boisramé-Helms
Pierre Asfar
Asaël Berger
Yoganaden Mootien
Thierry Lavigne
Lélia Grunebaum
François Lanza
Christian Gachet
Jean-Marie Freyssinet
Florence Toti
Ferhat Meziani

Microparticles are new biomarkers of septic shock-induced disseminated intravascular coagulopathy

Received: 8 May 2013
Accepted: 4 June 2013

© Springer-Verlag Berlin Heidelberg and ESICM 2013

Clinicaltrials.gov identifier NCT 01604551

Electronic supplementary material

The online version of this article (doi:10.1007/s00134-013-2993-x) contains supplementary material, which is available to authorized users.

X. Delabranche · J. Boisramé-Helms · A. Berger · F. Meziani (✉)
Service de Réanimation Médicale, Nouvel Hôpital Civil, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 1, Place de l'Hôpital, 67091 Strasbourg Cedex, France
e-mail: ferhat.meziani@chru-strasbourg.fr
Tel.: +33-3-69550434
Fax: +33-3-69551859

X. Delabranche · J. Boisramé-Helms · A. Berger · F. Meziani
EA 3072, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

P. Asfar
Service de Réanimation Médicale et Médecine Hyperbare, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, Angers, France

Y. Mootien
Service de Réanimation Médicale, Centre Hospitalier de Mulhouse, Mulhouse, France

T. Lavigne
EA 4438, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

L. Grunebaum
Laboratoire d'hématologie et Hémostase, Hôpital de Hautepierre, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

F. Lanza · C. Gachet
UMR S949 INSERM, Université de Strasbourg et Établissement Français du Sang-Alsace, Strasbourg, France

J.-M. Freyssinet
U770 INSERM, Faculté de Médecine, Université Paris-Sud, Le Kremlin-Bicêtre, Orsay, France

F. Toti
UMR 7213 CNRS, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, Illkirch, France

Abstract Purpose: Septic shock-induced disseminated intravascular coagulopathy (DIC) contributes to multiple organ failure. Mechanisms governing vascular responses to open occurrence of DIC have not yet been established. Circulating plasma microparticles (MPs), released upon cell stress, constitute a catalytic procoagulant surface and are surrogates of vascular cell activation/injury. Herein, MPs were assessed as possible markers of haemostatic and vascular

dysfunction in the DIC time course. **Methods:** One hundred patients with septic shock from three ICUs were enrolled and their haemostatic status evaluated at admission (D1), D2, D3 and D7. Circulating procoagulant MPs were isolated, quantified by prothrombinase assay and their cellular origin determined. DIC diagnosis was made according to the JAAM 2006 score. **Results:** Ninety-two patients were analysed and 40 had DIC during the first 24 h. Routine clotting times and factor/inhibitor activity did not allow assessing vascular cell involvement. At admission, thrombin generation and fibrinolysis were observed in both groups while impaired fibrin polymerisation was evidenced only in DIC patients. Sustained thrombin generation persisted over time in both groups at D7. While total microparticle concentrations were in the same range regardless of DIC diagnosis, specific phenotypes were already detected at admission in DIC patients. Endothelial- and leucocyte-derived MPs were higher in DIC while an increased soluble glycoprotein V/platelet ratio was delayed, underscoring the first involvement of endothelial cells and leucocytes whereas platelet activation was delayed. Endothelium-derived CD105-MPs (OR 6.55) and CD31-MPs (OR 0.49) were strongly

associated with early DIC in multivariate analysis.

Conclusion: Endothelial-derived microparticles are relevant biomarkers

of septic shock-induced DIC and could be used to evaluate early vascular injury.

Keywords Septic shock · Disseminated intravascular coagulopathy · Microparticles · Endothelium · JAAM score

Introduction

Septic shock is a life-threatening disorder with a host inflammatory response leading to multiple organ dysfunction syndrome (MODS) [1]. Coagulation activation has dual consequences with bacterial containment and thrombotic microangiopathy, eventually evolving to disseminated intravascular coagulopathy (DIC), which is frequently associated with MODS [2, 3]. Furthermore, assessment of both inflammation and haemostasis remains difficult because of major disturbances in regulatory loops [4]. According to a recent review by Gando et al. [5], the DIC paradigm can be viewed as follows: “the blood of patients with DIC is hypercoagulable in the circulation and difficult to clot outside the vessels”.

In clinical settings, the mechanisms governing vascular responses and the occurrence/resolution of DIC have not yet been deciphered. There are currently two coexisting DIC scoring systems, one from the International Society for Thrombosis and Haemostasis (ISTH overt 2001) [6] and the other from the Japanese Association for Acute Medicine (JAAM 2006) [7]; both were evaluated in critically ill patients [8–10].

The endothelium plays a central role in the pathophysiology of septic shock contributing to disseminated inflammation and coagulation [11]. Interplay among the neutrophils, endothelium, monocytes and platelets leading to endothelial injury and microvascular thrombosis is well established in the pathogenesis of both DIC and systemic inflammation and finally MODS [4].

Microparticles (MPs) are plasma membrane submicron fragments with procoagulant properties released from stressed cells. They disseminate membrane and cytoplasmic bioactive molecules from parental to neighbouring cells [12, 13]. MP procoagulant activity is linked to phosphatidylserine (PhtdSer), an aminophospholipid contributing to additional catalytic surface for the assembly of vitamin K-dependent blood coagulation factors and to the eventual presence of tissue factor (TF). Elevated levels of MPs were first associated with thrombotic disorders and further detected as indicators of vascular stress including coagulopathy, vascular occlusion, immune evasion and infection [14, 15]. Circulating MPs have been reported during septic shock in several clinical studies [16–18] and in experimental animal

models [19, 20] where MPs could behave as pathogenic markers by providing procoagulant surfaces and by acting as inflammatory vascular mediators [21].

The present study was designed to assess phenotypic and pathophysiological implications of procoagulant PhtdSer-bearing MPs as strong biomarkers of septic shock-induced vascular dysfunction and DIC.

Patients and methods

Patients

One hundred consecutive adult patients (18–85 years old) referred for septic shock [22] and treated with norepinephrine and/or epinephrine were prospectively enrolled after admission in medical intensive care units (ICU) from three tertiary hospitals. End-stage heart (NYHA class IV), liver (Child-Pugh classification C) or evolving cancerous diseases were excluded. The Strasbourg University Hospital Ethics Committee approved this multicentre study. Informed consent was obtained from the patient or relatives at admission and confirmed by the patient. Care was provided without a specific therapeutic intervention (Table 1 and supplementary data).

Blood collection and laboratory analysis

Sampling was performed as soon as possible after patients fulfilled septic shock criteria to avoid therapeutic bias (D1) and thereafter on the following mornings (days 2, 3 and 7). Platelet poor plasma (PPP) was obtained after two centrifugations at $2,500 \times g$ for 15 min and samples were frozen at -80°C . Haemostasis was analysed on STA-R[®] Evolution (Stago) with standard commercial reagents (see supplementary data). Platelet and leucocyte counts were measured daily. Tissue-type plasminogen activator (t-PA), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), interleukin-6 (IL-6), IL-10, TNF- α , monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), sP-selectin and sE-selectin were quantified by ELISA-derived FlowCytomix[™] beads (Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria). Soluble platelet glycoprotein V (sGPV) was quantified by ELISA (Stago).

Table 1 Patient characteristics

	Total (N = 92)	No DIC (N = 52)	DIC (N = 40)	<i>p</i> value
Characteristics				
Male sex, <i>N</i> (%)	59 (64.1)	33 (63.5)	26 (65.0)	0.97
Age, years	61.5 ± 15.0	62.3 ± 14.4	60.5 ± 15.9	0.58
SAPS II	57.5 ± 18.1	51.9 ± 14.3	64.9 ± 20.0	<0.01
Mortality day 7, <i>N</i> (%)	15 (16.3)	5 (9.6)	10 (25.0)	0.09
Mortality day 28, <i>N</i> (%)	27 (29.3)	15 (28.8)	12 (30.0)	0.91
Organ failure				
SOFA at admission	9.9 ± 3.0	8.5 ± 2.1	11.8 ± 3.0	<0.01
Respiratory failure, <i>N</i> (%)	85 (92.4)	46 (88.5)	39 (97.5)	0.23
Acute renal failure, <i>N</i> (%)	52 (56.5)	19 (36.5)	33 (82.5)	<0.01
Hepatic failure, <i>N</i> (%)	7 (7.6)	2 (3.8)	5 (12.5)	0.24
Coma	23 (25.0)	10 (19.2)	13 (32.5)	0.22
Site of infection				
Pneumonia	49 (53.3)	33 (63.5)	16 (40.0)	<0.01
Urinary	13 (14.1)	7 (13.5)	6 (15.0)	0.03
Abdominal	13 (14.1)	8 (15.4)	5 (12.5)	0.83
Bacteraemia	9 (9.8)	1 (1.9)	8 (20.0)	0.69
Unknown	12 (13.3)	3 (5.8)	9 (22.5)	0.01
Microorganism				
Gram-positive cocci	27 (29.3)	11 (21.2)	16 (40.0)	0.03
Enterobacteriae	20 (21.7)	12 (23.1)	8 (20.0)	0.50
Other gram-negative bacilli	13 (14.1)	8 (15.4)	5 (12.5)	
Unknown	32 (34.8)	21 (40.4)	11 (27.5)	
Therapy				
Renal replacement therapy, <i>N</i> (%)	35 (38.0)	13 (25.0)	22 (55.0)	<0.01
Norepinephrine, <i>N</i> (%)	91 (98.9)	52 (100.0)	39 (97.5)	0.99
Epinephrine, <i>N</i> (%)	7 (7.6)	2 (3.8)	5 (12.5)	0.25
Dobutamine, <i>N</i> (%)	21 (22.8)	9 (17.3)	12 (30.0)	0.15
Fresh frozen plasma, <i>N</i> (%)	22 (23.9)	4 (7.7)	18 (45.0)	<0.01
Platelet concentrate, <i>N</i> (%)	9 (9.8)	1 (1.9)	8 (20.0)	0.01
Heparin, <i>N</i> (%)	54 (58.7)	35 (67.3)	19 (47.5)	0.09
Drotrecogin alfa [activated], <i>N</i> (%)	16 (17.4)	3 (5.8)	13 (32.5)	<0.01

Bold *p* values refer to the global assessment of differences among a group of parameters

DIC scoring

DIC scores were calculated according to the ISTH 2001 “overt” and JAAM 2006 [6, 7]. Early DIC was confirmed if the JAAM (based on a dynamic evaluation of platelet count and taking into account the inflammatory response in critically ill patients) score was 4 or higher during the first 24 h at admission (D1) and/or at D2.

Microparticle analysis

cProcoagulant MPs were measured by prothrombinase assay and the results were expressed as nanomolar phosphatidylserine equivalents (nM eq. PhtdSer) (see supplementary data) [23]. The MP phenotype was determined using biotinylated relevant monoclonal antibodies instead of annexin-5: anti-GPIb (platelets), anti-CD11a (leucocytes), anti-CD62E (E-selectin, stimulated endothelial cells), anti-CD31 (apoptotic endothelial cells) and anti-CD105 (stimulated endothelial cells). The normal range in healthy volunteers was previously established in our laboratory [24].

Statistical analysis

Categorical variables were described as frequency, and comparison was performed by the χ^2 test or Fisher's exact test. Quantitative data were expressed as mean and standard deviation and analysed with the non-parametric Kruskal-Wallis test. Repeated measures were analysed with ANOVA. When indicated, a linear mixed model and two-way ANOVA including post hoc analyses were performed using a *t* test with Bonferroni correction for multiple comparisons. Prior to performing this analysis, variables were assessed for normality and non-normally distributed variables were transformed using logarithmic, square root, inverse or exponential transformations. Multiple logistic regression models, which excluded JAAM-related parameters, were performed to explain the occurrence of DIC at D1. Cohen's kappa coefficient was used to measure inter-rater agreement between JAAM 2006 and ISTH 2001 overt DIC scores. All statistics were performed with the MedCalc™ software, version 12.5.0 (Ostend, Belgium). *p* < 0.05 was considered statistically significant. For data presentation in figures, the non-parametrically distributed variables are presented as median values with interquartile range.

Results

Patients

Main characteristics of the 92 analysed patients are summarised in Table 1. Eight patients were excluded (six for missing or distorted samples and two for unknown exclusion criteria at admission). All patients fulfilled septic shock criteria at admission. We did not find differences in care and treatments between the centres. According to the JAAM 2006 score, 40 patients (44 %) met the early DIC criteria (30 at D1 and 10 at D2). Of note, Cohen's kappa coefficient between the JAAM 2006 and ISTH scores was 0.71 (good) and 34 patients with early DIC were diagnosed by both scoring systems. Patients with early DIC were more severely ill with higher SAPS2 and SOFA scores at admission ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively). In these latter patients, acute renal failure during the ICU stay was more frequent ($p < 0.001$). At admission (D1), plasma inflammatory markers (IL-6, IL-10, MCP-1, TNF α and CRP) were dramatically increased in all patients ($p < 0.05$) and significantly higher in early DIC ($p < 0.05$) except for TNF α and CRP (see supplementary data). Microorganism genus was not associated with DIC diagnosis ($p = 0.50$) (Table 1). Of note, while pneumonia was less frequent ($p = 0.03$) during DIC, bacteraemia was significantly associated with DIC (among these, four had pneumonia, two had pyelonephritis and one had a catheter infection).

Haemostasis and septic shock

Prothrombin time was increased with subsequent low prothrombin activity occurring to a similar extent in all patients with or without DIC. Although dramatically elevated in DIC patients, D-dimer levels were increased in all patients and remained at a high range until D7. Fibrinogen, a parameter not taken into account by the JAAM 2006 score, was increased in nearly all patients and was < 1 g/l in only one patient at admission. JAAM DIC scores remained < 4 in almost all non-DIC patients ($p = 0.61$ D1–D7) and were lowered in DIC patients ($p = 0.04$).

Interestingly, an early rise in prothrombin F1+2 (Fig. 1a) and elevated fibrin monomers (Fig. 1b) were both observed, confirming early thrombin generation and fibrin formation, whereas decreased AT and PC revealed the consumption of natural coagulation inhibitors. In both the non-DIC and DIC groups, sustained thrombin generation and fibrinolysis persisted over time despite supportive care and restored coagulation factors and inhibitors. Nevertheless, delayed AT and PC restoration was observed in DIC patients ($p < 0.05$ for time course D1–D7) (see supplementary data). Moreover, the PAI-1 plasma concentration was not significantly different in DIC and returned to baseline at D7 ($p < 0.05$) with delayed improvement when DIC was present (Fig. 1c). Truly soluble E-selectin was elevated in both groups and at the upper range during DIC ($p = 0.02$), highlighting endothelial stress (Fig. 1d).

Fig. 1 Time-course of thrombin and fibrin formation, fibrinolysis and selectins in DIC and non-DIC patients. Results are shown in white (no DIC) or grey (early DIC) whisker boxes (horizontal line inside the box median, upper and lower box limits 25–75th percentiles and T-bars 10–90th percentiles, respectively). Dashed lines correspond to reference values. Statistical analyses represent differences of repeated measures between patients with early or without DIC (DIC vs. no DIC) and differences of time-dependent evolution during ICU stay (days 1, 3 and 7 when available). **a** Prothrombin fragments 1+2; **b** fibrin monomers; **c** plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1); **d** soluble E-selectin

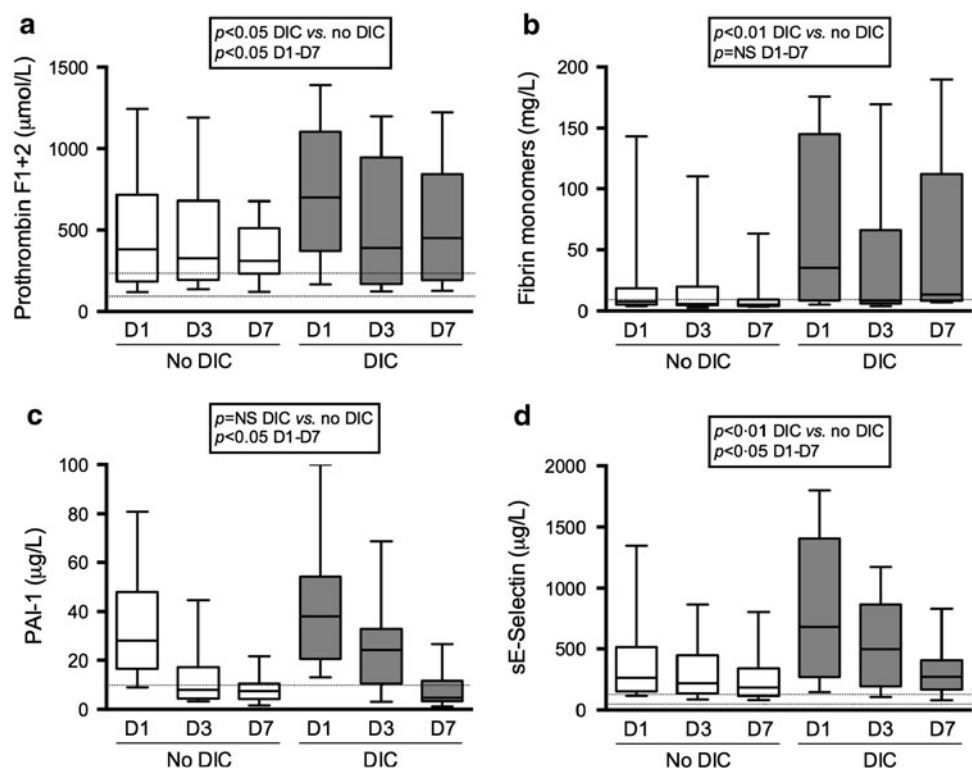
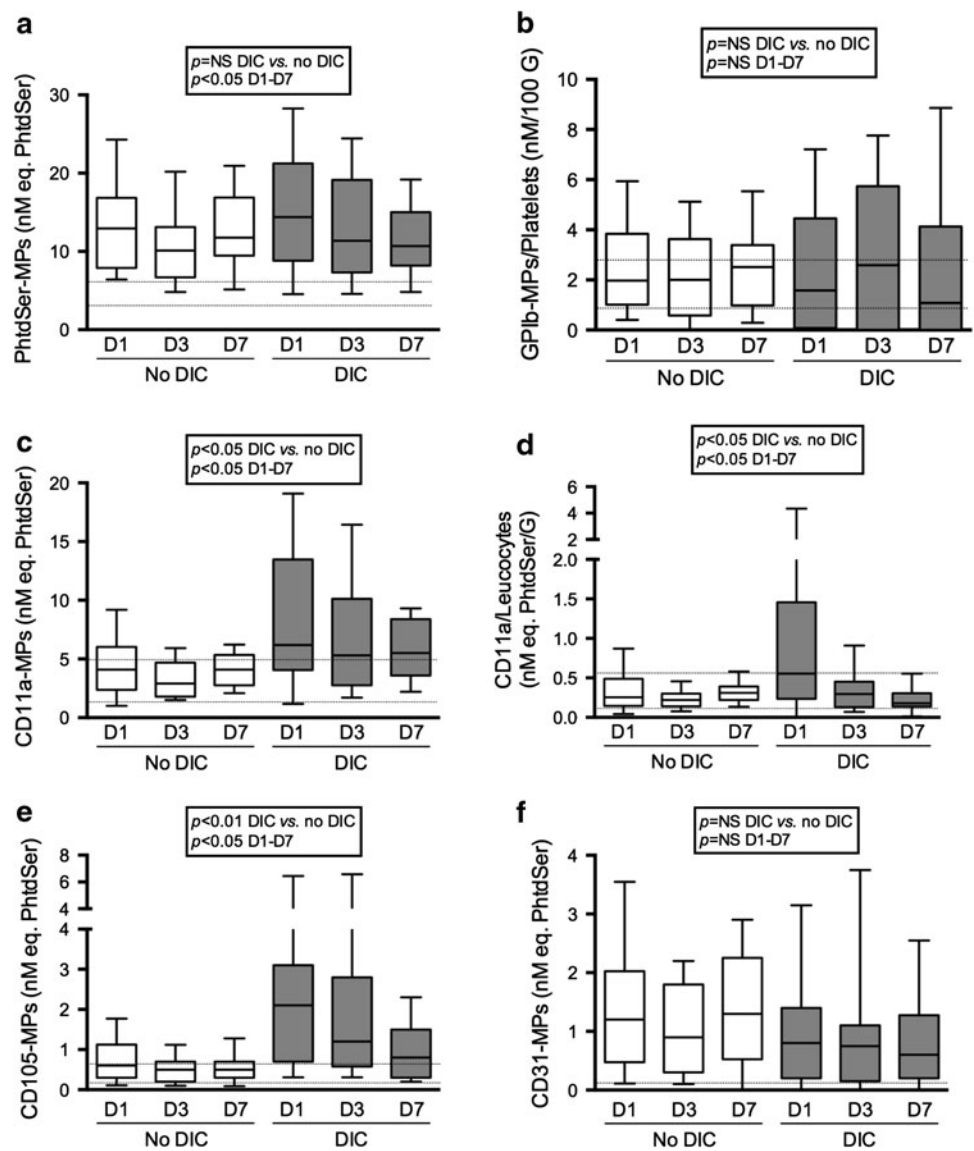


Fig. 2 Time course of total and platelet-, leucocyte- and endothelial cell-derived microparticles regarding DIC diagnosis. Results are shown in white (no DIC) or grey (early DIC) whisker boxes (horizontal line inside box median, upper and lower box limits 25–75th percentiles and T-bars 10–90th percentiles, respectively). Dashed lines correspond to reference values. Statistical analyses represent differences of repeated measures between patients with early or without DIC (DIC vs. no DIC) and differences of time-dependent evolution during the ICU stay (days 1, 3 and 7 when available). Results are in nanomolar equivalent phosphatidylserine (nM eq. PhtdSer) by reference to a standard curve established with liposomes of known composition and concentration. **a** Total microparticles (PhtdSer-MPs); **b** platelet-derived GPIb-MPs to platelet count ratio (GPIb-MPs/platelet); **c** leucocyte-derived CD11a-MPs; **d** leucocyte-derived CD11a-MPs to leucocyte ratio (CD11a-MPs/Leucocytes); **e** endothelial cell-derived CD105-MPs; **f** endothelial cell-derived CD31-MPs



DIC is characterised by a specific microparticle pattern

Total MPs were in the same range in DIC and non-DIC patients but followed a different time-course pattern (Fig. 2a). Nevertheless, compared to non-DIC patients, DIC patients exhibited a specific MP pattern. Circulating GPIb-MPs were lower in DIC ($p = 0.02$ vs. no DIC) (Fig. 2b). Regardless of the DIC diagnosis, MP release was directly dependent on the platelet concentration ($r^2 = 0.24$, $p < 0.001$), while the GPIb-MPs/platelet ratio remained stable within the normal range over time (approximately 2.5 nM/100 G).

At admission, CD11a-MP shedding, reflecting leucocyte activation, was drastically increased in the DIC group (9.2 ± 8.7 vs. 4.5 ± 2.8 nM eq. PhtdSer, $p = 0.02$, Fig. 2c) while the leucocyte count was similar

in both subsets. During the follow-up period, the CD11a-MPs/leucocyte count ratio remained constant in patients without DIC (0.4 nM/G) while decreasing from 1.5 nM/G to baseline values at D7 in patients with DIC (Fig. 2d). At D7, CD11a-MP levels remained high in DIC despite normalisation of leucocyte activation with concomitant hyperleucocytosis ($p < 0.05$ vs. no DIC).

Compared to non-DIC patients, CD105-MPs were dramatically increased ($p < 0.001$) in DIC patients and tended to return to baseline at the end of the follow-up period ($p < 0.05$) (Fig. 2e). CD31-MPs, which are more indicative of endothelial cell apoptosis, were increased to the same extent in DIC and non-DIC patients, and remained high at D7 (Fig. 2f). Nevertheless, one-way analysis showed that CD31-MPs were significantly lower in DIC patients at D1 (1.1 ± 1.2 vs. 1.6 ± 2.0 nM eq. PhtdSer, $p < 0.001$). Interestingly, compared to untreated

DIC patients, those treated by activated protein C [drotrecogin alfa (activated)] exhibited reduced circulating levels of CD105-MPs (4.0 ± 3.8 vs. 1.3 ± 1.1 nM eq. PhtdSer, $p < 0.001$) and CD31-MPs (1.4 ± 1.9 vs. 1.0 ± 1.3 nM eq. PhtdSer, $p = 0.06$) at D3. Fresh frozen plasma, platelet concentrate, unfractionated or low molecular weight heparin and renal replacement therapy did not significantly alter leucocyte- and endothelial cell-derived MPs (data not shown). Of note, ISTH DIC scoring did not impact these results (see supplementary data).

The time course of cell activation during septic shock-induced DIC

Patients who met the DIC criteria during the first 24 h (DIC at D2) were characterised by a mixed pattern at admission. They had moderately increased D-dimers in the same range as non-DIC patients (Fig. 3a). The platelet count was lower than that observed in non-DIC patients, but still above the cutoff value of JAAM (or ISTH) DIC scores (Fig. 3b). Soluble GPV (sGPV),

assessed as another indicator of platelet activation by thrombin, confirmed low platelet activation with a sGPV/platelet ratio in the normal range (Fig. 3c). Nevertheless, compared to non-DIC patients, patients who met the DIC criteria at D2 presented an enhanced inflammatory burst (see supplementary data) with increased thrombin generation (prothrombin F1+2, Fig. 3d) and endothelial cell (CD105-MPs and sE-selectin) and leucocyte activation ($p < 0.05$ vs. no DIC, Fig. 3e, f and see supplementary data). At D3, these patients clearly had DIC, with increased D-dimers and a low platelet count, and platelet activation was obvious (Fig. 3a–c). Endothelial cells and leucocytes still remained activated (Fig. 3e, f).

Microparticles may help towards early DIC assessment

Relevant biological parameters at D1 not related to the JAAM score were challenged in a logistic regression analysis in order to explain early DIC occurrence.

Fig. 3 Time course of cell activation and haemostasis activation during septic shock. Results are shown in *white* (no DIC), *light grey* (meeting DIC criteria at D2) or *grey* (DIC) whisker boxes (horizontal line inside box median, upper and lower box limits 25–75th percentiles and T-bars 10–90th percentiles, respectively). Dashed lines correspond to reference values. Statistical analyses represent differences at admission (D1) between patients without DIC or with DIC at day 1 (admission) or at day 2 (during the first 24 h of care), * $p < 0.05$ no DIC versus meeting DIC criteria at D2; # $p < 0.05$ no DIC versus DIC; \$ $p < 0.05$ DIC versus meeting DIC criteria at D2. **a** D-dimers; **b** platelet count; **c** soluble platelet glycoprotein V/platelets ratio (sGPV/platelets); **d** prothrombin F1+2; **e** endothelial cell-derived CD105-MPs; **f** leucocyte-derived CD11a-MP to leucocyte ratio (CD11a-MPs/leucocytes)

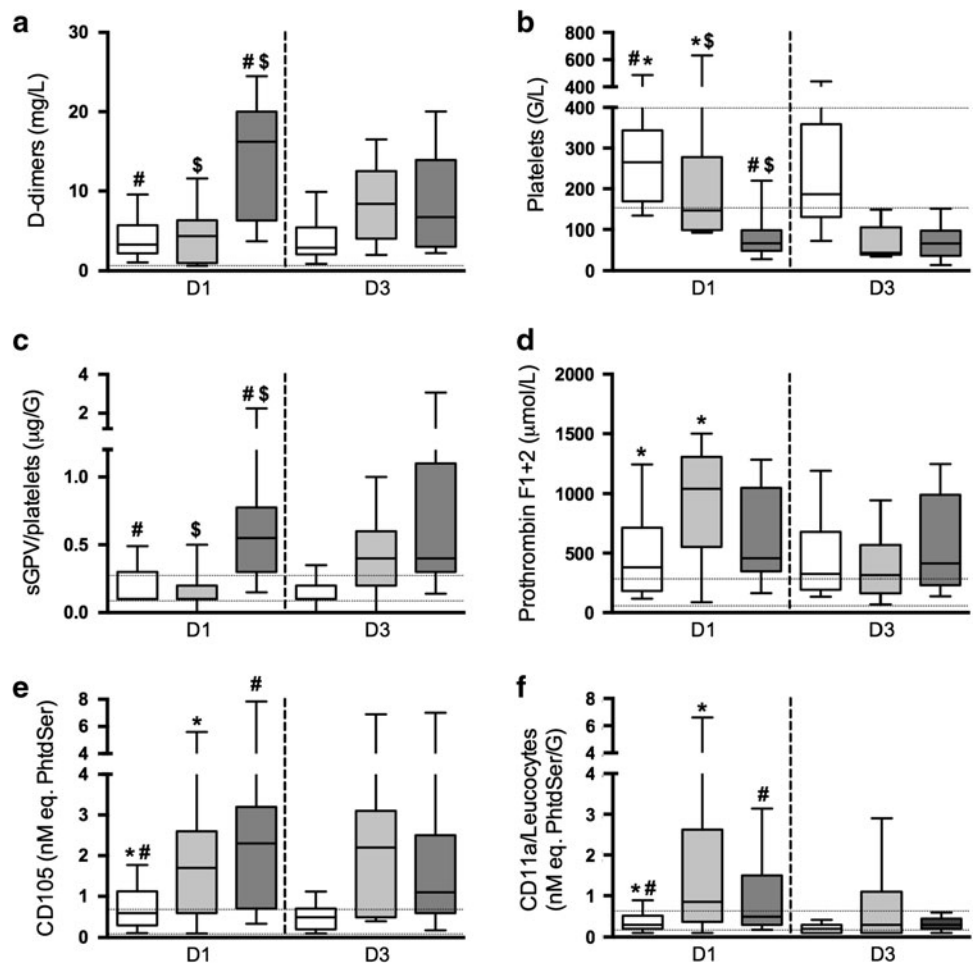


Table 2 Multiple logistic regression at admission (early DIC vs. no DIC)

Parameter	Odds-ratio	95 % confidence interval	<i>p</i> value
CD105-MPs	6.55	[2.54–16.92]	<0.01
CD31-MPs	0.49	[0.26–0.94]	0.03
Factor V	0.97	[0.95–0.99]	0.02
Fibrin monomers	1.01	[1.00–1.02]	0.06
Prothrombin fragment 1+2	1.00	[1.00–1.00]	0.09

PAI-1, AT, PC, sE-selectin, sP-selectin, CD11a-MPs/leucocyte ratio, IL-6, IL-10, MCP-1 and TNF α were not significantly associated with DIC

CD105-MPs, CD31-MPs, factor V, prothrombin F1+2 and fibrin monomers were associated with DIC (Table 2). In this model, PAI-1, AT, PC, sE-selectin, sP-selectin, CD11a-MPs/leucocyte ratio, IL-6, IL-10, MCP-1 and TNF α were not significantly associated with DIC.

Discussion

In septic shock, vascular injury is central and is prompted by different actors with overlapping kinetics, leading to difficulties in the deciphering of a sequential order [25]. Despite biological criteria and scores, ultimate disseminated intravascular coagulopathy is difficult to assess clinically [26, 27]. As the inflammatory cascade represents the main limitation of the ISTH overt score, the JAAM score could be more helpful in DIC detection [9, 28, 29]. Nevertheless, we found that at D1, DIC scoring had no effect on the outcome of the analysis of the variation in biomarkers, including MPs.

According to the DIC scoring criteria, we report a high incidence of “early” DIC diagnosed during the first 24 h and encompassing about 40 % of patients with septic shock. As previously reported, early DIC is strongly associated with septic shock severity (SAPS II) and organ failure (SOFA), but not with mortality [30]. From the present standpoint of haemostatic activation/deregulation during sepsis, one could consider a more dynamic imbalance evolving over time in patients meeting DIC criteria. Thus, the present prospective study was designed to evaluate the association between procoagulant MPs and DIC occurrence during the time course of septic shock. Our data confirm specific vascular damage whereby endothelial cell and leucocyte impairment subsequently evolves to deregulated thrombin generation and to DIC, despite therapeutic intervention. In a cell-based model of haemostasis, DIC may not only be viewed as a coagulation disorder, but also as a delayed symptom of emerging systemic vascular inflammatory disease [2, 4].

The possibility of MP-driven coagulation is supported by the reported role of MPs in meningococemia [31] or by the dissemination of a procoagulant signal to neutrophils and platelets [32]. Our data evidenced elevated levels of total MPs in septic patients and a concomitant rise in prothrombin F1+2, which is highly suggestive of an MP-driven activated coagulation pathway. Indeed, PhtdSer-MPs constitute an additional catalytic surface for blood coagulation that could partially compensate for the low platelet count observed during DIC. A recent report of thrombin generation triggered by platelet-MPs in an FVII-independent but FXII-dependent manner [33] raises the likelihood of a particular platelet contribution in increasing thrombin generation. Our observation of delayed platelet activation may reflect the presence of thrombin as the main agonist while GPVI activation by sub-endothelial collagen is not predominant [34].

In view of the present data, MPs appear to behave as vascular effectors in the course of sepsis and DIC. Multivariate analysis of the MP phenotype at D1 evidenced a particular pattern that indicates an evolution to DIC whereas routine laboratory tests failed to identify patients with an “intermediate” platelet count range and elevated prothrombin F1+2. Furthermore, as platelet activation is not yet detectable by sGPV/platelet and sP-selectin/platelet ratios, which remain low at D1, the MP phenotype pattern appears to be more informative with a characteristic drop in platelet-derived GPIb-MPs following a drop in platelets and a rise in leucocyte-derived CD11a-MPs and endothelial-derived CD105-MPs. Altogether, data from the present and other studies tend to draw a picture of DIC genesis during septic shock supported by endothelial injury after an inflammatory burst, with leucocyte recruitment [25]. Indeed, our data confirm that the very initial high levels of cytokines and chemokines prompt endothelial and leucocyte activation prior to septic shock-induced DIC [35].

Our study also indicates that MPs are a valuable tool for the detection of late cell events in the time course of sepsis. We evidenced an original specific drop in CD105-MPs values, which returned to normal range at D7 in DIC patients. These MPs could prove to be a better indicator than CD31-MPs in the monitoring of endothelial damage-driven DIC over time.

According to the Bradford-Hill criteria, causation requires temporality. From the present standpoint, endothelial and leucocyte activation precedes DIC diagnosis with CD105-MPs appearing to be the best predictor [36]. Furthermore, microparticle clearance from plasma is not clearly demonstrated, although their pharmacological modulation could constitute a reasonable challenge [18, 37], while the implication of CD105 is of interest in the context of septic shock-induced DIC. Of note, patients treated in the present study with drotrecogin alfa (activated), known to have cytoprotective effects [38], had significantly lowered CD105-MPs at D3.

Finally, we highlight that routine haemostatic assays could be combined with MPs as indicators of endothelial cell and leucocyte involvement during septic shock. Using this approach, three groups of patients as opposed to two could be identified: (1) patients with low-grade vascular injury and controlled thrombin generation (no DIC), (2) patients with inflammatory burst, endothelial cell and leucocytes activation but with still-controlled thrombin generation who meet the DIC criteria at D2 (only 10 patients in our cohort) and (3) patients with endothelial and leucocyte activation resulting in deregulated thrombin generation and high-level fibrinolysis who meet the DIC criteria. We suggest that our preliminary results of MP patterns could help clinicians to improve early DIC assessment in order to allow a better stratification of patients treated for septic shock in future clinical trials. Thus, a new cohort is warranted to establish a new combined cell-based and routine clotting time score to diagnose early vascular injury during septic shock.

Acknowledgments XD, FT and FM had full access to all the study data and take responsibility for their integrity and the accuracy of

the analysis. XD, FT, JMF and FM participated in the study design and obtained funding for the study. XD, PA, YM, JHB, AB and FM collected the data. XD, TL, FT and FM analysed the data; TL provided statistical expertise. XD, JHB, AB, LG, FL and FT performed biological analyses. XD, FT, FL and FM drafted the report, and the report was revised for important intellectual content by XD, PA, LG, CG, JMF, FT and FM. All authors read and approved the final manuscript.

We would like to thank Fatiha Zobairi for sample preparation and MP measurements, Jacqueline Picard for routine haemostasis tests, Sylvie Moog for sGPV analysis, François Lefebvre (MD) for complementary statistical analysis and Maleka Schenck-Dhif (MD) and Dominique Desprez (MD) for manuscript revision and Pierre Pothier for careful English proofreading of the manuscript.

This work was supported by grants from the French Ministry of Health (Projet Hospitalier de Recherche Clinique, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg no. 4649), Laboratoire Français de Fractionnement et des Biotechnologies (LFB SA, Les Ullis, France), the Société de Réanimation de Langue Française (SRLF, Paris, France) and the Association pour le Développement et la Recherche en Réanimation (ADRER, Strasbourg, France).

Conflicts of interest The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

1. Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM (2005) Septic shock. *Lancet* 365:63–78
2. Fourrier F (2012) Severe sepsis, coagulation, and fibrinolysis: dead end or one way? *Crit Care Med* 40:2704–2708
3. Levi M (2012) Coagulation and sepsis: a winding road ahead. *Crit Care Med* 40:2733–2734
4. Gando S (2010) Microvascular thrombosis and multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med* 38:S35–S42
5. Gando S, Wada H, Tachil J; The Scientific Standardization Committee on DIC of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) (2013) Differentiating disseminated intravascular coagulation (DIC) with the fibrinolytic phenotype from coagulopathy of trauma and acute coagulopathy of trauma-shock (COT/ACOTS). *J Thromb Haemost* 11:826–835
6. Taylor FB Jr, Toh CH, Hoots WK, Wada H, Levi M (2001) Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost* 86:1327–1330
7. Gando S, Iba T, Eguchi Y, Ohtomo Y, Okamoto K, Koseki K, Mayumi T, Murata A, Ikeda T, Ishikura H, Ueyama M, Ogura H, Kushimoto S, Saitoh D, Endo S, Shimazaki S (2006) A multicenter, prospective validation of disseminated intravascular coagulation diagnostic criteria for critically ill patients: comparing current criteria. *Crit Care Med* 34:625–631
8. Bakhtiari K, Meijers JC, de Jonge E, Levi M (2004) Prospective validation of the International Society of Thrombosis and Haemostasis scoring system for disseminated intravascular coagulation. *Crit Care Med* 32:2416–2421
9. Singh RK, Baronia AK, Sahoo JN, Sharma S, Naval R, Pandey CM, Poddar B, Azim A, Gurjar M (2012) Prospective comparison of new Japanese Association for Acute Medicine (JAAM) DIC and International Society of Thrombosis and Hemostasis (ISTH) DIC score in critically ill septic patients. *Thromb Res* 129:e119–e125
10. Wada H, Thachil J, Di Nisio M, Mathew P, Kurosawa S, Gando S, Kim HK, Nielsen JD, Dempfle CE, Levi M, Toh CH; The Scientific Standardization Committee on DIC of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (2013) Guidance for diagnosis and treatment of DIC from harmonization of the recommendations from three guidelines. *J Thromb Haemost* 11:761–767
11. Boisramé-Helms J, Kremer H, Schini-Kerth V, Meziani F (2013) Endothelial dysfunction in sepsis. *Curr Vasc Pharmacol* 11:150–160
12. Meziani F, Tesse A, Andriantsitohaina R (2008) Microparticles are vectors of paradoxical information in vascular cells including the endothelium: role in health and diseases. *Pharmacol Rep* 60:75–84
13. Mause SF, Weber C (2010) Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ Res* 107:1047–1057
14. Meziani F, Delabranche X, Asfar P, Toti F (2010) Bench-to-bedside review: circulating microparticles a new player in sepsis? *Crit Care* 14:236
15. Delabranche X, Berger A, Boisramé-Helms J, Meziani F (2012) Microparticles and infectious diseases. *Med Mal Infect* 42:335–343
16. Schouten M, Wiersinga WJ, Levi M, van der Poll T (2008) Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J Leukoc Biol* 83:536–545
17. Joop K, Berckmans RJ, Nieuwland R, Berkhout J, Romijn FP, Hack CE, Sturk A (2001) Microparticles from patients with multiple organ dysfunction syndrome and sepsis support coagulation through multiple mechanisms. *Thromb Haemost* 85:810–820

18. Perez-Casal M, Thompson V, Downey C, Welters I, Wyncoll D, Thachil J, Toh CH (2011) The clinical and functional relevance of microparticles induced by activated protein C treatment in sepsis. *Crit Care* 15:R195
19. Mortaza S, Martinez MC, Baron-Menguy C, Burban M, De la Bourdonnaye M, Fizanne L, Pierrot M, Cales P, Henrion D, Andriantsitohaina R, Mercat A, Asfar P, Meziani F (2009) Detrimental hemodynamic and inflammatory effects of microparticles originating from septic rats. *Crit Care Med* 37:2045–2050
20. Zafrani L, Gerotziafas G, Byrnes C, Hu X, Perez J, Levi C, Placier S, Letavernier E, Leelahavanichkul A, Haymann JP, Elalamy I, Miller JL, Star RA, Yuen PS, Baud L (2012) Calpastatin controls polymicrobial sepsis by limiting procoagulant microparticle release. *Am J Respir Crit Care Med* 185:744–755
21. Reid VL, Webster NR (2012) Role of microparticles in sepsis. *Br J Anaesth* 109:503–513
22. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G (2003) 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS international sepsis definitions conference. *Intensive Care Med* 29:530–538
23. Hugel B, Zobairi F, Freyssinet JM (2004) Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* 2:1846–1847
24. Bakouboula B, Morel O, Faure A, Zobairi F, Jesel L, Trinh A, Zupan M, Canuet M, Grunebaum L, Brunette A, Desprez D, Chabot F, Weitzenblum E, Freyssinet JM, Chaouat A, Toti F (2008) Procoagulant membrane microparticles correlate with the severity of pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 177:536–543
25. Shapiro NI, Schuetz P, Yano K, Sorasaki M, Parikh SM, Jones AE, Trzeciak S, Ngo L, Aird WC (2010) The association of endothelial cell signaling, severity of illness, and organ dysfunction in sepsis. *Crit Care* 14:13
26. Levi M, de Jonge E, van der Poll T (2003) Sepsis and disseminated intravascular coagulation. *J Thromb Thrombolysis* 16:43–47
27. Levi M (2010) The coagulant response in sepsis and inflammation. *Hamostaseologie* 30(10–12):14–16
28. Kushimoto S, Gando S, Saitoh D, Ogura H, Mayumi T, Koseki K, Ikeda T, Ishikura H, Iba T, Ueyama M, Eguchi Y, Otomo Y, Okamoto K, Endo S, Shimazaki S (2008) Clinical course and outcome of disseminated intravascular coagulation diagnosed by Japanese Association for Acute Medicine criteria. Comparison between sepsis and trauma. *Thromb Haemost* 100:1099–1105
29. Takemitsu T, Wada H, Hatada T, Ohmori Y, Ishikura K, Takeda T, Sugiyama T, Yamada N, Maruyama K, Katayama N, Isaji S, Shimpo H, Kusunoki M, Nobori T (2011) Prospective evaluation of three different diagnostic criteria for disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost* 105:40–44
30. Okabayashi K, Wada H, Ohta S, Shiku H, Nobori T, Maruyama K (2004) Hemostatic markers and the sepsis-related organ failure assessment score in patients with disseminated intravascular coagulation in an intensive care unit. *Am J Hematol* 76:225–229
31. Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, Boing AN, Romijn FP, Westendorp RG, Hack CE, Sturk A (2000) Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood* 95:930–935
32. Osterud B (2010) Tissue factor expression in blood cells. *Thromb Res* 125:S31–S34
33. Van Der Meijden PE, Van Schilfgaarde M, Van Oerle R, Renne T, ten Cate H, Spronk HM (2012) Platelet- and erythrocyte-derived microparticles trigger thrombin generation via factor XIIa. *J Thromb Haemost* 10:1355–1362
34. Heemskerk JW, Matheij NJ, Cosemans JM (2013) Platelet-based coagulation: different populations, different functions. *J Thromb Haemost* 11:2–16
35. de Jong HK, van der Poll T, Wiersinga WJ (2010) The systemic pro-inflammatory response in sepsis. *J Innate Immun* 2:422–430
36. Ramma W, Ahmed A (2011) Is inflammation the cause of pre-eclampsia? *Biochem Soc Trans* 39:1619–1627
37. Dasgupta SK, Abdel-Monem H, Niravath P, Le A, Bellera RV, Langlois K, Nagata S, Rumbaut RE, Thiagarajan P (2009) Lactadherin and clearance of platelet-derived microvesicles. *Blood* 113:1332–1339
38. Mosnier LO, Zlokovic BV, Griffin JH (2007) The cytoprotective protein C pathway. *Blood* 109:3161–3172

Supplementary data

Microparticles are new biomarkers of septic shock-induced disseminated intravascular coagulopathy

Xavier DELABRANCHE^{1,2} (MD), Julie BOISRAMÉ-HELMS^{1,2} (MD), Pierre ASFAR³ (MD, PhD), Asaël BERGER^{1,2} (MD), Yoganaden MOOTIEN⁴ (MD), Thierry LAVIGNE⁵ (MD), Lélia GRUNEBAUM⁶ (MD), François LANZA⁷ (PhD), Christian GACHET⁷ (MD, PhD), Jean-Marie FREYSSINET⁸ (PhD), Florence TOTI⁹ (PhD), Ferhat MEZIANI^{1,2} (MD, PhD)

¹Service de Réanimation Médicale, Nouvel Hôpital Civil, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg (France)

²EA 3072, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Faculté de médecine, Université de Strasbourg, Strasbourg, France.

³Service de Réanimation Médicale et Médecine Hyperbare, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, Angers (France)

⁴Service de Réanimation Médicale, Centre Hospitalier de Mulhouse, Mulhouse (France)

⁵EA 4438, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, Strasbourg (France)

⁶Laboratoire d'hématologie et hémostase, Hôpital de Hautepierre, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg (France)

⁷UMR S949 INSERM, Université de Strasbourg et Établissement Français du Sang-Alsace, Strasbourg (France)

⁸U770 INSERM, Faculté de Médecine, Université Paris-Sud, Le Kremlin-Bicêtre (France)

⁹UMR 7213 CNRS, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, Illkirch (France)

Patients and methods

Patients

Care was provided without specific therapeutic intervention. All patients received norepinephrine or epinephrine infusion after fluid challenge with crystalloids or 4% gelatines; hydroxyethyl starch was avoided and 20% human serum albumin use was restricted to low albuminemia (<20 g/L). Hydrocortisone hemisuccinate (200 to 300 mg per day) was added if norepinephrine infusion was greater than 0.5 µg/kg/min. after the sixth hour following admission. Fresh frozen plasma was transfused whenever required to maintain prothrombin time (expressed in percentage) and/or factor V (FV) above 30%. Antithrombin (Aclotine[®], LFB, Les Ullis, France) or activated protein C (drotrecogin alfa [activated], Xigris[®], Eli Lilly Inc., Indianapolis, IN) were used according to guidelines in 3 and 16 patients respectively. Unfractionated or low molecular weight heparin was infused to prevent thromboembolic event and allow anticoagulation of renal replacement therapy circuit. Platelet transfusion was avoided as long as overt bleeding was not present (Table I).

No difference for tobacco use ($p=0.06$), chronic obstructive pulmonary disease, diabetes mellitus, cancer, hypertension or ischemic heart disease could be evidenced between patients with early or without DIC. Previous treatments by anti-platelet therapy (about 25% of patients), vitamin K antagonists (14%) and/or heparin (8%) were similar in both groups.

Reagents

Haemostasis parameters were analysed using commercial reagents from Stago (Asnières, France), except prothrombin F1+2 from Siemens (Marburg, Germany). Anti-CD105-Bi antibody was from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA), anti-CD62E-Bi from (Ansell, Bayport, MN, USA), anti-CD31-Bi from CALTAG (Carlsbad, CA, USA), anti-CD11a-Bi and

isotypic controls from Leinco (St Louis, MO, USA). Anti-GPIIb/IIIa antibody was a gift from F. Lanza (EFS Alsace, Strasbourg, France). Biotinylated-annexin-5 was prepared in our laboratory. PPACK and Dns-GGACK were from Merck (Darmstadt, Germany) and phospholipids for liposomes (PhtdSer and PhtdChol) from Larodan (Malmö, Sweden). Human Factors (F)Va (American Diagnostica, Stamford, USA), Fxa (Biogenic, Perols, France), FII (Hyphen BioMed, Neuville sur Oise, France) and fluorochrom probe (pNAPEP0216) was from Cryopep (Montpellier, France).

Blood collection and laboratory analysis

Fifteen millilitres of blood were collected on sodium citrate (0.139 M) and immediately centrifuged twice at 4,500 x g during 15 min. to obtain platelet poor plasma (PPP), frozen at – 80°C before analysis.

Haemostasis was analysed on STA-R[®] Evolution (Stago) with regular commercial reagents: prothrombin time (PT), factor V (FV), activated partial thromboplastin time (aPTT), fibrinogen (Fg), D-dimers (Ddi), antithrombin (AT), protein C (PC) and fibrin monomers (FM). Prothrombin fragment 1+2 (F1+2) were quantified with commercial ELISA kit Enzygost[®] F1+2 and soluble platelet glycoprotein V (sGPV) by ELISA (Asserachrom[®] sGPV, Stago). Platelet and leukocyte counts were obtained from medical reports.

Microparticle analysis

Protease inhibitors (50 µM PPACK + 50 µM Dns-GGACK) were added to poor platelet plasma. MPs were measured by prothrombinase assay after capture onto insolubilised annexin-5 or biotinylated antibodies to determine their cell origin by using a covalently coated streptavidin multi-well plate (Roche, France) as previously reported. To circumvent a possible interference of plasma proteins leading to negativity for insolubilised ligand, MPs were

isolated and washed in TBS containing 3% w/v human serum albumin (LFB, Les Ullis, France) by a double step centrifugation (60 min., 12,000 x g) before the capture step. The samples containing MPs were distributed (100 μ L/well) and incubated for 30 min at 37°C. After three washes, the amount of insolubilised MPs was measured by prothrombinase assay where PhtdSer is the limiting factor of the reaction leading to thrombin generation. MPs were further quantified by prothrombinase assay that detect PhtdSer exposed at MP surface using a microtitration thermostated spectrophotometer equipped with kinetics software (VersaMax Molecular Device, Wokingam Berkshire, UK). In this functional assay, blood clotting factors (106 pM Fxa, 250 pM FVa and 3.5 μ M FII) and calcium (2.2 mM CaCl₂) concentrations are set to ensure that PhtdSer is the rate-limiting parameter in the generation of soluble thrombin from prothrombin. pNAPEP0216 is used for kinetic thrombin quantification over 3 min. and results were expressed as nanomolar PhtdSer equivalent (nM eq. PhtdSer) by reference to a standard curve established with liposomes of known composition (33% w/w PhtdSer and 67% w/w PhtdChol) and concentration.

Results

Haemostasis and septic shock

Interestingly, routine clotting times were improved in septic shock time-course both DIC and non-DIC patients (data not shown). Nevertheless, AT, PC and t-PA recovery was delayed (Fig. 4a-c). Platelet activation followed a unique pattern in DIC patients, reaching a peak at D3 then returning to the baseline value at D7 (Fig. 4d-e). Inflammatory cytokines and chemokines were dramatically increased in DIC patients compared to non-DIC patients, but remained elevated at D7 in both groups (Fig 4f-g).

Impact of DIC scoring systems

At admission, Cohen's kappa coefficient (a statistical measure of inter-rater agreement between JAAM 2006 and ISTH) was 0.71 (good). According to ISTH "overt" DIC score, 41 patients had early DIC (35 at D1 and 6 at D2). Among them, 34 had also early DIC according to JAAM. We did not observe any differences at D1 in D-dimers, Fibrin monomers, Prothrombin F1+2 levels according to ISTH "overt" versus JAAM scores in no DIC patient or in DIC patients (data not shown).

Time-course of CD105-MPs, CD11a-MPs/leucocyte ratio, CD31-MPs and sGPV/platelet ratio as well as mortality were similar (Fig. 5).

Figure legends

Fig. 4 Time-course of haemostatic and inflammatory parameters in DIC and no DIC patients

Results are shown in white (no DIC) or grey (early DIC) whisker boxes (*horizontal line inside box* median, *upper and lower box limits* 25–75 percentiles and T-bars 10–90 percentiles respectively). Dashed lines correspond to reference values. Statistical analyses represent differences of repeated measurements between patients with early or without DIC (DIC *vs.* no DIC) and differences of time-dependent evolution during ICU stay (days 1, 3 and 7 when available). **A.** Antithrombin; **b.** Protein C; **c.** tissue-type Plasminogen Activator (t-PA); **d.** Soluble P-selectin/platelet ratio (sP-Sel/platelets); **e.** Soluble platelet glycoprotein V/platelet ratio (sGPV/platelet); **f.** Interleukin-6 (IL-6); **g.** Tumor Necrosis Factor α (TNF- α); **h.** Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1).

Fig. 5 Time-course of platelet-, leucocyte-, endothelial cell-derived microparticles and platelet activation regarding ISTH “overt” DIC versus JAAM 2006 DIC diagnoses

Results are shown in white (no DIC) or grey (early DIC) whisker boxes (*horizontal line inside box* median, *upper and lower box limits* 25–75 percentiles and T-bars 10–90 percentiles respectively). Dashed lines correspond to represent reference values. Statistical analyses represent differences of repeated measurements between patients with early or without DIC (DIC *vs.* no DIC) and differences of time-dependent evolution during ICU stay (days 1, 3 and 7 when available). Results are in nanomolar equivalent phosphatidylserine (nM eq. PhtdSer) by reference to a standard curve established with liposomes of known composition and concentration. **JAAM 2006 DIC score:** **a.** Endothelial cell-derived CD105-MPs; **b.** CD11a-MPs to leucocyte ratio (CD11a-MPs/Leucocytes); **c.** Endothelial cell-derived CD31-MPs; **d.** soluble platelet glycoprotein V to platelet ratio (sGPV/platelet); **ISTH 2001 “overt” DIC**

score: **e.** Endothelial cell-derived CD105-MPs; **f.** CD11a-MPs to leucocyte ratio (CD11a-MPs/Leucocytes); **g.** Endothelial cell-derived CD31-MPs; **h.** soluble platelet glycoprotein V to platelet ratio (sGPV/platelet).

Fig 4.

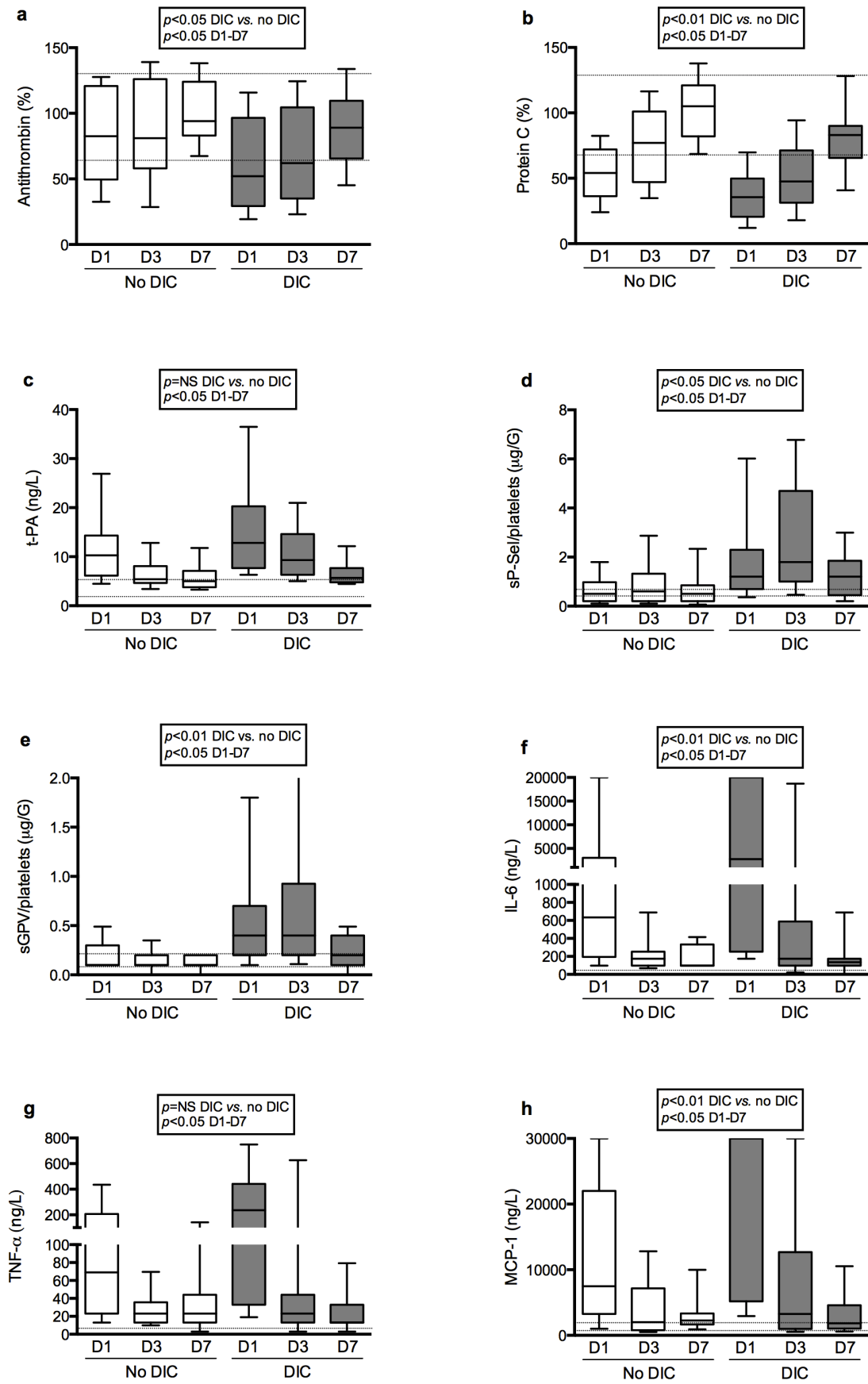


Fig 5.

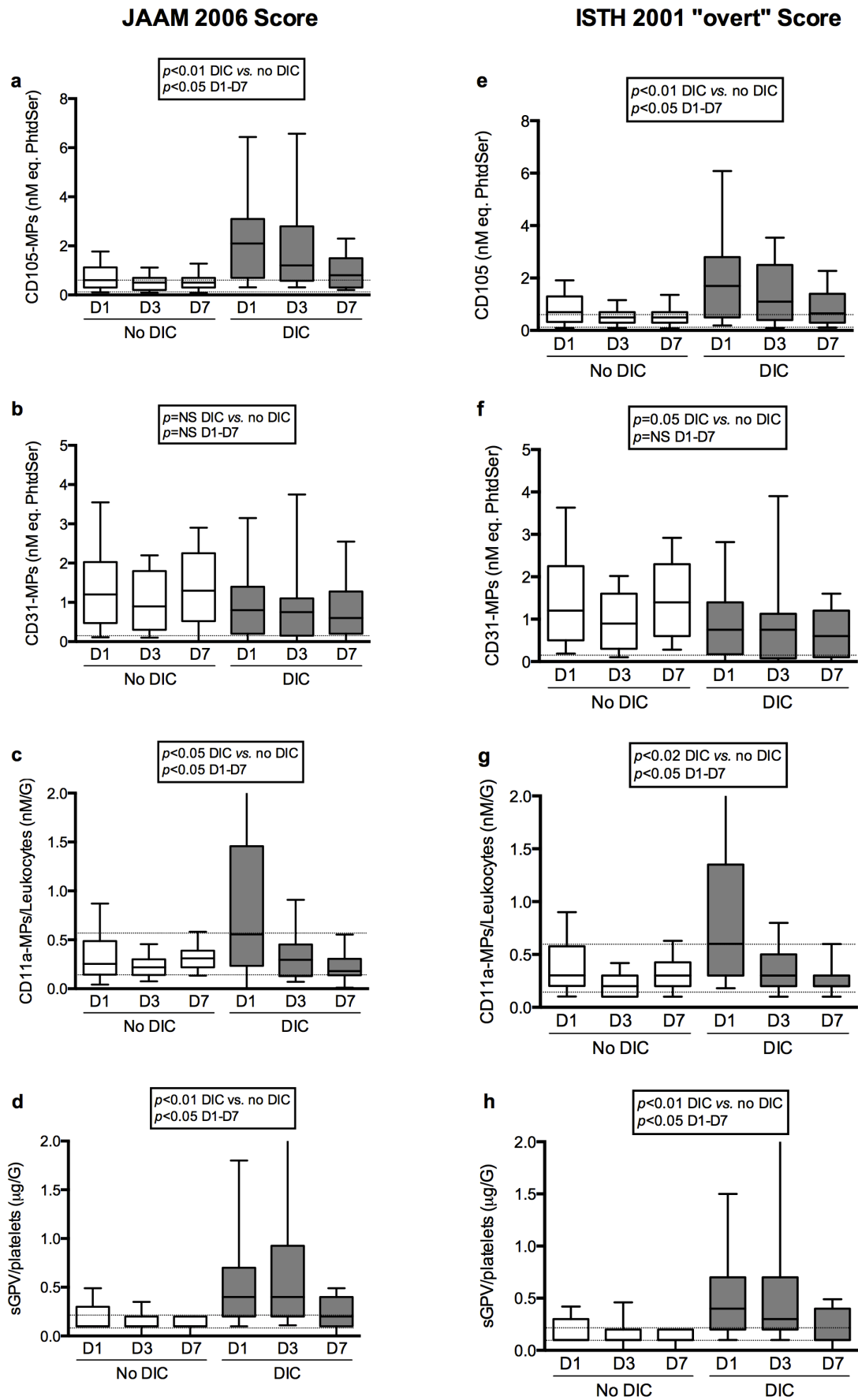


Table 5 Microparticles and hemostasis at admission (D1)

	Normal	No DIC	DIC (N=40)	
	Range	(N=52)	(N=10) ^a	(N=30) ^b
JAAM 2006 score				
At day 1	<4	2.1±0.5 [#]	2.7±0.5 ^{\$}	5.8±1.6 ^{#\$}
At day 2	<4	2.1±0.6 ^{#*}	5.4±1.2 [*]	5.2±1.6 [#]
ISTH 2001 “overt” score				
At day 1	<5	3.4±0.9 [#]	4.3±1.7	5.3±1.6 [#]
At day 2	<5	3.0±0.9 ^{#*}	5.2±0.9 [*]	5.0±1.4 [#]
Microparticles (nM eq. PhtdSer)				
Anx-A5 (Total)	4.9±2.0	14.0±7.7	14.3±7.6	16.1±9.7
GPIbα (Platelet)	3.5±2.2	6.6±6.4 [#]	4.3±4.1	2.5±3.1 [#]
CD11a (Leukocytes)	3.2±2.2	4.5±2.8 [#]	5.9±3.9	10.3±11.6 [#]
CD31 (Endothelium – apoptosis)	0.1±0.1	1.6±2.0	1.2±1.1	1.1±1.2
CD105 (Endothelium – activation)	0.4±0.3	0.8±0.6 ^{#*}	1.8±1.7 [*]	2.7±2.4 [#]
CD62E (Endothelium – activation)	0.0±0.0	0.0±0.1	0.0±0.1	0.3±0.9
Hemostatis				
Leucocytes (G/L)	[4.2-10.7]	16.0±9.5 [#]	9.2±11.5	16.1±15.9 [#]
Platelets (G/L)	[150-400]	275±130 ^{#*}	213±178 ^{*\$}	94±88 ^{#\$}
Prothrombin Time (%)	[70-120]	45±19 [#]	36±16	35±17 [#]
Fibrinogen (g/L)	[2.0-4.0]	5.8±1.9	5.3±2.6	4.6±2.2
D-Dimers (mg/L)	[<0.4]	4.5±4.3 [#]	4.5±3.5 ^{\$}	14.4±7.3 ^{#\$}
Antithrombin (%)	[70-130]	82±37 [#]	72±31	56±38 [#]
Protein C (%)	[70-130]	57±30 [#]	45±23	34±20 [#]

Fibrin Monomers (mg/L)	[<10]	29±50 [#]	32±40	84±73 [#]
Prothrombin fragment 1+2 (μmol/L)	[70-230]	508±409*	923±47*	651±416
Soluble glycoprotein (GP)V (μg/L)	[10-60]	47±33	28±11	49±36
sGPV/ platelets (μg/G)	[0.2±0.1]	0.2±0.2 [#]	0.2±0.1 ^{\$}	0.9±1.2 [#] ^{\$}
t-Plasminogen Activator (μg/L)	2.±1.4	13.4±14.4	26.6±26.3	15.6±17.4
Plasminogen Activator Inhibitor (μg/L)	[<10]	34.8±25.8	52.3±36.8	39.9±23.5
sE-selectin (μg/L)	[100±35]	472±522 [#] *	1007±1095*	1144±1525 [#]
sP-selectin/platelets (μg/G)	[0.5±0.1]	0.8±0.8 [#]	0.6±0.5 ^{\$}	3.3±5.7 [#] ^{\$}

Cytokines and chemokines

Interleukin-6 (μg/L)	[<0.005]	3.8±6.5*	14.5±8.9* ^{\$}	6.1±8.0 ^{\$}
Interleukin-10 (μg/L)	[<0.01]	5.5±12.7 [#] *	38.1±59.2*	36.1±59.8 [#]
Tumor Necrosis Factor α (ng/L)	[<4]	157±212*	348±251*	250±279
Monocyte Chemotactic Protein-1(μg/L)	[1.0±0.3]	11.8±10.4 [#] *	24.6±11.3*	17.7±11.5 [#]

^aPatients meeting DIC criteria at D2 (no DIC at D1); ^bPatient having DIC criteria at D1 (DIC)

**p*<0.05 no DIC vs. meeting DIC criteria at D2; [#]*p*<0.05 no DIC vs. DIC; ^{\$}*p*<0.05 DIC vs. meeting DIC criteria at D2

**Endothelial microparticles as early sensors of septic shock-induced DIC:
a new cell-based diagnosis approach**

Xavier DELABRANCHE^{1,2} (MD), Julie BOISRAMÉ-HELMS^{1,2} (MD), Pierre ASFAR³ (MD, PhD), Asaël BERGER^{1,2} (MD), Yoganaden MOOTIEN⁴ (MD), Thierry LAVIGNE⁵ (MD), Florence TOTI⁶ (PhD), Ferhat MEZIANI^{1,2} (MD, PhD)

Journal of Thrombosis and Haemostasis 2013

L'analyse des données de la cohorte de patients admis en réanimation pour choc septique nous a permis de mettre en évidence l'importance de la génération de MPs et surtout les différences phénotypiques entre patients développant ou non une CIVD. La CIVD précoce est caractérisée par une activation endothéliale avec augmentation de CD105-MPs – associée à une moindre apoptose à l'admission (CD31-MPs) – et une forte activation leucocytaire. De manière intéressante, parmi les 40 patients présentant une CIVD, 30 ont les critères diagnostiques (JAAM 2006) dès l'admission alors que 10 ne les développeront qu'au cours des 24 premières heures. Ces derniers n'ont pas de CIVD sur les paramètres usuels mais présentent dès l'admission une atteinte cellulaire majeure endothéliale et leucocytaire. Il est à noter que ces patients ne présentent pas d'activation plaquettaire avec des taux de sGPV/plaquettes et sP-sélectine/plaquettes dans l'intervalle de référence. Il nous semble donc que les MPs, reflet de l'atteinte cellulaire, puissent permettre de mieux appréhender la dynamique de l'atteinte cellulaire dans le compartiment vasculaire.

L'analyse par régression logistique a mis en évidence cinq paramètres associés à la survenue de la CIVD, après avoir exclu tous ceux qui étaient directement corrélés aux paramètres intervenant dans le calcul du score JAAM. Ces cinq paramètres sont CD105-MPs, CD31-MPs et FV ($p < 0,05$) ainsi que monomères de fibrine et F1+2 de la prothrombine ($p < 0,10$). Nous avons ainsi pu définir un modèle mathématique ne prenant en compte que CD105-MPs et CD31-MPs permettant une bonne prédiction du diagnostic de CIVD. Cela a conduit au dépôt d'un brevet. Un fond de maturation a été attribué pour développer une méthode de dosage rapide des MPs, utilisable en routine. D'autre part nous constituons une nouvelle bibliothèque pour confirmer les résultats et leur valeur diagnostique sur une cohorte élargie de près de 400 patients.

Endothelial microparticles as early sensors of septic shock-induced DIC: a new cell-based diagnosis approach

Xavier DELABRANCHE^{1,2} (MD), Julie BOISRAMÉ-HELMS^{1,2} (MD), Pierre ASFAR³ (MD, PhD), Asaël BERGER^{1,2} (MD), Yoganaden MOOTIEN⁴ (MD), Thierry LAVIGNE⁵ (MD), Florence TOTI⁶ (PhD), Ferhat MEZIANI^{1,2} (MD, PhD)

¹Service de Réanimation Médicale, Nouvel Hôpital Civil, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg (France)

²EA 3072, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Faculté de médecine, Université de Strasbourg, Strasbourg, France.

³Service de Réanimation Médicale et Médecine Hyperbare, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, Angers (France)

⁴Service de Réanimation Médicale, Centre Hospitalier de Mulhouse, Mulhouse (France)

⁵EA 4438, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, Strasbourg (France)

⁶UMR 7213 CNRS, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, Illkirch (France)

Correspondence to :

Ferhat Meziani

Service de Réanimation Médicale – Nouvel Hôpital Civil

1, place de l'Hôpital

F-67091 STRASBOURG cedex (France)

Phone : +33 (0) 369 550 434 ; Fax : +33 (0) 369 551 859

E-mail : ferhat.meziani@chru-strasbourg.fr

Key words: Disseminated Intravascular Coagulopathy (DIC); Microparticles (MPs); Septic Shock; Cell-based haemostasis.

Grants. This work was supported by French Ministry of Health (PHRC HUS #4649), Laboratoire Français de Fractionnement et des Biotechnologies (LFB SA, Les Ullis, France), the Société de Réanimation de Langue Française (SRLF, Paris, France) and the Association pour le Développement et la Recherche en Réanimation (ADRER, Strasbourg, France).

(NCT #01604551)

Dear Sir,

Haemostasis has evolved from an archaic innate defence system aimed at preserving vascular integrity by preventing intravascular coagulation, repairing vascular lesion and limiting pathogen invasion. In sepsis and septic shock, systemic activation of blood coagulation is culminating in disseminated intravascular coagulopathy (DIC) that occurs by two mutually non-exclusive ways: increased thrombin generation leading to fibrin formation and defective fibrinolysis (1). The precise sequence of cellular events contributing to DIC remains elusive.

DIC is one of these puzzling paradigms where it might appear difficult to reconcile the occurrence of blood clots in the vessel lumen and the absence of clotting in laboratory assays. Indeed, it has been pointed out by recent reports on DIC diagnosis in previous issues of the Journal, that the bedside assessment of DIC remains difficult in intensive care departments (2). Although DIC scores have been proposed by the International Society for Thrombosis and Haemostasis and the Japan Association for Acute Medicine, no gold standard is yet available for DIC diagnosis. Another puzzling issue is the disappointing results of clinical trials. Until now, therapeutic interventions in 196characteriz, placebo-controlled, 196characteri trials aiming at controlling unbalanced thrombin and/or hypercoagulation state failed to improve septic shock patients' survival, despite promising experimental studies (3). Of note, the fact that treatment allocations were not based on blood coagulation parameters might explain, at least in part, the trial data, and underline the needs for better patients' stratification during septic shock.

In a recent prospective and 196characteriz study of 92 patients with septic shock we questioned the relevance of a cell-based approach of septic shock-induced DIC and used circulating microparticles (MPs) as cellular surrogates of vascular cell response (4). MPs were measured at admission (D1) and during the 7 following days using functional prothrombinase assay that

allows simultaneous assessment of MP cell origin and procoagulant properties (5).

JAAM 2006 scoring was preferred in the analysis of the variations of cell-based haemostasis responses because it takes into account the inflammatory response, and the platelet count fall as well as the platelet absolute count on a time-scale basis. However, it has to be noted that Cohen's kappa coefficient between the JAAM 2006 and ISTH scores was 0.71 (good) and 34 patients with early DIC were diagnosed by both scoring systems. According to JAAM 2006, 40 patients (44 % of patients) met the early DIC criteria (30 at admission and 10 on the following day) and 41 patients according to ISTH score. (4) No difference could be evidenced in the analysis at D1 between both scores.

We reported continuous endothelial activation that was supported by inflammatory burst in septic-shock induced DIC, and showed that endothelial MPs could probe early vascular injury at the onset of DIC (4). Patients with early DIC were more severely ill by SAPS2 and SOFA scores at admission and delayed return to baseline levels of natural inhibitors was characteristic of DIC.

A specific early DIC MP pattern could be defined with high circulating concentrations of MPs of endothelial and leucocyte origin while the leucocyte count was similar in DIC and non-DIC patients. In one-way analysis, CD31-MPS ($p < 0.001$), CD105-MPs ($p < 0.001$) and CD11a-MPs/leucocyte ratio ($p < 0.01$) were strongly associated with DIC. Endothelial stress mirrored by sE-selectin was also at its upper range in DIC. All data indicating a possible diagnosis value of endothelial and leucocyte MPs, a multiple regression analysis was performed. We highlighted that CD105-MPs (OR 6.55, CI95% [2.54-16.92], $p < 0.01$), and CD31-MPs (OR 0.49, CI95% [0.26-0.94], $p = 0.03$) were associated with early DIC. The diagnosis value of MPs in the early detection of DIC at day of admission was challenged by multivariate analysis.

Among all cell markers assayed, only CD105-MPs and CD31-MPs were significant relevant variables by multivariate analysis. Cut-off values for CD105-MPs (>1.3 nM eq. PhtdSer) and CD31-MPs (≤ 1.4 nM eq. PhtdSer) were determined by ROC-curves with a sensitivity of 67.5% and 80.0%, and a specificity of 84.6% and 38.5% respectively. CD11-MPs were slightly less informative (see figure)

The logistic regression analysis leads to predict DIC with the following equation: Logit early DIC = $a + b \cdot \text{CD105} + c \cdot \text{CD31}$.

The equation factors are estimated by a bootstrap method (95% confidence interval):

- $-4.035 \leq a \leq -1.094$,
- $1.638 \leq b \leq 4.066$,
- $0.193 \leq c \leq 3.138$.

The parameters take only 2 possible values:

- if CD105-MPs > 1.3 then CD105=1, or else CD105=0,
- if CD31-MPs ≤ 1.4 then CD31=1, or else CD31=0.

Area under the resulting ROC curve is 0.816 ($p < 0.001$) and shows a best cut-off of 0.289 (Youden J index) for the diagnosis of early DIC, with the sensitivity of 67.7% [50.9-81.4], the specificity of 84.6% [71.9-93.1], the positive predictive value of 77.1% [59.9-89.6] and the negative predictive value of 77.2% [64.2-87.3].

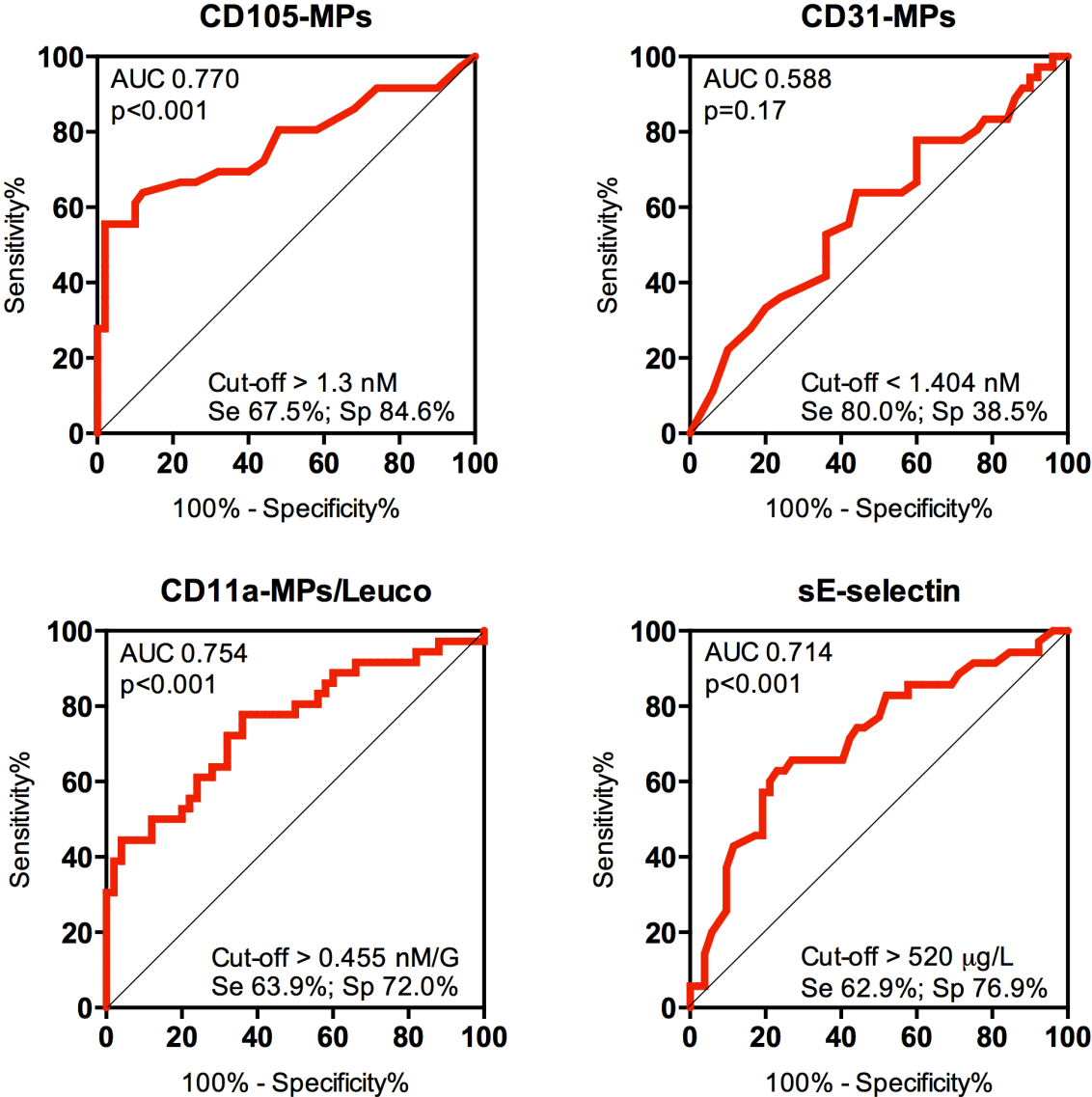
Gris and coll. (6, 7) proposed to replace D-dimers by fibrin monomers (FM) or to multiply D-dimers by FM to improve DIC diagnosis, but the absence of gold standard remains a methodological limit to this approach. In our cohort, FM were higher in DIC patients and were associated with DIC ($p=0.06$) by multiple logistic regression analysis. Nevertheless, they are not included in DIC scoring systems (ISTH overt and JAAM). A possible explanation of the occurrence of such high FM is fibrin polymerization defect. Indeed, we observed that

platelet activation follows thrombin generation (late increase in sGPV/platelet and sP-selectin/platelet ratios) and cannot support the propagation phase of haemostasis due to impaired P-selectin, ADP, Ca²⁺ and cellular dimeric ©FXIII local supply. According to our cell-based haemostasis approach of septic shock-induced DIC, the initial activation of endothelial cells and leucocytes is a characteristic feature of DIC. Indeed, although concerning only ten patients, sepsis patients developing DIC at day 2 could already be characterized by elevated CD105-MPs and CD11a-MPs/leucocyte ratio ($p < 0.05$ vs. no DIC) at D1 but also by sE-selectin, IL-10 and MCP-1 (4).

Thus, our analysis of early endothelial dysfunction in DIC indicates that the assessment of endothelial stress is crucial in sepsis-induced DIC and that sE-selectin and CD105-MPs have a diagnosis value in unclear clinical or biological context.

To date, the main limitation of our approach in current practice is the availability of easy and rapid biological assay for bedside decision. However, CD105-MPs procoagulant MPs are promising indicators of sepsis-induced DIC that could prove useful for the early patients' stratification in clinical trials and for tailored anticoagulant therapy.

Figure. Receiver Operating Characteristic curves of sE-selectin, endothelial cell- and leucocyte-derived microparticles and their relevance for early DIC diagnosis. AUC is area under curve, Se is sensitivity, Sp is specificity.



References

1. Gando S, Wada H, Tachil J, The Scientific Standardization Committee on DIC of ISTH. Differentiating disseminated intravascular coagulation (DIC) with the fibrinolytic phenotype from coagulopathy of trauma and acute coagulopathy of trauma-shock (COT/ACOTS). *J Thromb Haemost* 2013 doi: 10.1111/jth.12190
2. Wada H, Thachil J, Di Nisio M, Mathew P, Kurosawa S, Gando S, Kim HK, Nielsen JD, Dempfle CE, Levi M, Toh CH; The Scientific Standardization Committee on DIC of the International Society on Thrombosis Haemostasis. Guidance for diagnosis and treatment of DIC from harmonization of the recommendations from three guidelines. *J Thromb Haemost*. 2013 doi: 10.1111/jth.12155
3. Fourrier F. Severe sepsis, coagulation, and fibrinolysis: dead end or one way? *Crit Care Med* 2012; 40: 2704-8.
4. Delabranche X, Boisramé-Helms, Asfar P, Berger A, Mootien Y, Lavigne T, Grunebaum L, Lanza F, Gachet C, Freyssinet JM, Toti F, Meziani F. Microparticles are new biomarkers of septic shock-induced disseminated intravascular coagulopathy. *Intensive Care Med* 2013 doi:10.1007/s00134-013-2993x
5. Hugel B, Zobairi F, Freyssinet JM. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* 2004; 2 :1846-7.
6. Gris JC, Bouvier S, Cochery-Nouvellon E, Faillie JL, Lissalde-Lavigne G, Lefrant JY. Fibrin-related markers in patients with septic shock: individual comparison of D-dimers and fibrin monomers impacts on prognosis. *Thromb Haemost* 2011;106:1228-30.
7. Gris JC, Faillie JL, Cochery-Nouvellon E, Lissalde-Lavigne G, Lefrant JY. ISTH overt disseminated intravascular coagulation score in patients with septic shock: automated immunoturbidimetric soluble fibrin assay vs. D-dimer assay. *J Thromb Haemost* 2011;9:1252-5.



DISCUSSION

DISCUSSION GÉNÉRALE

Les microparticules ont été mises en évidence en microscopie électronique dans les années mil neuf cent-soixante (Wolf, 1967), même si leur existence avait pu être évoquée dans les années quarante de manière indirecte (Chargaff & West, 1946), puis ont été considérées comme des débris générés au cours du processus de préparation des échantillons (revue dans Coccuci *et al*, 2009). Il faudra attendre les années mil neuf cent-nonante pour que ces « débris cellulaires » soient reconnus comme des entités biologiquement actives, présentes à l'état physiologique et au cours de certaines pathologies où leur nombre ou leur origine peuvent être caractéristiques (Freyssinet *et al*, 1999 ; Muller *et al*, 2003 ; Del Conde *et al*, 2005 ; Morel *et al*, 2004).

Tout prédisposait les MPs à jouer un rôle dans l'hémostase : l'origine endovasculaire (plaquettes, cellules endothéliales, leucocytes, érythrocytes), la présence de phospholipides anioniques procoagulants, la mise en évidence de facteur tissulaire à leur surface, l'association entre syndrome de Scott et défaut d'externalisation de phosphatidylsérine (Wolf, 1967 ; Satta *et al*, 1994). Puis, leur mise en évidence lors des maladies thrombo-emboliques (Dignat-George *et al*, 2004) et au cours du purpura fulminans (Nieuwland *et al*, 2000) renforçait leur potentielle implication dans les anomalies de l'hémostase.

Nous pouvons articuler notre discussion autour de plusieurs points mis en exergue au cours de nos travaux. Nous aborderons successivement les interactions entre molécules actives circulantes véhiculées soit sous forme de MPs soit sous forme véritablement soluble puis les MPs comme acteurs et comme témoins d'une réponse hémostatique et vasculaire permettant une approche « cellulaire » du sepsis. Enfin, nous discuterons la possibilité d'utiliser les MPs comme marqueurs diagnostiques et de gravité et donc comme élément pouvant intervenir dans la stratification des patients en vue de leur proposer des traitements plus « ciblés ».

En effet, au sein du plasma, les molécules peuvent circuler libres, liées à un transporteur ou à des structures membranaires comme les microparticules (Giesen *et al*, 1999 ; Chou *et al*, 2004 ; Mackman, 2009 ; Owen & Mackman, 2011 ; MacKenzie *et al*, 2001 ; Dubyak, 2012). Le rôle dévolu et les possibilités d'interaction avec des récepteurs ou des cellules cibles dépendent de l'équilibre entre ces deux formes. Nos travaux permettent d'envisager cette dualité pour trois composants impliqués dans la réponse cellulaire au cours du sepsis, le CD14, CD62E et EPCR. Il s'agit de protéines membranaires libérées par protéolyse sous l'action de protéases activées par la stimulation cellulaire.

Plusieurs conséquences *in vivo* et dans les modèles d'études sont à envisager. En effet, ces facteurs réellement solubles seront probablement plus rapidement éliminés de la circulation sanguine que leur forme microparticulaire alors qu'ils perdurent dans les milieux conditionnés. Comme le suggèrent les résultats du premier article, les facteurs solubles pourraient se comporter en agonistes compétiteurs des MPs ou en « scavengers ». Dans le contexte du sepsis, caractérisé par une activation leucocytaire intense et une activité protéolytique exacerbée la contribution respective des facteurs solubles ou liés aux MPs doit être mieux connue afin de mieux appréhender la séquence des événements cellulaires et plasmatiques associés à la dérégulation de l'hémostase.

Dans notre modèle de communication intercellulaire, l'absence de CD14 « véritablement » soluble (sCD14) dans les surnageants de culture cellulaire a été établie. Ainsi, dans ce cas nos travaux montrent que l'insertion membranaire était nécessaire au transfert de la protéine fonctionnelle à la cellule cible. Ces résultats sont à pondérer car, si dans ce modèle le sérum de veau fœtal apporte la protéine LBP décrite comme transporteur de LPS *in vivo*, le milieu conditionné ne contient pas les protéases libérées par les neutrophiles au cours de l'inflammation (Park *et al*, 2009 ; Tsukamoto *et al*, 2010). L'absence de phospholipase A₂ capable de cliver les ancras GPI peut avoir augmenté la prédominance de CD14 sous forme liée aux MPs par rapport aux situations rencontrées en clinique (Fourcade *et al*, 1995). Toutefois, la phospholipase A₂ sécrétoire du groupe X (GX sPLA₂) est fortement surexprimée au cours de la réponse inflammatoire induisant une hypersensibilité au LPS, une facilitation de la libération des cytokines et une expression de COX-2 avec efflux de cholestérol au niveau des monocytes/macrophages (Shridas *et al*,

2011). Ces phénomènes pourraient favoriser la genèse de MPs. Il serait donc possible que dans le plasma des patients septiques, le pool de CD14 circulant se répartisse de manière différente entre les MPs capables de s'intégrer à des cellules cibles et de favoriser une dissémination du signal et la forme soluble sCD14. Cette dernière forme inactive sur la réponse inflammatoire des cellules d'après nos résultats, pourrait néanmoins avoir un effet cytoprotecteur éventuel en se liant au LPS circulant, diminuant ainsi la quantité disponible pour la liaison au CD14 cellulaire ou des MPs (Gluck *et al*, 2001 ; Kitchens *et al*, 2001).

Au cours du choc septique, deux phases se succèdent : la première inflammatoire (SIRS), la seconde anti-inflammatoire, compensatrice (CARS) (Adib-Conquy & Cavaillon, 2009). Chacune semble associée à la survenue du syndrome de défaillance multiviscérale, la première par excès d'inflammation, la seconde par immunodépression et facilitation des infections secondaires – dites nosocomiales. Cette phase de CARS associe à des degrés divers une apoptose lymphocytaire, en particulier splénique (Hotchkiss *et al*, 2001 ; Le Tulzo *et al*, 2002 ; Tinsley *et al*, 2003 ; Pène *et al*, 2009), et une modulation du phénotype des monocytes passant d'une majorité de cellules CD14^{high}CD16⁻ produisant des cytokines de type « pro-inflammatoires » (IL-1 β et IL-6) à des cellules CD14^{low}CD16⁺ avec diminution de l'expression de HLA-DR et production de cytokines « anti-inflammatoires » (IL-10) (Geissmann *et al*, 2003 ; Le Tulzo *et al*, 2004 ; Skrzeczynska-Moncznik *et al*, 2008). Ces phases se chevauchent dans le temps et leur amplitude et séquence diffèrent selon l'organe. Notre modèle cellulaire pourrait corroborer la séquence des événements observés en clinique humaine. À faible concentration de LPS, la réponse cellulaire se traduit par une génération de CD14-MPs capable d'amplifier (effet autocrine) la réponse monocyttaire au LPS. Plus la réponse est intense, plus la génération de MPs est importante avec un effet de type « scavenger » des CD14-MPs, permettant de lier du LPS et de le déplacer de sa cible cellulaire, de manière similaire à l'interaction du LPS avec sCD14 chez l'homme. Il est ainsi établi par ailleurs, que la forme soluble de CD14 pouvant atteindre 9 μ g/mL a été corrélée à la gravité du sepsis, (Gluck *et al*, 2001). À cette concentration, sCD14 était capable de capter du LPS circulant et de favoriser son élimination au niveau des micelles lipidiques (Kitchens *et al*, 2001).

Il est donc tentant d'envisager que *in vivo* les CD14-MPs agiraient initialement comme un leurre et qu'à concentration plus importante de CD14-MPs, leur probabilité de fusion avec d'autres types cellulaires augmente et favorise le transfert de CD14 vers des lymphocytes dépourvus de CD14.

L'hypothèse d'un mécanisme de dissémination du CD14 fonctionnel aux lymphocytes T4 (CEM) est en outre suggérée par nos résultats expérimentaux. Ainsi, au cours du sepsis, les MPs participeraient à l'amplification de la réponse pro-inflammatoire par le biais de communication intercellulaire et à son contrôle par le biais d'interactions avec le LPS.

Cette nouvelle approche est également applicable à l'analyse de la E-Sélectine (CD62E) circulante, chez les patients présentant un choc septique, inclus dans notre étude clinique. En effet, nous observons l'absence de CD62E porté par les MPs (CD62-MPs) chez presque tous les patients alors que la E-Sélectine est un marqueur reconnu de l'atteinte endothéliale et a été rapportée au cours du choc septique et de la CIVD (Shapiro *et al*, 2010 ; Shapiro & Aird, 2011 ; Skibsted *et al*, 2013). Pourtant, la détection de CD62-MPs par notre méthode est tout à fait reproductible dans les pathologies cardio-vasculaires (Morel *et al*, 2008 ; Jung *et al*, 2011). Dans notre cohorte de patients en choc septique, le dosage par ELISA a confirmé la présence de sE-Sélectine (sCD62E), avec un taux plus élevé en cas de CIVD. L'absence observée de détection de CD62E-MPs pourrait s'expliquer par l'intense activation leucocytaire avec une sécrétion importante de protéases ou d'élastase responsable d'un clivage rapide de la E-Sélectine ancrée dans la membrane endothéliale.

Les MPs peuvent également convoier le récepteur de la protéine C (EPCR). Ce récepteur est présent à la surface des cellules endothéliales et des monocytes (Fukudome & Esmon, 1995), mais aussi à la surface des MPs émises par ces cellules (Perez-Casal *et al*, 2005). Les MPs porteuses d'EPCR (EPCR⁺-MPs) sont capables de lier la protéine C qu'elle soit activée ou non, mais elles ne peuvent pas promouvoir l'activation de la PC en PCa, probablement en raison d'une quantité insuffisante de thrombomoduline permettant de « présenter » la thrombine. Cette raison reste néanmoins hypothétique car la thrombomoduline est exposée par les MPs des monocytes stimulés par le LPS (Satta *et al*, 1997).

Le traitement de patients en choc septique par la protéine C activée recombinante (rhAPC, drotrécogine alfa [activée], Xigris®, Eli Lilly) entraîne une augmentation de la génération de MPs porteuses d'EPCR se traduisant par la présence dans le plasma de PCa-EPCR⁺-MPs (Perez-Casal *et al*, 2005 ; Perez-Casal *et al*, 2009). Dans ce contexte, notre modèle de rats septiques montre, de manière très intéressante, une modification de la répartition phénotypique des MPs en fonction du traitement par drotrécogine alfa avec une diminution de la génération des MPs totales, en accord avec les résultats publiés chez les patients septiques, et une baisse relative des MPs d'origine leucocytaire. L'analyse des propriétés effectrices des MPs réinjectées à des rats naïfs démontre un rôle direct de la rhAPC sur les MPs. En effet, l'activation de COX-2 est moindre chez les receveurs dont les MPs présentent en outre un contenu en thromboxane A₂ (TXA₂) augmenté. Cependant, pour confirmer les travaux chez l'homme, il reste à identifier EPCR sur les MPs des rats donneurs et l'éventuelle présence de PCa potentiellement véhiculée par ces MPs.

L'ensemble de ces observations montre les limites du dosage et de la détection des MPs pour l'évaluation d'une réponse cellulaire intense. Plusieurs raisons peuvent conduire à l'absence de détection des MPs comme un dosage invalidé par le clivage protéolytique de la protéine, naturellement exacerbé dans le vaisseau en réponse au stress, ou un stockage prolongé ou des cycles de congélation décongélation fragilisant la liaison GPI. Enfin, la formation d'agrégats entre les MPs porteuses du récepteur intact comme l'EPCR capable de lier un ligand pharmacologique reste possible et prive dans ce cas d'une détection fiable notamment par cytométrie. À titre d'exemple, des agrégats leucoplaquettaires promus par les MPs de taille supérieure à 10 µm ont été mis en évidence au cours de l'infarctus du myocarde (Héloire *et al*, 2003).

Les MPs sont à la fois des acteurs et des témoins de la réponse hémostatique au cours du sepsis et du choc septique et témoignent de la contribution multiple des cellules vasculaires. Ainsi, d'autres composants des MPs sont susceptibles de contribuer à leurs propriétés effectrices au cours du sepsis, il s'agit des cytokines et lipides membranaires. Par exemple, l'IL-1β participe à la réponse inflammatoire. Dans notre modèle, la réponse apoptotique n'était pas majoritairement liée à IL-1β. En effet, l'apport d'IL-1β exogène ne permettait qu'une amplification modérée de la réponse des THP-1 au LPS et était sans effet sur les CEM.

Un effet amplificateur plus important a pu être mis en évidence par l'oxydation des MPs par du hydroperoxyde de *tert*-butyle (t-BuOOH) en présence de chlorure de fer, alors que la vitamine C avait un effet protecteur (données non publiées).

Le modèle de choc septique polymicrobien par perforation-ligature cœcale a montré l'implication des MPs dans la survenue de l'hypotension mais aussi de la réponse inflammatoire au niveau tissulaire. Toutefois, nous notons une diminution du débit carotidien – reflet du débit cardiaque – plus qu'une vasoplégie pouvant faire évoquer un effet dépresseur myocardique. Un tel effet avait déjà été rapporté sur une analyse ex-vivo de la contractilité de muscle papillaire cardiaque isolé (Azavedo *et al*, 2007). Cependant, nous notons également une augmentation significative de l'expression de iNOS associée à celle de NFκB et de pI-κBα témoignant d'une réponse vasculaire évoluant vers une vasoplégie. Par ailleurs, le taux de MPs totales est inchangé chez tous les rats témoignant d'une clairance ou d'une capture rapide des MPs injectées par les cellules vasculaires.

Notre protocole expérimental comportait l'utilisation de la rhAPC, comme modulateur pharmacologique à la fois de l'hémostase et de l'inflammation. Les rats septiques traités par rhAPC (en moyenne 18 heures après la ligature-perforation) présentaient une mortalité moindre à la 4^{ème} heure de monitoring (5/16 vs. 9/16, $p < 0,05$) et nécessitait des doses plus faibles de noradrénaline pour maintenir l'objectif fixé par avance de pression artérielle moyenne. Ces données sont en faveur d'un effet hémodynamique de la rhAPC qui a été largement décrit (Levy *et al*, 2010 ; Bouazza *et al*, 2011). D'autres équipes ont montré, in-vitro, un effet cytoprotecteur de rhAPC, mais aussi de protéines C modifiées ayant perdu toute action anticoagulante. Cet effet serait médié par l'activation des récepteurs activés par les protéases (PAR-1) (Riewald *et al*, 2002 ; Riewald *et al*, 2003 ; Mosnier *et al*, 2007). La thrombine et la protéine C activée ont des effets opposés au niveau de PAR-1. Une intense polémique est née de cette observation, la thrombine étant générée avant la PCa, certains évoquent l'impossibilité pour la PCa d'avoir une action cytoprotectrice *in vivo* (Ludeman *et al*, 2005 ; Esmon, 2005 ; Ruf, 2005). Cependant, ce modèle était rendu caduc par l'utilisation thérapeutique de rhAPC permettant d'obtenir rapidement une concentration élevée de PCa capable d'activer PAR-1. Il a également été montré une relocalisation de PAR-1 en dehors des rafts dépendante de la liaison de la Protéine C activée à son récepteur EPCR, alors que la thrombine est

préférentiellement présente au niveau des rafts (Bae *et al*, 2007 ; Bae *et al*, 2008). De plus, l'EPCR serait capable de lier FVII(a) avec une affinité équivalente à celle pour PC(a) avec d'une part un effet limitant de l'initiation de la génération de thrombine (effet « scavenger ») et d'autre part, la possibilité pour FVIIa lié à EPCR de cliver PAR-1 avec un effet cytoprotecteur identique à celui décrit avec PCa (Sen *et al*, 2011).

Nous disposons d'arguments forts pour penser que les MPs sont une cible pharmacologique qui pourrait être intéressant de contrôler dans une approche thérapeutique complémentaire (Perez-Casal *et al*, 2011, Andriantsitohaina, 2011). À côté de notre étude expérimentale chez le rat septique, Zafrani et coll. a récemment rapporté l'utilisation de la calpastatine pour réduire la vésiculation membranaire dans un modèle de ligature-perforation cœcale chez la souris, avec des résultats prometteurs en terme de survie et de modulation de l'inflammation (Zafrani *et al*, 2012). La lactadhérine pourrait également être un moyen de moduler la vésiculation tout comme l'était la drotrécogine alfa [activée] chez l'homme mais aussi dans notre modèle animal. En effet, la supplémentation en lactadhérine permettait d'augmenter la clairance des MPs d'origine plaquettaire avec une diminution des manifestations thrombotiques (Dasgupta *et al*, 2009).

Toutefois, la manipulation du réservoir dynamique des MPs fait courir le risque d'une réponse adaptative inappropriée, ce qui rend nécessaire une meilleure évaluation du « profil inflammatoire » du patient afin de lui proposer des traitements adaptés, tels qu'ils se développent dans le traitement « à la carte » des tumeurs après phénotypage (Dienstmann *et al*, 2013). Il nous faudrait donc évaluer les MPs sous l'angle du diagnostique de gravité et du suivi de la réponse aux traitements.

Pour entreprendre la réalisation de notre étude clinique, la définition de la CIVD dans la cohorte a été ainsi un point crucial. Il n'y a pas de « gold standard » tel que défini récemment par Wada et coll. pour le comité de standardisation de l'ISTH (Wada *et al*, 2013). Nous avons décidé *a priori* d'analyser les résultats en fonction du score diagnostique de CIVD JAAM 2006 (Gando *et al*, 2006) et non du score ISTH « overt » (Taylor *et al*, 2001). Le choix de ne pas utiliser le score ISTH est lié à la faible valeur diagnostique du taux de fibrinogène dans le contexte de syndrome inflammatoire avec hyperfibrinogénémie. De plus, le score JAAM permet une évaluation cinétique de la numération plaquettaire, et ainsi de prendre en considération

une chute de plus de 30 % (voire de plus de 50 %) des plaquettes sur deux prélèvements successifs. Enfin, même si le score ISTH a été évalué en réanimation (Bakhtiari *et al*, 2004), le score JAAM 2006 a été défini spécifiquement sur une population de réanimation, même si les patients septiques ne représentaient qu'environ un tiers de la cohorte. Dans notre cohorte, un seul patient avait un taux de fibrinogène inférieur à 1 g/L et le taux moyen de fibrinogène n'était pas significativement plus bas dans le groupe CIVD. De plus, presque tous les patients présentaient un taux de D-dimères augmenté, les valeurs seuils « basse » (1 point) et « haute » (3 points) du score ISTH semblaient ainsi peu discriminantes.

Malgré un effectif réduit (un peu moins de 100 patients), nous avons pu montrer que les variations des MPs au cours du sepsis pouvaient être un reflet de l'activation cellulaire dans le vaisseau. Nous avons observé un taux de MPs élevé chez les patients en choc septique, de l'ordre de 15 nM éq. PhtdSer, indépendant de la présence ou non d'une CIVD. La persistance d'un taux élevé chez les patients présentant une thrombopénie pourrait rendre compte de la faible incidence des manifestations hémorragiques chez les patients en CIVD présentant pourtant des troubles majeurs de la coagulation. En effet, les MPs constituent une surface procoagulante importante. La principale différence entre patient présentant une CIVD ou non – hormis sur les paramètres d'hémostase ! – est le changement de phénotype des MPs circulantes. Ainsi, nous observons une diminution des MPs d'origine plaquettaire portant la GPIIb/IIIa (au *pro rata* de la numération plaquettaire) tandis que les MPs leucocytaires deviennent prédominantes (CD11a-MPs). La numération leucocytaire étant identique à l'admission entre les patients présentant une CIVD ou pas, l'augmentation des MPs leucocytaires traduit alors une stimulation leucocytaire plus marquée, avec un ratio CD11a-MPs/leucocytes augmenté alors qu'il reste bas chez les patients sans CIVD. Cela est à mettre en parallèle avec une concentration des marqueurs inflammatoires en particulier IL-6 et MCP-1 plus élevée alors que la CRP n'est pas différente. Au cours du suivi jusqu'à J7, la prédominance des MPs leucocytaires persiste alors que les MPs totales tendent à retrouver un niveau « basal » parallèlement à la diminution très forte de la stimulation par les cytokines. Cette observation est à relier à une hyperleucocytose très élevée, jusqu'à 40 G/L, en l'absence d'infection secondaire.

Nous avons observé, comme d'autres, que l'activation de la coagulation était présente chez tous les patients en choc septique, mais certains seulement présentent une CIVD associée à une augmentation de la gravité et des défaillances d'organes. Dès lors que l'on considère l'hémostase comme une ligne de défense indispensable, sa modulation bénéfique chez les uns pourrait s'avérer délétère chez les autres. La question étant alors de définir ceux qui peuvent en tirer bénéfice. Deux observations soulignent cet aspect. Tout d'abord, la thrombophilie – c'est-à-dire le risque accru de maladie thrombo-embolique – peut être associée à une meilleure survie. Cela a été observé au cours de l'essai PROWESS (rhAPC contre placebo). Les patients porteurs d'une résistance à la protéine C activée par facteur V Leiden (FV^{R506Q}) présentaient une réduction significative de la mortalité indépendamment du traitement ; ceci a été confirmé sur un modèle de souris hétérozygote *f5^{+/-}*, alors que les souris homozygote (*f5^{-/-}*) n'étaient pas « protégées » (Kerlin *et al*, 2003). De même, les patients présentant un déficit sévère en plasminogène (environ 2 % de la population asiatique) présentent une résistance à l'infection par *Yersinia pestis*, car ce bacille a besoin d'activer le plasminogène de l'hôte pour promouvoir l'invasion tissulaire (Degen *et al*, 2007 ; Rijken & Lijnen, 2009). À l'inverse, l'hémophilie ou les traitements anticoagulants de type anti-vitamine K ne protègent pas de la survenue d'une CIVD (Schoenmakers *et al*, 2008 ; Vancine *et al*, 2011). Ainsi les traitements modifiant la génération des MPs ou leurs propriétés pourraient avoir une incidence sur les interactions entre cellules et protéines plasmatiques (voir paragraphe rhAPC). Il est à noter que ce changement de contribution des différentes origines cellulaires au pool de MPs circulantes a également été mis en évidence dans l'étude expérimentale chez le rat dans le groupe péritonite non traité par rhAPC.

Malgré l'absence de CD62E-MPs discutée plus haut on observe au cours du sepsis une augmentation des MPs endothéliales, avec de nombreuses différences entre CIVD et non CIVD. Le taux de CD31, reflétant l'apoptose endothéliale, était augmenté chez tous les patients. Toutefois, une moindre augmentation à J1 est mise en évidence au cours de la CIVD en analyse univariée et est également retrouvée en régression logistique bien qu'il n'y ait pas de différence en analyse sur mesures répétées (J1, J3 et J7).

Un autre marqueur endothélial est l'endogline (CD105), une protéine membranaire présentant un domaine RGD (comme les intégrines) et récepteur accessoire de TGF β impliquée dans l'angiogenèse et dans

l'ischémie-reperfusion (López-Novoa & Bernabeu, 2011). Le domaine RGD est impliqué dans la liaison à différentes protéines extracellulaires telles que la fibronectine, la prothrombine, le facteur von Willebrand, le fibrinogène ou la thrombospondine (Rossi *et al*, 2013).

Le déficit hétérozygote en CD105 est responsable de la maladie de Rendu-Osler caractérisée par des télangiectasies, et le déficit homozygote n'est pas viable (absence d'angiogenèse) (McAllister *et al*, 1994 ; Li *et al*, 1999). À l'opposé, la présence de taux élevés de CD105 soluble (sCD105) a été observée au cours de la grossesse en cas de pré-éclampsie et de HELPP syndrome associant anémie hémolytique (Haemolysis), cytolysé hépatique (Elevated Liver enzymes) et thrombopénie (Low Platelet count), mais aussi troubles de la conscience et insuffisance rénale aiguë chez la femme enceinte (Ramma & Ahmed, 2011). Cette pathologie fait partie des micro-angiopathies thrombotiques, tout comme le syndrome hémolytique et urémique / purpura thrombotique thrombocytopénique et la CIVD, telle que nous l'avons décrite dans le travail sur le choc septique. Au cours de la pré-éclampsie, l'hypoxie chronique placentaire induit une surexpression de l'hème-oxygénase (HO-1), de Fms-like tyrosine kinase receptor-1 (flt-1) et de l'endogline (Abildgaard & Heimdal, 2013). Ces marqueurs (flt-1 et sE-Sélectine) sont associés très fortement à la gravité du sepsis et du choc septique dans des études de Aird et Schapiro (Shapiro *et al*, 2010 ; Shapiro & Aird, 2011 ; Skibsted *et al*, 2013).

Le rôle de CD105 dans la survenue de l'insuffisance rénale a été étudié dans un modèle expérimental de souris haplodéficiente *Eng^{+/-}*. Les souris WT (*Eng^{+/+}*) présentaient une nécrose tubulaire aiguë après ischémie-reperfusion rénale alors que les souris haplodéficientes étaient protégées, semblant indiquer la participation de CD105 dans la survenue de l'insuffisance rénale (Docherty *et al*, 2006). Dans la cohorte, une importante élévation des MPs porteuses de CD105 est fortement associée à la CIVD, avec en analyse multivariée un Odd-Ratio à plus de 6. Les patients présentant une CIVD avaient une incidence très élevée d'insuffisance rénale aiguë (de l'ordre de 80 %) nécessitant le recours à l'épuration extra-rénale chez la moitié d'entre eux. Ainsi, nous pouvons faire un parallèle entre l'atteinte endothéliale observée au cours de la CIVD et la survenue de l'insuffisance rénale.

Le suivi des variations du phénotype des MPs et des autres marqueurs d'activation cellulaire et de l'hémostase nous permet d'entrevoir et proposer une séquence des évènements au cours du sepsis ainsi qu'une détection précoce.

Ainsi, la survenue d'une CIVD au cours des 24 premières heures de prise en charge en réanimation chez 10 patients, qui n'avaient pas les critères diagnostiques de CIVD à l'admission (un quart des patients présentant une CIVD), permet d'envisager la séquence des évènements conduisant à une CIVD. Ces patients présentaient toutefois à l'admission un taux de CD105-MPs et un taux de CD11a-MPs/leucocytes élevés, témoignant de l'atteinte endothéliale et de l'activation leucocytaire. Ces patients ne présentaient pas d'activation plaquettaire, avec des taux de sCD62P/plaquettes et sGPV/plaquettes normaux alors qu'ils étaient augmentés en cas de CIVD. Le faible nombre de patients rend l'analyse statistique difficile, mais le taux de PAI-1 semblait plus élevé alors que le taux de fragments 1+2 de la prothrombine (témoignant de la thrombinoformation) et le taux de monomères de fibrine (témoignant de la fibrinoformation) étaient augmentés. L'ensemble des données suggère un tableau de la survenue d'une CIVD mettant en jeu des interactions entre cellules et éléments circulants. Un pic de cytokines initial serait responsable d'une activation cellulaire intense, leucocytaire (CD11a-MPs) et endothéliale (CD105-MPs), avec initiation de la génération de thrombine et libération de PAI-1. À ce stade, l'absence d'activation plaquettaire limite la polymérisation des monomères de fibrine, tandis que l'excès de PAI-1 limite la fibrinolyse ; l'un et l'autre rendent compte du taux bas de D-dimères (gel de fibrine peu important et défaut de fibrinolyse). Alors que la thrombinoformation se poursuit, l'activation plaquettaire survient (dont témoignent l'augmentation des ratios sGPV/plaquettes et sCD62P/plaquettes) avec localement une libération accrue de Ca^{2+} , cFXIII et ADP facilitant la polymérisation des monomères de fibrine. Secondairement, la diminution de la libération de PAI-1 par la cellule endothéliale lésée et l'activation du plasminogène par t-PA d'autre part aboutit à une fibrinolyse avec élévation des D-dimères.

Il nous semble donc que les MPs joueraient un rôle prépondérant dans la survenue de la dysfonction vasculaire et de la CIVD. Les MPs témoignent de l'activation cellulaire, plus précoce que ses conséquences sur les concentrations de protéines plasmatiques, sur lesquelles portent actuellement le diagnostic. Dans

ce contexte, les MP-CD105 et endothéliales prennent une valeur diagnostique et de suivi de l'évolution de la CIVD, qu'il conviendra de vérifier dans une cohorte plus importante. .

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Nos différents travaux nous ont permis d'étudier et de caractériser le rôle de la vésiculation membranaire au cours des états septiques graves de l'échelon cellulaire à l'homme en passant par un modèle de choc septique expérimental réanimé chez le rat.

Les analyses chez le rat et chez l'homme confirment l'induction d'une vésiculation membranaire en réponse à l'agression par un pathogène. Nous observons une modification de la répartition phénotypique des MPs en fonction de l'intensité de la réponse inflammatoire. Ainsi, une réponse inflammatoire « contenue » semble associée à une activation endothéliale et leucocytaire modérée, une apoptose endothéliale et une initiation de la coagulation qui reste contrôlée, avec peu d'activation plaquettaire. Les MPs plaquettaires restent prédominantes, les MPs leucocytaires sont peu augmentées et le taux de MPs porteuses d'endogline (CD105-MPs) est à la limite supérieure de l'intervalle de référence. À l'opposé, une réponse inflammatoire « explosive » se traduit par une intense activation endothéliale (CD105-MPs) et leucocytaire, une thrombino- et une fibrinoformation massive. Initialement, l'activation plaquettaire reste modérée, avec un défaut de polymérisation des monomères de fibrine et un excès de PAI-1 puis une thrombopénie avec activation plaquettaire, formation de micro-caillots et fibrinolyse massive. Les MPs plaquettaires deviennent minoritaires alors que l'activation leucocytaire et endothéliale sont maximales avec prédominance des MPs leucocytaires. Ce profil a également été observé chez les rats septiques. Chez ces derniers, la modulation de l'inflammation endothéliale et de l'hémostase par la protéine C activée se traduisait par une réduction de l'activation leucocytaire et plaquettaire, avec de plus, l'absence d'effet hypotenseur chez les rats réinjectés et une forte réduction chez ceux-ci de l'inflammation et de l'expression de NF- κ B.

Stimulés par du LPS, les monocytes sont capables d'émettre des MPs porteuses de CD14/TLR4 (CD14-MPs). Ces MPs sont capables de s'intégrer à des cellules cibles par un mécanisme dépendant de l'exposition à leur surface de PhtdSer puisqu'inhibé par l'annexine-5 ; elles ne délivrent pas de signal pro-

apoptotique direct ni ne transfèrent des quantités importantes de LPS. En s'intégrant à la membrane, le complexe CD14/TLR4 conserve sa fonction et active la voie de NF- κ B en utilisant les voies de signalisation de la cellule hôte. En fonction de la cellule cible, les MPs ont un effet pro-inflammatoire (amplification de la réponse des monocytes) ou anti-inflammatoire (apoptose lymphocytaire). Parallèlement, elles assurent en solution une fonction de capture du LPS et pourraient ainsi contribuer à son inhibition et son élimination. Notre travail expérimental, confirme le rôle majeur des MPs dans la communication intercellulaire et la régulation de l'inflammation. Ainsi, les MPs participeraient à la balance pro-/anti-inflammatoire en fonction de leur cible et/ou de leur concentration, ce qui permet d'expliquer leur mode d'action dans la dysfonction hémodynamique qui caractérise le choc septique

Cette approche physiopathologique de la réponse à l'agression au cours du choc septique nous permet de mieux comprendre la séquence d'activation cellulaire, reflétée par les MPs circulantes. En particulier, nous pensons que l'échec des multiples traitements anticoagulants ou anti-inflammatoires qui ont été essayés au cours d'études randomisées contre placebo pourrait trouver ici une hypothèse explicative. Ces traitements ont été appliqués aux patients indépendamment de leur réponse inflammatoire. Les patients ne présentant pas de réponse inflammatoire « explosive », mettent en œuvre des mécanismes de défense nécessaires et contrôlés ; l'utilisation de molécules modulatrices sera alors au mieux inutile, voire délétère en limitant une réponse adaptative. À l'opposé, ceux présentant un « excès » de réponse inflammatoire – sans que l'on puisse en définir l'origine – voient leur activation endothéliale, leucocytaire et plaquettaire générer un excès de thrombine, avec augmentation des défaillances d'organe, en particulier d'insuffisance rénale nécessitant le recours à l'épuration extra-rénale. Nous pensons que seuls ces derniers pourraient avoir un bénéfice à être traités par des molécules modulant l'inflammation ou l'hémostase.

Le problème majeur reste la capacité à « diagnostiquer » ces patients à l'admission. Aucun dosage isolé (cytokines, numération leucocytaire ou plaquettaire, temps de coagulation, D-dimères) ne permet à lui seul de « prédire » le profil inflammatoire du patient. Il est donc nécessaire de recourir à une approche multifactorielle en intégrant différents paramètres. C'est ce que réalisent les scores de CIVD (JAAM 2006 et ISTH « overt »). Le diagnostic de CIVD n'était pas retenu comme critère dans l'indication des essais

randomisés par antithrombine ou protéine C activée. Ces essais sont négatifs (KyberSept et PROWESS-SHOCK) alors que l'analyse des sous-groupes « CIVD » de KyberSept et de PROWESS retrouvait un bénéfice significatif chez ces patients. Nous pensons donc que l'utilisation des scores de CIVD existants, éventuellement complétés par des marqueurs d'activation cellulaire tels que les MPs pourraient permettre de mieux cibler les patients susceptible de bénéficier des traitements modulant la génération de thrombine mais aussi la réponse vasculaire, endothéliale, leucocytaire et plaquettaire.

Les résultats que nous avons obtenus chez l'homme nous ont permis de déposer un brevet sur l'intérêt des MPs dans le diagnostic de la CIVD et de sa résolution, et nous avons obtenu les autorisations réglementaires pour débiter une nouvelle collection d'échantillons biologiques dans le but de confirmer ces résultats et de développer un kit de dosage rapide des MPs, les techniques actuelles (par cytométrie en flux ou par test prothrombinase) n'étant pas applicable à l'urgence ou au « coup-par-coup ». Ce nouveau travail prospectif devrait également permettre de proposer une nouvelle approche de la CIVD au cours du choc septique en intégrant, à côté des paramètres d'hémostase moléculaires à (re)définir, des éléments de l'activation cellulaire. Les éléments dont nous disposons orienteraient vers la prise en compte de la présence d'un SIRS, la numération plaquettaire (avec évaluation cinétique), le dosage des FV (en remplacement du temps de Quick/taux de prothrombine), D-dimères et monomères de fibrine, ainsi que les taux de CD105-MPs, CD31-MPs, CD11a-MPs/leucocytes et sE-sélectine. L'intérêt du rapport sGPV/plaquettes serait plus dans la « confirmation » du diagnostic (tardif). Par ailleurs, l'évolution de CD105-MPs et de CD11a-MPs/leucocytes pourrait être des marqueurs de « guérison » cellulaire.

Parallèlement, nous souhaitons développer des modèles animaux de CIVD septiques afin de comprendre l'implication de CD105 dans le développement de la CIVD et de l'atteinte rénale.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abildgaard U, Heimdal K. (2013)** Pathogenesis of the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count (HELLP): a review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 166:117-23.
- Abrams ST, Zhang N, Manson J, et al. (2013)** Circulating histones are mediators of trauma-associated lung injury. *Am J Resp Crit Care Med.* 187:160-9.
- Adib-Conquy M, Cavaillon JM. (2009)** Compensatory anti-inflammatory response syndrome. *Thromb Haemost.* 101:36-47.
- Aird WC. (2005)** Coagulation. *Crit Care Med.* 33:S485-7.
- Aird WC. (2007)** Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res.* 100:158-73.
- Akong-Moore K, Chow OA, von Kockritz-Blickwede M, Nizet V. (2012)** Influences of chloride and hypochlorite on neutrophil extracellular trap formation. *PLoS ONE* 7:e42984.
- Aliev G, Shi J, Perry G, Friedland RP, Lamanna JC. (2000)** Decreased constitutive nitric oxide synthase, but increased inducible nitric oxide synthase and endothelin-1 immunoreactivity in aortic endothelial cells of donryu rats on a cholesterol-enriched diet. *Anat Rec.* 260:16-25.
- Amabile N, Guerin AP, Leroyer A, et al. (2005)** Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 16:3381-8.
- Amabile N, Heiss C, Chang V, et al. (2009)** Increased CD62e(+) endothelial microparticle levels predict poor outcome in pulmonary hypertension patients. *J Heart Lung Transplant.* 28:1081-6.
- Ammollo CT, Semeraro F, Xu J, Esmon NL, Esmon CT. (2011)** Extracellular histones increase plasma thrombin generation by impairing thrombomodulin-dependent protein C activation. *J Thromb Haemost.* 9:1795-803.
- Amulik B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A. (2012)** Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Ann Rev Immunol.* 30:459-89.
- Andriantsitohaina R. (2011)** Microparticles as biological vectors of activated protein C treatment in sepsis. *Crit Care.* 15:11.
- Anglès-Cano E. (1994)** Overview on fibrinolysis: plasminogen activation pathways on fibrin and cell surfaces. *Chem Phys Lipids.* 68:353-62.
- Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM. (2005)** Septic shock. *Lancet.* 365:63-78.
- Aras O, Shet A, Bach RR, et al. (2004)** Induction of microparticle- and cell-associated intravascular tissue factor in human endotoxemia. *Blood.* 103:4545-53.
- Aupeix K, Hugel B, Martin T, et al. (1997)** The significance of shed membrane particles during programmed cell death in vitro, and in vivo, in HIV-1 infection. *J Clin Invest.* 99:1546-54.
- Azevedo LC, Janiszewski M, Pontieri V, et al. (2007)** Platelet-derived exosomes from septic shock patients induce myocardial dysfunction. *Crit Care.* 11.
- Bae JS, Yang L, Rezaie AR. (2007)** Receptors of the protein C activation and activated protein C signaling pathways are colocalized in lipid rafts of endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:2867-72.
- Bae JS, Yang L, Rezaie AR. (2008)** Lipid raft localization regulates the cleavage specificity of protease activated receptor 1 in endothelial cells. *J Thromb Haemost.* 6:954-61.

- Bakhtiari K, Meijers JC, de Jonge E, Levi M. (2004)** Prospective validation of the International Society of Thrombosis and Haemostasis scoring system for disseminated intravascular coagulation. *Crit Care Med.* 32:2416-21.
- Bakouboula B, Morel O, Faller AL, Freyssinet JM, Toti F. (2011)** Significance of membrane microparticles in solid graft and cellular transplantation. *Front Biosci.* 16:2499-514.
- Barbato JE, Tzeng E. (2004)** Nitric oxide and arterial disease. *J Vasc Surg.* 40:187-93.
- Bardelli C, Amoruso A, Federici Canova D, et al. (2012)** Autocrine activation of human monocyte/macrophages by monocyte-derived microparticles and modulation by PPARgamma ligands. *Br J Pharmacol.* 165:716-28.
- Baron M, Boulanger CM, Staels B, Tailleux A. (2012)** Cell-derived microparticles in atherosclerosis: biomarkers and targets for pharmacological modulation? *J Cell Mol Med.* 16:1365-76.
- Barry OP, Kazanietz MG, Pratico D, FitzGerald GA. (1999)** Arachidonic acid in platelet microparticles up-regulates cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin formation via a protein kinase C/mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J Biol Chem.* 274:7545-56.
- Barteneva NS, Fasler-Kan E, Bernimoulin M, et al. (2013)** Circulating microparticles: square the circle. *BMC Cell Biol.* 14:1471-2121.
- Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, et al. (2001)** Efficacy and safety of human recombinant activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med.* 344:699-709.
- Bick RL. (2003)** Disseminated intravascular coagulation current concepts of etiology, pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Hematol Oncol Clin North Am.* 17:149-76.
- Boisrame-Helms J, Kremer H, Schini-Kerth V, Meziani F. (2013)** Endothelial dysfunction in sepsis. *Curr Vasc Pharmacol.* 11:150-60.
- Bone RC. (1996)** Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med.* 24:1125-8.
- Bouazza Y, Sennoun N, Strub C, et al. (2011)** Comparative effects of recombinant human activated protein C and dexamethasone in experimental septic shock. *Intensive Care Med* 37:1857-64.
- Boulanger CM, Scoazec A, Ebrahimian T, et al. (2001)** Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. *Circulation.* 104:2649-52.
- Bouwens EA, Stavenuiter F, Mosnier LO. (2013)** Mechanisms of anticoagulant and cytoprotective actions of the protein C pathway. *J Thromb Haemost.* 11 Suppl 1: 242-53.
- Branzk N, Papayannopoulos V. (2013)** Molecular mechanisms regulating NETosis in infection and disease. *Semin Immunopathol.* 35:413-30.
- Bretelle F, Sabatier F, Desprez D, et al. (2003)** Circulating microparticles: a marker of procoagulant state in normal pregnancy and pregnancy complicated by preeclampsia or intrauterine growth restriction. *Thromb Haemost.* 89:486-92.
- Bretscher MS. (1972)** Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes. *Nat New Biol.* 236:11-2.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. (2004)** Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 303:1532-5.
- Brinkmann V, Zychlinsky A. (2012)** Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol.* 198:773-83.
- Brodsky SV, Zhang F, Nasjletti A, Goligorsky MS. (2004)** Endothelium-derived microparticles impair endothelial function in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 286:H1910-5.
- Brown GT, McIntyre TM. (2011)** Lipopolysaccharide signaling without a nucleus: kinase cascades stimulate platelet shedding of proinflammatory IL-1beta-rich microparticles. *J Immunol.* 186:5489-96.
- Buesing KL, Densmore JC, Kaul S, et al. (2011)** Endothelial microparticles induce inflammation in acute lung injury. *J Surg Res.* 166:32-9.

- Burnier L, Fontana P, Kwak BR, Angelillo-Scherrer A. (2009)** Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. *Thromb Haemost.* 101:439-51.
- Butenas S, Orfeo T, Mann KG. (2009)** Tissue factor in coagulation: Which? Where? When? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 29:1989-96.
- Callahan MK, Popernak PM, Tsutsui S, Truong L, Sschlegel RA, Henderson AJ. (2003)** Phosphatidylserine on HIV envelope is a cofactor for infection of monocytic cells. *J Immunol.* 4840-5.
- Campbell RL, Davies PL. (2012)** Structure-function relationships in calpains. *Biochem J.* 447:335-51.
- Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, Grange C, Fonsato V, Tetta C. (2011)** Exosome/microvesicle-mediated epigenetic reprogramming of cells. *Am J Cancer Res.* 1:98-110.
- Castaman G, Yu-Feng L, Battistin E, Rodeghiero F. (1997)** Characterization of a novel bleeding disorder with isolated prolonged bleeding time and deficiency of platelet microvesicle generation. *Br J Haematol.* 96:458-63.
- Castellana D, Toti F, Freyssinet JM. (2010)** Membrane microvesicles: macromessengers in cancer disease and progression. *Thromb Res.* 125:584-8.
- Cauwels A. (2007)** Nitric oxide in shock. *Kidney Int.* 72:557-65.
- Cauwenberghs S, Feijge MA, Harper AG, Sage SO, Curvers J, Heemskerk JW. (2006)** Shedding of procoagulant microparticles from unstimulated platelets by integrin-mediated destabilization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett.* 580:5313-20.
- Chargaff E, West R. (1946)** The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J Biol Chem.* 166:189-97.
- Chiao CW, da Silva-Santos JE, Giachini FR, Tostes RC, Su MJ, Webb RC. (2013)** P2X7 receptor activation contributes to an initial upstream mechanism of lipopolysaccharide-induced vascular dysfunction. *Clin Sci.* 125:131-41.
- Chironi GN, Simon A, Boulanger CM, et al. (2010)** Circulating microparticles may influence early carotid artery remodeling. *J Hypertens.* 28:789-96.
- Cho HJ, Xie QW, Calaycay J, et al. (1992)** Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J Exp Med.* 176:599-604.
- Choi SH, Smith SA, Morrissey JH. (2011)** Polyphosphate is a cofactor for the activation of factor XI by thrombin. *Blood.* 118:6963-70.
- Chou J, Mackman N, Merrill-Skoloff G, Pedersen B, Furie BC, Furie B. (2004)** Hematopoietic cell-derived microparticle tissue factor contributes to fibrin formation during thrombus propagation. *Blood.* 104:3190-7.
- Chung MC, Popova TG, Jorgensen SC, et al. (2008)** Degradation of circulating von Willebrand factor and its regulator ADAMTS13 implicates secreted *Bacillus anthracis* metalloproteases in anthrax consumptive coagulopathy. *J Biol Chem.* 283:9531-42.
- Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. (2009)** Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol.* 19:43-51.
- Coleman JA, Quazi F, Molday RS. (2013)** Mammalian P4-ATPases and ABC transporters and their role in phospholipid transport. *Biochim Biophys Acta.* 3:555-74.
- Coleman ML, Olson MF. (2002)** Rho GTPase signalling pathways in the morphological changes associated with apoptosis. *Cell Death Differ.* 9:493-504.
- Combes V, Coltel N, Alibert M, et al. (2005)** ABCA1 gene deletion protects against cerebral malaria: potential pathogenic role of microparticles in neuropathology. *Am J Pathol.* 166:295-302.
- Cox D, Kerrigan SW, Watson SP. (2011)** Platelets and the innate immune system: mechanisms of bacterial-induced platelet activation. *J Thromb Haemost.* 9:1097-107.

- Creagh EM, O'Neill LA. (2006)** TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol.* 27:352-7.
- Dalli J, Rosignoli G, Hayhoe RPG, et al. (2010)** CFTR inhibition provokes an inflammatory response associated with an imbalance of the annexin A1 pathway. *Am J Pathol* 177;176-86.
- Dalli J, Montero-Melendez T, Norling LV, et al. (2013)** Heterogeneity in neutrophil microparticles reveals distinct proteome and functional properties. *Mol Cell Proteomics.* doi:10.1074/mcp.M113.028589.
- Dasgupta SK, Abdel-Monem H, Niravath P, et al. (2009)** Lactadherin and clearance of platelet-derived microvesicles. *Blood.* 113:1332-9.
- Dasgupta SK, Le A, Chavakis T, Rumbaut RE, Thiagarajan P. (2012)** Developmental endothelial locus-1 (Del-1) mediates clearance of platelet microparticles by the endothelium. *Circulation.* 125:1664-72.
- Davidson CJ, Tuddenham EG, McVey JH. (2003)** 450 million years of hemostasis. *J Thromb Haemost.* 1:1487-94.
- Davis BK, Wen H, Ting JP. (2011)** The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu Rev Immunol.* 29:707-35.
- de Jonge E, Dekkers PE, Creasey AA, et al. (2000)** Tissue factor pathway inhibitor dose-dependently inhibits coagulation activation without influencing the fibrinolytic and cytokine response during human endotoxemia. *Blood.* 95:1124-9.
- Degen JL, Bugge TH, Goguen JD. (2007)** Fibrin and fibrinolysis in infection and host defense. *J Thromb Haemost.* 1:24-31.
- Dejouvencel T, Doeuvre L, Lacroix R, et al. (2010)** Fibrinolytic cross-talk: a new mechanism for plasmin formation. *Blood.* 115:2048-56.
- Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, Lopez JA. (2005)** Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood.* 106:1604-11.
- Delabranche X, Toti F, Meziani F. (2011)** Are microparticles reliable deleterious effectors in septic coagulopathy? *Annual update in intensive care and emergency medicine.* JL Vincent (ed.) 51-61.
- Delabranche X, Berger A, Boisrame-Helms J, Meziani F. (2012)** Microparticles and infectious diseases. *Med Mal Infect.* 42:335-43.
- Densmore JC, Signorino PR, Ou J, et al. (2006)** Endothelium-derived microparticles induce endothelial dysfunction and acute lung injury. *Shock.* 26:464-71.
- Devaux PF. (1991)** Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. *Biochemistry.* 30:1163-73.
- Dhainaut JF, Shorr AF, Macias WL, et al. (2005)** Dynamic evolution of coagulopathy in the first day of severe sepsis: relationship with mortality and organ failure. *Crit Care Med.* 33:341-8.
- Dignat-George F, Camoin-Jau L, Sabatier F, et al. (2004)** Endothelial microparticles: a potential contribution to the thrombotic complications of the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost.* 91:667-73.
- Di Virgilio F. (1995)** The P2Z purinoceptor: an intriguing role in immunity, inflammation and cell death. *Immunol Today.* 16:524-8.
- Dienstmann R, Rodon J, Tabernero J. (2013)** Biomarker-driven patient selection for early clinical trials. *Curr Opin Oncol.* 25:305-12.
- Distler JH, Huber LC, Hueber AJ, et al. (2005)** The release of microparticles by apoptotic
- Distler JH, Huber LC, Gay S, Distler O, Pisetsky DS. (2006)** Microparticles as mediators of cellular cross-talk in inflammatory disease. *Autoimmunity.* 39:683-90.
- Docherty NG, Lopez-Novoa JM, Arevalo M, et al. (2006)** Endoglin regulates renal ischaemia-reperfusion injury. *Nephrol Dial Transplant.* 21:2106-19.

- Dubyak GR. (2012)** P2X7 receptor regulation of non-classical secretion from immune effector cells. *Cell Microbiol.* 14:1697-706.
- Egorina EM, Sovershaev MA, Olsen JO, Osterud B. (2008)** Granulocytes do not express but acquire monocyte-derived tissue factor in whole blood: evidence for a direct transfer. *Blood.* 111:1208-16.
- El Ouaaliti M, Seil M, Dehaye JP. (2012)** Activation of calcium-insensitive phospholipase A(2) (iPLA(2)) by P2X(7) receptors in murine peritoneal macrophages. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 99:116-23.
- Engelman DM. (2005)** Membranes are more mosaic than fluid. *Nature.* 438:578-80.
- Esmon CT. (2005)** Is APC activation of endothelial cell PAR1 important in severe sepsis?: No. *J Thromb Haemost.* 3:1910-1.
- Esposito K, Ciotola M, Giugliano D. (2006)** Pioglitazone reduces endothelial microparticles in the metabolic syndrome: *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26:1926.
- Farrera C, Fadeel B. (2013)** Macrophage clearance of neutrophil extracellular traps is a silent process. *J Immunol.* doi.10.4049/jimmunol.1300436.
- Feldmann H, Geisbert TW. (2011)** Ebola haemorrhagic fever. *Lancet.* 377:849-62.
- Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E, et al. (2006)** The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J Immunol.* 176:3877-83.
- Flaumenhaft R, Mairuhu AT, Italiano JE. (2010)** Platelet- and megakaryocyte-derived microparticles. *Semin Thromb Hemost.* 36:881-7.
- Fourcade O, Simon MF, Viode C, et al. (1995)** Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell.* 80:919-27.
- Fox JE, Austin CD, Reynolds CC, Steffen PK. (1991)** Evidence that agonist-induced activation of calpain causes the shedding of procoagulant-containing microvesicles from the membrane of aggregating platelets. *J Biol Chem.* 266:13289-95.
- Frey B, Gaipf US. (2011)** The immune functions of phosphatidylserine in membranes of dying cells and microvesicles. *Semin Immunopathol.* 33:497-516.
- Freyssinet JM, Toti F, Hugel B, et al. (1999)** Apoptosis in vascular disease. *Thromb Haemost.* 82:727-35.
- Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, et al. (2007)** Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 176:231-41.
- Fuchs TA, Kremer Hovinga JA, Schatzberg D, Wagner DD, Lämmle B. (2012)** Circulating DNA and myeloperoxidase indicate disease activity in patients with thrombotic microangiopathies. *Blood.* 120:1157-64.
- Fukudome K, Esmon CT. (1995)** Molecular cloning and expression of murine and bovine endothelial cell protein C/activated protein C receptor (EPCR). The structural and functional conservation in human, bovine, and murine EPCR. *J Biol Chem.* 270:5571-7.
- Furchgott RF, Cherry PD, Zawadzki JV, Jothianandan D. (1984)** Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. *J Cardiovasc Pharmacol.* 6:S336-43.
- Furlan-Freguia C, Marchese P, Gruber A, Ruggeri ZM, Ruf W. (2011)** P2X7 receptor signaling contributes to tissue factor-dependent thrombosis in mice. *J Clin Invest.* 121:2932-44.
- Gando S, Wada H, Asakura H, et al. (2005)** Evaluation of new Japanese diagnostic criteria for disseminated intravascular coagulation in critically ill patients. *Clin Appl Thromb Hemost.* 11:71-6.
- Gando S, Iba T, Eguchi Y, et al. (2006)** A multicenter, prospective validation of disseminated intravascular coagulation diagnostic criteria for critically ill patients: comparing current criteria. *Crit Care Med.* 34:625-31.

- Geisbert TW, Young HA, Jahrling PB, Davis KJ, Kagan E, Hensley LE. (2003)** Mechanisms underlying coagulation abnormalities in ebola hemorrhagic fever: overexpression of tissue factor in primate monocytes/macrophages is a key event. *J Infect Dis.* 188:1618-29.
- Geissmann F, Jung S, Littman DR. (2003)** Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* 19:71-82.
- Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, et al. (1999)** Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:2311-5.
- Gilio K, van Kruchten R, Braun A, et al. (2010)** Roles of platelet STIM1 and Orai1 in glycoprotein VI- and thrombin-dependent procoagulant activity and thrombus formation. *J Biol Chem.* 285:23629-38.
- Gluck T, Silver J, Epstein M, Cao P, Farber B, Goyert SM. (2001)** Parameters influencing membrane CD14 expression and soluble CD14 levels in sepsis. *Eur J Med Res.* 6:351-8.
- Gow NA, van de Veerdonk FL, Brown AJ, Netea MG. (2012)** *Candida albicans* morphogenesis and host defense: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol.* 10:112-22.
- Guha M, Mackman N. (2001)** LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal.* 13:85-94.
- Gupta AK, Joshi MB, Philippova M, et al.** Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death. *FEBS Lett.* 584:3193-7.
- Gyorgy B, Szabo TG, Pasztoi M, et al. (2011)** Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci.* 68:2667-88.
- Hackeng TM, Maurissen LF, Castoldi E, Rosing J. (2009)** Regulation of TFPI function by protein S. *J Thromb Haemost.* 7 Suppl 1:165-8.
- Hackeng TM, Rosing J. (2009)** Protein S as cofactor for TFPI. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 29:2015-20.
- Harding CV, Heuser JE, Stahl PD. (2013)** Exosomes: looking back three decades and into the future. *J Cell Biol.* 200:367-71.
- Haiko J, Laakkonen L, Juuti K, Kalkkinen N, Korhonen TK. (2010)** The oomptins of *Yersinia pestis* and *Salmonella enterica* cleave the reactive center loop of plasminogen activator inhibitor 1. *J Bacteriol.* 192:4553-61.
- Heemskerk JW, Mattheij NJ, Cosemans JM. (2013)** Platelet-based coagulation: different populations, different functions. *J Thromb Haemost.* 11:2-16.
- Héloire F, Weill B, Weber S, Batteux F. (2003)** Aggregates of endothelial microparticles and platelets circulate in peripheral blood. Variations during stable coronary disease and acute myocardial infarction. *Thromb Res.* 110:173-80.
- Hirsch JG. (1958)** Bactericidal action of histones. *J Exp Med* 108:925-44.
- Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, et al. (2001)** Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol.* 166:6952-63.
- Howard MA, Coughlan M, David R, Pfueller SL. (1988)** Coagulation activities of plasma microparticles. *Thromb Res* 50:145-56.
- Hrachovinova I, Cambien B, Hafezi-Moghadam A, et al. (2003)** Interaction of P-selectin and PSGL-1 generates microparticles that correct hemostasis in a mouse model of hemophilia A. *Nat Med.* 9:1020-5.
- Huang L, Lord ST. (2013)** The isolation of fibrinogen monomer dramatically influences fibrin polymerization. *Thromb Res.* 131:23.
- Hugel B, Socie G, Vu T, et al. (1999)** Elevated levels of circulating procoagulant microparticles in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and aplastic anemia. *Blood.* 93:3451-6.
- Hugel B, Martinez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM. (2005)** Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology (Bethesda).* 20:22-7.

- Inal JM, Ansa-Addo EA, Stratton D, et al. (2012)** Microvesicles in health and disease. *Arch Immunol Ther Exp.* 60:107-21.
- Janiszewski M, Do Carmo AO, Pedro MA, Silva E, Knobel E, Laurindo FR. (2004)** Platelet-derived exosomes of septic individuals possess proapoptotic NAD(P)H oxidase activity: A novel vascular redox pathway. *Crit Care Med.* 32:818-25.
- Janeway CA, Jr. (1989)** Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1:1-13.
- Janmey PA, Kinnunen PK. (2006)** Biophysical properties of lipids and dynamic membranes. *Trends Cell Biol.* 16:538-46.
- Janowska-Wieczorek A, Wysoczynski M, Kijowski J, et al. (2005)** Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Int J Cancer.* 113:752-60.
- Jerala R. (2007)** Structural biology of the LPS recognition. *Int J Med Microbiol.* 297:353-63.
- Jia W, Wang R, Zhao J, et al. (2011)** E-selectin expression increased in human ruptured cerebral aneurysm tissues. *Can J Neurol Sci.* 38:858-62.
- Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Horstman LL, Ahn YS. (2001)** Elevated endothelial microparticles in thrombotic thrombocytopenic purpura: findings from brain and renal microvascular cell culture and patients with active disease. *Br J Haematol.* 112:81-90.
- Johnson JE, Chiu W. (2000)** Structures of virus and virus-like particles. *Curr Opin Struct Biol.* 10:229-35.
- Joop K, Berckmans RJ, Nieuwland R, et al. (2001)** Microparticles from patients with multiple organ dysfunction syndrome and sepsis support coagulation through multiple mechanisms. *Thromb Haemost.* 85:810-20.
- Jung KH, Chu K, Lee ST, et al. (2011)** Risk of macrovascular complications in type 2 diabetes mellitus: endothelial microparticle profiles. *Cerebrovasc Dis.* 31:485-93.
- Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ, et al. (2004)** Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost.* 2:1842-51.
- Kastrup CJ, Boedicker JQ, Pomerantsev AP, et al. (2008)** Spatial localization of bacteria controls coagulation of human blood by 'quorum acting'. *Nat Chem Biol.* 4:742-50.
- Kelton JG, Warkentin TE, Hayward CP, Murphy WG, Moore JC. (1992)** Calpain activity in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura is associated with platelet microparticles. *Blood.* 80:2246-51.
- Kerlin BA, Yan SB, Isermann BH, et al. (2003)** Survival advantage associated with heterozygous factor V Leiden mutation in patients with severe sepsis and in mouse endotoxemia. *Blood.* 102:3085-92.
- Kitchens RL, Thompson PA, Viriyakosol S, O'Keefe GE, Munford RS. (2001)** Plasma CD14 decreases monocyte responses to LPS by transferring cell-bound LPS to plasma lipoproteins. *J Clin Invest.* 108:485-93.
- Kulp A, Kuehn MJ. (2010)** Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu Rev Microbiol.* 64:163-84.
- Kumar S, Ingle H, Prasad DV, Kumar H. (2012)** Recognition of bacterial infection by innate immune sensors. *Crit Rev Microbiol.* doi:10.3109/1040841X.2012.706249.
- Kumar H, Bot A. (2013)** Innate immune recognition mechanisms and translational opportunities. *Int Rev Immunol.* 32:113-5.
- Kunzelmann K, Tian Y, Martins JR, et al. (2011)** Anoctamins. *Pflugers Arch.* 462:195-208.
- Kunzelmann K, Nilius B, Owsianik G, et al. (2013)** Molecular functions of anoctamin 6 (TMEM16F): a chloride channel, cation channel, or phospholipid scramblase? *Pflugers Arch.* 8:8.

- Lacroix R, Judicone C, Mooberry M, Boucekine M, Key NS, Dignat-George F. (2013)** Standardization of pre-analytical variables in plasma microparticle determination: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop. *J Thromb Haemost.* 2:12207.
- Lacroix R, Sabatier F, Mialhe A, et al. (2007)** Activation of plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles: a mechanism that modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells in vitro. *Blood.* 110:2432-9.
- Lam JK, Chion CK, Zanardelli S, Lane DA, Crawley JT. (2007)** Further characterization of ADAMTS-13 inactivation by thrombin. *J Thromb Haemost.* 5:1010-8.
- Lane DA, Philippou H, Huntington JA. (2005)** Directing thrombin. *Blood.* 106:2605-12.
- Langer HF, Chavakis T. (2009)** Leukocyte-endothelial interactions in inflammation. *J Cell Mol Med.* 13:1211-20.
- Le Roy D, Di Padova F, Adachi Y, Glauser MP, Calandra T, Heumann D. (2001)** Critical role of lipopolysaccharide-binding protein and CD14 in immune responses against gram-negative bacteria. *J Immunol.* 167:2759-65.
- Le Tulzo Y, Pangault C, Gacouin A, et al. (2002)** Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. *Shock.* 18:487-94.
- Le Tulzo Y, Pangault C, Amiot L, et al. (2004)** Monocyte human leukocyte antigen-DR transcriptional downregulation by cortisol during septic shock. *Am J Respir Crit Care Med.* 169:1144-51.
- Leroyer AS, Anfosso F, Lacroix R, et al. (2010)** Endothelial-derived microparticles: Biological conveyors at the crossroad of inflammation, thrombosis and angiogenesis. *Thromb Haemost.* 104:456-63.
- Levi M. (2007)** Disseminated intravascular coagulation. *Crit Care Med.* 35:2191-5.
- Levi M. (2010)** The coagulant response in sepsis and inflammation. *Hamostaseologie.* 30:10-2, 4-6.
- Levi M, van der Pol T. (2013)** Endothelial injury in sepsis. *Intensive Care Med* doi:10.1007/s00134-013-3054-1.
- Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. (2003)** 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS international sepsis definitions conference. *Intensive Care Med.* 29:530-8.
- Levy B, Collin S, Sennoun N, et al. (2010)** Vascular hyporesponsiveness to vasopressors in septic shock: from bench to bedside. *Intensive Care Med.* 36:2019-29.
- Levy JH, Dutton RP, Hemphill JC, 3rd, et al. (2010)** Multidisciplinary approach to the challenge of hemostasis. *Anesth Analg.* 110:354-64.
- Levy RM, Prince JM, Billiar TR. (2005)** Nitric oxide: a clinical primer. *Crit Care Med.* 33:S492-5.
- Li DY, Sorensen LK, Brooke BS, et al. (1999)** Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science.* 284:1534-7.
- Leytin V, Allen DJ, Mutlu A, Gyulkhandanyan AV, Mykhaylov S, Freedman J. (2009)** Mitochondrial control of platelet apoptosis: effect of cyclosporin A, an inhibitor of the mitochondrial permeability transition pore. *Lab Invest.* 89:374-84.
- Longstaff C, Varjú I, Sótonyi P, et al. (2013)** Mechanical stability and fibrinolytic resistance of clots containing fibrin, DNA and histones. *J Biol Chem.* 288:6946-56.
- Lopez JJ, Salido GM, Pariente JA, Rosado JA. (2008)** Thrombin induces activation and translocation of Bid, Bax and Bak to the mitochondria in human platelets. *J Thromb Haemost.* 6:1780-8.
- Lopez-Novoa JM, Bernabeu C. (2010)** The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 299:23.
- Lord ST. (2011)** Molecular mechanisms affecting fibrin structure and stability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31:494-9.

- Ludeman MJ, Kataoka H, Srinivasan Y, Esmon NL, Esmon CT, Coughlin SR. (2005)** PAR1 cleavage and signaling in response to activated protein C and thrombin. *J Biol Chem.* 280:13122-8.
- McAllister KA, Grogg KM, Johnson DW, et al. (1994)** Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat Genet.* 8:345-51.
- MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, Surprenant A. (2001)** Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity.* 15:825-35.
- Mackman N. (2009)** On the trail of microparticles. *Circ Res.* 104:925-7.
- Mackman N, Davis GE. (2011)** Blood coagulation and blood vessel development: is tissue factor the missing link?: *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31:2364-6.
- McVey M, Tabuchi A, Kuebler WM. (2012)** Microparticles and acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 303:22.
- Mallat Z, Benamer H, Hugel B, et al. (2000)** Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation.* 101:841-3.
- Martin S, Tesse A, Hugel B, et al. (2004)** Shed membrane particles from T lymphocytes impair endothelial function and regulate endothelial protein expression. *Circulation.* 109:1653-9.
- Martinez MC, Freyssinet JM. (2001)** Deciphering the plasma membrane hallmarks of apoptotic cells: phosphatidylserine transverse redistribution and calcium entry. *BMC Cell Biol.* 2:17.
- Martinez MC, Tesse A, Zobairi F, Andriantsitohaina R. (2005)** Shed membrane microparticles from circulating and vascular cells in regulating vascular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 288:H1004-9.
- Martinez MC, Larbret F, Zobairi F, et al. (2006)** Transfer of differentiation signal by membrane microvesicles harboring hedgehog morphogens. *Blood.* 108:3012-20.
- Martinez MC, Tual-Chalot S, Leonetti D, Andriantsitohaina R. (2011)** Microparticles: targets and tools in cardiovascular disease. *Trends Pharmacol Sci.* 32:659-65.
- Martinod K, Demers M, Fuchs TA, et al. (2013)** Neutrophil histone modification by peptidylarginine deiminase 4 is crucial for deep vein thrombosis in mice. *Proc Natl Acad Sci.* 110:8674-9.
- Massberg S, Grahl L, von Bruehl ML, et al. (2010)** Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med.* 16:887-96.
- Mastronardi ML, Mostefai HA, Mezziani F, Martinez MC, Asfar P, Andriantsitohaina R. (2011)** Circulating microparticles from septic shock patients exert differential tissue expression of enzymes related to inflammation and oxidative stress. *Crit Care Med.* 39:1739-48.
- Matafonov A, Sarilla S, Sun MF, et al. (2011)** Activation of factor XI by products of prothrombin activation. *Blood.* 118:437-45.
- Mause SF, Weber C. (2010)** Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ Res.* 107:1047-57.
- Medzhitov R. (2001)** Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 1:135-45.
- Medzhitov R, Janeway CA, Jr. (1997)** Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol.* 9:4-9.
- Mesri M, Altieri DC. (1999)** Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway. *J Biol Chem.* 274:23111-8.
- Metzler KD, Fuchs TA, Nauseef WM, et al. (2011)** Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implication for innate immunity. *Blood.* 117:953-9.
- Mezziani F, Tesse A, Andriantsitohaina R. (2008)** Microparticles are vectors of paradoxical information in vascular cells including the endothelium: role in health and diseases. *Pharmacol Rep.* 60:75-84.

- Meziani F, Delabranche X, Asfar P, Toti F. (2010)** Bench-to-bedside review: circulating microparticles--a new player in sepsis? *Crit Care*. 14:236.
- Miller BF, Abrams R, Dorfman A, Klein M. (1942)** Antibacterial properties of protamine histone. *Science*. 96:428-30.
- Mim C, Unger VM. (2012)** Membrane curvature and its generation by BAR proteins. *Trends Biochem Sci*. 37:526-33.
- Moake J. (2009)** Thrombotic thrombocytopenia purpura (TTP) and other thrombotic microangiopathies. *Best Pract Res Clin Haematol*. 22:567-76.
- Mobarrez F, He S, Broijersen A, et al. (2011)** Atorvastatin reduces thrombin generation and expression of tissue factor, P-selectin and GPIIIa on platelet-derived microparticles in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Thromb Haemost*. 106:344-52.
- Mócsai A. (2013)** Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation and beyond. *J Exp Med*. 210:1283-99.
- Morel O, Toti F, Hugel B, Freyssinet JM. (2004)** Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. *Curr Opin Hematol*. 11:156-64.
- Morel O, Toti F, Hugel B, et al. (2006a)** Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 26:2594-604.
- Morel O, Toti F, Bakouboula B, Grunebaum L, Freyssinet JM. (2006b)** Procoagulant microparticles: 'criminal partners' in atherothrombosis and deleterious cellular exchanges. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 35:15-22.
- Morel O, Toti F, Morel N, Freyssinet JM. (2009)** Microparticles in endothelial cell and vascular homeostasis: are they really noxious?: *Haematologica*. Mar;94(3):313-7.
- Morel O, Morel N, Jesel L, Freyssinet JM, Toti F. (2011a)** Microparticles: a critical component in the nexus between inflammation, immunity, and thrombosis. *Semin Immunopathol*. 33:469-86.
- Morel O, Jesel L, Freyssinet JM, Toti F. (2011b)** Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 31:15-26.
- Morris SM, Jr., Billiar TR. (1994)** New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am J Physiol*. 266:E829-39.
- Morrissey JH. (2012)** Polyphosphate: a link between platelets, coagulation and inflammation. *Int J Hematol*. 95:346-52.
- Morrissey JH, Choi SH, Smith SA. (2012)** Polyphosphate: an ancient molecule that links platelets, coagulation, and inflammation. *Blood*. 119:5972-9.
- Morser J, Gabazza EC, Myles T, Leung LL. (2010)** What has been learnt from the thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor-deficient mouse? *J Thromb Haemost*. 8:868-76.
- Mortaza S, Martinez MC, Baron-Menguy C, et al. (2009)** Detrimental hemodynamic and inflammatory effects of microparticles originating from septic rats. *Crit Care Med*. 37:2045-50.
- Mosesson MW. (2005)** Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost*. 3:1894-904.
- Mosnier LO, Buijtenhuijs P, Marx PF, Meijers JC, Bouma BN. (2003)** Identification of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) in human platelets. *Blood*. 101:4844-6.
- Mosnier LO, Gale AJ, Yegneswaran S, Griffin JH. (2004)** Activated protein C variants with normal cytoprotective but reduced anticoagulant activity. *Blood*. 104:1740-4.
- Mosnier LO, Zlokovic BV, Griffin JH. (2007)** The cytoprotective protein C pathway. *Blood*. 109:3161-72.
- Mosnier LO, Sinha RK, Burnier L, et al. (2012)** Biased agonism of protease-activated receptor 1 by activated protein C caused by noncanonical cleavage at Arg46. *Blood* 2012;120:5237-46.

- Mostefai HA, Meziani F, Mastronardi ML, et al. (2008)** Circulating microparticles from patients with septic shock exert protective role in vascular function. *Am J Respir Crit Care Med.* 178:1148-55.
- Muller I, Klocke A, Alex M, et al. (2003)** Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *Faseb J.* 17:476-8.
- Munnix IC, Harmsma M, Giddings JC, et al. (2003)** Store-mediated calcium entry in the regulation of phosphatidylserine exposure in blood cells from Scott patients. *Thromb Haemost.* 89:687-95.
- Muszbek L, Bereczky Z, Bagoly Z, Komaromi I, Katona E. (2011)** Factor XIII: a coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions. *Physiol Rev.* 91:931-72.
- Neeli I, Kahn SN, Radic M. (2008)** Histone deimination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils. *J Immunol.* 180:1895-902.
- Neeli I, Dwivedi N, Kahn SN, Radic M. (2009)** Regulation of extracellular chromatin release from neutrophils. *J Innate Immun.* 1:194-201.
- Nickel KF, Renne T. (2012)** Crosstalk of the plasma contact system with bacteria. *Thromb Res.* 130:284.
- Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, et al. (2000)** Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood.* 95:930-5.
- Nieuwland R, Sturk A. (2010)** Why do cells release vesicles? *Thromb Res.* 125:11.
- Norling LV, Dalli J. (2013)** Microparticles are novel effectors of immunity. *Curr Opin Pharmacol.* doi.10.1016/j.coph.2013.05.008
- Nozaki T, Sugiyama S, Sugamura K, et al. (2010)** Prognostic value of endothelial microparticles in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail.* 12:1223-8.
- Okabayashi K, Wada H, Ohta S, Shiku H, Nobori T, Maruyama K. (2004)** Hemostatic markers and the sepsis-related organ failure assessment score in patients with disseminated intravascular coagulation in an intensive care unit. *Am J Hematol.* 76:225-9.
- Okajima K. (2001)** Regulation of inflammatory responses by natural anticoagulants. *Immunol Rev.* 184:258-74.
- Ono T, Mimuro J, Madoiwa S, et al. (2006)** Severe secondary deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) in patients with sepsis-induced disseminated intravascular coagulation: its correlation with development of renal failure. *Blood.* 107:528-34.
- Opitz B, Puschel A, Schmeck B, et al. (2004)** Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem.* 279:36426-32.
- Østerud B, Bjørklid E. (2012)** Tissue factor in blood cells and endothelial cells. *Front Biosci.* 4:289-99.
- Owens AP, 3rd, Mackman N. (2011)** Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ Res.* 108:1284-97.
- Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. (2010)** Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 191:677-91
- Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H, Lee JO. (2009)** The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature.* 458:1191-5.
- Parseghian MH, Luhrs KA. (2006)** Beyond the walls of the nucleus: the role of histones in cellular signaling and innate immunity. *Biochem Cell Biol.* 84:589-604.
- Pene F, Courtine E, Ouaz F, et al. (2009)** Toll-like receptors 2 and 4 contribute to sepsis-induced depletion of spleen dendritic cells. *Infect Immun.* 77:5651-8.
- Perez-Casal M, Downey C, Fukudome K, Marx G, Toh CH. (2005)** Activated protein C induces the release of microparticle-associated endothelial protein C receptor. *Blood.* 105:1515-22.

- Perez-Casal M, Downey C, Cutillas-Moreno B, Zuzel M, Fukudome K, Toh CH. (2009)** Microparticle-associated endothelial protein C receptor and the induction of cytoprotective and anti-inflammatory effects. *Haematologica*. 94:387-94.
- Perez-Casal M, Thompson V, Downey C, et al. (2011)** The clinical and functional relevance of microparticles induced by activated protein C treatment in sepsis. *Crit Care*. 15:R195.
- Pfister SL. (2004)** Role of platelet microparticles in the production of thromboxane by rabbit pulmonary artery. *Hypertension*. 43:428-33.
- Phillipson M, Kubes P. (2011)** The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med*. 17:1381-90.
- Pilszczek FH, Salina D, Poon KK, et al. (2010)** A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol*. 185:7413-25.
- Puy C, Tucker EI, Wong ZC, et al. (2013)** Factor XII promotes blood coagulation independent of factor XI in the presence of long chain polyphosphate. *J Thromb Haemost*. 9:12295.
- Quenot JP, Binquet C, Kara F, et al. (2013)** The epidemiology of septic shock in French intensive care units: the prospective multicenter cohort EPISS study. *Crit Care*. 17.
- Quinsey NS, Greedy AL, Bottomley SP, Whisstock JC, Pike RN. (2004)** Antithrombin: in control of coagulation. *Int J Biochem Cell Biol*. 36:386-9.
- Qu Y, Dubyak GR. (2009)** P2X7 receptors regulate multiple types of membrane trafficking responses and non-classical secretion pathways. *Purinergic Signal*. 5:163-73.
- Ramma W, Ahmed A. (2011)** Is inflammation the cause of pre-eclampsia? *Biochem Soc Trans*. 39:1619-27.
- Ranieri VM, Thompson BT, Barie, et al. (2012)** Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock. *N Engl J Med*. 366:2055-64.
- Rautou PE, Mackman N. (2012)** Deletion of microvesicles from the circulation: *Circulation*. Apr 3;125(13):1601-4. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.094920. Epub 2012 Mar 2.
- Reid VL, Webster NR. (2012)** Role of microparticles in sepsis. *Br J Anaesth*. 109:503-13.
- Rezaie AR. (2010)** Regulation of the protein C anticoagulant and antiinflammatory pathways. *Curr Med Chem*. 17:2059-69.
- Riewald M, Petrovan RJ, Donner A, Mueller BM, Ruf W. (2002)** Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. *Science*. 296:1880-2.
- Riewald M, Petrovan RJ, Donner A, Ruf W. (2003)** Activated protein C signals through the thrombin receptor PAR1 in endothelial cells. *J Endotoxin Res*. 9:317-21.
- Rijken DC, Lijnen HR. (2009)** New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *J Thromb Haemost*. 7:4-13.
- Roos MA, Gennero L, Denysenko T, et al. (2010)** Microparticles in physiological and in pathological conditions. *Cell Biochem Funct*. 28:539-48.
- Rossi E, Sanz-Rodriguez F, Eleno N, et al. (2012)** Endothelial endoglin is involved in inflammation: role in leukocyte adhesion and transmigration. *Blood*. 16:16.
- Ruf W. (2005)** Is APC activation of endothelial cell PAR1 important in severe sepsis?: Yes. *J Thromb Haemost*. 3:1912-4.
- Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA, et al. (2012)** Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS ONE* 7:e32366.
- Sarang PP, Lee HW, Kim M. (2010)** Activated protein C action in inflammation. *Br J Haematol*. 148:817-33.
- Satta N, Toti F, Feugeas O, et al. (1994)** Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. *J Immunol*. 153:3245-55.

- Satta N, Freyssinet JM, Toti F. (1997)** The significance of human monocyte thrombomodulin during membrane vesiculation and after stimulation by lipopolysaccharide. *Br J Haematol.* 96:534-42.
- Schaller J, Gerber SS. (2011)** The plasmin-antiplasmin system: structural and functional aspects. *Cell Mol Life Sci.* 68:785-801.
- Schoenmakers SH, Bruggemann LW, Groot AP, Maijs S, Reitsma PH, Spek CA. (2005)** Role of coagulation FVIII in septic peritonitis assessed in hemophilic mice. *J Thromb Haemost.* 3:2738-44.
- Sebbagh M, Renvoize C, Hamelin J, Riche N, Bertoglio J, Breard J. (2001)** Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol.* 3:346-52.
- Sebbagh M, Hamelin J, Bertoglio J, Solary E, Breard J. (2005)** Direct cleavage of ROCK II by granzyme B induces target cell membrane blebbing in a caspase-independent manner. *J Exp Med.* 201:465-71.
- Seeley EJ, Matthay MA, Wolters PJ. (2012)** Inflection points in sepsis biology: from local defense to systemic organ injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 303:L355-63.
- Semeraro F, Ammollo CT, Morrissey JH, et al. (2011)** Extracellular histones promote thrombin generation through platelet-dependent mechanisms: involvement of platelet TLR2 and TLR4. *Blood.* 118:1952-61.
- Sen P, Gopalakrishnan R, Kothari H, et al. (2011)** Factor VIIa bound to endothelial cell protein C receptor activates protease activated receptor-1 and mediates cell signaling and barrier protection. *Blood.* 117:3199-208.
- Sennoun N, Meziani F, Dessebe O, et al. (2009a)** Activated protein C improves lipopolysaccharide-induced cardiovascular dysfunction by decreasing tissular inflammation and oxidative stress. *Crit Care Med.* 37:246-55.
- Sennoun N, Baron-Menguy C, Burban M, et al. (2009b)** Recombinant human activated protein C improves endotoxemia-induced endothelial dysfunction: a blood-free model in isolated mouse arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 297:24.
- Shapiro NI, Aird WC. (2011)** Sepsis and the broken endothelium. *Crit Care.* 15.
- Shapiro NI, Schuetz P, Yano K, et al. (2010)** The association of endothelial cell signaling, severity of illness, and organ dysfunction in sepsis. *Crit Care.* 14:13.
- Shridas P, Bailey WM, Talbott KR, Oslund RC, Gelb MH, Webb NR. (2011)** Group X secretory phospholipase A2 enhances TLR4 signaling in macrophages. *J Immunol.* 187:482-9.
- Singer SJ, Nicolson GL. (1972)** The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science.* 175:720-31.
- Sinning JM, Losch J, Walenta K, Bohm M, Nickenig G, Werner N. (2011)** Circulating CD31+/Annexin V+ microparticles correlate with cardiovascular outcomes. *Eur Heart J.* 32:2034-41.
- Skibsted S, Jones AE, Puskarich MA, et al. (2013)** Biomarkers of endothelial cell activation in early sepsis. *Shock.* 39:427-32.
- Skrzeczynska-Moncznik J, Bzowska M, Loseke S, Grage-Griebenow E, Zembala M, Pryjma J. (2008)** Peripheral blood CD14^{high} CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10. *Scand J Immunol.* 67:152-9.
- Sommeijer DW, Hansen HR, van Oerle R, et al. (2006)** Soluble tissue factor is a candidate marker for progression of microvascular disease in patients with Type 2 diabetes. *J Thromb Haemost.* 4:574-80.
- Song J, Lee KA, Park TS, Park R, Choi JR. (2008)** Linear relationship between ADAMTS13 activity and platelet dynamics even before severe thrombocytopenia. *Ann Clin Lab Sci.* 38:368-75.
- Soriano AO, Jy W, Chirinos JA, et al. (2005)** Levels of endothelial and platelet microparticles and their interactions with leukocytes negatively correlate with organ dysfunction and predict mortality in severe sepsis. *Crit Care Med.* 33:2540-6.

- Taddei S, Ghiadoni L, Viridis A, Versari D, Salvetti A. (2003)** Mechanisms of endothelial dysfunction: clinical significance and preventive non pharmacological therapeutic strategies. *Curr Pharm Des* 2385-402.
- Taylor FB, Jr., Toh CH, Hoots WK, Wada H, Levi M. (2001)** Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost.* 86:1327-30.
- Tesse A, Martinez MC, Hugel B, et al. (2005)** Upregulation of proinflammatory proteins through NF-kappaB pathway by shed membrane microparticles results in vascular hyporeactivity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25:2522-7.
- Tesse A, Meziani F, David E, et al. (2007)** Microparticles from preeclamptic women induce vascular hyporeactivity in vessels from pregnant mice through an overproduction of NO. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 293:16.
- Tinsley KW, Grayson MH, Swanson PE, et al. (2003)** Sepsis induces apoptosis and profound depletion of splenic interdigitating and follicular dendritic cells. *J Immunol.* 171:909-14.
- Titheradge MA. (1999)** Nitric oxide in septic shock. *Biochim Biophys Acta.* 5:2-3.
- Toti F, Satta N, Fressinaud E, Meyer D, Freyssinet JM. (1996)** Scott syndrome, characterized by impaired transmembrane migration of procoagulant phosphatidylserine and hemorrhagic complications, is an inherited disorder. *Blood.* 87:1409-15.
- Tsukamoto H, Fukudome K, Takao S, Tsuneyoshi N, Kimoto M. (2010)** Lipopolysaccharide-binding protein-mediated Toll-like receptor 4 dimerization enables rapid signal transduction against lipopolysaccharide stimulation on membrane-associated CD14-expressing cells. *Int Immunol.* 22:271-80.
- Urban CF, Ermert D, Schmid M, et al. (2009)** Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog* 5:e1000639.
- Vallet B, Wiel E. (2001)** Endothelial cell dysfunction and coagulation. *Crit Care Med.* 29:S36-41.
- Van Der Meijden PE, Van Schilfgaarde M, Van Oerle R, Renne T, ten Cate H, Spronk HM. (2012)** Platelet- and erythrocyte-derived microparticles trigger thrombin generation via factor XIIa. *J Thromb Haemost.* 10:1355-62.
- van der Pol E, van Gemert MJ, Sturk A, Nieuwland R, van Leeuwen TG. (2012)** Single vs. swarm detection of microparticles and exosomes by flow cytometry. *J Thromb Haemost.* 10:919-30.
- van Hinsbergh VW. (2011)** Endothelium-role in regulation of coagulation and inflammation. *Semin Immunopathol.*
- Vancine SM, Picoli-Quaino SK, Costa DS, et al. (2011)** Evaluation of the host response to endotoxemia of FVIII and FIX deficient mice. *Haemophilia.* 17:800-7.
- VanWijk MJ, VanBavel E, Sturk A, Nieuwland R. (2003)** Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res.* 59:277-87.
- Varga-Szabo D, Braun A, Kleinschnitz C, et al. (2008)** The calcium sensor STIM1 is an essential mediator of arterial thrombosis and ischemic brain infarction. *J Exp Med.* 205:1583-91.
- Varga-Szabo D, Braun A, Nieswandt B. (2009)** Calcium signaling in platelets. *J Thromb Haemost.* 7:1057-66.
- Verkleij AJ, Zwaal RF, Roelofsen B, Comfurius P, Kastelijn D, van Deenen LL. (1973)** The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy. *Biochim Biophys Acta.* 323:178-93.
- Versteeg HH, Heemskerk JW, Levi M, Reitsma PH. (2013)** New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev.* 93:327-58.
- Vincent MA, Barrett EJ, Lindner JR, Clark MG, Rattigan S. (2003)** Inhibiting NOS blocks microvascular recruitment and blunts muscle glucose uptake in response to insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 285:E123-9.

- Wada H, Thachil J, Di Nisio M, et al. (2013)** Guidance for diagnosis and treatment of DIC from harmonization of the recommendations from three guidelines. *J Thromb Haemost.* 4:12155.
- Walford G, Loscalzo J. (2003)** Nitric oxide in vascular biology. *J Thromb Haemost.* 1:2112-8.
- Werner N, Wassmann S, Ahlers P, Kosiol S, Nickenig G. (2006)** Circulating CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles correlate with coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26:112-6.
- Wheatcroft SB, Williams IL, Shah AM, Kearney MT. (2003)** Pathophysiological implications of insulin resistance on vascular endothelial function. *Diabet Med.* 20:255-68.
- Wolberg AS, Campbell RA. (2008)** Thrombin generation, fibrin clot formation and hemostasis. *Transfus Apher Sci.* 38:15-23.
- Wolf P. (1967)** The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol.* 13:269-88.
- Wolfs JL, Wienders SJ, Comfurius P, et al. (2006)** Reversible inhibition of the platelet procoagulant response through manipulation of the Gardos channel. *Blood.* 108:2223-8.
- Wun T, Paglieroni T, Rangaswami A, et al. (1998)** Platelet activation in patients with sickle cell disease. *Br J Haematol.* 100:741-9.
- Xu J, Zhang XM, Pelayo R, et al. (2009)** Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med.* 15:1318-21.
- Ye Z, Ting JP. (2008)** NLR, the nucleotide-binding domain leucine-rich repeat containing gene family. *Curr Opin Immunol.* 20:3-9.
- Yun TH, Morrissey JH. (2009)** Polyphosphate and ompTins: novel bacterial procoagulant agents. *J Cell Mol Med.* 13:4146-53.
- Zafrani L, Gerotziafas G, Byrnes C, et al. (2012)** Calpastatin controls polymicrobial sepsis by limiting procoagulant microparticle release. *Am J Respir Crit Care Med.* 185:744-55.
- Zafrani L, Ince C, Yuen PST. (2013)** Microparticles during sepsis: target, canary or cure? *Intensive Care Med* doi:10.1007/s00134-013-3047-0.
- Zeerleder S, Schroeder V, Hack CE, Kohler HP, Wuillemin WA. (2006)** TAFI and PAI-1 levels in human sepsis. *Thromb Res.* 118:205-12.
- Zernecke A, Bidzhekov K, Noels H, et al. (2009)** Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal.* 2:2000610.
- Zwaal RF, Schroit AJ. (1997)** Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood.* 89:1121-32.
- Zwicker JI, Liebman HA, Neuberg D, et al. (2009)** Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy. *Clin Cancer Res.* 15:6830-40.

ANNEXES

**Bench-to-bedside review: Circulating microparticles – a new
player in sepsis?**

Ferhat MEZIANI, Xavier DELABRANCHE, Pierre ASFAR, Florence TOTI

Critical Care 2010;14:236

REVIEW

Bench-to-bedside review: Circulating microparticles - a new player in sepsis?

Ferhat Meziani^{1,2}, Xavier Delabranche^{1,2,3}, Pierre Asfar^{4,5} and Florence Toti^{3,6,7*}

Abstract

In sepsis, inflammation and thrombosis are both the cause and the result of interactions between circulating (for example, leukocytes and platelets), endothelial and smooth muscle cells. Microparticles are proinflammatory and procoagulant fragments originating from plasma membrane generated after cellular activation and released in body fluids. In the vessel, they constitute a pool of bioactive effectors pulled from diverse cellular origins and may act as intercellular messengers. Microparticles expose phosphatidylserine, a procoagulant phospholipid made accessible after membrane remodelling, and tissue factor, the initiator of blood coagulation at the endothelial and leukocyte surface. They constitute a secretion pathway for IL-1 β and up-regulate the proinflammatory response of target cells. Microparticles circulate at low levels in healthy individuals, but undergo phenotypic and quantitative changes that could play a pathophysiological role in inflammatory diseases. Microparticles may participate in the pathogenesis of sepsis through multiple ways. They are able to regulate vascular tone and are potent vascular proinflammatory and procoagulant mediators. Microparticles' abilities are of increasing interest in deciphering the mechanisms underlying the multiple organ dysfunction of septic shock.

Introduction

In the 1960s and 70s Wolf [1] was the first to describe platelet derivatives of less than 0.1 μm as procoagulant vesicles. Later, having been given the name of 'microparticles' (MPs), these vesicles were described as membrane-derived nano-fragments (0.05 to 1 μm) that

are active in coagulation and inflammation. MPs are released in the extracellular environment through a membrane reorganization and blebbing process following cell activation or apoptosis. They constitute a storage pool of bioactive effectors with varied cellular origins and are able to act as intercellular messengers [2]. They are present in body fluids where they reflect normal tissue homeostasis, but undergo phenotypic and quantitative changes to play a pathophysiological role in several diseases, most of them associated with thrombotic disorders [3,4] (Figure 1).

MPs often convey tissue factor (TF) that may contribute to the dissemination of coagulopathy in sepsis [5,6] and cytokines up-regulating deleterious inflammatory responses [7]. Circulating MPs can also provoke vascular dysfunction, and they reduce available nitric oxide (NO) and increase levels of reactive oxygen species, thereby promoting oxidative stress [8].

This review will focus on the role of MPs during sepsis, with a special emphasis on coagulation and inflammation disturbances.

Microparticles are potential intercellular messengers during sepsis

Sepsis is a syndrome characterized by excessive cellular activation involving a systemic inflammatory response to severe infection. Its most severe form may lead to septic shock. The ongoing circulatory failure is characterized by vasoplegia-related arterial hypotension and may include vasopressor resistance, and myocardial and local blood flow impairments. Inflammation plays a key role in the acute activation of the vascular wall and is associated with local thrombosis and changes in vasomotricity [9]. Thus, the endothelium-derived TF initiates the coagulation process and a proteolytic cascade [10]. The endothelial damage furthermore leads to the expression of adhesion molecules and other vasoactive factors involved in inflammation and coagulation.

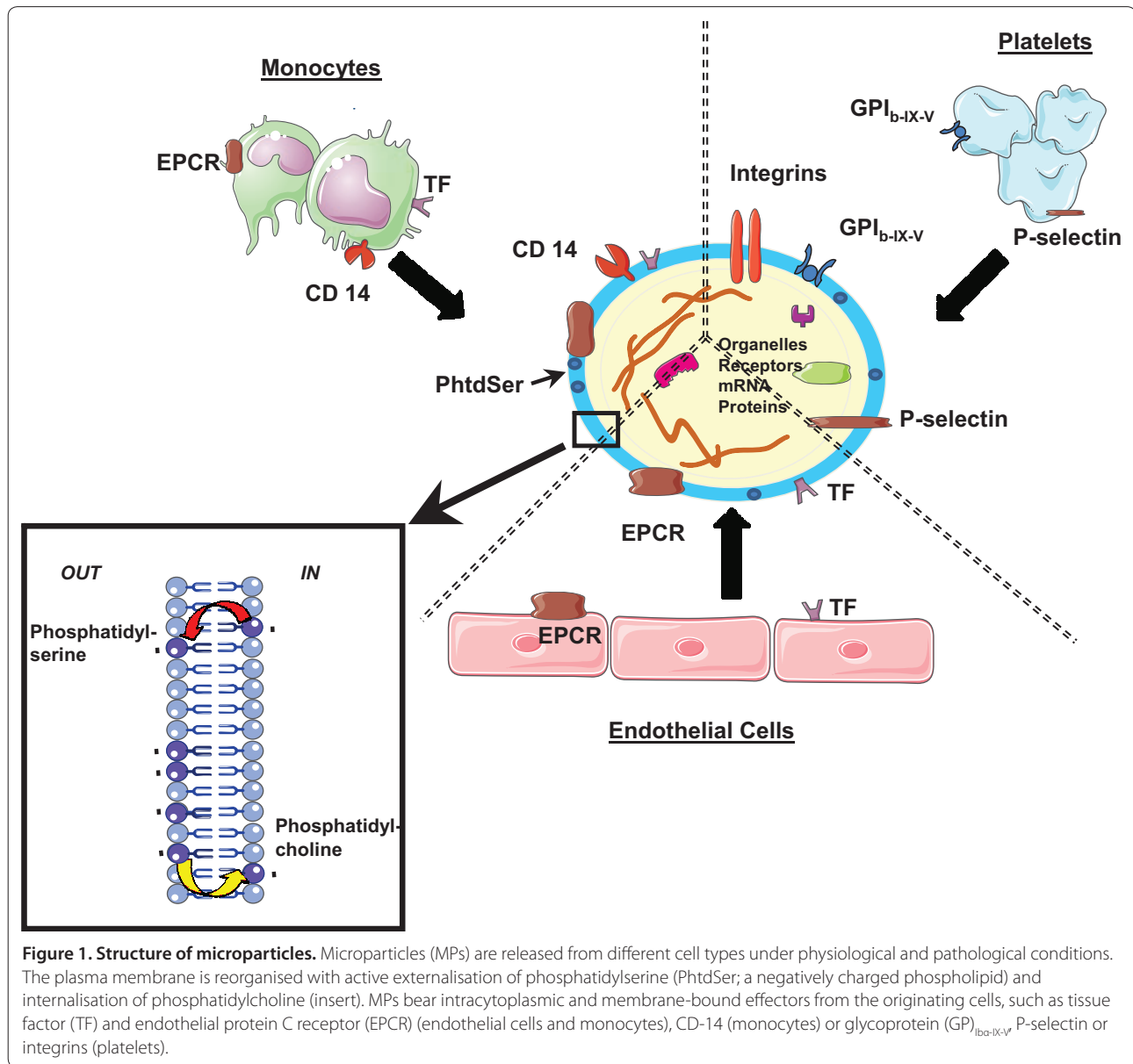
Biogenesis and general features of microparticles

MPs are produced following cellular activation or apoptosis. The increase in intracellular calcium activates various cytosolic enzymes, including calpains, that cleave

*Correspondence: florence.toti@unistra.fr

³Institut d'Hématologie et d'Immunologie, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, 4 rue Kirschleger, F-67085 Strasbourg, France

Full list of author information is available at the end of the article



the cytoskeleton and facilitate the role of procaspase-3 in apoptosis [11]. As a response to stimulus, the cytoskeleton is reorganized and the asymmetric distribution of the phospholipid membrane modified with exposure of phosphatidylserine at the cell surface. Cellular blebbing then occurs, ultimately leading to the release of MPs. In addition to phosphatidylserine exposure, protein-lipid raft domains are formed and furnish the MP with its specificities and biological roles [12] (Figure 1).

The cellular origin of MPs can be determined by assessment of the antigens that they expose at their surface. However, the complete protein content of MPs remains difficult to establish. More than 300 proteins

have been reported by proteomics, some of which are cytosolic and some membranous [13]. The MP phenotype is, however, known to vary according to cellular origin and parental cell response to stimulus [7,14].

Microparticle survival and clearance

Although bearing phosphatidylserine, which is a signal for phagocytosis, MPs seem to survive longer than their parental apoptotic cell, probably because of their size, which does not allow optimal exposure of a cluster of senescence signals. Dasgupta and colleagues [15] recently described the major role of lactadherin in the removal of phosphatidylserine-expressing platelet MPs from human

plasma. Lactadherin is a macrophage opsonin that mediates the clearance of apoptotic lymphocytes and knockout lactadherin (-/-) mice have increased levels of circulating platelet MPs and a hypercoagulable state; lactadherin supplementation restores the normal clearance of MPs. To date, there are no data on the effect of MP clearance on the haemostatic balance under physiological or pathological settings.

Microparticles as messengers in blood flow

As mediators of cellular communication, MPs are actors and possible mediators in the interplay between thrombosis and inflammation, a process previously described for vascular injury in inflammatory diseases [5]. They can transfer receptors, organelles, mRNA and other proteins to target cells [16] and also comprise a secretion pathway for several cytokines, such as mature IL-1 β [17]. The multiple properties of MPs and the variety of their possible cellular targets support them having a key role in cell reprogramming and tissue remodeling with physiological or pathological consequences [4]. Thus, MPs could play a major role in propagating proinflammatory and procoagulant states in sepsis. In the vascular compartment, including the arterial wall, the particular settings of sepsis and the tuning abilities of MPs point to the endothelium as a pivotal target [18,19].

How to detect and measure microparticles?

The International Society for Thrombosis and Haemostasis (ISTH) provides information on technical procedures and recommendations for the detection and measurement of MPs. Although no standardized procedures for MP measurement are available yet, a consensus is forming on blood sampling and MP isolation by centrifugation steps that avoid exosome contamination of MP samples [20]. Several assays and phenotyping methods coexist, but these are not necessarily comparable, thus making the interpretation of results across studies difficult. MPs can be analyzed through capture techniques (using immobilized annexin V - a high affinity probe for phosphatidylserine - quantitative assessment, or insolubilized antibodies for phenotyping) combined with a functional prothrombinase assay. Flow cytometry is another method for the study of MPs. This method allows quantification and determination of cellular origin via the use of specific fluorescent antibodies and calibration beads. The protein content of MPs can also be assayed and expressed in molecular mass units [21]. Caution should be taken in the interpretation of MP analyses, taking into account the pitfalls of each method and the purpose of the experiment or clinical investigation. Furthermore, control cohorts are of prime importance in clinical investigations of MP pattern variations.

Microparticles as a player in coagulation disorders of sepsis

In the defence against pathogens, haemostasis is as fundamentally important as innate immunity and complement-mediated cell lysis. Haemostasis is activated during sepsis and septic shock, leading to thrombin and fibrin generation with dual effects: limitation of pathogen diffusion and invasion; and fibrin deposition in vessels, resulting in thrombotic microangiopathy or disseminated intravascular coagulopathy. As detailed above, MPs are efficient effectors in the haemostatic response and pathogenic markers of thrombotic disorders (Figure 2).

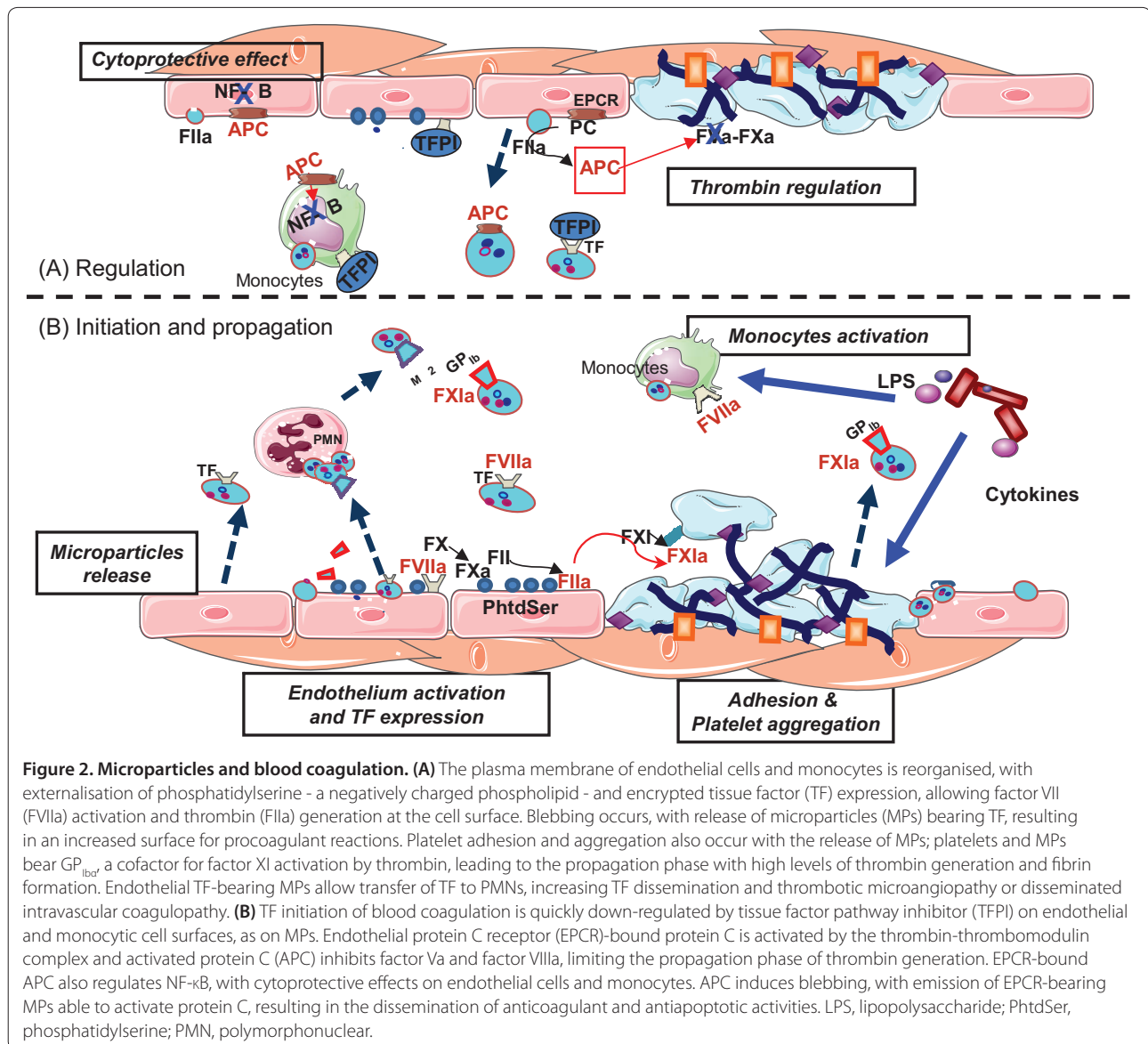
Microparticles and thrombin generation

Thrombin generation requires activation of coagulation factors, which is made possible after their assembly on a catalytic surface constituted of anionic phospholipids. Cell activation constitutes the first step by furnishing exposed phosphatidylserine with a negative charge. The required remodelling of plasma membrane, resulting in phosphatidylserine translocation to the outer leaflet of the plasma membrane, occurs in platelets, endothelial cells and monocytes at sites of vascular damage or injury. Calcium ion-mediated interactions between gamma-carboxyl groups of vitamin-K-dependent factors and phosphatidylserine comprise the key step in this assembly, explaining the efficacy of anti-vitamin K treatments in hypercoagulable states [22].

At the monocyte surface a possible encrypted preformed TF would be de-encrypted by plasma membrane remodelling, thereby allowing the (auto-)activation of factor VII. Indeed, TF expression at the surface of monocyte-derived MPs has been demonstrated during *in vitro* endotoxin stimulation [23]. Although TF is the primary initiator of blood coagulation, whether there is a blood-borne TF (activity) is still debated, but there is growing evidence that this activity is directly tied to MPs [5,24]. TF-bearing MPs can interact with neutrophil granulocytes by 'paracrine transfer', as demonstrated *in vitro* [25-27]. Circulating MPs bearing active TF have been associated with a thrombotic status in human meningococcal sepsis [28] and a primate Ebola fever model [29], pointing to their possible role in the dissemination of a procoagulant potential.

Microparticles and amplification loops in thrombin generation

TF-driven coagulation is under the control of Tissue factor pathway inhibitor (TFPI), an inhibitory complex, with factor Xa and protein S as cofactors. Although this inhibits TF-induced thrombin generation, thrombin is still generated during the propagation phase via the Jossen loop: platelet-exposed factor XI (of megakaryocytic origin) is activated by the GP_{Ib} α -thrombin complex present on the surface of activated platelets. Activated



platelets, and released GP_{Ib}-FXIa bearing MPs, may, in turn, be responsible for increased thrombin generation [30-32]. In addition to blood-borne TF conveyed by MPs, polymorphonuclear (PMN)-derived MPs likely contribute to an additional amplification loop in the generation of thrombin mediated by MPs (Figure 2).

MPs could contribute to such amplification loops in sepsis. Indeed, *ex vivo* activation of human neutrophils by endotoxin, platelet activating factor or phorbol myristate acetate can generate MPs bearing active integrin $\alpha_M\beta_2$ (CD11b/CD18), which is able to activate GP_{Ib} [33,34].

Microparticles in the control of thrombin generation, cytoprotection and tissue remodelling

Interestingly, several cellular models showed that $\alpha_M\beta_2$ exposed at the MP surface can interact with other ligands,

such as urokinase plasminogen activator, plasminogen and metalloproteases MMP-2 and -5, suggesting a role in fibrinolysis and in local tissue remodelling [30,34,35]. MPs may also display antithrombotic activities, which would be overwhelmed by procoagulant activities when MPs are released under highly thrombotic conditions, as observed during sepsis or myocardial infarction. Indeed, in purified monocyte suspensions, thrombomodulin anticoagulant activity and TF coexist at the MP surface, but when released by lipopolysaccharide treatment, the TF activity is predominant on MPs [31]. The presence of the anticoagulant endothelial protein C receptor (EPCR) at the surface of endothelial-derived MPs (mpEPCR) is another example of a cytoprotective element attached to MPs [32]; EPCR is involved in the activation of anticoagulant protein C by the thrombin-thrombomodulin complex. mpEPCR,

released in response to activated protein C (APC), may switch the procoagulant properties of endothelial MPs to anticoagulant and anti-apoptotic properties. On the surface of MPs bearing mpEPCR, APC inactivates procoagulant cofactors factor Va and factor VIIIa, thereby down-regulating thrombin generation. Because a circulating soluble form of EPCR (sEPCR) has been described in sepsis, and its concentration possibly correlates with the severity of the illness, the respective contributions of mpEPCR and sEPCR is a matter of clinical relevance. sEPCR binds protein C and APC, thereby blunting their actions. The efficacy of therapeutic activated protein C (rhAPC; drotrecogin alfa (activated)) may depend on the balance between circulating sEPCR and mpEPCR [32]. Recent investigations in human endothelial cells reported that free rhAPC and rhAPC bound to mpEPCR have similar effects. rhAPC cleaves protease activated receptor-1 and induces significant changes in the activation/inhibition of genes with direct anti-apoptotic effects or indirect cell barrier protective effects, the latter requiring transactivation of KDR (vascular endothelial growth factor receptor 2/kinase insert domain receptor) via the phosphoinositide 3-kinase-Akt pathway and S1P₁ (sphingosine 1-phosphate receptor) [36].

In sepsis, procoagulant MPs of endothelial, platelet, erythroid, and leukocyte origins have been reported [28,37].

Microparticles as potential effectors in the inflammatory response of sepsis

Circulating MPs have been reported to be present in various inflammatory diseases, including sepsis [7]. MPs are a source of phospholipids, a substrate for phospholipase A2, which facilitates platelet aggregation [38,39]; they may also provoke vascular inflammation during sepsis via lysophosphatidic acid and facilitate chemotactic migration of platelets and/or leukocytes to the endothelium, thus playing the role of trigger in the production of monocyte cytokines (IL-1 β , IL-8 and tumour necrosis factor- α) [8,40,41] (Figure 3).

Microparticles targeting the endothelial function

During sepsis, the endothelial function is altered and the endothelial surface becomes proadhesive, procoagulant and antifibrinolytic [42]. The endothelium is one of the primary targets of circulating MPs, as demonstrated by Barry and colleagues [43] *in vitro*. Indeed, they showed that arachidonic acid exposed by platelet MPs promotes the up-regulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) and intercellular adhesion molecules in endothelial cells. Platelet-derived MPs have been shown to modulate interactions between monocytes and endothelial cells. Released proinflammatory endothelial cytokines may themselves also contribute to the production of MPs [44],

thereby amplifying the inflammatory response and the consecutive alteration of the vascular function [45]. Platelet activating factor present in endothelial cells and leukocytes is also involved in the proinflammatory effect of MPs [46].

Endothelial microparticles and inflammatory status

Circulating MPs of endothelial origin may thus vary with respect to quantity and phenotype according to the endothelial response and have been reported in inflammatory diseases and disorders [47]; the endothelial response to inflammation stimuli may be immediate, delayed or reflect a chronic endothelial activation. They were reported to participate in the regulation of arterial tone in several diseases in which oxidative stress is involved, such as human acute coronary syndromes [48] or preeclampsia [49] associated with altered NO bioavailability [50].

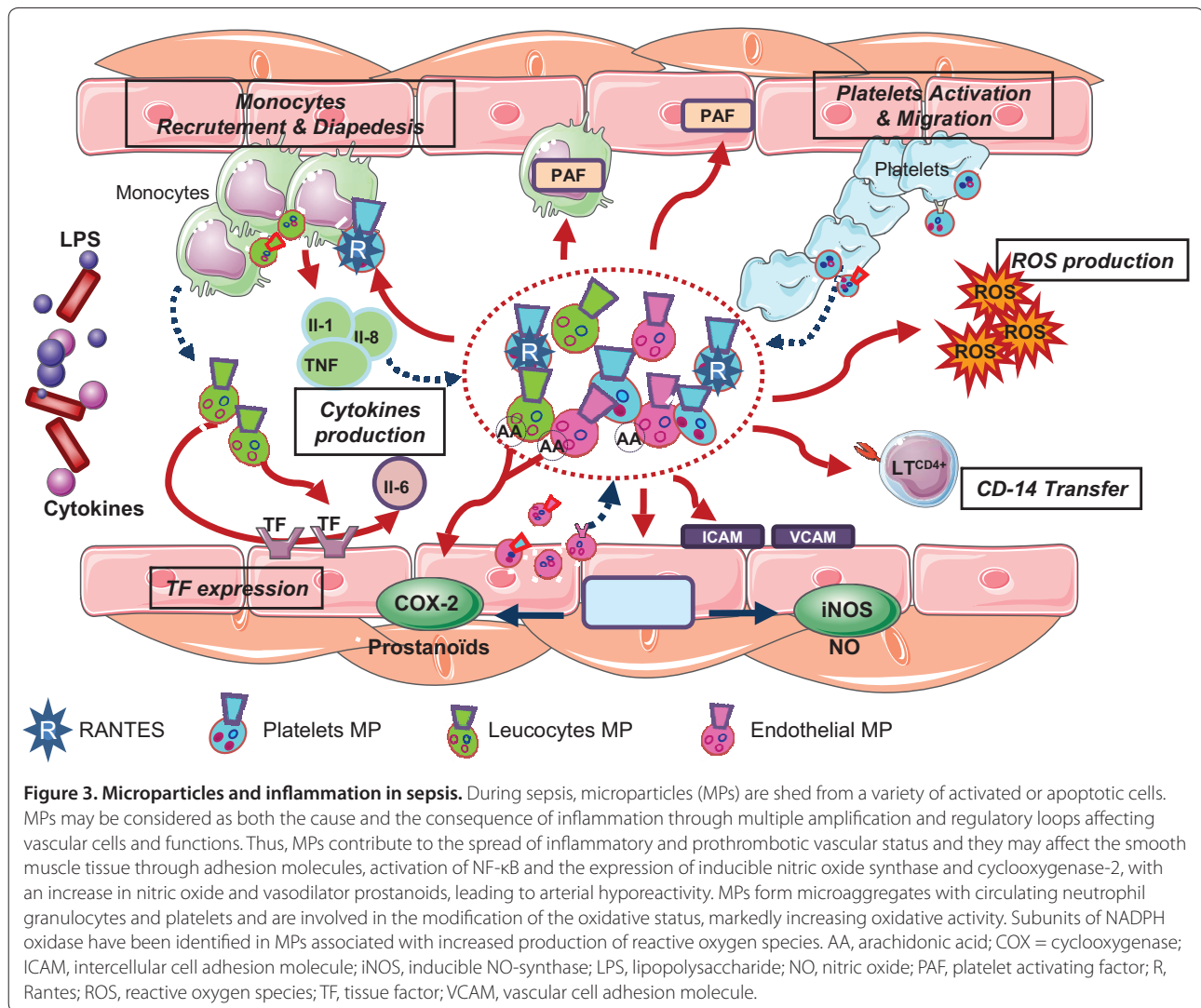
Sepsis induces a phenotypic change of the endothelium and the endothelial surface becomes proinflammatory, expresses cell adhesion molecules (intercellular cell adhesion molecule 1, vascular cell adhesion molecule 1) [51] and becomes prothrombotic through the increased expression of membrane TF and the inhibition of thrombomodulin and EPCR synthesis. In parallel, endothelial cells become capable of recruiting and activating platelets [52].

Microparticles contribute to the spreading of inflammatory and prothrombotic vascular status

MPs may be considered as both the cause and the consequence of inflammatory diseases through multiple amplification and regulatory loops affecting vascular cell functions. *In vitro* incubation of leukocyte-derived MPs with endothelial cells allowed Mesri and Altieri [53] to demonstrate their role in the secretion of inflammatory IL-6 and in the production of TF [54]. Furthermore, platelet MPs are able to deliver RANTES at the inflamed endothelium, thus promoting leukocyte recruitment and diapedesis [55]. MPs may affect the smooth muscle tissue through the activation of the transcription factor NF- κ B and favour the expression of inducible NO-synthase and COX-2, resulting in an increase in NO and vasodilator prostanoids, leading to arterial hyporeactivity [45].

The interactions between platelets, leukocytes and endothelium clearly contribute to the vascular dysfunction observed in sepsis and various MPs were reported to alter the arterial wall directly or indirectly [56,57].

Endothelial MPs may play a role in the spread of sepsis inflammatory responses leading to multiple organ dysfunction [18,58]. They may participate in the potentialisation of the procoagulant state associated with sepsis by providing renewed lipid surfaces of human endothelial



cells for the generation of thrombin and by up-regulating monocyte TF expression, as demonstrated *in vitro* [59]. In sepsis, blockade of the human TF pathway by TFPI is very quickly overridden, clearing the way for a detrimental procoagulant state [28]. Indeed, in humans, a single endotoxin administration provokes a significant increase in endothelial-cell- or monocyte-derived MPs displaying potentiated TF [60]. This state is worsened by the exhaustion and/or faulty activation of the two other regulatory molecules, antithrombin and APC.

Several reports illustrate well the cascade of interwoven events that link cellular activation, TF up-regulation, the release of MPs presenting active TF and the triggering of disseminated intravascular coagulopathy and shock [28,29]. With regard to vascular tone, MPs could promote the significant vasoplegia observed in septic shock [8]. Arachidonic acid transfer may up-regulate COX-2 expression and the production of prostacyclin, which is

implicated in vasodilation and the inhibition of platelet activation [32].

Microparticles and oxidative stress

During sepsis, generated MPs are involved in the modification of the oxidative status; they form microaggregates with circulating neutrophil granulocytes and markedly increase oxidative activity [8]. Subunits of NADPH oxidase have been identified in endothelial- and platelet-derived MPs associated with increased production of reactive oxygen species [18,61] (Figure 3).

Conclusion

The systemic inflammatory response that is a characteristic feature of sepsis is a major cause of cellular dysfunction that may lead to the exaggerated generation of MPs. These plasma membrane fragments are circulating markers of vascular inflammatory diseases. They also

behave as pathogenic shuttles able to disseminate their deleterious proinflammatory and procoagulant potential in the systemic circulation and may be implicated in the multiple organ dysfunction characterizing sepsis and septic shock. To date, however, we have insufficient evidence to determine whether MPs are major players or bystanders in the development of the sepsis syndrome.

Abbreviations

APC, activated protein C; COX, cyclooxygenase; EPCR, endothelial protein C receptor; IL, interleukin; MP, microparticle; mpEPCR, microparticle endothelial protein C receptor; NF, nuclear factor; NO, nitric oxide; rhAPC, therapeutic activated protein C; sEPCR, soluble endothelial protein C receptor; TF, tissue factor; TFPI, Tissue factor pathway inhibitor.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Service de réanimation médicale, Nouvel Hôpital Civil, Hôpitaux universitaires de Strasbourg, F-67091 Strasbourg, France. ²Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, UMR 7213 CNRS, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, F-67401 Illkirch, France. ³Institut d'Hématologie et d'Immunologie, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, 4 rue Kirschleger, F-67085 Strasbourg, France. ⁴Laboratoire HIFIH, UPRES EA 3859, IFR 132, Université d'Angers, F-49045 Angers, France. ⁵Département de réanimation médicale et médecine hyperbare, CHU Angers, F-49933 Angers, France. ⁶Inserm U770, Hôpital de Bicêtre, F94275 Le Kremlin Bicêtre, France. ⁷Université Paris-Sud 11, Faculté de Médecine, F94275 Le Kremlin-Bicêtre, France.

Authors' contributions

All authors participated in the design of this review and in drafting the manuscript. FM and FT supervised the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

Published: 20 October 2010

References

1. Wolf P: The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol* 1967, **13**:269-288.
2. Morel O, Toti F, Hugel B, Freyssinet JM: Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. *Curr Opin Hematol* 2004, **11**:156-164.
3. Zwaal RF, Schroit AJ: Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* 1997, **89**:1121-1132.
4. Freyssinet JM: Cellular microparticles: what are they bad or good for? *J Thromb Haemost* 2003, **1**:1655-1662.
5. Morel O, Morel N, Freyssinet JM, Toti F: Platelet microparticles and vascular cells interactions: a checkpoint between the haemostatic and thrombotic responses. *Platelets* 2008, **19**:9-23.
6. Pawlinski R, Mackman N: Cellular sources of tissue factor in endotoxemia and sepsis. *Thromb Res* 2010, **125** Suppl 1:S70-73.
7. Distler JH, Huber LC, Gay S, Distler O, Pisetsky DS: Microparticles as mediators of cellular cross-talk in inflammatory disease. *Autoimmunity* 2006, **39**:683-690.
8. Mortaza S, Martinez MC, Baron-Menguy C, Burban M, de la Bourdonnaye M, Fizanne L, Pierrot M, Calès P, Henrion D, Andriantsitohaina R, Mercat A, Asfar F, Meziani F: Detrimental hemodynamic and inflammatory effects of microparticles originating from septic rats. *Crit Care Med* 2009, **37**:2045-2050.
9. Russell JA: Management of sepsis. *N Engl J Med* 2006, **355**:1699-1713.
10. Gando S, Kameue T, Matsuda N, Hayakawa M, Morimoto Y, Ishitani T, Kemmotsu O: Imbalances between the levels of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in ARDS patients. *Thromb Res* 2003, **109**:119-124.
11. Cohen Z, Gonzales RF, Davis-Gorman GF, Copeland JG, McDonagh PF: Thrombin activity and platelet microparticle formation are increased in type 2 diabetic platelets: a potential correlation with caspase activation. *Thromb Res* 2002, **107**:217-221.
12. Hugel B, Martinez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM: Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology (Bethesda)* 2005, **20**:22-27.

13. Miguet L, Pacaud K, Felden C, Hugel B, Martinez MC, Freyssinet JM, Herbrecht R, Potier N, van Dorsselaer A, Mauvieux L: Proteomic analysis of malignant lymphocyte membrane microparticles using double ionization coverage optimization. *Proteomics* 2006, **6**:153-171.
14. Miguet L, Bechade G, Fornecker L, Zink E, Felden C, Gervais C, Herbrecht R, van Dorsselaer A, Mauvieux L, Sanglier-Cianferani S: Proteomic analysis of malignant B-cell derived microparticles reveals CD148 as a potentially useful antigenic biomarker for mantle cell lymphoma diagnosis. *J Proteome Res* 2009, **8**:3346-3354.
15. Dasgupta SK, Abdel-Monem H, Niravath P, Le A, Bellera RV, Langlois K, Nagata S, Rumbaut RE, Thiagarajan P: Lactadherin and clearance of platelet-derived microvesicles. *Blood* 2009, **113**:1332-1339.
16. Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ: Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia* 2006, **20**:1487-1495.
17. MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, Surprenant A: Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity* 2001, **15**:825-835.
18. Ogura H, Tanaka H, Koh T, Fujita K, Fujimi S, Nakamori Y, Hosotsubo H, Kuwagata Y, Shimazu T, Sugimoto H: Enhanced production of endothelial microparticles with increased binding to leukocytes in patients with severe systemic inflammatory response syndrome. *J Trauma* 2004, **56**:823-830.
19. Soriano AO, Jy W, Chirinos JA, Valdivia MA, Velasquez HS, Jimenez JJ, Horstman LL, Kett DH, Schein RM, Ahn YS: Levels of endothelial and platelet microparticles and their interactions with leukocytes negatively correlate with organ dysfunction and predict mortality in severe sepsis. *Crit Care Med* 2005, **33**:2540-2546.
20. Thery C, Zitvogel L, Amigorena S: Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2002, **2**:569-579.
21. Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ, Ahn YS, Biró E, Nieuwland R, Sturk A, Dignat-George F, Sabatier F, Camoin-Jau L, Sampol J, Hugel B, Zebairi F, Freyssinet JM, Nomura S, Shet AS, Key NS, Hebbel RP: Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* 2004, **2**:1842-1851.
22. Lane DA, Philippou H, Huntington JA: Directing thrombin. *Blood* 2005, **106**:2605-2612.
23. Satta N, Toti F, Feugeas O, Bohbot A, Dachary-Prigent J, Eschwege V, Hedman H, Freyssinet JM: Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. *J Immunol* 1994, **153**:3245-3255.
24. Key NS: Analysis of tissue factor positive microparticles. *Thromb Res* 2010, **125** Suppl 1:S42-45.
25. Liu ML, Reilly MP, Casasanto P, McKenzie SE, Williams KJ: Cholesterol enrichment of human monocyte/macrophages induces surface exposure of phosphatidylserine and the release of biologically-active tissue factor-positive microvesicles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007, **27**:430-435.
26. Egorina EM, Sovershaev MA, Olsen JO, Osterud B: Granulocytes do not express but acquire monocyte-derived tissue factor in whole blood: evidence for a direct transfer. *Blood* 2008, **111**:1208-1216.
27. Chou J, Mackman N, Merrill-Skoloff G, Pedersen B, Furie BC, Furie B: Hematopoietic cell-derived microparticle tissue factor contributes to fibrin formation during thrombus propagation. *Blood* 2004, **104**:3190-3197.
28. Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, Boing AN, Romijn FP, Westendorp RG, Hack CE, Sturk A: Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood* 2000, **95**:930-935.
29. Geisbert TW, Young HA, Jahrling PB, Davis KJ, Kagan E, Hensley LE: Mechanisms underlying coagulation abnormalities in ebola hemorrhagic fever: overexpression of tissue factor in primate monocytes/macrophages is a key event. *J Infect Dis* 2003, **188**:1618-1629.
30. Lacroix R, Sabatier F, Mialhe A, Basire A, Pannell R, Borghi H, Robert S, Lamy E, Plawinski L, Camoin-Jau L, Gurewich V, Angles-Cano E, Dignat-George F: Activation of plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles: a mechanism that modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells *in vitro*. *Blood* 2007, **110**:2432-2439.
31. Satta N, Freyssinet JM, Toti F: The significance of human monocyte thrombomodulin during membrane vesiculation and after stimulation by lipopolysaccharide. *Br J Haematol* 1997, **96**:534-542.
32. Perez-Casal M, Downey C, Fukudome K, Marx G, Toh CH: Activated protein C induces the release of microparticle-associated endothelial protein C receptor. *Blood* 2005, **105**:1515-1522.

33. Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, Lopez JA: **Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation.** *Blood* 2005, **106**:1604-1611.
34. Pluskota E, Woody NM, Szpak D, Ballantyne CM, Soloviev DA, Simon DI, Plow EF: **Expression, activation, and function of integrin alphaMbeta2 (Mac-1) on neutrophil-derived microparticles.** *Blood* 2008, **112**:2327-2335.
35. Tarabozetti G, D'Ascenzo S, Borsotti P, Giavazzi R, Pavan A, Dolo V: **Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells.** *Am J Pathol* 2002, **160**:673-680.
36. Perez-Casal M, Downey C, Cutillas-Moreno B, Zuzel M, Fukudome K, Toh CH: **Microparticle-associated endothelial protein C receptor and the induction of cytoprotective and anti-inflammatory effects.** *Haematologica* 2009, **94**:387-394.
37. Itakura Sumi Y, Ogura H, Tanaka H, Koh T, Fujita K, Fujimi S, Nakamori Y, Shimazu T, Sugimoto H: **Paradoxical cytoskeleton and microparticle formation changes in monocytes and polymorphonuclear leukocytes in severe systemic inflammatory response syndrome patients.** *J Trauma* 2003, **55**:1125-1132.
38. Fourcade O, Simon MF, Viode C, Rugani N, Leballe F, Ragab A, Fournie B, Sarda L, Chap H: **Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells.** *Cell* 1995, **80**:919-927.
39. Sellam J, Proulle V, Jünger A, Ittah M, Miceli Richard C, Gottenberg JE, Toti F, Benessiano J, Gay S, Freyssinet JM, Mariette X: **Increased levels of circulating microparticles in primary Sjogren's syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis and relation with disease activity.** *Arthritis Res Ther* 2009, **11**:R156.
40. Lynch SF, Ludlam CA: **Plasma microparticles and vascular disorders.** *Br J Haematol* 2007, **137**:36-48.
41. Gambim MH, do Carmo Ade O, Marti L, Verissimo-Filho S, Lopes LR, Janiszewski M: **Platelet-derived exosomes induce endothelial cell apoptosis through peroxynitrite generation: experimental evidence for a novel mechanism of septic vascular dysfunction.** *Crit Care* 2007, **11**:R107.
42. Sennoun N, Baron-Menguy C, Burban M, Lecompte T, Andriantsitohaina R, Henrion D, Mercat A, Asfar P, Levy B, Meziani F: **Recombinant human activated protein C improves endotoxemia-induced endothelial dysfunction: a blood-free model in isolated mouse arteries.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009, **297**:H277-282.
43. Barry OP, Kazanietz MG, Pratico D, FitzGerald GA: **Arachidonic acid in platelet microparticles up-regulates cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin formation via a protein kinase C/mitogen-activated protein kinase-dependent pathway.** *J Biol Chem* 1999, **274**:7545-7556.
44. Nomura S, Imamura A, Okuno M, Kamiyama Y, Fujimura Y, Ikeda Y, Fukuhara S: **Platelet-derived microparticles in patients with arteriosclerosis obliterans: enhancement of high shear-induced microparticle generation by cytokines.** *Thromb Res* 2000, **98**:257-268.
45. Tesse A, Martinez MC, Hugel B, Chalupsky K, Muller CD, Meziani F, Mitolo-Chieppa D, Freyssinet JM, Andriantsitohaina R: **Upregulation of proinflammatory proteins through NF-kappaB pathway by shed membrane microparticles results in vascular hyporeactivity.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005, **25**:2522-2527.
46. Wolf P, Nghiem DX, Walterscheid JP, Byrne S, Matsumura Y, Matsumura Y, Bucana C, Ananthaswamy HN, Ullrich SE: **Platelet-activating factor is crucial in psoralen and ultraviolet A-induced immune suppression, inflammation, and apoptosis.** *Am J Pathol* 2006, **169**:795-805.
47. VanWijk MJ, VanBavel E, Sturk A, Nieuwland R: **Microparticles in cardiovascular diseases.** *Cardiovasc Res* 2003, **59**:277-287.
48. Boulanger CM, Scoazec A, Ebrahimian T, Henry P, Mathieu E, Tedgui A, Mallat Z: **Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction.** *Circulation* 2001, **104**:2649-2652.
49. Meziani F, Tesse A, David E, Martinez MC, Wangesteen R, Schneider F, Andriantsitohaina R: **Shed membrane particles from preeclamptic women generate vascular wall inflammation and blunt vascular contractility.** *Am J Pathol* 2006, **169**:1473-1483.
50. Brodsky SV, Zhang F, Nasjletti A, Goligorsky MS: **Endothelium-derived microparticles impair endothelial function in vitro.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004, **286**:H1910-1915.
51. Lopes-Bezerra LM, Filler SG: **Endothelial cells, tissue factor and infectious diseases.** *Braz J Med Biol Res* 2003, **36**:987-991.
52. Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM: **Endothelial cells undergoing apoptosis become proadhesive for nonactivated platelets.** *Blood* 1999, **93**:3831-3838.
53. Mesri M, Altieri DC: **Endothelial cell activation by leukocyte microparticles.** *J Immunol* 1998, **161**:4382-4387.
54. Mesri M, Altieri DC: **Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway.** *J Biol Chem* 1999, **274**:23111-23118.
55. Mause SF, von Hundelshausen P, Zerneck A, Koenen RR, Weber C: **Platelet microparticles: a transcellular delivery system for RANTES promoting monocyte recruitment on endothelium.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005, **25**:1512-1518.
56. Morel O, Hugel B, Jesel L, Lanza F, Douchet MP, Zupan M, Chauvin M, Cazenave JP, Freyssinet JM, Toti F: **Sustained elevated amounts of circulating procoagulant membrane microparticles and soluble GPV after acute myocardial infarction in diabetes mellitus.** *Thromb Haemost* 2004, **91**:345-353.
57. Pfister SL: **Role of platelet microparticles in the production of thromboxane by rabbit pulmonary artery.** *Hypertension* 2004, **43**:428-433.
58. Densmore JC, Signorino PR, Ou J, Hatoum OA, Rowe JJ, Shi Y, Kaul S, Jones DW, Sabina RE, Pritchard KA Jr, Guice KS, Oldham KT: **Endothelium-derived microparticles induce endothelial dysfunction and acute lung injury.** *Shock* 2006, **26**:464-471.
59. Brodsky SV, Malinowski K, Golightly M, Jesty J, Goligorsky MS: **Plasminogen activator inhibitor-1 promotes formation of endothelial microparticles with procoagulant potential.** *Circulation* 2002, **106**:2372-2378.
60. Aras O, Shet A, Bach RR, Hysjulien JL, Slungaard A, Hebbel RP, Escobar G, Jilma B, Key NS: **Induction of microparticle- and cell-associated intravascular tissue factor in human endotoxemia.** *Blood* 2004, **103**:4545-4553.
61. Janiszewski M, Do Carmo AO, Pedro MA, Silva E, Knobel E, Laurindo FR: **Platelet-derived exosomes of septic individuals possess proapoptotic NAD(P)H oxidase activity: A novel vascular redox pathway.** *Crit Care Med* 2004, **32**:818-825.

doi:10.1186/cc9231

Cite this article as: Meziani F, et al.: Circulating microparticles: a new player in sepsis? *Critical Care* 2010, **14**:236.

**Are microparticles reliable deleterious effectors
in septic coagulopathy?**

Xavier DELABRANCHE, Florence TOTI, Ferhat MEZIANI

**Annual update in intensive care and emergency medicine 2011, pp 51-61. JL. Vincent, editor.
Springer, Heidelberg 2011**

Are Microparticles Reliable Deleterious Effectors in Septic Coagulopathy?

X. DELABRANCHE, F. TOTI, and F. MEZIANI

II

Introduction

Hemostasis has evolved from an archaic innate defense system that maintains vascular integrity by a tightly regulated equilibrium between procoagulant and anticoagulant as well as profibrinolytic and antifibrinolytic systems. This defense system acts by preventing intravascular coagulation (thrombosis), repairing vascular lesion (hemostasis and fibrinolysis), and limiting pathogen invasion.

Systemic activation of blood coagulation during sepsis has been described for a long time in its most explosive clinical expression, purpura fulminans, with distal purpura and necrosis, diffuse bleeding, and death. It is now established that blood coagulation is one part of a systemic inflammatory response during sepsis, and that blood coagulation occurs with dual consequences: (1) limitation of pathogen diffusion; and (2) deposition of platelet-rich clots and fibrin in microvessels resulting in the thrombotic microangiopathy involved in the multiple organ failure syndrome. Thus, the host response is deregulated and excessive with increased thrombin generation and increased fibrinolysis, resulting in a major disorder termed 'coagulopathy'.

In this chapter, we will describe this deregulation-induced-coagulopathy and discuss the emerging role of microparticles that display pro- and anticoagulant patterns and offer new insights into host-pathogen interactions.

How is Coagulopathy Initiated during Sepsis?

This question includes both 'how does the host initiate hemostasis?' and 'how does the pathogen activate blood coagulation?'

Hemostasis

Clot formation is determined by flow conditions and cellular interactions (endothelial cells, platelets, erythrocytes, monocytes and neutrophils) with matrix (collagen) and proteins (blood coagulation factors and cofactors, and inhibitors).

Platelet and endothelial cell activation and microparticle release

Normal hemostasis is triggered by two major events: Subendothelial collagen exposure and endothelial cell activation. Collagen is the most potent platelet agonist, enabling rolling and adhesion, cytoskeleton contraction, membrane remodeling, secretion of α - and dense-granules and (auto-)activation. Cellular activa-

II

tion allows calcium influx, and the activation of various calcium-dependent proteases, such as calpains or caspases, which in turn cleave the cytoskeleton [1]. Membrane remodeling occurs with reorganization of asymmetric phospholipid distribution, protein-lipid raft domain formation and blebbing [2]. In addition to membrane remodeling, with phosphatidylserine exposure at the outer leaflet, endothelial cell activation results in encrypted tissue factor (TF) expression and secretion of ultra-large von Willebrand factor multimers (UL-vWF) from Weibel-Palade bodies. Microparticles are ultimately released and constitute a reservoir of bioactive mediators involved in inflammation and thrombosis [3]. Microparticles were first described in the 1960s as platelet fragments with procoagulant activity. Specific to their cellular origin, microparticles can transfer receptors, organelles, mRNA and other proteins to target cells. They also constitute a secretion pathway for several cytokines, such as mature interleukin (IL)-1 β . As mediators of cellular communication, microparticles are actors and possible mediators in the interplay between thrombosis and inflammation, a process previously described for vascular injury during inflammatory diseases [4]. The multiple properties of microparticles and the variety of their possible cellular targets suggest they have a key-role in cell reprogramming and tissue remodeling with physiological or pathological consequences. Microparticles could, therefore, play a major role in propagating procoagulant activity in sepsis. In the vascular compartment, including the arterial wall, the particular settings of sepsis and the tuning abilities of microparticles point to the endothelium as a pivotal target [5].

Initiation of thrombin generation: Role of tissue factor

Initiation of thrombin generation supervenes after binding of negatively-charged factor (F)VII to TF and phosphatidylserine, leading to auto-activation of FVIIa. Small amounts of FVIIa activate FX, and FXa promotes the generation of traces of thrombin (FIIa) by cleavage of prothrombin (FII). UL-vWF enables platelet adhesion under high shear-stress and fibrinogen allows aggregation after GP_{Ib/IIIa} activation. Thrombin is a multipotent molecule with different targets according to its molecular environment. Linked to phosphatidylserine, FIIa activates cofactors FV and FVIII, whereas when linked to platelet GP_{Ib α} it promotes activation of platelet FXI [6]. Plasma Fxa (not bound to phosphatidylserine) is captured by TF pathway inhibitor (TFPI) and protein S as a TFPI cofactor. This complex inactivates cellular TF and stops FVIIa generation. It is now well established that microparticles are a source of active TF [7], and that these TF-bearing microparticles are able to transfer functional TF to various vascular cells such as neutrophils and platelets [8, 9]. TF-bearing microparticles have been identified in human meningococcal disease [10] and may originate from cells with inducible TF expression (endothelial cells, monocytes).

Amplification of thrombin generation: The Josso' loop

While initiation of thrombin generation by TF is partly inhibited by TFPI, the Josso' loop becomes the main thrombin generation pathway. Explosive thrombin generation during the propagation phase is not TF-dependent, but occurs on the membrane of activated platelets, with activation of platelet-exposed FXI (of megacaryocytic origin) by GP_{Ib α} -bound FIIa. FXIa activates FIX, and the assembly of the tenase complex (FIXa-FVIIIa) generates FXa from FX allowing the formation of the prothrombinase complex able to cleave FII into thrombin. GP_{Ib α} -FXI(a)-bearing microparticles released after platelet activation constitute an addi-

tional catalytic surface for tenase assembly and propagation of procoagulant effectors. Thrombin generates soluble fibrin monomers from fibrinogen, which are transformed into an insoluble fibrin network by FXIIIa, a transaminase generated by FIIa cleavage at the fibrin surface. The resulting fibrin network retains erythrocytes and activated platelets [6] in a wide-mesh net with persistent low flow resupply of 'fresh' factors enabling thrombus growth [11].

A renewed role for the 'contact' pathway

Inorganic phosphates can form linear polymers linked by energy-rich phosphoanhydride bonds of more than 100 residues. Polyphosphates are a major source of energy for prokaryotes and lower eukaryotes, and are present in platelet dense-granules. In contrast to FXII activation in the 'contact-phase', it is now well established that the TF (extrinsic) pathway is the relevant process in physiological thrombin generation [12]. Physiological FXI activation is under thrombin dependence at the platelet surface through the Josso' loop. The 'intrinsic pathway' is of importance at the laboratory level to explore hemophilia using the activated partial thromboplastin time (aPTT) where the 'contact activator' is glass or kaolin. Polyphosphates are now recognized as physiological 'contact activators' implicated in the rapid generation of traces of FVa and thrombin. In addition, polyphosphates abrogate the action of TFPI as a regulator of thrombin generation and modify the clot into a strengthened structure [13].

Host-induced Hemostasis

Hemostasis is a 'primitive' line of defense against pathogens, as are innate immunity and the complement system. All three are finely tuned and are interdependent. The global response is a systemic inflammatory response syndrome (SIRS), with fever, chills, hypotension, drowsiness, oliguria. Clinical presentations range from sepsis to septic shock, and result from an equilibrium between pathogenicity and host responses. This means that septic shock, the most severe presentation with persistent hypotension despite fluid resuscitation and vasopressors and leading to organ dysfunction, is due to overwhelming host responses rather than to high bacterial virulence.

In contrast to the physiological mechanisms of hemostasis, thrombin generation is not limited to one point but is multifocal rather than disseminated. In sepsis, endothelial cell damage is also the *primum movens*, with subendothelial collagen denudation, cellular membrane remodeling with TF and phosphatidylserine exposure, and secretion of UL-vWF. Platelets are recruited at sites of multifocal lesions, thrombin is generated. Microthrombi in small vessels are responsible for ischemic lesions. Dissemination of this procoagulant activity occurs by at least two complementary mechanisms. The first is monocyte recruitment as a major source of TF [14], and the second is cellular membrane blebbing and microparticle formation (Fig. 1). In septic states, microparticles disseminated in the blood are from endothelial cells, monocytes, platelets, and erythrocytes [15]; the respective contributions of these microparticles are not yet known. Circulating TF-bearing microparticles are well characterized during meningococemia in humans [10], and have been found in a cohort of patients with septic shock irrespective of the causative agent (personal data). The elevation in microparticle levels probably enables multiple fusion events that promote microparticle-mediated cellular cross-talk [4]. Neutrophilic integrin, $\alpha_M\beta_2$ (Mac-1), can activate platelet

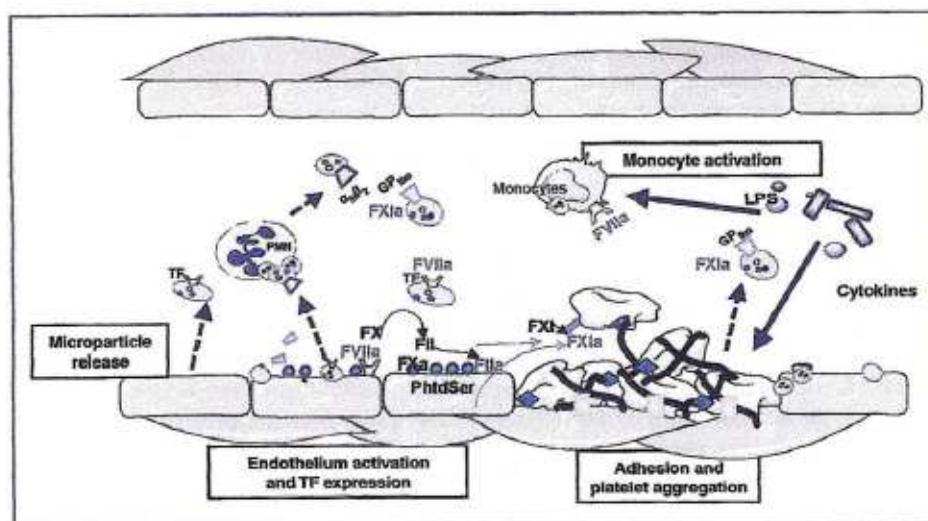


Fig. 1. Thrombin generation during sepsis. Plasma membranes of endothelial cells and monocytes are reorganized with externalization of phosphatidylserine (PtdSer) and encrypted tissue factor (TF) expression allowing factor VII activation (FVIIa) and thrombin (FIIa) generation at the cell surface. Blebbing occurs, with release of microparticles bearing TF, resulting in an increased surface for procoagulant reactions. Platelet adhesion and aggregation also supervene with release of microparticles; platelets and microparticles bear $GP_{Ib\alpha}$, a cofactor for FXI activation by thrombin, leading to a propagation phase with high levels of thrombin generation and fibrin formation. Endothelial TF-bearing microparticles allow transfer of TF to polymorphonuclear leukocytes (PMN), increasing TF dissemination. LPS: lipopolysaccharide; PMN: polymorphonuclear leukocyte

$GP_{Ib\alpha}$ in neutrophil-platelet aggregates. In an amplification loop, Mac-1-bearing microparticles obtained after *ex vivo* stimulation of human neutrophils by lipopolysaccharide (LPS), platelet activating factor (PAF) or phorbol myristate acetate (PMA) were also demonstrated to be platelet activators [16]. Although not yet proven, the role of microparticles in disseminating procoagulant activity not only *via* TF-bearing microparticles but also *via* $GP_{Ib\alpha}$ -FXIa-bearing microparticles is highly evocative.

Pathogen-induced Hemostasis

Direct activation of host hemostasis by pathogens can coexist with the host response. Whereas the latter is a defense mechanism (even if overwhelming and resulting in thrombotic disorders that contribute to organ failure), the former is aggressive. As reported above, microorganisms are rich in polyphosphates, which can allow (auto-)activation of FXII to FXIIa. FXIIa can in turn not only initiate thrombin generation *via* the 'contact phase' but also activate complement, bradykinin formation (and increased vascular permeability) and vascular matrix remodeling. Bacterial polyphosphate is about 200 residues and is more potent than platelets (75–100 residues) at activating FXII. Polyphosphates are hydrolyzed by phosphatases with a plasma half-life of about 2 hours [17].

Two bacteria highlight the direct action of pathogens on hemostasis, *Bacillus anthracis* and *Yersinia pestis*. Anthrax is due to a non-motile Gram-positive spore-forming bacterium, *B. anthracis*. The disease is now rare, but this bacte-

rium can be used as a biological weapon. Inhalation of spores results in pneumonia with pleural effusion, and thrombotic and hemorrhagic disorders. InhA1, a bacterial secreted zinc metalloprotease, is responsible for coagulopathy with direct activation of FX and FII (independently of FXIIa and TF-FVIIa), fibrin deposition [18], inhibition of ADAMTS13 (disintegrin-like metalloproteinase that limits vWF multimer size) with the consecutive formation of platelet-rich thrombi, and hemorrhage *via* the degradation of vWF by an independent proteolytic mechanism [19]. Moreover, this coagulopathy seems not to result from the total amount of circulating bacteria (referred to as 'quorum sensing') but rather from their spatial localization ('quorum acting') [18].

Y. pestis is a Gram-negative bacterium that expresses outer membrane aspartyl proteases referred to as ompins. Their enzymatic activity requires rough LPS (with short O-antigen side chains) [17]. The most studied member of the ompin family is Pla from *Y. pestis* (responsible for the plague). Pla has many effects on host hemostasis and is responsible for virulence and pathogenicity [17]. Pla activates thrombin generation by direct proteolytic conversion of FVII to FVIIa and inhibition of TFPI. Hemostatic 'containment' due to protective fibrin deposits allows *Y. pestis* to escape inflammatory cells and phagocytosis. After bacterial growth, Pla activates fibrinolysis/matrix proteolysis by direct activation of plasminogen, cleavage of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI), and inhibition of α_2 -antiplasmin, resulting in lymph node remodeling (lymphadenitis, necrosis, hemorrhage and thrombosis) and bacterial dissemination. Dysplasminogenemia (Ala⁶⁰¹→Thr) is a common feature affecting nearly 2 % of the Chinese, Korean and Japanese population. Although plasminogen activity is reduced to 10 %, these populations are 'positively-selected' by lower responsiveness to *Y. pestis* infection. Knock-out mice for plasminogen and fibrinogen depict similar patterns of protection against *Y. Pestis*, confirming the clinical relevance of this bacterial-induced fibrinolysis [20]. Other Gram-negative bacteria also have ompins, with PgtE (*Salmonella enterica* serovar *typhimurium*) and Kop (*Klebsiella pneumoniae*) strictly selective for PAI-1 inactivation [21].

Why is Hemostasis not Efficiently Regulated During Sepsis?

Thrombin generation and fibrinolysis are regulated locally and temporally with complex interactions (Fig. 2). Under physiological conditions, platelet aggregation and adhesion, initiation of thrombin, and amplification are controlled by tuned mechanisms relying on specific inhibitors, namely TFPI, activated protein C (APC) and antithrombin. Secondary clot lysis is also regulated by plasmin/ α_2 -antiplasmin and TAFI. Under high shear stress, adhesion is reduced but UL-vWF multimers are present. UL-vWF multimers are cleaved into lower molecular weight fragments by a specific plasma enzyme, ADAMTS13.

Regulation of thrombin generation is controlled by APC with protein S as a cofactor. Bound to endothelial thrombomodulin, FIIa activates PC-EPCR (endothelial protein C receptor), and APC-protein S inactivates FVa thus limiting thrombin generation. Moreover, thrombin dissemination is prevented by its binding to plasma antithrombin, a serpin (serine protease inhibitor), recruited in the endothelial vicinity by glycosaminoglycans.

Reperfusion occurs by defacing the fibrin network. Circulating tissue-type plasminogen activator (t-PA) is bound to PAI-1 and is unable to cleave free plas-

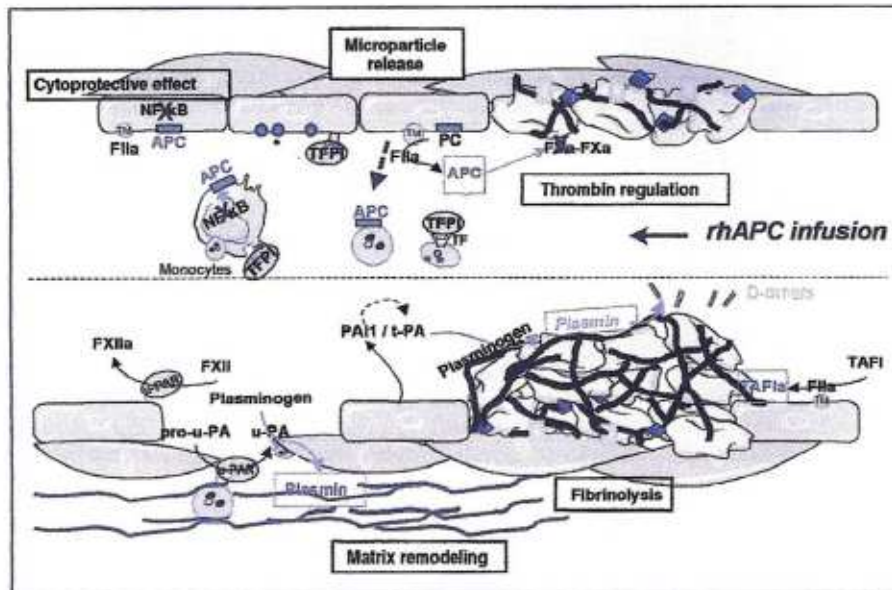


Fig. 2. Regulation and fibrinolysis/matrix remodeling. Tissue factor (TF)-initiation of blood coagulation is quickly downregulated by TF pathway inhibitor (TFPI) on endothelial and monocyte cell surfaces as on microparticles. Endothelial protein C receptor (EPCR)-bound protein C is activated by thrombin-thrombomodulin complex and activated protein C (APC) inhibits FVa limiting the propagation phase. EPCR-bound APC also regulates nuclear factor- κ B (NF- κ B), with cytoprotective effects on endothelial cells and monocytes. Infusion of recombinant APC (rhAPC) induces blebbing and release of EPCR-microparticles that allow protein C activation with anticoagulant and cytoprotective activity dissemination *in vitro*.

Fibrinolysis denotes fibrin network defacing by plasmin, resulting in fibrin degradation products (including D-dimers). Fibrin-bound plasminogen is activated by tissue-type plasminogen activator (t-PA) dissociated from its natural inhibitor, plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1). Clot fibrinolysis is delayed by removal of C-terminal lysine residues from fibrin by activated thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI). TAFI is activated by the thrombin-thrombomodulin complex. Matrix remodeling results from plasminogen activation by urokinase-type plasminogen activator (u-PA) linked to a specific receptor, u-PAR.

minogen. Plasminogen binds fibrin at lysine C-terminal moieties. t-PA has a greater affinity for fibrin-bound plasminogen than for PAI-1, allowing t-PA driven activation of plasminogen into plasmin. Fibrin-bound plasmin defaces the fibrin network into D-dimers as fibrin degradation products. Released plasmin is inactivated by α_2 -antiplasmin (a serpin). Fibrinolysis is delayed after lysine-removal from fibrin by activated TAFI resulting in limited plasminogen binding sites. TAFI is activated by the thrombomodulin-thrombin (TM-FIIa) complex, and has an important role in inflammation, not only by limiting fibrinolysis but also as a carboxypeptidase involved in inhibition of bradykinin and C5a [22].

In addition to reperfusion, pericellular matrix remodeling occurs when plasminogen is activated by urokinase-type plasminogen activator (u-PA) bound to a glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI)-anchored receptor, u-PAR. u-PAR is also associated with FXII activation, bradykinin generation from high molecular weight kininogen, and endothelial cellular activation. The net action of u-PAR is

plasmin-dependent matrix proteolysis, vasodilation mediated by endothelial nitric oxide (NO) and prostacyclin (PGI₂), and bradykinin-dependent capillary leakage.

Controlled hemostasis implies that a single endothelial lesion induces the hemostatic waterfall at one point of the vascular tree, regulation occurs with inhibition of the TF pathway, inactivation of FVa and reperfusion by plasmin. In contrast, sepsis promotes multifocal phenotypic changes in the endothelium. The endothelial surface becomes pro-inflammatory and prothrombotic. Cell adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1) and membrane TF are upregulated whereas thrombomodulin and EPCR synthesis are decreased [23]. In parallel, endothelial cells become capable of recruiting and activating platelets. Endothelial damage is no longer localized and thrombin generation and platelet activation occur at different sites and at different times in the course of the disease.

The prime mechanism for thrombin generation deregulation is consumption of inhibitors by ongoing thrombin generation, which occurs through multiple ways. Platelet adhesion to subendothelial collagen and aggregation are increased at sites of endothelial lesion because of reduced blood flow as a result of hypotension and rheologic disturbances and of high amounts of UL-vWF that occur from the inhibition of ADAMTS13 by thrombin and granulocyte elastase. During sepsis, TFPI has a key role in downregulating thrombin generation, and is quickly reduced by consumption, direct degradation by granulocyte elastase and sometimes by bacterial products (e.g., Pla), [17, 24]. Moreover, free protein S availability is decreased because of the inflammatory response that leads to the elevation in plasma C4b binding protein, a multimeric plasma protein S transporter.

Antithrombin is a 'negative-phase' protein in inflammatory responses and its synthesis is downregulated during inflammation. Loss of glycosaminoglycans due to endothelial cell damage reduces antithrombin activity. Moreover, antithrombin is degraded by granulocyte elastase. Activation of the protein C pathway requires thrombomodulin and EPCR. Thrombomodulin is widely expressed on various cell types (endothelial cells, platelets, neutrophils, monocytes, astrocytes) whereas EPCR is expressed on endothelial cells of large vessels (but not in the microvasculature), monocytes and neutrophils. During sepsis, impaired activation of protein C has been described with low levels of plasma APC [23]. Neutrophil-derived enzymes are able to cleave thrombomodulin, resulting in increased soluble thrombomodulin in plasma and lower activation of TAFI and protein C. Soluble thrombomodulin levels have been correlated with severity and prognosis of sepsis. In addition, C-reactive protein (CRP), which is able to downregulate thrombomodulin and EPCR, may contribute to the deficient APC pathway. Recently, in an experimental model, EPCR was also shown to be involved in FVIIa clearance with caveolin-dependent intracellular internalization and trafficking [25].

Two forms of circulating EPCR are present in the plasma of septic patients: Soluble EPCR (sEPCR) released by enzymatic cleavage and membrane-bound on microparticles EPCR (mpEPCR) [26]. sEPCR is able to capture protein C, thereby preventing activation by TM-FIIa, and inactivating APC. mpEPCR is released in response to treatment with recombinant APC (drotrecogin alfa [activated]). APC-EPCR-bound microparticles remain biologically active. *In vitro*, they promote inactivation of FVa with anticoagulant effects and cleave protease-activated receptor (PAR)-1, the thrombin receptor. Endothelial cytoprotection has been reported through different pathways triggered by APC-EPCR-microparticles [27]. *In vivo*,



recombinant APC's cytoprotective effects were evidenced in a baboon model of heatstroke with reduced IL-6, soluble thrombomodulin and TF-bearing microparticle release. Unfortunately, this model did not allow investigation of mortality [28]. Altogether, these observations suggest that microparticles are a key storage pool in the tuning of hemostatic balance.

The antithrombotic activities of microparticles would be overwhelmed by their procoagulant ones when microparticles are released under high thrombotic conditions with a major increase in TF induction at the cell surface, as observed during sepsis. Indeed, in purified monocyte suspensions, thrombomodulin anticoagulant activity and TF coexist at the surface of microparticles, but when released by LPS treatment, TF activity is predominant on microparticles [29]. Pharmacological treatment of septic shock by APC infusion could be of value by counterbalancing the procoagulant microparticles bearing TF and GP_{Ib} through the generation and delivery of anticoagulant and anti-inflammatory EPCR-bearing microparticles.

Impairment of fibrinolysis regulation is of importance during sepsis and septic shock. PAI-1 is secreted by injured endothelial cells with inhibition of t-PA and TAFI is activated by FIIa-thrombomodulin complex allowing fibrin growth. While thrombin is overproduced and fibrin deposition occurs, the consumption of procoagulant factors limits clot formation. Thereafter, fibrinolysis is induced with massive clot lysis, reperfusion and massive and diffuse bleeding. Interestingly, several cellular models have shown that $\alpha_M\beta_2$ exposed at the endothelial and neutrophil microparticle surface can interact with u-PA, plasminogen and metalloproteases (MMP)-2 and -5, suggesting a role in fibrinolysis and in local tissue remodeling [16, 30]. u-PA/u-PAR bearing microparticles of endothelial cell origin can promote a disseminated fibrinolytic potential with activation of plasminogen on platelets, fibrin, fibronectin or extracellular matrix, suggesting their possible role in further vascular leakage [31].

Why and How to Treat Septic Coagulopathy?

Coagulopathy and Organ Dysfunction

Clinical evidence of thrombotic microangiopathy during sepsis is less frequent than the biological diagnosis of 'coagulopathy' on laboratory test, questioning the rationale for treatment. Do we have to correct laboratory values or treat thrombi and necrosis? Biological criteria for overt or non-overt disseminated intravascular coagulopathy (DIC) were defined in 2001 by the International Society on Thrombosis and Hemostasis but they are not helpful in therapeutic decision making. Trials aimed at the pharmacological control of DIC point to a more complex vascular pathology.

Overview of (Disappointing) Therapies to Modulate Thrombin Generation in Sepsis

Negative results in large clinical trials with TFPI and antithrombin substitution have been reported. In the Optimist trial (recombinant TFPI, Tifacogin), excessive bleeding was observed with no advantage in mortality [32]. Reviewing the pathophysiological role of TFPI in regulation of the initiation of thrombin, one can suppose that TFPI substitution was applied at a late step not allowing control of the amplification phase. The Kybersept trial (antithrombin, with or without hepa-

rin) was also negative [33], but patients with overt-DIC and not treated with concomitant heparin seemed to have improved prognosis in a secondary analysis [34]. This treatment is not yet recommended by the Surviving Sepsis Campaign, and a novel recombinant antithrombin molecule is under investigation.

Recombinant APC (drotrecogin alfa [activated]) reduced 28-day mortality in a large trial (PROWESS) unrelated to DIC diagnosis, but results with this agent were disappointing in pediatrics and low-risk of mortality patients (ADDRESS). This treatment is, therefore, still controversial, and a new trial is ongoing (PROWESS-SHOCK). In line with the observation that the prognostic value of APC treatment might not be related to its anticoagulant effect, fundamental data argue for a cytoprotective effect of APC [27].

Microparticles as a Therapeutic Target in Septic Coagulopathy

Because microparticles constitute a real storage pool of vascular effectors in the vessel, one could argue that their therapeutic control might prove beneficial. Different methods could be investigated: Modulation of pro/anticoagulant microparticles *via* APC infusion [27], mechanical removal by hemofiltration, and/or enhancement of physiological clearance by reticuloendothelial cells.

Indeed, although bearing phosphatidylserine, which is a signal for phagocytosis, microparticles seem to survive longer than their parental apoptotic cell, probably because of their size, which does not allow optimal exposure of a cluster of senescence signals. Dasgupta et al. [35] recently described a major role of lactadherin in the removal of phosphatidylserine-expressing platelet microparticles from human plasma. Lactadherin is a macrophage opsonin that mediates the clearance of apoptotic lymphocytes. Knock-out lactadherin (-/-) mice show increased levels of circulating platelet microparticles and a hypercoagulable state; lactadherin supplementation restores the normal clearance of microparticles. There are currently no data on the effect that microparticle clearance has on the hemostatic balance under physiological or pathological settings.

Using the hypothesis that an efficient cut-off can be obtained, one could suggest the removal of deleterious microparticles from plasma during renal replacement therapy by continuous hemofiltration. Patients with chronic renal failure have a peak of microparticle generation at the beginning of hemodialysis (with increased risk of circuit thrombosis), followed by a decrease below their baseline at the end of the session suggesting a direct removal [36]; a similar pattern is observed during septic shock (personal data).

Conclusion

Hemostasis is a complex and finely tuned equilibrium that controls the interactions between vascular cells and proteins. Thrombin generation and clot formation are followed by restoration of vascular integrity and reperfusion. Microorganisms disturb the intricate control pathways and disrupt the balance by targeting both pro- and anticoagulation. The clinical presentation reflects this deregulation with microthrombi and organ failure on one hand, and the occurrence of diffuse bleeding in the other hand. In sepsis, microparticles released from activated cells (endothelial cells, platelets, and leukocytes) are another example of this duality. These microparticles are able to disseminate a prime procoagulant

phenotype but this might prove beneficial. Indeed, TF-bearing microparticles can support thrombin generation and transfer of functional TF to target cells, such as granulocytes and platelets. On the other hand, recombinant APC can reverse this effect, with EPCR-bearing microparticles able to disseminate a cytoprotective and anticoagulant message to target cells. The role of microparticles in fibrinolysis is the next challenging issue in our understanding of microparticles as vascular effectors in sepsis. Therapeutic interventions to control thrombin generation have been disappointing despite a good rationale for treatment. More precise comprehension of the mechanisms involved and the emerging role of microparticles as modulators of the pro/anticoagulation equilibrium could reveal novel therapeutic options.

References

1. Cohen Z, Gonzales RF, Davis-Gorman GF, Copeland JG, McDonagh PF (2005) Thrombin activity and platelet microparticle formation are increased in type 2 diabetic platelets: a potential correlation with caspase activation. *Thromb Res* 107: 217–221
2. Zwaal RF, Schroit AJ (1997) Pathophysiological implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* 89: 1121–1132
3. Hugel B, Martinez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM (2005) Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology (Bethesda)* 20: 22–27
4. Morel O, Morel N, Freyssinet JM, Toti F (2008) Platelet microparticles and vascular cells interactions: a checkpoint between the haemostatic and thrombotic responses. *Platelets* 19: 9–23
5. Mortaza S, Martinez MC, Baron-Menguy C, et al (2009) Detrimental hemodynamic and inflammatory effects of microparticles originating from septic rats. *Crit Care Med* 37: 2045–2050
6. Lane DA, Philippou H, Huntington JA (2005) Directing thrombin. *Blood* 106: 2605–2612
7. Key NS (2010) Analysis of tissue factor positive microparticles. *Thromb Res* 125: S42–45
8. Chou J, Mackman N, Merrill-Skoloff G, Pedersen B, Furie BC, Furie B (2004) Hematopoietic cell-derived microparticle tissue factor contributes to fibrin formation during thrombus propagation. *Blood* 104: 3190–3197
9. Egorina EM, Sovershaev MA, Olsen JO, Osterud B (2008) Granulocytes do not express but acquire monocyte-derived tissue factor in whole blood: evidence for a direct transfer. *Blood* 111: 1208–1216
10. Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, et al (2000) Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood* 95: 930–935
11. Orfeo T, Brummel-Ziedins KE, Gissel M, Butenas S, Mann KG (2008) The nature of the stable blood clot procoagulant activities. *J Biol Chem* 283: 9776–9786
12. Smith SA, Mutch NJ, Baskar D, Rohloff P, Docampo R, Morrissey JH (2006) Polyphosphate modulates blood coagulation and fibrinolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 903–908
13. Müller F, Mutch NJ, Schenk WA, et al (2009) Platelet polyphosphate are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo. *Cell* 139: 1143–1156
14. Satta N, Toti F, Feugeas O, et al (1994) Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. *J Immunol* 153: 3245–3255
15. Itakura Sumi Y, Ogura H, Tanaka H, et al (2003) Paradoxical cytoskeleton and microparticle formation changes in monocytes and polymorphonuclear leukocytes in severe systemic inflammatory response syndrome patients. *J Trauma* 55: 1125–1132
16. Pluskota E, Woody NM, Szpak D, et al (2008) Expression, activation, and function of integrin alphaMbeta2 (Mac-1) on neutrophil-derived microparticles. *Blood* 112: 2327–2335
17. Yun TH, Morrissey JH (2009) Polyphosphate and omptins: novel bacterial procoagulant agents. *J Cell Mol Med* 13: 4146–4153
18. Kastrup CJ, Boedicker JQ, Pomerantsev AP, et al (2008) Spatial localization of bacteria controls coagulation of human blood by 'quorum sensind'. *Nat Chem Biol* 4: 742–750

19. Chun MC, Popova TG, Jorgensen SC et al. (2008) Degradation of circulating von Willebrand factor and its regulator ADAMTS13 implicates secreted *Bacillus anthracis* metalloproteases in anthrax consumptive coagulopathy. *J Biol Chem* 283: 9531–9542
20. Degen JL, Bugge TH, Coguen JD (2007) Fibrin and fibrinolysis in infection and host defense. *J Thromb Haemost* 5(S1): 24–31
21. Haiko J, Laakkonen L, Juuti K, Kalkkinen K, Korhonen TK (2010) The omptins of *Yersinia pestis* and *Salmonella enterica* cleave the reactive center loop of plasminogen activator 1. *J Bacteriol* 192: 4553–4561
22. Rijken DC, Lijnen HR (2009) New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *J Thromb Haemost* 7: 4–13
23. Schouten M, Wiersinga WJ, Levi M, van der Poll T (2008) Inflammation, endothelium and coagulation in sepsis. *J Leukoc Biol* 83: 536–545
24. Massberg S, Gahl L, von Bruehl ML, et al (2010) Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med* 16: 887–897
25. Nayak RC, Sen P, Ghosh S, et al (2009) Endothelial cell protein C receptor cellular localization and trafficking: potential functional implications. *Blood* 114: 1974–1986
26. Perez-Casal M, Downey C, Fukudome K, Marx G, Toh CH (2005) Activated protein C induces the release of microparticle-associated endothelial protein C receptor. *Blood* 105: 1515–1522
27. Perez-Casal M, Downey C, Cutillas-Moreno B, Zuzel M, Fukudome K, Toh CH (2009) Microparticle-associated endothelial protein C receptor and the induction of cytoprotective and anti-inflammatory effects. *Haematologica* 94: 387–394
28. Bouchama A, Kunzelmann C, Debbi M, et al (2008) Recombinant activated protein C attenuates endothelial injury and inhibits procoagulant microparticles release in baboon heatstroke. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 1318–1325
29. Satta N, Freyssinet JM, Toti F (1997) The significance of human monocyte thrombomodulin during membrane vesiculation and after stimulation by lipopolysaccharide. *Br J Haematol* 96: 534–542
30. Lacroix R, Sabatier F, Mialhe A, et al (2007) Activation of plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles: a mechanism that modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells in vitro. *Blood* 110: 2432–2439
31. Dejouvencel T, Doeuve L, Lacroix R et al (2010) Fibrinolytic cross-talk: a new mechanism for plasmin formation. *Blood* 115: 2048–2056
32. Abraham E, Reinhart K, Opal S, et al (2003) Efficacy and safety of Tifacogin (recombinant tissue factor pathway inhibitor) in severe sepsis. *JAMA* 290: 238–247
33. Warren BL, Eid A, Singer P, et al (2001) High-dose antithrombin III in severe sepsis: a randomized control trial (KyberSept). *JAMA* 286: 1869–1878
34. Kienast J, Juers M, Wiedermann CJ, et al (2006) Treatment effects of high-dose antithrombin without concomitant heparin in patient with and without disseminated intravascular coagulopathy. *J Thromb Haemost* 4: 90–97
35. Dasgupta SK, Abdel-Monem H, Niravath P, et al (2009) Lactadherin and clearance of platelet-derived microvesicles. *Blood* 113: 1332–1339
36. Morel O, Chantrel F, Hugel B, et al (2001) High levels of circulating procoagulant microparticles in patients on hemodialysis. *Thromb Haemost* 71: 270 (abst)

Microparticles and infectious diseases

Xavier DELABRANCHE, Asaël BERGER, Julie BOISRAMÉ-HELMS, Ferhat MEZIANI

Médecine et Maladies Infectieuses 2012;42:335-43

General review

Microparticles and infectious diseases

Microparticules et maladies infectieuses

X. Delabranche^{a,b,c}, A. Berger^{a,b,d}, J. Boisramé-Helms^{a,d}, F. Meziani^{a,*,d}

^a Service de réanimation médicale, nouvel hôpital civil, hôpitaux universitaires de Strasbourg, 1, place de l'Hôpital, 67091 Strasbourg cedex, France

^b Institut d'immunologie et d'hématologie, faculté de médecine, université de Strasbourg, 67085 Strasbourg cedex, France

^c EA 3072, faculté de médecine, université de Strasbourg, 67085 Strasbourg cedex, France

^d Laboratoire de biophotonique et pharmacologie, UMR 7213 CNRS, faculté de pharmacie, université de Strasbourg, 67401 Illkirch-Graffenstaden cedex, France

Received 14 April 2012; received in revised form 16 April 2012; accepted 29 May 2012

Available online 4 July 2012

Abstract

Membrane shedding with microvesicle (MV) release after membrane budding due to cell stimulation is a highly conserved intercellular interplay. MV can be released by micro-organisms or by host cells in the course of infectious diseases. Host MVs are divided according to cell compartment origin in microparticles (MPs) from plasma membrane and exosomes from intracellular membranes. MPs are cell fragments resulting from plasma membrane reorganization characterized by phosphatidylserine (PhtdSer) content and parental cell antigens on membrane. The role of MPs in physiology and pathophysiology is not yet well elucidated; they are a pool of bioactive molecules able to transmit a pro-inflammatory message to neighboring or target cells. The first acknowledged function of MP was the dissemination of a procoagulant potential via PhtdSer and it is now obvious that MPs bear tissue factor (TF). Such MPs have been implicated in the coagulation disorders observed during sepsis and septic shock. MPs have been implicated in the regulation of vascular tone and cardiac dysfunction in experimental sepsis. Beside a non-specific role, pathogens such as *Neisseria meningitidis* and Ebola Virus can specifically activate blood coagulation after TF-bearing MPs release in the bloodstream with disseminated intravascular coagulopathy and *Purpura fulminans*. The role of MPs in host-pathogen interactions is also fundamental in Chagas disease, where MPs could allow immune evasion by inhibiting C3 convertase. During cerebral malaria, MPs play a complex role facilitating the activation of brain endothelium that contributes to amplify vascular obstruction by parasitized erythrocytes. Phagocytosis of HIV induced MPs expressing PhtdSer by monocytes/macrophages results in cellular infection and non-inflammatory response via up-regulation of TGF- β .
© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Microparticles; Microorganisms; Inflammation; Sepsis; Coagulopathy

Résumé

L'émission de microvésicules (MVs) après bourgeonnement membranaire consécutif à une stimulation cellulaire est un moyen de communication intercellulaire hautement conservé. Au cours des maladies infectieuses, les MVs peuvent avoir pour origine les micro-organismes ou les cellules de l'hôte ; ces dernières sont séparées en microparticules (MPs) issues de la membrane plasmique et en exosomes dérivant des membranes internes. Les MPs sont des fragments cellulaires caractérisés par un remaniement de la membrane plasmique avec externalisation de phosphatidylsérine (PhtdSer) et la présence de molécules de la cellule mère. Le rôle physiologique et physiopathologique des MPs commence à être entrevu, elles constituent un pool de molécules biologiquement actives, capables de transmettre un potentiel pro-inflammatoire à des cellules cibles. La première fonction reconnue des MPs a été la dissémination d'un potentiel procoagulant par l'intermédiaire de PhtdSer, mais aussi de la présence de facteur tissulaire (FT). Depuis, les MPs ont été impliquées dans la dysfonction cardiovasculaire au cours du sepsis et du choc septique. Les MPs porteuses de FT sont le support de la coagulation intravasculaire disséminée au cours des infections à *Neisseria meningitidis*, mais aussi de la fièvre hémorragique liée au virus Ebola. La maladie de Chagas se caractérise par une évasion immunitaire par inhibition de la C3 convertase par les MPs.

* Corresponding author.

E-mail address: ferhat.meziani@chru-strasbourg.fr (F. Meziani).

Au cours du neuropaludisme, les MPs jouent un rôle complexe en facilitant l'activation de l'endothélium des vaisseaux cérébraux, ce qui contribue à l'amplification de l'obstruction vasculaire par les hématies parasitées. Enfin, la phagocytose par les monocytes/macrophages de MPs induites par le VIH se traduit par une dissémination sans réponse inflammatoire par régulation positive du TGF- β .

© 2012 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Microparticules ; Microorganismes ; Inflammation ; Sepsis ; Coagulopathie

During the past century, the main progress was “communication” to connect people, from telegraph to Internet, from trains and transatlantic ships to individual cars and planes. But intercellular communication is also the major mechanism for survival, and the role of “microvesicles” is emerging along with direct cell-to-cell interaction and soluble messengers.

Microvesicles were first described in the 1960s by Wolf, as platelets derivatives less than 0.1 μm in size [1]. It now seems obvious that shedding of microvesicles (MVs), by cells, prokaryotes as well as eukaryotes, must be regarded as a major intercellular pathway. In this review, we focused on microparticles (MPs) shed by host cells in response to infectious agents, and their role in sepsis. But we must first introduce shedding as a ubiquitous phenomenon for life.

1. Microvesiculation: an overview

MVs are cellular fragments, less than 1 μm in diameter, surrounded by a lipid membrane and containing cytoplasmic components such as proteins or nucleic acids. They constitute a storage pool of bioactive messengers able to diffuse in fluids, disseminating information to other cells. MVs could be divided according to their origin (pathogen or host) and cellular compartment (external or internal) (Fig. 1).

Briefly, pathogenic MVs are 50–100 nm and have been isolated in fungi, protozoa, viruses and bacteria. They are involved in invasion and immunity evading. Bacterial outer membrane vesicles (OMV) are involved in LPS spreading during gram-negative bacteremia [2]. Host MVs have been closely studied and their role in physiology and pathophysiology is gradually being understood. MVs are called “exosomes” when vesiculation occurs in the cytoplasmic compartment, whereas when it occurs on the cell membrane after lipid exchange between inner and outer leaflet, they are called “microparticles” (MPs) [3]. Virus-like particles (VLP) are another confounding type of MVs shed from host plasma membrane after viral infection and lipid raft organization without lipid exchange [4]. In this review, we focus on the emerging role of MPs in host-pathogen interactions.

2. What are microparticles?

2.1. Membrane remodeling and microparticles characteristics

MPs are released from the budding plasma membrane of virtually every eukaryotic cell type after stimulation or apoptosis (Fig. 2). This phenomenon is called “ectocytosis” [5] and MPs are also known as “ectosomes”. Membrane phospholipid asymmetry is ubiquitous: sphingomyelin and phosphatidylcholine

(PhtdCho) are the main lipids of the outer leaflet whereas phosphatidylserine (PhtdSer) and phosphatidylethanolamine (PhtdEth) are located in the inner leaflet. The maintenance of this lipid asymmetry depends on adenosine triphosphate (ATP)-dependent transporters:

- an aminophospholipid translocase or flippase involved in PhtdSer and PhtdEth transport from the outer to inner leaflet of plasma membranes against the concentration gradient;
- a floppase, which regulates the differential transbilayer orientation of phospholipids and transports both aminophospholipids and cholinephospholipids from the inner to the outer leaflet. The combined action of translocase and floppase seems to prevent and correct alterations in lipid distribution, to avoid potentially pathological consequences;
- a scramblase which requires the constant presence of cytoplasmic calcium [6]. This activity is bidirectional, and all major classes move back and forth at comparable rates. Moreover, cytoskeleton proteins help maintain membrane phospholipid asymmetry by selectively interacting with aminophospholipids.

Membrane remodeling is a crucial event in cell response and is involved in apoptosis, hemostasis, and cell clearance. A significant and sustained increase of cytosolic Ca^{2+} due to cell stimulation may lead to the loss of membrane asymmetry by stimulating scramblase and floppase activities, and concomitantly inhibiting the flippase [7]. PhtdSer is then exposed on the outer leaflet of plasma membrane, with MP release after cytoskeleton degradation by Ca^{2+} -dependent proteolysis [8]. Moreover, the plasticity of plasma membrane lateral organization in raft domains provides a basis for the shedding of specific lipids and proteins within MPs, leading to a potential difference in the protein and lipid composition of MPs of a same cellular origin [9]. The increase of cytosolic calcium may induce the formation of temporary pores. Moreover, sphingomyelin hydrolysis by sphingomyelinase occurs, allowing ceramide concentrations to reach a threshold enabling a mismatch between the two membrane leaflets, and the creation of invagination [3].

MPs bear the phenotypic characteristics of the original cell on their surface. Phenotyping MPs reveals their antigenic contents and may help determine their cellular origin. Furthermore, the MPs wall includes many receptors and adhesion molecules, which enable specific interaction crosstalk with target cells. MPs also contain various cytokines, enzymes, mRNA, and part of DNA. They can transfer receptors, organelles, and other proteins to target cells, and also include a secretion pathway for several cytokines. The multiple properties of MPs could play

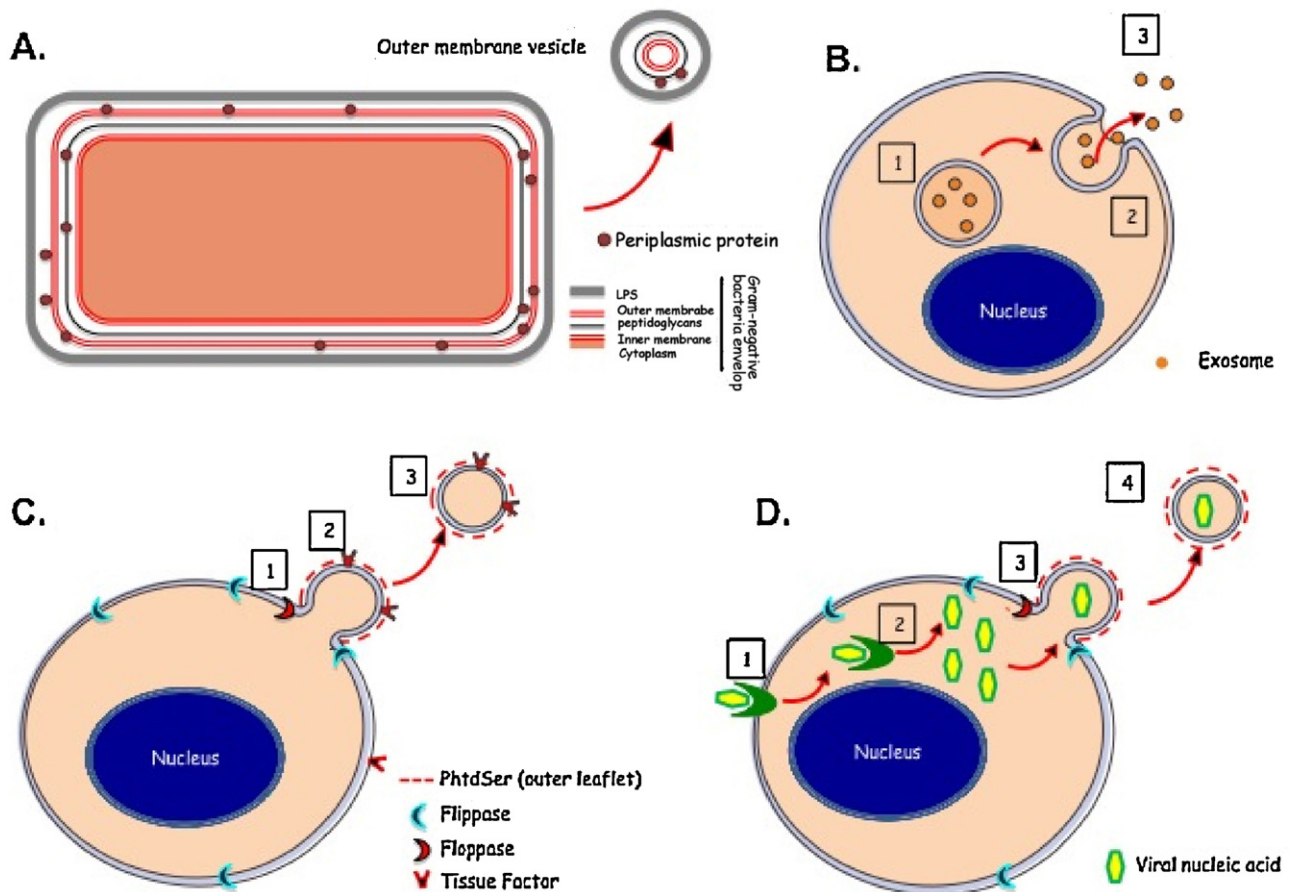


Fig. 1. Shedding from prokaryotes and eukaryotes: different types of microvesicles. A. Gram-negative bacteria feature the lipopolysaccharide (LPS) anchored in the outer bilayer membrane, peptidoglycans, and an inner bilayer membrane. Outer membrane vesicles (OMV) disseminate the LPS bound to the outer membrane, with periplasmic proteins, curvature inducing proteins, and plasmids. B. Exosomes from eukaryote cells are derived from (1) inner vesicles enclosed in endosomes or multivesicular bodies. (2) Vesicles fuse with plasma membrane, and (3) exosome content is released in the extracellular medium. C. Eukaryotes cell plasma membrane remodeling allows membrane budding and shedding of microparticles (MPs). (1) Floppase activation allows phosphatidylserine (PtdSer) to be externalized with (2) cytoskeleton contraction and budding. (3) MP contains cytoplasmic components (RNA, proteins, etc.) and expresses PtdSer and parental antigens on membrane, constituting a storage pool of bioactive effectors such as Tissue Factor. D. (1) The virus interacts with eukaryote cells via membrane receptors, and (2) replicates in the host cell using its machinery to synthesize viral components. (3) Viral particles may induce host cell apoptosis with plasma membrane remodeling as seen in C. (4) Resulting (micro)-particle expresses PtdSer, contain viral nucleic acid, and may disseminate to neighboring cells with increased infectivity and immune response evasion.

A. Les bactéries gram-négatives présentent sur leur enveloppe le lipopolysaccharide (LPS) accroché sur une première membrane lipidique (bicouche) du peptidoglycane puis la membrane interne. Les vésicules de la membrane externe (OMV) disséminent le LPS fixé sur les OMV avec des protéines périplasmiques incluant des protéines et des plasmides au sein de ces particules. B. Les exosomes des cellules eucaryotes résultent de vésicules internes (1) incluses dans des endosomes ou des corps multivesiculaires. (2) Ces vésicules fusionnent avec la membrane plasmique après migration intracellulaire et (3) les exosomes contenus sont relargués dans l'espace extracellulaire. C. Le remodelage de la membrane plasmique des cellules eucaryotes conduit au bourgeonnement et à la vésiculation des microparticules. (1) L'activation de la floppase externalise la phosphatidylsérine associée à la contraction du cytosquelette (2) cela conduit au bourgeonnement membranaire. (3) Les microparticules contiennent des composants cytoplasmiques (ARN, protéines, etc.) et expriment à leur surface de la phosphatidylsérine et des antigènes membranaires de la cellule d'origine (comme le facteur tissulaire) constituant ainsi un pool de molécules biologiquement actives. D. Les virus interagissent avec les cellules eucaryotes par des récepteurs membranaires et (2) se répliquent dans les cellules hôtes en utilisant sa machinerie cellulaire de l'hôte pour la synthèse des composants viraux. (3) Les particules virales peuvent induire l'apoptose de la cellule hôte avec remodelage de la membrane plasmique comme en C. (4) Les (micro)-particules qui en résulte expriment PtdSer, contiennent de l'acide nucléique viral et peuvent disséminer aux cellules voisines avec augmentation de la charge virale mais aussi contourner la réponse immunitaire.

a major role in propagating proinflammatory and procoagulant states in sepsis but also have a cytoprotective effect [10].

MPs are highly characterized by PtdSer content and this aminophospholipid plays a major role in physiology and pathophysiology [11]. Beside the assembly of vitamin K-dependent coagulation factors allowing thrombin generation and coagulation, PtdSer has been involved in clearance of apoptotic cells and in inflammatory response modulation. Externalization

of PtdSer is a common feature of apoptotic cells and elements resulting from apoptotic cell fragmentation, and MPs [3]. PtdSer appears to be a major “eat-me” signal allowing phagocytosis after direct recognition or in combination with adaptors such as milk fat globule protein MFG-E8 (also called lactadherin), growth arrest-specific gene product GAS-6 (a vitamin K-dependent protein analogue to protein S acting as a ligand for MerTK), β_2 -glycoprotein-1, and C-reactive protein

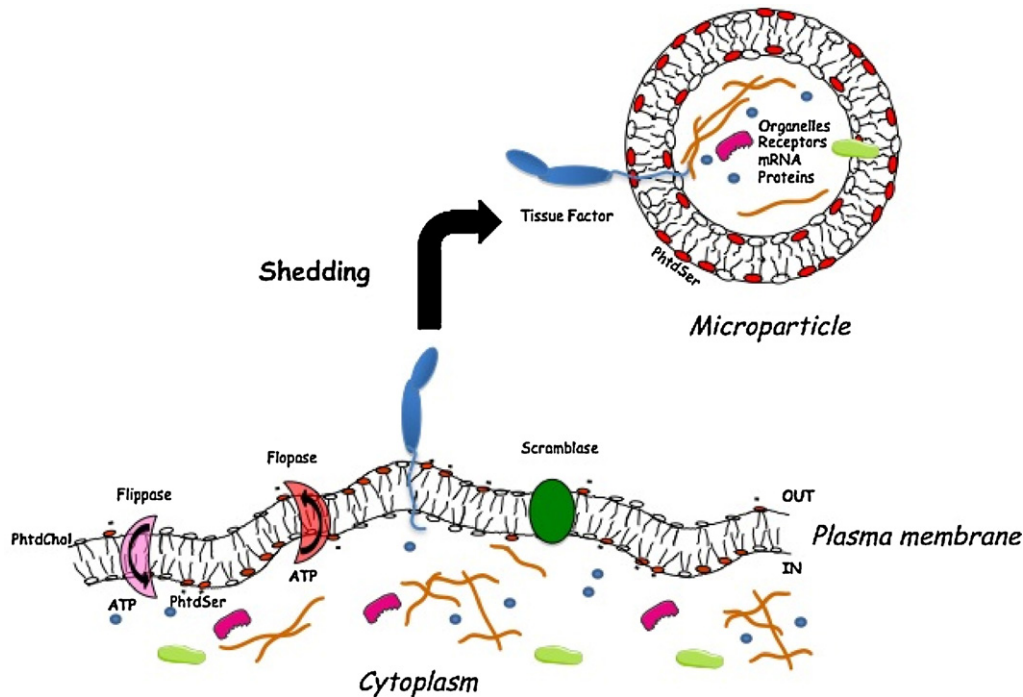


Fig. 2. Microparticle: an overview. In resting cells, phosphatidylcholine (PtdChol, white circles) is the major outer leaflet component while negatively charged phosphatidylserine (PtdSer, red circles) is found in the inner leaflet; this asymmetry is maintained by flippase, an ATP-dependent aminophospholipid translocase. After cell stimulation, ATP-dependent floppase disrupts the asymmetry resulting in externalization of PtdSer and budding; then cytoskeleton contraction is necessary for shedding. Resulting microparticles express PtdSer in the outer leaflet (allowing coagulation proteases assembly) and parental cell proteins; inside, the cytoplasmic content includes proteins, RNA, organelles.

Pour les cellules non activées, la phosphatidylcholine (PtdChol, cercles blancs) est le composant majeur de la couche externe de membrane phospholipidique, tandis que la phosphatidylsérine (PtdSer, cercles rouges) chargée négativement est à la face interne de cette bicouche membranaire. Cette asymétrie est maintenue par la flippase qui est une aminophospholipide-translocase ATP-dépendant. Après stimulation cellulaire, la floppase ATP-dépendant modifie cette asymétrie avec externalisation de la PtdSer; le bourgeonnement et la contraction du cytosquelette sont alors nécessaires pour la vésiculation. Les microparticules qui en résultent expriment PtdSer sur la membrane externe (permettant un assemblage des protéases de la coagulation) et des protéines de la cellule parentale; le contenu cytoplasmique est composé de protéines, ARN et organelles.

[12–14]. PtdSer is able to induce a non-inflammatory response in phagocytes with down-regulation of TNF- α and up-regulation of TGF- β [15]. Stabilin-2 or hepatic hyaluronan receptor is a potent PtdSer scavenger when acidosis is present; it may have an important role during inflammatory response [16]. MPs survive longer than their parental cell, probably because of the high concentration of MPs present in plasma, exceeding the clearance capacity, and because their size does not allow optimal cellular phagocytosis. Lactadherin is a macrophage opsonin implicated in MP clearance [17]; experimental studies on knockout lactadherin mice confirmed increased levels of circulating platelet MPs, while lactadherin supplementation restored a normal clearance of MPs. The role of secretory phospholipase A₂ (sPLA₂) in MP hydrolysis has also been suggested. Nevertheless, clearance of MP in vivo remains controversial.

2.2. How can microparticle be detected, analyzed, or quantified?

MPs could be viewed as artifacts, generated during blood sample process. The absence of definitive guidelines for sample processing remains the limitation of many clinical or experimental studies. Recommendations are available regarding blood sampling (citrate and rapid double centrifugation to eliminate

cells), isolation (12,000 g during 45 minutes twice), and conservation (-20°C for a few days or -76° for longer periods). Quantification and phenotyping may be performed by flow cytometry using specific fluorescent antibodies and calibration beads, functional prothrombinase assay (with PtdSer as the limiting factor) after capture of MPs on annexin-5 (total) or specific antibodies, or even by protein content determination. Electron microscopy, eventually of fresh frozen samples, may be used to view MPs in relation with neighboring cells. Nevertheless, MPs analyses should be interpreted with caution, taking into account the pitfalls of each method, and the purpose of the experiment or clinical investigations [18].

3. Pathogens and hemostasis: microparticle has a major role

Hemostasis activation occurs during sepsis with two effects:

- limiting bacteria growth and dissemination;
- and platelet and fibrin-rich clot deposition in microvasculature with subsequent ischemia.

This activation may be first considered as a primary line of host defence such as innate immunity and complement

activation. Understanding the pathophysiology of hemostasis is important to assess its crucial role in infectious diseases and during severe sepsis and septic shock.

Blood coagulation is initiated by endothelial cell damage resulting in tissue factor (TF) exposure by subendothelial smooth muscle cells, and secondary expression on endothelial cells, with externalization of a negatively-charged phospholipid, PhtdSer allowing cascade of blood coagulation factors. In the same time, platelet aggregation occurs via matrix collagen exposure and ultra large von Willebrand factor polymer (ULvWF) secretion from endothelial cell Weibel-Palade bodies. Thrombin is generated at the site of cell damage, with platelet activation and fibrin deposition, while inhibitory mechanisms are initiated: tissue factor inhibition by TFPI (tissue factor pathway inhibitor), factor (F) Va degradation by activated protein C with protein S as cofactor, and inhibition of thrombin by antithrombin linked to glycosaminoglycans of neighboring endothelial cells [19]. Secondary fibrinolysis occurs after plasminogen activation by t-PA (Fig. 3A).

Hemostasis activation differs greatly when targeted by pathogens. The main sources of TF are not only vascular smooth muscle and endothelial cells, but also circulating monocytes and MPs-borne TF (whereas soluble TF without phospholipids is not able to initiate FVII (auto)-activation). Circulating MPs-borne TF allows a multifocal rather than disseminated initiation of thrombin generation [20]. Moreover, MPs can deliver and transfer TF to target cells (neutrophils and platelets) amplifying activated cell surface exposition of concomitant TF and PhtdSer [21]. MPs-borne TF has been implicated in *Purpura fulminans* during meningococemia and could act as the main initiator of disseminating intravascular coagulopathy [22]. Nevertheless, fibrin formation and deposition require massive thrombin generation independent from TF. This thrombin generation is mainly located on activated platelets where FIIa (thrombin) cleaves platelet FXI linked to GPIIb α . Resulting FXIa becomes the major activator of thrombin generation with assembly of tenase (FIXa-FVIIIa) and prothrombinase (FXa-FVa) complexes on activated platelet surface. Circulating GPIIb α -MPs have been found after platelet activation, and could be considered as another additional surface for blood coagulation (Fig. 3B). Moreover, the contact phase seems to be implicated in thrombin generation during the infectious disease. FXII can be activated by kallikrein linked to GPI-anchored u-PA receptor (uPAR) on endothelial cells, and also by polyphosphates (PolyP) containing 100 to 200 inorganic phosphate residues and disseminated in bloodstream by lysed bacteria. PolyP (75 to 100 residues) contained in platelets and secreted during activation are less potent to activate FXII [23]. MP bearing uPAR have been found in plasma, responsible for fibrinolytic activity. They may also be a way for FXIIa to disseminate after pathogen invasion. Pathogens can interact directly with host hemostasis, not only to evade host defense, but also to invade it.

However MPs do not have only a deleterious effect. Hemostasis activation is necessary for host defense and only a deregulation with excessive thrombin generation could induce organ dysfunction. MPs are essential to recruit target cells (platelets, monocytes, neutrophils) (Fig. 3B) by disseminating

a procoagulant potential (via TF or GPIIb α with FVIIa and FXIa generation respectively). MPs could also be involved in hemostasis regulation and fibrinolysis. MPs from monocytes and endothelial cell could bear thrombomodulin (required for activation of protein C by thrombin) and EPCR, the specific receptor for protein C [24]. Thereafter, generation of activated protein C could occur on MPs and send a cytoprotective message (anti-coagulant and anti-apoptotic) to target cells via PAR-1 activation. Drotrecogin alfa activated (DAA) or recombinant human activated protein C (Xigris[®], Eli Lilly Inc.) was approved in the treatment of septic shock up to August 2011. DAA induced shedding from endothelial cells, and MPs bore activated protein C bound to EPCR [25,26].

4. Microparticles and vascular tone

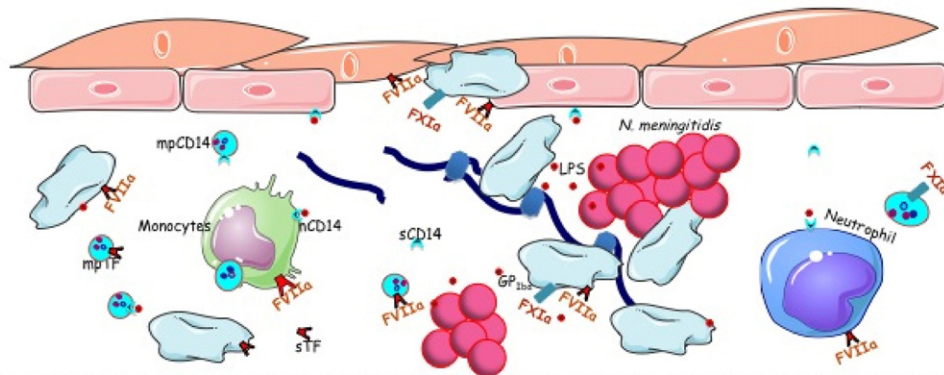
Severe sepsis is characterized by a systemic inflammatory response syndrome associated with hypotension. Septic shock, the more severe form of infection, is defined by severe sepsis with persistent hypotension despite fluid loading and use of vasopressor.

Reactive oxygen species (ROS) overproduced during septic shock could alter both endothelial and circulating cell functions. Activated platelets shed numerous MP (PMPs) not only bearing procoagulant and pro-inflammatory molecules but also superoxide anion able to induce oxidative stress to target cells (endothelial and smooth muscle cells) [27]. PMPs seem to be involved in vascular tone dysfunction. Moreover, MPs can bear NADPH oxidase activity involved in oxidative stress [28]. In experimental studies, reactive nitrogen species (RNS) have also been observed in MPs and could modulate the nitric oxide pathway in smooth muscle cells, with impaired response to vasoconstrictors not requiring inducible NO synthase [29]. The role of MPs in this vascular dysfunction was obvious in many experimental studies. Mortaza et al. were able to induce hypotension in naive rats after challenge by pooled MPs from septic rats (following cecal ligation and puncture) whereas MPs from control rats had no effect on blood pressure [30]. MPs could be derived from platelets, monocytes, leucocytes, or endothelial cells. Platelet-derived MPs could promote monocytes-endothelial cells interactions but also deliver RANTES to inflamed endothelium recruiting leucocytes allowing diapedesis. IL-1 β is produced by monocytes and released embedded in MPs soon after LPS challenge. Moreover, MPs have been reported to modulate vascular tone and cardiac contractility, at least in isolated hearts. These MPs are not related to a specific pathogen but to the inflammatory host response and may contribute to disseminate pro-inflammatory stimuli.

5. Role of microparticles in specific infectious diseases

MPs have been found during sepsis whatever the causative pathogen. These MPs are shed in response to various stimuli such as LPS, induced-chemokines, or cytokines. Nevertheless, specific MPs have been characterized in the course of some infectious diseases, enhancing their pathophysiological role in host-pathogen interactions. We reviewed five diseases with a

A. Pathogen-induced haemostasis



B. Endothelial injury-induced haemostasis

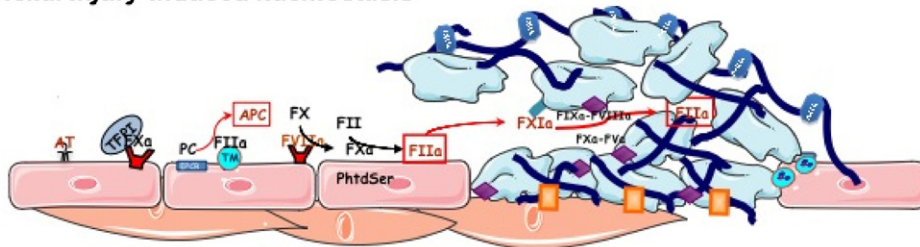


Fig. 3. Physiological hemostasis and pathogen-induced coagulopathy. A. Pathogen-induced hemostasis differs greatly from normal hemostasis. The lipopolysaccharide (LPS) activates endothelial cells and monocytes after binding to its sensor CD14/MD-2/TLR4 complex. TF is up regulated and PtdSer externalization occurs allowing coagulation factors assembly. Microparticles are generated from activated monocytes, platelets, and endothelial cells bearing not only TF but also GPIIb α with dissemination of a procoagulant stimulus. TF+MPs can transfer functional TF to target cells such as platelets and neutrophils, increasing surface assembly for blood coagulation. B. Physiological hemostasis. Endothelial cell lesion initiates (normal) hemostasis when sub-endothelial collagen is exposed. Platelets are activated by collagen and ultra-large von Willebrand factor (ULvWF) with subsequent GPIIb/IIIa (α IIb β 3) activation allowing fibrinogen to bridge activated platelets. TF is de-encrypted by endothelial cell aggression and expressed by smooth muscle cells. When floppase is activated with PtdSer externalization it allows coagulation factors to assemble on the cell surface. In a first stage (initiation), thrombin (FIIa) is generated, with subsequent cofactor FV and FVIII activation (in FVa and FVIIIa respectively), and FXI induces platelet GPIIb α activation. Thereafter, thrombin generation occurs on activated platelet with fibrinogen conversion to soluble fibrin, whereas FXIII is activated by FIIa, allowing soluble fibrin monomers to polymerize. Fibrin mesh includes activated platelets and erythrocytes (not shown) to form the clot. Non-aggressed neighboring cells participate in the regulation: inhibition of TF by TFPI-FXa, generation of activated protein C (APC) by thrombomodulin-FIIa, and inhibition of free thrombin by antithrombin linked to glycocalyx.

A. La réponse hémostatique induite par les pathogènes diffère grandement de l'hémostase normale. Le lipopolysaccharide (LPS) active les cellules endothéliales et les monocytes après liaison au complexe CD14/MD-2/TLR4. Le gène du facteur tissulaire (TF) est sur-exprimé et l'externalisation de PtdSer conduit à l'assemblage de facteurs de la coagulation à la surface des cellules lésées. Les microparticules sont produites à partir des monocytes activés, des plaquettes et des cellules endothéliales comportant TF mais aussi GPIIb α avec dissémination du stimulus pro-coagulant. Les microparticules TF+ peuvent transférer du facteur tissulaire fonctionnel aux cellules cibles comme les plaquettes et les granulocytes neutrophiles augmentant la surface disponible pour la coagulation sanguine. B. Hémostase physiologique. L'initiation de l'hémostase normale est une lésion de la cellule endothéliale avec l'exposition du collagène sous-endothélial. Les plaquettes sont activées par le collagène et le facteur von Willebrand de haut poids moléculaire (ULvWF) avec l'activation du GPIIb/IIIa (α IIb β 3), le fibrinogène faisant le liant entre les plaquettes activées. Le facteur tissulaire est dé-encrypté par l'agression des cellules endothéliales et est exprimé par les cellules musculaires lisses. Quand la floppase est activée avec l'externalisation de PtdSer, cela forme une association de facteurs de la coagulation à la surface cellulaire. Lors de l'initiation, de la thrombine est générée (FIIa), avec comme corollaire l'activation des co-facteurs FV et FVIII (en FVa et FVIIIa respectivement) et la liaison du FXI induit l'activation du GPIIb α plaquettaire. Ainsi la génération de thrombine se produit à la surface plaquettaire avec la conversion du fibrinogène en fibrine soluble tandis que FXIII est activé par FIIa permettant la polymérisation des monomères de fibrine. Les mailles de fibrine incluent des plaquettes activées et des érythrocytes pour former le clou plaquettaire. Les cellules voisines qui ne sont pas agressées participent à la régulation de la coagulation : inhibition du TF par TFPI-FXa, génération de protéine C activée (APC) par le complexe thrombomoduline-FIIa (inhibant FVa) et l'inhibition de la thrombine libre par l'antithrombine liée au glycocalyx.

recently documented role of MPs; meningococemia and Ebola hemorrhagic fever in which TF-bearing MPs are involved in disseminated intravascular coagulopathy, Chagas disease in which MPs seem to allow evading immunity, malaria, and HIV infection.

5.1. Meningococemia

Neisseria meningitidis is a commensal gram-negative bacteria located in the throat in nearly one-third of humans. Eventually, the bacteria can invade tonsils and therefore be

responsible for a systemic infection, meningococemia. The most severe clinical presentation is *P. fulminans* with co-existing thrombotic and hemorrhagic manifestations, extensive limb skin necrosis, acute renal failure, coma, and defibrination with uncontrolled oozing from venipuncture sites and mucosal hemorrhage. The biological features of disseminated intravascular coagulopathy are always present, with rapid and severe depletion in antithrombin and protein C with low thrombomodulin expression on endothelial cells of skin biopsies. Nieuwland et al. demonstrated the role of TF-bearing MPs derived from monocytes in the pathophysiology of coagulopathy (Figure 3B)

[22]. These results were confirmed and elucidated recently by Øvstebø et al. using wild-type *N. meningitidis* (wt-Nm), LPS-deficient *N. meningitidis* (lps⁻-Nm), and purified *N. meningitidis* LPS (LPS-Nm) (without phospholipids). TF-expression on monocytes was not different according to the stimulus, whereas TF-activity was greatly reduced by both LPS-Nm and lps⁻-Nm; moreover, TF-MPs shedding was also decreased, resulting in a reduced pro-coagulant activity. Both TF expression and PhtdSer externalization are required for TF-activity on monocytes (and on MPs). IL-10, an anti-inflammatory cytokine, reduces TF-expression on monocytes and TF-MPs shedding after LPS challenge. The authors confirmed a decreased in TF-activity and PhtdSer on both monocytes and MPs when using recombinant IL-10, whereas TF-expression was slightly reduced [31].

5.2. Ebola hemorrhagic fever

Ebola virus (EBOV) belongs to the filoviridae family, like the *Marburg virus* (MARV); it is an enveloped, non-segmented, negative-strand RNA virus. The natural reservoir has not been clearly identified, but bats are suspected hosts. Human contaminations occur after contact with infected animals, monkeys or more recently pigs. These infections occur as outbreaks almost always in Africa; after a 4- to 10-day incubation period, the disease symptoms are chills, fever, malaise, and myalgia. The systemic symptoms are gastrointestinal, neurological, respiratory involvement, and shock as in bacterial septic shock. The main characteristic is hemostatic symptoms with *P. fulminans*-like thrombotic and hemorrhagic manifestations. Signs of disseminated intravascular coagulopathy are present (thrombocytopenia, coagulation factors consumption, early protein C level sharp fall, and elevated D-dimers) [32]. The overexpression of TF from monocytes/macrophages is the primary event, with TF-bearing MPs production in a non-human primate model of EBOV infection [33]. No specific treatment is available and supportive therapy is mandatory. Anticoagulant therapy by recombinant activated protein C (rhAPC, DAA), but also by recombinant nematode anticoagulant protein c2 (rNAPc2) and TFPI were effective to prevent death in macaques, in experimental infection [34].

5.3. Chagas disease

Chagas disease is due to *Trypanosoma cruzi* infection. This parasite evades the innate host defense and MPs are involved in this evasion via a specific mechanism, unique at this time. Trypomastigotes enter host cells, soon after transmission by insect, where they differentiate in amastigotes and secondarily in trypomastigotes, before disrupting host cells to infect other cells or be ingested by an insect vector. Complement activation can occur by usual or by lectin pathways on infected cells. Both pathways result in C3-convertase (C4b2a) assembly. C3-convertase hydrolyzes C3 in C3b which cleaves C5 in C5b whereas C3a and C5a are anaphylotoxins implicated in leukocyte recruitment. C5b with C6, C7, C8 and C9 together form a pore in plasma membrane also known as membrane attack

complex (MAC). Cestari et al. [35] observed a release of MPs from infected cells into the bloodstream. These MPs are able to bind C3 convertase (C4b2a) assembled on *T. cruzi*, inhibiting C3 activation and MAC assembly. Factor H, a key regulator of the alternative pathway, is able to bind to sialic acid and therefore inactivate C3 (iC3b). All this data suggests that *T. cruzi* can evade innate immunity, preventing both complement-induced lysis and neutrophil granulocyte recruitment by anaphylotoxins C3a and C5a. Moreover, released MPs carry TGF- β , a cytokine implicated in *T. cruzi* infectivity of epithelial cells and cardiomyocytes with acute and chronic fibrosis. The facilitating role of TGF- β -MPs was proved in a murine model of Chagas disease. MPs allow increased parasitemia when injected simultaneously with *T. cruzi* [35].

5.4. Cerebral malaria

Malaria is a very common disease due to *Plasmodium* sp. parasites and transmitted to humans by a mosquito during its blood meal. Malaria is characterized by recurrent fever, hemolytic anemia, and thrombocytopenia; severe presentations of *P. falciparum* infection could lead to cerebral malaria and death. These clinical presentations associate severe thrombocytopenia, acute renal failure, and coma without schizocytosis. Nevertheless, there are specific features such as the absence of endothelial cell activation, and a relatively low level of fibrinolysis with low D-dimers, despite fibrin deposit in capillaries, reflecting a partial activation of hemostasis [36,37]. Shedding of GPIIb α is well characterized but does not seem to be implicated in thrombocytopenia [38]. ULvWF are also found in patients' plasma and ADAMTS13 (ULvWF protease) activity is decreased independently from usual inhibitors such as free hemoglobin, FVIII, IL-6, or thrombospondin-1 [39,40].

Microparticles have been found during malaria and particularly in cerebral malaria. MPs originate from platelets, erythrocytes, endothelial cells, and monocytes; they have various roles in the pathophysiology of cerebral malaria. The lack of ABCA1, a lipid transporter implicated in MPs shedding in transgenic mice, protects from severe malaria with lower MP levels in plasma [41]. Platelet MPs (PMPs) can interact specifically with parasitized red blood cells (PRBCs) and deliver platelet antigens to PRBCs increasing their ability to bind to brain endothelial cells. Moreover, PMPs can also transfer antigens to brain endothelial cells changing their phenotype. These phenomena may contribute to amplify vascular obstruction by PRBCs observed during cerebral malaria [42]. Both PRBCs and non infected cells can generate MPs but to a lesser extent; shedding of MPs from non infected cells is regulated by heme products released by PRBCs during schizonte rupture and can be partially reversed by anti-oxidant *N*-acetyl cysteine [43]. MPs from infected mice could also activate monocytes/macrophages in vitro with CD40 and TNF α overproduction [44]. Another feature is the role of platelet factor 4 (PF4/CXCL4) in the development of both vascular occlusion and inflammation after direct activation of platelets by infected erythrocytes [45].

5.5. HIV infection

Human immunodeficiency virus (HIV) is a retrovirus able to evade inflammatory response. HIV induces cell apoptosis with PtdSer externalization after cell endocytosis. The resulting viral particles express PtdSer and look both like virion and MPs (Fig. 1D) [46]. Phagocytosis by monocytes/macrophages results in cellular infection and non-inflammatory response via up-regulation of TGF- β [47]. Moreover, annexin-A5, a potent inhibitor of PtdSer, is able to dramatically reduce HIV (micro-) particle uptake by macrophages with reduced infectivity [48]. Nef or negative factor of HIV-1 is an accessory protein associated with viral persistence, infectivity, and disease pathogenesis. Nef is released by HIV-infected cells on microvesicles (mvNef) also bear CD45, but these particles do not contain retroviral material and are distinct from virions. The authors of a clinical study reported that mvNef was present despite HAART (highly active antiretroviral therapy) and seemed to induce apoptosis in target cells in vitro (T-lymphocytes but not monocytes) [49].

An increased risk for thrombosis and atherosclerosis with myocardial infarction was observed during HIV infection, even with HAART. The authors of a recent study reported that HIV patients presented an increased activation of platelet MPs expressing P-selectin and/or tissue factor. TF-PMPs were correlated with TF expression on monocytes and soluble CD14 (a marker of LPS-induced monocyte activation) but not with HIV plasma level or CD4 count [50].

6. Conclusion

Membrane budding and (micro)-vesicle shedding may be considered as a highly conserved cell-to-cell interplay mechanism. Both microorganism and host shed MVs in the course of infectious diseases. Microparticles are MVs derived from the plasma membrane of host cells after lipid remodeling characterized by PtdSer externalization. MPs constitute a pool of bioactive messengers and play a role in the pathophysiology of sepsis and septic shock. MPs are able to induce hypotension, cardiac hypocontractility, and to disseminate tissue factor. Beside these non-specific roles, MPs could be implicated in the specific pathogenicity of some infectious diseases. We mentioned several typical implications of MPs in five infectious diseases: dissemination of a procoagulant phenotype by TF-MPs with thrombotic/hemorrhagic clinical settings during meningococemia and Ebola hemorrhagic fever; evading immunity in Chagas disease; and the role of MPs in cerebral malaria with vascular occlusion and non-inflammatory response after HIV dissemination by infected-cell MPs.

Disclosure of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest concerning this article.

References

- [1] Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol* 1967;13:269–88.
- [2] Kulp A, Kuehn MJ. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu Rev Microbiol* 2010;64:163–84.
- [3] Hugel B, Martinez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM. Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology (Bethesda)* 2005;20:22–7.
- [4] Kueng HJ, Schmetterer KG, Pickl WF. Lipid rafts, pseudotyping, and virus-like particles: relevance of a novel, configurable, and modular antigen-presenting platform. *Int Arch Allergy Immunol* 2011;154:89–110.
- [5] Zwaal RF, Schroit AJ. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* 1997;89:1121–32.
- [6] Morel O, Jesel L, Freyssinet JM, Toti F. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:15–26.
- [7] Henseleit U, Plasa G, Haest C. Effects of divalent cations on lipid flip-flop in the human erythrocyte membrane. *Biochim Biophys Acta* 1990;2:127–35.
- [8] Cauwenberghs S, Feijge MA, Harper AG, Sage SO, Curvers J, Heemskerk JW. Shedding of procoagulant microparticles from unstimulated platelets by integrin-mediated destabilization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett* 2006;580:5313–20.
- [9] Michel V, Bakovic M. Lipid rafts in health and disease. *Biol Cell* 2007;99:129–40.
- [10] Meziari F, Delabranche X, Asfar P, Toti F. Bench-to bedside review: circulating microparticles—a new player in sepsis? *Crit Care* 2010;14:236.
- [11] Frey B, Gaipf US. The immune functions of phosphatidylserine in membranes of dying cells and microvesicles. *Semin Immunopathol* 2011;33:497–516.
- [12] Yoshida H, Kawane K, Koike M, Mori Y, Uchiyama Y, Nagata S. Phosphatidylserine-dependent engulfment by macrophages of nuclei from erythroid precursor cells. *Nature* 2005;437:754–8.
- [13] Hanayama R, Tanaka M, Miwa K, Shinohara A, Iwamatsu A, Nagata S. Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* 2002;417:182–7.
- [14] Ishimoto Y, Ohashi K, Mizuno K, Nakano T. Promotion of the uptake of PS liposomes and apoptotic cells by a product of growth arrest-specific gene, gas6. *J Biochem* 2000;127:411–7.
- [15] Lucas M, Stuart LM, Zhang A, Hodivala-Dilke K, Febbraio M, Silverstein R, et al. Requirements for apoptotic cell contact in regulation of macrophage responses. *J Immunol* 2006;177:4047–54.
- [16] Kim S, Bae DJ, Hong M, Park SY, Kim IS. The conserved histidine in epidermal growth factor-like domains of stabilin-2 modulates pH-dependent recognition of phosphatidylserine in apoptotic cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2010;42:1154–63.
- [17] Dasgupta SK, Abdel-Monem H, Niravath P, Le A, Bellera RV, Langlois K, et al. Lactadherin and clearance of platelet-derived microvesicles. *Blood* 2009;113:1332–9.
- [18] Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ, Ahn YS, Biro E, Nieuwland R, et al. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* 2004;2:1842–51.
- [19] Lane DA, Philippou H, Huntington JA. Directing thrombin. *Blood* 2005;106:2605–12.
- [20] Satta N, Toti F, Feugeas O, Bohbot A, Dachary-Prigent J, Eschwege V, et al. Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. *J Immunol* 1994;153:3245–55.
- [21] Egorina EM, Sovershaev MA, Olsen JO, Osterud B. Granulocytes do not express but acquire monocyte-derived tissue factor in whole blood: evidence for a direct transfer. *Blood* 2008;111:1208–16.
- [22] Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, Boing AN, Romijn FP, Westendorp RG, et al. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood* 2000;95:930–5.
- [23] Yun TH, Morrissey JH. Polyphosphate and omptins: novel bacterial procoagulant agents. *J Cell Mol Med* 2009;13:4146–53.
- [24] Satta N, Freyssinet JM, Toti F. The significance of human monocyte thrombomodulin during membrane vesiculation and after stimulation by lipopolysaccharide. *Br J Haematol* 1997;96:534–42.

- [25] Perez-Casal M, Downey C, Fukudome K, Marx G, Toh CH. Activated protein C induces the release of microparticle-associated endothelial protein C receptor. *Blood* 2005;105:1515–22.
- [26] Perez-Casal M, Thompson V, Downey C, Welters I, Wyncoll D, Thachil J, et al. The clinical and functional relevance of microparticles induced by activated protein C treatment in sepsis. *Crit Care* 2011;15.
- [27] Soriano AO, Jy W, Chirinos JA, Valdivia MA, Velasquez HS, Jimenez JJ, et al. Levels of endothelial and platelet microparticles and their interactions with leukocytes negatively correlate with organ dysfunction and predict mortality in severe sepsis. *Crit Care Med* 2005;33:2540–6.
- [28] Janiszewski M, Do Carmo AO, Pedro MA, Silva E, Knobel E, Laurindo FR. Platelet-derived exosomes of septic individuals possess proapoptotic NAD(P)H oxidase activity: a novel vascular redox pathway. *Crit Care Med* 2004;32:818–25.
- [29] Boulanger CM, Scoazec A, Ebrahimian T, Henry P, Mathieu E, Tedgui A, et al. Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. *Circulation* 2001;104:2649–52.
- [30] Mortaza S, Martinez MC, Baron-Menguy C, Burban M, de la Bourdonnaye M, Fizanne L, et al. Detrimental hemodynamic and inflammatory effects of microparticles originating from septic rats. *Crit Care Med* 2009;37:2045–50.
- [31] Ovstebo R, Dalsbotten Aass HC, Haug KB, Siebke Troseid AM, Gopinathan U, Kierulf P, et al. LPS from *Neisseria meningitidis* is crucial for inducing monocyte- and microparticle-associated tissue factor activity but not for tissue factor expression. *Innate Immun* 2011, <http://dx.doi.org/10.1177/1753425911428230>.
- [32] Feldmann H, Geisbert TW. Ebola haemorrhagic fever. *Lancet* 2011;377:849–62.
- [33] Geisbert TW, Young HA, Jahrling PB, Davis KJ, Kagan E, Hensley LE. Mechanisms underlying coagulation abnormalities in ebola hemorrhagic fever: overexpression of tissue factor in primate monocytes/macrophages is a key event. *J Infect Dis* 2003;188:1618–29.
- [34] Hensley LE, Stevens EL, Yan SB, Geisbert JB, Macias WL, Larsen T, et al. Recombinant human activated protein C for the postexposure treatment of Ebola hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 2007;196(Suppl 2): S390–9.
- [35] Cestari I, Ansa-Addo E, Deolindo P, Inal JM, Ramirez MI. Trypanosoma cruzi immune evasion mediated by host cell-derived microvesicles. *J Immunol* 2012;188:1942–52.
- [36] Francischetti IM, Seydel KB, Monteiro RQ. Blood coagulation, inflammation, and malaria. *Microcirculation* 2008;15:81–107.
- [37] Moxon CA, Heyderman RS, Wassmer SC. Dysregulation of coagulation in cerebral malaria. *Mol Biochem Parasitol* 2009;166:99–108.
- [38] de Mast Q, de Groot PG, van Heerde WL, Roestenberg M, van Velzen JF, Verbruggen B, et al. Thrombocytopenia in early malaria is associated with GPIb shedding in absence of systemic platelet activation and consumptive coagulopathy. *Br J Haematol* 2010;151:495–503.
- [39] Larkin D, de Laat B, Jenkins PV, Bunn J, Craig AG, Terraube V, et al. Severe *Plasmodium falciparum* malaria is associated with circulating ultra-large von Willebrand multimers and ADAMTS13 inhibition. *PLoS Pathog* 2009;5:e1000349.
- [40] Lowenberg EC, Charunwathana P, Cohen S, van den Born BJ, Meijers JC, Yunus EB, et al. Severe malaria is associated with a deficiency of von Willebrand factor cleaving protease, ADAMTS13. *Thromb Haemost* 2010;103:181–7.
- [41] Combes V, Collet N, Alibert M, van Eck M, Raymond C, Juhan-Vague I, et al. ABCA1 gene deletion protects against cerebral malaria: potential pathogenic role of microparticles in neuropathology. *Am J Pathol* 2005;166:295–302.
- [42] Faille D, Combes V, Mitchell AJ, Fontaine A, Juhan-Vague I, Alessi MC, et al. Platelet microparticles: a new player in malaria parasite cytoadherence to human brain endothelium. *FASEB J* 2009;23: 3449–58.
- [43] Nantakomol D, Dondorp AM, Krudsood S, Udomsangpetch R, Pattanapanyasat K, Combes V, et al. Circulating red cell-derived microparticles in human malaria. *J Infect Dis* 2011;203:700–6.
- [44] Couper KN, Barnes T, Hafalla JC, Combes V, Ryffel B, Secher T, et al. Parasite-derived plasma microparticles contribute significantly to malaria infection-induced inflammation through potent macrophage stimulation. *PLoS Pathog* 2010;6:e1000744.
- [45] Srivastava K, Cockburn IA, Swaim A, Thompson LE, Tripathi A, Fletcher CA, et al. Platelet factor 4 mediates inflammation in experimental cerebral malaria. *Cell Host Microbe* 2008;4:179–87.
- [46] Cantin R, Diou J, Belanger D, Tremblay AM, Gilbert C. Discrimination between exosomes and HIV-1: purification of both vesicles from cell-free supernatants. *J Immunol Methods* 2008;338:21–30.
- [47] Callahan MK, Popernack PM, Tsutsui S, Truong L, Schlegel RA, Henderson AJ. Phosphatidylserine on HIV envelope is a cofactor for infection of monocytic cells. *J Immunol* 2003;170:4840–5.
- [48] Munoz LE, Franz S, Pausch F, Furnrohr B, Sheriff A, Vogt B, et al. The influence on the immunomodulatory effects of dying and dead cells of Annexin V. *J Leukoc Biol* 2007;81:6–14.
- [49] Raymond AD, Campbell-Sims TC, Khan M, Lang M, Huang MB, Bond VC, et al. HIV Type 1 Nef is released from infected cells in CD45(+) microvesicles and is present in the plasma of HIV-infected individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2011;27:167–78.
- [50] Mayne E, Funderburg NT, Sieg SF, Asaad R, Kalinowska M, Rodriguez B, et al. Increased Platelet and Microparticle Activation in HIV Infection: Upregulation of P-Selectin and Tissue Factor Expression. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2012;59:340–6.

Microparticules membranaires au cours des états septiques graves : aspects cellulaires, physiopathologiques et cliniques

Résumé

Ce travail porte sur le rôle des microparticules procoagulantes (MPs) générées par les cellules vasculaires en réponse à un état septique. Après une introduction rappelant la structure et les propriétés des microparticules et la réponse de l'hôte à un agent pathogène, en particulier en terme d'activation de la coagulation, nous rapportons nos travaux expérimentaux et cliniques. Le premier travail a été réalisé sur un modèle cellulaire de vésiculation induite par le LPS. Il nous a permis de caractériser le transfert du complexe CD14/TLR4 à différents types cellulaires in-vitro dépourvus du récepteur au LPS. Ainsi, les MPs monocytaires pourraient avoir un rôle d'amplification de la réponse inflammatoire mais aussi dans la réponse anti-inflammatoire secondaire en participant à l'apoptose lymphocytaire. Le second travail a été réalisé chez l'animal. Après induction d'un choc septique, nous avons observé une amélioration hémodynamique en réponse à la perfusion de protéine C activée associée à une modulation du phénotype des MPs. Réinjectées à des rats naïfs, les MPs issues des rats septiques traités par protéine C activée développaient une moindre vasoplégie. Enfin, nous avons réalisé une étude prospective sur 100 patients en choc septique. Nous avons ainsi pu caractériser la présence d'une concentration élevée de microparticules procoagulantes, avec une variation phénotypique en présence de coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) : réduction du contingent plaquettaire au profit des MPs d'origine leucocytaires qui deviennent prépondérantes et témoignent d'une activation leucocytaire accrue, et surtout une activation des cellules endothéliales avec génération de MPs porteuses d'endogline (CD105). En analyse multivariée, CD105+MPs étaient fortement associée à la CIVD et pourraient constituer un marqueur précoce de l'atteinte endothéliale au cours du choc septique.

Mots clefs : Microparticules ; Choc septique ; Coagulation Intravasculaire Disséminée ; Protéine C activée ; Endothélium ; Hémostase ; Inflammation

Summary

This work focused on procoagulant microparticles shed after vascular cells stress during sepsis. The first part gives an overview on MPs and host response during pathogen challenge. The first lab experimental work confirms direct and functional transfer of CD14/TLR4 LPS sensor by MPs shed to target cells after monocytic THP-1 challenge by LPS. CD14-MPs amplify LPS-induced apoptosis in monocytes but also prompted lymphocyte apoptosis and could play a role in secondary anti-inflammatory response. Then, septic shock was induced in rats after caecal ligation and puncture. Activated protein C (APC) infusion improved haemodynamic parameters and alter septic microparticulate content. Infused in naïve rats, APC-treated MPs were associated with reduced hypotension and inflammatory response, confirming cytoprotective effect of both APC and APC-induced MPs. Finally, we performed a clinical prospective study in 3 medical ICU in France. Patients referred for septic shock had an increased level of circulating procoagulant MPs regardless disseminated intravascular coagulopathy (DIC) diagnosis. Nevertheless, DIC patients evidenced a specific pattern with lower platelet-MPs, increased leucocyte-MPs and specific endothelial cells activation with endoglin (CD105) shedding. In multiple logistic regression analysis, CD105-MPs were strongly associated with DIC and were evidenced before DIC diagnosis according to routine laboratory assays.

Key words: Microparticles; Septic shock; Disseminated Intravascular Coagulopathy ; Activated protein C: Endothelium; Haemostasis; Inflammation