

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

THÈSE

présentée par

Julie BOISRAMÉ-HELMS

soutenue le **30 juin 2014**

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

Discipline/ Spécialité : Biologie

**Les microparticules dans le choc septique,
marqueurs pathogènes et cibles thérapeutiques
potentielles**

THÈSE dirigée par :

M. Ferhat MEZIANI

Professeur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme Chantal BOULANGER

Directeur de Recherche, Centre de Recherche Cardiovasculaire,
Université de Paris V

M. Jean-Paul MIRA

Professeur, Université de Paris V

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M. Siamak BAHRAM

Professeur, Université de Strasbourg
Président du Jury

À la mémoire de mon Papa,

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier vivement les membres de mon jury, **Madame le Docteur Boulanger, Monsieur le Professeur Mira, Monsieur le Professeur Bahram** et **Monsieur le Professeur Rohr**, d'avoir accepté de juger ce travail.

Je souhaite aussi remercier particulièrement mon directeur de thèse, **Monsieur le Professeur Meziani**, qui m'a fait l'honneur de me proposer ce travail, l'a encadré et dirigé, avec la plus grande patience, la rigueur et l'imperturbable exigence qui le caractérisent. Par sa capacité à transmettre et à défendre, avec art et maîtrise, ses connaissances et valeurs humaines, il m'a formée depuis mes premiers pas en réanimation, comme au laboratoire, et est pour moi un véritable exemple. Je lui adresse mes plus sincères remerciements et le prie de croire en ma plus haute considération et mon profond respect.

Je voudrais également exprimer toute ma gratitude à **Madame le Professeur Toti**, qui m'a fait découvrir l'univers microparticulaire au cours des dernières années et m'a fait l'honneur de partager ses connaissances et sa rigueur scientifique, à **Monsieur le Docteur Xavier Delabranche**, pour son indéfectible soutien et son aide précieuse au laboratoire comme au service, mais aussi à **tous ceux qui m'ont aidée dans la réalisation de ce travail** : Grégory, Mélanie, Fatiha, Céline, Andrei et Alexandre, mais aussi les équipes de l'EA3072 et de l'UMR7213, qui m'ont accueillie et formée.

J'adresse enfin mes plus tendres remerciements à **mon mari, Thomas**, à **mes filles, Clara et Maïa**, et à **ma famille**.

Table des matières

Remerciements.....	4
Table des matières.....	5
Liste des tableaux	7
Liste des figures.....	8
Liste des abréviations	9
Introduction	11
I. Les microparticules	16
1) Caractéristiques.....	16
2) Microparticules et autres microvésicules.....	19
3) La membrane plasmique	19
a. Asymétrie membranaire	21
b. Les transporteurs membranaires des phospholipides	22
4) Mécanismes de formation des microparticules.....	25
a. Remodelage de la membrane plasmique et flux calcique.....	25
b. L'apoptose cellulaire.....	29
c. Signal d'activation cellulaire.....	33
5) Clairance des microparticules	35
6) Quantification et détermination de l'origine cellulaire des microparticules.....	37
II. Le choc septique	41
1) Définition, épidémiologie	41
2) Diagnostic	42
3) Physiopathologie.....	43
a. Activation des cellules de l'immunité.....	44
b. Inflammation et activation endothéliale.....	55
c. Coagulopathie du choc septique - activation plaquettaire, endothéliale et leucocytaire.....	59
d. Choc septique et activation plaquettaire	62
III. Les microparticules, marqueurs pathogènes et cibles thérapeutiques potentielles au cours du choc septique.....	67
1) Microparticules, marqueurs potentiels de la dysfonction cardiovasculaire	67
a. Microparticules et réponse inflammatoire	67
b. Microparticules et homéostasie vasculaire	70
c. Microparticules et coagulopathie	73

2) Les microparticules dans le choc septique, des cibles modulables ?	75
a. Nutrition et immunonutrition	76
b. Traitement de la coagulopathie du choc septique	80
c. Traitement de l'insuffisance surrénalienne	87
d. Contrôle glycémique	87
e. Traitements immunomodulateurs.....	88
f. Epuration extra-rénale	88
Travaux personnels	91
Article 1	92
Article 2.....	109
Article 3.....	138
Article 4.....	161
Discussion	176
Conclusion et perspectives	188
Annexes	211
Annexe 1	212
Annexe 2	222
Annexe 3	232
Annexe 4	244
Résumé.....	272
Résumé en anglais	272

Liste des tableaux

Tableau 1 : Antigènes de surface des microparticules circulantes	17
Tableau 2 : Clairance des microparticules	36
Tableau 3 : Méthodes de détection et de mesure des microparticules	38

Liste des figures

Figure 1 : Interactions lipides-protéines au sein de la membrane plasmique	20
Figure 2 : Transporteurs membranaires des phospholipides	23
Figure 3 : Mécanismes de régulation de la vésiculation membranaire	27
Figure 4 : Remaniements du cytosquelette au cours de l'apoptose	28
Figure 5 : Voies de signalisation conduisant à l'apoptose cellulaire	32
Figure 6 : Activation des inflammasomes et signalosomes par les signaux dangers intra et extracellulaires	34
Figure 7 : Test prothrombinase	40
Figure 8 : Signalisation induite par les TLR et Nod	47
Figure 9 : Voies de la NETose	51
Figure 10 : Rôle de l'activation des granulocytes neutrophiles dans l'interaction inflammation/thrombose	53
Figure 11 : Dysfonction vasculaire au cours du choc septique	57
Figure 12 : Coagulopathie du choc septique	61
Figure 13 : Rôle de l'activation des plaquettes dans l'interaction inflammation/ thrombose	64
Figure 14 : Inflammasome et réponse immunitaire	69
Figure 15 : Activation cellulaire et microparticules au cours du choc septique	72
Figure 16 : Activité de la protéine C activée	83
Figure 17 : Effets de la protéine C activée au cours du sepsis	85
Figure 18 : Schéma récapitulatif des résultats de ce travail	190

Liste des abréviations

ADP		Adénosine diphosphate
ADN		Acide désoxyribonucléique
A-V		Annexine-V
ARNm		Acide ribonucléique messager
AT		Antithrombine
ATP		Adénosine triphosphate
CARS	<i>Compensatory anti-inflammatory response syndrom</i>	Syndrome de réponse anti-inflammatoire compensatrice
CARD	<i>Caspase-Activating Recruitment Domain</i>	Domaine activateur des caspases
CD		Cluster de Différentiation
CIVD		Coagulation intravasculaire disséminée
COX-2		Cyclo-oxygénase de type 2
CPA		Cellule Présentatrice d'Antigène
eNOS	<i>endothelial NO-Synthase</i>	NO-synthétase endothéliale
EPCR	<i>Endothelial Protein C Receptor</i>	Récepteur endothélial de la protéine C
ERO		Espèces Réactives de l'Oxygène
ERN		Espèces Réactives du Nitrogène
F1+2		Fragments 1+2 de la prothrombine
FII/FIIa		Prothrombine/Thrombine
FM	<i>Fibrin Monomers</i>	Monomères de fibrine
FT		Facteur Tissulaire
GPIb α		Glycoprotéine Ib α
GPI		Glycosyl phospho-inhibiteur
GPV	<i>Platelet glycoprotein V</i>	Glycoprotéine V plaquettaire
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>	Molécule d'adhésion intercellulaire 1
IFN		Interféron
IGSII		Indice de gravité simplifié II
IL		Interleukine
iNOS	<i>inducible NO-Synthase</i>	NO-synthétase inductible
IRAK	<i>IL-1 Receptor-Associated Kinase</i>	Kinase associée au récepteur de l'IL-1
ISTH	<i>International society for Thrombosis & Haemostasis</i>	Société internationale de thrombose et hémostasie
JAAM	<i>Japanese Association for Acute Medicine</i>	Société japonaise de réanimation
JNK	<i>c-Jun N-terminal protein Kinase</i>	Protéine kinase c-Jun terminale
KO	<i>Knock out</i>	
LBP	<i>LPS-Binding Protein</i>	Protéine liant le LPS
LPS		Lipopolysaccharide
MCP-1	<i>Macrophage Chemoattractant Protein-1</i>	Protéine chimio-attractrice des macrophages
miARN		Acide ribonucléique microscopique

MBL	<i>Mannan-binding lectin</i>	Lectine liant les mannanes
MMP		Métalloprotéinase
MPs		Microparticules
MPO		Myéloperoxydase
NADPH		Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NETs	<i>Neutrophil extracellular traps</i>	Pièges extracellulaires issus des neutrophiles
NF- κ B	<i>Nuclear Factor κB</i>	Facteur de transcription nucléaire κ B
NO \cdot	<i>Nitric Oxide</i>	Monoxyde d'azote
Nod	<i>Nucleotid-binding oligomerisation domain</i>	Domaine d'oligomérisation liant les nucléotides
PAI-1	<i>Plasminogen Activator Inhibitor-1</i>	Inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type 1
PAMP	<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>	Motifs moléculaires associés au pathogène
PAR	<i>Protease-Associated Receptor</i>	Récepteur associé aux protéases
PAM		Pression Artérielle Moyenne
PAS		Pression Artérielle Systolique
PCa		Protéine C activée
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PGI ₂		Prostaglandine I ₂ (prostacycline)
PhtdChol		Phosphatidylcholine
PhtdSer		Phosphatidylsérine
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>	Motif moléculaire associé aux pathogènes
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>	Récepteur activé par proliférateurs de peroxyosomes
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>	Récepteur des motifs de reconnaissance
SIRS	<i>Systemic Inflammatory Response Syndrom</i>	Syndrome de réponse inflammatoire systémique
SOFA	<i>Sepsis-related Organ Failure Assessment</i>	Appréciation des défaillances d'organes associées au sepsis
TCA		Temps de Céphaline Activé
TFPI	<i>Tissue factor pathway inhibitor</i>	Inhibiteur de la voie du facteur tissulaire
TGF	<i>Tumor growth factor</i>	Facteur de croissance tumorale
TLR	<i>Toll-like Receptors</i>	Récepteurs de type Toll
TNF α	<i>Tumor Necrosis Factor α</i>	Facteur de nécrose tumorale α
TP		Taux de Prothrombine
tPA	<i>tissue-type Plasminogen Activator</i>	Activateur tissulaire du plasminogène
TRAF-6	<i>TNF Receptor-Associated Factor 6</i>	Facteur 6 associé au récepteur du TNF
TXA ₂		Thromboxane A ₂
uPA	<i>urinary-type Plasminogen Activator</i>	Activateur de type urinaire du plasminogène
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i>	Molécule d'adhésion cellulaire vasculaire 1
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>	Facteur de croissance vasculaire endothélial
vWF	<i>von Willebrand Factor</i>	Facteur von Willebrand

Introduction

Le choc septique constitue une des formes les plus sévères de la réponse de l'hôte à un micro-organisme pathogène. C'est un des syndromes médicaux les plus anciens, mais qui demeure parmi les plus insaisissables, marqué par une défaillance multi-organes et une mortalité élevée. Déjà décrit par Hippocrate au IV^{ème} siècle avant JC comme la putréfaction des tissus (Funk DJ *et al.*, 2009), la définition du sepsis a évolué vers la description d'une inflammation systémique résultant de l'invasion de l'organisme par un germe pathogène, disséminant secondairement dans le sang (Angus DC *et al.*, 2013). Cependant, l'éradication du pathogène par les antibiotiques ne permet pas la résolution du sepsis et de nombreux patients décèdent malgré une prise en charge optimale. Ainsi, Lewis Thomas a suggéré que c'est la réponse de l'hôte qui est responsable de la pathologie, et non le germe (Thomas L, 1972).

La réponse de l'hôte est liée à une atteinte cytotoxique directe par les agents infectieux ou indirecte par les médiateurs de l'inflammation. Elle passe par la mise en jeu de nombreux mécanismes de défense et par une intense activation cellulaire notamment endothéliale, plaquettaire et monocytaire, mais aussi érythrocytaire ou granulocytaire. Le phénotype de l'endothélium vasculaire est alors altéré, prenant un caractère pro-adhésif, pro-inflammatoire et pro-thrombotique (Annane D *et al.*, 2005; Boissrame-Helms J *et al.*, 2013). À ce stade, l'activation pathologique de la coagulation et une inhibition de la fibrinolyse réactionnelle peuvent induire une forme sévère de coagulopathie : la coagulation intravasculaire disséminée (CIVD). Celle-ci aboutit à la génération inappropriée de thrombine, à l'origine de microthromboses et d'une consommation des facteurs de l'hémostase, et serait précurseur de syndrome de défaillance multiviscérale (Fourrier F, 2012).

De plus, l'activation cellulaire au cours du choc septique est marquée entre autres par une génération excessive de microparticules (MPs) détectées dans le sang (Delabranche X *et al.*, 2013). Les MPs sont des vésicules de moins d'un micromètre de diamètre, libérées dans l'espace extracellulaire suite à un remaniement de la membrane plasmique et à son bourgeonnement. Décrites il y a presque cinquante ans et longtemps considérées comme des débris cellulaires dépourvus de fonction biologique propre,

elles connaissent aujourd'hui un intérêt croissant en recherche clinique. Cet intérêt est lié à leur nature, qui reflète une activation ou une destruction cellulaire (Wolf P, 1967), et à leur comportement, puisqu'elles constituent de véritables messagers intercellulaires, capables de moduler de nombreuses réponses vasculaires et tissulaires. Les MPs véhiculent en effet un signal biologique propre aux conditions de leur émission par la cellule parentale, leurs caractéristiques membranaires leur conférant des propriétés généralement procoagulantes, pro-inflammatoires et pro-apoptotiques, mais aussi anticoagulantes ou pro-fibrinolytiques (Morel O *et al.*, 2004).

Chez l'homme, les MPs sont détectables à de faibles concentrations dans le sang et les fluides biologiques, en dehors de toute situation pathologique, et témoignent de l'homéostasie cellulaire des tissus (Berckmans RJ *et al.*, 2001; Meziani F *et al.*, 2008). Des concentrations élevées de MPs circulantes sont rapportées dans de nombreuses pathologies thrombotiques, inflammatoires, traumatiques ou cancéreuses (VanWijk MJ *et al.*, 2003; Martinez MC *et al.*, 2011b), et notamment au cours du choc septique (Soriano AO *et al.*, 2005; Delabranche X *et al.*, 2013).

Dans ce contexte, les propriétés pro-inflammatoires et pro-apoptotiques des MPs favoriseraient la survenue d'un syndrome de défaillance multiviscérale (Meziani F *et al.*, 2010). Chez le rat en choc septique, il a été montré que les MPs pourraient ainsi participer à l'importante dysfonction vasculaire observée, à la modulation du statut oxydant ou encore, contribuer à un état procoagulant (Mortaza S *et al.*, 2009). La physiopathologie du choc septique est en effet caractérisée par une intense dysfonction vasculaire, qui se traduit par une vasoplégie réfractaire au remplissage, nécessitant le recours à des traitements vasopresseurs.

À la lumière de ces éléments, la détection de l'activation cellulaire et de l'interaction des différents types cellulaires au sein des voies de signalisation pourrait constituer une des nouvelles pistes physiopathologiques d'intérêt au cours du choc septique. Elle pourrait en effet mener à un diagnostic précoce et à une meilleure stratification des patients selon leur gravité, afin d'adapter et d'optimiser leur prise en charge.

Dans ce travail de thèse, j'ai cherché à montrer l'intérêt des MPs circulantes comme marqueurs pathogènes, mais également comme cibles thérapeutiques potentielles au cours du choc septique. Le manuscrit articule ainsi des données de recherche expérimentale, cellulaires et animales, et de données de recherche clinique.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet qualitatif de différentes émulsions lipidiques de nutrition parentérale sur le remodelage membranaire de monocytes en culture induit par une endotoxine bactérienne et la genèse des MPs comme témoin de ce remodelage. Dans ce travail, les MPs sont présentées comme un outil d'exploration de l'activation cellulaire au cours du choc septique et des mécanismes du remodelage membranaire.

L'effet de ces mêmes émulsions lipidiques a ensuite été exploré sur la génération *in vivo* de MPs et l'inflammation vasculaire, dans un modèle de choc septique par péritonite chez le rat.

Nous avons poursuivi ces travaux expérimentaux par la caractérisation de l'activation cellulaire au cours du choc septique, avec une étude clinique réalisée chez cent patients en choc septique, en utilisant les MPs circulantes comme témoins de la dysfonction du compartiment vasculaire et plus précisément ici, de l'activation de la coagulation, à l'échelle cellulaire.

Enfin, la faisabilité de la modulation pharmacologique des MPs et de leurs propriétés au cours du choc septique a été montrée en utilisant la protéine C activée dans notre modèle de choc septique par péritonite chez le rat, afin d'étayer la piste des MPs comme cibles thérapeutiques.

Les résultats obtenus dans ces différents travaux montrent l'intérêt des MPs circulantes comme outil dans l'exploration de nouvelles pistes physiopathologiques du choc septique, mais également comme des cibles pharmacologiquement modulables à des fins éventuellement thérapeutiques.

Avant de présenter notre travail de recherche, je vais rappeler dans une première partie introductive les caractéristiques, propriétés et mécanismes de formation des microparticules, puis la physiopathologie du choc septique à l'échelle cellulaire, avant de montrer comment les microparticules peuvent être impliquées dans la physiopathologie du choc septique et comment elles peuvent, de ce fait, représenter des marqueurs de l'activation cellulaire et potentiellement des cibles thérapeutiques.






I. Les microparticules

1) Caractéristiques

Les MPs sont des fragment submicroniques de membrane plasmique, mesurant 0,05 à 1 μm de diamètre, libérées dans l'espace extracellulaire par une cellule parentale sous l'effet d'un stress cellulaire (Freyssinet JM, 2003). Ce stress provoque le réarrangement des phospholipides anioniques entre les deux feuilletts de la membrane cellulaire, qui est déstabilisée et bourgeonne (Zwaal RF *et al.*, 1997).

Toute cellule est susceptible d'émettre des MPs en réponse à un stress. Dans le vaisseau, elles sont issues des cellules circulantes, les plaquettes, les leucocytes et les érythrocytes, et des cellules composant la paroi vasculaire, principalement les cellules endothéliales, les macrophages et les cellules musculaires lisses (Freyssinet JM, 2003). Les MPs portent les antigènes de surface spécifiques de la cellule émettrice, qui permettent l'identification de leur origine cellulaire et parfois même du type de stress impliqué, lorsqu'il se traduit par des modifications de la composition protéique membranaire (Baj-Krzyworzeka M *et al.*, 2002). Les MPs endothéliales sont ainsi identifiées par la présence des antigènes de surface CD144, CD62E, CD105 et CD31 ; les MPs plaquettaires portent quant à elles les CD41a, CD42b et CD62P et les MPs leucocytaires, les CD45, CD4, CD8, CD14 (McVey M *et al.*, 2012). L'origine des MPs peut être déterminée en combinant la détection simultanée de plusieurs antigènes de surface (Burger D *et al.*, 2012) (tableau 1).

Tableau 1 : Antigènes de surface des microparticules circulantes
(d'après McVey M et al., 2012)

Cellule émettrice		Marqueurs de surface des microparticules
Plaquette		CD31, CD40L, CD41a, CD42a, CD42b, CD61, CD62P, CD63, CD107a, fibrinogène, vWF
Monocyte		CD14, CD142, CD144, CD162, TLR4
Lymphocyte		CD3, CD4, CD8, CD11b, CD16, CD19, CD21, CD45, CD66b
Polynucléaire neutrophile		CD11a, CD11b, CD15, CD16, CD35, CD49, CD59, CD62L, CD66b, CD142
Cellule endothéliale		CD31, CD34, CD51, CD54, CD62E, CD63, CD105, CD106, CD142, CD144, CD146

Les MPs ont la capacité de fusionner avec les membranes plasmiques d'autres cellules ou avec d'autres MPs et sont ainsi susceptibles d'acquérir et de transmettre différents antigènes (Rauch U *et al.*, 2000; Scholz T *et al.*, 2002). Le thrombus en formation constitue un exemple de focalisation des MPs leucocytaires et plaquettaires *in vivo* favorisant la constitution de nouvelles espèces hybrides exhibant des antigènes propres aux deux lignées (Mause SF *et al.*, 2010).

Dans le vaisseau, les MPs sont considérées comme procoagulantes, car elles exposent de la phosphatidylsérine (PhtdSer) sur le feuillet externe de leur membrane. C'est un phospholipide anionique qui constitue la surface catalytique nécessaire à la fixation des facteurs de la coagulation vitamine K-dépendants et à leur assemblage sous la forme des complexes de la cascade de la coagulation. En outre, certaines MPs émises par les cellules endothéliales ou les monocytes portent du facteur tissulaire (FT) actif, qui est l'initiateur cellulaire de la cascade de la coagulation (Satta N *et al.*, 1994; Zwicker JI *et al.*, 2011).

Les MPs sont des effecteurs cellulaires impliqués dans de nombreux phénomènes physiologiques et pathologiques (Mause SF *et al.*, 2010). Leur action dépend de la molécule qu'elles délivrent à la cellule cible (Morel O *et al.*, 2004). Elles peuvent avoir une action autocrine ou paracrine, et sont capables d'atteindre des cibles éloignées en disséminant dans le sang circulant (Chironi GN *et al.*, 2009). Les médiateurs solubles (interleukine IL-1 β , RANTES), peuvent être délivrés à la cellule cible, tandis que les ligands associés à la membrane participeraient à l'activation cellulaire. Les MPs peuvent transférer à la cellule cible des constituants membranaires, récepteurs ou acides nucléiques cytosoliques (ARN messagers – ARNm, ARN microscopiques – miARN) par fusion membranaire ou après internalisation (Zernecke A *et al.*, 2009). Récemment, les MPs ont été proposées comme des outils de transfert de molécules actives dans un modèle de cellules génétiquement modifiées pour exprimer les récepteurs nucléaires PPAR- γ (Sahler J *et al.*, 2012). D'autres exemples plus physiologiques de reprogrammation cellulaire par les MPs ont été mis en évidence par transfert du morphogène Hedgehog (Martinez MC *et al.*, 2006). Cependant, les molécules membranaires apportées par les MPs, comme le FT de cellules cancéreuses, peuvent être recyclées et présentées à la surface de la cellule cible (Mause SF *et al.*, 2010).

2) Microparticules et autres microvésicules

Les MPs sont à distinguer d'une autre forme de vésicules d'origine endosomale, les exosomes, qui ne portent pas de PhtdSer, sont de plus petite taille, de l'ordre de 50 à 100 nm et fortement enrichis en protéines de la famille des tétraspanines (Thery C *et al.*, 2002). Les exosomes sont libérés par fusion de la membrane vésiculaire avec la membrane plasmique (exocytose), qui de ce fait, ne subit pas de remodelage membranaire. Le contenu, les marqueurs de surface et les propriétés des exosomes et des MPs sont différents. De plus, les exosomes proviennent essentiellement des cellules tumorales et immunitaires (Gyorgy B *et al.*, 2011; van der Pol E *et al.*, 2012). Dans la littérature, la distinction entre les différents types de microvésicules n'est pas claire, notamment du fait de l'évolution des termes employés et de la diversité des techniques d'isolement. Le terme microvésicule, plus ancien, est ainsi employé pour désigner des MPs ou des vésicules libérées par des cellules non vasculaires ou cancéreuses (Janowska-Wieczorek A *et al.*, 2005).

3) La membrane plasmique

La membrane plasmique mesure environ 5 nm d'épaisseur ; elle est composée d'une bicouche de phospholipides, principalement des glycérophospholipides, et de la sphingosine en moins grande quantité (Janmey PA *et al.*, 2006). Ces phospholipides sont répartis de manière asymétrique. La membrane contient également du cholestérol et des protéines, soit transmembranaires, soit ancrées par des glycosyl-inositol phosphates à la surface de la membrane (Singer SJ *et al.*, 1972). Le cholestérol membranaire assure la stabilité mécanique de la bicouche de phospholipides. Au total, la membrane plasmique contient environ 50% de protéines, dont le poids moléculaire moyen est de 100 kDa, qui se déplacent dans 50% de lipides, dont le poids moléculaire moyen est nettement inférieur, de l'ordre de 0,7 kDa (Levental I *et al.*, 2010) (figure 1).

Les phospholipides confèrent à la membrane plasmique une courbure grâce à leurs propriétés intrinsèques chimiques, électriques et leur morphologie conique (la tête polaire est plus petite que le diamètre de la base occupée par les acides gras hydrophobes). Ainsi, les mouvements de phospholipides au sein de la bicouche sont capables de moduler la courbure de la membrane plasmique. Certaines protéines, en interagissant avec les lipides, participent à la forme de la courbure de la membrane (Mim C *et al.*, 2012) et pourraient également être impliquées dans la formation des MPs, leurs charges positives facilitant la liaison avec la PhtdSer.

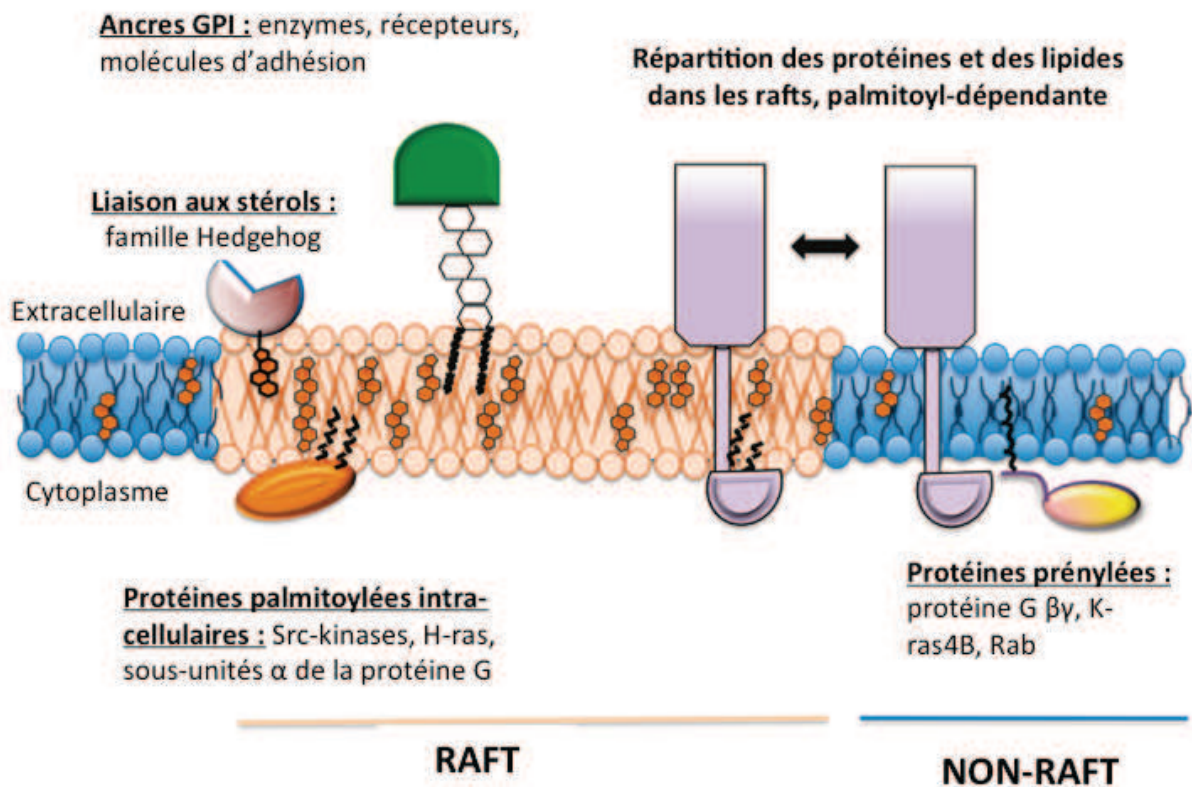


Figure 1 : Interactions lipides-protéines au sein de la membrane plasmique

(d'après Levental I *et al.*, 2010)

Les cellules sont composées d'une bicouche de phospholipides, dont la répartition est asymétrique. Le feuillet externe est composé majoritairement de phosphatidylcholine et le feuillet interne de phosphatidylsérine, chargée négativement. Cette asymétrie est maintenue par la flippase (aminophospholipide-translocase ATP-dépendante). Les ancres lipidiques régulent le trafic de protéines et l'organisation de la membrane plasmique ; elles ont également des fonctions propres, médiées par leur affinité pour les radeaux lipidiques (raft). GPI : glycosyl-inositol phosphates.

a. Asymétrie membranaire

Les phospholipides sont synthétisés à la surface des membranes biogénique par des enzymes du réticulum endoplasmique (comme la choline-phosphotransférase, qui synthétise la phosphatidylcholine, PhtdChol), dont le site actif est situé dans le cytoplasme. Les protéines de transport au sein de la bicouche lipidique permettent d'assurer la répartition asymétrique des phospholipides nouvellement synthétisés entre les deux feuillet, préservant ainsi la stabilité de la membrane (Menon A *et al.*, 2012).

Des mouvements latéraux dans le plan de la membrane assurent sa fluidité et permettent la réorganisation et la formation au sein des bicouches phospholipidiques d'entités fonctionnelles ou radeaux lipidiques (rafts), permettant de focaliser certains ensembles macromoléculaires (récepteurs, canaux ioniques, etc.) (Verkleij AJ *et al.*, 1973). Pour les cellules « au repos », les échanges spontanés de lipides entre les feuillet interne et externe (diffusion transverse ou « flip-flop »), sont rares et lents. En revanche, les membranes plasmiques des cellules « activées » ou stimulées sont capables d'échanges rapides entre les feuillet interne et externe, et actifs qui consomment de l'ATP et s'accompagnent de transports ioniques (Martinez MC *et al.*, 2001).

La fluidité des membranes dépend du coefficient de diffusion des lipides, de l'ordre d' $1 \mu\text{m}^2/\text{s}$, mais surtout de leur organisation moléculaire. Ainsi, la nature des acides gras, caractérisée par la longueur de leur chaîne et le nombre de carbones insaturés, détermine la flexibilité des lipides et l'organisation de la membrane en phase compacte ordonnée ou fluide désordonnée. Le cholestérol influence également la fluidité des membranes, en l'augmentant ou en la diminuant, selon sa position dans les chaînes d'acides gras (Ohlwein N *et al.*, 2012).

L'asymétrie des membranes est liée à la fois à la présence de protéines se déplaçant latéralement dans les membranes, sans pouvoir changer de feuillet ni traverser la bicouche lipidique, mais également à la différence de composition lipidique des deux feuillet. Ainsi, si les stérols et céramides sont

distribués de façon homogène dans la bicouche car ils sont capables de diffuser spontanément au sein de la membrane, les sphingomyélines et la PhtdChol sont principalement localisées sur le feuillet externe, et les PhtdSer et phosphatidyléthanolamine (PhtdEth) sur le feuillet interne (Bretscher MS, 1972; Verkleij AJ *et al.*, 1973; Devaux PF, 1991). Cette asymétrie de répartition des phospholipides membranaires a de nombreuses conséquences en terme de fonctions biologiques. En effet, le feuillet externe, composé d'un assemblage dense de sphingolipides et stérols, assure la stabilité de la membrane vis-à-vis du sang circulant, alors que l'accumulation d'aminophospholipides, et notamment de PhtdEth, dans le feuillet cytosolique des membranes plasmiques et des vésicules d'endocytose et exocytose, pourrait permettre à ces membranes de fusionner. La PhtdSer externalisée est également reconnue comme un signal de phagocytose (« eat me ») et d'initiation de la cascade de coagulation. De plus, le déséquilibre des masses lipidiques au sein de la membrane serait aussi responsable de la vésiculation membranaire (Ohlwein N *et al.*, 2012). Enfin, la constitution des rafts s'accompagne du recrutement sur le feuillet interne de protéines à ancres farnesyl ou géranyl qui participent à la signalisation intracellulaire en réponse au stress (Levental I *et al.*, 2010).

b. Les transporteurs membranaires des phospholipides

Au niveau de la membrane cellulaire, la distribution asymétrique des phospholipides membranaires et sa réorganisation après activation cellulaire sont gouvernées par un ensemble de transporteurs, qui assurent la translocation des lipides entre les deux feuillets (Coleman JA *et al.*, 2013) (figure 2).

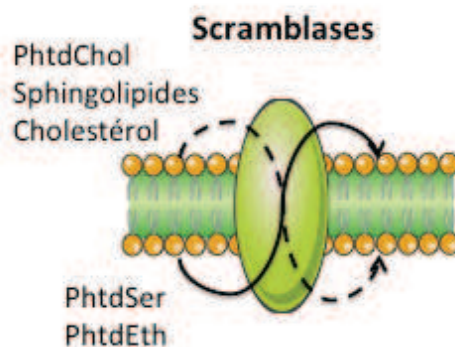
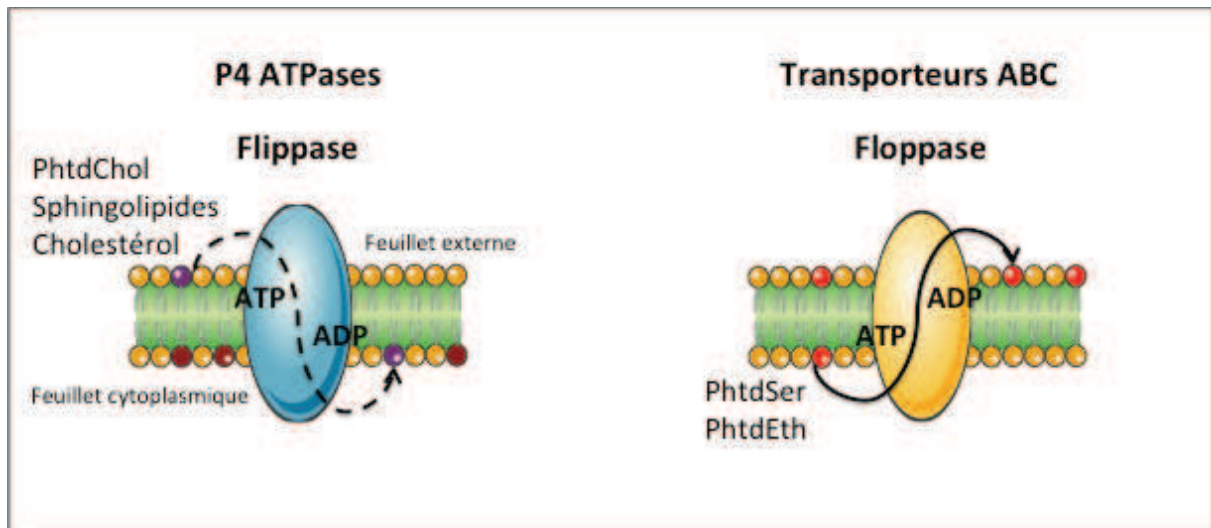


Figure 2 : Transporteurs membranaires des phospholipides

Les flippases transportent la phosphatidylsérine (PtdSer) et la phosphatidyléthanoline (PtdEth) du feuillet externe de la membrane plasmique vers le feuillet interne, contre un gradient de concentration ; les floppases transportent la phosphatidylcholine (PtdChol), les sphingolipides et le cholestérol contre un gradient de concentration dans l'autre sens ; les scramblases ne consomment pas d'ATP et facilitent le transport de différents lipides à travers la membrane, selon les gradients de concentration. Dans la cellule quiescente, seule les flippases sont activées, permettant le maintien de la PtdSer au niveau du feuillet interne de la membrane ; les flippases sont inactivées, tandis que les floppases et scramblases sont activées dans la cellule stimulée.

On distingue notamment les transporteurs de type ABC (floppases), les P4-ATPases (flippases) et les scramblases (Zwaal RF *et al.*, 2005). Les transporteurs ABC sont des protéines transmembranaires, catalysant généralement le transport très rapide des phospholipides du feuillet interne vers le feuillet externe au sein de la bicouche lipidique membranaire, en consommant de l'ATP et permettant l'efflux de lipides vers des lipoprotéines ou vers les micelles biliaires. Les flippases ont quant à elles été décrites pour la première fois par Daleke dans des érythrocytes humains (Daleke DL *et al.*, 1985).

Elles transportent les phospholipides anioniques contre un gradient de concentration, du feuillet externe vers le feuillet interne (Daleke DL, 2003). Elles transportent notamment la PhtdSer et la PhtdEth, limitant ainsi les interactions entre la PhtdSer et le milieu environnant et préservant la cellule de la reconnaissance par le système réticulo-endothélial. Certains transporteurs ABC peuvent cependant se comporter comme des flippases. Les scramblases sont des transporteurs n'utilisant pas d'ATP, mais dont l'activité dépend de la présence d'ions calcium. Elles permettent l'externalisation de la PhtdSer, réduisant ainsi l'asymétrie des membranes (Coleman JA *et al.*, 2013). La fonction spécifique de chacun de ces transporteurs et leur régulation en pathologie sont encore mal connues du fait des difficultés techniques de leur étude. De plus, des pores transmembranaires se forment de façon transitoire dans les membranes des cellules activées, facilitant les échanges de phospholipides entre les deux feuillets de la membrane plasmique et donc l'externalisation locale et transitoire de PhtdSer (figure 2). Enfin, il faut noter que de nombreux transporteurs ABC se comportent comme des floppases occasionnelles, comme MDR-2 (Toti F *et al.*, 2005).

Une autre protéine transmembranaire, TMEM16F, décrite récemment, serait impliquée dans l'externalisation de la PhtdSer à la surface des cellules (Suzuki J *et al.*, 2010). Cette protéine fait partie de la famille des anoctamines identifiées initialement *in silico*. La protéine canonique Ano1 dépend des flux calciques et un canal chlore (Duran C *et al.*, 2011). Le gène TMEM16F se trouve au niveau du chromosome 12 (12q12) et comporte 20 exons, codant pour une protéine de 910 acides aminés et 8 domaines transmembranaires. Des mutations du gène conduisent au syndrome de Scott (maladie hémorragique congénitale), du fait de la production de protéines TMEM16F tronquées non fonctionnelles (Castoldi E *et al.*, 2011). Dans cette pathologie, les cellules érythrocytaires, plaquettaires et lymphocytaires sont incapables de réaliser le flip-flop et d'émettre des MPs en réponse à un influx calcique rapide.

4) Mécanismes de formation des microparticules

a. Remodelage de la membrane plasmique et flux calcique

L'activation et l'apoptose cellulaires s'accompagnent d'une élévation importante et soutenue du calcium intracellulaire, nécessaire à l'externalisation de la PhtdSer. Cette augmentation du calcium intracellulaire est liée à un influx calcique *via* les canaux ioniques ou à la libération de calcium des stocks intracellulaires principalement du réticulum endoplasmique (Martinez MC *et al.*, 2001). Ainsi, la redistribution des phospholipides anioniques dépend des entrées calciques qui peuvent être mobilisées en réponse à un agoniste cellulaire. Les canaux SOCE -Store Operated Channel Entry- (canaux STIM1- stromal-interacting molecule 1, et Orai1), mais aussi d'autres canaux calciques, comme P2X1 dans les plaquettes permettent une augmentation très importante et soutenue du calcium (Munnix IC *et al.*, 2003; Varga-Szabo D *et al.*, 2009). L'implication d'autres canaux ioniques, comme les « GARDOS channels » (canaux potassiques sensibles au calcium), a également été évoquée (Heemskerk JW *et al.*, 2013; Kunzelmann K *et al.*, 2013). L'entrée de calcium intracellulaire s'accompagne d'une activation des calpaïnes, qui interviennent dans la dégradation du cytosquelette, favorisant ainsi le bourgeonnement de la cellule (Flaumenhaft R *et al.*, 2010).

Les mitochondries, en dépolarisant leur membrane externe, participent également à l'externalisation de la PhtdSer (Lopez JJ *et al.*, 2008), l'ouverture du pore conduisant à une augmentation du calcium intracellulaire et à l'activation des caspases et des calpaïnes dans les cellules apoptotiques (Leytin V *et al.*, 2009)

L'activité translocase est inhibée par une augmentation soutenue et conséquente du calcium intracellulaire, qui va activer les scramblases (Bever EM *et al.*, 2010) et les calpaïnes, qui participent au clivage du cytosquelette. L'activation et l'apoptose cellulaires sont ainsi caractérisées par un remaniement de la membrane plasmique, avec externalisation de la PhtdSer (Kunzelmann-Marche C

et al., 2001). La surcharge en phospholipides chargés négativement qui en découle induit un bourgeonnement de la membrane et la libération de MPs (figure 3). Il faut noter cependant que les mécanismes de flip-flop liés à la signalisation calcique sont probablement différents selon le type de stress et sa durée, puisque les cellules Scott sont capables d'externaliser la PhtdSer en réponse à un stress apoptotique, alors qu'elles sont incapables de répondre à un stress agoniste comme la thrombine pour les plaquettes (Lhermusier T *et al.*, 2011)

Le cytosquelette est constitué de polymères biologiques organisés, qui lui confèrent des propriétés mécaniques spécifiques et conditionnent la forme de la cellule. Au repos, la concentration de calcium cytosolique est d'environ 1 nM, garantissant la stabilité du cytosquelette. Lorsque les cellules sont activées, on observe une entrée massive de calcium dans le cytosol (30 à 350 μ M), responsable d'une activation transitoire des calpaïnes, des cystéines-protéases intracellulaires calcium-dépendantes. Ces enzymes protéolysent des protéines essentielles du cytosquelette, la filamine-1, la gélosine, la taline et la myosine (Fox JE *et al.*, 1991; Cauwenberghs S *et al.*, 2006; Campbell RL *et al.*, 2012).

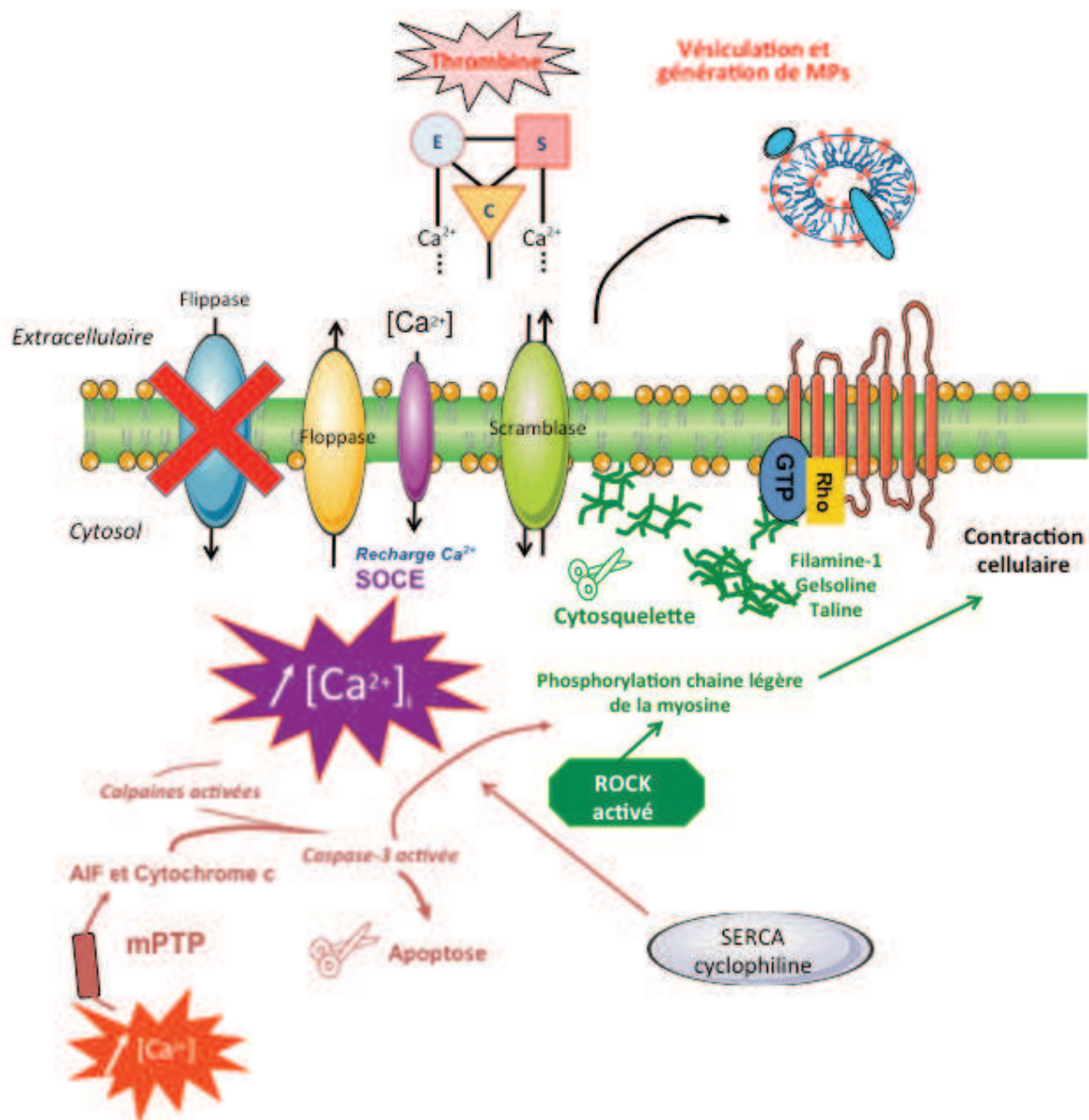


Figure 3 : Mécanismes de régulation de la vésiculation membranaire

L'augmentation du calcium intracellulaire (Ca_2^+) et l'activation des enzymes « caspase-1 like » et calpaïnes sont responsables du clivage de protéines du cytosquelette comme la taline, la gelsoline et la filamine. D'autres caspases, comme la caspase 3, vont induire le clivage de ROCK-1 dans les plaquettes / ROCK-2 dans les cellules endothéliales, des Rho-kinases qui vont phosphoryler la chaîne légère de la myosine, induire la contraction de la cellule et la vésiculation de la membrane plasmique. AIF : facteur induisant l'apoptose (apoptosis inducing factor), mPTP : pore de transition membranaire mitochondrial, SOCE : store-operated calcium channel

L'activation des caspases joue un rôle clé dans la génération de MPs. Ainsi, la caspase-3 est directement impliquée dans la vésiculation membranaire, en clivant la Rho-kinase ROCK-1 qui phosphoryle la chaîne légère de la myosine, qui induit alors la contraction de la cellule et la libération de MPs (Sebbagh M *et al.*, 2001; Coleman ML *et al.*, 2002). La caspase-2 serait capable d'induire la génération de MPs en l'absence de phénomène apoptotique, puisqu'elle est activée en présence de thrombine et clive alors la ROCK-2 dans les cellules endothéliales (Sebbagh M *et al.*, 2005). Elle induirait la vésiculation membranaire de cellules endothéliales stimulées par la thrombine (Sapet C *et al.*, 2006). Les PAK (p21-activated kinases) pourraient également être impliquées dans les remaniements du cytosquelette, mais les mécanismes sont mal connus (Leverrier Y *et al.*, 2001) (figure 4).

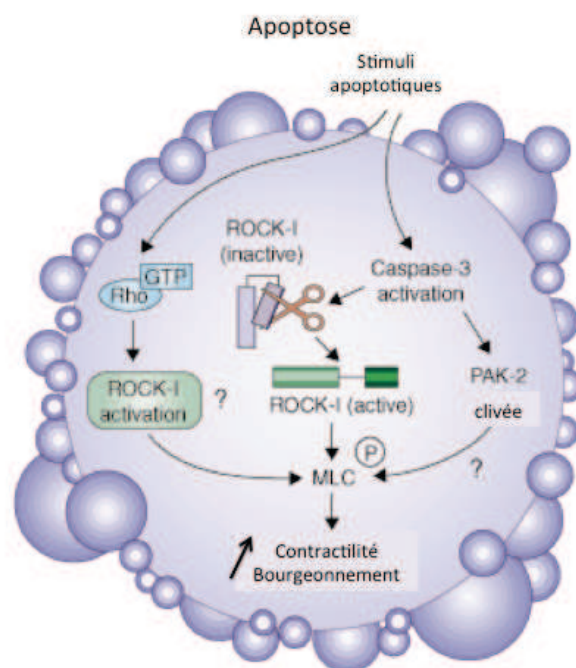


Figure 4 : Remaniements du cytosquelette au cours de l'apoptose

(d'après Leverrier Y and Ridley AJ, 2001)

Au cours de l'apoptose, l'activation des caspases joue un rôle clé dans la génération de microparticules : la caspase-3 clive la Rho-kinase ROCK-1 qui phosphoryle la chaîne légère de la myosine (CLM), qui induit alors la contraction de la cellule et la libération de microparticules Les PAK (p21-activated kinases) pourraient également être impliquées dans les remaniements du cytosquelette, mais les mécanismes sont mal connus.

Au total, la membrane des MPs reflète l'état d'activation cellulaire, notamment par la composition du feuillet externe en phospholipides anioniques, mais aussi par l'enrichissement en protéines particulières exprimées en grande proportion par la membrane des cellules activées, comme la E-sélectine, la P-sélectine ou le FT (Satta N *et al.*, 1994; Morel O *et al.*, 2008). Certaines protéines et récepteurs transmembranaires peuvent être sélectivement exportés ou au contraire exclus de la MP en fonction de leur regroupement transversal dans les rafts, qui sont réorganisés au cours du stress.

b. L'apoptose cellulaire

L'apoptose est un phénomène physiologique, hautement conservé parmi les espèces, nécessaire au remodelage tissulaire ou encore au développement et à la résolution de l'inflammation. Elle peut également être déclenchée par les cellules infectées par un agent pathogène, afin de limiter la dissémination de l'infection, ou plus généralement par des cellules endommagées de manière irréversible (lésions de l'ADN, etc.) (Leist M *et al.*, 2001).

L'apoptose est initiée par un signal apoptotique, qui induit une cascade de signalisation spécifique au signal. L'activation d'enzymes cataboliques est responsable d'une rétraction cytoplasmique, d'une condensation de la chromatine des cellules apoptotiques, suivie de la fragmentation de l'ADN en oligonucléosomes et de la protéolyse des protéines intracellulaires. Ces phénomènes aboutissent à la formation de corps apoptotiques, entourés de membrane cytoplasmique, qui seront phagocytés et éliminés par les macrophages, sans relargage du matériel cytoplasmique, et par conséquent, sans réaction inflammatoire locale (Leist M *et al.*, 2001; Assuncao Guimaraes C *et al.*, 2004; Jin Z *et al.*, 2005). Deux voies de signalisation sont décrites, extrinsèque et intrinsèque, en fonction de la nature du stimulus initial (Cabon L *et al.*, 2013).

La voie extrinsèque met en jeu les récepteurs à domaines de mort (*death domain*) de la famille du facteur de nécrose tumorale TNF (tumor necrosis factor), les TNF-R1 et TNF-R2, et le récepteur

Fas/CD95 (figure 5). Les récepteurs liés à leurs ligands, TNF et Fas, induisent l'activation d'un complexe de signalisation, qui active des cystéinyl aspartates protéases spécifiques, les caspases, présentes sous la forme de pro-enzymes dans les cellules. Les caspases sont composées de deux sous-unités et d'un domaine N-terminal qui permettra l'activation des pro-caspases. Les caspases sont activées par auto-activation ou en cascade, par l'intermédiaire d'oligomérisations et clivages sur des résidus aspartates situés à la jonction des pro-enzymes et des enzymes actives (Tesnière A *et al.*, 2006).

Les caspases initiatrices -8 et -10, une fois activées par les récepteurs de la famille TNF, qui changent de conformation, sont responsables de la transduction du signal apoptotique. Elles vont à leur tour activer de multiples kinases (JNK, ERK, RIP), TRAF et la voie du NF- κ B, cliver et rendre fonctionnelles les caspases effectrices -3 et -7, pour aboutir à la mort par protéolyse. Les caspases effectrices activées sont capables de protéolyser de nombreux substrats cellulaires essentiels et notamment leurs précurseurs, leur permettant ainsi de s'auto-activer (Cabon L *et al.*, 2013).

Des voies d'auto-amplification de l'apoptose sont décrites et impliqueraient notamment, après activation de Fas, le clivage précoce de la protéine Bid par la caspase-8 activée, qui interagit avec Bcl-2, se fixe sur la mitochondrie et aboutit à la libération de substances pro-apoptotiques, amplifiant la voie intrinsèque de l'apoptose. Cette voie est activée par le stress cellulaire par différents signaux finement régulés, selon le type cellulaire et l'environnement. Les régulateurs moléculaires de cette voie impliquent des protéines de la famille Bcl-2, qui vont activer les caspases initiatrices (caspase-9 principalement), qui à leur tour, activent les caspases effectrices (figure 5).

Certaines protéines de la famille de Bcl-2 sont anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-X_L) ; elles comportent un domaine BH4 spécifique, qui interagit avec les protéines régulatrices de l'apoptose (Bag-1, Raf-1). D'autres sont pro-apoptotiques (Bak, Bax, Bid, Bik), elles comportent un domaine BH3. Ces protéines contrôlent la perméabilité des membranes mitochondriales externes. Ainsi, les Bcl-2 pro-apoptotiques s'incorporent dans la membrane mitochondriale et y forment des canaux, provoquant de relargage dans le cytosol de molécules pro-apoptotiques, notamment le cytochrome c, qui va

participer à la formation d'un complexe appelé apoptosome et à l'activation des caspases. Les Bcl-2 anti-apoptotiques quant à elles, inhiberaient la formation des pores de perméabilité mitochondriale. Les corps apoptotiques expriment à leur surface la PhtdSer, qui permet leur reconnaissance et phagocytose par les macrophages. Le processus apoptotique dépend de la présence d'ATP. En cas de production énergétique insuffisante, l'apoptose ne pourra avoir lieu et les cellules évolueront vers la nécrose. D'ailleurs, une importante stimulation apoptotique s'accompagne d'une libération massive de cytochrome c qui inhibe la chaîne respiratoire mitochondriale et donc la production d'ATP (Leist M *et al.*, 2001; Assuncao Guimaraes C *et al.*, 2004; Jin Z *et al.*, 2005).

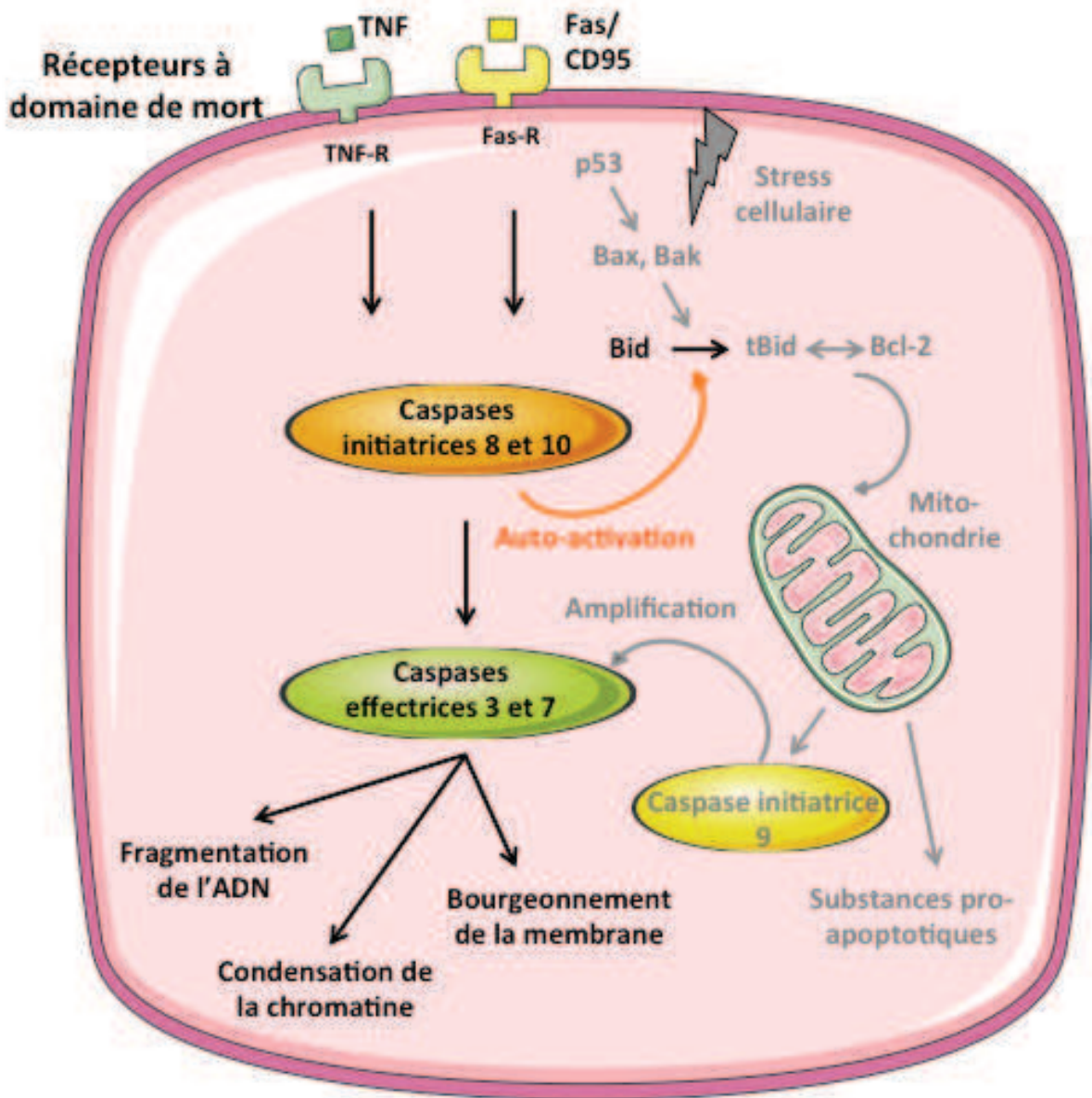


Figure 5 : Voies de signalisation conduisant à l'apoptose cellulaire

L'apoptose peut être déclenchée par la voie extrinsèque (en noir) impliquant des récepteurs à domaine de mort et leurs ligands ; ceux-ci vont activer des caspases initiatrices, qui vont à leur tour activer des caspases effectrices et participer à une boucle d'auto-amplification de la cascade, en activant la voie intrinsèque, impliquant la mitochondrie (en gris). La voie intrinsèque peut être activée directement, par un stress cellulaire ou des lésions de l'ADN. Les caspases effectrices vont cliver de nombreux substrats conduisant à la fragmentation de l'ADN, à la condensation de la chromatine et au bourgeonnement de la membrane plasmique. TNF : tumor necrosis factor, TNF-R : récepteur du TNF, p53 : protéine 53, Bax : Bcl-2 associated X protein, Bak : Bcl-2 homologous antagonist killer, Bcl-2 : B-cell leukemia protein-2.

La réponse précoce d'un organisme à l'infection est marquée par une apoptose des granulocytes neutrophiles, qui contrôlent la multiplication des bactéries, limitent la dissémination de l'infection et induisent une activation des cellules endothéliales, une inflammation systémique et des lésions organiques. Chez les patients septiques, l'apoptose des neutrophiles est inhibée. L'inhibition de l'apoptose a pour conséquence une prolongation de la demi-vie des granulocytes neutrophiles et est associée à une augmentation de la sévérité du sepsis, liée à des lésions tissulaires par accumulation de ces granulocytes neutrophiles dans les tissus. Les mécanismes de cette inhibition ne sont pas encore parfaitement élucidés. Elle impliquerait une activation du NF- κ B, responsable d'une inhibition de l'activité caspase-3 et du maintien des potentiels transmembranaires mitochondriaux. Les lipoprotéines bactériennes inhibent la dépolarisation de la membrane mitochondriale réduisant ainsi l'activité caspase-3. Un autre mécanisme retardant l'apoptose serait une dégradation accélérée de la caspase-3 induite par l'endotoxine ou l'induction de protéines anti-apoptotiques. L'inflammation au cours du choc septique majore l'expression des caspases-3, -8 et -9 des lymphocytes et augmente l'apoptose des monocytes (Jedynak M *et al.*, 2012).

c. Signal d'activation cellulaire

Le déclenchement des processus de vésiculation membranaire, menant à la libération de MPs, nécessite un signal d'activation cellulaire. De nombreux signaux peuvent ainsi jouer ce rôle : des médiateurs de l'inflammation, avec notamment les cytokines IL-1 β et TNF α ; des molécules exogènes PAMP (Pathogen-Associated Molecular Pattern molecules), qui initient la réponse inflammatoire en présence d'un agent pathogène infectieux ; l'endotoxine des bactéries gram-négatives (LPS) ou l'acide lipoteichoïque des bactéries gram-positives, qui vont activer respectivement les récepteurs TLR4 et TLR2 (Toll-Like Receptors 4 and 2) et initier les cascades de signalisation cellulaire, responsables de phosphorylation et déphosphorylation protéique régulant l'activité de protéines effectrices (Deutschman CS *et al.*, 2014) (figure 6).

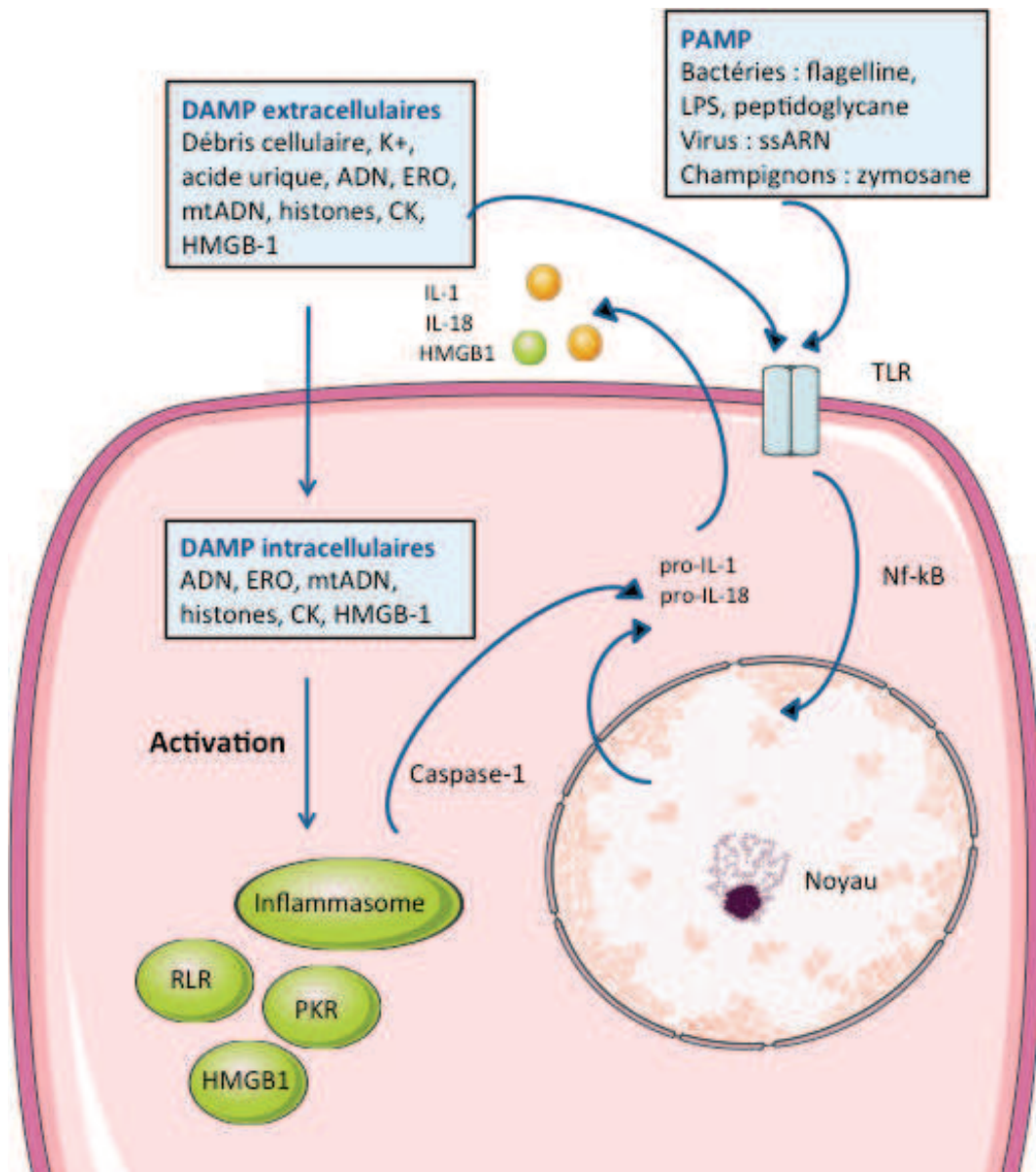


Figure 6 : Activation des inflammasomes et signalosomes par les signaux dangers intra et extracellulaires

(d'après Deutschman CS and Tracey KJ, 2014)

Les molécules de danger et motifs de danger associés aux pathogènes (DAMP - alarmines, PAMP) sont reconnus par des récepteurs PPR (NLR: récepteur de type Nod, RLR : récepteur *retinoic acid inducible gene 1-like*). L'inflammasome est un complexe protéique oligomérique, qui se forme après reconnaissance de signaux « danger ». Après activation, il clive la pro-caspase-1 en caspase-1, qui va cliver les cytokines inflammatoires interleukine-1 β (IL-1 β) et interleukine 18 (IL-18) après activation de sa caspase-1.

5) Clairance des microparticules

Les mécanismes de la clairance des MPs sont encore mal connus, car difficiles à mesurer, mais plusieurs voies d'élimination sont décrites. Comme elles sont de petite taille, les MPs échapperaient transitoirement à l'élimination par le système réticulo-endothélial, par défaut d'exposition des signaux de reconnaissance pour la phagocytose par les macrophages et diffusion dans l'interstitium (Rautou PE *et al.*, 2012).

Plusieurs études récentes décrivent des mécanismes potentiels d'élimination des MPs et laissent supposer que ces mécanismes sont nombreux. Ainsi Dasgupta *et al.* ont décrit en 2009 une des voies principales de la clairance des MPs plaquettaires, *via* la liaison de la PhtdSer des cellules apoptotiques et des MPs à la lactadhérine, par l'intermédiaire d'un domaine « discoidin I-like » (Dasgupta SK *et al.*, 2009). La lactadhérine est sécrétée par les macrophages et cellules dendritiques immatures et jouerait un rôle clé dans l'épuration des MPs plaquettaires, en permettant leur opsonisation par les macrophages spléniques. Cette protéine n'est pas retrouvée dans le plasma des sujets sains, en revanche elle est présente à la surface des MPs plaquettaires. De plus, les MPs plaquettaires circulantes sont augmentées chez les souris KO pour la lactadhérine (*Mfge8*^{-/-}) et présentent un phénotype procoagulant réversible après supplémentation en lactadhérine (Dasgupta SK *et al.*, 2009). La même équipe a décrit plus récemment une autre voie d'élimination de MPs plaquettaires, qui implique Del-1 (developmental endothelial locus-1). Cette glycoprotéine est sécrétée par l'endothélium et présente également un domaine « discoidin I-like » et un domaine RGD (Arginine-Glycine-Acide aspartique), responsables de la liaison à la PhtdSer microparticulaire. Elle est retrouvée dans le plasma des sujets sains. L'élimination des MPs par Del-1 serait dépendante du phénotype des MPs, puisqu'elle ne permet la liaison que des MPs endothéliales et plaquettaires, et du tropisme tissulaire, la protéine n'étant exprimée que dans l'endothélium de certains tissus (poumons et cerveau chez la souris). Chez le rat, les MPs érythrocytaires seraient rapidement éliminées de la circulation, principalement par les cellules hépatiques de Kupffer (92%), mais également par les macrophages, par

l'intermédiaire d'une liaison de la PhtdSer (Willekens FL *et al.*, 2005). L'élimination des MPs plaquettaires, pourrait également passer par une opsonisation par le fragment C3b, reconnaissant la PhtdSer microparticulaire, activant ainsi la cascade du complément, pour être finalement détruites dans la rate et le foie (Flaumenhaft R, 2006). Enfin, la clairance des MPs pourrait dépendre du contexte physiopathologique, puisqu'en cas d'endotoxémie chez la souris, Dasgupta *et al.* ont montré que l'expression de la lactadhérine est profondément diminuée, alors que celle de Del-1 est augmentée au niveau de cellules endothéliales (Dasgupta SK *et al.*, 2012).

Concernant les délais de clairance des MPs, ceux-ci dépendent probablement du phénotype des MPs, de l'espèce étudiée et du stimulus ayant induit la vésiculation membranaire (tableau 3). La demi-vie des MPs varierait en effet de quelques minutes à plusieurs heures. Ainsi, Rank *et al.* ont mis en évidence que la clairance de MPs plaquettaire *in vivo* est plus rapide que celle des plaquettes et ils évoquent de ce fait des mécanismes d'élimination différents (Rank A *et al.*, 2011). Dans cette étude, 70% des MPs étaient retrouvées à la troisième heure après injection de MPs plaquettaires chez l'homme, alors qu'elles seraient éliminées en moins de 10 minutes chez le lapin (Rand ML *et al.*, 2006) et en moins de 30 minutes chez la souris (Flaumenhaft R, 2006).

Tableau 2 : Clairance des microparticules

(d'après Rautou PE and Mackman N, 2012)

Microparticules	Organes impliqués	Cellules impliquées	Molécules impliquées	Cinétique
Plaquettaires	Rate Foie, poumons	Macrophages C. endothéliales	Lactadhérine Del-1 (sauf rate)	5 min.
Endothéliales	Rate, foie, poumons	Monocytes / Macrophages	?	5 min.
Erythrocytaires	Foie ± rate, poumons, reins	C. de Kupffer	PhtdSer	5 min. (80%)

6) Quantification et détermination de l'origine cellulaire des microparticules

Les MPs sont détectables dans le sang et la plupart des fluides biologiques. Une phase pré-analytique d'isolement et de concentration est nécessaire. Le comité de standardisation de l'ISTH a récemment émis des recommandations quant aux méthodes de prélèvements des échantillons sanguins : pour un isolement optimal des MPs, il préconise une ponction veineuse avec un garrot peu serré, le rejet des premiers millilitres de sang et l'utilisation de tubes citrates (citrate de sodium 129 mM, sans adjonction) ; les échantillons doivent être immédiatement centrifugés (double centrifugation de 15 min. à 2500 x g) afin d'obtenir du plasma pauvre en plaquettes, qui est congelé à -80°C, si possible après avoir plongé l'échantillon dans l'azote liquide (-176°C) (Lacroix R *et al.*, 2013).

La quantification et la détermination de l'origine cellulaire des MPs ne font l'objet d'aucun consensus, voire sont matière à controverses (Hugel B *et al.*, 2004). Différentes méthodes d'imagerie directe ou indirecte, ainsi que des tests fonctionnels permettent la détection des MPs et leur quantification. Elles peuvent également être dénombrées après immunomarquage par cytométrie en flux ou *single particle tracking* (Freyssinet JM *et al.*, 2010) (tableau 2).

Tableau 3 : Méthodes de détection et de mesure des microparticules
(d'après Freyssinet JM and Toti F, 2010)

Méthodes	Reproductibilité Sensibilité	Spécificité : origine cellulaire, fonctions	Avantages	Inconvénients
Cytométrie en flux (basée sur la taille)	(+)	++ (anticorps spécifique)	Echantillons de petits volumes	Taille inférieure limite Risque d'agrégats lipidiques Etude fonctionnelle indirecte (anticorps spécifique)
Cytométrie à impédance (basée sur le volume électronique)	++(+)	++ (anticorps spécifique)	Echantillons de petits volumes Limite de taille inférieure plus basse	Etude fonctionnelle indirecte (anticorps spécifique) Prototype
Microscopie à force atomique (basée sur la taille)	+++	++ (anticorps spécifique)	Mesure objective Distribution par taille	Etude fonctionnelle indirecte (anticorps spécifique)
Spectroscopie de corrélation de photon (basée sur le diamètre hydrodynamique)	+++	0	Echantillons de petits volumes Mesure objective Distribution par taille	Etude fonctionnelle indirecte (anticorps spécifique) Sensibilité à la polydispersion
Repérage des particules fluorescentes (basée sur le diamètre hydrodynamique)	+++	++ (anticorps spécifique)	Echantillons de petits volumes Mesure objective Distribution par taille	Etude fonctionnelle indirecte (anticorps spécifique)
Capture et test fonctionnel (biologique/ immunologique)	++(+)	++(+) (activité procoagulante, annexine V, anticorps spécifique)	Fonction procoagulante Souplesse d'emploi (autres fonctions)	Quantification indirecte Etude fonctionnelle indirecte en dehors de l'aspect procoagulant (anticorps spécifique)
ELISA (biologique/ immunologique)	++(+)	++(+)	Souplesse d'emploi	Quantification indirecte Etude fonctionnelle indirecte (anticorps spécifique)
Test de génération de thrombine (biologique)	(+)	++ (activité procoagulante)	Test global	Quantification indirecte Pas d'autre fonction que procoagulant
Protéomique et lipidomique (biochimique et bases de données)	--	+/-	Variations qualitatives	Volume de l'échantillon

Dans les tests fonctionnels, une étape préalable de capture des MPs grâce à l'affinité de la PhtdSer microparticulaire pour l'annexine-V biotinylée fixée sur une plaque recouverte de streptavidine est réalisée (figure 7). Les MPs capturées catalysent alors l'assemblage du complexe prothrombinase et la génération de thrombine à leur surface après adjonction de FXa, FVa, FII et chlorure de calcium ; aux concentrations utilisées, la PhtdSer est le facteur limitant de la génération de thrombine. La thrombine ainsi générée est quantifiée par clivage d'un substrat chromogène spécifique à l'aide d'un spectrophotomètre thermostaté et le résultat est converti en « nanomolaires équivalent phosphatidylsérine » (nM éq. PhtdSer) par référence à une courbe de calibration réalisée grâce à des liposomes de composition (1/3 PhtdSer, 2/3 PhtdChol) et de concentration connues.

Le phénotype des MPs peut être déterminé en remplaçant l'annexine-V par un anticorps biotinylé d'intérêt et en soustrayant les valeurs du dosage prothrombinase obtenues par capture sur anticorps non immun (Aupeix K *et al.*, 1997; Hugel B *et al.*, 2004).

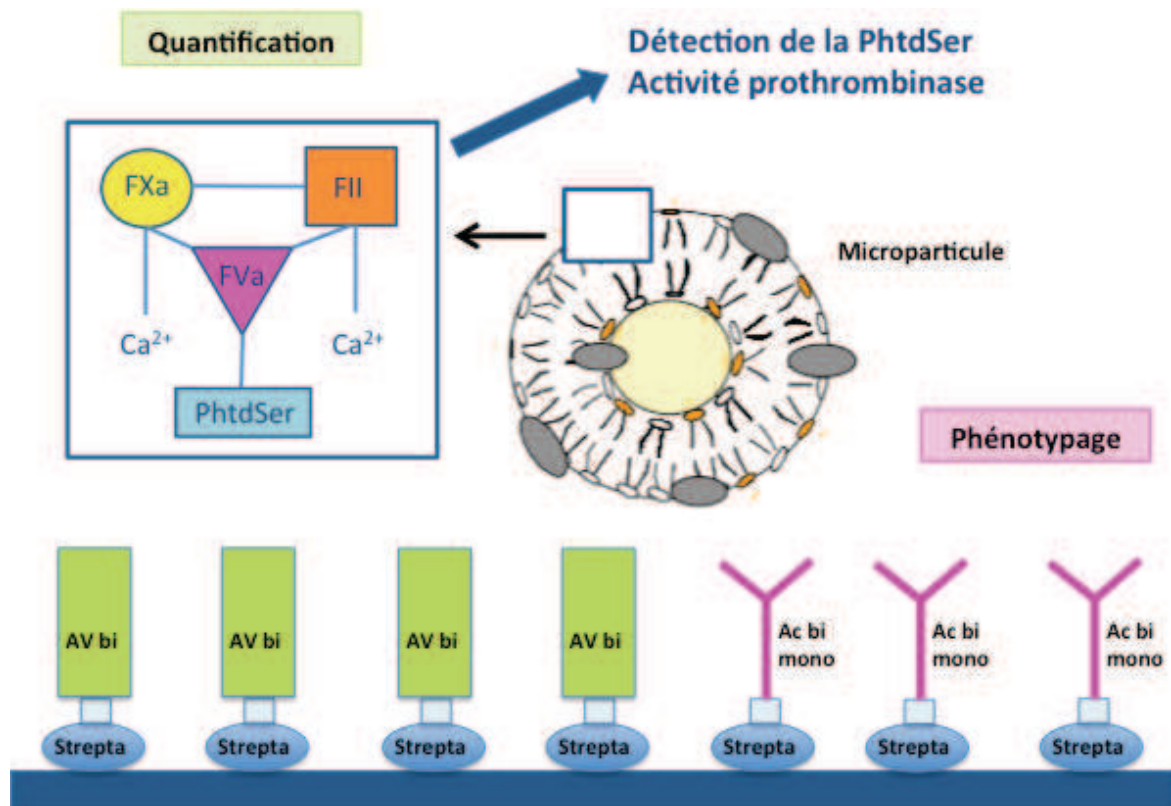


Figure 7 : Test prothrombinase

(d'après Aupeix *et al.*, 1997)

À gauche quantification des microparticules totales sur annexine-V biotinylée (AV bi) et à droite phénotypage par anticorps monoclonal spécifique biotinylé (Ac bi mono). Strepta : streptavidine, PhtdSer : phosphatidylsérine, FXa : facteur X activé, FVa : facteur V activé, FII : facteur II (prothrombine), FIIa : thrombine.

II. Le choc septique

1) Définition, épidémiologie

Le sepsis, le sepsis sévère et le choc septique sont un *continuum* d'une même entité clinique caractérisée par une gravité clinique croissante :

- Le sepsis est défini comme une infection, avec des manifestations systémiques liées à une réponse inflammatoire systémique de l'organisme.
- Le sepsis sévère est associé à une dysfonction d'organe ou une hypoperfusion tissulaire (élévation du lactate sanguin ou oligurie). L'hypotension induite par le sepsis est définie par une pression artérielle systolique (PAS) inférieure à 90 mmHg, une pression artérielle moyenne (PAM) inférieure à 70 mmHg ou une chute de plus de 40 mmHg de la PAS, sans autre cause d'hypotension artérielle.
- Le choc septique est défini par une hypotension artérielle, persistant malgré un remplissage vasculaire adapté et nécessitant le recours à des vasopresseurs (Levy MM *et al.*, 2003). Le choc septique est caractérisé par une réponse inflammatoire systémique intense en réponse à un micro-organisme pathogène, marquée par 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.

Le choc septique est un motif fréquent d'admission en réanimation. S'il y a 30 ans, la mortalité du choc septique était de plus de 80 %, des progrès thérapeutiques ont permis de considérablement la diminuer. Cependant, malgré une prise en charge étiologique (traitement de l'infection) et symptomatique (suppléance des défaillances d'organes) optimale, la mortalité reste élevée, de l'ordre de 30 à 40 %. L'incidence est d'environ 50 cas pour 100 000 personnes par an. Le choc septique

représentait 1495 des 10941 (13,7 %) admissions réalisées sur 2 ans dans 14 services de réanimation français appartenant au réseau EPISS ; le taux de mortalité toutes causes confondues à J28 était de 42 % (Quenot JP *et al.*, 2013). On constate de plus une surmortalité à moyen et long terme chez les patients survivants, avec une morbidité également importante, comprenant notamment une altération des capacités physiques et troubles cognitifs. Les avancées dans la compréhension physiopathologique du choc septique n'ont donc pas abouti aux progrès thérapeutiques escomptés (Asfar P *et al.*, 2013). Des traitements ciblés ont été développés afin d'interrompre la cascade cytokinique pro-inflammatoire initiale (anti-LPS, anti-cytokines proinflammatoires, anti-TNF α) ou de réduire la coagulopathie (protéine C activée, antithrombine), sans qu'aucun n'ait démontré d'efficacité. Cependant, des thérapeutiques immunomodulatrices comme les glucocorticoïdes et les immunoglobulines, pourraient avoir un intérêt (Angus DC *et al.*, 2013).

2) Diagnostic

Le diagnostic de choc septique est clinique. Il associe une défaillance circulatoire à des dysfonctions d'organes. Le patient est ainsi classiquement décrit tachycarde, hypotendu avec un pouls filant, des marbrures cutanées et des extrémités froides et cyanosées, oligo-anurique, polypnéique et pouvant présenter une encéphalopathie septique associant à un degré divers une agitation, une confusion, des troubles de la conscience, voire un coma. À ces signes non spécifiques, est le plus souvent associée une fièvre ou à l'opposé une hypothermie. Le foyer infectieux peut être évident (cutané, pulmonaire, abdominal, urinaire, méningé) ou non. Le diagnostic est établi devant l'absence de correction des signes d'hypoperfusion après expansion volémique, nécessitant l'introduction d'un support vasopresseur.

Des éléments paracliniques sont évocateurs du diagnostic, mais sont aspécifiques. On peut ainsi retrouver une hyperleucocytose ou une leucopénie, une thrombopénie, des signes de CIVD biologique, une acidose métabolique lactique, une augmentation de la CRP (C reactive protein), de la procalcitonine et des anomalies en rapport avec des dysfonctions d'organes. Il n'existe actuellement

aucun biomarqueur permettant de faire précocement et avec certitude le diagnostic de choc septique (Faix JD, 2013). Plusieurs scores d'évaluation cliniques ont été proposés comme aide au diagnostic, mais leur utilisation reste restreinte en pratique courante. La détection des anomalies physiopathologiques à l'échelon cellulaire, que nous allons détailler ci-dessous, pourrait permettre une meilleure compréhension de la physiopathologie de ce syndrome et donc un diagnostic plus précoce.

3) Physiopathologie

La physiopathologie du choc septique est complexe, multifactorielle et encore mal cernée. Elle est caractérisée par une activation excessive et non contrôlée de certains mécanismes de défense cellulaires. Ceux-ci sont essentiels et bénéfiques lorsqu'ils sont activés localement, mais délétères lorsqu'ils sont activés à l'échelle systémique et non contrôlés (Adib-Conquy M *et al.*, 2009). Le choc septique est ainsi accompagné d'un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS, systemic inflammatory response syndrom), non spécifique de l'état infectieux, et d'un déséquilibre de la balance d'oxydo-réduction, d'une altération de la réponse immunitaire innée, d'une immunosuppression et d'une activation du complément, qui, ensemble, vont conduire à l'état de choc septique.

La réponse de l'hôte contre l'agent pathogène est à l'origine d'une intense activation cellulaire, principalement leucocytaire, endothéliale et plaquettaire, aboutissant notamment à la production de cytokines, protéases, médiateurs lipidiques, peptides vasoactifs, substances gazeuses et marqueurs de stress cellulaire. Des molécules d'adhésion et chimiokines séquestrent et activent les neutrophiles dans les organes cibles, augmentant ainsi l'inflammation et les lésions tissulaires. Des substances anti-inflammatoires contrebalancent les effets des médiateurs pro-inflammatoires, permettant ou non de contrôler les mécanismes de défense immunitaire. Ces mécanismes compensateurs et régulateurs, regroupés sous la dénomination de « CARS » (compensatory anti-inflammatory response syndrome) seront également responsables d'une immunodépression secondaire facilitant la survenue des infections nosocomiales (Bone RC, 1996; Adib-Conquy M *et al.*, 2009).

Après invasion par un agent pathogène, la réponse de l'hôte se fait par la mise en jeu des systèmes d'immunité innée et d'immunité adaptative. L'immunité innée constitue la première ligne de défense, tandis que l'immunité adaptative fait appel à des systèmes de reconnaissance spécialisés et systémiques, spécifiques de l'agent pathogène. En réponse à un stimulus initial, les cellules de l'immunité innée libèrent un grand nombre de cytokines, chimiokines et produits de l'activation du complément, quelle que soit la phase du sepsis. La réponse immunitaire adaptative est induite par l'interaction avec les cellules présentatrices d'antigène (CPA) qui ont ingéré un pathogène. Après reconnaissance de l'antigène, les cellules de l'immunité adaptative, comme les cellules T naïves, prolifèrent et génèrent des cellules effectrices, qui à leur tour, libèrent des cytokines. « L'orage cytokinique » serait à l'origine de l'induction de la réponse inflammatoire au cours du sepsis (Aziz M *et al.*, 2013).

a. Activation des cellules de l'immunité

i) Réponse immunitaire innée

Au cours des états infectieux, l'immunité innée participe et initie les mécanismes de défense *via* la reconnaissance de motifs moléculaires conservés à la surface des pathogènes, les PAMP (pathogen-associated molecular patterns) comme le LPS ou le peptidoglycane, par des récepteurs de l'hôte, les PRR (pattern recognition receptors), comme les protéines TLR (toll-like receptors) ou Nod (nucleotide-binding oligomerization domain), présents à la surface ou dans le cytosol de nombreuses cellules (macrophages, cellules dendritiques, histiocytes, cellules de Kupffer, mastocytes). Les TLR sont une famille de récepteurs membranaires, tandis que les Nod sont des molécules cytoplasmiques qui détectent les motifs microbiens pénétrant dans la cellule (Athman R *et al.*, 2004; Huet O *et al.*, 2004; Kumar H *et al.*, 2013).

L'interaction des motifs PAMP avec les TLR déclenche les cascades de signalisation qui vont induire la réponse immunitaire et la clairance de l'agent infectieux. L'activation de ces voies de signalisation implique de nombreuses cytokines et molécules associées, nécessaires à l'initiation de la réponse immunitaire adaptative. Au cours du choc septique, le SIRS peut être initié par des produits dérivés des bactéries, comme le lipopolysaccharide (LPS) ou l'acide lipotéichoïque, mais également libérés après lésions cellulaires. La réponse inflammatoire induite par le LPS est un des mécanismes principaux de la défense de l'hôte contre l'agent pathogène (Bosmann M *et al.*, 2013). Le LPS est reconnu par les monocytes et macrophages et transporté par la protéine de liaison LBP (LPS Binding Protein) jusqu'à son récepteur. Le complexe LPS-LBP interagit avec le CD14, une glycoprotéine extracellulaire liée par une ancre GPI (glycosylphospho-inositol) et exprimée par les cellules myéloïdes, corécepteur du TLR4 (Toll Like Receptor 4). 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 induction de l'apoptose (Guha M *et al.*, 2001). Dans le monocyte, le LPS active en effet de nombreuses voies de signalisation intracellulaire, 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 et p38 (Guha M *et al.*, 2001). D'autres ligands, dérivés des bactéries (acide lipotéichoïque, lipopeptides...) ou de l'hôte (protéines intra- ou extracellulaires, lipides oxydés...), peuvent également initier ou amplifier la cascade de signalisation du TLR4.

Les TLR, maillon essentiel de l'immunité innée, interagissent avec des molécules de surface des agents pathogènes. Leur stimulation va activer la cascade de signalisation *via* les MAPK, aboutissant à la translocation nucléaire du NF- κ B et à une modulation de l'expression de différents gènes, avec une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ) ou anti-inflammatoires (IL-10), et une répression d'autres gènes (antithrombine, albumine) (Bosmann M *et al.*, 2013) (figure 8). La famille du NF- κ B comporte 5 protéines fixant l'ADN. En l'absence d'activation, elles sont séquestrées dans le cytoplasme, liées à des protéines inhibitrices du NF- κ B (I κ B). Les 5 protéines, p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50 (NF- κ B1) et p52 (NF- κ B2) partagent un

domaine homologue Rel au niveau de leur extrémité N-terminale qui permet leur liaison à l'ADN et la formation d'homo- ou d'hétérodimères. Leur extrémité C-terminale, en revanche, diffère selon leur mode de synthèse. RelA/p65, RelB et c-Rel, synthétisées sous leur forme mature, possèdent un domaine de transactivation, qui permet l'initiation de la transcription de gènes par NF- κ B. NF- κ B1/p50 et NF- κ B/p52, quant à elles, sont synthétisées par protéolyse à partir de leur précurseur polypeptidique p105 et p100 respectifs. La protéolyse de p105 en p50 est constitutive, tandis que celle de p100 en p52 est étroitement régulée et inductible. Les homodimères de p50 et p52 sont des répresseurs de la transcription, sauf s'ils sont associés à RelA/p65, RelB et c-Rel. Les protéines de la famille I κ B interagissent avec le domaine homologue Rel de NF- κ B afin d'empêcher la localisation nucléaire des sous-unités Rel.

Dans le cytoplasme cellulaire, les dimères NF- κ B sont associés avec I κ B α , I κ B β ou I κ B ϵ , qui sont dégradés suite à un stimulus. Des protéines I κ B atypiques peuvent être induites et interagissent avec le NF- κ B dans le noyau. Bcl-3, liée préférentiellement aux homodimères p50 ou p52, est une oncoprotéine possédant également des domaines de transactivation, permettant ainsi l'initiation de la transcription de gènes par NF- κ B, en présence de co-régulateurs nucléaires. Enfin, IKK β et IKK γ sont responsables de l'activation de la voie de signalisation classique de NF- κ B, *via* la phosphorylation de I κ B, en réponse notamment aux cytokines pro-inflammatoires, et IKK α active la voie alternative de NF- κ B et peut réguler la signalisation médiée par IKK β .

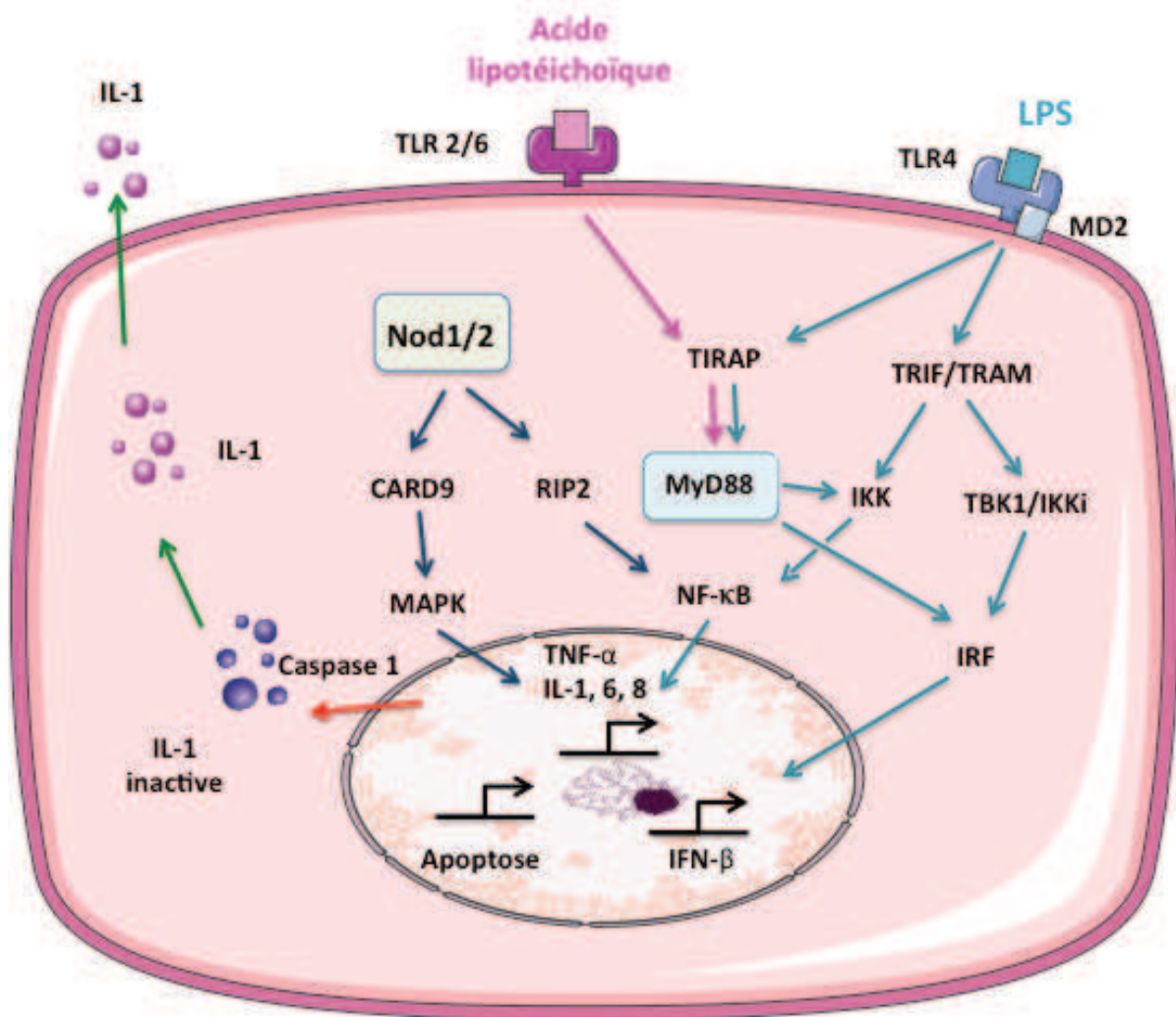


Figure 8 : Signalisation induite par les TLR et Nod

(d'après Kumar H and Bot A, 2013)

Au niveau des monocytes/macrophages et des cellules dendritiques, les récepteurs TLR2/6 (activés par l'acide lipotéichoïque) et TLR4 (activé par le LPS) recrutent MyD88 par l'intermédiaire de TIRAP, conduisant à l'activation de NF-κB. TLR4 recrute également TRIF par l'intermédiaire de TRAM ; TRIF active les kinases TBK1/IKK et le complexe IKK permettant la phosphorylation des IRF responsables de la transcription des gènes de l'interféron beta (IFN-β) et de NF-κB. Les Nod1 et Nod2 cytosoliques recrutent RIP2 et de CARD9 qui activent NF-κB et la voie des MAPK pour induire la transcription des gènes des cytokines pro-inflammatoires et de l'apoptose.

Les TIRAP (Toll/IL-1R domain-containing adaptator protein) sont d'autres protéines adaptatrices spécifiques du TLR2 et du TLR4, qui agissent conjointement avec MyD88. TRIF (TIR-containing adaptator-inducing interferon β) est ainsi responsable de l'induction de la voie de signalisation indépendante de MyD88, et TRAM (TRIF-related adaptator molecule) joue le rôle de co-adaptateur dans la signalisation initiée par le TLR4 (Athman R *et al.*, 2004).

Les molécules Nod1 et Nod2 font partie d'une famille de protéines (nucleotide binding site-leucine-rich repeats proteins, NBS-LRR), impliquées dans le système de détection intracellulaire. Nod1 (aussi appelée CARD4, caspase-activating recruitment domain-4) est exprimée de façon ubiquitaire et reconnaît les deux derniers acides aminés du peptidoglycane des bactéries gram-négatives. Nod2 (CARD15) est principalement exprimée dans les cellules de la lignée myéloïde et reconnaît le MDP (muramyl dipeptide) dérivé du peptidoglycane des bactéries gram-négatives et gram-positives, capable d'induire la production de TNF α et IL-1 β (Athman R *et al.*, 2004).

Nod1 et Nod2 interagissent avec une molécule de signalisation commune, RIP2, *via* des interactions CARD-CARD. RIP2 interagit avec la I κ B kinase γ (IKK γ) avec formation d'un complexe et phosphorylation de I κ B α , qui active le NF- κ B. Ce dernier est ensuite transloqué dans le noyau et induit la transcription de nombreux gènes de l'inflammation. De plus, Nod1 active JNK en réponse à l'invasion par une bactérie. Nod1 et Nod2 pourraient également activer l'apoptose, en interagissant avec les caspases-1 et -9, et auraient un rôle pro-inflammatoire pour Nod1, *via* la caspase-1 qui est capable de cliver la pro-IL-1 β et l'IL-18 en molécules actives sécrétées par les cellules et donc d'intervenir dans le développement de l'inflammation (Athman R *et al.*, 2004) (figure 8). De plus, on peut noter que dans les monocytes, 50% de l'IL-1 β est libérée sous forme active dans les MPs (MacKenzie A *et al.*, 2001).

Après avoir été stimulés par l'endotoxine, les macrophages induisent la libération de nombreux médiateurs proinflammatoires, comme le TNF α , l'IL-1 β , l'IL-6, l'interféron- γ , l'IL-8 et MCP-1, de même que de nombreux médiateurs responsables de lésions tissulaires, comme les dérivés du monoxyde d'azote (NO \cdot) ou les espèces réactives de l'oxygène (ERO). Dans le sepsis, les neutrophiles

activés permettent initialement la clairance des bactéries, mais contribuent également, dans un second temps, aux lésions tissulaires *via* une stimulation du stress oxydant, une cytotoxicité, une dégranulation, une augmentation de la perméabilité vasculaire et des lésions d'organes, liées à la libération de nombreux médiateurs proinflammatoires, de myéloperoxydase (MPO) et protéases. Des cytokines anti-inflammatoires, comme l'IL-10 ou le facteur de croissance tumorale β (TGF β , tumor growth factor β), libérés par les macrophages et les granulocytes neutrophiles, tentent de réguler la réponse immunitaire (Aziz M *et al.*, 2013).

Le système du complément est un élément essentiel de l'immunité innée, qui aboutit à la phagocytose et à la lyse des pathogènes. Le complément peut être activé par différentes voies : la voie classique qui active le C1, C4 et C2 pour produire de la C3 convertase, la voie de la MLB (mannan binding lectin), où la MLB se lie aux glycanes riches en mannose à la surface des bactéries. Cela mène à l'activation des deux premières protéases C1r et C1s de la voie classique, qui aboutit au clivage du C4 et du C2 pour former le C4b2a et la C3 convertase va générer le C3a et C3b. La troisième voie d'activation du complément est liée à l'hydrolyse spontanée du C3, aboutissant à la formation de C3b, qui active ensuite le complément. La voie extrinsèque de l'activation du complément est liée au clivage du C5 en C5a et C5b par des protéases cellulaires, tissulaires ou plasmatiques, comme la thrombine ou les protéases libérées par les neutrophiles et macrophages (Ward PA *et al.*, 2012).

ii) Réponse immunitaire adaptative - activation leucocytaire

La rencontre de l'antigène étranger d'un agent pathogène, *via* les CPA, induit une activation des lymphocytes T dits « naïfs » et leur transformation en lymphocytes T « effecteurs » (helpers) (Th1 et Th2), qui se multiplient. Les cellules dendritiques font partie des CPA et jouent un rôle clé dans l'initiation de la réponse immunitaire adaptative en activant les lymphocytes T et leur différenciation en lymphocytes T effecteurs (Shortman K *et al.*, 2002). Les Th1 libèrent de grandes quantités de TNF α , IL-2, IL-12, interféron- γ et leucotriènes, permettant la destruction et l'élimination des pathogènes. Les Th2, quant à eux, produisent des cytokines immunomodulatrices comme l'IL-4, l'IL-

5, l'IL-9, l'IL-10 et l'IL-13. La plupart des cytokines Th1 sont produites à la phase précoce du sepsis et les cytokines Th2 sont libérées en quantité excessive dans un second temps. Un déséquilibre entre les cytokines Th1 et Th2, au profit des Th2, peut être responsable d'une immunosuppression rendant l'hôte vulnérable par exemple aux infections nosocomiales à la phase tardive d'un sepsis (Verbist KC *et al.*, 2012; Aziz M *et al.*, 2013). Cette phase est caractérisée par une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires et par l'apoptose des lymphocytes B et T (Hotchkiss RS *et al.*, 2006). De plus, la diminution des cellules dendritiques circulantes et dans les organes lymphoïdes participerait à la dysfonction immunitaire secondaire, induite par le sepsis (Tinsley KW *et al.*, 2003; Grimaldi D *et al.*, 2011).

Une infime partie des lymphocytes T effecteurs ne sont pas détruits et constituent un pool de lymphocytes T « mémoire », qui peuvent réagir rapidement si l'organisme rencontre une nouvelle fois le même antigène étranger. Les lymphocytes T mémoire expriment à leur surface des molécules impliquées dans la reconnaissance et l'activation de cellules de l'immunité, des récepteurs à des cytokines et à des facteurs de croissance. Une fois les lymphocytes activés par la rencontre antigénique, ils prolifèrent rapidement et acquièrent des fonctions effectrices leur permettant de produire une grande quantité de facteurs cytotoxiques et immunorégulateurs (Verbist KC *et al.*, 2012). Les granulocytes neutrophiles activés participent aussi à la défense antibactérienne par l'intermédiaire de la phagocytose et régulent la réponse immunitaire adaptative, la libération du contenu des granules sous l'influx ionique et l'émission des NETs (Neutrophil Extracellular Traps) (figure 9) (Amulic B *et al.*, 2012).

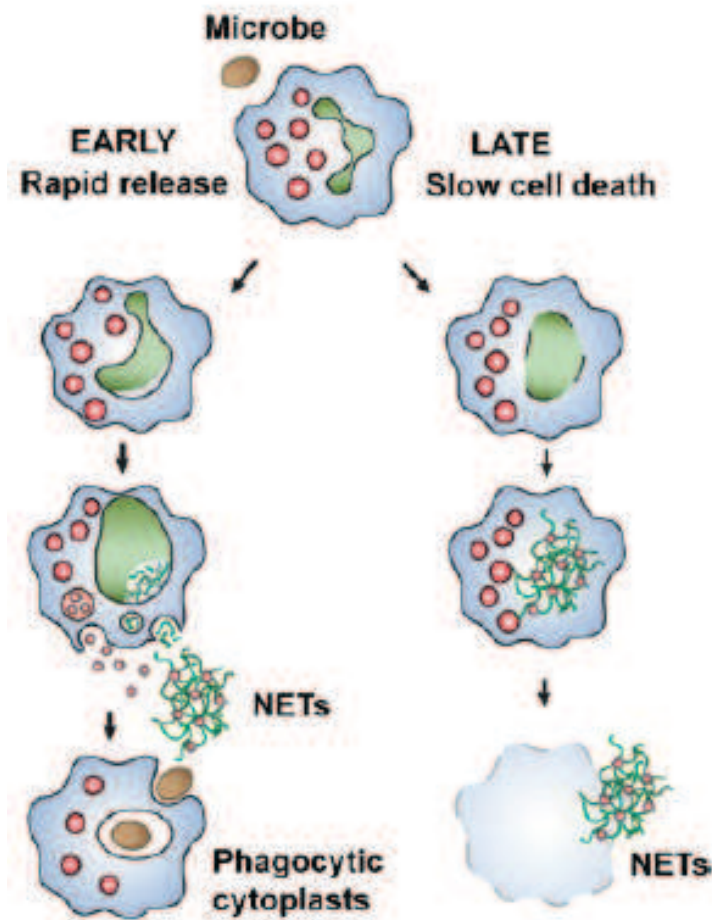


Figure 9 : Voies de la NETose

(Branzk N *et al.*, 2013)

La NETose est une forme de mort cellulaire, associant déroulement de la chromatine, perméabilisation des membranes nucléaires et cellulaire et libération d'ADN, histones et enzymes formant les NETs. La NETose peut être rapide (à gauche) ou plus lente (à droite).

La « NETose » est une forme de mort cellulaire qui associe un déroulement de la chromatine et une perméabilisation des membranes nucléaires puis cellulaires, avec libération de filaments d'ADN, d'histones et de diverses enzymes, dont l'élastase, qui constituent les NETs (Brinkmann V *et al.*, 2012). Contrairement à l'apoptose qui aboutit à la fragmentation de l'ADN, la NETose maintient l'intégrité de l'ADN. Les NETs forment un filet qui entrave la dissémination de l'agent pathogène et focalisent aussi une activité enzymatique en permettant l'interaction avec les enzymes protéolytiques, comme l'élastase leucocytaire. La décondensation de la chromatine serait également facilitée par la

citruillination des histones à partir de l'arginine sous l'action de la peptidylarginine-désaminase 4 (PAD4) (Neeli I *et al.*, 2009). La NETose peut se faire par mort cellulaire, en quelques heures, et dépend notamment de la génération d'ERO (Brinkmann V *et al.*, 2004). Au cours des infections à bactéries gram-positives, on décrit une autre voie de NETose rapide (quelques minutes à une heure), par relargage de vésicules contenant la chromatine décondensée et des protéines antibactériennes granulaires s'associant pour former les NETs (Pilszczek FH *et al.*, 2010). Les neutrophiles anucléés conservent leur fonction de phagocytose, celle-ci ne dépendant pas de la synthèse de nouvelles protéines. Les NETs potentialisent la réponse inflammatoire et la production de cytokines après stimulation par le LPS (Farrera C *et al.*, 2013).

Les leucocytes interagissent avec la cellule endothéliale et facilitent notamment le recrutement de différents acteurs de la cascade de la coagulation, comme les plaquettes ou des facteurs de la coagulation. Les plaquettes activées par le collagène sont capables de provoquer la libération des nucléosomes, qui sont des complexes d'ADN et d'histones, à partir de granulocytes neutrophiles et de diverses protéases. Les nucléosomes peuvent se lier à l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI) et l'inhiber, favorisant ainsi l'extension du thrombus (Farrera C *et al.*, 2013), soulignant l'interaction entre immunité innée et thrombose, *via* les NETs (figure 10).

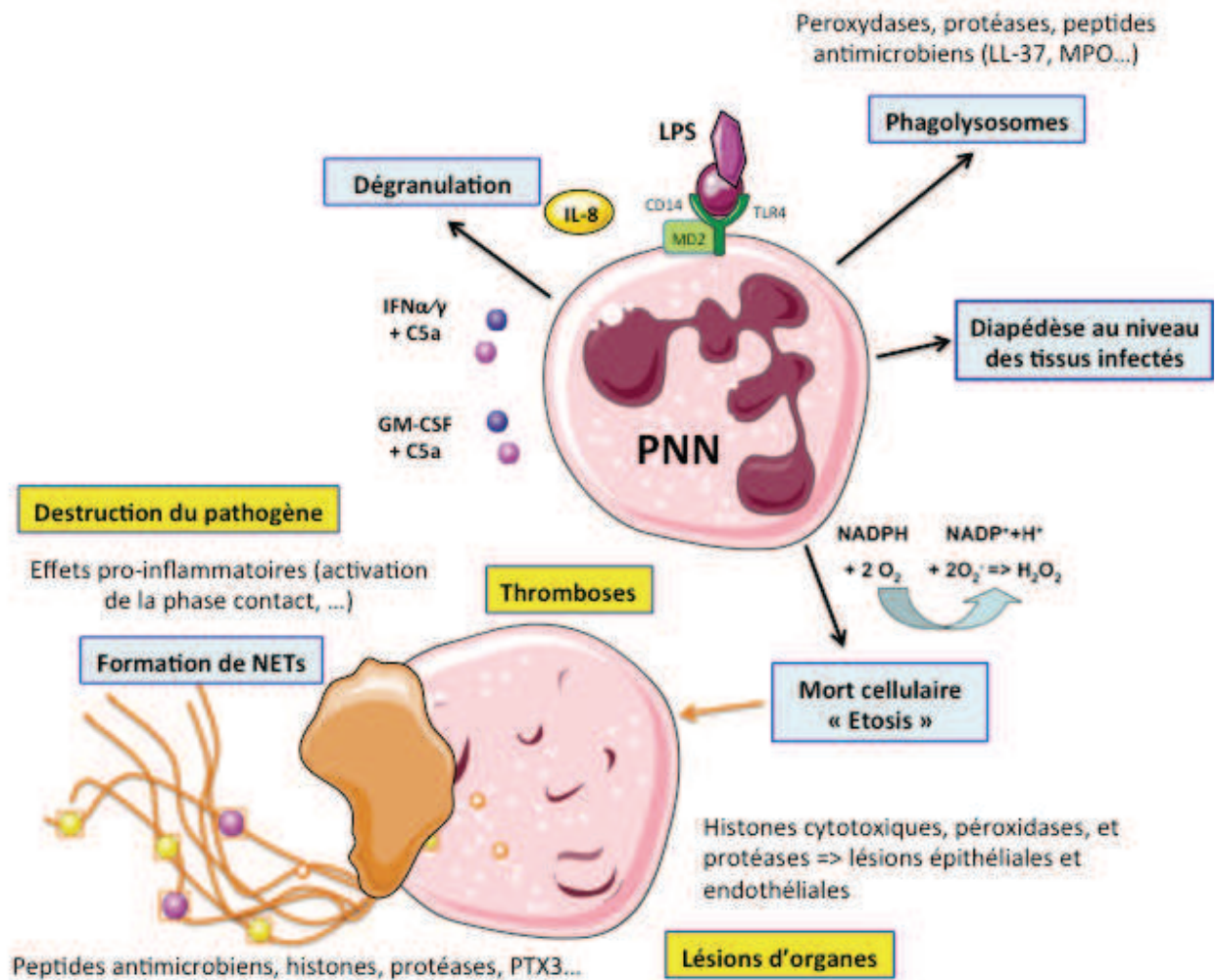


Figure 10 : Rôle de l'activation des granulocytes neutrophiles dans l'interaction inflammation/thrombose

Les granulocytes neutrophiles (PNN) activés par contact avec l'agent microbien pathogène, ou divers stimuli (lipopolysaccharide (LPS), interleukine-8 (IL-8), interférons-alpha ou -gamma ($\text{IFN-}\alpha/\gamma$) ou facteur de croissance hématopoïétique GM-CSF (granulocyte macrophage-colony-stimulating factor) associés à la fraction C5a du complément) sont recrutés dans les tissus inflammatoires et participent à la défense antibactérienne *via* l'émission de NETs (Neutrophil Extracellular Traps). Les NETs sont responsables d'une mort cellulaire (NETose) et permettent la capture de pathogènes et une stimulation de la réponse inflammatoire. Les leucocytes activés recrutés au niveau des lésions endothéliales sont incriminés dans les processus thrombotiques par l'intermédiaire des NETs et des histones. Des complexes d'ADN et d'histones forment les nucléosomes, qui peuvent inhiber l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI) et favoriser l'extension du thrombus.

iii) Susceptibilité génétique aux agents pathogènes

L'immunité innée peut être altérée chez certains individus porteurs de polymorphismes génétiques au niveau de protéines impliquées dans la reconnaissance de l'agent infectieux, comme les récepteurs TLR, l'inflammation ou la coagulation, expliquant ainsi une plus grande susceptibilité génétique aux infections. Ainsi, depuis le début des années 2000, de nombreuses mutations ont été décrites et seraient associées à la survenue plus fréquente de choc septique ou à une plus grande vulnérabilité à certains pathogènes (Schroder NW *et al.*, 2005; Netea MG *et al.*, 2012).

Les mutations ponctuelles des récepteurs TLR ont été parmi les premières décrites. Pour le TLR4, elles seraient responsables d'une diminution de l'interaction entre le récepteur et le LPS, augmentant la susceptibilité des patients aux bacilles gram-négatives (Lorenz E *et al.*, 2002). Des mutations au niveau de nombreux autres récepteurs de la famille des TLR, du CD14, de la mannose binding lectin (MBL), de cytokines et d'interleukines ont par la suite également été mises en évidence (Mira JP *et al.*, 1999; Texereau J *et al.*, 2005; Joram N *et al.*, 2006). L'identification des différents polymorphismes, par l'analyse du génome mènera peut être à l'apparition de nouvelles thérapeutiques ciblant la variante ou l'anomalie génétique, adaptées à chaque patient, mais paraît en tout cas une des pistes de recherche incontournable dans les années à venir (Chiche JD *et al.*, 2002).

b. Inflammation et activation endothéliale

L'activation cellulaire endothéliale peut être définie par une augmentation de production de molécules d'adhésion par des cytokines pro-inflammatoires, avec dommages cellulaires (gonflement, vacuolisation, dénudation). Cette activation aboutit au recrutement des leucocytes par les chimiokines et molécules d'adhésion, avec extravasation dans les tissus environnants.

Le sepsis est également associé à un intense stress oxydant et nitrosant, en rapport avec une libération excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERN), notamment par les leucocytes, et une diminution des défenses antioxydantes endogènes, entraînant des lésions cellulaires, en particulier des cellules endothéliales et musculaires lisses vasculaires (Taylor DE *et al.*, 1995; Annane D *et al.*, 2005). Les stimuli inflammatoires et oxydants/nitrosants altèrent le fonctionnement de l'endothélium (Trzeciak S *et al.*, 2008). L'adhésion leucocytaire et plaquettaire, l'augmentation de la perméabilité capillaire et l'activation de la cascade de coagulation avec dépôts de fibrine, associées à l'altération du tonus vasomoteur, conduisent à un état procoagulant et une perfusion capillaire hétérogène avec une diminution de l'extraction de l'oxygène tissulaire (Vincent JL *et al.*, 2005) et une altération de la signalisation endothéliale intercellulaire (Tymk K *et al.*, 2001).

Les cellules endothéliales s'adaptent à ces changements de manière appropriée (activation endothéliale) ou non (dysfonction endothéliale), en réponse aux stimuli environnementaux, chimiques (TNF α , IL-1, LPS) ou physiques (forces de cisaillement, hypoxie). En cas de dysfonction, l'endothélium devient pro-adhésif, car le NO * n'inhibe plus l'adhésion plaquettaire et l'expression de récepteurs de molécules d'adhésion impliqués dans l'adhésion plaquettaire et leucocytaire, et procoagulant du fait d'une surexpression du FT et d'une diminution de l'expression de la thrombomoduline et la protéine C activée (Boisrame-Helms J *et al.*, 2013) (figure 11).

Le NF- κ B (p65/p50) joue un rôle majeur dans la stimulation inflammatoire de l'endothélium. Il peut être activé par une voie classique et libéré après phosphorylation, ubiquitination et dégradation des I κ B α . Les dimères RelA (p65)/p50 sont ensuite libérés, transloqués dans le noyau et activent la transcription des gènes des molécules d'adhésion, de la cyclo-oxygénase 2 (COX-2), du FT et de

l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type 1 (PAI-1). Dans une autre voie d'activation (voie non canonique), le NF- κ B est activé après protéolyse de la protéine p100, un inhibiteur de RelB. Enfin, dans les cellules endothéliales, le NF- κ B peut aussi être activé par des agents pathogènes *via* les TLR2 et TLR4, qui sont tous deux augmentés dans des conditions inflammatoires (van Hinsbergh VW, 2011). De plus, les cytokines pro-inflammatoires sont responsables de la synthèse de nombreux facteurs liés aux protéines G (COX, phospholipase A₂, 5-lipo-oxygénase et acétyltransférase), qui favorisent l'inflammation *via* la sécrétion de prostaglandines, leucotriènes et du facteur d'activation des plaquettes (Annane D *et al.*, 2005) (figure 11).

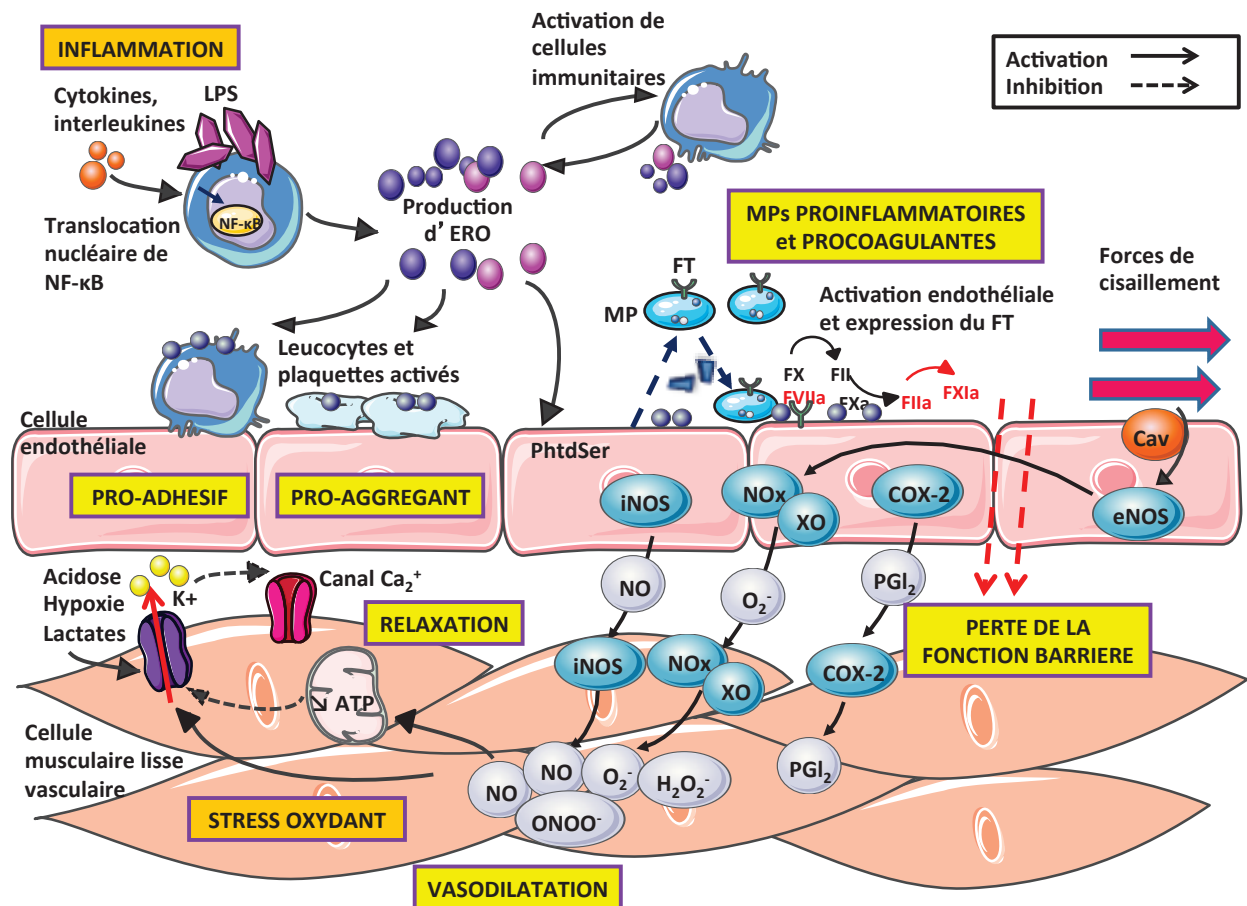


Figure 11 : Dysfonction vasculaire au cours du choc septique

La réponse de l'hôte à un agent pathogène est responsable d'une activation cellulaire et de nombreuses voies de signalisation intra- et intercellulaires, aboutissant à un état pro-inflammatoire et pro-oxydant. L'endothélium devient alors pro-adhésif et pro-agrégant, supporte la génération de microparticules pro-inflammatoires et procoagulantes, la fonction barrière de l'endothélium est altérée et le tonus vasculaire dérégulé, avec pour conséquence une hyporéactivité vasculaire et une vasodilatation.

ATP : adénosine triphosphate, Ca²⁺ : calcium, Cav : cavéoline-1, COX-2 : cyclo-oxygénase-2, eNOS : NO synthétase endothéliale, H₂O₂ peroxyde d'hydrogène, iNOS : NO synthétase inductible, K⁺ : potassium, LPS : lipopolysaccharide, MP : microparticule, NF-κB : facteur nucléaire kappa B, NO : monoxyde d'azote, O₂⁻ anion superoxyde, ONOO⁻ peroxynitrite, PGI₂ : prostacycline, ERO : espèces réactives de l'oxygène, FT : facteur tissulaire, XO : xanthine oxydase.

Les lésions endothéliales s'accompagnent d'une augmentation de l'apoptose cellulaire et de la perméabilité capillaire, expliquant en partie l'hypovolémie majeure (Vallet B, 2003). La perméabilité de l'endothélium est augmentée en raison d'altérations de jonctions serrées et du glycocalyx (Marechal X *et al.*, 2008), conduisant à une fuite de liquide de l'espace intravasculaire avec formation d'œdème, déficit d'extraction de l'oxygène et hypoxie tissulaire (Schouten M *et al.*, 2008). La perte de l'intégrité des jonctions serrées est responsable de l'internalisation de leur composant principal, la cadhérine endothéliale vasculaire (VE-cadhérine), et des fuites endothéliales (Goldenberg NM *et al.*, 2011). Le cytosquelette endothélial joue également un rôle dans la perte de la fonction barrière de l'endothélium : les membres de la famille Rho des guanosine triphosphatases (GTPases) régulent les filaments d'actine, un composant structurel principal du cytosquelette. Dans les pathologies inflammatoires, telles que le sepsis, la régulation des protéines G RhoA est déficiente et favorise la perméabilité de l'endothélium (London NR *et al.*, 2010). Il y a également dépôt et oxydation des LDL dans l'espace sous-endothélial ; le LDL oxydé favorise l'expression de molécules d'adhésion et de récepteurs de chimiokines à la surface de cellules endothéliales, ce qui provoque une infiltration de la paroi vasculaire par les monocytes et les lymphocytes T. L'activation, l'adhésion et la migration leucocytaires sont médiées par les cellules endothéliales, *via* une cascade finement régulée impliquant des molécules d'adhésion (P-sélectine, E-sélectine, ICAM-1, VCAM-1) (Peters K *et al.*, 2003).

Le phénotype pro-adhésif de l'endothélium inflammatoire est renforcé par des modifications des cellules circulantes au cours du sepsis, avec l'activation leucocytaire, les érythrocytes déformés, l'augmentation secondaire de la viscosité sanguine, l'agrégation et l'adhésion (Trzeciak S *et al.*, 2008). L'endothélium devient prothrombotique et antifibrinolytique, favorise l'adhésion plaquettaire et leucocytaire, ce qui perturbe le flux sanguin et la perfusion et contribue à l'hypoxie tissulaire (Lee WL *et al.*, 2011). Les cellules endothéliales vont libérer des cytokines pro-inflammatoires, contribuant à la propagation des lésions microcirculatoires (Nencioni A *et al.*, 2009). Ces cytokines pourraient induire l'expression des métalloprotéinases matricielles (MMP), qui dégradent les protéines de la matrice et les connexions intercellulaires, participant ainsi au remodelage vasculaire (Austin KM *et al.*, 2013).

c. Coagulopathie du choc septique - activation plaquettaire, endothéliale et leucocytaire

Les infections graves, comme le choc septique, sont caractérisées par une activation systémique pathologique de la coagulation et une inhibition de la fibrinolyse réactionnelle (Fourrier F, 2012). La formation de thrombi dans la microcirculation en cas de dérégulation est également observée, 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 (Boisrame-Helms J *et al.*, 2013). En outre, les polyphosphates bactériens de longue taille 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 et a une valeur prédictive de sévérité et de mortalité (Vallet B, 2003; Hartemink KJ *et al.*, 2010; Fourrier F, 2012).

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 (Delabranche X *et al.*, 2012a). Ainsi, l'activation des réactions de coagulation au cours du sepsis permet de limiter la croissance et la dissémination de l'agent pathogène, constituant un mécanisme de défense au même titre que l'immunité innée ou l'activation du complément.

Les cytokines pro-inflammatoires induisent la transcription et l'expression du FT, à la surface des cellules endothéliales et des monocytes, ce qui va initier la cascade de la coagulation en activant le

FVII en FVIIa. Cette cascade aboutit à une génération excessive de thrombine, en raison d'une boucle d'auto-amplification par les FVa et FVIIIa et par l'activation du FXI plaquettaire. La thrombine, liée au fibrinogène, convertit celui-ci en monomères de fibrine, secondairement assemblés en un réseau de fibrine insoluble après action de FXIII, lui-même activé par le complexe thrombine-fibrine (Lane DA *et al.*, 2005).

La fibrinolyse est caractérisée par l'activation du plasminogène lié à la fibrine en plasmine par l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) ou, dans une moindre mesure, par l'urokinase (u-PA). La fibrine est ensuite clivée par la plasmine au niveau de l'extrémité C-terminale de la chaîne α , libérant les produits de dégradation de la fibrine (PDF), dont les D-dimères spécifiques de la dégradation de la fibrine stabilisée (Angles-Cano E, 1994). La génération de plasmine est principalement contrôlée par l'inhibiteur de l'activateur tissulaire du plasminogène (PAI-1) sécrété par les cellules endothéliales, les fibroblastes et les hépatocytes, mais également par l'inhibiteur de la fibrinolyse activable par la thrombine (TAFI) en présence de thrombomoduline. Le TAFI est sécrété par les hépatocytes et diminue la liaison du plasminogène à la fibrine (Morser J *et al.*, 2010). La plasmine générée en excès est neutralisée par l' α_2 -anti-plasmine et l' α_2 -macroglobuline (Schaller J *et al.*, 2011). L'excès de thrombine et/ou le défaut de polymérisation des monomères de fibrine est responsable de la CIVD, avec déplétion en anticoagulants naturels et altération de l'activation de la fibrinolyse (van der Poll T *et al.*, 2014). En effet, la CIVD se traduit par une fibrinolyse retardée par l'augmentation de PAI-1 sécrété par les cellules endothéliales et les plaquettes activées (avec diminution du t-PA) et par l'activation du TAFI (Zeerleder S *et al.*, 2006)

Par ailleurs, plus le sepsis devient grave, plus les systèmes de régulation négative perdent leur efficacité. Les concentrations plasmatiques des anticoagulants naturels (protéine C, protéine S, thrombomoduline et antithrombine) sont diminuées dès les stades précoces des infections graves : la fibrinolyse est particulièrement touchée et le TFPI, qui limite l'activation de la coagulation en interagissant avec le facteur X et la protéine S, est moins actif (figure 12). L'inhibition de l'activation de la fibrinolyse par PAI signe la dysfonction d'organes et a une valeur prédictive de mortalité dans le sepsis et la CIVD (Hartemink KJ *et al.*, 2010).

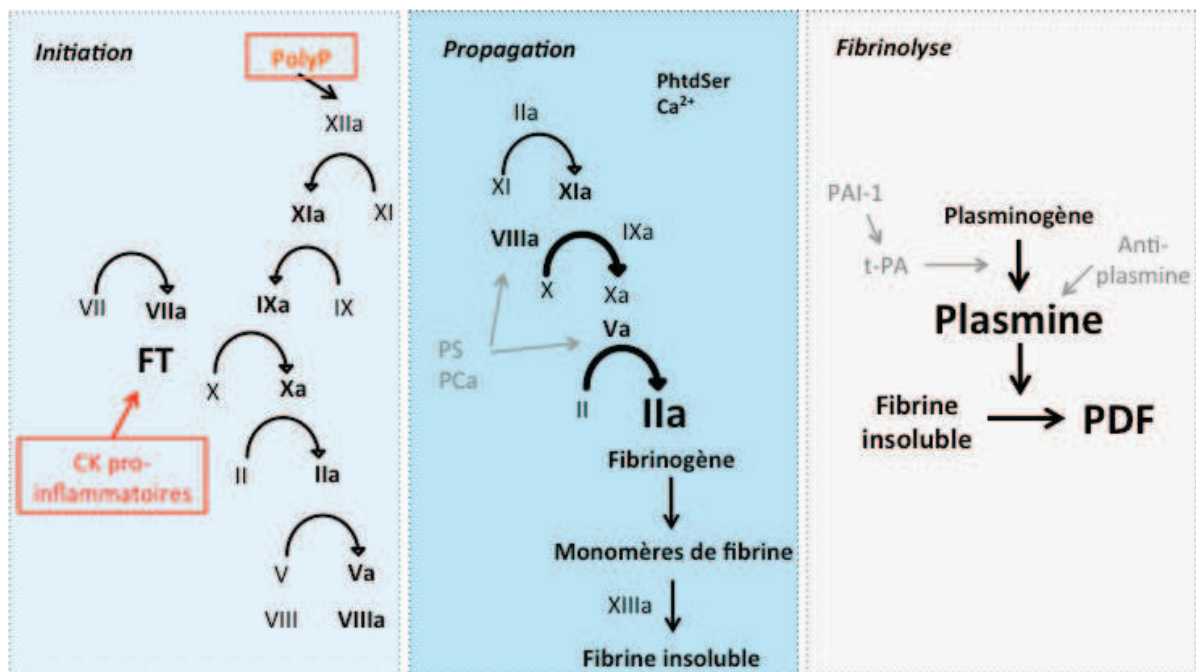


Figure 12 : Coagulopathie du choc septique

Les cytokines (CK) pro-inflammatoires sont responsables d'une activation de la cascade de la coagulation, *via* le facteur tissulaire (FT). Le déficit en inhibiteurs naturels de la coagulation au cours du choc septique va particulièrement affecter la fibrinolyse.

PS : protéine S, PCa : protéine C activée, PAI-1 : inhibiteur de l'activateur du plasminogène, PDF : produits de dégradation de la fibrine, polyP : polyphosphates bactériens, t-PA : activateur tissulaire du plasminogène.

Le rôle de la coagulation dans le sepsis ne se limite pas à la formation de microthrombi. En effet, l'inflammation et la coagulation sont étroitement liées. Les cytokines pro-inflammatoires sont responsables d'une activation de la coagulation. L'IL-6 joue ainsi un rôle dans l'initiation de la cascade de la coagulation, le TNF α et l'IL-1 participent à la régulation de l'anticoagulation dans des conditions physiologiques (van Deventer SJ *et al.*, 1990). De plus, certains facteurs ont des propriétés pro-inflammatoires (FXa, FIIa et FT/FVII(a)) et stimulent la production endothéliale d'IL-6 et IL-8 en augmentant l'expression membranaire de molécules d'adhésion leucocytaires (E-sélectine, VCAM-1, ICAM-1 et MCP-1). La protéine C, outre son activité anticoagulante, module l'activation de l'inflammation médiée par l'endothélium *via* les récepteurs des protéases activées (protease activated receptor, PAR), dont l'activation entraîne la production de cytokines responsables de lésions

tissulaires inflammatoires (Levi M, 2010). L'activation de la coagulation est la conséquence de l'inflammation, mais contribue également directement à la physiopathologie du sepsis. Ainsi, chez les patients septiques, Shapiro *et al.* (Shapiro NI *et al.*, 2010) ont montré que les biomarqueurs d'activation cellulaire endothéliale (notamment PAI-1, E-sélectine soluble, ICAM-1 et VCAM-1) sont corrélés avec la gravité de la septicémie, la défaillance d'organes et la survie. Cela a été confirmé par Furian *et al.* (Furian T *et al.*, 2011), qui ont récemment évalué les indices échographiques de la fonction myocardique, les marqueurs de l'inflammation vasculaire et la dysfonction endothéliale dans les phases précoces de sepsis sévère et ont ainsi mis en évidence que les dysfonctionnements systoliques ventriculaires sont directement associés à certains marqueurs suscités de dysfonction endothéliale et à un mauvais pronostic.

d. Choc septique et activation plaquettaire

Les plaquettes sont des fragments cytoplasmiques dépourvus de noyau, issues de la fragmentation des mégacaryocytes médullaires, de 2 à 3 μm de diamètre et 8 à 10 μm^3 . Leur durée de vie est de 7 à 10 jours. La glycoprotéine Ia (GPIa) s'associe au GPIIa pour former l'intégrine $\alpha 2\beta 1$, impliquée dans l'adhésion plaquettaire au collagène, tout comme GPIIb. La liaison du facteur von Willebrand à la GPIb permet l'adhésion plaquettaire. La GPIb facilite l'activation plaquettaire en formant un complexe macromoléculaire GPIb-IX-V. La GPIIb-IIIa ($\alpha\text{IIb}\beta 3$) activée lie le fibrinogène après activation et participe à l'agrégation. Les plaquettes portent notamment les TLR2 et TLR4, impliqués dans la réponse immune innée, et peuvent synthétiser de l'IL-1 β au cours des processus inflammatoires (Morrell CN *et al.*, 2014). Elles contiennent des granules denses, des granules α , des lysosomes, des mitochondries et des brins d'ARNm. Les granules α renferment des facteurs de croissance (endothéliaux VEGF, plaquettaires PDGF et PF-4), libérés durant l'agrégation plaquettaire. Ces facteurs interviennent dans la régulation de la prolifération, de la différenciation et de la survie de l'endothélium microvasculaire, dans sa réparation et dans l'angiogenèse (Yaguchi A *et al.*, 2004).

Les plaquettes activées interviennent dans l'hémostase primaire en adhérant au collagène du sous-endothélium, formant un clou plaquettaire au niveau des lésions vasculaires, et constituent une surface pour l'assemblage des facteurs de la coagulation. Au cours du choc septique, une thrombopénie et une altération de la fonction plaquettaire sont souvent rapportées. De plus, le LPS et l'acide lipotéichoïque peuvent se lier aux plaquettes et membranes cellulaires endothéliales et inhiber l'agrégation plaquettaire. La fonction sécrétoire des plaquettes est en revanche préservée au cours du sepsis, mais le contenu des granules α est altéré. Ceci serait en rapport avec des modifications au niveau mégacaryocytaire induites par la réponse inflammatoire. L'agrégation plaquettaire est diminuée, mais les plaquettes sont toujours capables d'exprimer les molécules d'adhésion et de libérer le VEGF. Indépendamment de la numération plaquettaire, le sepsis induit une régulation complexe des fonctions plaquettaires, avec une diminution de leur rôle dans l'hémostase, au profit d'autres fonctions, comme la réparation des lésions vasculaires (Yaguchi A *et al.*, 2004) (figure 13).

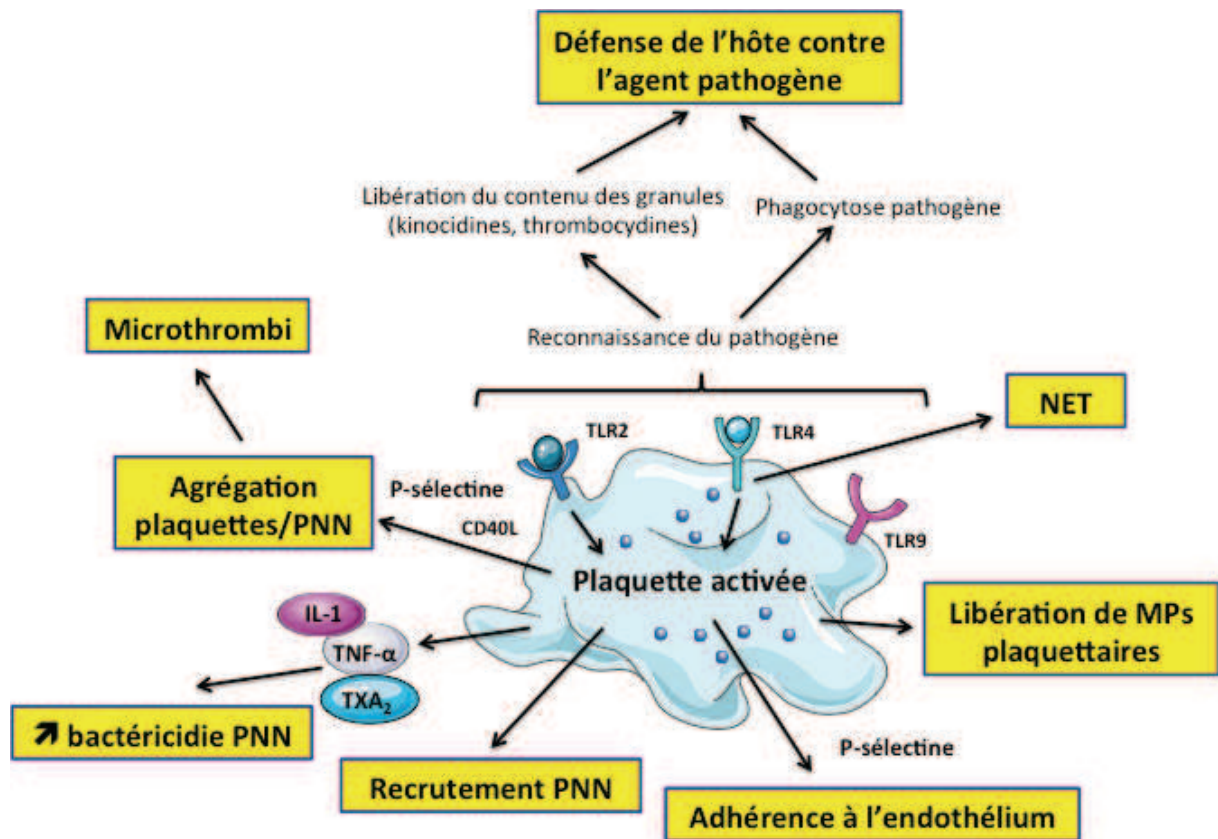


Figure 13 : Rôle de l'activation des plaquettes dans l'interaction inflammation/ thrombose

Les plaquettes interviennent dans l'hémostase primaire (formation du clou plaquettaire au niveau des lésions vasculaires et génération de thrombine), mais également dans la régulation de la réponse immunitaire au cours du sepsis, *via* leurs récepteurs TLR2 et TLR4 et leur capacité à synthétiser de l'IL-1 β au cours des processus inflammatoires. L'activation plaquettaire augmente la synthèse d'interleukines et cytokines, comme l'IL-27 et le CD40 soluble, contribuant à l'altération de la régulation immunitaire au cours du choc septique. Les plaquettes activées sont également capables de provoquer la libération des nucléosomes à partir des granulocytes neutrophiles et de diverses protéases, participant à la formation des NETs (pièges neutrophiles extracellulaires).

Il a récemment été montré que les métalloprotéinases matricielles jouent un rôle essentiel à la fois dans les fonctions endothéliales et plaquettaires. PAR-1 est un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé à la protéine G, exprimé par presque toutes les cellules sanguines circulantes, à l'exception des érythrocytes, et par la paroi vasculaire. PAR-1 est activé par la thrombine (voie canonique) et participe à l'activation plaquettaire (agrégation des plaquettes, changement de forme, adhésion, prolifération cellulaire, production de chimiokines et migration).

Les récepteurs PAR (-1, -2, -3 et -4) sont activés de façon irréversible, par clivage de l'extrémité N-terminale extracellulaire par les sérine-protéases (thrombine, plasmine, protéine C activée, thrombocytine, FXa, FVIIa, kallikréine, trypsine...). PAR-1 peut également être activé par les MMP-1 et MMP-13 (collagénases interstitielles), capables de cliver l'extrémité N-terminale en d'autres sites (voie non canonique), avec génération de néo-ligands spécifiques qui activent la voie de signalisation des protéines G (G_q , G_i et $G_{12/13}$) et ainsi avoir une activité agoniste de PAR-1. MMP-1 est l'enzyme principale responsable de la dégradation du collagène ; elle est exprimée par la plupart des cellules de la paroi vasculaire, de l'inflammation et les plaquettes. La pro-MMP-1 forme un complexe stable avec les intégrines $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha IIb\beta 3$ à la surface des plaquettes. MMP-1 active PAR-1, *via* la voie de signalisation impliquant $G_{12/13}$ -Rho et la MAPK p38, induisant un changement de forme de la plaquette. Cette voie est également impliquée dans la thrombogénèse plaquettaire et la rétraction du caillot (Austin KM *et al.*, 2013). MMP-1 jouerait également un rôle essentiel dans la dysfonction vasculaire du sepsis. Des taux très augmentés de pro-MMP-1 ont été détectés chez les patients septiques et sont corrélés à la survie des patients. MMP-1, *via* l'activation de PAR-1, initie l'altération de la fonction barrière de l'endothélium, en activant la voie Rho. L'inhibition de MMP-1 à un stade précoce du sepsis est associée à une amélioration de la survie de souris septiques KO pour le récepteur PAR-2, mais pas chez les souris KO pour PAR-1. De plus, chez ces mêmes souris, l'administration exogène de MMP-1 aggrave la dysfonction endothéliale par altération de la fonction barrière de l'endothélium, alors que son inhibition diminue la fuite capillaire induite par le sepsis, la CIVD et atténue l'orage cytokinique (Tressel SL *et al.*, 2011).

De récents travaux expérimentaux ont montré que l'activation plaquettaire pouvait de plus contribuer à l'augmentation des concentrations plasmatiques d'interleukines et cytokines, comme l'IL-27 (régulateur des lymphocytes T, avec des effets pro- et anti-inflammatoires, prédicteur d'infection) et le CD40 soluble (membre de la famille du TNF α , prothrombotique et pro-inflammatoire lorsqu'il se lie à son récepteur et corrélé à la mortalité du sepsis), et ainsi contribuer à l'altération de la régulation immune au cours du choc septique (Lorente L *et al.*, 2011; Wong HR *et al.*, 2012; Hamzeh-Cognasse H *et al.*, 2013).

III. Les microparticules, marqueurs pathogènes et cibles thérapeutiques potentielles au cours du choc septique

1) Microparticules, marqueurs potentiels de la dysfonction cardiovasculaire

a. Microparticules et réponse inflammatoire

Dans le vaisseau, les microparticules peuvent être le témoin de l'activation cellulaire et contribuer à l'amplification de la réponse inflammatoire au LPS par la stimulation de différentes voies de signalisation intercellulaire. En effet, chez les animaux traités par du LPS, les concentrations de MPs leucocytaires circulantes sont augmentées et il a été démontré in-vitro qu'elles favorisent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-6) par les cellules endothéliales (Mesri M *et al.*, 1999). Les mécanismes d'amplification de la réponse monocyttaire pourraient être relayés par le récepteur P2X7, de la famille des récepteurs inotropiques ATP-dépendants, à l'origine de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. Ainsi, l'activation de ce récepteur 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 GR, 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 MPs monocytaires. L'IL-1 délivrée par les MPs 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 (MacKenzie A *et al.*, 2001; Chiao CW *et al.*, 2008). En effet, l'activation endothéliale par les monocytes est dépendante

de la concentration en IL-1 β et induit la synthèse et l'expression de molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1) et de E-sélectine, favorisant l'adhésion leucocytaire (Wang JG *et al.*, 2011; Amabile N *et al.*, 2013).

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 (Qu Y *et al.*, 2009). De manière intéressante, les plaquettes, qui possèdent les récepteurs TLR4, seraient capables sous l'effet du LPS d'exporter de d'IL-1 β dans les MPs et de participer au couplage inflammation-thrombose en favorisant la production d'ICAM-1 par les cellules endothéliales (Brown GT *et al.*, 2011).

Enfin, les MPs peuvent contenir d'autres protéines impliquées dans les processus inflammatoires, notamment celles constitutives de l'inflammasome (figure 14), 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 (Wang JG *et al.*, 2011).

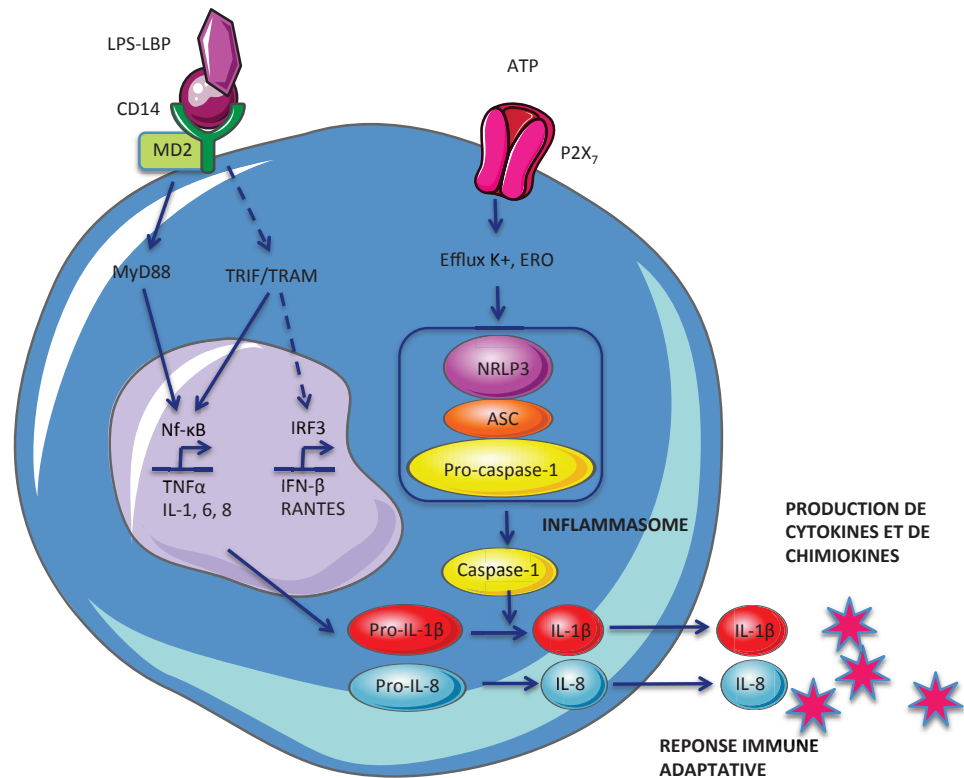


Figure 14 : Inflammasome et réponse immunitaire

Les microparticules contiennent des protéines qui entrent dans la composition de l'inflammasome. Ce complexe multiprotéique intervient dans divers processus inflammatoires. Sa constitution varie selon le signal inducteur. Il induit la synthèse de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires. (LBP : protéine liant le lipopolysaccharide (LPS), NLRP3 : récepteur de type Nod, ASC : protéine adaptatrice, IL : interleukine, IFN- γ : interféron gamma, ERO : espèces réactives de l'oxygène, TNF α : facteur de nécrose tumorale alpha, NF- κ B : facteur nucléaire kappa B).

b. Microparticules et homéostasie vasculaire

Les MPs, en tant que bio-effecteurs procoagulants, pourraient intervenir dans la genèse de la dysfonction cardio-circulatoire caractérisant le choc septique, notamment en agissant sur la régulation du tonus vasculaire. Les MPs 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...) (Amabile N *et al.*, 2013) ; elles constituent un marqueur d'activation, voire d'apoptose, mais aussi de dysfonction endothéliale (Densmore JC *et al.*, 2006; Chironi GN *et al.*, 2010).

Dans le compartiment vasculaire, les MPs circulantes sont capables d'agir à la fois sur les cellules endothéliales qui constituent une surface d'interaction importante (Boulanger CM *et al.*, 2001; Martin S *et al.*, 2004; Tesse A *et al.*, 2005) et parfois sur les cellules musculaires lisses (Pfister SL, 2004; Tesse A *et al.*, 2005) avec une action possible sur la réactivité vasculaire, notamment *via* une régulation de la production cellulaire de NO^{*} (Martinez MC *et al.*, 2005). Au cours de la pré-éclampsie, les concentrations circulantes des MPs lymphocytaires et granulocytaires sont augmentées (VanWijk MJ *et al.*, 2002). Ces dernières sont capables d'induire une hyperactivité vasculaire chez les souris gestantes, *via* une augmentation de l'expression de la 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 COX-2 (Meziani F *et al.*, 2006; Tesse A *et al.*, 2007). Chez les patients diabétiques, coronariens ou insuffisants rénaux, il a également été montré que les MPs 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 CM *et al.*, 2001), par diminution et/ou inhibition de la eNOS (Martin S *et al.*, 2004; Amabile N *et al.*, 2005).

Certaines MPs pourraient également promouvoir l'importante vasoplégie observée au cours du sepsis (Morel N *et al.*, 2006; Mortaza S *et al.*, 2009). L'inoculation des MPs « septiques » chez le rat sain entraîne une diminution significative de la pression artérielle moyenne sans variation significative des débits sanguins carotidien et portal (Mortaza S *et al.*, 2009). 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 OP *et al.*, 1999). Plus récemment, il a été montré que des MPs d'origine lymphocytaire étaient capables d'induire une hyporéactivité vasculaire en induisant la synthèse dans la média de iNOS et COX-2 (Tesse A *et al.*, 2005).

De plus, certaines MPs plaquettaires, porteuses d'O₂^{•-} pourraient être impliquées dans la dysfonction endothéliale en augmentant le stress oxydant et diminuant la biodisponibilité du NO[•] (Brodsky SV *et al.*, 2004; Soriano AO *et al.*, 2005). Janiszewski *et al.* ont en effet montré que les MPs plaquettaires induisent la génération d'ERO par les cellules endothéliales et musculaires lisses et produisent elles-mêmes de l'O₂^{•-}, *via* la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase (Janiszewski M *et al.*, 2004). Or, en conditions pro-oxydantes, le NO[•] réagit avec l'O₂^{•-} pour former du peroxynitrite (ONOO⁻). Ces ERO pourraient par ailleurs être directement impliquées dans l'induction de l'apoptose cellulaire au niveau vasculaire.

Enfin, Pfister *et al.* ont montré que les MPs plaquettaires produisent du thromboxane-A₂, métabolite vasoconstricteur dérivé de l'acide arachidonique et puissant vasoconstricteur, et peuvent ainsi participer à la régulation du tonus vasculaire (Pfister SL, 2004) (figure 15).

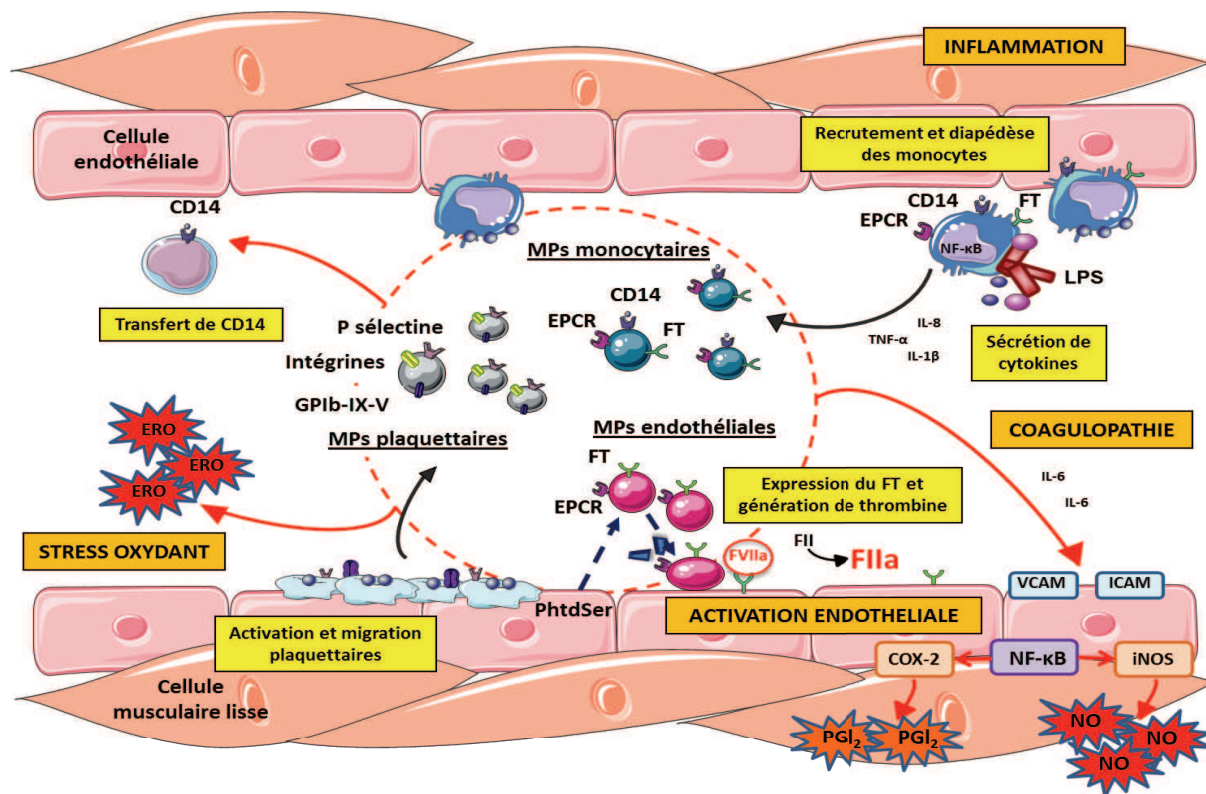


Figure 15 : Activation cellulaire et microparticules au cours du choc septique

Au cours du choc septique, l'interaction hôte-pathogène est responsable de la génération de microparticules (MPs) procoagulantes d'origine endothéliale, plaquettaire, érythrocytaire et granulocytaire. Ces MPs sont responsables d'une dysfonction vasculaire avec altération de la relaxation vasculaire NO-dépendante, génération d'espèces réactives de l'oxygène et inhibition de l'activation plaquettaire. De plus, les MPs sont procoagulantes et pourraient participer à la coagulopathie du choc septique, en exprimant la phosphatidylsérine (PhtdSer) qui permet l'assemblage des facteurs de la coagulation et la génération de thrombine ; les MPs monocytaires et endothéliales portent à leur surface de la thrombomoduline nécessaire à l'activation de la protéine C par la thrombine (FIIa) et le récepteur de la protéine C, EPCR. Enfin, les MPs monocytaires participent à la dissémination d'un potentiel procoagulant en exprimant le facteur tissulaire (FT) à leur surface. (CD14 : cluster de différenciation 14 ; COX-2 : cyclo-oxygénase 2 ; EPCR : endothelial protein C receptor, récepteur de la protéine C ; GPIb : glycoprotéine Ib ; ICAM-1 : intercellular adhesion molecule 1, molécule d'adhésion intercellulaire 1 ; IL : interleukine ; iNOS : NO synthétase inductible ; LPS : lipopolysaccharide ; NF-κB : facteur de transcription nucléaire kappa B ; NO : monoxyde d'azote ; PGI₂ : prostacycline ; TNFα : facteur de nécrose tumorale alpha ; VCAM-1 : vascular cell adhesion molecule 1, molécule d'adhésion cellulaire vasculaire 1).

c. Microparticules et coagulopathie

Les MPs augmentent la surface d'interaction avec les facteurs de coagulation circulants et favorisent 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 MPs ont ainsi un potentiel procoagulant intrinsèque du fait de la PhtdSer, constituant une surface catalytique pour l'assemblage des facteurs de la coagulation vitamine K-dépendants, démontré dans différentes pathologies (Dignat-George F *et al.*, 2004; Morel O, 2005).

Dans la coagulopathie du choc septique, les MPs monocytaires porteuses de FT jouent également un rôle clé dans l'initiation et la propagation de la cascade de la coagulation (Lane DA *et al.*, 2005), participant donc à la dissémination d'un potentiel procoagulant (Satta N *et al.*, 1994; Nieuwland R *et al.*, 2000; Geisbert TW *et al.*, 2003). La génération de thrombine est possible à la surface des MPs porteuses du FT de façon indépendante du FXII de la phase contact. Ces MPs, 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 MPs porteuses du FT est observée 3 à 4 heures après l'injection de LPS et s'accompagne d'une monocytopenie transitoire, suggérant que les MPs constitueraient alors le support principal de la réponse procoagulante dépendante du FT (Nieuwland R *et al.*, 2000; Morel O, 2005). 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 MPs 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 C *et al.*, 2011) (figure 15).

Au cours du sepsis, les MPs plaquettaires favoriseraient une génération accrue de thrombine (Perez-Casal M *et al.*, 2005; Meziani F *et al.*, 2010) dépendant, elle, de l'activation du FXI (plaquettaire) par

la thrombine et du FXII activé par les polyphosphates bactériens (Puy C *et al.*, 2013). 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 PE *et al.*, 2012). On peut noter également que les MPs endothéliales circulantes contribuent à la formation de larges agrégats plaquettaires dans certaines atteintes cardiovasculaires (Heloire F *et al.*, 2003). Enfin les MPs, qu'elles soient endothéliales ou leucocytaires, participeraient au couplage entre inflammation et thrombose (Distler JH *et al.*, 2006; Leroyer AS *et al.*, 2010).

Les MPs sont également impliquées dans la régulation de la coagulation et de la fibrinolyse (Geddings JE *et al.*, 2014), notamment en exprimant un activateur du plasminogène de type urokinase et son récepteur ; leur rôle dans le choc septique reste à définir (Van Der Meijden PE *et al.*, 2012). Enfin, les MPs 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 N *et al.*, 1997). Bien que les MPs monocytaires induites par le LPS soient globalement procoagulantes en raison du FT qui prédomine sur l'activité de la thrombomoduline (Satta N *et al.*, 1997), les capacités cytoprotectrices des MPs endothéliales et monocytaires dépendront de la loi d'action de masse, c'est-à-dire de la quantité de MPs nécessaires au déclenchement d'une réaction pro- ou anti-coagulante dans la cellule cible (Delabranche X *et al.*, 2012a). Ainsi, en délivrant de l'annexine A1, une protéine cytoplasmique anti-inflammatoire, des MPs de neutrophiles participent à la protection endothéliale (Dalli J *et al.*, 2010; Wang JG *et al.*, 2011) (figure 15).

Enfin, les MPs pourraient avoir des effets pro- ou anticoagulants en exhibant à leur surface l'inhibiteur de la protéine C (PCI), aussi appelé inhibiteur de l'activateur du plasminogène 3 (PAI-3). Le PCI est un inhibiteur suicide non spécifique des sérine protéases (serpine) (Geiger M, 2007) et notamment de la protéine C activée. Il s'agit d'une glycoprotéine plasmatique de 57 kDa, synthétisée principalement par le foie (Morito F *et al.*, 1985) et contenue dans les granules alpha des plaquettes. Le PCI sécrété par les plaquettes activées se lie aux phospholipides chargés négativement comme la phosphatidyléthanolamine et la PhtdSer des membranes plaquettaires et des microparticules. La

liaison à la phosphatidyléthanolamine serait capable d'augmenter l'activité inhibitrice du PCI envers la PCa (Nishioka J *et al.*, 1998). Le PCI joue en effet un rôle procoagulant en inhibant la PCa et l'activation de la PC par le complexe thrombine/ thrombomoduline (Suzuki K *et al.*, 1984). Il se lie à la PCa par des liaisons covalentes, formant ainsi des complexes, qui constituent un marqueur d'activation de la coagulation, notamment chez les patients présentant une CIVD (España F *et al.*, 1990). Le PCI est capable d'inhiber d'autres sérine protéases impliquées dans la coagulation et la fibrinolyse, telles que la thrombine, les facteurs X et XI activés, l'urokinase, l'activateur tissulaire du plasminogène et les kallikréines plasmatiques (Nishioka J *et al.*, 1998). L'activité du PCI est modulée par l'héparine, qui se lie à l'hélice H adjacente à la boucle du centre réactif, entraînant un changement de conformation du récepteur et d'affinité du PCI pour les protéases (Huntington JA *et al.*, 2009).

2) Les microparticules dans le choc septique, des cibles modulables ?

La prise en charge thérapeutique du choc septique en réanimation est à la fois étiologique, mais également symptomatique. Le traitement étiologique comporte l'instauration précoce d'un traitement anti-infectieux, consistant généralement en une antibiothérapie probabiliste à large après réalisation des prélèvements à visée microbiologiques, voire en un contrôle chirurgical d'un foyer infectieux dans certains cas. Le traitement symptomatique vise quant à lui à réduire la dette en oxygène liée à une inadéquation entre les apports et les besoins, en améliorant l'état circulatoire et ventilatoire du patient. Des traitements adjuvants à ces mesures clés pourraient également avoir un intérêt et permettre de réduire la morbi-mortalité du choc septique (Delabranche X *et al.*, 2009). Nous détaillerons particulièrement deux thérapeutiques adjuvantes, les émulsions lipidiques de nutrition parentérale et la protéine C activée, auxquelles nous nous sommes intéressés dans ce travail. Puis nous aborderons, sans les détailler, les autres thérapeutiques adjuvantes du choc septique.

a. Nutrition et immunonutrition

Le choc septique est caractérisé par un hypercatabolisme, en rapport avec une modification des métabolismes glucidique, protéique et lipidique, avec pour conséquence une dénutrition rapide et une altération des fonctions immunitaires. Une nutrition précoce et adaptée est, pour cette raison, indispensable (Delabranche X *et al.*, 2009). Les émulsions lipidiques sont le principal pourvoyeur d'énergie dans la nutrition artificielle des malades de réanimation. De plus, le contrôle de l'infection résulte des interactions complexes entre les agents pathogènes, le système immunitaire et l'homéostasie corporelle. Ainsi, l'état hyper-inflammatoire du sepsis est responsable d'un effondrement des défenses antioxydantes et d'une altération de la fonction des lymphocytes. Dans ce contexte, l'immunonutrition, qui consiste en l'administration par voie parentérale ou entérale, de nutriments spécifiques, comme les acides gras n-3, en quantité supérieure à la normale dans le but d'améliorer les fonctions immunitaires, pourrait avoir un intérêt. En effet, les émulsions lipidiques de nutrition parentérale, connues pour moduler les réactions inflammatoires et l'immunité, de façon plus ou moins marquée selon la nature des acides gras qui les composent, pourraient avoir un effet bénéfique chez ces patients, tandis que d'autres émulsions seraient au contraire délétères (Calder PC, 2013). Les acides gras, qui sont les principaux constituants des membranes cellulaires, sont impliqués dans la synthèse des hormones, la signalisation cellulaire, le transport des vitamines liposolubles et interfèrent avec les processus immunitaires et inflammatoires. Les acides gras polyinsaturés (AGPI) n-6 sont ainsi métabolisés en eicosanoïdes pro-inflammatoires dérivés de l'acide arachidonique (AA), tandis que les AGPI n-3, comme l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA), entrent en concurrence avec le métabolisme enzymatique de l'AA. Les eicosanoïdes dérivés de l'EPA sont donc moins pro-inflammatoires que ceux synthétisés à partir de l'AA. Les AGPI n-3 diminuent également la production de cytokines pro-inflammatoires, augmentent la synthèse de cytokines anti-inflammatoires (Calder PC, 2013), diminuent la production leucocytaire d'espèces réactives de l'oxygène et conduisent à la libération de résolvines, qui participent au contrôle endogène

de l'inflammation (Wanten G, 2006). Enfin, les n-3 stabilisent le complexe NF- κ B/I κ B supprimant ainsi l'activation des gènes impliqués dans le processus inflammatoire (Zhao Y *et al.*, 2004).

L'optimisation de la composition des nutriments parentéraux en émulsions lipidiques constitue ainsi un enjeu majeur, afin de moduler la réponse inflammatoire chez les patients critiques, à travers des modifications complexes de la composition et de la structure de la membrane cellulaire et de récepteurs, de la synthèse d'eicosanoïdes, de cytokines et de l'expression de gènes (Calder PC, 2011). En effet, la composition phospholipidique des membranes des cellules immunitaires est modulée par les acides gras exogènes et leur nature conditionne le profil des prostaglandines, leucotriènes et autres médiateurs lipidiques libérés, déterminant ainsi l'ampleur de la réponse inflammatoire. La modulation de la composition membranaire en phospholipides peut également altérer la fluidité de la membrane et l'organisation moléculaire des radeaux lipidiques, ce qui interfère avec l'activité des protéines clés et de la fonction immunitaire (Calder PC, 2012). Plusieurs études expérimentales ont mis en évidence le rôle des radeaux lipidiques dans la médiation de l'immunosuppression induite par les AGPI n-3, suite à leur incorporation membranaire dans les membranes des cellules immunitaires (Yaqoob P *et al.*, 2010). Les membranes des cellules immunitaires sont principalement composées d'AA, mais leur composition en AGPI n-6 et n-3 peut être modulée par l'apport exogène d'EPA et DHA (Calder PC, 2011). De plus, il a été récemment montré que les AGPI n-6 peuvent altérer la fonction endothéliale, entraînant une augmentation de la production de MPs endothéliales circulantes (Sutherland WH *et al.*, 2010).

La composition lipidique des MPs étant dépendante de celle des membranes émettrices et probablement du stress initial, nous avons émis l'hypothèse que toute modification de la composition membranaire de la cellule émettrice pourrait moduler les activités biologiques des MPs et expliquer les effets des émulsions lipidiques de nutrition parentérale sur l'immunité et l'inflammation chez les patients en sepsis.

En réanimation, principalement chez les patients présentant un syndrome de détresse respiratoire aigu (SDRA), la supplémentation par des émulsions lipidiques augmenterait la mortalité et le taux de

complications notamment pulmonaires (Heyland DK *et al.*, 1998), en rapport avec des niveaux élevés d'acides gras n-6 acides gras dans les émulsions (Lekka ME *et al.*, 2004). Cependant, l'huile de poisson pourrait avoir des effets bénéfiques chez les patients septiques (Mayer K *et al.*, 2003a; Mayer K *et al.*, 2003b). Pour réduire les effets délétères de l'apport de doses élevées d'acides gras n-6, tout en remplaçant la source énergétique glucidique par des lipides, des émulsions à base de mélanges d'acides gras, notamment à base de triglycérides à chaîne moyenne ou d'acides gras mono-insaturés (huile d'olive), ont été administrées. De plus, le rapport n-6/n-3 a été considérablement réduit dans les dernières générations d'émulsions lipidiques.

Des études prospectives randomisées, menées chez des patients en SDRA ou en choc septique, ont montré que les produits de nutrition entérale enrichis en n-3, acide gamma-linolénique et antioxydants, amélioreraient l'oxygénation, réduiraient les durées de ventilation mécanique, de séjour en réanimation, le nombre de défaillance d'organes et la mortalité à 28 jours, par rapport aux produits non supplémentés (Gadek JE *et al.*, 1999; Pontes-Arruda A *et al.*, 2006; Singer P *et al.*, 2006). Ces études sont cependant criticables d'un point de vue méthodologique, d'autant que les patients des groupes contrôles étaient nourris avec des émulsions riches en n-6. Plus récemment, l'étude Oméga a évalué les effets de l'administration séparée d'acides gras n-3, d'acide gamma-linolénique et d'antioxydants sous forme de bolus deux fois par jour par voie entérale, chez des patients en SDRA (Rice TW *et al.*, 2011). Cette étude a été arrêtée prématurément après la première analyse intérimaire de 272 patients sur les 1000 inclusions prévues, montrant une réduction de la survie et du nombre de jours sans ventilation mécanique chez les patients qui avaient reçu un bolus de n-3, avec une mortalité hospitalière à 60 jours plus élevée que dans le groupe témoin. L'étude a été critiquée pour l'administration en bolus des immunomodulateurs, soulevant des interrogations quant à l'incorporation des acides gras dans les membranes plasmiques. De plus, la mortalité des patients dans le groupe contrôle était particulièrement basse. Une autre étude menée chez des patients en SDRA, comparant l'administration de bolus intermittents de n-3 à des bolus de soluté salé isotonique, n'a montré aucun bénéfice sur l'inflammation ou la survie des patients (Stapleton RD *et al.*, 2011). Au cours du sepsis, l'apport entéral de n-3, acide gamma-linolénique et antioxydants aurait des effets bénéfiques, avec une diminution du nombre de défaillances d'organes cardiovasculaire et pulmonaire

(Stapleton RD *et al.*, 2011). Toutefois, cette étude a également été très critiquée d'un point de vue méthodologique, notamment sur les critères de sélection des patients.

Au total, les études les plus récentes sur l'immunonutrition sont décevantes (Desai SV *et al.*, 2014) et de nombreuses questions restent en suspens : par exemple, y a-t-il un intérêt à administrer en continu (versus bolus) des formules entérales enrichies en n-3 ? Quel est le meilleur délai pour initier l'administration de la nutrition par rapport à la phase aiguë d'un état de choc ? Au vu des l'ensemble des études cliniques, les dernières recommandations concernant la prise en charge des patients en choc septique ne préconisent pas l'immunonutrition, au sens large (Dellinger RP *et al.*, 2013).

La nutrition parentérale, quant à elle, ne devrait être administrée que lorsque la voie entérale n'est pas praticable (Heyland DK *et al.*, 2003; Martindale RG *et al.*, 2009; Singer P *et al.*, 2009). Les données concernant l'intérêt de la nutrition parentérale sont nombreuses et contradictoires. En effet, une méta-analyse montre qu'elle pourrait améliorer la survie des patients de réanimation, sans effet sur le taux d'infections (Simpson F *et al.*, 2005). Cette analyse est corroborée par une étude montrant qu'une nutrition entérale insuffisante en terme d'apports caloriques serait corrélée au taux de complications, principalement infectieuses, de ces patients (Villet S *et al.*, 2005).

Cependant, l'étude TICACOS (Singer P *et al.*, 2011) sur des patients de réanimation ventilés ne montre pas de différence en terme de mortalité dans le groupe avec des objectifs caloriques déterminés par calorimétrie, avec une nutrition entérale et parentérale de complément comparé au groupe entéral contrôle avec 25 kcal/kg/j, et retrouve un taux d'infections plus important et des durées de ventilation prolongées. L'étude EPaNIC a quant à elle étudié le délai d'introduction de la nutrition parentérale de complément chez des patients de réanimation (J2 versus J8 de réanimation), montrant qu'une nutrition parentérale précoce est associée à un taux d'infections plus important (Casaer MP *et al.*, 2011). Il persiste ainsi de nombreuses interrogations et controverses sur la nutrition des patients de réanimation.

Dans le cadre de l'immunonutrition, d'autres nutriments ont successivement suscité de l'intérêt. Il s'agit par exemple de la glutamine, qui est un acide aminé non-essentiel. Elle constitue le substrat

énergétique des entérocytes et des lymphocytes, impliquée dans le statut d'oxydo-réduction, la synthèse du glutathion et la régulation de la synthèse protéique, des bases puriques et pyrimidiques et dans la signalisation intercellulaire. En l'absence d'apport, la glutamine musculaire est rapidement mobilisée. La supplémentation en dipeptide alanyl-glutamine permettrait de réduire les complications infectieuses et d'améliorer la tolérance métabolique à la nutrition, sans effet sur la mortalité (Delabranche X *et al.*, 2009).

L'arginine, autre acide aminé non essentiel, est le substrat de différentes enzymes, dont l'arginase et la NO synthétase. Elle est le précurseur de la synthèse de l'urée, du monoxyde d'azote, de la créatine et de l'agmatine. Chez l'homme adulte, l'arginine est de ce fait impliquée dans de nombreuses fonctions biologiques, aussi bien dans la physiologie et que dans la pathologie, et notamment dans l'immunité cellulaire, la synthèse de protéines et la cicatrisation. Au cours des dernières années, l'arginine et les inhibiteurs de l'arginase ont ainsi suscité un engouement particulier et ont été étudiés dans différents modèles animaux. L'intérêt de la supplémentation entérale ou parentérale en arginine en pathologie reste pourtant controversé et n'est pas recommandé chez les patients en choc septique (Boisramé-Helms J *et al.*, 2012).

Enfin, la supplémentation en antioxydants et oligo-éléments (vitamine C, vitamine E, sélénium, zinc) semble nécessaire, surtout lorsqu'une nutrition parentérale est administrée. L'état de choc est en effet responsable de la génération d'espèces réactives de l'oxygène et du nitrogène et d'un effondrement des réserves. Les apports optimaux ne sont cependant pas clairement définis.

b. Traitement de la coagulopathie du choc septique

Dans les processus infectieux, l'activation de la coagulation aboutissant *in fine* à la génération de thrombine avec formation de microthrombi, permet notamment de limiter la diffusion des agents pathogènes. Au cours du choc septique, il y a un déséquilibre entre les activateurs (thrombine) et les

inhibiteurs naturels (PCa, antithrombine), avec génération excessive de thrombine pouvant aboutir à la CIVD. La recherche d'un traitement qui permettrait de réduire la coagulopathie du choc septique a conduit pendant plusieurs années à l'utilisation de la PCa.

La protéine C est une sérine protéase plasmatique, vitamine K-dépendante, activée par la liaison du complexe thrombine-thrombomoduline. Il s'agit d'une enzyme anticoagulante et profibrinolytique puissante, capable d'inactiver les facteurs de la coagulation Va et VIIIa et le TFPI (Tissue Factor Plasminogen Inhibitor) (Mosnier LO *et al.*, 2007). Un déficit homozygote en protéine C n'est généralement pas viable en raison de l'apparition de complications thrombotiques extrêmement sévères. Un déficit hétérozygote est quant à lui responsable d'un risque thrombotique veineux accru (Griffin JH *et al.*, 1981).

L'activation de la protéine C à la surface des cellules endothéliales fait intervenir la liaison de la thrombine à la thrombomoduline, qui cache alors l'exosite I procoagulant de la thrombine, et la liaison au récepteur endothélial de la protéine C, EPCR, par l'intermédiaire d'un domaine riche en résidus γ -carboxyglutamate. La liaison de la thrombine à la thrombomoduline permet d'augmenter l'activation de la protéine C d'un facteur 1000 et la liaison à l'EPCR l'accroît encore d'un facteur 20 *in vivo*.

L'activité anticoagulante de la PCa est régulée par la protéine S vitamine-K dépendante et le facteur V (FV). Le FVa peut être inactivé par la protéine S seule, alors que l'inactivation du facteur VIIIa (FVIIIa) nécessite la présence des deux cofacteurs de la PCa, la protéine S et le FV. Seule la protéine S circulante peut agir comme cofacteur de la PCa, alors que la protéine S liée au complexe C4BP du complément n'en est pas capable.

Trois sites de clivage du FVa par la PCa sont identifiés aux positions Arg306, Arg506 et Arg679 et possèdent des propriétés différentes. Ainsi, le site de clivage Arg506 est responsable d'une dégradation plus rapide que l'Arg306, car il est moins dépendant de la protéine S, de la composition phospholipidique et il est inhibé par la liaison du facteur Xa ; un clivage à ce niveau n'engendre qu'une perte partielle de l'activité de la PCa. Au contraire, le site de clivage Arg306 est plus lent,

nécessite la présence de phospholipides chargés négativement et il est dépendant de la protéine S ; un clivage au niveau de ce site résulte en une perte complète de la fonction de la PCa après dissociation des fragments A2. La régulation du FVIIIa par la PCa est plus complexe et nécessite deux cofacteurs, la protéine S et le FV intact. Le FVIIIa est clivé par la PCa au niveau des sites Arg336 et Arg562 (Dahlback B *et al.*, 2005).

La PCa est inactivée par différentes protéases, dont l'inhibiteur de la protéine C (PCI), l' α_1 -antitrypsine et l' α_2 -macroglobuline. Sa demi-vie est cependant prolongée, de l'ordre de 20 minutes (Dahlback B *et al.*, 2005).

En plus de ses propriétés anticoagulantes, la PCa a de multiples effets cytoprotecteurs, médiés par le récepteur PAR-1 (figure 16). Elle aurait en effet la capacité de moduler l'expression de nombreux gènes, et notamment ceux impliqués dans l'inflammation et l'apoptose. Elle diminue ainsi l'expression du NF- κ B, de protéines pro-apoptotiques (p53, Bax) et augmente l'expression de protéines anti-apoptotiques (Bcl-2). La régulation génique par la PCa dépend de l'activation de PAR-1, EPCR-dépendante (Mosnier LO *et al.*, 2007).

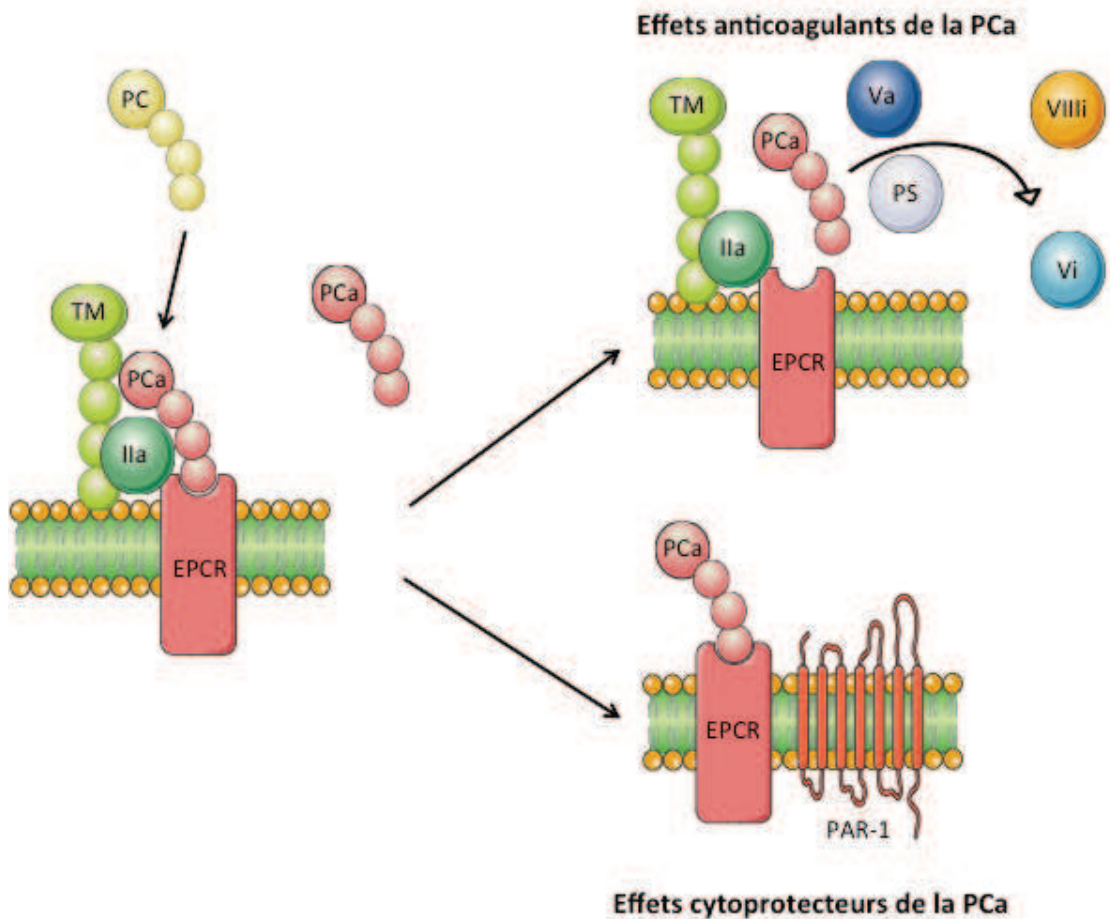


Figure 16 : Activité de la protéine C activée

Activation de la protéine C (PC) au niveau de la membrane cellulaire endothéliale par la liaison de la thrombine (IIa) à la thrombomoduline (TM). Effets anticoagulants de la PCa liés à l'inactivation des facteurs VIII et V activés, en présence de cofacteurs (protéine S - PS et facteur V, cofacteurs lipidiques). Effets cytoprotecteurs (modulation génique, effets anti-inflammatoires, effets anti-apoptotiques, protection de la barrière endothéliale) de la PCa, en présence de ses récepteurs EPCR et PAR-1. PC : protéine C, EPCR : récepteur endothélial à la protéine C, PS : protéine S.

La PCa a également des effets anti-inflammatoires. Tout d'abord, la PCa inhibe la libération de médiateurs de l'inflammation et diminue la libération de molécules d'adhésion vasculaires par les cellules endothéliales, réduisant ainsi l'adhésion et l'infiltration leucocytaires et les dommages tissulaires sous-jacents. Elle maintient la fonction barrière de l'endothélium et réduit le potentiel chimiotactique de plusieurs agents chimiotactiques puissants.

La PCa réduit également la libération de cytokines par les leucocytes et limite ainsi la réponse inflammatoire systémique, notamment au cours du sepsis. En effet, la PCa inhibe la production de médiateurs pro-inflammatoires par les leucocytes, leur accumulation dans les tissus et les phénomènes de chimiotactisme, après stimulation par une endotoxine, mais également *in vivo* (Murakami K *et al.*, 1996; White B *et al.*, 2000; Nick JA *et al.*, 2004). La PCa a enfin des effets anti-apoptotiques, par l'intermédiaire des récepteurs PAR-1 et EPCR, en diminuant la traduction de gènes pro-apoptotiques et en augmentant celle des gènes anti-apoptotiques, mais également en inhibant des caspases initiateurs, comme la caspase-8, et effectrices, comme la caspase-3 (Mosnier LO *et al.*, 2007).

Les cytokines proinflammatoires, comme le TNF α , induisent une réduction de l'activité de la thrombomoduline et donc une diminution de la génération de protéine C (Annane D *et al.*, 2005). Or, il a été montré que des taux de protéine C diminués chez les patients en sepsis sont corrélés à un risque accru de mortalité (Toussaint S *et al.*, 2009). Dans des modèles animaux d'endotoxémie, la PCa recombinante humaine aurait des effets protecteurs sur la microcirculation, par le biais d'une inhibition de l'interaction entre les leucocytes et l'endothélium inhibant leur l'adhésion à l'endothélium, et d'une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires (Hoffmann JN *et al.*, 2004; Iba T *et al.*, 2005; Lehmann C *et al.*, 2006). Dans un modèle d'artères isolées de souris, la PCa améliorerait la dysfonction endothéliale et la contractilité artérielle induite par une endotoxine bactérienne, en augmentant l'activation de la NO synthétase endothéliale (eNOS) et en réduisant l'activation du NF- κ B et l'expression de la NO synthétase inductible (iNOS) (Sennoun N *et al.*, 2009) (figure 17).

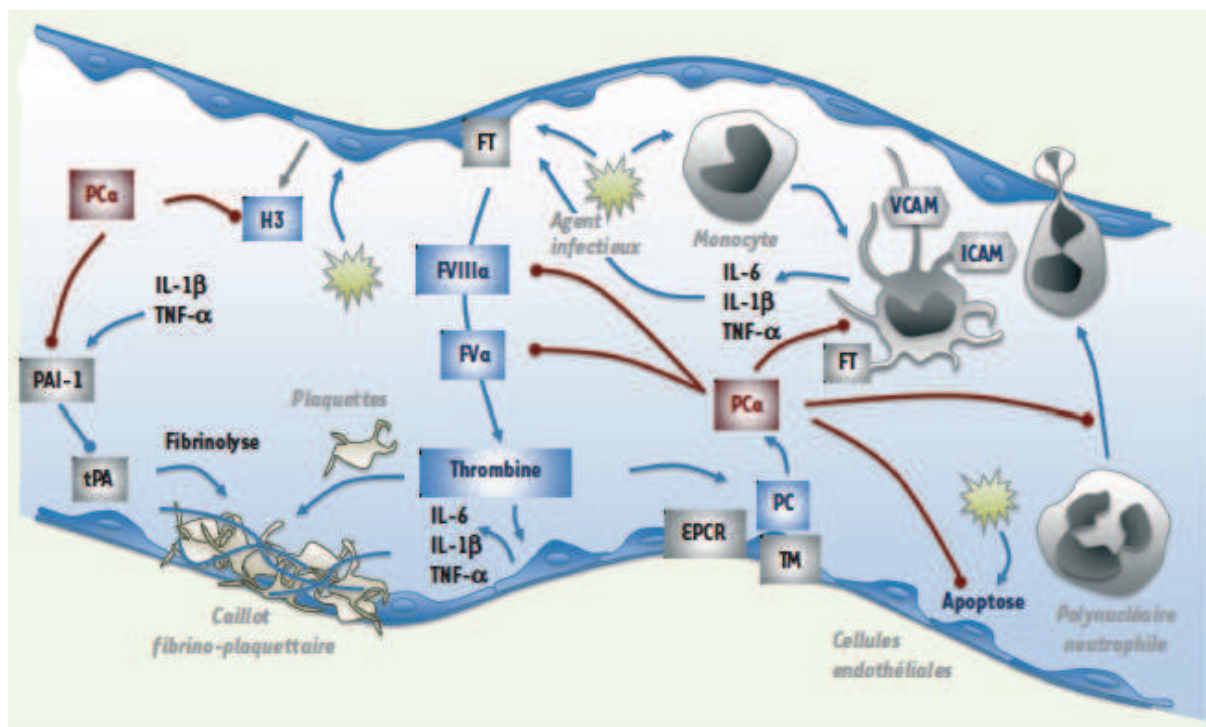


Figure 17 : Effets de la protéine C activée au cours du sepsis.

(Borgel D *et al.*, 2011)

PC : protéine C ; PCa : PC activée ; FT : facteur tissulaire ; TM : thrombomoduline ; EPCR : récepteur endothélial de la protéine C ; t-PA : activateur tissulaire du plasminogène ; PAI-1 : inhibiteur de l'activateur du plasminogène ; H3 : histone extracellulaire 3 ; VCAM : vascular cell adhesion molecule, ICAM : intercellular cell adhesion molecule – molécules d'adhésion ; IL : interleukines ; TNF- α : facteur de nécrose tumorale alpha.

Un traitement par PCa humaine recombinante était considéré comme bénéfique au cours du choc septique, depuis l'étude clinique PROWESS (recombinant human activated Protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis), qui montrait une réduction significative de 19,4% du risque relatif de mortalité (IC 95% : 6,6-30,5%) et une récupération plus rapide de la défaillance cardiovasculaire (Bernard GR *et al.*, 2001). De Backer *et al.* avaient utilisé une technique d'imagerie pour explorer la microcirculation (OPS, orthogonal polarization spectral imaging) et montré que le traitement des patients septiques par PCa améliorerait précocement leur perfusion capillaire (De Backer D *et al.*, 2006). Malgré ces données cliniques et expérimentales intéressants, il a finalement été établi que la

PCa recombinante humaine n'améliore pas la survie à 28 jours des patients en choc septique (Ranieri VM *et al.*, 2012) et le produit a été récemment retiré du marché.

Cependant, il a été montré que le traitement par PCa induit la génération de MP endothéliales porteuses d'une forme biologiquement active du récepteur de la protéine C activée (mpEPCR) (Perez-Casal M *et al.*, 2005). Les MP générées après traitement par la PCa pourraient avoir un effet bénéfique dans le choc septique, en diminuant la réponse inflammatoire, mais aussi en modulant la réponse hémostatique. En effet, elles possèdent des propriétés anticoagulantes, permettant de retarder la formation de thrombine (Perez-Casal M *et al.*, 2005) et pourraient ainsi permettre de restaurer l'équilibre entre système pro- et antithrombotique et donc d'éviter le déclenchement de CIVD (Morel N *et al.*, 2006). Pérez-Casal suggère d'ailleurs que les MPs pourraient véhiculer les effets de la PCa, *via* la liaison de la protéine à son récepteur microparticulaire EPCR, pour inactiver les facteurs de la coagulation Va et VIIIa, avec pour conséquence une diminution de la génération de thrombine (Perez-Casal M *et al.*, 2011). Dans notre travail, nous avons ainsi cherché à moduler pharmacologiquement les MPs par la PCa, afin d'étudier les effets de ces MPs sur la dysfonction hémodynamique du choc septique.

D'autres molécules ont été étudiées, dans le but de moduler la coagulopathie du choc septique, comme l'antithrombine et l'héparine. Au cours du choc septique, on observe une diminution du taux d'antithrombine, mais une supplémentation n'aurait d'intérêt qu'en présence de manifestations thrombotiques de CIVD. La place de l'héparine non fractionnée est débattue depuis de nombreuses années, mais pourrait avoir un intérêt à faibles doses, notamment au cours de la CIVD. Les autres molécules, comme le TFPI, les traitements fibrinolytiques ou antifibrinolytiques ne sont pas indiqués et les concentrés de facteurs vitamine K-dépendants (PPSB) sont contre-indiqués, bien qu'apportant de la protéine C, car il y a un risque majeur de thrombose. La transfusion plaquettaire n'est pas indiquée même en cas de thrombopénie sévère – sauf en cas de syndrome hémorragique – car elle ne ferait que favoriser la formation des microthrombi (Fujishima S *et al.*, 2014; Iba T *et al.*, 2014).

c. Traitement de l'insuffisance surrénalienne

La surrénale est une glande endocrine synthétisant trois classes de stéroïdes : les glucocorticoïdes (cortisol) agissant sur le métabolisme et l'immunité, les minéralocorticoïdes (aldostérone) agissant sur la pression artérielle, le tonus vasculaire et les électrolytes, et les androgènes (testostérone). En cas de stress, il existe une importante stimulation de la surrénale avec une sécrétion de cortisol et dans une moindre mesure d'aldostérone. Les états de choc septiques sont marqués par une insuffisance surrénalienne relative, avec une augmentation insuffisante de la sécrétion de cortisol. Une supplémentation en hydrocortisone a de ce fait été proposée et permettrait d'accélérer la résolution du choc (réduction de la posologie et de la durée d'utilisation des catécholamines) et dans certaines études de la survie (Annane D *et al.*, 2002; Sprung CL *et al.*, 2008; Wang C *et al.*, 2014).

d. Contrôle glycémique

Au cours des états d'agression aiguë, il est habituel d'observer une hyperglycémie, liée à une sécrétion accrue d'hormones hyperglycémiantes (glucagon, hormone de croissance, cortisol et adrénaline) et de médiateurs de l'inflammation (TNF α , IL-6), une insulino-résistance et une diminution de la sécrétion d'insuline par le pancréas. L'hyperglycémie favorise alors d'autres voies métaboliques que la glycolyse avec production d'espèces réactives de l'oxygène, responsables d'un stress oxydant et de modifications de l'immunité innée. Le contrôle glycémique et la prévention des variations brutales de la glycémie (insulinothérapie, réduction des apports de glucose à la phase aiguë d'un état de choc) pourraient ainsi avoir un intérêt en réanimation (Langouche L *et al.*, 2006; Fahy BG *et al.*, 2009).

e. Traitements immunomodulateurs

Au cours des dernières années, plusieurs traitements spécifiques visant à moduler les effets de l'un ou l'autre des médiateurs de l'inflammation ont suscité beaucoup d'intérêt, mais aucun n'a dépassé le stade de l'essai thérapeutique (Fujishima S *et al.*, 2014).

f. Epuration extra-rénale

Un rôle propre de l'épuration extra-rénale lié à l'épuration de cytokines pro-inflammatoires ou à l'épuration des endotoxines bactériennes a été évoqué au cours des dernières années. Cependant, aucune étude de grande envergure ne montre de réduction de la mortalité chez les patients en choc septique, quelles que soient les modalités de l'épuration considérées (hémodialyse, hémofiltration veino-veineuse continue, hauts volumes d'échange d'eau plasmatique, polymyxine B...) (Zhou F *et al.*, 2013).

Au total, le traitement d'un patient en état de choc septique comporte une phase d'optimisation hémodynamique (remplissage, vasopresseurs et inotropes) et un traitement anti-infectieux qui doivent être réalisés sans délai dès le diagnostic – clinique – établi. Mais il existe aussi de nombreux autres traitements, dont l'impact individuel est plus difficile à démontrer sur la mortalité, qui participent à la bonne prise en charge du patient. Ces traitements « adjuvants » ont une place qui doit encore être précisée mais l'amélioration du pronostic des patients en choc septique nécessite une prise en charge « globale » (Dellinger RP *et al.*, 2013).

Objectifs

Le choc septique est une pathologie grave, dont la morbi-mortalité reste très élevée, malgré une prise en charge précoce et optimale. Sa physiopathologie est complexe et encore mal connue, impliquant de nombreuses voies de signalisation et expliquant l'absence de traitement spécifique du choc septique. Les MPs étant générées par des cellules activées et/ou apoptotiques, elles pourraient représenter un outil précieux pour détecter précocement l'activation cellulaire et apporter ainsi une nouvelle approche notamment de la chronologie des mécanismes mis en jeu dans le choc septique, ainsi que leur suivi.

Les objectifs de ce travail de thèse étaient donc de déterminer l'intérêt des MPs :

- comme marqueurs de l'activation cellulaire vasculaire du choc septique
- et comme cibles thérapeutiques.

Le manuscrit s'articule ainsi autour de résultats originaux de recherche expérimentale, cellulaire et animale, et de recherche clinique. Les articles seront présentés et organisés selon nos deux objectifs, les trois premiers travaux visant à montrer la place des MPs comme marqueurs pathogènes, diagnostiques et pronostiques dans le choc septique, et le quatrième avait pour objectif de mettre en évidence la pharmacomodulation des MPs et ses conséquences.

Travaux personnels

Article 1

Lipid emulsions differentially affect LPS-induced acute monocytes inflammation: Effects on membrane remodeling and cell viability

Boisramé-Helms J, Delabranche X, Klymchenko A, Blond E, Drai J, Zobairi F,
Mely Y, Hasselmann M, Toti F, Meziani F

Lipids. 2014 Jul 20.

DOI: [10.1007/s11745-014-3930-7](https://doi.org/10.1007/s11745-014-3930-7).

Notre **premier article** rapporte les effets de différentes émulsions lipidiques de nutrition parentérale sur la modulation de l'inflammation et le remodelage des membranes cellulaires, et la conséquence de ces perturbations sur la vésiculation membranaire, dans un modèle de cellules stimulées par une endotoxine bactérienne. En situation d'agression comme au cours du choc septique, des apports nutritionnels précoces et adaptés constituent une part importante de la prise en charge des patients de réanimation. Les émulsions lipidiques de nutrition parentérale sont capables de moduler la réaction inflammatoire et l'immunité, de façon plus ou moins marquée selon la nature des acides gras qui les composent, en modifiant le profil des phospholipides membranaires des cellules immunitaires. Ainsi, un apport élevé en acide linoléique (C18:2 n-6), précurseur de l'acide arachidonique, oriente préférentiellement la synthèse des eicosanoïdes vers des dérivés pro-inflammatoires, alors qu'un apport en acides gras polyinsaturés n-3, en particulier l'acide eicosapentaénoïque (EPA, C20:5 n-3), l'oriente vers des dérivés moins immunosuppresseurs et moins pro-inflammatoires.

Dans ce travail, les MPs sont présentées comme un outil d'exploration de l'activation cellulaire au cours du choc septique et des mécanismes du remodelage membranaire. En effet, la composition lipidique des MPs étant dépendante de celle des membranes plasmiques des cellules émettrices et probablement du stress initial, toute modification de la composition membranaire de la cellule émettrice pourrait moduler les activités biologiques des MPs et expliquer les effets des émulsions lipidiques de nutrition parentérale sur l'immunité et l'inflammation chez les patients en sepsis.

Nous avons ainsi examiné le rôle de ces émulsions sur le remodelage de la membrane plasmique, incluant la vésiculation membranaire, et sur la réponse inflammatoire de la cellule.

Nous avons mis au point un modèle de culture cellulaire de monocytes humains immortalisés (THP-1) en milieu lipidique, en utilisant différentes émulsions lipidiques industrielles de nutrition parentérale, choisies selon leur composition en acides gras. Les remodelages membranaires ont été étudiés avant et après stimulation par une endotoxine bactérienne, le lipopolysaccharide (LPS), et en présence de différentes émulsions.

Nous avons mis en évidence que la croissance cellulaire des monocytes est ralentie en milieu lipidique et dépend de la composition en acides gras de l'émulsion lipidique. Ainsi, les émulsions à base de

triglycérides à chaînes moyennes (TCM) ralentissent de façon plus marquée la croissance cellulaire, avec une diminution du nombre de cellules vivantes, quantifiées par un test d'exclusion au bleu Trypan. Après stimulation par le LPS, la nécrose et l'apoptose cellulaires quantifiées par cytométrie en flux sont augmentées (respectivement triplée et doublée) et la concentration de MPs émises dans le surnageant, mesurée par un test prothrombinase, est triplée en milieu enrichi en TCM, comparé au milieu enrichi en triglycérides à chaînes longues (TCL). Les TCM et TCL sont incorporées de manière différente dans la membrane des monocytes. De plus, les membranes des MPs émises par les monocytes traités par les différentes émulsions sont caractérisées par une désorganisation de la structure lipidique de leur bicouche mise en évidence par une sonde biphotonique et reflète la désorganisation des membranes parentales.

En conclusion, ce travail suggère que les émulsions lipidiques industrielles utilisées pour la nutrition parentérale modulent la viabilité cellulaire, la vésiculation membranaire et la composition des membranes des monocytes. Ces effets pourraient expliquer l'effet qualitatif cellulaire des différentes émulsions lipidiques rapportés par d'autres.

=> *Ce travail est publié :*

Boisramé-Helms J, Delabranche X, Klymchenko A, Draï J, Blond E, Zobairi F, Mely Y, Hasselmann M, Toti F, Meziani F.

Lipid Emulsions Differentially Affect LPS-Induced Acute Monocytes Inflammation: In Vitro Effects on Membrane Remodeling and Cell Viability.

Lipids. 2014 Jul 20. DOI: 10.1007/s11745-014-3930-7.

(impact factor 2,6).

Lipid Emulsions Differentially Affect LPS-Induced Acute Monocytes Inflammation: In Vitro Effects on Membrane Remodeling and Cell Viability

Julie Bokrami-Helms · Xavier Delabranche · Andrey Klyuchenko · Jocelyne Drai · Emilie Blond · Fatima Zohairi · Yves Mely · Michel Haedermann · Florence Toti · Ferhat Meziani

Received: 27 May 2014 / Accepted: 10 June 2014
© AACS 2014

Abstract The aim of this study was to assess how lipid emulsions for parenteral nutrition affect lipopolysaccharide (LPS)-induced acute monocyte inflammation *in vitro*. An 18 h long LPS induced human monocyte leukemia cell stimulation was performed and the cell-growth medium was supplemented with three different industrial lipid emulsions: Intralipid[®], containing long-chain triglycerides (LCT—soybean oil); Medialipid[®], containing LCT (soybean oil) and medium-chain triglycerides (MCT—coconut oil); and SMOFlipid[®], containing LCT, MCT, omega-9 and -3 (soybean, coconut, olive and fish oils). Cell viability and apoptosis were assessed by Trypan Blue exclusion and

flow cytometry respectively. Monocyte composition and membrane remodeling were studied using gas chromatography and NR12S staining. Microparticles released in supernatant were measured by prothrombinase assay. After LPS challenge, both cellular necrosis and apoptosis were increased (threefold and twofold respectively) and microparticle release was enhanced (sevenfold) after supplementation with Medialipid[®] compared to Intralipid[®], SMOFlipid[®] and monocytes in the standard medium. The monocytes differentially incorporated fatty acids after lipid emulsion challenge. Finally, lipid-treated cells displayed microparticles characterized by disrupted membrane lipid order, reflecting lipid remodeling of the parental cell plasma membrane. Our data suggest that lipid emulsions differentially alter cell viability, monocyte composition and thereby microparticle release. While MCT have deleterious effects, we have shown that parenteral nutrition emulsion containing LCT or LCT and MCT associated to n-3 and n-9 fatty acids have no effect on endotoxin-induced cell death and inflammation.

Electronic Supplementary Material The online version of this article (doi:10.1007/s11745-014-3930-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

J. Bokrami-Helms · X. Delabranche · M. Haedermann · F. Meziani (✉)
Service de Réanimation Médicale, Nouvel Hôpital Civil,
Hôpital Universitaire de Strasbourg, 1 place de l'Hôpital,
67000 Strasbourg, France
e-mail: ferhat.meziani@chu-strasbourg.fr

J. Bokrami-Helms · X. Delabranche · F. Meziani
EA 3072, Fédération de Médecine Translationnelle de
Strasbourg (IMTS), Faculté de médecine, Université de
Strasbourg, 4 rue Kirschleger, 67000 Strasbourg, France

A. Klyuchenko · F. Zohairi · Y. Mely · F. Toti
Laboratoire de Biophysique et Pharmacologie, UMR 7213
CNRS, Institut de Pharmacie, Université de Strasbourg, 24 rue
du Rôtir, 67401 Illkirch-Grœnwalden, France

J. Drai · E. Blond
Laboratoire de Biochimie Centre Hospitalier Lyon Sud Pierre
Béteux et CurMeN-INSERM U1060-Université Claude Bernard
Lyon 1, 165 chemin du Grand Revoire, 69695 Pierre Bénite,
France

Keywords Lipid emulsion · Monocyte · Membrane remodeling · Inflammation · Microparticles · Sepsis

Abbreviations

Ctrl	Control
DHA	Docosahexaenoic acid
EPA	Eicosapentaenoic acid
IL	Intralipid
LCT	Long-chain triglyceride(s)
LPS	Lipopolysaccharide(s)
MCT	Medium-chain triglyceride(s)
ML	Medialipid
MP	Microparticle
NF- κ B	Nuclear factor kappa B

Published online: 20 July 2014

Springer AACS

PEser	Phosphatidylserine
PUFA	Polyunsaturated fatty acid(s)
SD	Standard deviation
S	SMOFlipid
THP-1	Human monocytic leukemia cells
TLR4	Toll-like receptor 4

Introduction

Fatty acids, which are a major cell membrane component, are involved in immune and inflammatory processes [1]. Long-chain triglyceride (LCT) $n-6$ polyunsaturated fatty acids (PUFA) are metabolized into pro-inflammatory arachidonic acid-derived eicosanoids, while eicosanoids derived from $n-3$ PUFA, mainly eicosapentaenoic acid (EPA), are less pro-inflammatory. In addition, $n-3$ PUFA enhance anti-inflammatory cytokine release, decrease leucocyte reactive oxygen species production and lead to resolvin release, contributing to the endogenous inflammation control [2].

Optimizing the composition of lipid emulsions for parenteral nutrition [1–3] is a major challenge and could help to modulate the inflammatory response in critically ill patients, through changes in the cell membrane composition, in eicosanoid and cytokine production and in gene expression [1, 4]. Modulating cell membrane phospholipid composition may indeed alter membrane fluidity and lipid raft organization, and thereby interfere with the activity of key membrane proteins involved in immune cell signaling [5]. Several experimental studies have shown the regulatory role of lipid rafts through the incorporation of functional $n-3$ PUFA, which limits T cell activation and the immune response [6–8]. Moreover, a concentration-dependent supplementation in DHA has been shown to induce apoptosis and to decrease the proliferation of various cancer cells. Lipid peroxidation and reactive oxygen species formation would account for these cytotoxic effects [9]. Interestingly, Sutherland et al. [10] have recently demonstrated that the ingestion of $n-6$ PUFA may acutely alter the endothelial function, resulting in an increased generation of circulating endothelial microparticles. Microparticles are submicron vesicles, released into the extracellular environment, in response to stress, after plasma membrane remodeling and fatty acid remodeling [11]. Circulating microparticles behave as vascular and cellular effectors [12–14] and could play a deleterious role by initiating inflammatory processes, apoptosis and multiple organ failure during sepsis in both animals and humans [15–18]. As leucocytes, and more specifically monocytes, are key players in host inflammatory response against the

pathogen, the purpose of this study was to assess the role of three different parenteral nutrition lipid emulsions in the modulation of monocyte response and microparticle release in a cell culture model of LPS-stimulated monocytes.

Materials and Methods

Material and Reagents

Cell culture reagents (sodium pyruvate, non-essential amino acids, gentamycin and β -mercaptoethanol, Trypan Blue) and medium (RPMI 1640) were from Biosciences (Walkersville, MD, USA). Heated fetal calf serum (complement- and endotoxin-free) was from GIBCO-Life technologies (Cergy-Pontoise, France). Lipopolysaccharide (LPS, *E. coli* serotype O127:B8) was from Sigma-Aldrich (L'Isle d'Ahaut, Chesse, France). The following industrial lipid-in-water emulsions designed for intravenous infusion were used (see Table 1 in the Supplementary Material for the detailed composition): Intalipid[®] (soybean oil 200 g/L—LCT) and SMOFlipid[®] (soybean oil 60 g/L, coconut oil 60 g/L, olive oil 50 g/L, fish oil 30 g/L—LCT, MCT, $n-9$, $n-3$) were from Fresenius-Kabi (Bad Homburg, Germany) while Medialipid[®] (soybean 300 g/L, coconut oil 100 g/L—LCT, MCT) was from B Braun (Melsungen, Germany). Lipid emulsions were prepared in small aliquots and stored under an inert gas atmosphere to avoid oxidation. Antibodies and control immunoglobulins were from Beckman-Coulter (Brea, CA, USA), Jackson (Suffolk, UK) and Invivogen (Toulouse, France).

Cell Culture and Lipid Emulsions Challenge

THP-1 (ATCC TIB-202) human monocytic leukemia cells, obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) were cultured in a RPMI 1640 medium supplemented with 10 % (v/v) fetal calf serum, 1 mM sodium pyruvate, 100 mM non-essential amino acids, 10 μ g/mL gentamycin and 20 μ M β -mercaptoethanol (0.02 % v/v). THP-1 were challenged or not with LPS (15 μ g/mL) for 18 h, in medium containing the different industrial lipid emulsions.

Preliminary cell culture experimentations were set to determine the concentrations of triglycerides with minimum toxicity. Cell growth was assessed in culture medium supplemented with each lipid emulsion using final triglycerides concentrations ranging from 0 to 20 g/L and compared to standard medium. A triglyceride (in emulsion) concentration of 0.5 g/L (0.05 % v/v) was selected, because it enabled an optimal cellular growth and a response to LPS. The composition of culture medium (without cells) was analyzed in the presence or absence of

0.5 g/L of triglycerides, leading to a 20-fold increase in triglyceride concentration, whereas cholesterol, protein and glucose concentrations remained unaffected (Table I in the Supplementary Material). In our model, the volume of lipid emulsion added to the medium was limited, there was no significant difference in pH and osmolality in medium supplemented with the different lipid emulsions. In addition, although their fatty acid composition differs, the total molecular weight of the different emulsions was not different either (data not shown).

Measurement of Microparticles

Microparticles were isolated from cell supernatants after a double centrifugation step at $600\times g$ for 7 min to remove cells and debris, then at $13,000\times g$ for 45 min. A ring of lipids was present at the top of supernatants immediately removed by gentle aspiration. Then, the supernatant was discarded and the microparticle pellet was further concentrated in 0.9 % NaCl or sterile Hank's balanced salt solution supplemented with 1 mM CaCl_2 . Microparticles were captured on insolubilized Amexis-V and their PafSer content was measured by prothrombinase assay as previously described [19]. Blood clotting factors (11.2 μM FXa, 33.3 μM FVa and 1.2 μM FII—HypHEN Biotech, Neuville sur Oise France) and calcium (2.0 mM CaCl_2) concentrations were set to ensure that PafSer is the rate-limiting parameter in the generation of soluble thrombin from prothrombin [19]. Results were standardized and expressed as nanomolar PafSer equivalents (nM Eq. PafSer) for 10^5 cells by reference to a standard curve constructed with liposomes of known composition and concentration [20].

Cell Necrosis and Apoptosis

Cell necrosis was assessed through Trypan Blue staining (0.2 % v/v final) and cell count. Apoptosis was evaluated by flow cytometry using propidium iodide (Sigma-Aldrich, L'île d'Abeau, Charente, France) (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) labeling in ethanol-permeabilized cells [21]. 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 QuestSM software (Beckton-Dickinson). The forward and side light scatter and fluorescence channels were set as logarithmic gains.

Gas Chromatography

Total fatty acids were extracted from each cell pellet re-suspended in PBS buffer, using a chloroform/methanol mixture (1:1, v/v). C17:0 was added as an internal standard. The extract was washed with a Hank's balanced salt solution to remove protein. The chloroform phase was

concentrated under a stream of nitrogen and re-dissolved in chloroform/methanol. The dry residue was dissolved with HCl methanolic to generate fatty acid methyl esters (FAME). FAME were then separated from non-methylated fatty acids by thin-layer chromatography on silica gel plates (Merck 572) using dichloromethane as the developing solvent [22]. The plates were sprayed with bromophenol blue and individual bands of methyl ester lipids were scraped off into separate tubes. Methyl esters were removed by 900 μl hexane and analyzed by gas-liquid chromatography on a Trace GC-ThermoFilter gas chromatograph (Thermo Separation Products, Les Ulis, France) equipped with a CP-SIL fused silica capillary column (25 m \times 0.25 mm internal diameter) coated with 100 % cyanopropyl siloxane 88 phase 0.2 μm (Chrompack, Les Ulis, France) with helium as the carrier gas and a split ratio of 1:20.

The initial temperature was 120 °C for 1 min, then brought to 20 °C/min up to 165 °C, then up to 210 and 250 °C thereafter. Identification of individual methyl ester components was made by frequent comparison of the retention times with those of suitable standards. The results were expressed in mol%.

Staining of Plasma and Microparticle Membranes with NR12S and Fluorescence Spectroscopy

Nile Red 12S (NR12S), a probe that assesses the lipid order of model and cellular membranes, was synthesized as previously reported [23, 24]. To stain the cell or microparticle suspensions with the NR12S probe, an appropriate aliquot of NR12S stock solution in DMSO (Sigma-Aldrich, L'île d'Abeau, Charente, France) was added to 0.5 mL Hank's balanced salt solution. After vortexing, the solution was immediately added to 0.5 mL of the cell or microparticle suspension to obtain a final probe concentration of 50 nM (<0.25 % DMSO). The final cell concentration after three washes with Hank's balanced salt solution was 1×10^6 cells/mL. Microparticles (20 nM Eq. PafSer) were also stained after three washings ($3000\times g$, 1 h) and a filtering using a Millipore[®] filter (0.1 μm). All staining procedures were performed using a probe prepared less than 1 min earlier in Hank's balanced salt solution to circumvent the slow aggregation of the probe in water. Before measurements, the cell or microparticle suspension was incubated with the probe for 7 min at room temperature in the dark.

Absorption spectra were recorded on a Cary 4 spectrophotometer (Varian) and fluorescence spectra on a FluoroMax 3D (Jobin-Yvon, Horiba) spectrofluorometer. Fluorescence emission spectra were systematically recorded at a 530 nm excitation wavelength at room temperature. All the spectra were corrected from the fluorescence

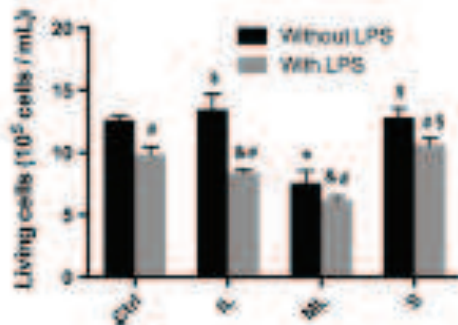


Fig. 1 Monocyte viability in non-stimulated and LPS-stimulated conditions, in standard medium (Ctrl), or in medium supplemented with lipid emulsions containing long-chain triglycerides (IL—Intralipid[®]), or a mixture of medium and long-chain triglycerides only (ME—Medialipid[®]) or associated with omega 9 and 3 (S—SMOFipid[®]). Trypan blue staining, $n = 4$, \pm SD. * $p < 0.05$ vs Ctrl, [‡] $p < 0.05$ vs Ctrl-LPS, [§] $p < 0.05$ vs condition without LPS, [¶] $p < 0.05$ vs ME, [†] $p < 0.05$ vs ME-LPS

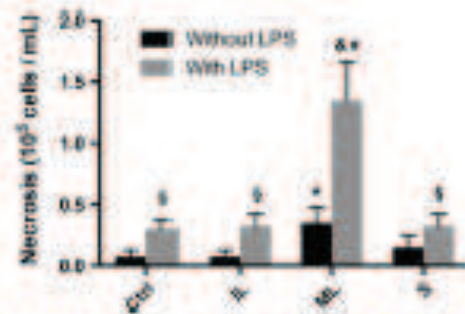


Fig. 2 Monocyte necrosis in non-stimulated and LPS-stimulated conditions, in standard medium (Ctrl), or in medium supplemented with lipid emulsions containing long-chain triglycerides (IL—Intralipid[®]), or a mixture of medium and long-chain triglycerides only (ME—Medialipid[®]) or associated with omega 9 and 3 (S—SMOFipid[®]). Trypan blue staining, $n = 4$, \pm SD. * $p < 0.05$ vs Ctrl, [‡] $p < 0.05$ vs Ctrl-LPS, [¶] $p < 0.05$ vs condition without LPS, [†] $p < 0.05$ vs ME-LPS

of the corresponding blank (suspension of cells or micro-particles without the probe).

Statistic

In vitro experiments were performed three to twelve times. The non-parametric Kruskal-Wallis test was used for comparison of in vitro measurements between the groups. Whenever a significant difference was found between groups, subsequent Dunn post hoc tests were performed. All values are presented as means \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

Medium-Chain Triglycerides Decrease Cell Viability and Increase LPS-Induced Cell Mortality

Lipid emulsions containing MCT or a mixture of LCT and MCT significantly impaired the viability of LPS-treated cells (control-LPS) in a time- and concentration-dependent manner (Figs. 1a, b, 2a, b in the *Supplementary Material*), mainly after supplementation with MCT (Medialipid[®]) (Intralipid[®]: $8.4 \pm 0.2 \times 10^5$ cells/mL or Medialipid[®]: $6.2 \pm 0.3 \times 10^5$ cells/mL vs control-LPS: $9.9 \pm 0.6 \times 10^5$ cells/mL, $p < 0.05$) (Fig. 1). The emulsion containing a mixture of MCT/LCT/9/6-3 (SMOFipid[®]) had no effect on cell viability, which was comparable to values obtained in LPS-treated cells (SMOFipid[®]:

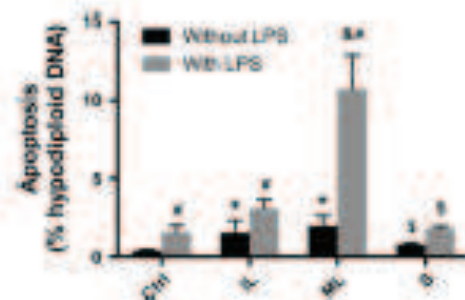


Fig. 3 Monocyte cell apoptosis in non-stimulated and LPS-stimulated conditions, in standard medium (Ctrl), or in medium supplemented with lipid emulsions containing long-chain triglycerides (IL—Intralipid[®]), or a mixture of medium and long-chain triglycerides only (ME—Medialipid[®]) or associated with omega 9 and 3 (S—SMOFipid[®]). Flow cytometry, $n = 3$, \pm SD. * $p < 0.05$ vs Ctrl, [‡] $p < 0.05$ vs Ctrl-LPS, [¶] $p < 0.05$ vs condition without LPS, [†] $p < 0.05$ vs ME, [†] $p < 0.05$ vs ME-LPS

$30.6 \pm 0.6 \times 10^3$ cells/mL vs control-LPS: $9.9 \pm 0.6 \times 10^3$ cells/mL) (Fig. 1).

In non-stimulated conditions (control without LPS), MCT supplementation (Medialipid[®]) significantly increased cell necrosis ($0.4 \pm 0.1 \times 10^5$ cells/mL vs control without LPS $0.1 \pm 0.1 \times 10^5$ cells/mL) and apoptosis (2.0 ± 0.6 % vs control without LPS 0.4 ± 0.1 %) ($p < 0.05$). A similar deleterious effect of MCT was observed after LPS stimulation, with a high degree of induced necrosis ($1.4 \pm 0.3 \times 10^5$ cells/mL vs control-LPS $0.3 \pm 0.1 \times 10^5$ cells/mL) and apoptosis (10.7 ± 2.2 % vs control-LPS 1.6 ± 0.4 %) ($p < 0.05$). In contrast, LCT supplementation (Intralipid[®]) had no effect on LPS-induced cell mortality (Figs. 2, 3). Similarly, the emulsion containing a mixture of MCT/LCT/9/6-3

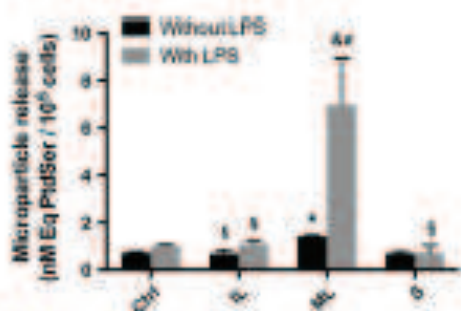


Fig. 4 Release of procoagulant microparticles non-stimulated and LPS-stimulated conditions in standard medium (Ctrl), or in medium supplemented with lipid emulsion containing long-chain triglycerides (IL—Intralipid[®]), or a mixture of medium and long-chain triglycerides only (ML—Medialipid[®]) or associated with omega 9 and 3 (S—SMOFlipid[®]). Prothrombinase assay, $n = 4$, \pm SD. * $p < 0.05$ vs. Ctrl, # $p < 0.05$ vs. Ctrl-LPS, ^ $p < 0.05$ vs. conditions without LPS, ^ $p < 0.05$ w. ML, ^ $p < 0.05$ w. ML-LPS

(SMOFlipid[®]) had no significant effect on cell necrosis and apoptosis, compared to the control, whether cells were treated with LPS or not (Figs. 2, 3).

Medium-Chain Triglycerides Increase LPS-Induced Procoagulant Microparticle Release

Medium-chain triglycerides (Medialipid[®]) significantly increased the generation of procoagulant microparticle in the absence of LPS challenge (1.4 ± 0.1 nM Eq PtdSer/ 10^5 cells vs. control 0.7 ± 0.1 nM Eq PtdSer/ 10^5 cells, $p < 0.05$), as well as in the presence of LPS (7.0 ± 2.0 nM Eq PtdSer/ 10^5 cells vs. control-LPS 1.0 ± 0.1 nM Eq PtdSer/ 10^5 cells, $p < 0.05$). Microparticle release remained unaffected when cells were challenged with LCT (Intralipid[®]) or with the mixed emulsion containing MCT/LCT/ ω -9/ ω -3 (SMOFlipid[®]), whether associated with LPS or not (Fig. 4).

LPS Affects Monocyte Fatty Acid Composition

We investigated monocyte fatty acid composition, using gas chromatography. We showed that LPS stimulation significantly decreased the integration of most fatty acids into the cell (C16:0, C18:0, C18:1 n -9, C18:1 n -7, C18:2, C18:3, C20:4 n -6 and C22:6 n -3) compared to non-stimulated monocytes (Table 1).

Monocytes Incorporate Medium-Chain Fatty Acids after Lipid Emulsion Challenge

C8:0 and C10:0 were neither detected in monocytes in basal or endotoxemic conditions (THP-1 or THP-1 + LPS),

nor in monocytes treated with MCT-free lipid emulsions. Cell exposure to lipid emulsion containing MCT (Medialipid[®] and SMOFlipid[®]), whether associated with LPS stimulation or not, led to C8:0 and C10:0 incorporation, independently of the MCT content in the lipid emulsions (Table 1).

Parenteral Lipid Emulsions Alter Monocyte Composition in Long-Chain Fatty Acids

Treating monocytes with lipid emulsions affected their content in bioactive fatty acids, with a significant increase in C16:0, C:18:0, C18:1 n -9 and C18:2 in non-stimulated and LPS-stimulated conditions, compared to untreated monocytes (Table 1).

Compared to other lipid emulsions, the emulsion containing only LCT (Intralipid[®]) prompted an eight to ninefold increase in C18:2 and a two to threefold rise in C18:3 in non-stimulated and LPS-stimulated states, respectively. Compared to LPS-stimulated monocytes, the emulsion containing a mixture of MCT/LCT/ ω -9/ ω -3 (SMOFlipid[®]) significantly increased the amount of C18:2, but this increase was significantly lower than with Intralipid[®] and Medialipid[®] (Table 1).

Treatment by Lipid Emulsions Decreases the Plasma Membrane Lipid Order of Parental Cells and Has Major Consequences on the Membrane Structure of Derived Microparticles

In intact cell suspensions, the maximum emission observed after staining with NR12S was centered at 595 nm. The microparticles harvested from the supernatant of such cells (THP and THP-LPS) showed a slightly red shifted spectra, indicating that the formation of microparticles was associated with a small decrease in the membrane order. Remarkably, the treatment of cells with any mixture of unsaturated lipids modified the spectrum of released microparticles that was characterized by a significant red shifted emission of NR12S centered at 604–605 nm, close to that observed in model membranes of pure disordered phase (Fig. 5).

Discussion

Fatty acid supplementation leads to plasma membrane remodeling and may thus affect immune functions with clinical consequences in patients with inflammatory diseases. In the present study, we developed a cell culture model using LPS-stimulated monocytes and assessed the effects of a lipid emulsion-enriched medium on acute inflammatory stress and cell membrane remodeling.

Table 1 Monocyte fatty acid composition after treatment with lipid emulsions containing long-chain triglycerides (IL—Intralipid[®]), a mixture of medium- and long-chain triglycerides only (ML—Medialipid[®]) or associated with omega 3 (S—SMOFlipid[®])

Fatty acids	Ctrl	IL	ML	S	Ctrl + LPS	IL + LPS	ML + LPS	S + LPS
C8:0	0 ± 0	0 ± 0	9.3 ± 1.0**	12.7 ± 1.9**	0 ± 0	0 ± 0	9.8 ± 1.4***	11.9 ± 0.3**
C10:0	0 ± 0	0 ± 0	2.2 ± 0.6**	2.9 ± 0.5**	0 ± 0	0 ± 0	2.6 ± 0.6***	6.0 ± 2.5**
C12:0	2.3 ± 0.3	1.4 ± 0.0	2.4 ± 0.5	1.4 ± 0.2	2.5 ± 1.1	1.7 ± 0.6	2.0 ± 0.5	2.0 ± 0.7
C14:0	3.1 ± 1.0	1.4 ± 0.2	1.9 ± 0.4	2.0 ± 0.4	3.4 ± 0.7	1.5 ± 0.2	1.8 ± 0.4	1.9 ± 0.2
C16:0	36.1 ± 2.1	21.1 ± 1.2**	22.6 ± 1.1**	21.3 ± 1.1**	29.7 ± 2.2**	22.6 ± 1.0**	22.7 ± 1.6**	20.5 ± 0.5**
C16:1	4.6 ± 1.8	2.1 ± 0.2	2.6 ± 0.6	3.3 ± 0.2	4.4 ± 0.6	2.0 ± 0.2	2.4 ± 0.2	3.3 ± 0.4
C18:0	11.3 ± 2.3	10.6 ± 0.6**	11.1 ± 0.5**	9.7 ± 0.5**	13.6 ± 1.5	9.9 ± 0.6**	9.6 ± 1.2	8.6 ± 1.3
C18:1 n-7	15.6 ± 2.5	16.3 ± 1.5**	17.3 ± 0.8**	19.8 ± 1.1**	17.2 ± 0.7	17.9 ± 1.4**	16.8 ± 2.5***	20.0 ± 2.5**
C18:1 n-7	7.3 ± 1.7	7.3 ± 0.5**	5.3 ± 0.7	5.4 ± 0.2	9.2 ± 1.5	3.1 ± 0.3*	3.4 ± 0.4*	3.5 ± 0.6*
C18:2 n-6	4.4 ± 2.1	27.5 ± 0.8**	14.3 ± 0.7**	10.0 ± 0.8**	3.5 ± 0.3**	29.4 ± 1.1**	18.6 ± 1.6**	11.4 ± 0.7**
C18:3 n-3	0.8 ± 0.6	2.8 ± 0.3**	1.0 ± 0.0	0.8 ± 0.2	1.5 ± 0.3	3.6 ± 0.8**	1.5 ± 0.2	1.1 ± 0.2
C20:4 n-6	6.5 ± 0.8	4.6 ± 0.4	5.0 ± 0.5	5.0 ± 0.3	7.2 ± 0.9	4.1 ± 0.3	4.5 ± 0.5	4.8 ± 0.5
C20:5 n-3	2.3 ± 1.9	1.4 ± 0.2	1.3 ± 0.3	1.8 ± 0.2	2.3 ± 0.2	1.1 ± 0.1	1.2 ± 0.7	1.6 ± 0.5
C22:6 n-3	5.5 ± 0.9	3.6 ± 0.3	3.6 ± 0.6	4.7 ± 0.3	5.6 ± 0.6	3.0 ± 0.1	3.2 ± 0.6	3.6 ± 0.8

Gas chromatography, ** $p < 0.01$ vs Ctrl, * $p < 0.01$ vs Ctrl + LPS, $n = 6$, $n/6$ ± SD

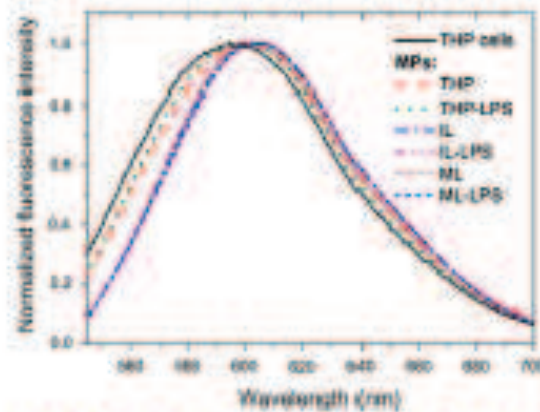


Fig. 5 Normalized fluorescence spectra of NR125 (50 nM) in intact cells (THP cells) and in microparticles (MP) after treating cells with lipid emulsions containing long-chain triglycerides (IL—Intralipid[®]), or a mixture of medium and long-chain triglycerides (ML—Medialipid[®]), in the presence or absence of LPS, $n = 3$

First, our data suggest that MCT supplementation specifically blunt monocyte survival in a time- and concentration-dependent manner. These results are consistent with previous data showing that MCT, but not LCT, alter neutrophil functions [25, 26], with inhibitory effects on chemotaxis, phagocytosis, and bacterial killing *in vitro* [27, 28]. In our model only small volumes of lipid emulsions were added to the medium (0.05 %), thereby excluding any unspecific pH and osmolality effects. Watten et al. [29] showed that MCT induced oxygen radical production in unstimulated neutrophils, contrary to LCT. Oxidative stress

could therefore trigger increased cell injury and mortality. The lipid emulsions contain different amounts of α -tocopherol (vitamin E), which are used to prevent lipid peroxidation and could act as a pharmacological modulator for inflammatory diseases. Interestingly, the vitamin E concentration is nearly six times higher in Medialipid[®] and SMOFlipid[®] than in Intralipid[®] (Table 1 in Supplementary Material). In our present experiments, vitamin E antioxidative properties are not likely to account for the deleterious effect of Medialipid[®], compared to Intralipid[®] or SMOFlipid[®].

LPS challenge led to both cellular necrosis and apoptosis in medium enriched with emulsions containing MCT (Medialipid[®]), while a mixture of MCT/LCT/n-3 (SMOFlipid[®]) did not promote significant necrosis and seemed to be more neutral towards cells. These data are consistent with previous studies, showing that n-3 PUFA have beneficial effects, notably through the modulation of the immune response [30]. We have thus established MCT as pro-apoptotic agents. The enhanced apoptotic evidenced in the present work is also in line with previous studies demonstrating that supplementing the culture medium with fatty acids induces cell apoptosis [31, 32].

As expected from numerous data, microparticle generation by THP-1 was correlated with apoptosis [33]. Microparticles were shown to induce macrophage apoptosis by enhancing the free non-esterified arachidonic acid pool, resulting in an alteration of membrane lipid homeostasis [34]. Interestingly, we have shown that the release of microparticle is not increased by n-3 fatty acids, in accordance with previous data showing that platelet- and monocyte-derived microparticle levels are significantly

lower in post-myocardial infarction patients treated by $n-3$ fatty acids [35]. Since MCT lipid emulsions led to increased procoagulant microparticle release, one may hypothesize that MCT more dramatically interfere with cell membrane composition and might deeply modify cell membrane composition and structure.

It is well known that in a culture medium deprived of essential fatty acids, glucose induces lipogenesis and high rates of *de novo* fatty acid biosynthesis [36], which may further take part in the cellular metabolism. We have shown how supplementing the medium with lipid emulsions induces changes in monocyte composition, with differential incorporation of MCT and LCT. Although MCT are hydrophilic and mainly have an energetic function, our data have shown that a proportion of MCT is incorporated into the monocyte and involved in apoptosis and microparticle generation. Finally, some fatty acids like CLA3, which is increased in the monocyte after LCT treatment, might have some beneficial effects with subsequent decreased necrosis and apoptosis. It has indeed been previously shown that $n-3$ -inoleic acid (CLA3, $n-3$) has anti-oxidative and anti-inflammatory properties, leading to decreased apoptosis in different cell types [37–40].

The present study also demonstrates that LPS interferes with the action of fatty acids from parenteral nutrition. First, we have shown that without any lipid supplementation, some fatty acid chains are decreased in cell after LPS challenge, which may be due to fatty acid consumption for eicosanoid synthesis and inflammatory processes initiation. Secondly, fatty acids are differentially incorporated into the cell after LPS stimulation. The inflammatory response induced by LPS is a major mechanism of host-pathogen interactions, responsible for the secretion of pro-inflammatory cytokines and induction of apoptosis [41]. Fatty acids alter TLR4 signaling pathways, through lipid raft modulation. Kim et al. [42] have indeed recently shown that TLR4 receptor recruitment into lipid rafts is modulated by $n-3$ fatty acids, leading to the down-regulation of TLR4-mediated signaling. The anti-inflammatory actions of $n-3$ fatty acids would include the modulation of cellular membranes and lipid raft composition, the inhibition of nuclear factor kappa B (NF- κ B) transcription, with a subsequent decrease in inflammatory gene expression and the activation of anti-inflammatory transcription factors [43, 44]. It has also recently been shown that fish oil alters innate and adaptive B cell function, by increasing the membrane order and the size of lipid rafts, both effects being responsible for functional changes [45, 46]. In our study, we have shown that the plasma membrane order is altered by a lipid emulsion treatment. Indeed, the maximum emission of the spectrum observed in intact cells is centered at 595 nm, an intermediate value observed between the ordered (572 nm) and disordered (605 nm)

phases of model lipid membranes [23], which was expected given that the outer membrane leaflet consists of lipids forming ordered and disordered phases [47, 48]. Interestingly, THP-1 cell treatment by lipid emulsions produced a limited decrease in the lipid order of the cell plasma membrane, in accordance with the limited apoptosis and microparticle generation in non-stimulated conditions. Strikingly, microparticles released from lipid-treated cells showed subsequent high disorder in their membranes. It is thus tempting to hypothesize that after the action of exogenous fatty acids, the cells generate microparticles from those parts of the plasma membranes that present a liquid disordered phase. In this way, the cells might preserve a relatively high order of their plasma membrane even after treatment with unsaturated lipids.

Conclusions

In this cell culture model of LPS-stimulated monocytes, we have shown that MCT decrease monocyte growth, increase their mortality and stimulate the subsequent procoagulant microparticle release. These effects may be partly explained by MCT-induced cell membrane disorders. In contrast, emulsions containing LCT or MCT/LCT/ $n-9/n-3$ seemed to be more neutral, without deleterious effects on monocyte viability, membrane remodeling and MP shedding.

Study Limitations

How fatty acids have an effect on membrane fluidity and metabolic pathways remains to be elucidated by *in vivo* studies. The clinical relevance of the results of this study using parenteral nutrition in septic shock has yet to be established by *in vivo* studies.

Acknowledgments We thank Professor Thomas J. Bach for his revision of our manuscript and Doctor Daniel Romberg for the care he has shown in proofreading it. This work has been supported by the French Society of Clinical Nutrition and Metabolism (Société Française de Nutrition Clinique et Métabolisme, SFNCM), the Aneurin Association for Respiratory Failure Help at Home (Association Des Insuffisants Respiratoires Aneurin Lorraine, AIDRAL) and the Association for Research Development in Intensive Care (Association pour le Développement de la Recherche En Réanimation, ADRER).

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest.

References

1. Watten GL, Calder PC (2007) Immune modulation by parenteral lipid emulsions. *Am J Clin Nutr* 85:1171–1184
2. Wachberg DL, Tomlinson RS (2009) Fish oil lipid emulsions and immune response: what clinicians need to know. *Nutr Clin Pract* 24:497–499

1. Waxen G (2006) An update on pancreatic lipids and immune function: only smoke, or is there any fire? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 9:79–83
2. Calder PC (2011) Fatty acids and inflammation: the cutting edge between food and plasma. *Eur J Pharmacol* 668(Suppl 1):S50–S58
3. Calder PC (2012) Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. *J Nutr* 142:592S–598S
4. Yaqoob P (2009) The nutritional significance of lipid rafts. *Annu Rev Nutr* 29:257–282
5. Xavier R, Brissau T, Li Q, McCormack C, Seed B (1998) Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. *Immunity* 8:723–732
6. Siddiqui RA, Harvey KA, Zaloga GP, McNeill W (2007) Modulation of lipid rafts by Omega-3 fatty acids in inflammation and cancer: implications for use of lipids during nutrition support. *Nutr Clin Pract* 22:54–68
7. Zajdel A, Wilczok A, Chodnicki H, Gruchala A, Dzierzewicz Z (2013) Polyunsaturated fatty acids inhibit melanoma cell growth in vitro. *Acta Pol Pharm* 70:365–369
8. Sutherland WH, de Jong SA, Haines PA, Williams MJ (2010) Ingestion of native and thermally oxidized polyunsaturated fat acutely increases circulating numbers of endothelial microparticles. *Metab Clin Exp* 59:446–453
9. Meriani P, Delibranche X, Arfar F, Tosi P (2010) Bench-to-bedside review: circulating microparticles—a new player in apace? *Crit Care* 14(2):R6
10. Boitama-Helms J, Delibranche X, Degirmenci SI, Zohari F, Berger A, Meyer G, Barbas M, Moresini HA, Lory B, Tosi P, Meriani P (2014) Pharmacological modulation of proinflammatory microparticles improves haemodynamic dysfunction during septic shock in rats. *Thromb Haemostasis* 111:154–164
11. Dierker JH, Juegel A, Huber LC, Sauerbrey CA, Reich CF 3rd, Gay RH, Michel HA, Pomara A, Gay S, Pisselky DS, Dierker O (2005) The induction of matrix metalloproteinase and cysteine expression in cytosolic fibroblasts coincides with increased cell microparticles. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:2292–2297
12. Poyrazov JM (2003) Cellular microparticles: what are they for or good for? *J Thromb Haemostasis* 1:165S–166S
13. Boitama-Helms J, Kruiser H, Schinz-Kerth V, Meriani P (2013) Endothelial dysfunction in sepsis. *Curr Opin Pharmacol* 11:150–160
14. Delibranche X, Berger A, Boitama-Helms J, Meriani P (2012) Microparticles and infectious diseases. *Med et Maladies Infect* 42:335–343
15. Delibranche X, Boitama-Helms J, Arfar F, Berger A, Mooman Y, Langue T, Gruchala A, Lanza P, Glaser C, Poyrazov JM, Tosi P, Meriani P (2013) Microparticles are new biomarkers of septic shock-induced disseminated intravascular coagulopathy. *Intensive Care Med* 18:1695–1703
16. Meriani P, Martinot MC, Baro-Minguez C, Barbas M, de la Hoz-Bonay M, Pirana L, Piarri M, Calat F, Hainin D, Andriantsoahana R, Merani A, Arfar F, Meriani P (2009) Distinct haemodynamic and inflammatory effects of microparticle originating from septic rats. *Crit Care Med* 37:2045–2050
17. Hagel B, Zohari F, Poyrazov JM (2004) Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemostasis* 2:1846–1847
18. Aquino K, Hagel B, Martin T, Bickhoff P, Loh H, Poyrazov JM, Poyrazov JM (1997) The significance of shed membrane particles during programmed cell death in vitro, and in vivo, in HIV-1 infection. *J Clin Invest* 99:1546–1554
19. Schmidt I, Uttenbogart CH, Gorg J (1994) Sensitive method for measuring apoptosis and cell surface phenotype in human thymocytes by flow cytometry. *Cytometry* 15:12–20
20. High JD, Dyer WJ (1999) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 77:911–917
21. Kucharski GA, Ocal S, Darwich Z, Yatchewskis DA, Amir Y, Dulfer F, Maly Y, Klyuchnikov AS (2010) Sensitive Nile Red-based probe for cholesterol and lipid order at the outer leaflet of membranes. *J Am Chem Soc* 132:4907–4916
22. Darwich Z, Klyuchnikov AS, Kucharski GA, Richon L, Maly Y (2012) Detection of apoptosis through the lipid order of the outer plasma membrane leaflet. *Biochim Biophys Acta* 1818:3046–3054
23. Bellinaso-Pere R, Wainberg DL, Saigade MM, Carneiro-Sampaio MM (1993) Functional alterations of human neutrophils by medium-chain triglyceride emulsions: evaluation of phagocytosis, bacterial killing, and oxidative activity. *J Labic Biol* 57:404–410
24. Waxen GJ, Ross D, Naber AH (2000) Effects of structurally different lipid emulsions on human neutrophil migration. *Clin Nutr* 19:327–331
25. Bellinaso-Pere R, Wainberg DL, Saigade MM, Carneiro-Sampaio MM (1992) Effect of medium- and long-chain triglyceride on human neutrophil migration. *Br J Med Res* 25:369–373 *Revista brasileira de pesquisa médica e biológica/Sociedade Brasileira de Biologia*
26. Wainberg DL, Bellinaso-Pere R, Yamaguchi N, Marul-Cruz S, Saigade MM, Hypolito IP, Soares SC, Gruchala AL, Dyer F (1996) Influence of medium-chain triglyceride-based lipid emulsion on rat polymorphonuclear cell function. *Nutrition* 12:95–99
27. Waxen GJ, Naber AH, Kraimer JW, Tool AT, Ross D, Jensen JB (1999) Influence of structurally different lipid emulsions on human neutrophil oxygen radical production. *Int J Clin Invest* 29:357–363
28. Wainberg DL, Tomshak RS, Jadhav TM (2006) New parenteral lipid emulsions for clinical use. *JPN J Parenter Sci Technol* 30:351–367
29. Abino AP, Han G, Dragano F, Reinhard L, Connolly J, Ross DF, Derynckiewicz Z (2000) Cell cycle arrest and apoptosis of melanoma cells by docosahexaenoic acid: association with decreased p66 phosphorylation. *Cancer Res* 60:4139–4145
30. Zhou H, Liu L, Zhang Y, Huang YY, Yao YH, Zhang S, Su JJ, Tang YF, Guo ZL, Hu RM, Dong Q (2013) Glutathione prevents free fatty acid-induced oxidative stress and apoptosis in human brain vascular endothelial cells through Akt pathway. *CNS Neurosci Ther* 19:252–261
31. Poyrazov JM, Dignas-Garza F (2005) More on measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemostasis* 5:613–614
32. Huber LC, Juegel A, Dierker JH, Moritz F, Gay RH, Michel HA, Pisselky DS, Gay S, Dierker O (2007) The role of membrane lipids in the induction of macrophage apoptosis by microparticles. *Apoptosis* 12:763–774
33. Del Turco S, Bana G, Latorre G, Tringolita M, Ranaldi G, Tangaroli P, Cristofari JH, Schmidt EB, De Caterina R (2008) Effect of the administration of n-3 polyunsaturated fatty acids on circulating levels of microparticles in patients with a previous myocardial infarction. *Haematologica* 93:992–999
34. Latorre A, Pombou D, Wolf C, Quina H (2013) The effect of lipid in cultured cells measured with classical lipidomics. *Mol Nutr Food Res* 7(5):1401–1409
35. Vanchini A, Cicconetti V, Satta P, Calgiana F, Orvieto F, Binaglia L, Nazzari G, Riccardi C, Carvello G, Polina P, Maggiano N, Di Nardo P (2004) Dietary alpha-linolenic acid induces CCR-2 expression and induces apoptosis of hepatoma cells. *J Lipid Res* 45:308–316
36. Kurokawa H, Molloy EJ, Sami M, Green H, Chatterjee PK (2009) alpha-Linolenic acid protects renal cells against palmitic acid lipotoxicity via inhibition of endoplasmic reticulum stress. *Int J Pharmacol* 323:107–112

39. Zhang Y, Yang X, Shi H, Dong L, Bai J (2011) Effect of alpha-linolenic acid on endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of palmitic acid lipotoxicity in primary rat hepatocytes. *Lipids Health Dis* 10:122
40. Kapoor R, Huang YS (2006) Gamma-linolenic acid: an anti-inflammatory omega-6 fatty acid. *Curr Pharm Biotechnol* 7:531–534
41. Ohta M, Mizushima N (2001) LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal* 13:85–94
42. Kim K, Jang N, Lee K, Choi J, Kim S, Jun J, Kim H, Kim D (2013) Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids attenuate hepatic ischemia/reperfusion injury in rats by modulating toll-like receptor recruitment into lipid rafts. *Clin Nutr* 32(5):855–862
43. Barua KV, Carolina AP, Schalch J, Moshier III, Mason JA, Calder FC, Sforzo VL (2013) Pharmacokinetics: acute fatty acid modulation of circulating cytokines in elderly patients in the ICU. *J Parent Sci Technol* 36(4):467–474
44. Calder FC (2013) Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? *Br J Clin Pharmacol* 75:645–662
45. Rochon HJ, Thapa H, Harris M, Melton M, Williams J, Wainil SR, Shalh SR (2012) DHA oil increases raft size and membrane order of B cells accompanied by differential effect on function. *J Lipid Res* 53:674–683
46. Shalh SR, Thapa H (2012) N-3 fatty acids and membrane microdomains from model membranes to lymphocyte function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 87:205–208
47. Zwaal RF, Schmit AJ (1997) Pathophysiology: implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* 89:1121–1132
48. Lingwood D, Simons K (2010) Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* 327:46–50

Supplementary data:

Figure 1a

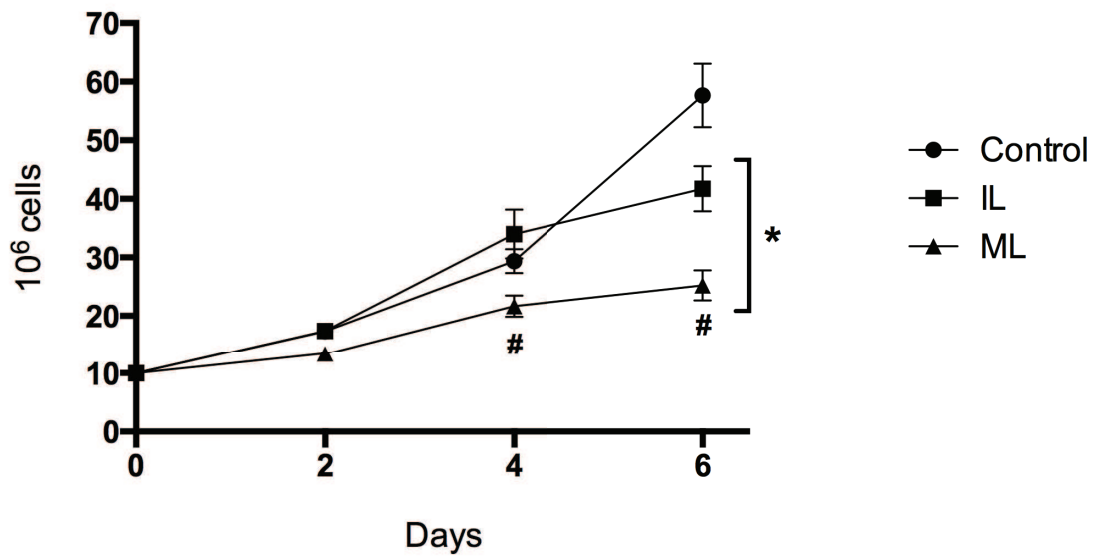
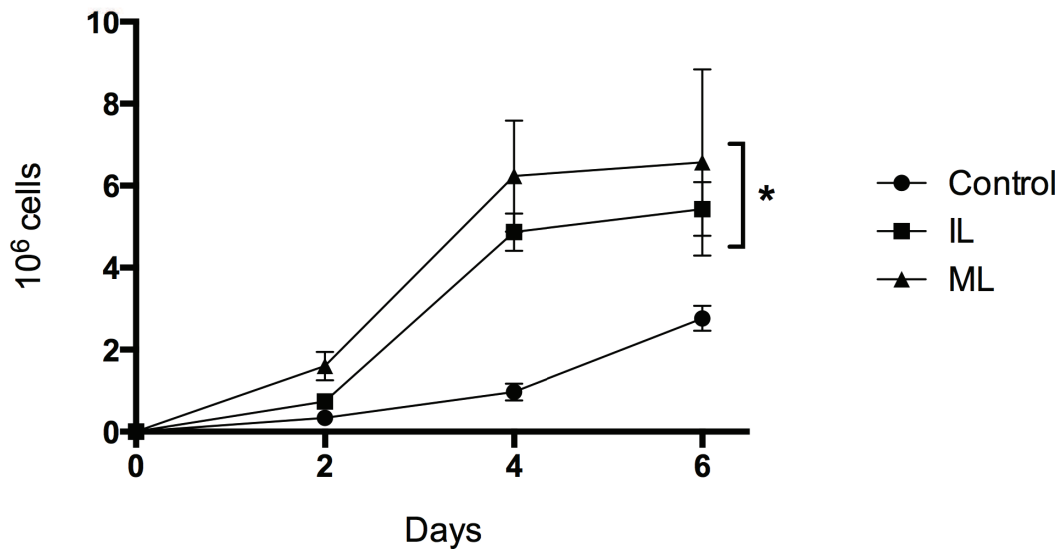


Figure 1b



Figures 1a and 1b: Time-dependent growth (1a) and necrosis (1b) of monocytes after treatment with lipid emulsions containing long chain triglycerides (IL – Intralipid®) or a mixture of medium and long chain triglycerides only (ML – Medialipid®), without or with LPS. $n=4 \pm$ SD. * $p < 0.05$ versus Control, # $p < 0.05$ versus IL.

Figure 2b

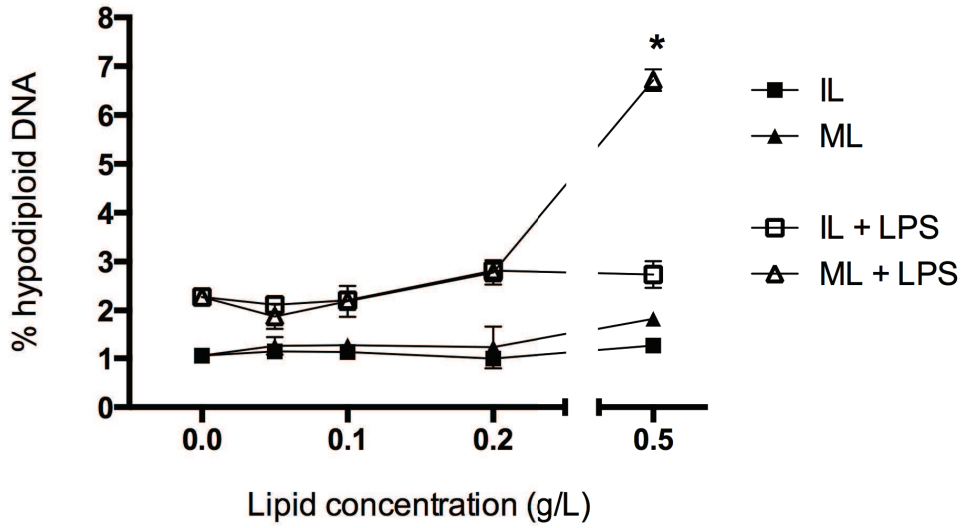
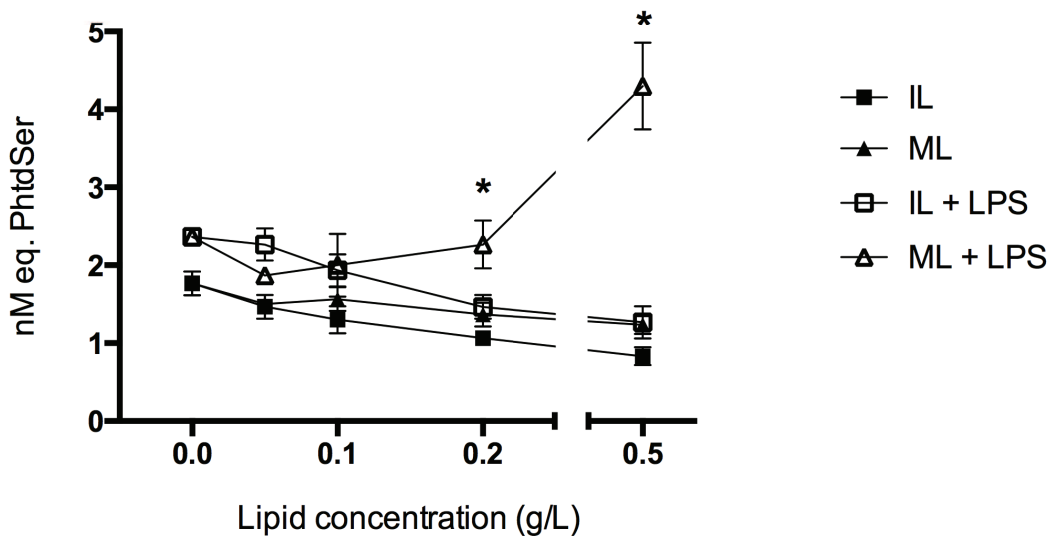


Figure 2a



Figures 2a and 2b: Dose-dependent apoptosis (2a) and microparticle (2b) generation in cells after treatment with lipid emulsions containing long chain triglycerides (IL – Intralipid®) or a mixture of medium and long chain triglycerides only (ML – Medialipid®), without or with LPS. n=4 ± SD. * p<0.05 versus IL+LPS.

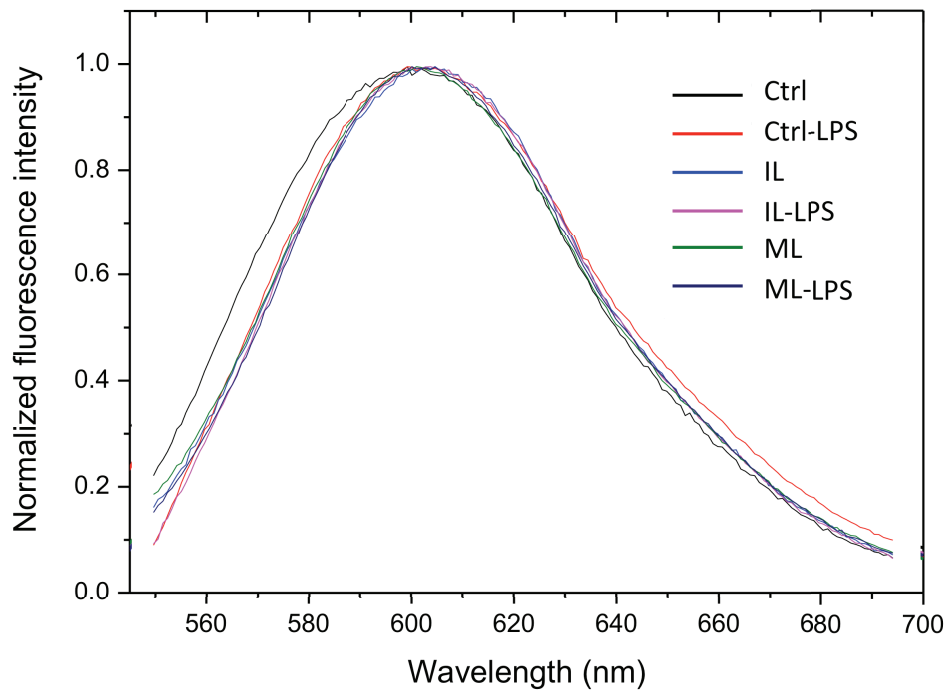


Figure 3: Normalized fluorescence spectra of NR12S (50 nM) in cells after treatment with lipid emulsions containing long chain triglycerides (IL – Intralipid[®]) or a mixture of medium and long chain triglycerides only (ML – Medialipid[®]), without or with LPS. $n=3 \pm SD$.

Table I: Lipid emulsion composition and molecular concentrations of fatty acids.

		<i>Molecular concentrations</i>	Intralipid	Medialipid	SMOFLipid
Oil (g/100 mL):					
- soy			20	10	6
- coco				10	6
- fish					3
- olive					5
Fatty acids:		<i>mmol/L for 0.5 g/L</i>	(%)	(%)	(%)
- caproate	6:0	4.30		0.5	
- caprylate	8:0	3.47		28.5	10
- caprate	10:0	2.90		20	11
- laurate	12:0	2.50		1	
- myristate	14:0	2.19			1
- palmitate	16:0	1.95	11	7.5	10
- stearate	18:0	1.76	4	2	3.5
- palmitoleate	16:1ω-7	1.97			1.5
- oleate	18:1ω-9	1.77	24	11	31
- linoleate	18:2ω-6	1.78	53	29	20
- α -linolenate	18:3ω-3	1.80	8	4.5	2
- arachidonate	20:4ω-6	1.64			
- eicosapentaenoic acid	20:5ω-3	1.65			3
- docosapentaenoic acid	22:5ω-3	1.52			2
α-tocopherol mg/100 mL			3.8	21.6	21.5

Table II: Cell culture medium after supplementation with [0.5 g/L] lipid emulsions.

	Standard culture medium	Culture medium supplemented with lipid emulsions
Glucose (g/L)	1.82	1.84
Proteins (g/L)	3.0	3.0
Cholesterol (g/L)	0.05	0.07
Triglycerides (g/L)	0.05	0.99

Article 2

Medium-chain triglycerides supplementation exacerbates peritonitis-induced septic shock in rats: role on cell membrane remodelling

Boisramé-Helms J, Said A, Burban M, Delabranche X, Zobairi F, Hasselmann M,
Schini-Kerth VB, Toti F, Meziani F.

Soumis à *Shock*

Nous avons évalué *in vivo* l'effet de deux de ces émulsions lipidiques dans un modèle de choc septique par péritonite (ligature et perforation caecale) chez le rat, pour déterminer la place de la modulation de la vésiculation membranaire et de l'inflammation dans un système intégré. Cette partie est l'objet du deuxième article.

Des rats ayant subi une péritonite par ligature et perforation caecale étaient nourris pendant les 22h suivant l'opération par une émulsion lipidique de nutrition parentérale à l'aide d'un cathéter veineux central jugulaire interne tunnelisé. Une fois le choc septique installé (18^{ème} heure), les rats étaient sédatisés, ventilés et réanimés pendant 4 heures (remplissage vasculaire et noradrénaline) afin d'atteindre un objectif de pression artérielle moyenne fixé. A l'issue des 4 heures, les rats étaient exsanguinés pour isoler les MPs et les organes prélevés pour différentes analyses réalisées *ex vivo*.

Nous avons montré que les doses de noradrénaline nécessaires pour obtenir les objectifs de pression artérielle moyenne fixés étaient significativement plus importantes chez les rats préalablement nourris avec des émulsions lipidiques à base de triglycérides à chaînes moyennes (TCM), qu'avec les émulsions à base de triglycérides à chaînes longues (TCL) ($1,7 \pm 0,7$ vs. $0,8 \pm 0,2$ $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$, $p < 0,05$). Compte-tenu des résultats que nous avons obtenus *in-vitro* sur les monocytes en culture, nous avons émis l'hypothèse que ces effets hémodynamiques pourraient notamment passer par une altération de la génération de MPs par les émulsions lipidiques. Ainsi, nous avons montré que les émulsions à base de TCM, comparées aux TCL, sont responsables d'une augmentation significative de la vésiculation membranaire (MPs totales : $38,6 \pm 5,8$ versus $19,2 \pm 3,0$ nM Eq PhtdSer, $p < 0,05$). Les émulsions lipidiques sont également à l'origine d'une modulation qualitative de la vésiculation membranaire, puisque les TCM augmentent significativement les MPs leucocytaires (MPs CD45 : $17,4 \pm 3,5$ versus $6,0 \pm 1,1$ nM Eq PhtdSer, $p < 0,05$), plaquettaires (MPs CD61 : $13,9 \pm 2,5$ pour les TCM *versus* $5,4 \pm 1,3$ nM Eq PhtdSer, $p < 0,05$) et endothéliales (MPs CD54 : $16,9 \pm 3,6$ *versus* $5,6 \pm 0,8$ nM Eq PhtdSer, $p < 0,05$). La génération de ces différents phénotypes de MPs reflète l'activation cellulaire correspondante, leucocytaire, plaquettaire et endothéliale. Enfin, les TCM majorent significativement le stress oxydant cardiaque et vasculaire.

En conclusion, nous avons montré dans ce deuxième travail que les TCM pourraient avoir des effets délétères pro-oxydants au cours du choc septique en majorant la dysfonction hémodynamique. Ces

effets pourraient être liés à une activation cellulaire accrue, dont les MPs endothéliales, plaquettaires et leucocytaires sont le témoin.

=> *Ce travail est soumis et actuellement en révision dans Shock (impact factor 2,6).*

Shock: Injury, Inflammation, and Sepsis: Laboratory and Clinical Approaches

Medium-chain triglycerides supplementation exacerbates peritonitis-induced septic shock in rats: Role on cell membrane remodeling –Manuscript Draft–

Manuscript Number:	SHOCK-D-14-00206R2
Full Title:	Medium-chain triglycerides supplementation exacerbates peritonitis-induced septic shock in rats: Role on cell membrane remodeling
Short Title:	Lipid emulsions modulate peritonitis-induced shock
Article Type:	Basic Science Aspects (Animal Subjects)
Keywords:	lipid emulsions; parenteral nutrition; membrane remodeling; inflammation; microparticles; septic shock.
Corresponding Author:	Farhat Meziani, M.D., Ph.D. Service de Réanimation Médicale, Nouvel Hôpital Civil, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France. Strasbourg, FRANCE
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Service de Réanimation Médicale, Nouvel Hôpital Civil, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France.
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Julie Boisrame-Helms, M.D.
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Julie Boisrame-Helms, M.D. Amisil Said Mélanie Burben, Ph.D. Xavier Delabranche, M.D., Ph.D. Laure Stiel Fatma Zobeir Michel Hasselmann, M.D., Ph.D. Valérie B Schini-Kerth, Ph.D. Florence Tost, Ph.D. Farhat Meziani, M.D., Ph.D.
Order of Authors Secondary Information:	
Manuscript Region of Origin:	FRANCE

Medium-chain triglycerides supplementation exacerbates peritonitis-induced septic shock in rats: Role on cell membrane remodeling

Short title: Lipid emulsions modulate peritonitis-induced shock

Boisramé-Helms J.1,2*, Said A.3*, Burban M.3, Delabranche X.1, Stiel L.1,4, Zobairi F.4, Hasselmann M.1, Schini-Kerth V.B.3, Toti F.3, Meziani F.1,2

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

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

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

4SVTT, EA 7293, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, Illkirch (France)

*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

Funding sources: This work has been supported by the Alsacian Association for Respiratory Failure Help at Home (Association Des Insuffisants Respiratoires Alsace Lorraine, ADIRAL) and the Association for Research Development in Intensive Care (Association pour le Développement de la Recherche En Réanimation, ADRER).

No conflict of interest.

Abstract

Background and aims: Lipid emulsions for parenteral nutrition interfere with immunity and may alter the cell plasma membrane and microparticle release, thus modulating their biological effects. Our aim was to evaluate the effect of two lipid emulsions for parenteral nutrition containing either a mixture of long- and medium-chain triglycerides (LCTs and MCTs) or LCTs only, to assess their role on microparticle release and acute inflammation during septic shock in rats.

Methods and results: Septic rats (cecal ligation and puncture) and sham rats were infused with 5% dextrose or a lipid emulsion during 22 hours. After 18 hours, rats were resuscitated during 4 hours and hemodynamic parameters monitored. Circulating microparticles and their phenotype were measured by prothrombinase assay; heart and aorta were collected for western blotting and electron paramagnetic resonance measurements.

No significant effect of lipid emulsions was observed in sham rats. In septic rats, norepinephrine requirements was increased in MCTs/LCTs infused rats compared to 5% dextrose or LCTs alone infused rats (2.7 ± 0.2 vs. 1.9 ± 0.8 and 1.2 ± 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ respectively, $p < 0.05$) and procoagulant microparticle generation (38.6 ± 5.8 vs. 18.8 ± 3.1 and 19.2 ± 3.0 nM Eq PhtdSer, $p < 0.05$), by increasing leukocyte- (17.4 ± 3.5 vs. 7.7 ± 1.8 and 6.0 ± 1.1 nM Eq PhtdSer, $p < 0.05$), platelet- (13.9 ± 2.5 vs. 4.4 ± 0.7 and 5.4 ± 1.3 nM Eq PhtdSer, $p < 0.05$) and endothelial-derived microparticles (16.9 ± 3.6 vs. 6.4 ± 1.4 and 5.6 ± 0.8 nM Eq PhtdSer, $p < 0.05$). The mixture of MCTs/LCTs significantly increased cardiac and vascular NO^\cdot and O_2^\cdot production, pI κ B and COX-2 expression compared to the lipid emulsion containing only LCTs.

Conclusion: Compared to 5% dextrose, MCT/LCT supplementation during septic shock in rats induced deleterious effects with increased inflammation, cell activation, associated to vascular hyporeactivity. During septic shock, LCT supplementation seemed to be neutral compared to 5% dextrose infusion.

KEY WORDS: lipid emulsions; parenteral nutrition; membrane remodeling; inflammation; microparticles; septic shock.

INTRODUCTION

Fatty acids (FAs) are known to interfere with many physiological processes, including inflammation and immunity (1). Inflammatory response modulation in critically ill patients through the modulation of lipid content in parenteral emulsion has therefore aroused clinician interest (2). The composition of lipid emulsions may account for changes in cell membrane composition, downstream production of eicosanoids and cytokines, as well as gene expression (1, 3). Exogenous lipids could alter the cell membrane fluidity and the lipid raft organization, thereby interfering with the activity of key membrane proteins involved in immune cell signaling (4). Several experimental studies have evidenced the regulatory role of lipid rafts after incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) that limited T cell activation and the immune response (5-7). The n-6 and n-3 PUFAs content of immune cell plasma membranes can be modulated by eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) intake (3). Interestingly, n-6 PUFAs ingestion may acutely alter the endothelial function, resulting in an increased generation of circulating endothelial microparticles (MPs) (8). MPs are plasma membrane submicron vesicles, released from the cell in response to inflammatory signals following the translocation of procoagulant phosphatidylserine in the outer leaflet (PhtdSer) (9). Numerous experimental studies have also demonstrated that MPs behave as vascular and cellular effectors (10, 11). In sepsis, circulating MPs may indeed promote inflammation and vascular cell apoptosis, contribute to hemodynamic dysfunction, coagulation activation and multiple organ failure (10, 12). The purpose of this study was therefore to assess the effects of two parenteral nutrition lipid emulsions on the modulation of inflammation, procoagulant MP release and hemodynamic during septic shock in rats.

MATERIALS AND METHODS

This study was performed with the approval of the Strasbourg Regional Committee of Ethics in Animal Experimentation (CREMEAS, AL/69/76/02/13).

Industrial lipid emulsions for parenteral nutrition

Intralipid® (soybean oil 200 g/L – long-chain triglycerides, LCTs) was from Fresenius-Kabi (Bad Homburg, Germany) and Medialipid® (soybean 100 g/L – LCTs, coconut oil 100 g/L – medium-chain triglycerides, MCTs) from B Braun (Melsungen, Germany). Their n-3 PUFAs content was only α -linolenic acid (18:1n-3) and neither of the emulsions contained EPA (20:5n-3) or DHA (22:6n-3); the n-3/n-6 ratio was the same in both emulsions (Supplementary table I).

Cecal ligation and puncture model and infusion with lipid emulsions for parenteral nutrition

Male Wistar rats (300-350 g) were from Javier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France). During surgical procedures, rats were anesthetized with isoflurane 1-2% (Baxter S.A.S, Maurepas, France) and analgesia was ensured by sufentanil (Mylan, Pittsburgh PA, USA) (0.1 μ g/kg of body weight) administered subcutaneously. Before skin incision, a subcutaneous injection of 0.1 mL lidocaine 1% (AstraZeneca, Rueil-Malmaison, France) was performed.

Rats underwent cecal ligation and puncture (CLP) as previously described (13). The rats developed septic shock within the 16–20 hours after CLP. Sham rats underwent laparotomy and cecal exposure. The right internal jugular was catheterized and the catheter was tunneled between the ears.

Rats were then allocated to six groups of 12 animals each: sham-G5, sham-IL, sham-ML, CLP-G5, CLP-IL and CLP-ML. The randomly allocated lipid emulsion was infused at identical rates during 22 hours (1.5 g/kg/24 hours, according to human nutrition guidelines (14)). The control groups (sham-G5 and CLP-G5) were infused with 5% dextrose under identical conditions. The lipid emulsion or dextrose infusion was not stopped for the next 22 hours until the end of the experiment. No animal died before the end of the experiment.

After 18 hours, when CLP rats fulfilled illness criteria (lethargy, piloerection, glassy eyes), rats were anesthetized, tracheotomised and mechanically ventilated. 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 the carotid artery to continuously measure carotid blood flow (CBF). The left femoral artery was used to measure mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR) and to collect blood samples. For the CLP group, septic shock was assessed if MAP was <90 mmHg and lactate elevated. In CLP groups, fluid resuscitation was performed with a bolus of 0.9% NaCl (500 μ L/10 min. if MAP was <100 mmHg); if MAP remained <100 mmHg, norepinephrine was infused and increased by step of 0.1 μ g/kg/min each 10 minutes to target a MAP above 100 mmHg.

After 240 min., rats were bled via the left carotid artery under sterile condition using endotoxin-free material. The total blood volume was collected in sodium citrate tubes (Vacutainer™, Becton Dickinson; Le Pont de Claix, France), organs were collected for western blotting analysis and electron paramagnetic resonance measurements.

Quantification of procoagulant microparticles

Blood samples were centrifuged for 15 min. at 800 g; plasma was centrifuged 2 min. at 12,000 g to obtain platelet-poor plasma (PPP). PPP was centrifuged twice at 12,000 g for 60 min. to pellet MPs. The MP pellets were suspended in 150 μ L of 0.9% NaCl, pooled and concentrated by centrifugation for 60 min. at 12,000 g. Washed pellet suspensions (500 μ L of 0.9% NaCl) were kept at 4°C for less than 2 weeks.

To specifically analyze the generation of procoagulant MPs, MP quantification was performed by functional prothrombinase assay as described elsewhere (15). Briefly, after three washes, the amount of MPs insolubilized onto annexin-5 coated microplates was measured by prothrombinase assay in which phosphatidylserine (PhtdSer) is the limiting factor of the reaction leading to thrombin generation. The measurements were performed in a kinetic mode with a thermostated spectrophotometer (VersaMax™ Molecular Device, USA). The absorbance was converted into nanomolar equivalent phosphatidylserine (eq. PhtdSer) by reference to a calibration curve made of

known concentrations of synthetic vesicles containing 33% w/w PhtdSer and 67% w/w PhtdChol) (15).

Characterization of the microparticle cell origin

MP phenotype was assessed according to the expression of cellular specific membrane antigens using biotinylated monoclonal antibodies (anti-CD61 – platelet GPIIIa (β 3), anti-CD45 – leukocyte common antigen, anti-CD54 – ICAM-1 for endothelial cells [BioLegend, San Diego, CA, USA] and anti-glycophorin for erythrocytes [Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA]). MPs were measured after capture onto each specific antibody coated on the streptavidin plate (1 μ g/well) as described above.

Electron paramagnetic resonance (EPR)

Nitric oxide (NO): Aorta and heart samples were incubated for 30 min. in Krebs–Hepes buffer containing: bovine serum albumin (20.5 g/L), CaCl_2 (3 mM), and L-arginine (0.8 mM). NaDETC (3.6 mg) (DETC: diethyldithiocarbamate) and $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2.25 mg) were separately dissolved under nitrogen gas bubbling in 10-mL volumes of ice-cold Krebs–Hepes buffer. These compounds were rapidly mixed to obtain a pale yellow-brown opalescent colloid $\text{Fe}(\text{DETC})_2$ solution (0.4 mM), which was used immediately. The colloid $\text{Fe}(\text{DETC})_2$ solution was added to the organs and incubated for 45 min. at 37°C. NO \cdot measurement was performed on a table-top x-band spectrometer Miniscope (Magnettech, MS200, Berlin, Germany). Recordings were made at 77°K, using a Dewar flask. Instrument settings were 10 mW of microwave power, 1 mT of amplitude modulation, 100 kHz of modulation frequency, 60 seconds of Sweep time, and 5 numbers of scans.

Superoxide anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$): Aorta and heart samples were allowed to equilibrate in deferoxamine-chelated Krebs–Hepes solution containing 1 hydroxy-3 methoxycarbonyl 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin (CMH, Noxygen, Germany) (500 μ M), deferoxamine (25 μ M), and DETC (5 μ M) under constant temperature (37°C) for 1 hour. The reaction was stopped by freezing the samples in liquid nitrogen for EPR spectroscopy analysis

Values were expressed as arbitrary units per milligram weight of dried tissue (A/Wd).

Western immunoblotting

Phosphorylated I kappa B-alpha (pI κ B- α), nuclear factor-kappa B (NF- κ B) and cyclo-oxygenases-2 (COX-2) expression was evaluated in heart and aorta lysates using Western immunoblotting. Proteins were separated by electrophoresis in 10% polyacrylamide gel and transferred onto a PVDF (PolyVinylidene Fluoride) membrane. Nonspecific binding sites were blocked with 5% skimmed milk in Tris-Buffered Saline solution with 0.5% Tween for 1 hour at room temperature. Membranes were then incubated overnight at 4°C with primary antibodies directed against pI κ B- α (1/500, Euromedex, Souffelweyersheim, France), NF- κ B p65 (1/1,000, Ozyme, Saint Quentin, France), COX-2 (1/1,000 Cayman Chemical Co, Ann Arbor, MI), β -tubuline (1/10,000, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany). After 3 washes, membranes were incubated with secondary antibodies (1/5,000 dilution except for anti- β -tubuline that revealed with a 1/40,000 dilution of anti-mouse IgG) for 1 hour at room temperature and signals were revealed by chemiluminescence. The optical density was quantified and expressed relative to β -tubulin (imageJ).

Statistical analysis

The inter-group comparison of hemodynamic parameters was performed by ANOVA repeated measures; the pairwise comparison was made using a Tukey-Kramer adjustment for p values. A nonparametric analysis by Kruskal Wallis test with Dunn post hoc test was used for analysis of MPs, proteins, NO. and O₂-. All statistics was performed with Statview™ software (version 5.0, SAS Institute, Cary, NC, USA). All values are presented as mean \pm SD for n experiments; with n representing the number of rats. A p value<0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

The emulsion containing a mixture of medium-and long-chain triglycerides increases septic shock-induced vascular hyporeactivity

Lipid emulsions had no adverse effect in sham rats (sham-IL and sham-ML), as hemodynamic parameters (HR, MAP, CBF), microparticles, western immunoblottings and EPR were unaltered compared to 5% dextrose-infused sham rats (sham-G5). The infusion of lipid emulsions containing LCTs (Intralipid® - IL) or a mixture of LCTs/MCTs (Medialipid® - ML) had no effect (MAP, HR, CBF and blood lactate) compared to 5% dextrose infusion on the early phase of infection in CLP rats, up to the 18th hour after surgery (Table I).

At the end of the 4-hours resuscitation period (18th to 22th hours), MAP, HR, CBF and blood lactate were still not significantly different and all CLP rats survived (Table I). Nevertheless, the LCT/MCT emulsion increased septic shock-induced vascular hyporeactivity evidenced by an increased norepinephrine requirement to reach the targeted MAP compared to 5% dextrose (2.7 ± 0.2 vs. 1.9 ± 0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$, $p < 0.05$), while LCT emulsion had no effect (1.2 ± 0.3 vs. 1.9 ± 0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$, NS) (Table I).

The emulsion containing a mixture of medium-and long-chain triglycerides increases alters membrane vesiculation

In the CLP groups (CLP-G5, CLP-IL, CLP-ML), total MPs, leukocyte-, platelet- and endothelial-derived MPs were significantly increased compared to sham rats (figures 1a and b). Microparticle generation was significantly increased in CLP-ML rats compared to CLP-G5 rats and CLP-IL rats (38.6 ± 5.8 vs. 18.8 ± 3.0 and 19.2 ± 3.0 nM Eq PhtdSer respectively, $p < 0.05$) (figure 1a), as well as leukocyte- (17.4 ± 3.5 vs. 7.7 ± 1.8 and 6.0 ± 1.1 nM Eq PhtdSer respectively, $p < 0.05$), platelet- (13.9 ± 2.5 vs. 4.4 ± 0.7 and 5.4 ± 1.3 nM Eq PhtdSer respectively, $p < 0.05$) and endothelial-derived MPs (16.9 ± 3.6 vs. 6.4 ± 1.4 and 5.6 ± 0.8 nM Eq PhtdSer respectively, $p < 0.05$) (figure 1b). Of note, MP generation (concentration and phenotype) was not significantly different between CLP-IL and CLP-G5 rats (figures 1a and b).

The emulsion containing a mixture of medium-and long-chain triglycerides increases cardiovascular oxidative and nitrosative stresses

NO[•] and O₂^{•-} production was significantly increased in the aorta (174.8±14.7 vs. 130.2±18.5 and 708.2±35.6 vs. 496.3±45.8 amplitude/Wd respectively, p<0.05) (figures 2a and 2c) and heart (158.7±15.7 vs. 110.3±7.3 and 786.3±29.6 vs. 579.1±62.6 amplitude/Wd respectively, p<0.05) of CLP-ML rats compared to CLP-IL rats (figures 2b and 2d). Compared with sham rats, NO[•] and O₂^{•-} were significantly increased in aorta and heart from CLP-G5 rats but not in aorta and heart from CLP-IL rats (figures 2a, 2b, 2c and 2d). NO[•] and O₂^{•-} production was not different in CLP-IL and CLP-G5 groups, except a significant increase of cardiac NO[•] in CLP-IL rats compared to CLP-G5 rats (figure 2b).

The emulsion containing a mixture of medium-and long-chain triglycerides modulates vascular inflammation

NF-κB activation was evidenced through the assessment of the phosphorylation of its inhibitor IκB resulting in the translocation of free NF-κB to the nucleus and the transcription of pro-inflammatory genes. In the aorta, pIκB-α was significantly increased in CLP-G5 rats compared with sham-G5 rats (0.2±0.0 vs. 0.1±0.0 relative to β-tubulin content, p<0.05) as well as in CLP-ML rats compared with CLP-IL rats (0.4±0.1 vs. 0.1±0.0 relative to β-tubulin content, p<0.05) (figure 3a), while NF-κB expression remained unchanged (data not shown). Similarly, in heart samples of CLP-G5 rats, pIκB-α expression was significantly increased compared with sham-G5 rats (1.0±0.2 vs. 0.3±0.1 relative to β-tubulin content, p<0.05), while NF-κB expression remained unaltered (data not shown). Moreover, cardiac pIκB-α expression was significantly increased in CLP-ML rats compared with CLP-IL rats (1.8±0.1 vs. 0.6±0.2 relative to β-tubulin content, p<0.05) (figure 3b). Finally, pIκB-α was significantly increased in CLP-ML group compared with CLP-G5 in both heart and aorta (figures 3a and 3b).

In the aorta, COX-2 expression was significantly increased in CLP-G5 rats compared to sham-G5 rats (1.4±0.2 vs. 0.9±0.2 relative to β-tubulin content, p<0.05), as well as in CLP-ML rats compared to CLP-IL (2.1±0.3 vs. 1.0±0.1 relative to β-tubulin content, p<0.05) (figure 3c). Cardiac COX-2

expression was also significantly increased in CLP-G5 rats compared to sham-G5 rats (1.4 ± 0.1 vs. 0.4 ± 0.0 relative to β -tubulin content, $p < 0.05$). COX-2 expression was also significantly increased in CLP-ML rats compared with CLP-IL rats (1.5 ± 0.2 vs. 0.5 ± 0.0 relative to β -tubulin content, $p < 0.05$) (figure 3d). COX-2 was significantly increased in CLP-ML group compared with CLP-G5 in both heart and aorta (figures 3c and 3d).

DISCUSSION

Fatty acid supplementation leads to plasma membrane remodeling and may thus affect immune functions with clinical consequences in patients with inflammatory diseases (1). We therefore hypothesized that lipid emulsion supplementation could alter membrane vesiculation and MP release, thereby modulating inflammation and hemodynamic status in septic rats (3, 10, 12, 16). Thus, we investigated the hemodynamic function of septic rats and used MPs as surrogates of vascular cell damage.

In the present study, we have not shown any beneficial or deleterious effects of LCT or LCT/MCT parenteral lipid emulsions on sham rats. Moreover, these emulsions did not prevent or worsen septic shock issue. Nevertheless, we have shown that the infusion of a mixture of MCTs and LCTs may exacerbate the septic shock-induced hemodynamic dysfunction, enhancing the activation of vascular cells, inflammatory processes and cardiovascular oxidative and nitrosative stresses.

We have also shown that the emulsion containing a mixture of MCTs and LCTs (Medialipid®) significantly increased membrane vesiculation in septic rats, compared with the emulsion containing only LCTs (Intralipid®) or with 5% dextrose. These data are consistent with previous works showing that FAs are differentially incorporated into the cell membrane depending on the length of their carbon chain, which leads to increased membrane vesiculation with increased phospholipid membrane disorder in emitted MPs (17, 18). In contrast, n-3 FAs decrease the concentration of circulating MPs in post-myocardial infarction patients, suggesting that n-3 FAs might alter membrane vesiculation (19). In addition, recent data from our laboratory suggest that a mixture of MCTs and LCTs would have an energetic function, but would also take part in membrane vesiculation, by being incorporated in membranes and by altering their physical order (18).

To further characterize the *in vivo* FA effects on membrane vesiculation, we have established the phenotype of circulating MPs. We focused on procoagulant MPs exposing phosphatidylserine, which have been shown to behave as pathogenic markers in experimental septic shock and as markers of

coagulation disturbance in clinical trials (10, 20). We have thus shown that a mixture of MCTs and LCTs significantly alters the MP phenotype, with an increased generation of circulating leukocyte-, platelet- and endothelial-derived MPs, reflecting their parental cell activation. In contrast, LCTs do not seem to have any effect on cellular activation in septic rats as indicated by the unchanged MP pattern.

Furthermore, lipid emulsions containing a mixture of MCTs and LCTs promoted enhanced pro-inflammatory markers in aorta and heart tissues. Therefore, MCT infusion could lead to procoagulant and pro-inflammatory MP release, which might in turn deeply alter the cell membrane and increase further cell damages.

Lipid emulsions containing a mixture of MCTs and LCTs would have specific clinical advantages over lipid emulsions containing LCTs alone. Several studies indeed suggest their superiority, with improved nutritional status in septic and cancer patients undergoing surgery (21, 22). Indeed, the MCT/LCT emulsion was shown to increase patient prealbumin levels, which would be partially due to the higher circulating insulin levels. However, the outcome of septic patients or the length of hospital stay, the surgical complication rate in tract cancer patients following surgery were not significantly different, whatever the emulsion considered. Moreover, a recent review by Casaer and Van den Berghe failed to evidence any benefit in lipid modulation during septic shock (23).

More interestingly, emulsions containing a mixture of MCTs and LCTs would be less immunosuppressive than LCT emulsions. The former would be associated with reduced alterations of human monocyte and neutrophil functions (24), with subsequent limited infections in patients with chronic obstructive pulmonary disease (25). Experimental and clinical data however diverge, as in patients with acute respiratory distress syndrome, Masclans et al. showed that LCT emulsions increased cardiac output and oxygen delivery (26), while Smyrniotis et al. showed that it worsened oxygenation (27).

FAs may interfere with inflammation by numerous mechanisms, including their incorporation into the phospholipids of inflammatory cell membranes, as we have evidenced it in monocytes after LPS

stimulation (18) and as it has been shown in other models (5). Furthermore, FAs are known to affect inflammation through the NF- κ B pathway. Indeed, n-3 FAs inhibit the LPS-induced production of inflammatory proteins like COX-2, in-vitro and in vivo (3). In our study, a mixture of MCTs and LCTs would have the opposite effect and up-regulate the NF- κ B pathway with increased I κ B phosphorylation and subsequent inflammatory protein expression, as it has been shown in-vitro with saturated FAs, especially lauric acid (C12:0) (28, 29). In contrast, LCTs seemed neutral compared to 5% dextrose.

Some fatty acid receptors may be involved in the regulation of these anti-inflammatory effects like the peroxisome proliferator activated receptor (PPAR- γ), a transcription factor that down-regulates the NF- κ B pathway when bound to PUFAs (30). The LCT receptor GPR120, which is highly expressed on inflammatory cells mediating anti-inflammatory gene activation (31), and the MCT pro-inflammatory receptor GPR84, that promotes cytokine secretion in LPS-treated neutrophils and macrophages (32), could also have contributed to the respective effects of MCTs and LCTs in our study. Moreover, several LCTs have been shown to decrease leukocyte chemotaxis towards inflammatory sites, contrary to MCTs (32, 33). N-3 LCTs also decrease arachidonic acid-derived pro-inflammatory eicosanoids and COX-2 pathway and increase the production of resolvins and protectins (33). Our study therefore confirms a previous body of evidences showing that MCT-based lipid emulsions in-vitro affect immune cell functions in-vitro. Indeed, previous data showed that MCTs, but not LCTs, alter neutrophils functions (17, 34), with inhibitory effects on chemotaxis, phagocytosis, and bacterial killing in-vitro, as well as in cell signaling (35, 36).

Limitations of the study: Given the severity of our septic shock model, we have deliberately chosen to study only one time-point; moreover, repeated blood sampling was impossible due to low blood volume. As the timing to introduce artificial nutrition in critical patients is a matter of debate and there is still no consensus (37), we assume that the timing of lipid infusion during our experiments could be considered as a limitation of the study.

CONCLUSION

This experimental work shows that supplementation by lipid emulsion containing MCTs and LCTs, but neither lipid emulsion containing only LCTs nor 5% dextrose, exacerbates the peritonitis-induced septic shock, via pro-inflammatory pathway with an intense MP generation reflecting the vascular cell activation. These data could pave the way for further investigations during septic shock in humans.

References

1. Wanten GJ and Calder PC: Immune modulation by parenteral lipid emulsions. *Am J Clin Nutr* 85(5):1171-84, 2007.
2. Waitzberg DL, Torrinhas RS and Jacintho TM: New parenteral lipid emulsions for clinical use. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 30(4):351-67, 2006.
3. Calder PC: Fatty acids and inflammation: the cutting edge between food and pharma. *Eur J Pharmacol* 668 Suppl 1:S50-8, 2011.
4. Calder PC: Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. *J Nutr* 142(3):592S-599S, 2012.
5. Yaqoob P: The nutritional significance of lipid rafts. *Annu Rev Nutr* 29:257-82, 2009.
6. Xavier R, Brennan T, Li Q, McCormack C and Seed B: Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. *Immunity* 8(6):723-32, 1998.
7. Siddiqui RA, Harvey KA, Zaloga GP and Stillwell W: Modulation of lipid rafts by Omega-3 fatty acids in inflammation and cancer: implications for use of lipids during nutrition support. *Nutr Clin Pract* 22(1):74-88, 2007.
8. Sutherland WH, de Jong SA, Hessian PA and Williams MJ: Ingestion of native and thermally oxidized polyunsaturated fats acutely increases circulating numbers of endothelial microparticles. *Metabolism* 59(3):446-53, 2010.
9. Meziani F, Delabranche X, Asfar P and Toti F: Bench-to-bedside review: circulating microparticles--a new player in sepsis? *Crit Care* 14(5):236, 2010.
10. Boisrame-Helms J, Delabranche X, Degirmenci SE, Zobairi F, Berger A, Meyer G, Burban M, Mostefai HA, Levy B, Toti F and Meziani F: Pharmacological modulation of procoagulant microparticles improves haemodynamic dysfunction during septic shock in rats. *Thromb Haemost* 111(1):154-64, 2014.
11. Distler JH, Jungel A, Huber LC, Seemayer CA, Reich CF, 3rd, Gay RE, Michel BA, Fontana A, Gay S, Pisetsky DS and Distler O: The induction of matrix metalloproteinase and cytokine expression in synovial fibroblasts stimulated with immune cell microparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(8):2892-7, 2005.

12. 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 and Meziani F: Detrimental hemodynamic and inflammatory effects of microparticles originating from septic rats. *Crit Care Med* 37(6):2045-50, 2009.
13. Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, Kerby JD, Rue LW, 3rd, Bland KI and Chaudry IH: Cecal ligation and puncture. *Shock* 24 Suppl 1:52-7, 2005.
14. Singer P, Berger MM, Van den Berghe G, Biolo G, Calder P, Forbes A, Griffiths R, Kreyman G, Leverve X, Pichard C and Espen: ESPEN Guidelines on Parenteral Nutrition: intensive care. *Clin Nutr* 28(4):387-400, 2009.
15. Hugel B, Zobairi F and Freyssinet JM: Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* 2:1846-1847, 2004.
16. Angus DC and van der Poll T: Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 369(21):2063, 2013.
17. Bellinati-Pires R, Waitzberg DL, Salgado MM and Carneiro-Sampaio MM: Functional alterations of human neutrophils by medium-chain triglyceride emulsions: evaluation of phagocytosis, bacterial killing, and oxidative activity. *J Leukoc Biol* 53(4):404-10, 1993.
18. Boisrame-Helms J, Delabranche X, Klymchenko A, Draï J, Blond E, Zobairi F, Mely Y, Hasselmann M, Toti F and Meziani F: Lipid Emulsions Differentially Affect LPS-Induced Acute Monocytes Inflammation: In Vitro Effects on Membrane Remodeling and Cell Viability. *Lipids*, 2014.
19. Del Turco S, Basta G, Lazzerini G, Evangelista M, Rainaldi G, Tanganelli P, Christensen JH, Schmidt EB and De Caterina R: Effect of the administration of n-3 polyunsaturated fatty acids on circulating levels of microparticles in patients with a previous myocardial infarction. *Haematologica* 93(6):892-9, 2008.
20. Delabranche X, Boisrame-Helms J, Asfar P, Berger A, Mootien Y, Lavigne T, Grunebaum L, Lanza F, Gachet C, Freyssinet JM, Toti F and Meziani F: Microparticles are new biomarkers of septic shock-induced disseminated intravascular coagulopathy. *Intensive Care Med* 39(10):1695-703, 2013.

21. Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Jimenez-Jimenez FJ, Garcia-Garmendia JL, Jimenez-Jimenez LM, Garnacho-Montero MC and Barrero-Almodovar A: Clinical and metabolic effects of two lipid emulsions on the parenteral nutrition of septic patients. *Nutrition* 18(2):134-8, 2002.
22. Chen FM, Wang JY, Sun LC, Juang RF, Huang TJ and Hsieh JS: Efficacy of medium-chain triglycerides compared with long-chain triglycerides in total parenteral nutrition in patients with digestive tract cancer undergoing surgery. *Kaohsiung J Med Sci* 21(11):487-94, 2005.
23. Casaer MP and Van den Berghe G: Nutrition in the acute phase of critical illness. *N Engl J Med* 370(25):2450-1, 2014.
24. Waitzberg DL, Bellinati-Pires R, Salgado MM, Hypolito IP, Colleto GM, Yagi O, Yamamuro EM, Gama-Rodrigues J and Pinotti HW: Effect of total parenteral nutrition with different lipid emulsions of human monocyte and neutrophil functions. *Nutrition* 13(2):128-32, 1997.
25. Iovinelli G, Marinangeli F, Ciccone A, Ciccozzi A, Leonardis M, Paladini A and Varrassi G: Parenteral nutrition in ventilated patients with chronic obstructive pulmonary disease: long chain vs medium chain triglycerides. *Minerva Anesthesiol* 73(1-2):65-76, 2007.
26. Masclans JR, Iglesia R, Bermejo B, Pico M, Rodriguez-Roisin R and Planas M: Gas exchange and pulmonary haemodynamic responses to fat emulsions in acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med* 24(9):918-23, 1998.
27. Smyrniotis VE, Kostopanagiotou GG, Arkadopoulos NF, Theodoraki KA, Kotsis TE, Lambrou AT and Vassiliou JG: Long-chain versus medium-chain lipids in acute pancreatitis complicated by acute respiratory distress syndrome: effects on pulmonary hemodynamics and gas exchange. *Clin Nutr* 20(2):139-43, 2001.
28. Lee JY, Sohn KH, Rhee SH and Hwang D: Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 276(20):16683-9, 2001.
29. Weatherill AR, Lee JY, Zhao L, Lemay DG, Youn HS and Hwang DH: Saturated and polyunsaturated fatty acids reciprocally modulate dendritic cell functions mediated through TLR4. *J Immunol* 174(9):5390-7, 2005.

30. Vanden Berghe W, Vermeulen L, Delerive P, De Bosscher K, Staels B and Haegeman G: A paradigm for gene regulation: inflammation, NF-kappaB and PPAR. *Adv Exp Med Biol* 544:181-96, 2003.
31. Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan W, Li P, Lu WJ, Watkins SM and Olefsky JM: GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell* 142(5):687-98, 2010.
32. Suzuki M, Takaishi S, Nagasaki M, Onozawa Y, Iino I, Maeda H, Komai T and Oda T: Medium-chain fatty acid-sensing receptor, GPR84, is a proinflammatory receptor. *J Biol Chem* 288(15):10684-91, 2013.
33. Calder PC: Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? *Br J Clin Pharmacol* 75(3):645-62, 2013.
34. Wanten GJ, Roos D and Naber AH: Effects of structurally different lipid emulsions on human neutrophil migration. *Clin Nutr* 19(5):327-31, 2000.
35. Bellinati-Pires R, Waitzberg DL, Salgado MM and Carneiro-Sampaio MM: Effect of medium- and long-chain triglycerides on human neutrophil migration. *Braz J Med Biol Res* 25(4):369-73, 1992.
36. Waitzberg DL, Bellinati-Pires R, Yamaguchi N, Massili-Oku S, Salgado MM, Hypolito IP, Soares SC, Goncalves EL and Furst P: Influence of medium-chain triglyceride-based lipid emulsion on rat polymorphonuclear cell functions. *Nutrition* 12(2):93-9, 1996.
37. Casaer MP and Van den Berghe G: Nutrition in the acute phase of critical illness. *N Engl J Med* 370(13):1227-36, 2014.

Figures 1a and 1b: Quantification (a) and phenotype (b) of microparticles

CLP: cecal ligation and puncture, G5: 5% dextrose, IL: Intralipid®, ML: Medialipid®, MPs: microparticles, nM Eq PhtdSer: nanomolar phosphatidylserine equivalents. n=12, * p<0.05 vs. CLP-IL, # p<0.05 vs. sham-G5, & p<0.05 vs. CLP-G5.

Figures 2a, 2b, 2c and 2d: Vascular and cardiac nitrosative and oxidative stresses

Nitric oxide (NO.) and superoxide anion (O₂·-) measured by electron paramagnetic resonance in the aorta (2a and 2c) and heart (2b and 2d). CLP: cecal ligation and puncture, G5: 5% dextrose, IL: Intralipid®, ML: Medialipid®. n=6, * p<0.05 vs. CLP-IL, # p<0.05 vs. sham-G5, & p<0.05 vs. CLP-G5.

Figures 3a, 3b, 3c and 3d: Vascular and cardiac pIκB-α and COX-2 expressions relative to β-

tubulin content evaluated by Western immunoblotting in the aorta (3a and 3c) and heart (3b and 3d). CLP: cecal ligation and puncture, G5: 5% dextrose, IL: Intralipid®, ML: Medialipid®. n=6, * p<0.05 vs. CLP-IL, # p<0.05 vs. sham-G5, & p<0.05 vs. CLP-G5.

Figure 1a

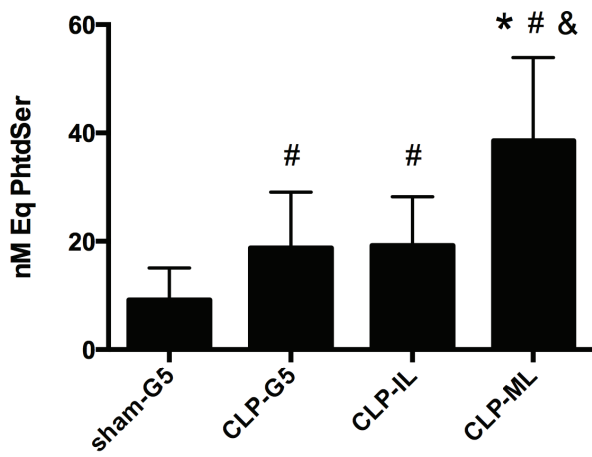


Figure 1b

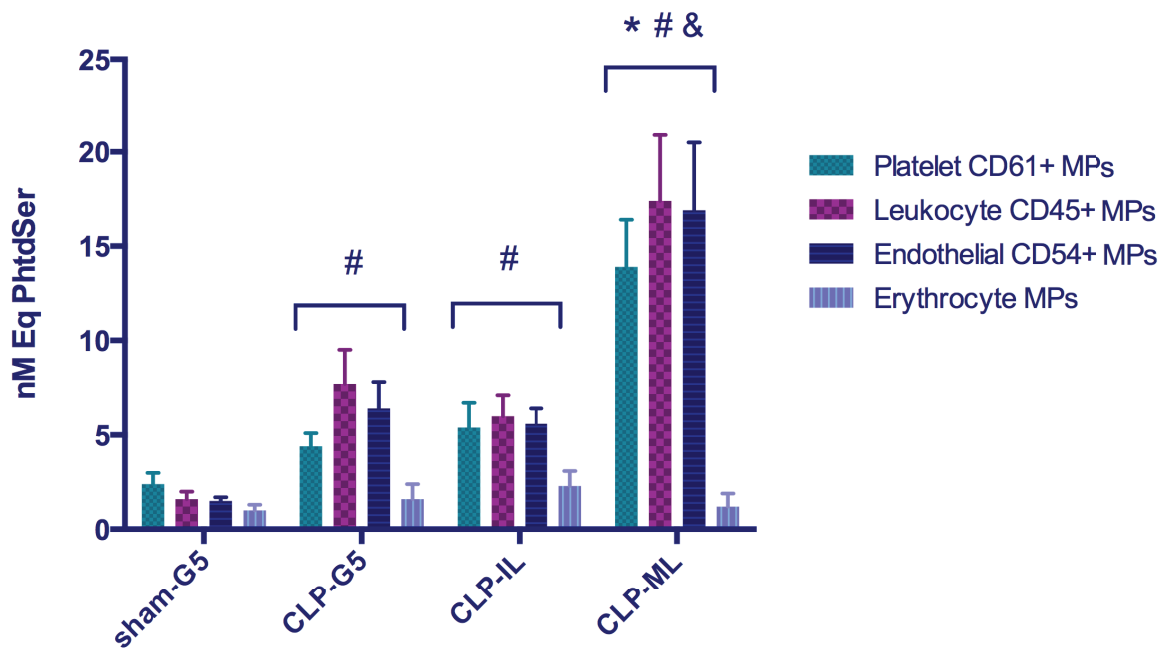


Figure 2a

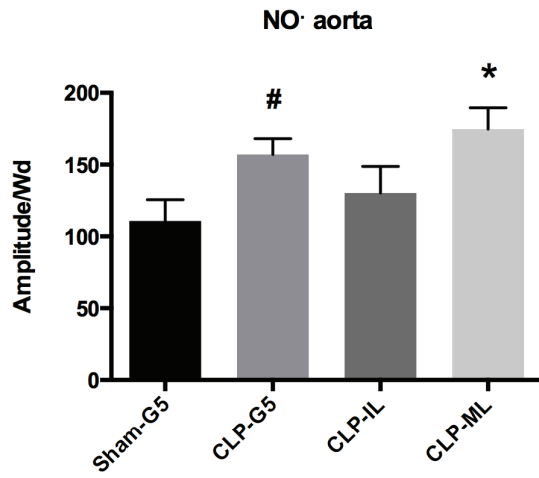


Figure 2b

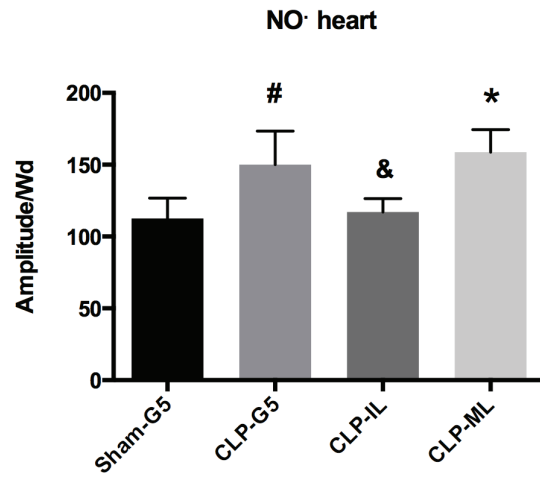


Figure 2c

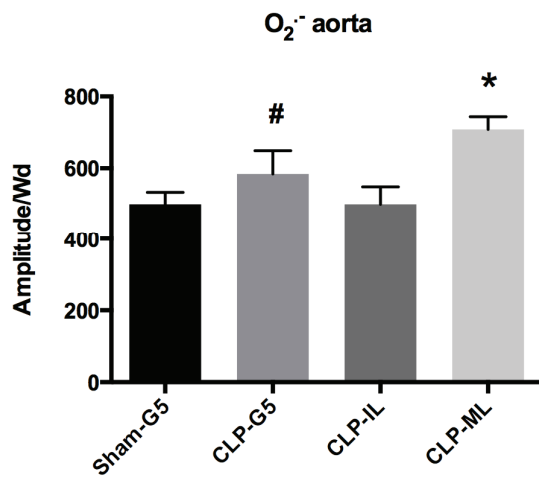


Figure 2d

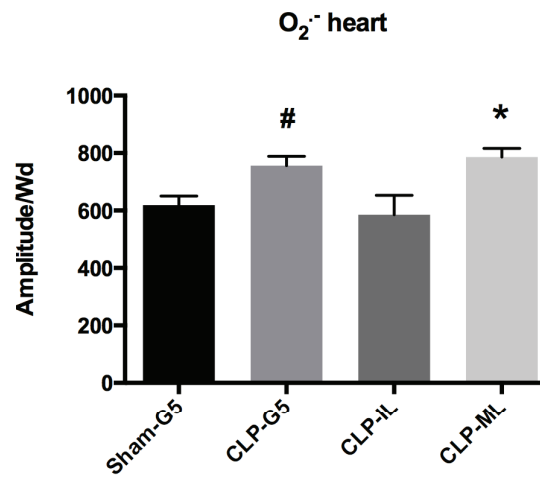


Figure 3a

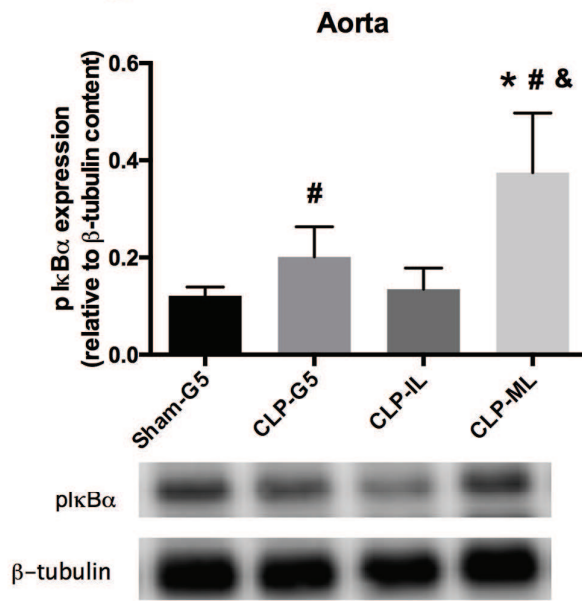


Figure 3b

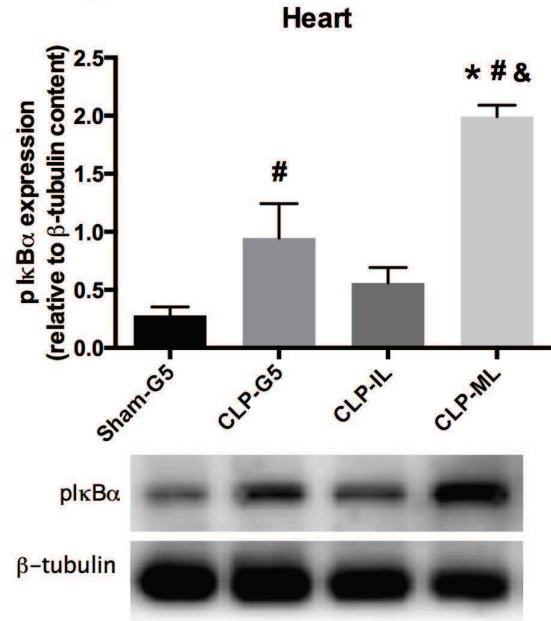


Figure 3c

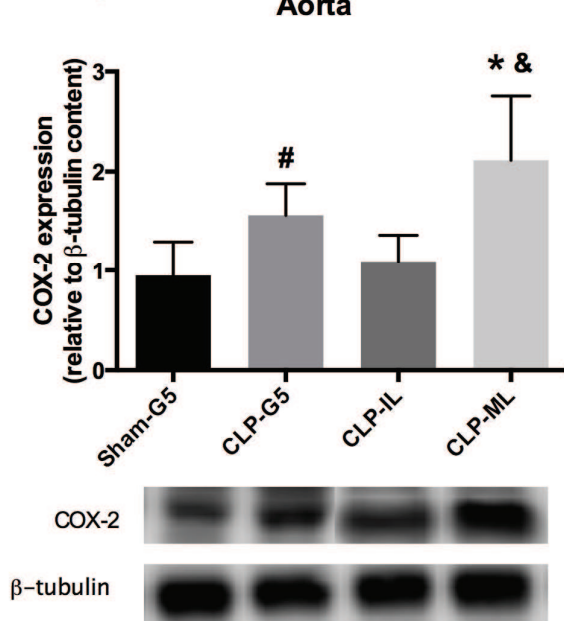


Figure 3d

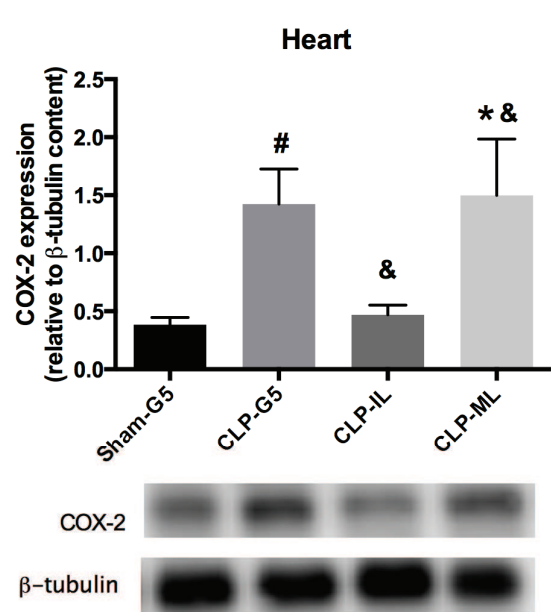


Table I: Characteristics of rats

CLP: cecal ligation and puncture, G5: dextrose 5%, IL: Intralipid®, ML: Medialipid®, MAP: mean arterial pressure, HR: heart rate, bpm: beat per minute, CBF: carotid blood flow, NE: norepinephrine, baseline: H18 after CLP/sham operation, end of experiment: H22 after CLP/sham operation, MPs: microparticles, nM eq. PhtdSer: nanomolar phosphatidylserine equivalents, SD: standard deviation. For each group, n=12. * p<0.05 vs. CLP-IL, # p<0.05 vs. sham-G5.

Mean ± SD	Sham-G5	Sham-IL	Sham-ML	CLP-G5	CLP-IL	CLP-ML
Weight (g)	358±9	358±9	363±5	349±8	353±7	353±7
Diuresis (mL)	14.9±3.8	18.5±2.4	17.6±5.7	7.3±2.3 [#]	9.9±2.4 [#]	9.0±2.4 [#]
MAP (mmHg)						
Baseline	119±4	120±3	120±3	72±6 [#]	71±7 [#]	72±6 [#]
End experiment	116±4	114±7	117±4	111±7	106±8	105±7
HR (bpm)						
Baseline	356±12	349±19	358±14	398±31 [#]	375±12 [#]	405±16 [#]
End experiment	381±14	369±20	391±19	417±40	390±11	382±29
CBF (mL/min)						
Baseline	4.5±0.8	4.0±0.4	4.8±0.3	2.6±0.7 [#]	2.9±0.8 [#]	2.8±0.8 [#]
End experiment	3.6±0.5	3.2±0.5	4.2±0.6	2.5±0.4 [#]	2.7±0.6	2.9±0.6 [#]
NaCl (mL/h)	1.0±0	1.0±0.0	1.0±0.0	2.5±0.5 [#]	2.4±0.3 [#]	2.7±1.1 [#]
NE (µg/kg/min)	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	1.9±0.8 [#]	1.2±0.3 [#]	2.7±0.2 ^{#*}
Lactate (mmol/L)	1.1±0.2	0.9±0.1	1.0±0.1	2.8±0.4 [#]	2.6±0.1 [#]	2.4±0.2 [#]
Survival (min)	240±0	240±0	240±0	240±0	240±0	240±0

Supplementary data:

Table I: Oil composition of the two lipid emulsions

Oil (g/100 mL):	Intralipid®	Medialipid®
- soybean oil	20	10
- coconut oil		10

Table II: Lipid emulsion detailed composition

		Intralipid®	Medialipid®
Fatty acids (g/100 mL):			
- caproate	6:0	0.0	0.1
- caprylate	8:0	0.0	5.7
- caprate	10:0	0.0	4.0
- laurate	12:0	0.0	0.2
- myristate	14:0	0.0	0.0
- palmitate	16:0	2.2	1.5
- stearate	18:0	0.8	0.4
- palmitoleate	16:1ω-7	0.0	0.0
- oleate	18:1ω-9	4.8	2.2
- linoleate	18:2ω-6	10.6	5.8
- α -linolenate	18:1ω-3	1.6	0.9
- arachidonate	20:4ω-6	0.0	0.0
- eicosapentaenoic acid	20:5ω-3	0.0	0.0
- docosapentaenoic acid	22:5ω-3	0.0	0.0
α-tocopherol (mg/100 mL)		3.8	21.6

Article 3

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

Delabranche X, **Boisramé-Helms J**, Asfar P, Berger A, Mootien Y, Lavigne T, Grunebaum L, Lanza F, Gachet C, Freyssinet J.M, Toti F, Meziani F

Intensive Care Medicine. 2013;39(10):1695-703

Les travaux décrits dans le troisième article avaient pour objectif de caractériser les MPs au cours du choc septique chez l'homme, à partir d'une étude clinique (Clinicaltrial.gov identifier NCT 01604551). Les MPs cumulant des effets pro-inflammatoires, procoagulants et pro-apoptotiques, nous avons évalué et caractérisé l'activation cellulaire au cours du choc septique chez l'homme, en utilisant les MPs circulantes comme témoins de la dysfonction du compartiment vasculaire et plus précisément ici de l'activation de la coagulation, à l'échelle cellulaire.

Nous avons réalisé une étude prospective multicentrique dans trois hôpitaux français, ayant inclus cent patients consécutifs adultes âgés de 18 à 85 ans et atteints de choc septique, après leur admission en réanimation. Nous avons réalisé des prélèvements sanguins le jour de l'admission et jusqu'au 4^{ème} jour, puis au 7^{ème} jour, afin de doser et caractériser les MPs circulantes, ainsi qu'un certain nombre de paramètres de l'hémostase et de l'inflammation, et d'établir leur cinétique.

Quatre-vingt-douze des cent patients ont été analysés. Le choc septique est associé à une augmentation significative du taux de MPs procoagulantes circulantes, comparé à des dosages de référence chez le sujet sain ($14,7 \pm 8,0$ vs. $4,9 \pm 2,8$ nM Eq PhtdSer, $p < 0,001$). La génération de certaines MPs procoagulantes est associée à la coagulation intravasculaire disséminée (CIVD). Le profil des MPs est modifié au cours du sepsis et le phénotype constitue un marqueur original d'activation cellulaire majeure, avec une augmentation significative de la génération de MPs endothéliales ($1,5 \pm 2,0$ vs. contrôles $0,4 \pm 0,0$ nM Eq PhtdSer, $p < 0,001$), leucocytaires ($6,4 \pm 6,0$ vs. contrôles $3,2 \pm 2,0$ nM Eq PhtdSer, $p < 0,001$) et plaquettaires ($5,1 \pm 6,0$ vs. contrôles $3,5 \pm 2,0$ nM Eq PhtdSer, $p < 0,05$). Chez les patients présentant une CIVD, les MPs plaquettaires diminuent significativement et proportionnellement à la thrombopénie, tandis que la numération leucocytaire indique une forte activation avec une proportion de MPs leucocytaires (CD11a) avec l'évolution de la CIVD. Enfin, on observe une activation très précoce et spécifique de l'endothélium, avec une forte augmentation des MPs CD105 et une diminution de l'apoptose endothéliale (CD31) en présence de CIVD.

Ces résultats soulignent l'importance potentielle des MPs dans la physiopathologie du choc septique et notamment l'approche cellulaire de la coagulopathie et de l'atteinte vasculaire qui le caractérisent. Plus précisément, les MPs apparaissent comme des marqueurs diagnostiques précoces et sensibles de la CIVD au cours du choc septique.

=> *Ce travail est publié :*

*Delabranche X, Boisramé-Helms J, Asfar P, Berger A, Mootien Y, Lavigne T, Grunebaum L, Lanza F, Gachet C, Freyssinet J.M, Toti F, Meziani F. Microparticles are new biomarkers of septic shock-induced disseminated intravascular coagulopathy. **Intensive Care Medicine.** 2013;39(10):1695-703. (impact factor 6,1)*

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
Published online: 21 June 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg and ESICM 2013

Clinicaltrial.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 biomark-

ers 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 (PtdSer), 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 PtdSer-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)	0.83
Abdominal	13 (14.1)	8 (15.4)	5 (12.5)	0.69
Bacteraemia	9 (9.8)	1 (1.9)	8 (20.0)	0.01
Unknown	12 (13.3)	3 (5.8)	9 (22.5)	0.03
Microorganism				
Gram-positive cocci	27 (29.3)	11 (21.2)	16 (40.0)	0.50
Enterobacteriae	20 (21.7)	12 (23.1)	8 (20.0)	
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

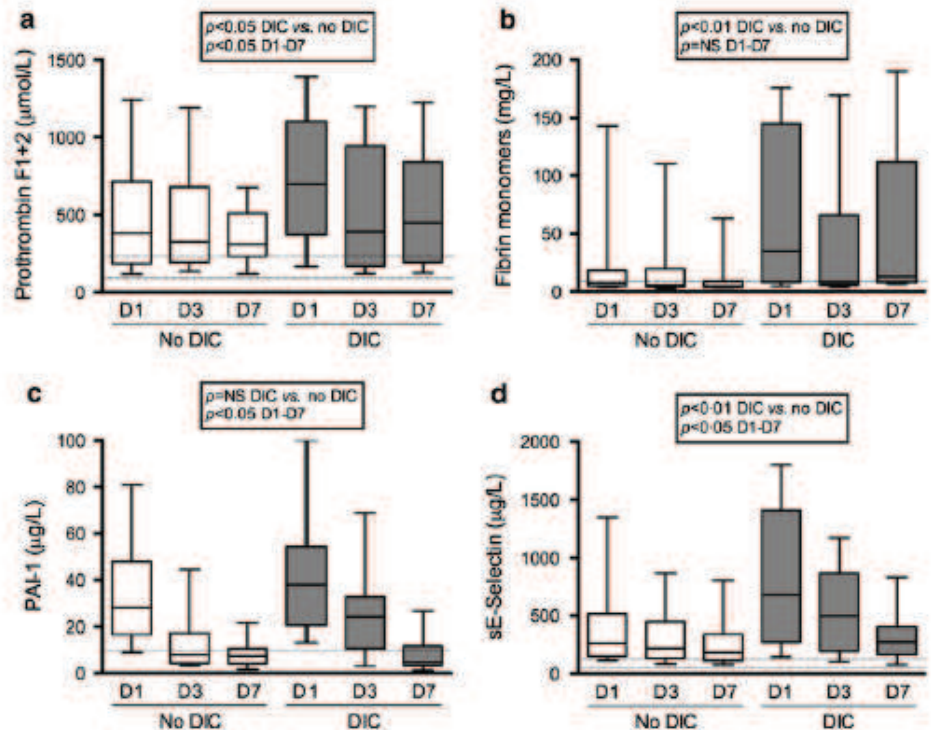
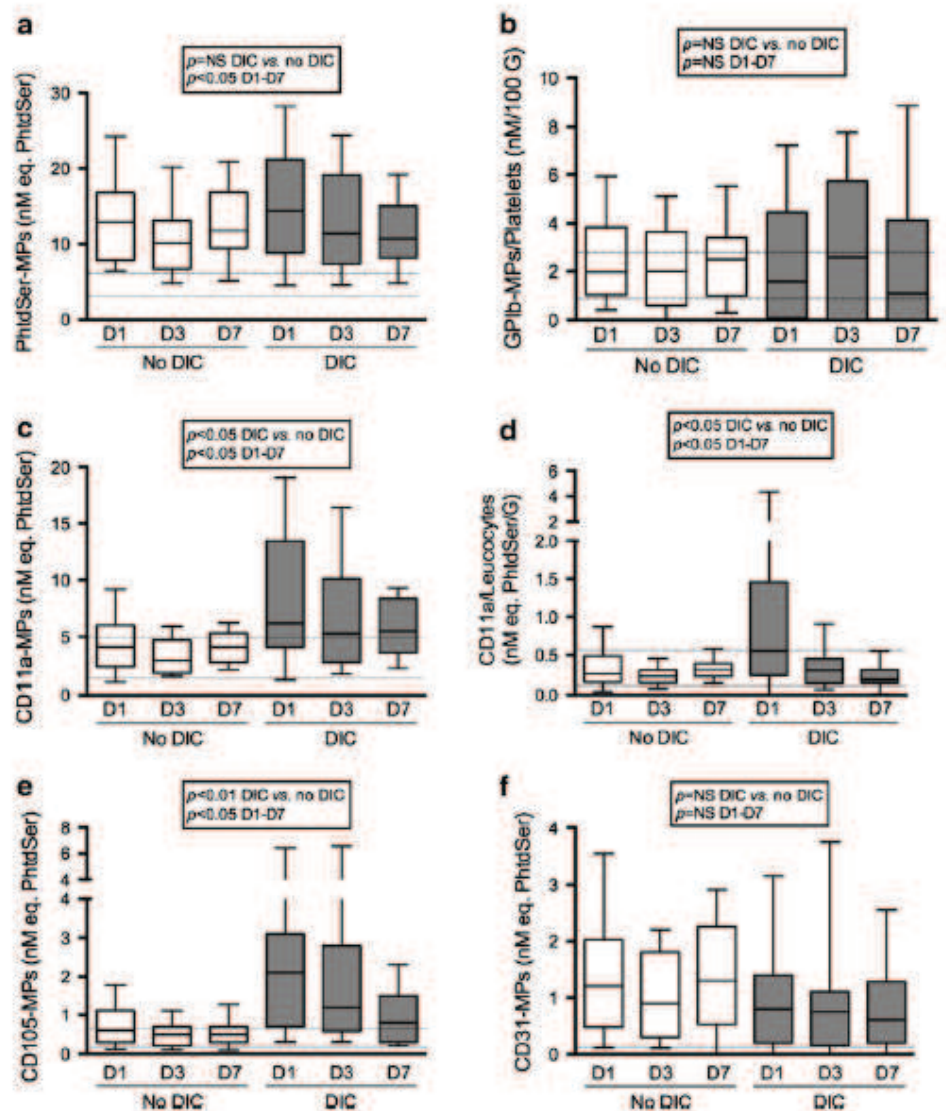


Fig. 2 Time course of total and platelet-, leucocyte- and endothelial cell-derived microparticles regarding DIC diagnosis. Results are shown in white (no DIC) or grey (early DIC) whisker boxes (horizontal line inside box median, upper and lower box limits 25–75th percentiles and T-bars 10–90th percentiles, 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)

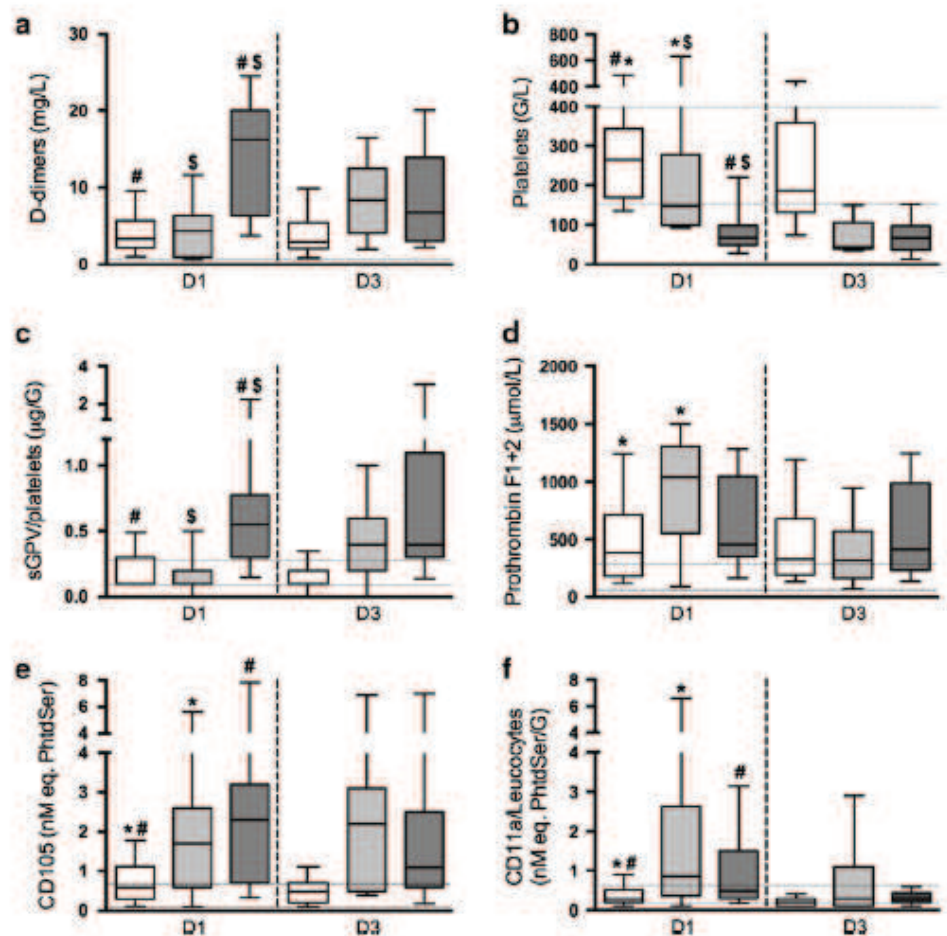


Table 2 Multiple logistic regression at admission (early DIC vs. no DIC)

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

- Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM (2005) Septic shock. *Lancet* 365:63–78
- Fourrier F (2012) Severe sepsis, coagulation, and fibrinolysis: dead end or one way? *Crit Care Med* 40:2704–2708
- Levi M (2012) Coagulation and sepsis: a winding road ahead. *Crit Care Med* 40:2733–2734
- Gando S (2010) Microvascular thrombosis and multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med* 38:S35–S42
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- Boisramé-Helms J, Kremer H, Schinikerth V, Meziani F (2013) Endothelial dysfunction in sepsis. *Curr Vasc Pharmacol* 11:150–160
- 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
- Mause SF, Weber C (2010) Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ Res* 107:1047–1057
- Meziani F, Delabranche X, Asfar P, Toti F (2010) Bench-to bedside review: circulating microparticles a new player in sepsis? *Crit Care* 14:236
- Delabranche X, Berger A, Boisramé-Helms J, Meziani F (2012) Microparticles and infectious diseases. *Med Mal Infect* 42:335–343
- Schouten M, Wiersinga WJ, Levi M, van der Poll T (2008) Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J Leukoc Biol* 83:536–545
- 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, Burbat 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, Gerotziakas 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, Chauat 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 XIIIa. *J Thromb Haemost* 10:1355–1362
34. Heemskerk JW, Mattheij 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 (Ancell, 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 non-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 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). 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.

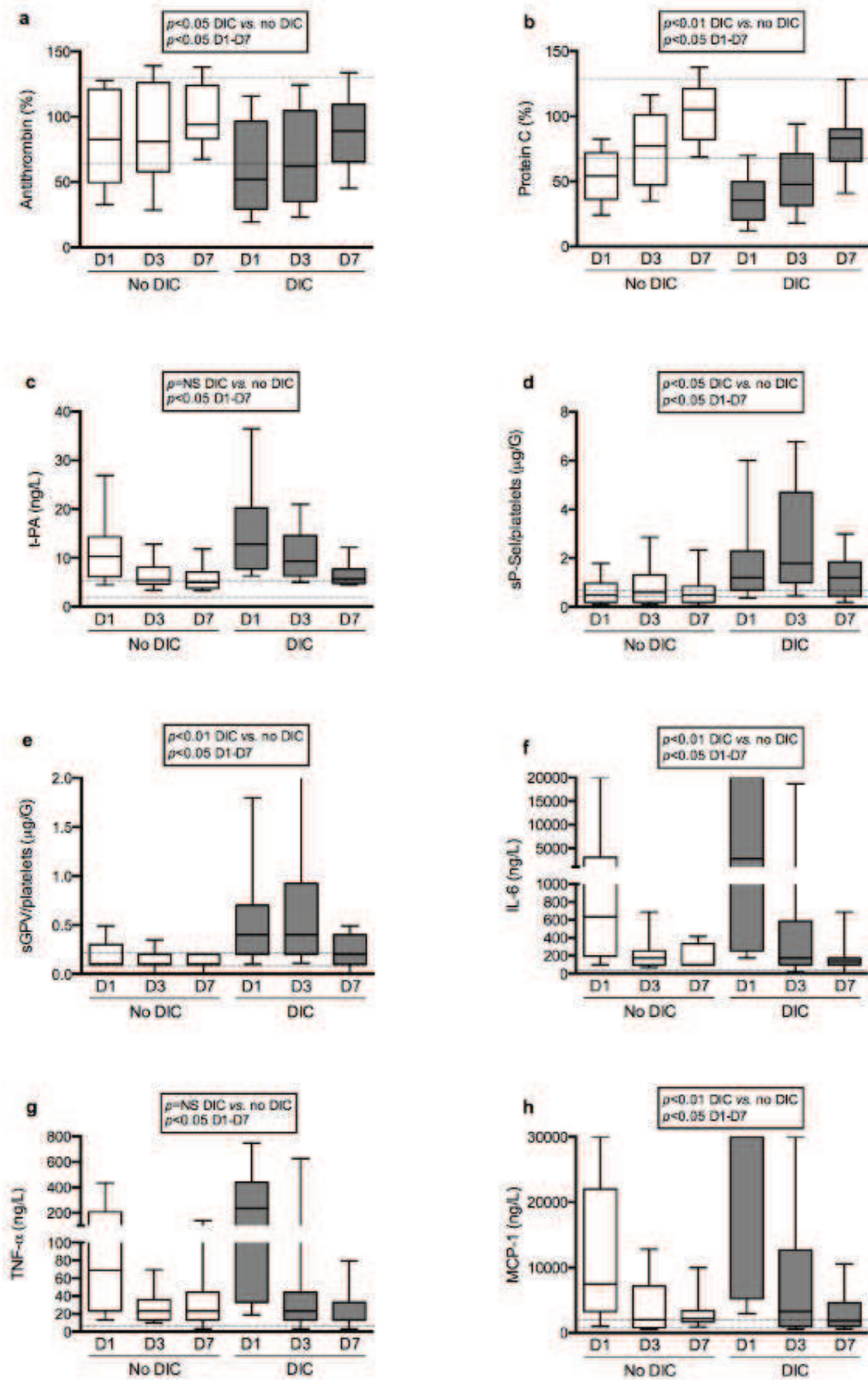


Fig 5.

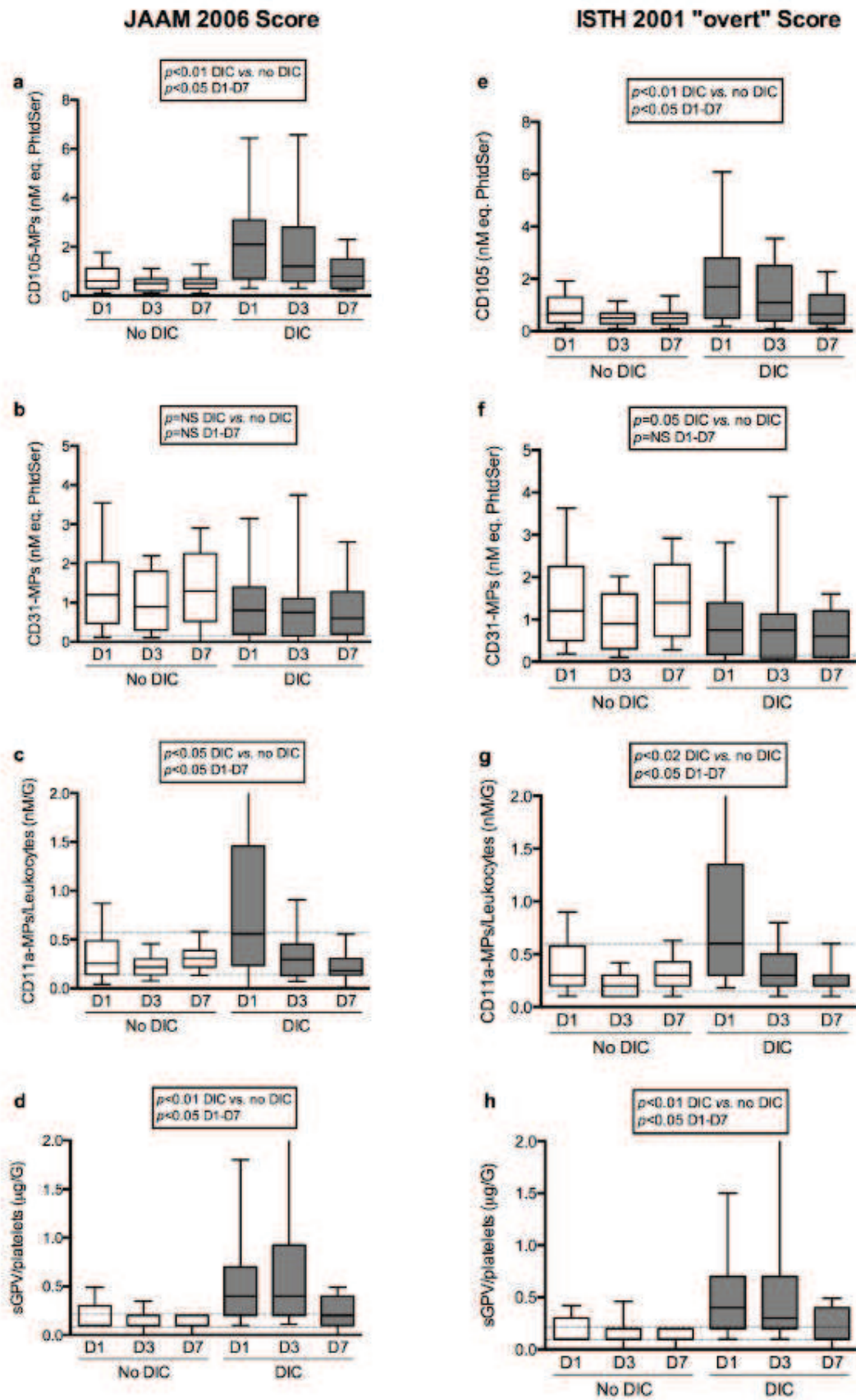


Table 3 DIC scoring, microparticles and haemostasis at admission (D1)

	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 ^S	5.8±1.6 ^{#S}
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
GPIIb/IIIa (Platelet)	3.5±2.2	6.6±6.4 [#]	4.3±4.1	2.5±3.1 [#]
CD11a (Leucocytes)	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 ^{+S}	94±88 ^S
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 ^S	14.4±7.3 ^{#S}
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

Article 4

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

Boisramé-Helms J, Delabranche X, Degirmenci S.E, Zobairi F, Berger A, Meyer G, Burban M, Mostefai H.A, Levy B, Toti F, Meziani F.

Thrombosis and Haemostasis. (2014) 10;111, 154-164

Le **quatrième article** de cette thèse a exploré l'intérêt de la modulation pharmacologique des MPs par la protéine C activée (PCa), afin de déterminer la place des MPs comme cibles thérapeutiques potentielles au cours du choc septique.

La protéine C est une sérine protéase plasmatique, vitamine K-dépendante, qui possède des propriétés anticoagulantes en présence de thrombine et de son cofacteur, la thrombomoduline, lorsqu'elle est liée à son récepteur endothélial EPCR. Une diminution de la génération de protéine C peut être consécutive à l'effet de cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF- α par réduction de l'activité de la thrombomoduline. L'utilisation de la PCa recombinante comme traitement induit la génération de MPs endothéliales porteuses d'une forme biologiquement active du récepteur de la protéine C activée. Ainsi, les MPs générées pourraient avoir un effet bénéfique dans le choc septique en diminuant la réponse inflammatoire, mais aussi en modulant la réponse hémostatique. En effet, ces MPs montrent des propriétés anticoagulantes, permettant de retarder la formation de thrombine et pourraient ainsi permettre de restaurer l'équilibre entre système pro- et anti-thrombotique et donc d'éviter le déclenchement de CIVD.

L'objectif principal de ce travail est d'étudier les mécanismes par lesquels les MPs participent à la dysfonction hémodynamique qui caractérise le choc septique et d'établir l'effet de leur modulation pharmacologique par la PCa recombinante.

Dans un modèle de choc septique par péritonite chez le rat, une fois le choc septique installé, les rats étaient sédatisés, ventilés et réanimés (remplissage vasculaire et noradrénaline) afin d'atteindre un objectif de pression artérielle moyenne et traités par la PCa en intraveineux continu durant 4h. Les MPs issues de rats en choc septique ou sham ont ensuite été inoculées à des rats « receveurs » sains et la réponse hémodynamique, le stress oxydant et la génération de MPs évalués chez les receveurs.

Nous avons tout d'abord mis en évidence une modification majeure du profil phénotypique des MPs circulantes chez les rats septiques, avec l'augmentation significative des concentrations en MPs leucocytaires, plaquettaires et endothéliales (respectivement multipliées par 9, 4 et 3). Le traitement

par PCa réduit significativement la concentration de MPs leucocytaires plasmatiques et la dose de noradrénaline nécessaire pour atteindre les objectifs de pression artérielle moyenne fixés pour la réanimation.

L'inoculation de MPs de rats septiques aux receveurs sains, a des conséquences hémodynamiques spécifiques selon le traitement initial du rat donneur. Ainsi, les MPs de rats septiques non traités, réduisent significativement la pression artérielle moyenne des rats receveurs sains (PAM 83 ± 9 vs. 120 ± 6 mmHg, 4h après l'inoculation des MPs, $p < 0,05$), reproduisant ainsi le profil hémodynamique du choc septique (contrairement aux MPs de rats traités par PCa).

Pour expliquer ces effets hémodynamiques, nous avons exploré différents mécanismes intervenant dans la physiopathologie du choc septique en quantifiant le thromboxane A₂, un puissant vasoconstricteur, l'activité PCa et en étudiant des protéines d'intérêt dans l'inflammation et le stress oxydant par résonance paramagnétique électronique. Les MPs circulant chez les rats septiques traités par PCa, comparées à celles des animaux non traités, présentent un contenu en thromboxane A₂ significativement supérieur ($77,1 \pm 11,4$ pg/mL vs. $39,8 \pm 4,5$ pg/mL, $p < 0,05$) et véhiculent une activité PCa plus importante ($15,3 \pm 1,6$ vs. $4,4 \pm 0,5$ mOD/h par 0.1 pmol de MPs totales, $p < 0,05$). De plus, l'inoculation de telles MPs à des receveurs sains est responsable d'une diminution de l'activation des NF- κ B et COX-2 artériels et d'une diminution de la génération de iNOS pro-inflammatoire. Enfin, cette inoculation modifie le phénotype des MPs chez les rats receveurs, avec une augmentation significative du taux de MPs plaquettaires ($4,5 \pm 1,3$ vs. $3,0 \pm 0,9$ nM, $p < 0,05$) et endothéliales ($2,7 \pm 1,5$ nM vs. $1,3 \pm 1,2$ nM, $p < 0,05$), confirmant ainsi que les MPs sont des cibles pharmacologiques.

En conclusion, nous avons montré dans un modèle animal de choc septique, que l'augmentation des concentrations de MPs procoagulantes circulantes est responsable d'effets hémodynamiques délétères et qu'un traitement par PCa modifie l'origine cellulaire et les quantités de MPs déversées dans le sang, limitant ainsi l'inflammation vasculaire et favorisant une amélioration de la pression artérielle.

=> Ce travail est publié :

Boisramé-Helms J, Delabranche X, Degirmenci SE, Zobairi F, Berger A, Meyer G, Burban M, Mostefai HA, Levy B, Toti F and Meziani F. Pharmacological modulation of procoagulant microparticles improves haemodynamic dysfunction during septic shock in rats. *Thrombosis and Haemostasis* 2014 ;111,154-164. (impact factor 6,1)

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

Julie Boisramé-Helms^{1,2*}; Xavier Delabranche^{1,2*}; Su-Emmanuelle Degirmenci²; Fatiha Zobairi²; Asael Berger^{1,2}; Grégory Meyer⁴; Mélanie Burban⁴; Hadj-Ahmed Mostefai¹; Bruno Levy⁵; Florence Toti^{3,4}; Ferhat Meziani^{1,2}

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; ³EA 7293, Stress Vasculaire et Tissulaire en Transplantation, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, France; ⁴Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, UMR 7213 CNRS, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, Illkirch, France; ⁵Groupe CHOC, Equipe AVENIR Inserm, Faculté de Médecine, Université de Nancy, Vandoeuvre les Nancy, Nancy, France

Summary

Circulating microparticles play a pro-inflammatory and procoagulant detrimental role in the vascular dysfunction of septic shock. It was the objective of this study to investigate mechanisms by which a pharmacological modulation of microparticles could affect vascular dysfunction in a rat model of septic shock. Septic or sham rats were treated by activated protein C (aPC) and resuscitated during 4 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. We found that 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 naive recipients, microparticles from aPC-treated septic rats prompted reduced NF- κ B and cyclooxygenase-2 arterial activation, blunted the generation of pro-inflammatory iNOS and secondarily increased platelet and endothelial microparticles. In 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.

Keywords

Activated protein C, haemodynamic dysfunction, inflammation, microparticles, septic shock

Correspondence to:

Ferhat Meziani, MD, PhD
Service de Réanimation Médicale – Nouvel Hôpital Civil
1, place de l'Hôpital
F-67091 Strasbourg cedex, France
Tel: +33 369 550 434, Fax: +33 369 551 859
E-mail: ferhat.meziani@chru-strasbourg.fr

Financial support:

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).

Received: April 17, 2013

Accepted after major revision: September 4, 2013

Prepublished online: October 10, 2013

doi:10.1160/TH13-04-0313

Thromb Haemost 2014; 111: 154–164

* The two first authors contributed equally to this work.

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 pro-thrombotic, 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 submicronic 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, that constitutes 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-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, IN, 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 μ g/kg of body weight) administered subcutaneously. If necessary, inhaled anaesthesia was increased and sufentanil was reinjected (0.1 μ g/kg of body weight; up to 0.5 μ g/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 (h) 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 (► Figure 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 stabilise for 30 minutes (min). 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 μ g/kg/h) or 0.9% sodium chloride. Fluid resuscitation of CLP rats was performed by a bolus of 0.9% NaCl (500 μ l every 10 min when needed) and norepinephrine was infused to target a MAP above 100 mmHg. After 240 min treatment, rats were bled *via* the left carotid artery under sterile conditions and blood was anticoagulated using 129 mM sodium citrate

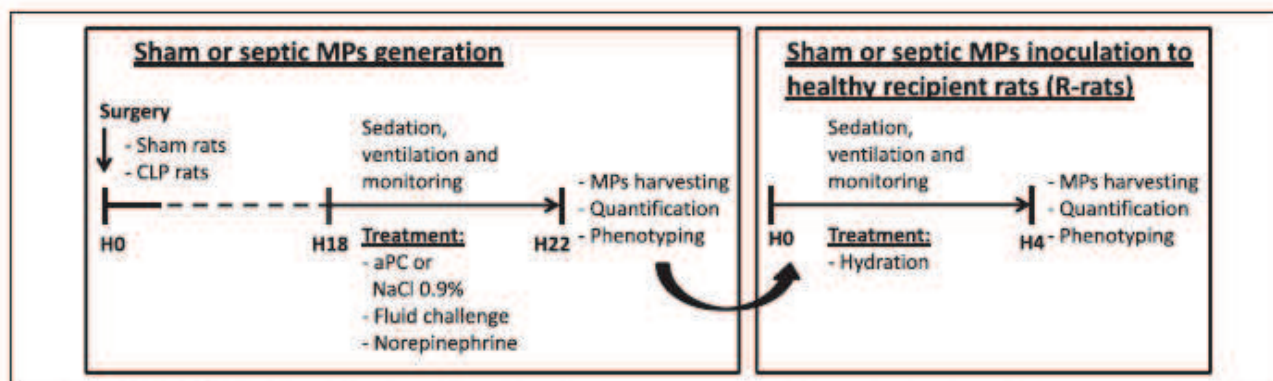


Figure 1: Protocol design. Left panel: in a first set of experiments, CLP rats were treated during 4 h with aPC or vehicle (0.9% sodium chloride) and resuscitated using fluid challenge and norepinephrine to target a MAP value over 100 mmHg. MPs were collected at the end of the monitoring. Right panel: in a second set of experiments, concentrated and washed MPs were

inoculated to healthy recipient rats (R-rats). R-Rats were monitored during 4 h 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.

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 (► Figure 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 centrifugations. 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 min to pellet MPs. MP pellets were washed and concentrated in Hanks Balanced Saline Solution (HBSS) without calcium or magnesium after 1 h 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 two 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 min 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. A total of 10-12 rats were inoculated in each subset. Rats were monitored as described above and haemodynamic parameters recorded during 4 h. 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 (► Figure 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, Paris, France) as described elsewhere (21). MP samples (100 µl/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 µM 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 Devices, Sunnyvale, CA, 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 µg/well) were directed against characteristic antigens borne by the parental cells: anti-CD61 for platelet GP_{IIb/IIIa} (β₃), 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, L'Arbresle Cedex, France) and were below the detection threshold (<0.1 endotoxin units/ml).

Measurement of the aPC activity borne by microparticles

MP pellets from 300 µl PPP (12,000 x g during 1 h) were re-suspended in 500 µl HBSS. After centrifugation (12000 x g, 1 h, 4°C), washed MP pellets were re-suspended in 300 µl HBSS. aPC activity was measured in 100 µl 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/h (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/h per 0.1 pmol PhtdSer.

Western blot analysis

Tissues from harvested MRAs, aortas and hearts were homogenised in lysis buffer (10 mM Tris-HCl, containing 1% sodium dodecyl sulfate, 1 mM sodium orthovanadate, 2.5 mg/l leupeptin and 5 mg/l aprotinin, pH 7.4) using an Ultrasonic Processor (Bioblock Scientific, Illkirch, 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, Hercules, CA, USA). Proteins were transferred onto polyvinylidene difluoride blotting membranes (Immobilon-P, Millipore, Billerica, MA, USA) 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 h 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, Euro-medex, Souffelweyersheim, France), NF-κB (1/1,000, Ozyme, Saint Quentin, France), cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 (1/1,000 Cayman Chemical Co, Ann Arbor, MI, USA), iNOS (1/1,000, Beckton Dickinson), β-tubulin (1/10,000, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany). After three washing steps,

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 h after CLP or sham surgery and rats were monitored during 4 h (from the 18th to the 22nd h). Circulating MPs were measured as nanomolar phosphatidylserine equivalents (nM eq. PhtdSer) at the end of the experiment (22nd h). 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.

	Sham-NaCl	Sham-aPC	CLP-NaCl	CLP-aPC
Body weight (g)	328 ± 8	336 ± 4	324 ± 6	328 ± 5
MAP (mmHg)	115 ± 5	110 ± 3	79 ± 3 * &	76 ± 3 * &
Baseline	115 ± 3	114 ± 3	59 ± 6 * &	72 ± 10 * &
End of experiment				
HR (bpm)	362 ± 8	341 ± 6	412 ± 14	386 ± 12
Baseline	375 ± 9	341 ± 3	350 ± 33	376 ± 21
End of experiment				
CBF (ml/min)	9.4 ± 0.4	8.5 ± 0.5	5.9 ± 0.4 * &	5.3 ± 0.6 * &
Baseline	6.4 ± 0.5	6.6 ± 0.3	4.3 ± 0.4 * &	4.8 ± 0.4 * &
End of experiment				
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 * & #
HCO ₃ ⁻ (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: 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/h: 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 \pm SD, * p<0.05 vs sham-NaCl and sham-aPC, # vs CLP-aPC, \$ vs sham-NaCl.

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

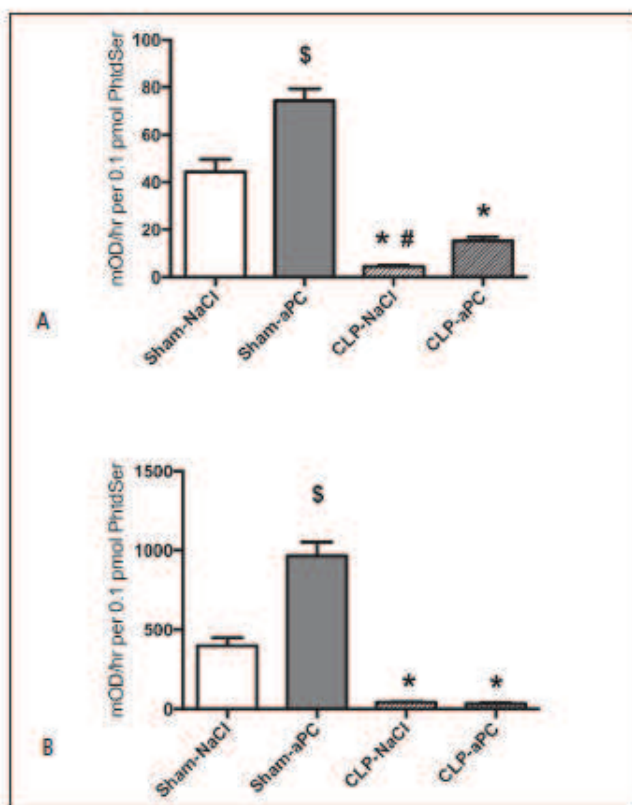


Figure 2: aPC activity borne by MPs from sham and CLP donor rats. aPC activity was measured in washed MP concentrates using a specific chromogenic substrate (n=6). Variations in optical density are expressed as mOD/h (optical density) per 0.1 pmol of PhtdSer. aPC activity was normalised to the content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

labelling was detected by 1/5,000 dilution of rabbit HRP-linked anti-rat for 1 h 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 1/2 dilution. Quantification was performed by densitometry analysis using imageJ™. Densitometry values of blotted proteins were 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 μ l of the supernatant of lysed MPs (12,000 \times 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 were 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

At 16–20 h 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 \pm 0.30 vs 1.41 \pm 0.10 mmol/l, p<0.05) and in HR (412 \pm 14 vs 362 \pm 8 bpm, p<0.05) and the collapse of CBF (5.9 \pm 0.4 vs 9.4 \pm 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 \pm 6 vs 79 \pm 3 mmHg at the beginning of the monitoring, p<0.05) and CBF (4.3 \pm 0.4 vs 5.9 \pm 0.4, p<0.05) in spite of active resuscitation, whereas the MAP of CLP-aPC rats (72 \pm 10 vs 76 \pm 3) and their CBF (4.8 \pm 0.4 vs 5.3 \pm 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 a 9-fold, 3-fold, 4-fold range compared to sham rats, re-

spectively (► 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/h 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/h per 0.1 pmol of MPs, $p < 0.05$) (► Figure 2A). However, normalisation to endothelial MPs' concentrations, showed that aPC activity per endothelial MP was not different in CLP-NaCl and CLP-aPC rats (► Figure 2B), although still higher in sham-aPC vs sham-NaCl rats (965.3 ± 86.1 and 398.1 ± 49.6 mOD/h per 0.1 pmol of PhtdSer, respectively, $p < 0.05$) (► Figure 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 ► Figure 2B).

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 h 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 h). 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.

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

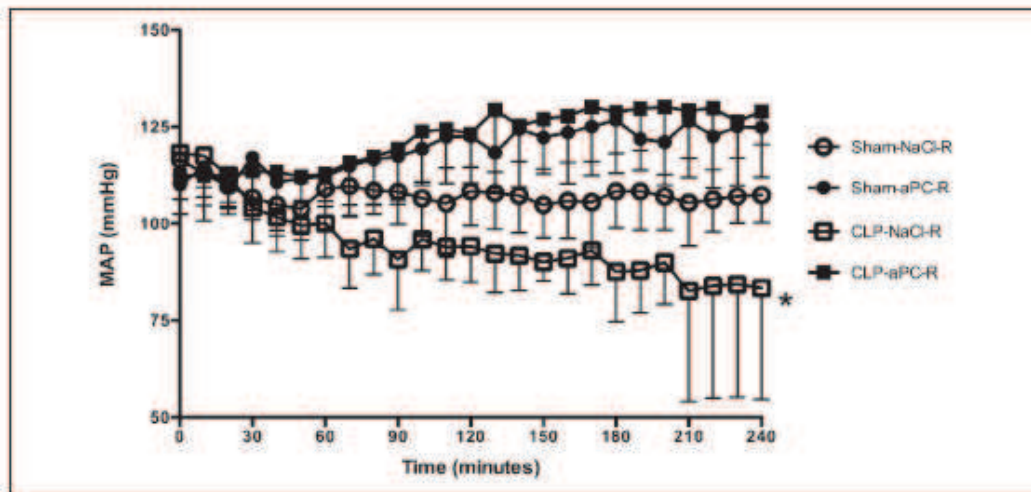


Figure 3: Mean arterial pressure (MAP) in healthy recipient rats (R-rats). MAP was monitored during the 4 h following microparticle inoculation. R-rats received MPs from sham-NaCl, sham-aPC, CLP-NaCl or CLP-aPC rats (n=10–12); data are expressed as mean \pm SD; *p<0.05 vs sham-NaCl-R, sham-aPC-R and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

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 h 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 h.

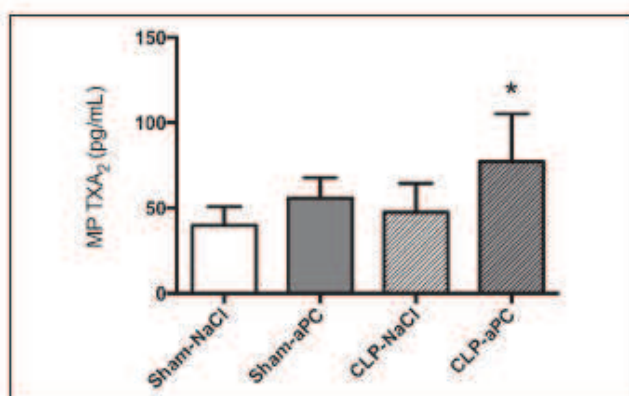


Figure 4: Thromboxane A₂ (TXA₂) content in microparticles isolated from donor rats and the effect of activated protein C. The TXA₂ content was measured by ELISA in MPs collected at the end of CLP-induced sepsis or in sham rats. The aPC treatment or the vehicle (0.9% NaCl) was applied during the 4 h following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

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, ► Figure 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 \pm 11.4 pg/ml vs sham-NaCl MPs: 39.8 \pm 4.5 pg/ml, p<0.05) (► Figure 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) was investigated by western blotting in the aorta, MRAs and heart collected from R-rats. COX 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 \pm 0.40 vs 2.00 \pm 0.11 arbitrary units [AU] for NF- κ B and 0.25 \pm 0.03 vs 0.15 \pm 0.02 AU for pI κ B- α , p<0.05) (► Figure 5A and C), 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 \pm 0.05 vs sham-NaCl-R: 0.16 \pm 0.02 AU for NF- κ B and CLP-NaCl-R: 0.51 \pm 0.02 vs sham-NaCl-R: 0.18 \pm 0.02 AU for pI κ B- α , p<0.05) (► Figure 5B and D). Interestingly, MPs from aPC-treated septic rats significantly limited NF- κ B and pI κ B- 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- 0.07 ± 0.02 AU in CLP-aPC-R rats, $p < 0.05$) (► Figure 5A and C). This observation was confirmed in heart tissues (► Figure 5B and D) and in aorta extracts (data not shown).

MPs had no effect on COX-1 expression in the recipients' MRAs, whatever the donor subset (► Figure 6). A different pat-

tern 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 AU, $p < 0.05$) (► Figure 6). Conversely, while septic MPs from CLP-NaCl donors increased iNOS expression

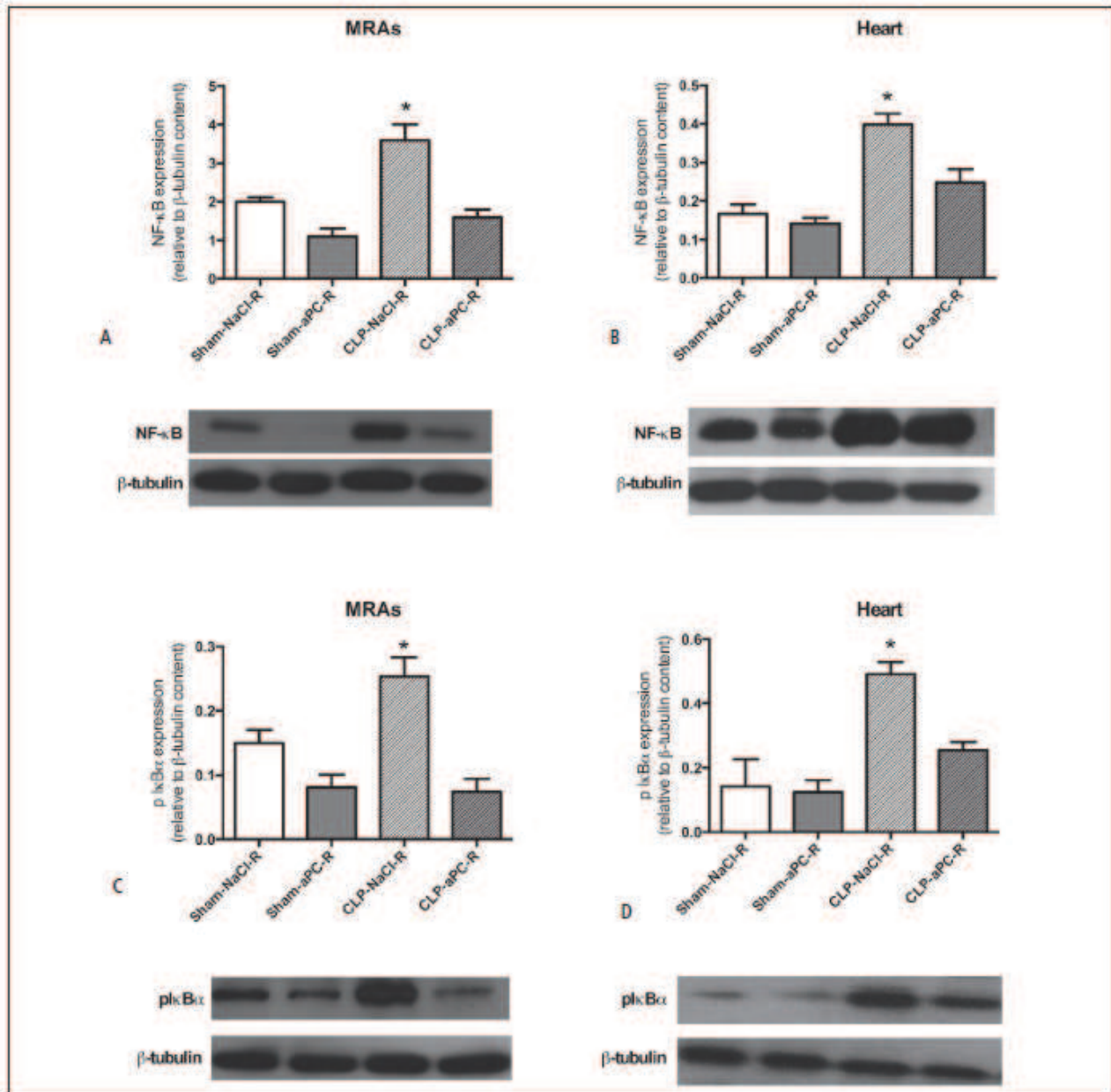


Figure 5: NF- κ B p65/RelA and pI κ B- α expressions in mesenteric resistance arteries (MRAs) and heart tissues of recipient rats inoculated with MPs. MRAs (A, C) and heart (B, D) tissue homogenates from sham-NaCl-R, sham-aPC-R, CLP-NaCl and CLP-aPC-R rats were collected 4 h following MP inoculation and loaded on 9% SDS-PAGE gels. NF- κ B p65/RelA

and pI κ B- α were identified by immunoblotting using specific antibodies. Densitometry images are representative of six separate blots and mean \pm SD densitometry values are expressed in arbitrary units (AU) relative to β -tubulin content. * $p < 0.05$ vs sham-NaCl-R, sham-aPC-R and CLP-aPC-R.

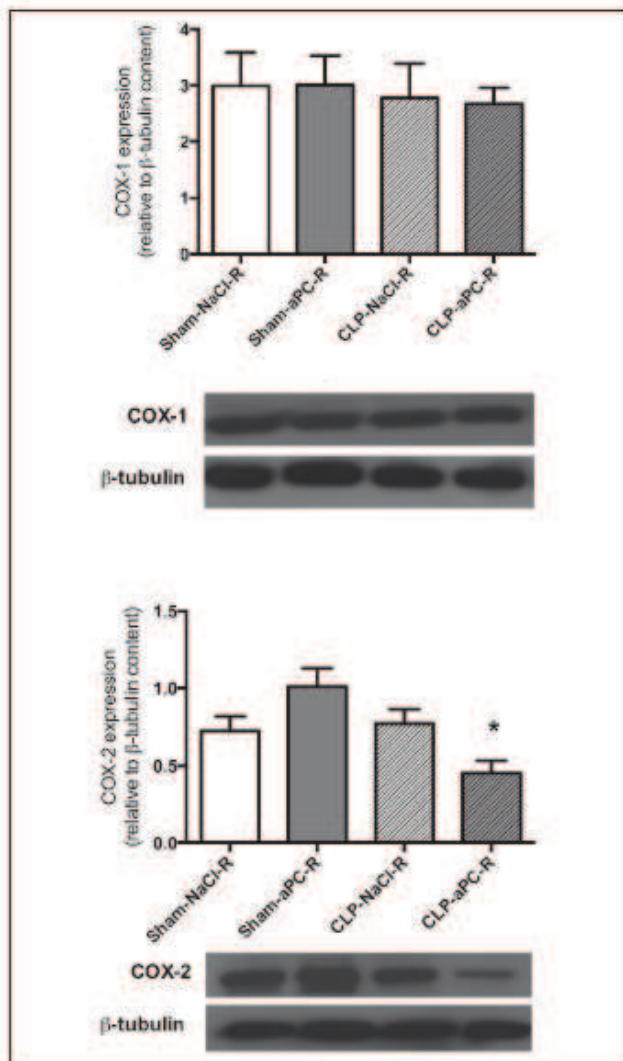


Figure 6: COX-1 and COX-2 expression in mesenteric resistance arteries (MRAs) of recipient rats inoculated with MPs. MRAs tissue homogenates from sham-NaCl-R, sham-aPC-R, CLP-NaCl and CLP-aPC-R rats were collected 4 h after MP inoculation and loaded on 9% SDS-PAGE gels. The expression of COX-1 and COX-2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

(CLP-NaCl-R: 4.28 ± 0.38 vs sham-NaCl-R: 1.00 ± 0.49 AU, $p < 0.05$), MPs isolated from aPC-treated septic rats significantly blunted this increase (CLP-aPC-R: 2.00 ± 0.42 AU, $p < 0.05$) (► Figure 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, 33, 34) 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 nitric oxide 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 revealed 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 vascular 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), 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- κ B 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

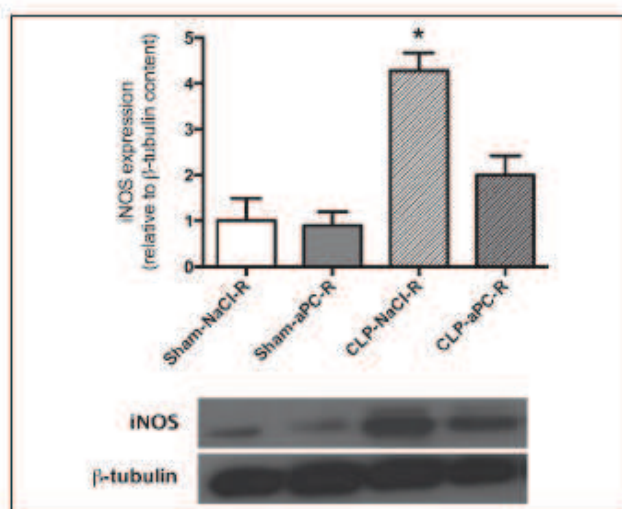


Figure 7: iNOS expression in mesenteric resistance arteries (MRAs) of recipient rats inoculated with MPs. MRA lysates from healthy recipient rats (R-rats) were obtained 4 h after MP inoculation and immunoblots performed to assess iNOS expression. Densitometry images are representative of six separate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

improve patients' survival and has therefore been recently removed from the available pharmacological tools (46). However, despite the alleged 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.

What is known about 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 does this paper add?

- 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.

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

Conflicts of Interest

None declared.

References

- Annane D, et al. Septic shock. *Lancet* 2005; 365: 63–78.
- Boisramé-Helms J, et al. Endothelial dysfunction in sepsis. *Curr Vasc Pharmacol* 2013; 11: 150–160.
- Fourrier F. Severe sepsis, coagulation, and fibrinolysis: dead end or one way? *Crit Care Med* 2012; 40: 2704–2708.
- Morel O, et al. Microparticles: a critical component in the nexus between inflammation, immunity, and thrombosis. *Semin Immunopathol* 2011; 33: 469–486.
- Mause SF, Weber C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ Res* 2010; 107: 1047–1057.
- Morel O, et al. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. *Curr Opin Hematol* 2004; 11: 156–164.
- Meziani F, et al. Bench-to-bedside review: circulating microparticles—a new player in sepsis? *Crit Care* 2010; 14: 236.
- Nieuwland R, et al. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood* 2000; 95: 930–935.
- Mortaza S, et al. Detrimental hemodynamic and inflammatory effects of microparticles originating from septic rats. *Crit Care Med* 2009; 37: 2045–2050.
- Berckmans RJ, et al. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb Haemost* 2001; 85: 639–646.
- Rautou PE, et al. Microparticles, vascular function, and atherothrombosis. *Circ Res* 2011; 109: 593–606.
- Egorina EM, et al. Granulocytes do not express but acquire monocyte-derived tissue factor in whole blood: evidence for a direct transfer. *Blood* 2008; 111: 1208–1216.
- Van Der Meijden PE, et al. Platelet- and erythrocyte-derived microparticles trigger thrombin generation via factor XIIa. *J Thromb Haemost* 2012; 10: 1355–1362.
- Mosnier LO, et al. The cytoprotective protein C pathway. *Blood* 2007; 109: 3161–3172.
- Montes R, et al. Activated protein C: reasons to believe. *J Thromb Haemost* 2012; 10: 1733–1735.
- Sennoun N, 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: H277–282.
- Sennoun N, et al. Activated protein C improves lipopolysaccharide-induced cardiovascular dysfunction by decreasing tissular inflammation and oxidative stress. *Crit Care Med* 2009; 37: 246–255.
- Dhainaut JF, et al. Treatment effects of drotrecogin alfa (activated) in patients with severe sepsis with or without overt disseminated intravascular coagulation. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH* 2004; 2: 1924–1933.
- Kerschen EJ, et al. Endotoxemia and sepsis mortality reduction by non-anticoagulant activated protein C. *J Exp Med* 2007; 204: 2439–2448.
- Mosnier LO, et al. Hyperantithrombotic, noncytoprotective Glu149Ala-activated protein C mutant. *Blood* 2009; 113: 5970–5978.
- Russo A, et al. Proteases display biased agonism at protease-activated receptors: location matters! *Mol Interv* 2009; 9: 87–96.
- 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: 390–396.
- Weiler H. Multiple receptor-mediated functions of activated protein C. *Hemostaseologie* 2011; 31: 185–195.
- Mosnier LO, et al. Biased agonism of protease-activated receptor 1 by activated protein C caused by noncanonical cleavage at Arg46. *Blood* 2012; 120: 5237–5246.
- Perez-Casal M, et al. Activated protein C induces the release of microparticle-associated endothelial protein C receptor. *Blood* 2005; 105: 1515–1522.
- Perez-Casal M, et al. The clinical and functional relevance of microparticles induced by activated protein C treatment in sepsis. *Crit Care* 2011; 15: R195.
- Hubbard WJ, et al. Cecal ligation and puncture. *Shock* 2005; 24 (Suppl 1): S2–S7.
- Hugel B, et al. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 1846–1847.
- Boulangier CM, et al. Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. *Circulation* 2001; 104: 2649–2652.
- Pfister SL. Role of platelet microparticles in the production of thromboxane by rabbit pulmonary artery. *Hypertension* 2004; 43: 428–433.
- Tesse A, et al. Upregulation of proinflammatory proteins through NF-kappaB pathway by shed membrane microparticles results in vascular hyporeactivity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 2522–2527.
- Dignat-George F, et al. Endothelial microparticles: a potential contribution to the thrombotic complications of the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 2004; 91: 667–673.
- Joop K, et al. Microparticles from patients with multiple organ dysfunction syndrome and sepsis support coagulation through multiple mechanisms. *Thromb Haemost* 2001; 85: 810–820.
- Delabranche X, et al. Microparticles are new biomarkers of septic shock-induced disseminated intravascular coagulopathy. *Intensive Care Med* 2013; epub ahead of print.
- Brodsky SV, et al. Endothelium-derived microparticles impair endothelial function in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286: H1910–1915.
- Densmore JC, et al. Endothelium-derived microparticles induce endothelial dysfunction and acute lung injury. *Shock* 2006; 26: 464–471.
- Soriano AO, 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: 2540–2546.
- Janiszewski M, et al. Platelet-derived exosomes of septic individuals possess proapoptotic NAD(P)H oxidase activity: A novel vascular redox pathway. *Critical Care Med* 2004; 32: 818–825.
- Sen P, 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: 3199–3208.
- Bouwens EA, et al. Mechanisms of anticoagulant and cytoprotective actions of the protein C pathway. *J Thromb Haemost* 2013; 11 (Suppl 1): 242–253.
- Bae JS, et al. Lipid raft localization regulates the cleavage specificity of protease activated receptor 1 in endothelial cells. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 954–961.
- Ghosh S, et al. Endothelial cell protein C receptor acts as a cellular receptor for factor VIIa on endothelium. *J Biol Chem* 2007; 282: 11849–11857.
- Bhattacharya A, Cohen ML. Vascular contraction and relaxation to thrombin and trypsin: thrombomodulin preferentially attenuates thrombin-induced contraction. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 295: 284–290.
- Mostefai HA, et al. Circulating microparticles from patients with septic shock exert protective role in vascular function. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178: 1148–1155.
- Barry OP, 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: 7545–7556.
- Ranieri VM, et al. Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock. *N Engl J Med* 2012; 366: 2055–2064.

Discussion

Dans ce travail de thèse, nous avons cherché à montrer que les microparticules, au cours du choc septique, peuvent constituer à la fois des marqueurs reflétant l'intense activation cellulaire, pouvant ainsi être des marqueurs diagnostiques ou pronostiques, mais également des cibles thérapeutiques potentielles.

Dans un premier temps, notre travail a cherché à évaluer la place des microparticules comme **marqueurs de l'activation cellulaire** au cours du choc septique. Ce dernier est en effet caractérisé par une intense activation cellulaire, qui entraîne un remodelage de la membrane plasmique, aboutissant à la génération de MPs circulantes (Freyssinet JM, 2003). L'intérêt de ces microvésicules réside dans le fait qu'elles témoignent spécifiquement de l'atteinte d'un type cellulaire, en réponse à un stress donné, et pourraient de ce fait apporter un nouvel éclairage sur la physiopathologie cellulaire du choc septique.

Nous avons ainsi montré dans notre modèle expérimental de choc septique chez le rat, mais également chez l'homme, que les MPs totales sont significativement augmentées et que leur phénotype est altéré, avec une augmentation significative des MPs endothéliales, plaquettaires et leucocytaires, reflétant notamment la dysfonction endothéliale (Boisrame-Helms J *et al.*, 2013).

Ces MPs seraient impliquées dans la pathogénèse de la dysfonction circulatoire et la défaillance d'organes, notamment par le biais d'une potentielle amplification des réponses pro-inflammatoires et procoagulantes (Meziani F *et al.*, 2010). Ainsi, nous avons montré que l'injection de MPs procoagulantes issues de rats septiques reproduit le profil hémodynamique du choc septique, ce qui corrobore des résultats obtenus précédemment dans un modèle de rats septiques (Mortaza S *et al.*, 2009).

Les effets hémodynamiques des MPs passeraient par plusieurs mécanismes, chaque type de MPs (endothélial, leucocytaire, plaquettaire) pouvant avoir des effets spécifiques. Les résultats que nous

avons obtenus dans notre modèle de choc septique chez le rat prennent ici toute leur importance, puisque nous avons mis en évidence que l'inoculation de MPs isolées chez des rats septiques après modulation pharmacologique par la PCa est responsable de la génération d'un nouveau type de MPs, avec une augmentation significative du taux de MPs plaquettaires et une tendance à l'augmentation du taux de MPs endothéliales.

Ainsi, les MPs endothéliales et plaquettaire sont capables de majorer le stress oxydant en induisant la génération d'espèces réactives de l'oxygène (Brodsky SV *et al.*, 2004; Janiszewski M *et al.*, 2004; Soriano AO *et al.*, 2005). Elles régulent également le tonus vasculaire, par le biais notamment d'une diminution de la biodisponibilité du NO[•] et d'une majoration de la synthèse de thromboxane-A₂, puissant vasoconstricteur, comme nous l'avons montré dans le modèle de choc septique chez le rat et comme cela a été mis en évidence dans un modèle d'hypertension artérielle pulmonaire chez le lapin (Pfister SL, 2004).

Les MPs sont également procoagulantes, car elles fournissent la PhtdSer (Aras O *et al.*, 2004), permettant l'assemblage des facteurs de la coagulation, et selon leur origine cellulaire, elles exposent le facteur tissulaire, initiateur de la coagulation. Elles participent ainsi à la formation de microthrombi, amplifiant les réponses procoagulantes (Zwicker JI *et al.*, 2011), contribuent à la formation de larges agrégats plaquettaires dans certains types d'atteintes cardiovasculaires inflammatoires (infarctus du myocarde, accident vasculaire cérébral, *purpura fulminans*, etc...) et leur taux est corrélé à la survenue d'événements thrombotiques (Nieuwland R *et al.*, 2000; Heloire F *et al.*, 2003). Par ailleurs, les MPs d'origine plaquettaire et endothéliale, augmentent la génération de thrombine (Perez-Casal M *et al.*, 2005; Meziani F *et al.*, 2008; Van Der Meijden PE *et al.*, 2012) et peuvent donc potentiellement aggraver la coagulopathie qui accompagne les états de choc septique. Un travail expérimental a en effet mis en évidence la génération de thrombine à la surface des MPs plaquettaires indépendamment du facteur tissulaire et du FVIIa, *via* le FXII activé par les polyphosphates plaquettaires ou bactériens (Van Der Meijden PE *et al.*, 2012). Les MPs monocytaires participent elles aussi à la dissémination d'un potentiel procoagulant en exprimant le facteur tissulaire (Satta N *et al.*, 1994; Nieuwland R *et al.*, 2000; Geisbert TW *et al.*, 2003; Morel N *et al.*, 2006) et en permettant,

dans un état septique grave, la génération de thrombine de façon indépendante du FXII (phase contact). Par ailleurs, les MPs monocytaires et endothéliales exhibent de la thrombomoduline nécessaire à l'activation de la protéine C par la thrombine et l'EPCR (Satta N *et al.*, 1997). Après stimulation par du LPS, les MPs monocytaires sont de plus capables de transporter de d'IL-1 β , participant ainsi au couplage inflammation-thrombose (MacKenzie A *et al.*, 2001) en favorisant la production d'ICAM-1 et autres molécules d'adhésion par les cellules endothéliales (Brown GT *et al.*, 2011) et facilitant la diapédèse des leucocytes au niveau du site de l'infection.

Les MPs peuvent de plus moduler l'inflammation, puisqu'elles sont responsables d'une extravasation des lymphocytes T vers les sites d'inflammation (Qu Y *et al.*, 2009), contiennent et véhiculent des protéines impliquées dans les processus inflammatoires et la reconnaissance des pathogènes, participant ainsi à la fois au contrôle, mais également à la propagation de l'inflammation et de ses conséquences (Wang JG *et al.*, 2011). D'autres types microparticulaires sont à l'origine d'effets pro-inflammatoires et participent à la genèse de la dysfonction cardio-circulatoire du choc septique comme nous l'avons montré dans notre modèle de choc septique chez le rat. Ainsi, les MPs leucocytaires, augmentées dans notre étude chez les patients septiques, sont capables d'induire une hyperactivité vasculaire en majorant la synthèse de COX-2 et de iNOS (Tesse A *et al.*, 2005), avec surproduction de NO[•] et réduction de la contraction vasculaire (Meziani F *et al.*, 2006; Tesse A *et al.*, 2007).

Les MPs contribueraient également à l'induction de la réponse immunitaire innée et la clairance de l'agent infectieux par les TLR. Après stimulation de monocytes en culture par du LPS, nous avons montré que les MPs générées sont capables de transmettre le CD14 soluble/TLR4 à des cellules cibles lymphocytaires et d'induire dans des cellules dépourvues de TLR4 l'activation de NF- κ B et l'apoptose (Delabranche X *et al.*, 2012b; Constantinescu AA *et al.*, 2014). Il a par ailleurs été montré que les MPs endothéliales sont capables d'activer la voie alterne du complément (Renner B *et al.*, 2013). De nombreuses maladies auto-immunes sont associées à des concentrations plasmatiques de MPs élevées et ces dernières semblent être plutôt la cause que la conséquence d'un état hyper-

inflammatoire (van Eijk IC *et al.*, 2010). Elles portent en effet des immunoglobulines (IgG, IgM) et la fraction C1q. Les concentrations élevées de MPs porteuses d'IgG ont été associées à la production d'auto-anticorps et à l'activation du complément (Nielsen CT *et al.*, 2012).

Afin d'évaluer la cinétique de l'activation cellulaire durant le choc septique, nous avons pu caractériser l'évolution de la vésiculation membranaire dans notre cohorte de patients en choc septique et la corrélérer aux désordres hémostatiques. Nous avons tout d'abord montré que les variations du taux et du phénotype des MPs sont détectables précocement au cours du choc septique et pourraient refléter la séquence d'activation cellulaire chez les patients, alors que les conséquences de cette activation, comme la libération de protéines plasmatiques, sont détectables et quantifiables plus tardivement. Ainsi, chez les malades en choc septique sans CIVD, nous avons montré que les MPs plaquettaires sont significativement et durablement augmentées. Ces patients ne présentent pas d'activation plaquettaire, avec des ratios de CD62P soluble/plaquettes et GPV soluble/plaquettes normaux, alors qu'ils sont augmentés en cas de CIVD. L'activation plaquettaire survient plus tardivement comme le montre l'augmentation secondaire des CD62P soluble/plaquettes et GPV soluble/plaquettes.

Nous avons également montré que les MPs procoagulantes étaient significativement et durablement augmentées chez les patients en choc septique, qu'il y ait ou non une coagulopathie de consommation (CIVD), et pourraient expliquer la faible incidence des manifestations hémorragiques chez les patients en CIVD présentant pourtant des troubles majeurs de l'hémostase. L'activité procoagulante des MPs plaquettaires serait en effet supérieure à celles des plaquettes activées, ce qui pourrait expliquer la faible incidence des manifestations hémorragiques au cours des thrombopénies par activation plaquettaire (Kelton JG *et al.*, 1992; Jimenez JJ *et al.*, 2001; Bretelle F *et al.*, 2003; Meziani F *et al.*, 2006), comme au cours de la CIVD du choc septique (Nieuwland R *et al.*, 2000).

Nous avons aussi montré une altération du phénotype microparticulaire chez les patients présentant une CIVD, avec une diminution des MPs plaquettaires proportionnellement à la numération plaquettaire, tandis que les MPs leucocytaires deviennent prédominantes, avec un ratio MPs leucocytaires/leucocytes augmenté comparé aux patients ne présentant pas de CIVD. La numération

leucocytaire étant identique à l'admission dans les deux groupes de patients, cette augmentation traduit une vésiculation plus importante reflétant une activation leucocytaire plus importante. Nous avons montré que la prédominance des MPs leucocytaires persiste dans le temps (au moins jusqu'au 7^{ème} jour), alors que les concentrations de MPs circulantes reviennent à un niveau basal. Nous avons également mis en évidence que l'activation de la coagulation se traduit par une activation endothéliale avec génération de MPs endothéliale à la phase précoce de la CIVD.

Dans ce travail, nous avons ensuite cherché à montrer que les microparticules peuvent constituer de véritables **marqueurs diagnostiques et pronostiques** au cours du choc septique. Le diagnostic précoce de choc septique est primordial, afin d'en optimiser la prise en charge symptomatique et étiologique, de prévenir ou suppléer les défaillances d'organes et d'en réduire la mortalité. Des marqueurs biologiques spécifiques pourraient permettre d'en établir précocement le diagnostic. Plusieurs marqueurs biologiques sont dosés en pratique clinique, comme le lactate plasmatique, qui peut témoigner d'une hypoperfusion tissulaire, mais est aspécifique. Il est cependant couramment utilisé, dans tous types d'état de choc, pour guider la prise en charge thérapeutique de ces patients (Early Goal Directed Therapy) (Rivers E *et al.*, 2001). Plus récemment, de nouveaux traitements ont vu le jour, visant à diminuer la phase inflammatoire du sepsis (Christaki E *et al.*, 2011). De nouveaux biomarqueurs associés sont également étudiés, avec pour objectif de prédire la mise en jeu des mécanismes de régulation du système immunitaire. Ils présenteraient un intérêt, comme « marqueur adjuvant » pour affiner la place du lactate. Ces biomarqueurs incluent des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires, témoins respectivement de la phase hyper-inflammatoire ou immunosuppressive du sepsis, la CRP et la procalcitonine, synthétisées en réponse à l'inflammation et à l'infection bactérienne, et des marqueurs de l'activation leucocytaire (granulocytes neutrophiles, monocytes, lymphocytes). L'usage combiné de ces marqueurs pourrait permettre un diagnostic précoce de gravité des patients, avant un stade évolué du sepsis (Faix JD, 2013).

Des données de la littérature suggèrent que les taux plasmatiques et profils phénotypiques des MPs pourraient être utilisés comme des marqueurs diagnostiques ou pronostiques dans certaines pathologies (Baron M *et al.*, 2012). Ainsi, les MPs endothéliales auraient par exemple une valeur pronostique dans l'hypertension artérielle pulmonaire et l'insuffisance rénale terminale, où elles sont corrélées à la survenue de complications et à une surmortalité. Au cours de l'hypertension artérielle pulmonaire, une augmentation du taux de MPs endothéliales aurait la même valeur prédictive pronostique péjorative que la valeur de la CRP (Bakouboula B *et al.*, 2008; Amabile N *et al.*, 2009; Burger D *et al.*, 2012).

Durant le choc septique chez l'homme, le diagnostic de CIVD est difficile, non consensuel et souvent retardé, alors que la survenue d'une CIVD au cours du choc septique est grevée d'une surmortalité. Dans ce contexte, eu égard à notre travail, les MPs endothéliales porteuses de CD105 prennent une véritable valeur diagnostique et pourraient constituer un précieux outil de suivi biologique de la CIVD. Elles permettraient en effet d'établir un diagnostic précoce et rapide. D'après nos résultats, les MPs semblent également constituer des marqueurs de sévérité du sepsis, potentiellement utiles pour identifier les patients les plus à risque d'évolution défavorable.

Nous retrouvons également une augmentation significative du taux d'E-sélectine soluble dans notre cohorte de patients septiques. La E-sélectine est un marqueur d'activation endothéliale, dont l'augmentation est décrite au cours du choc septique et très fortement associée à la gravité du choc septique (Skibsted S *et al.*, 2013). Nous n'observons cependant pas d'augmentation des MPs porteuses de E-sélectine chez ces patients, ce qui pourrait s'expliquer par l'intense activation leucocytaire responsable d'une sécrétion de protéases ou d'élastases capables de cliver la E-sélectine ancrée dans la membrane cellulaire endothéliale, voire microparticulaire.

Enfin, nous avons cherché à montrer que les microparticules peuvent constituer des **cibles thérapeutiques potentielles** au cours du choc septique. De nombreuses données dans la littérature indiquent en effet que les MPs pourraient être modulées pharmacologiquement (Perez-Casal M *et al.*, 2005; Zafrani L *et al.*, 2013). La concentration circulante de MPs totales n'est pas toujours modifiée

en situation pathologique, mais la modification du phénotype traduit la contribution particulière d'un type cellulaire et peut révéler une atteinte cellulaire ou tissulaire donnée spécifique (Baron M *et al.*, 2012). Ainsi, il a été montré qu'un traitement par statines chez des patients diabétiques ou souffrant d'artériopathies permet de diminuer le taux de MPs plaquettaires porteuses de protéines d'adhésion (GPIIIa, P-sélectine) ou procoagulantes (FT) (Sommeijer DW *et al.*, 2005; Mobarrez F *et al.*, 2011). De même, un traitement par glitazone, un ligand de PPAR- γ , dans le syndrome métabolique, diminue le taux de MPs endothéliales (Esposito K *et al.*, 2006) et serait capable, in-vitro, de moduler l'effet des MPs monocytaires, en diminuant leurs effets pro-inflammatoires en modifiant la production d'espèces réactives de l'oxygène, la libération de cytokines et l'activation du NF- κ B (Bardelli C *et al.*, 2012). De la même façon, l'activation du récepteur PPAR- α par les fénofibrates permettrait de moduler les concentrations de MPs dans les lésions d'athérosclérose dans un modèle de souris apoE2-KI athérosclérotiques, sans effet au niveau du foie stéatosique (Baron M *et al.*, 2011).

Par ailleurs, l'utilisation de la calpastatine permettrait de diminuer la génération de MPs dans un modèle de choc septique par péritonite chez la souris, avec pour conséquence une modulation de l'inflammation et une amélioration de la survie (Zafrani L *et al.*, 2012). La lactadhérine pourrait également être un moyen de moduler la vésiculation membranaire et d'augmenter la clairance des MPs d'origine plaquettaire, avec pour conséquence une diminution des manifestations thrombotiques (Dasgupta SK *et al.*, 2009).

La difficulté d'une modulation pharmacologique des MPs à visée thérapeutique tient à leur nature. Leurs effets, tantôt bénéfiques, tantôt délétères, semblent dépendre en partie des conditions de leur émission et de leurs caractéristiques membranaires. Ainsi, dans notre modèle de monocytes en culture, stimulés par une endotoxine, les émulsions lipidiques utilisées pour la nutrition parentérale et l'apport énergétique des patients traités pour choc septique en réanimation modulent quantitativement et qualitativement les MPs générées. Nous avons montré que la génération de MPs est corrélée à l'apoptose, ce qui est cohérent avec les données de la littérature (Freyssinet JM, 2003; Balasubramanian K *et al.*, 2012). Il est intéressant de noter qu'au cours du sepsis, les MPs circulantes peuvent activer des processus inflammatoires et l'apoptose cellulaire (Boisrame-Helms J *et al.*, 2013),

en augmentant le pool d'acide arachidonique non estérifié, perturbant ainsi l'homéostasie de la membrane lipidique (Huber LC *et al.*, 2007).

L'apport d'acides gras exogènes pourrait interférer avec la modulation des processus immunitaires. En effet, les acides gras sont intégrés dans les membranes en perturbent la fluidité et l'organisation moléculaire des radeaux lipidiques. Cette désorganisation de la membrane plasmique peut interférer avec l'activité des protéines clés et la fonction immunitaire (Calder PC, 2012). Plusieurs études expérimentales ont mis en évidence le rôle des radeaux lipidiques dans la médiation de l'immunosuppression induite par les AGPI n-3, suite à leur incorporation membranaire dans les membranes des cellules immunitaires (Yaqoob P *et al.*, 2010; Calder PC, 2011). En accord avec ces résultats, nous avons montré que les acides gras exogènes sont intégrés dans les membranes plasmiques et désorganisent les membranes de monocytes en culture et les membranes des MPs émises par ces cellules. Les TCM et les TCL sont intégrés de façon différentielle dans les membranes plasmiques, que la supplémentation lipidique soit associée ou non à une stimulation endotoxinique. Alors que les TCM sont hydrosolubles, nous observons leur incorporation dans la membrane cellulaire et ils seraient, par ce biais, impliqués dans les mécanismes apoptotiques et la vésiculation membranaire.

Comparés au rats contrôles, nous avons par ailleurs mis en évidence les effets délétères des TCM chez le rat en choc septique, avec l'augmentation significative des besoins en noradrénaline pour maintenir des objectifs de pression artérielle moyenne fixés, de la libération de MPs totales, leucocytaires, endothéliales et plaquettaires et du stress oxydant au niveau cardiaque et vasculaire, alors que les TCL n'ont pas ou peu d'effets.

Dans notre travail sur la modulation pharmacologique des MPs par la PCa, nous avons utilisé la génération de MPs comme témoin de l'activation cellulaire systémique et de l'état procoagulant de l'endothélium (Dignat-George F *et al.*, 2004). L'injection de MPs issues de rats septiques traités par PCa active les plaquettes et majore la génération de MPs plaquettaires chez les receveurs sains. Chez des patients en choc septique traité par PCa, Pérez-Casal *et al.* suggèrent que les MPs pourraient véhiculer les effets anticoagulants de la PCa (Perez-Casal M *et al.*, 2011) par la liaison de la protéine

à son récepteur microparticulaire EPCR. Nous avons en effet également mis en évidence que les MPs sont capables de véhiculer l'activité PCa après traitement par PCa recombinante exogène et pourraient ainsi potentiellement moduler la coagulopathie du choc septique.

De plus, nos résultats montrent que les MPs circulantes lors d'un choc septique peuvent avoir un tropisme hémodynamique, et que ces effets pourraient dépendre des conditions de leur génération. Grâce à notre modèle de rats en choc septique, nous avons mis en évidence que les MPs peuvent intervenir dans le processus cellulaire qui permet à la PCa de réduire l'activation *in situ* de la transcription de NF- κ B dans le cœur et les vaisseaux et donc réduit potentiellement les processus inflammatoires générateurs de dysfonction artérielle.

Les données physiopathologiques actuelles sur le sepsis suggèrent que la majoration du stress oxydant et de l'inflammation sont liées à l'activation de la chaîne légère de l'activateur NF- κ B au niveau des lymphocytes B activés. La famille NF- κ B/RelA permet l'expression de nombreux gènes spécifiques de l'inflammation (Russell JA, 2006). Dans ce contexte, les MPs circulantes des patients en choc septique seraient responsables d'une expression tissulaire différentielle des enzymes de l'inflammation et du stress oxydant. En effet, Mastronardi *et coll.* ont montré que les MPs issues de patients en choc septique augmentent l'expression de la iNOS, de la COX-2 et du NF- κ B dans le cœur et les poumons (Mastronardi ML *et al.*, 2011). En accord avec ces résultats, nous avons mis en évidence que iNOS, COX-2, phospho-I κ B et NF- κ B sont surexprimés dans le cœur et les vaisseaux des rats sains inoculés avec des MPs de rats septiques, alors que leur expression est diminuée chez les rats sains inoculés avec des MPs issues de rats septiques traités par PCa, indiquant un effet direct et modulable des MPs sur l'induction de ces protéines.

L'utilisation des MPs comme agent pharmacologique reste un champ d'investigation ouvert. La difficulté de leur pharmaco-modulation réside à la fois dans les connaissances restreintes des mécanismes de clairance et des processus de régulation des concentrations circulantes des MPs (Rautou PE *et al.*, 2012), d'autant que dans le choc septique, des traitements comme l'épuration extrarénale pourraient interférer avec l'élimination des MPs (Abdelhafeez AH *et al.*, 2014). De même, les catécholamines endogènes, libérées massivement au cours du choc septique ou exogènes, apportées

pour essayer de contrecarrer l'intense vasoplégie, pourraient interférer avec la fonctionnalité des cellules de l'immunité (Sarkar C *et al.*, 2013) et peut être par ce biais, altérer la vésiculation de membranaire. Un nombre croissant d'étude a montré que l'augmentation de sécrétion de noradrénaline ou adrénaline pouvait avoir des effets immunosuppresseurs. Les récepteurs β adrénergiques sont présents à la surface des lymphocytes B et T, des cellules NK (*natural killers*), des monocytes/macrophages et des cellules dendritiques (Nance DM *et al.*, 2007). Leur stimulation serait capables d'inhiber les réponses immunitaires médiées par la plupart de ces cellules. La noradrénaline et l'adrénaline augmenteraient, *via* les récepteurs β , la production de cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-6 ou l'IL-8, et l'apoptose cellulaire (Marino F *et al.*, 2013). Cependant, l'activation sélective des récepteurs β_2 adrénergiques pourrait réguler négativement l'expression intracellulaire de molécules d'adhésion comme ICAM-1, la production d'IL-12, de TNF- α et d'interféron gamma et les productions d'IL-18 et IL-12 induites par le LPS, ce qui pourrait avoir des effets bénéfiques dans le traitement du sepsis (Takahashi HK *et al.*, 2003; Mizuno K *et al.*, 2005).

Un traitement pharmacologique ayant pour cible les MPs pourra intervenir sur la capacité des cellules à vésiculer pour tenter de restreindre la dissémination du message biologique qu'elles véhiculent ou pour moduler la nature même de ce signal. Martinez *et al.* ont par exemple mis en évidence que les MPs porteuses de la protéine Sonic hedgehog stimulent la néovascularisation des processus tumoraux. Des MPs issues de cellules déficientes en cette protéine pourraient constituer un leurre noyant le message délétère véhiculé par les MPs endogènes aux cellules avoisinantes, ralentissant ainsi le développement tumoral (Martinez MC *et al.*, 2006; Martinez MC *et al.*, 2011a). Par ailleurs, les effets des MPs sont tantôt spécifiques d'un tissu ou d'un organe, tantôt systémiques, et une modulation pharmacologique des MPs impliquerait d'arriver à contrôler précisément les cibles des MPs (Baron M *et al.*, 2011).

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

disséminent sous forme d'ARNm ou de protéines (Zernecke A *et al.*, 2009). De plus, les MPs 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 MPs circulantes, mais aussi pour déterminer l'intérêt et les dose efficaces d'un traitement ciblant les MPs. Ainsi, dans la cohorte de patients septiques, nous avons mis en évidence qu'un lavage supplémentaire était nécessaire pour mettre en évidence la PhtdSer à la surface des MPs.

Enfin, les MPs constituent un réservoir dynamique d'effecteurs vasculaires (Morel O *et al.*, 2004) et toute manipulation de ce réservoir risque de déséquilibrer une réponse adaptative nécessaire aux mécanismes de défense de l'hôte contre l'agent pathogène. Une meilleure évaluation du profil inflammatoire du patient pourrait permettre d'adapter et d'optimiser un traitement, comme pour le traitement « à la carte » des néoplasies après phénotypage (Dienstmann R *et al.*, 2013).

Conclusion et perspectives

Au cours du sepsis, l'interaction hôte-pathogène est à l'origine d'une intense activation cellulaire qui entraîne un remaniement et une vésiculation des membranes, aboutissant à la génération de MPs. Initialement considérées comme de simples débris cellulaires, les MPs font l'objet depuis quelques années, d'un intérêt croissant en biologie, car elles sont en réalité de véritables bio-effecteurs, capables de transmettre des messages entre cellules. Leurs propriétés et leur rôle potentiel dans le choc septique sont cependant mal connus chez l'homme et l'étude des caractéristiques des MPs durant cet état d'inflammation aiguë, pourrait apporter un nouvel éclairage dans la physiopathologie de ce syndrome clinique très étudié.

Dans ce contexte, nos différents travaux ont permis de déterminer l'intérêt des MPs circulantes au cours du choc septique, comme des marqueurs pathogènes de l'activation cellulaire, mais également comme des marqueurs diagnostiques précoces et pronostiques de la dysfonction vasculaire chez l'homme et l'animal (figure 18). Elles ouvrent ainsi de nouvelles pistes d'exploration des mécanismes physiopathologiques dans lesquels elles sont impliquées à part entière, probablement en amplifiant et en réorientant la réponse cellulaire et vasculaire au stress inflammatoire.

Notre évaluation a porté sur la détermination de la place des MPs dans les mécanismes d'interférence des acides gras exogènes avec l'inflammation, dans un modèle de monocytes en culture stimulés par une endotoxine bactérienne. Les MPs se comportent comme un outil d'exploration de l'activation cellulaire. En effet, la composition lipidique de la membrane des MPs étant déterminée par celle de la cellule émettrice, toute modification de celle-ci pourrait potentiellement moduler le contenu des MPs et les activités biologiques qu'elles véhiculent. Nous avons mis en évidence que la croissance cellulaire est ralentie en milieu lipidique, de façon plus marquée avec les TCM, en rapport avec une majoration des phénomènes d'apoptose. De plus, les membranes des MPs émises par les monocytes traités par les différentes émulsions sont caractérisées par une désorganisation de la structure lipidique de leur bicouche et reflètent celle des membranes parentales.

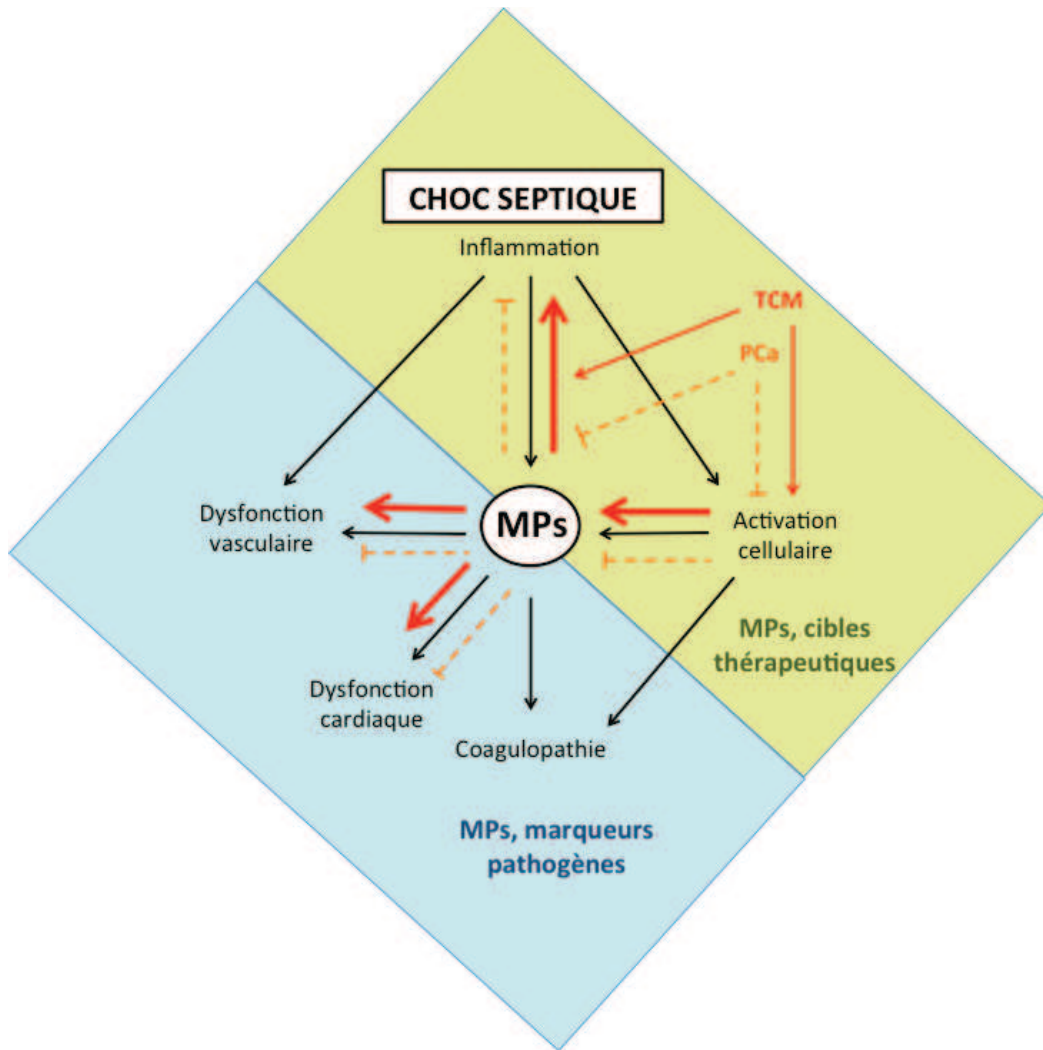


Figure 18 : Schéma récapitulatif des résultats de ce travail

En bleu, les microparticules (MPs) comme marqueurs pathogènes de l'activation cellulaire, de la dysfonction cardiovasculaire et de la coagulopathie induites par de choc septique. En vert : les MPs, comme cibles thérapeutiques potentielles, pharmacologiquement modulables par la protéine C activée (PCa) et les triglycérides à chaîne moyenne (TCM) ; en rouge, stimulation, en orange : inhibition.

Nous avons complété ces données obtenues in-vitro par l'étude de ces mêmes émulsions lipidiques dans un modèle de choc septique par péritonite chez le rat réanimé. Dans ce travail, nous avons montré que les émulsions lipidiques parentérales à base de TCM, comparées aux TCL, ont des effets pro-oxydants et délétères au cours du choc septique, en majorant la dysfonction hémodynamique *via* une activation cellulaire accrue, dont les MPs endothéliales, plaquettaires et leucocytaires sont le reflet.

Les MPs cumulant des effets pro-inflammatoires, procoagulants et pro-apoptotiques, nous avons cherché à caractériser plus précisément l'activation cellulaire induite par le choc septique chez l'homme, en utilisant les MPs circulantes comme témoins de la dysfonction du compartiment vasculaire et plus précisément ici de l'activation de la coagulation, à l'échelle cellulaire. Dans une cohorte prospective de cent patients, nous avons ainsi confirmé nos résultats expérimentaux et montré que le choc septique est associé à une augmentation significative du taux de MPs procoagulantes circulantes, avec une augmentation significative de la génération de MPs endothéliales, leucocytaires et plaquettaires, révélant ainsi l'atteinte spécifique d'un type cellulaire donné. L'augmentation des MPs endothéliales circulantes témoigne d'une activation ou d'une apoptose endothéliale et pourrait refléter et confirmer la dysfonction endothéliale décrite durant le choc septique. Les MPs d'origine plaquettaire pourraient avoir un rôle, avec les plaquettes, dans le couplage inflammation-thrombose en favorisant une génération accrue de thrombine. De plus, les MPs, principalement endothéliales et plaquettaires, par un effet pro-inflammatoire démontré chez l'animal, interviennent dans la genèse de la dysfonction cardio-circulatoire du choc septique.

Parallèlement aux dysfonctions endothéliale et cardiovasculaire, le choc septique est caractérisé par une activation de la coagulation, responsable d'un état procoagulant et anti-fibrinolytique, qui peut se compliquer d'une coagulopathie intravasculaire disséminée. Les MPs jouent un rôle clé dans l'activation de la coagulation, en augmentant la surface d'interaction avec les facteurs de la coagulation circulants, en favorisant les interactions récepteurs/ligands et le recrutement des cellules (plaquettes, monocytes, neutrophiles) au site initial de la réaction inflammatoire locale. Nous avons déterminé que les microparticules pourraient constituer un marqueur diagnostique et pronostique au cours du choc septique. En effet, dans notre étude, la génération de MPs procoagulantes est associée de façon précoce au développement d'une CIVD et pourrait ainsi constituer un marqueur de gravité chez les patients en choc septique.

Les variations de la concentration et du phénotype des MPs au moment d'un choc septique sont donc le reflet d'une séquence particulière d'activations cellulaires et devraient permettre à la fois une nouvelle approche diagnostique de la dysfonction vasculaire du choc septique et une meilleure stratification pronostique des patients pouvant développer une CIVD.

Enfin, nous avons montré que l'effet des MPs est modulable pharmacologiquement et qu'elles constituent ainsi des cibles thérapeutiques potentielles, qui permettraient de limiter l'altération des fonctions vasculaires et de défense de l'hôte contre l'agent pathogène. Une partie des objectifs de cette thèse a concerné l'exploration des effets de la modulation pharmacologique des MPs par la protéine C activée (PCa), pour ses propriétés anticoagulantes, sur la dysfonction hémodynamique, dans un modèle de choc septique par péritonite chez le rat.

Nous retrouvons les modifications majeures du profil phénotypique des MPs circulantes chez les rats septiques, avec l'augmentation significative des concentrations en MPs leucocytaires, plaquettaires et endothéliales. L'inoculation de ces MPs de rats septiques à des rats sains a des conséquences hémodynamiques, puisqu'elle est responsable d'une diminution significative de la pression artérielle moyenne des rats receveurs sains, reproduisant ainsi le profil hémodynamique du choc septique. À l'opposé, le traitement des rats par la PCa permet de contrecarrer les effets hémodynamiques délétères des MPs émises par les rats septiques, en rapport avec une augmentation significative du contenu microparticulaire en thromboxane A2 et de l'activité PCa microparticulaire. De plus, l'inoculation de telles MPs à des receveurs sains est responsable d'une diminution de l'inflammation et du stress oxydant cardiaque et vasculaire, et d'une modulation du phénotype des MPs chez les rats receveurs, avec une augmentation significative du taux de MPs plaquettaires et endothéliales, confirmant ainsi que les MPs sont des cibles pharmacologiques.

Les perspectives de ce travail sont nombreuses et nous avons tout d'abord prévu d'affirmer la pertinence des MPs comme marqueur pathogène et surtout diagnostique, en confirmant l'intérêt des MPs endothéliales porteuses de CD105 comme outil diagnostique de la CIVD lors du choc septique, dans une plus grande cohorte de patients. Nous avons prévu de doser les MPs porteuses du récepteur de l'urokinase (uPAR) pour évaluer l'équilibre fibrinolytique chez ces patients.

Nous poursuivons ensuite la piste des MPs comme cible thérapeutique pharmacologiquement modulable, en affinant et précisant les mécanismes d'action des MPs ainsi modulées, au niveau

moléculaire par la recherche de protéines modulées par les MPs septiques ainsi que des miARN éventuellement associés, grâce à des modèles cellulaires et ex-vivo.

Enfin, l'exploration dynamique de la clairance des MPs présente un intérêt majeur dans le choc septique, notamment chez des patients hémofiltrés.

Bibliographie

- Abdelhafeez AH, Jeziorczak PM, Schaid TR, Hoefs SL, Kaul S, Nanchal R, Jacobs ER and Densmore JC, 2014. Clinical cvvh model removes endothelium-derived microparticles from circulation. *J Extracell Vesicles*, 3.
- Adib-Conquy M and Cavaillon JM, 2009. Compensatory anti-inflammatory response syndrome. *Thromb Haemost*, 101(1): 36-47.
- Amabile N, Guerin AP, Leroyer A, Mallat Z, Nguyen C, Boddaert J, London GM, Tedgui A and Boulanger CM, 2005. Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol*, 16(11): 3381-3388.
- Amabile N, Guignabert C, Montani D, Yeghiazarians Y, Boulanger CM and Humbert M, 2013. Cellular microparticles in the pathogenesis of pulmonary hypertension. *Eur Respir J*, 42(1): 272-279.
- Amabile N, Heiss C, Chang V, Angeli FS, Damon L, Rame EJ, McGlothlin D, Grossman W, De Marco T and Yeghiazarians Y, 2009. Increased cd62e(+) endothelial microparticle levels predict poor outcome in pulmonary hypertension patients. *J Heart Lung Transplant*, 28(10): 1081-1086.
- Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD and Zychlinsky A, 2012. Neutrophil function: From mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol*, 30: 459-489.
- Angles-Cano E, 1994. Overview on fibrinolysis: Plasminogen activation pathways on fibrin and cell surfaces. *Chem Phys Lipids*, 67-68: 353-362.
- Angus DC and van der Poll T, 2013. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*, 369(21): 2063.
- Annane D, Bellissant E and Cavaillon JM, 2005. Septic shock. *Lancet*, 365(9453): 63-78.
- Annane D, Sebille V, Charpentier C, Bollaert PE, Francois B, Korach JM, Capellier G, Cohen Y, Azoulay E, Troche G, Chaumet-Riffaud P and Bellissant E, 2002. Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. *JAMA*, 288(7): 862-871.
- Aras O, Shet A, Bach RR, Hysjulien JL, Slungaard A, Hebbel RP, Escolar G, Jilma B and Key NS, 2004. Induction of microparticle- and cell-associated intravascular tissue factor in human endotoxemia. *Blood*, 103(12): 4545-4553.
- Asfar P, Claessens YE, Duranteau J, Kipnis E, Leone M, Levy B, Mira JP and French Opinion Group in S, 2013. Residual rates of mortality in patients with severe sepsis: A fatality or a new challenge? *Ann Intensive Care*, 3(1): 27.
- Assuncao Guimaraes C and Linden R, 2004. Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. *Eur J Biochem*, 271(9): 1638-1650.
- Athman R and Philpott D, 2004. Innate immunity via toll-like receptors and nod proteins. *Curr Opin Microbiol*, 7(1): 25-32.
- Aupeix K, Hugel B, Martin T, Bischoff P, Lill H, Pasquali JL and Freyssinet JM, 1997. The significance of shed membrane particles during programmed cell death in vitro, and in vivo, in hiv-1 infection. *J Clin Invest*, 99(7): 1546-1554.
- Austin KM, Covic L and Kuliopulos A, 2013. Matrix metalloproteases and par1 activation. *Blood*, 121(3): 431-439.
- Aziz M, Jacob A, Yang WL, Matsuda A and Wang P, 2013. Current trends in inflammatory and immunomodulatory mediators in sepsis. *J Leukoc Biol*, 93(3): 329-342.
- Baj-Krzyworzeka M, Majka M, Pratico D, Ratajczak J, Vilaire G, Kijowski J, Reza R, Janowska-Wieczorek A and Ratajczak MZ, 2002. Platelet-derived microparticles

- stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. *Exp Hematol*, 30(5): 450-459.
- 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 and Toti F, 2008. Procoagulant membrane microparticles correlate with the severity of pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, 177(5): 536-543.
- Balasubramanian K and Schroit A, 2012. Membrane lipid asymmetry in aging and apoptosis. In: *Transmembrane dynamics of lipids*, P. F. Devaux and A. Herrmann, (Eds.). pp: 291-313.
- Bardelli C, Amoruso A, Federici Canova D, Fresu L, Balbo P, Neri T, Celi A and Brunelleschi S, 2012. Autocrine activation of human monocyte/macrophages by monocyte-derived microparticles and modulation by ppargamma ligands. *Br J Pharmacol*, 165(3): 716-728.
- Baron M, Boulanger CM, Staels B and Tailleux A, 2012. Cell-derived microparticles in atherosclerosis: Biomarkers and targets for pharmacological modulation? *J Cell Mol Med*, 16(7): 1365-1376.
- Baron M, Leroyer AS, Majd Z, Lalloyer F, Vallez E, Bantubungi K, Chinetti-Gbaguidi G, Delerive P, Boulanger CM, Staels B and Tailleux A, 2011. Ppar alpha activation differently affects microparticle content in atherosclerotic lesions and liver of a mouse model of atherosclerosis and nash. *Atherosclerosis*, 218(1): 69-76.
- Barry OP, Kazanietz MG, Pratico D and 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(11): 7545-7556.
- Berckmans RJ, Nieuwland R, Boing AN, Romijn FP, Hack CE and Sturk A, 2001. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb Haemost*, 85(4): 639-646.
- Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW and Fisher CJ, Jr., 2001. Efficacy and safety of recombinant human activated protein c for severe sepsis. *N Engl J Med*, 344(10): 699-709.
- Beyers EM and Williamson PL, 2010. Phospholipid scramblase: An update. *FEBS Lett*, 584(13): 2724-2730.
- Boisrame-Helms J, Kremer H, Schini-Kerth V and Meziani F, 2013. Endothelial dysfunction in sepsis. *Curr Vasc Pharmacol*, 11(2): 150-160.
- Boisramé-Helms J, Meyer G, Meziani F and Hasselmann M, 2012. Implications et potentialités de l'arginine chez le malade de réanimation. *Réanimation.*, 21: 381-387.
- Bone RC, 1996. Sir isaac newton, sepsis, sirs, and cars. *Crit Care Med*, 24(7): 1125-1128.
- Borgel D and Vieillard-Baron A, 2011. [activated protein c, a protein at the crossroads between coagulation and inflammation]. *Med Sci (Paris)*, 27(5): 501-507.
- Bosmann M and Ward PA, 2013. The inflammatory response in sepsis. *Trends Immunol*, 34(3): 129-136.
- Boulanger CM, Scoazec A, Ebrahimian T, Henry P, Mathieu E, Tedgui A and Mallat Z, 2001. Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. *Circulation*, 104(22): 2649-2652.
- Branzk N and Papayannopoulos V, 2013. Molecular mechanisms regulating netosis in infection and disease. *Semin Immunopathol*, 35(4): 513-530.
- Bretelle F, Sabatier F, Desprez D, Camoin L, Grunebaum L, Combes V, D'Ercole C and Dignat-George F, 2003. Circulating microparticles: A marker of procoagulant state in

- normal pregnancy and pregnancy complicated by preeclampsia or intrauterine growth restriction. *Thromb Haemost*, 89(3): 486-492.
- Bretscher MS, 1972. Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes. *Nat New Biol*, 236(61): 11-12.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y and Zychlinsky A, 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303(5663): 1532-1535.
- Brinkmann V and Zychlinsky A, 2012. Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol*, 198(5): 773-783.
- Brodsky SV, Zhang F, Nasjletti A and Goligorsky MS, 2004. Endothelium-derived microparticles impair endothelial function in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 286(5): H1910-1915.
- Brown GT and McIntyre TM, 2011. Lipopolysaccharide signaling without a nucleus: Kinase cascades stimulate platelet shedding of proinflammatory il-1beta-rich microparticles. *J Immunol*, 186(9): 5489-5496.
- Burger D and Touyz RM, 2012. Cellular biomarkers of endothelial health: Microparticles, endothelial progenitor cells, and circulating endothelial cells. *J Am Soc Hypertens*, 6(2): 85-99.
- Cabon L, Martinez-Torres AC and Susin SA, 2013. [programmed cell death comes in many flavors]. *Med Sci (Paris)*, 29(12): 1117-1124.
- Calder PC, 2011. Fatty acids and inflammation: The cutting edge between food and pharma. *Eur J Pharmacol*, 668 Suppl 1: S50-58.
- Calder PC, 2012. Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. *J Nutr*, 142(3): 592S-599S.
- Calder PC, 2013. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: Nutrition or pharmacology? *Br J Clin Pharmacol*, 75(3): 645-662.
- Campbell RL and Davies PL, 2012. Structure-function relationships in calpains. *Biochem J*, 447(3): 335-351.
- Casaer MP, Mesotten D, Hermans G, Wouters PJ, Schetz M, Meyfroidt G, Van Cromphaut S, Ingels C, Meersseman P, Muller J, Vlasselaers D, Debaveye Y, Desmet L, Dubois J, Van Assche A, Vanderheyden S, Wilmer A and Van den Berghe G, 2011. Early versus late parenteral nutrition in critically ill adults. *N Engl J Med*, 365(6): 506-517.
- Castoldi E, Collins PW, Williamson PL and Bevers EM, 2011. Compound heterozygosity for 2 novel tmem16f mutations in a patient with scott syndrome. *Blood*, 117(16): 4399-4400.
- Cauwenberghs S, Feijge MA, Harper AG, Sage SO, Curvers J and Heemskerk JW, 2006. Shedding of procoagulant microparticles from unstimulated platelets by integrin-mediated destabilization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett*, 580(22): 5313-5320.
- Chiao CW, Tostes RC and Webb RC, 2008. P2x7 receptor activation amplifies lipopolysaccharide-induced vascular hyporeactivity via interleukin-1 beta release. *J Pharmacol Exp Ther*, 326(3): 864-870.
- Chiche JD, Cariou A and Mira JP, 2002. Bench-to-bedside review: Fulfilling promises of the human genome project. *Crit Care*, 6(3): 212-215.
- Chironi GN, Boulanger CM, Simon A, Dignat-George F, Freyssinet JM and Tedgui A, 2009. Endothelial microparticles in diseases. *Cell Tissue Res*, 335(1): 143-151.
- Chironi GN, Simon A, Boulanger CM, Dignat-George F, Hugel B, Megnien JL, Lefort M, Freyssinet JM and Tedgui A, 2010. Circulating microparticles may influence early carotid artery remodeling. *J Hypertens*, 28(4): 789-796.
- Christaki E, Anyfanti P and Opal SM, 2011. Immunomodulatory therapy for sepsis: An update. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 9(11): 1013-1033.

- Coleman JA, Quazi F and Molday RS, 2013. Mammalian p4-atpases and abc transporters and their role in phospholipid transport. *Biochim Biophys Acta*, 1831(3): 555-574.
- Coleman ML and Olson MF, 2002. Rho gtpase signalling pathways in the morphological changes associated with apoptosis. *Cell Death Differ*, 9(5): 493-504.
- Constantinescu AA, Gleizes C, Alhosin M, Yala E, Zobairi F, Leclercq A, Stoian G, Mitrea IL, Prevost G, Toti F and Kessler L, 2014. Exocrine cell-derived microparticles in response to lipopolysaccharide promote endocrine dysfunction in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*, 13(2): 219-226.
- Dahlback B and Villoutreix BO, 2005. Regulation of blood coagulation by the protein c anticoagulant pathway: Novel insights into structure-function relationships and molecular recognition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25(7): 1311-1320.
- Daleke DL, 2003. Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *J Lipid Res*, 44(2): 233-242.
- Daleke DL and Huestis WH, 1985. Incorporation and translocation of aminophospholipids in human erythrocytes. *Biochemistry*, 24(20): 5406-5416.
- Dalli J, Rosignoli G, Hayhoe RP, Edelman A and Perretti M, 2010. Cfr inhibition provokes an inflammatory response associated with an imbalance of the annexin a1 pathway. *Am J Pathol*, 177(1): 176-186.
- Dasgupta SK, Abdel-Monem H, Niravath P, Le A, Bellera RV, Langlois K, Nagata S, Rumbaut RE and Thiagarajan P, 2009. Lactadherin and clearance of platelet-derived microvesicles. *Blood*, 113(6): 1332-1339.
- Dasgupta SK, Le A, Chavakis T, Rumbaut RE and Thiagarajan P, 2012. Developmental endothelial locus-1 (del-1) mediates clearance of platelet microparticles by the endothelium. *Circulation*, 125(13): 1664-1672.
- De Backer D, Verdant C, Chierigo M, Koch M, Gullo A and Vincent JL, 2006. Effects of drotrecogin alfa activated on microcirculatory alterations in patients with severe sepsis. *Crit Care Med*, 34(7): 1918-1924.
- Delabranche X, Berger A, Boisrame-Helms J and Meziani F, 2012a. Microparticles and infectious diseases. *Med Mal Infect*, 42(8): 335-343.
- Delabranche X, Boisrame-Helms J, Asfar P, Berger A, Mootien Y, Lavigne T, Grunebaum L, Lanza F, Gachet C, Freyssinet JM, Toti F and Meziani F, 2013. Microparticles are new biomarkers of septic shock-induced disseminated intravascular coagulopathy. *Intensive Care Med*, 39(10): 1695-1703.
- Delabranche X, Boisramé-Helms J, Berger A, Martinet O, Hasselmann M, Toti F and Meziani F, 2012b. Evaluation in-vitro du rôle des microparticules monocytaires sur la réponse lymphocytaire au lipopolysaccharide (lps). XXXXème Congrès de la SRLF, Paris 18-20 janvier 2012., *Réanimation* (2012): pp: S13-S16.
- Delabranche X and Meziani F, 2009. Traitements adjuvants au cours du choc septique. 38ème Congrès de la SRLF.
- Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, Sevransky JE, Sprung CL, Douglas IS, Jaeschke R, Osborn TM, Nunnally ME, Townsend SR, Reinhart K, Kleinpell RM, Angus DC, Deutschman CS, Machado FR, Rubenfeld GD, Webb SA, Beale RJ, Vincent JL, Moreno R and Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee including the Pediatric S, 2013. Surviving sepsis campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med*, 41(2): 580-637.
- Densmore JC, Signorino PR, Ou J, Hatoum OA, Rowe JJ, Shi Y, Kaul S, Jones DW, Sabina RE, Pritchard KA, Jr., Guice KS and Oldham KT, 2006. Endothelium-derived

- microparticles induce endothelial dysfunction and acute lung injury. *Shock*, 26(5): 464-471.
- Desai SV, McClave SA and Rice TW, 2014. Nutrition in the icu: An evidence-based approach. *Chest*, 145(5): 1148-1157.
- Deutschman CS and Tracey KJ, 2014. Sepsis: Current dogma and new perspectives. *Immunity*, 40(4): 463-475.
- Devaux PF, 1991. Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. *Biochemistry*, 30(5): 1163-1173.
- Dienstmann R, Rodon J and Tabernero J, 2013. Biomarker-driven patient selection for early clinical trials. *Curr Opin Oncol*, 25(3): 305-312.
- Dignat-George F, Camoin-Jau L, Sabatier F, Arnoux D, Anfosso F, Bardin N, Veit V, Combes V, Gentile S, Moal V, Sanmarco M and Sampol J, 2004. Endothelial microparticles: A potential contribution to the thrombotic complications of the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost*, 91(4): 667-673.
- Distler JH, Huber LC, Gay S, Distler O and Pisetsky DS, 2006. Microparticles as mediators of cellular cross-talk in inflammatory disease. *Autoimmunity*, 39(8): 683-690.
- Dubyak GR, 2012. P2x7 receptor regulation of non-classical secretion from immune effector cells. *Cell Microbiol*, 14(11): 1697-1706.
- Duran C and Hartzell HC, 2011. Physiological roles and diseases of tmem16/anoctamin proteins: Are they all chloride channels? *Acta Pharmacol Sin*, 32(6): 685-692.
- Espana F, Vicente V, Tabernero D, Scharrer I and Griffin JH, 1990. Determination of plasma protein c inhibitor and of two activated protein c-inhibitor complexes in normals and in patients with intravascular coagulation and thrombotic disease. *Thromb Res*, 59(3): 593-608.
- Esposito K, Ciotola M and Giugliano D, 2006. Pioglitazone reduces endothelial microparticles in the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26(8): 1926.
- Fahy BG, Sheehy AM and Coursin DB, 2009. Glucose control in the intensive care unit. *Crit Care Med*, 37(5): 1769-1776.
- Faix JD, 2013. Biomarkers of sepsis. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 50(1): 23-36.
- Farrera C and Fadeel B, 2013. Macrophage clearance of neutrophil extracellular traps is a silent process. *J Immunol*, 191(5): 2647-2656.
- Flaumenhaft R, 2006. Formation and fate of platelet microparticles. *Blood Cells Mol Dis*, 36(2): 182-187.
- Flaumenhaft R, Mairuhu AT and Italiano JE, 2010. Platelet- and megakaryocyte-derived microparticles. *Semin Thromb Hemost*, 36(8): 881-887.
- Fourrier F, 2012. Severe sepsis, coagulation, and fibrinolysis: Dead end or one way? *Crit Care Med*, 40(9): 2704-2708.
- Fox JE, Austin CD, Reynolds CC and 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(20): 13289-13295.
- Freyssinet JM, 2003. Cellular microparticles: What are they bad or good for? *J Thromb Haemost*, 1(7): 1655-1662.
- Freyssinet JM and Toti F, 2010. Membrane microparticle determination: At least seeing what's being sized! *J Thromb Haemost*, 8(2): 311-314.
- Fujishima S, Gando S, Saitoh D, Mayumi T, Kushimoto S, Shiraishi S, Ogura H, Takuma K, Kotani J, Ikeda H, Yamashita N, Suzuki K, Tsuruta R, Takeyama N, Araki T, Suzuki Y, Miki Y, Yamaguchi Y, Aikawa N and Japanese Association for Acute Medicine Sepsis Registry Study G, 2014. A multicenter, prospective evaluation of quality of

- care and mortality in japan based on the surviving sepsis campaign guidelines. *J Infect Chemother*, 20(2): 115-120.
- Funk DJ, Parrillo JE and Kumar A, 2009. Sepsis and septic shock: A history. *Crit Care Clin*, 25(1): 83-101, viii.
- Furian T, Aguiar C, Prado K, Ribeiro RV, Becker L, Martinelli N, Clausell N, Rohde LE and Biolo A, 2011. Ventricular dysfunction and dilation in severe sepsis and septic shock: Relation to endothelial function and mortality. *J Crit Care*, In press.
- Furlan-Freguia C, Marchese P, Gruber A, Ruggeri ZM and Ruf W, 2011. P2x7 receptor signaling contributes to tissue factor-dependent thrombosis in mice. *J Clin Invest*, 121(7): 2932-2944.
- Gadek JE, DeMichele SJ, Karlstad MD, Pacht ER, Donahoe M, Albertson TE, Van Hoozen C, Wennberg AK, Nelson JL and Noursalehi M, 1999. Effect of enteral feeding with eicosapentaenoic acid, gamma-linolenic acid, and antioxidants in patients with acute respiratory distress syndrome. Enteral nutrition in ards study group. *Crit Care Med*, 27(8): 1409-1420.
- Geddings JE and Mackman N, 2014. New players in haemostasis and thrombosis. *Thromb Haemost*, 111(4): 570-574.
- Geiger M, 2007. Protein c inhibitor, a serpin with functions in- and outside vascular biology. *Thromb Haemost*, 97(3): 343-347.
- Geisbert TW, Young HA, Jahrling PB, Davis KJ, Kagan E and 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(11): 1618-1629.
- Goldenberg NM, Steinberg BE, Slutsky AS and Lee WL, 2011. Broken barriers: A new take on sepsis pathogenesis. *Sci Transl Med*, 3(88): 88ps25.
- Griffin JH, Evatt B, Zimmerman TS, Kleiss AJ and Wideman C, 1981. Deficiency of protein c in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest*, 68(5): 1370-1373.
- Grimaldi D, Louis S, Pene F, Sirgo G, Rousseau C, Claessens YE, Vimeux L, Cariou A, Mira JP, Hosmalin A and Chiche JD, 2011. Profound and persistent decrease of circulating dendritic cells is associated with icu-acquired infection in patients with septic shock. *Intensive Care Med*, 37(9): 1438-1446.
- Guha M and Mackman N, 2001. Lps induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal*, 13(2): 85-94.
- Gyorgy B, Szabo TG, Pasztoi M, Pal Z, Misjak P, Aradi B, Laszlo V, Pallinger E, Pap E, Kittel A, Nagy G, Falus A and Buzas EI, 2011. Membrane vesicles, current state-of-the-art: Emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci*, 68(16): 2667-2688.
- Hamzeh-Cognasse H, Damien P, Nguyen KA, Zeni F, Pozzetto B, Cognasse F and Garraud O, 2013. Contribution of activated platelets to plasma il-27 levels. *Crit Care*, 17(1): 411.
- Hartemink KJ, Hack CE and Groeneveld AB, 2010. Relation between coagulation/fibrinolysis and lactate in the course of human septic shock. *J Clin Pathol*, 63(11): 1021-1026.
- Heemskerk JW, Mattheij NJ and Cosemans JM, 2013. Platelet-based coagulation: Different populations, different functions. *J Thromb Haemost*, 11(1): 2-16.
- Heloire F, Weill B, Weber S and 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(4): 173-180.
- Heyland DK, Dhaliwal R, Drover JW, Gramlich L, Dodek P and Canadian Critical Care Clinical Practice Guidelines C, 2003. Canadian clinical practice guidelines for

- nutrition support in mechanically ventilated, critically ill adult patients. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 27(5): 355-373.
- Heyland DK, MacDonald S, Keefe L and Drover JW, 1998. Total parenteral nutrition in the critically ill patient: A meta-analysis. *JAMA*, 280(23): 2013-2019.
- Hoffmann JN, Vollmar B, Laschke MW, Inthorn D, Fertmann J, Schildberg FW and Menger MD, 2004. Microhemodynamic and cellular mechanisms of activated protein c action during endotoxemia. *Crit Care Med*, 32(4): 1011-1017.
- Hotchkiss RS and Nicholson DW, 2006. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol*, 6(11): 813-822.
- Huber LC, Jungel A, Distler JH, Moritz F, Gay RE, Michel BA, Pisetsky DS, Gay S and Distler O, 2007. The role of membrane lipids in the induction of macrophage apoptosis by microparticles. *Apoptosis*, 12(2): 363-374.
- Huet O, Choukroun G and Mira JP, 2004. Récepteurs de type toll, réponse inflammatoire et sepsis. *Réanimation*, 13: 167-175.
- Hugel B, Zobairi F and Freyssinet JM, 2004. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost*, 2: 1846-1847.
- Huntington JA and Li W, 2009. Structural insights into the multiple functions of protein c inhibitor. *Cell Mol Life Sci*, 66(1): 113-121.
- Iba T, Kidokoro A, Fukunaga M, Nagakari K, Shirahama A and Ida Y, 2005. Activated protein c improves the visceral microcirculation by attenuating the leukocyte-endothelial interaction in a rat lipopolysaccharide model. *Crit Care Med*, 33(2): 368-372.
- Iba T, Yamada A, Hashiguchi N and Nagaoka I, 2014. New therapeutic options for patients with sepsis and disseminated intravascular coagulation. *Pol Arch Med Wewn*, 124(6): 321-328.
- Janiszewski M, Do Carmo AO, Pedro MA, Silva E, Knobel E and 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(3): 818-825.
- Janmey PA and Kinnunen PK, 2006. Biophysical properties of lipids and dynamic membranes. *Trends Cell Biol*, 16(10): 538-546.
- Janowska-Wieczorek A, Wysoczynski M, Kijowski J, Marquez-Curtis L, Machalinski B, Ratajczak J and Ratajczak MZ, 2005. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Int J Cancer*, 113(5): 752-760.
- Jedynak M, Siemiakowski A and Rygasiewicz K, 2012. Molecular basics of sepsis development. *Anaesthesiol Intensive Ther*, 44(4): 221-225.
- Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Horstman LL and 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(1): 81-90.
- Jin Z and El-Deiry WS, 2005. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther*, 4(2): 139-163.
- Joram N, Lopez E, Texereau J and Mira JP, 2006. [genetic polymorphisms and infections]. *Med Mal Infect*, 36(6): 314-321.
- Kelton JG, Warkentin TE, Hayward CP, Murphy WG and Moore JC, 1992. Calpain activity in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura is associated with platelet microparticles. *Blood*, 80(9): 2246-2251.
- Kumar H and Bot A, 2013. Innate immune recognition mechanisms and translational opportunities. *Int Rev Immunol*, 32(2): 113-115.
- Kunzelmann K, Nilius B, Owsianik G, Schreiber R, Ousingsawat J, Sirianant L, Wanitchakool P, Bevers EM and Heemskerk JW, 2013. Molecular functions of

- anoctamin 6 (tmem16f): A chloride channel, cation channel, or phospholipid scramblase? *Pflugers Arch*.
- Kunzelmann-Marche C, Freyssinet JM and Martinez MC, 2001. Regulation of phosphatidylserine transbilayer redistribution by store-operated ca^{2+} entry: Role of actin cytoskeleton. *J Biol Chem*, 276(7): 5134-5139.
- Lacroix R, Judicone C, Mooberry M, Boucekine M, Key NS, Dignat-George F and The ISSCW, 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*.
- Lane DA, Philippou H and Huntington JA, 2005. Directing thrombin. *Blood*, 106(8): 2605-2612.
- Langouche L and Van den Berghe G, 2006. Glucose metabolism and insulin therapy. *Crit Care Clin*, 22(1): 119-129, vii.
- Lee WL and Liles WC, 2011. Endothelial activation, dysfunction and permeability during severe infections. *Curr Opin Hematol*, 18(3): 191-196.
- Lehmann C, Meissner K, Knock A, Diedrich S, Pavlovic D, Grundling M, Usichenko T, Wendt M and Birnbaum J, 2006. Activated protein c improves intestinal microcirculation in experimental endotoxaemia in the rat. *Crit Care*, 10(6): R157.
- Leist M and Jaattela M, 2001. Four deaths and a funeral: From caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(8): 589-598.
- Lekka ME, Liokatis S, Nathanail C, Galani V and Nakos G, 2004. The impact of intravenous fat emulsion administration in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*, 169(5): 638-644.
- Leroyer AS, Anfosso F, Lacroix R, Sabatier F, Simoncini S, Njock SM, Jourde N, Brunet P, Camoin-Jau L, Sampol J and Dignat-George F, 2010. Endothelial-derived microparticles: Biological conveyors at the crossroad of inflammation, thrombosis and angiogenesis. *Thromb Haemost*, 104(3): 456-463.
- Levental I, Grzybek M and Simons K, 2010. Greasing their way: Lipid modifications determine protein association with membrane rafts. *Biochemistry*, 49(30): 6305-6316.
- Leverrier Y and Ridley AJ, 2001. Apoptosis: Caspases orchestrate the rock 'n' bleb. *Nat Cell Biol*, 3(4): E91-93.
- Levi M, 2010. The coagulant response in sepsis and inflammation. *Hamostaseologie*, 30(1): 10-12, 14-16.
- Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G and Sccm/Esicm/Accp/Ats/Sis, 2003. 2001 sccm/esicm/accp/ats/sis international sepsis definitions conference. *Crit Care Med*, 31(4): 1250-1256.
- Leytin V, Allen DJ, Mutlu A, Gyulkhandanyan AV, Mykhaylov S and Freedman J, 2009. Mitochondrial control of platelet apoptosis: Effect of cyclosporin a, an inhibitor of the mitochondrial permeability transition pore. *Lab Invest*, 89(4): 374-384.
- Lhermusier T, Chap H and Payrastre B, 2011. Platelet membrane phospholipid asymmetry: From the characterization of a scramblase activity to the identification of an essential protein mutated in scott syndrome. *J Thromb Haemost*, 9(10): 1883-1891.
- London NR, Zhu W, Bozza FA, Smith MC, Greif DM, Sorensen LK, Chen L, Kaminoh Y, Chan AC, Passi SF, Day CW, Barnard DL, Zimmerman GA, Krasnow MA and Li DY, 2010. Targeting robo4-dependent slit signaling to survive the cytokine storm in sepsis and influenza. *Sci Transl Med*, 2(23): 23ra19.
- Lopez JJ, Salido GM, Pariente JA and Rosado JA, 2008. Thrombin induces activation and translocation of bid, bax and bak to the mitochondria in human platelets. *J Thromb Haemost*, 6(10): 1780-1788.

- Lorente L, Martin MM, Varo N, Borreguero-Leon JM, Sole-Violan J, Blanquer J, Labarta L, Diaz C, Jimenez A, Pastor E, Belmonte F, Orbe J, Rodriguez JA, Gomez-Melini E, Ferrer-Aguero JM, Ferreres J, Lliminana MC and Paramo JA, 2011. Association between serum soluble cd40 ligand levels and mortality in patients with severe sepsis. *Crit Care*, 15(2): R97.
- Lorenz E, Mira JP, Frees KL and Schwartz DA, 2002. Relevance of mutations in the tlr4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch Intern Med*, 162(9): 1028-1032.
- MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA and Surprenant A, 2001. Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity*, 15(5): 825-835.
- Marechal X, Favory R, Joulin O, Montaigne D, Hassoun S, Decoster B, Zerimech F and Neviere R, 2008. Endothelial glycocalyx damage during endotoxemia coincides with microcirculatory dysfunction and vascular oxidative stress. *Shock*, 29(5): 572-576.
- Marino F and Cosentino M, 2013. Adrenergic modulation of immune cells: An update. *Amino Acids*, 45(1): 55-71.
- Martin S, Tesse A, Hugel B, Martinez MC, Morel O, Freyssinet JM and Andriantsitohaina R, 2004. Shed membrane particles from t lymphocytes impair endothelial function and regulate endothelial protein expression. *Circulation*, 109(13): 1653-1659.
- Martindale RG, McClave SA, Vanek VW, McCarthy M, Roberts P, Taylor B, Ochoa JB, Napolitano L, Cresci G, American College of Critical Care M and Directors ASPENBo, 2009. Guidelines for the provision and assessment of nutrition support therapy in the adult critically ill patient: Society of critical care medicine and american society for parenteral and enteral nutrition: Executive summary. *Crit Care Med*, 37(5): 1757-1761.
- Martinez MC and Andriantsitohaina R, 2011a. Microparticles in angiogenesis: Therapeutic potential. *Circ Res*, 109(1): 110-119.
- Martinez MC and Freyssinet JM, 2001. Deciphering the plasma membrane hallmarks of apoptotic cells: Phosphatidylserine transverse redistribution and calcium entry. *BMC Cell Biol*, 2: 20.
- Martinez MC, Larbret F, Zobairi F, Coulombe J, Debili N, Vainchenker W, Ruat M and Freyssinet JM, 2006. Transfer of differentiation signal by membrane microvesicles harboring hedgehog morphogens. *Blood*, 108(9): 3012-3020.
- Martinez MC, Tesse A, Zobairi F and Andriantsitohaina R, 2005. Shed membrane microparticles from circulating and vascular cells in regulating vascular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 288(3): H1004-1009.
- Martinez MC, Tual-Chalot S, Leonetti D and Andriantsitohaina R, 2011b. Microparticles: Targets and tools in cardiovascular disease. *Trends Pharmacol Sci*, 32(11): 659-665.
- Mastronardi ML, Mostefai HA, Meziani F, Martinez MC, Asfar P and 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(7): 1739-1748.
- Mause SF and Weber C, 2010. Microparticles: Protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ Res*, 107(9): 1047-1057.
- Mayer K, Gokorsch S, Fegbeutel C, Hattar K, Rosseau S, Walmrath D, Seeger W and Grimminger F, 2003a. Parenteral nutrition with fish oil modulates cytokine response in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*, 167(10): 1321-1328.
- Mayer K, Meyer S, Reinholz-Muhly M, Maus U, Merfels M, Lohmeyer J, Grimminger F and Seeger W, 2003b. Short-time infusion of fish oil-based lipid emulsions, approved for

- parenteral nutrition, reduces monocyte proinflammatory cytokine generation and adhesive interaction with endothelium in humans. *J Immunol*, 171(9): 4837-4843.
- McVey M, Tabuchi A and Kuebler WM, 2012. Microparticles and acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 303(5): L364-381.
- Menon A and Herrmann A, 2012. Phospholipid flip-flop in biogenic membranes. In: *Transmembrane dynamics of lipids*, P. Devaux and A. Herrmann, (Eds.). Wiley: pp: 99-118.
- Mesri M and Altieri DC, 1999. Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a jnk1 signaling pathway. *J Biol Chem*, 274(33): 23111-23118.
- Meziani F, Delabranche X, Asfar P and Toti F, 2010. Bench-to-bedside review: Circulating microparticles--a new player in sepsis? *Crit Care*, 14(5): 236.
- Meziani F, Tesse A and Andriantsitohaina R, 2008. Microparticles are vectors of paradoxical information in vascular cells including the endothelium: Role in health and diseases. *Pharmacol Rep*, 60(1): 75-84.
- Meziani F, Tesse A, David E, Martinez MC, Wangesteen R, Schneider F and Andriantsitohaina R, 2006. Shed membrane particles from preeclamptic women generate vascular wall inflammation and blunt vascular contractility. *Am J Pathol*, 169(4): 1473-1483.
- Mim C and Unger VM, 2012. Membrane curvature and its generation by bar proteins. *Trends Biochem Sci*, 37(12): 526-533.
- Mira JP, Cariou A, Grall F, Delclaux C, Losser MR, Heshmati F, Cheval C, Monchi M, Teboul JL, Riche F, Leleu G, Arbibe L, Mignon A, Delpech M and Dhainaut JF, 1999. Association of tnf2, a tnf-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: A multicenter study. *JAMA*, 282(6): 561-568.
- Mizuno K, Takahashi HK, Iwagaki H, Katsuno G, Kamurul HA, Ohtani S, Mori S, Yoshino T, Nishibori M and Tanaka N, 2005. Beta2-adrenergic receptor stimulation inhibits lps-induced il-18 and il-12 production in monocytes. *Immunol Lett*, 101(2): 168-172.
- Mobarrez F, He S, Broijersen A, Wiklund B, Antovic A, Antovic J, Egberg N, Jorneskog G and Wallen H, 2011. Atorvastatin reduces thrombin generation and expression of tissue factor, p-selectin and gpiia on platelet-derived microparticles in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Thromb Haemost*, 106(2): 344-352.
- Morel N, Morel O, Delabranche X, Jesel L, Sztark F, Dabadie P, Freyssinet JM and Toti F, 2006. Microparticules circulantes au cours des traumatismes graves et des sepsis : Un élément du couplage inflammation–thrombose *Ann Fr Anesth Reanim*, 25(9): 955-966.
- Morel O, 2005. Les microparticules circulantes : Rôles physiologiques dans les maladies inflammatoires et thrombotiques. *Rev Med Interne*, 2: 791–801.
- Morel O, Ohlmann P, Epailly E, Bakouboula B, Zobairi F, Jesel L, Meyer N, Chenard MP, Freyssinet JM, Bareiss P, Mazzucotelli JP and Toti F, 2008. Endothelial cell activation contributes to the release of procoagulant microparticles during acute cardiac allograft rejection. *J Heart Lung Transplant*, 27(1): 38-45.
- Morel O, Toti F, Hugel B and Freyssinet JM, 2004. Cellular microparticles: A disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. *Curr Opin Hematol*, 11(3): 156-164.
- Morito F, Saito H, Suzuki K and Hashimoto S, 1985. Synthesis and secretion of protein c inhibitor by the human hepatoma-derived cell line, hep g2. *Biochim Biophys Acta*, 844(2): 209-215.
- Morrell CN, Aggrey AA, Chapman LM and Modjeski KL, 2014. Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells. *Blood*, 123(18): 2759-2767.

- Morser J, Gabazza EC, Myles T and Leung LL, 2010. What has been learnt from the thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor-deficient mouse? *J Thromb Haemost*, 8(5): 868-876.
- Mortaza S, Martinez MC, Baron-Menguy C, Burbán M, de la Bourdonnaye M, Fizanne L, Pierrot M, Cales P, Henrion D, Andriantsitohaina R, Mercat A, Asfar P and Meziani F, 2009. Detrimental hemodynamic and inflammatory effects of microparticles originating from septic rats. *Crit Care Med*, 37(6): 2045-2050.
- Mosnier LO, Zlokovic BV and Griffin JH, 2007. The cytoprotective protein c pathway. *Blood*, 109(8): 3161-3172.
- Munnix IC, Harmsma M, Giddings JC, Collins PW, Feijge MA, Comfurius P, Heemskerk JW and Bevers EM, 2003. Store-mediated calcium entry in the regulation of phosphatidylserine exposure in blood cells from scott patients. *Thromb Haemost*, 89(4): 687-695.
- Murakami K, Okajima K, Uchiba M, Johno M, Nakagaki T, Okabe H and Takatsuki K, 1996. Activated protein c attenuates endotoxin-induced pulmonary vascular injury by inhibiting activated leukocytes in rats. *Blood*, 87(2): 642-647.
- Nance DM and Sanders VM, 2007. Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987-2007). *Brain Behav Immun*, 21(6): 736-745.
- Neeli I, Dwivedi N, Khan S and Radic M, 2009. Regulation of extracellular chromatin release from neutrophils. *J Innate Immun*, 1(3): 194-201.
- Nencioni A, Trzeciak S and Shapiro NI, 2009. The microcirculation as a diagnostic and therapeutic target in sepsis. *Intern Emerg Med*, 4(5): 413-418.
- Netea MG, Wijmenga C and O'Neill LA, 2012. Genetic variation in toll-like receptors and disease susceptibility. *Nat Immunol*, 13(6): 535-542.
- Nick JA, Coldren CD, Geraci MW, Poch KR, Fouty BW, O'Brien J, Gruber M, Zarini S, Murphy RC, Kuhn K, Richter D, Kast KR and Abraham E, 2004. Recombinant human activated protein c reduces human endotoxin-induced pulmonary inflammation via inhibition of neutrophil chemotaxis. *Blood*, 104(13): 3878-3885.
- Nielsen CT, Ostergaard O, Stener L, Iversen LV, Truedsson L, Gullstrand B, Jacobsen S and Heegaard NH, 2012. Increased igg on cell-derived plasma microparticles in systemic lupus erythematosus is associated with autoantibodies and complement activation. *Arthritis Rheum*, 64(4): 1227-1236.
- Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, Boing AN, Romijn FP, Westendorp RG, Hack CE and Sturk A, 2000. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood*, 95(3): 930-935.
- Nishioka J, Ning M, Hayashi T and Suzuki K, 1998. Protein c inhibitor secreted from activated platelets efficiently inhibits activated protein c on phosphatidylethanolamine of platelet membrane and microvesicles. *J Biol Chem*, 273(18): 11281-11287.
- Ohlwein N, Herrmann A and Devaux PF, 2012. Endocytosis and lipid asymmetry. In: *Transmembrane dynamics of lipids*, P. F. Devaux and A. Herrmann, (Eds.). pp: 275-287.
- Perez-Casal M, Downey C, Fukudome K, Marx G and Toh CH, 2005. Activated protein c induces the release of microparticle-associated endothelial protein c receptor. *Blood*, 105(4): 1515-1522.
- Perez-Casal M, Thompson V, Downey C, Welters I, Wyncoll D, Thachil J and Toh CH, 2011. The clinical and functional relevance of microparticles induced by activated protein c treatment in sepsis. *Crit Care*, 15(4): R195.
- Peters K, Unger RE, Brunner J and Kirkpatrick CJ, 2003. Molecular basis of endothelial dysfunction in sepsis. *Cardiovasc Res*, 60(1): 49-57.

- Pfister SL, 2004. Role of platelet microparticles in the production of thromboxane by rabbit pulmonary artery. *Hypertension*, 43(2): 428-433.
- Pilsczek FH, Salina D, Poon KK, Fahey C, Yipp BG, Sibley CD, Robbins SM, Green FH, Surette MG, Sugai M, Bowden MG, Hussain M, Zhang K and Kubes P, 2010. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to staphylococcus aureus. *J Immunol*, 185(12): 7413-7425.
- Pontes-Arruda A, Aragao AM and Albuquerque JD, 2006. Effects of enteral feeding with eicosapentaenoic acid, gamma-linolenic acid, and antioxidants in mechanically ventilated patients with severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med*, 34(9): 2325-2333.
- Puy C, Tucker EI, Wong ZC, Gailani D, Smith SA, Choi SH, Morrissey JH, Gruber A and McCarty OJ, 2013. Factor xii promotes blood coagulation independent of factor xi in the presence of long-chain polyphosphates. *J Thromb Haemost*, 11(7): 1341-1352.
- Qu Y and Dubyak GR, 2009. P2x7 receptors regulate multiple types of membrane trafficking responses and non-classical secretion pathways. *Purinergic Signal*, 5(2): 163-173.
- Quenot JP, Binquet C, Kara F, Martinet O, Ganster F, Navellou JC, Castelain V, Barraud D, Cousson J, Louis G, Perez P, Kuteifan K, Noirot A, Badie J, Mezher C, Lessire H and Pavon A, 2013. The epidemiology of septic shock in french intensive care units: The prospective multicenter cohort episs study. *Crit Care*, 17(2): R65.
- Rand ML, Wang H, Bang KW, Packham MA and Freedman J, 2006. Rapid clearance of procoagulant platelet-derived microparticles from the circulation of rabbits. *J Thromb Haemost*, 4(7): 1621-1623.
- Ranieri VM, Thompson BT, Barie PS, Dhainaut JF, Douglas IS, Finfer S, Gardlund B, Marshall JC, Rhodes A, Artigas A, Payen D, Tenhunen J, Al-Khalidi HR, Thompson V, Janes J, Macias WL, Vangerow B, Williams MD and Group P-SS, 2012. Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock. *N Engl J Med*, 366(22): 2055-2064.
- Rank A, Nieuwland R, Crispin A, Grutzner S, Iberer M, Toth B and Pihusch R, 2011. Clearance of platelet microparticles in vivo. *Platelets*, 22(2): 111-116.
- Rauch U, Bonderman D, Bohrmann B, Badimon JJ, Himber J, Riederer MA and Nemerson Y, 2000. Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by cd15 and tissue factor. *Blood*, 96(1): 170-175.
- Rautou PE and Mackman N, 2012. Del-etion of microvesicles from the circulation. *Circulation*, 125(13): 1601-1604.
- Renner B, Klawitter J, Goldberg R, McCullough JW, Ferreira VP, Cooper JE, Christians U and Thurman JM, 2013. Cyclosporine induces endothelial cell release of complement-activating microparticles. *J Am Soc Nephrol*.
- Rice TW, Wheeler AP, Thompson BT, deBoisblanc BP, Steingrub J, Rock P, Investigators NNARDSNo and Network NACT, 2011. Enteral omega-3 fatty acid, gamma-linolenic acid, and antioxidant supplementation in acute lung injury. *JAMA*, 306(14): 1574-1581.
- Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, Peterson E, Tomlanovich M and Early Goal-Directed Therapy Collaborative G, 2001. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*, 345(19): 1368-1377.
- Russell JA, 2006. Management of sepsis. *N Engl J Med*, 355(16): 1699-1713.
- Sahler J, Woeller C, Spinelli S, Blumberg N and Phipps R, 2012. A novel method for overexpression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in megakaryocyte and platelet microparticles achieves transcellular signaling. *J Thromb Haemost*, 10(12): 2563-2572.

- Sapet C, Simoncini S, Loriol B, Puthier D, Sampol J, Nguyen C, Dignat-George F and Anfosso F, 2006. Thrombin-induced endothelial microparticle generation: Identification of a novel pathway involving rock-ii activation by caspase-2. *Blood*, 108(6): 1868-1876.
- Sarkar C, Chakroborty D and Basu S, 2013. Neurotransmitters as regulators of tumor angiogenesis and immunity: The role of catecholamines. *J Neuroimmune Pharmacol*, 8(1): 7-14.
- Satta N, Freyssinet JM and Toti F, 1997. The significance of human monocyte thrombomodulin during membrane vesiculation and after stimulation by lipopolysaccharide. *Br J Haematol*, 96(3): 534-542.
- Satta N, Toti F, Feugeas O, Bohbot A, Dachary-Prigent J, Eschwege V, Hedman H and Freyssinet JM, 1994. Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. *J Immunol*, 153(7): 3245-3255.
- Schaller J and Gerber SS, 2011. The plasmin-antiplasmin system: Structural and functional aspects. *Cell Mol Life Sci*, 68(5): 785-801.
- Scholz T, Temmler U, Krause S, Heptinstall S and Losche W, 2002. Transfer of tissue factor from platelets to monocytes: Role of platelet-derived microvesicles and cd62p. *Thromb Haemost*, 88(6): 1033-1038.
- Schouten M, Wiersinga WJ, Levi M and van der Poll T, 2008. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J Leukoc Biol*, 83(3): 536-545.
- Schroder NW and Schumann RR, 2005. Single nucleotide polymorphisms of toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. *Lancet Infect Dis*, 5(3): 156-164.
- Sebbagh M, Hamelin J, Bertoglio J, Solary E and 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(3): 465-471.
- Sebbagh M, Renvoize C, Hamelin J, Riche N, Bertoglio J and Breard J, 2001. Caspase-3-mediated cleavage of rock i induces mlc phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol*, 3(4): 346-352.
- Sennoun N, Baron-Menguy C, Burbani M, Lecompte T, Andriantsitohaina R, Henrion D, Mercat A, Asfar P, Levy B and Meziani F, 2009. 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(1): H277-282.
- Shapiro NI, Schuetz P, Yano K, Sorasaki M, Parikh SM, Jones AE, Trzeciak S, Ngo L and Aird WC, 2010. The association of endothelial cell signaling, severity of illness, and organ dysfunction in sepsis. *Crit Care*, 14(5): R182.
- Shortman K and Liu YJ, 2002. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol*, 2(3): 151-161.
- Simpson F and Doig GS, 2005. Parenteral vs. Enteral nutrition in the critically ill patient: A meta-analysis of trials using the intention to treat principle. *Intensive Care Med*, 31(1): 12-23.
- Singer P, Anbar R, Cohen J, Shapiro H, Shalita-Chesner M, Lev S, Grozovski E, Theilla M, Frishman S and Madar Z, 2011. The tight calorie control study (ticacos): A prospective, randomized, controlled pilot study of nutritional support in critically ill patients. *Intensive Care Med*, 37(4): 601-609.
- Singer P, Berger MM, Van den Berghe G, Biolo G, Calder P, Forbes A, Griffiths R, Kreyman G, Leverve X, Pichard C and Espen, 2009. Espen guidelines on parenteral nutrition: Intensive care. *Clin Nutr*, 28(4): 387-400.

- Singer P, Theilla M, Fisher H, Gibstein L, Grozovski E and Cohen J, 2006. Benefit of an enteral diet enriched with eicosapentaenoic acid and gamma-linolenic acid in ventilated patients with acute lung injury. *Crit Care Med*, 34(4): 1033-1038.
- Singer SJ and Nicolson GL, 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175(4023): 720-731.
- Skibsted S, Jones AE, Puskarich MA, Arnold R, Sherwin R, Trzeciak S, Schuetz P, Aird WC and Shapiro NI, 2013. Biomarkers of endothelial cell activation in early sepsis. *Shock*, 39(5): 427-432.
- Sommeijer DW, Joop K, Leyte A, Reitsma PH and ten Cate H, 2005. Pravastatin reduces fibrinogen receptor gpiia on platelet-derived microparticles in patients with type 2 diabetes. *J Thromb Haemost*, 3(6): 1168-1171.
- Soriano AO, Jy W, Chirinos JA, Valdivia MA, Velasquez HS, Jimenez JJ, Horstman LL, Kett DH, Schein RM and Ahn YS, 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(11): 2540-2546.
- Sprung CL, Annane D, Keh D, Moreno R, Singer M, Freivogel K, Weiss YG, Benbenishty J, Kalenka A, Forst H, Laterre PF, Reinhart K, Cuthbertson BH, Payen D, Briegel J and Group CS, 2008. Hydrocortisone therapy for patients with septic shock. *N Engl J Med*, 358(2): 111-124.
- Stapleton RD, Martin TR, Weiss NS, Crowley JJ, Gundel SJ, Nathens AB, Akhtar SR, Ruzinski JT, Caldwell E, Curtis JR, Heyland DK, Watkins TR, Parsons PE, Martin JM, Wurfel MM, Hallstrand TS, Sims KA and Neff MJ, 2011. A phase ii randomized placebo-controlled trial of omega-3 fatty acids for the treatment of acute lung injury. *Crit Care Med*, 39(7): 1655-1662.
- Sutherland WH, de Jong SA, Hessian PA and Williams MJ, 2010. Ingestion of native and thermally oxidized polyunsaturated fats acutely increases circulating numbers of endothelial microparticles. *Metabolism*, 59(3): 446-453.
- Suzuki J, Umeda M, Sims PJ and Nagata S, 2010. Calcium-dependent phospholipid scrambling by tmem16f. *Nature*, 468(7325): 834-838.
- Suzuki K, Nishioka J, Kusumoto H and Hashimoto S, 1984. Mechanism of inhibition of activated protein c by protein c inhibitor. *J Biochem*, 95(1): 187-195.
- Takahashi HK, Morichika T, Iwagaki H, Yoshino T, Tamura R, Saito S, Mori S, Akagi T, Tanaka N and Nishibori M, 2003. Effect of beta 2-adrenergic receptor stimulation on interleukin-18-induced intercellular adhesion molecule-1 expression and cytokine production. *J Pharmacol Exp Ther*, 304(2): 634-642.
- Taylor DE and Piantadosi CA, 1995. Oxidative metabolism in sepsis and sepsis syndrome. *J Crit Care*, 10(3): 122-135.
- Tesnière A and Mignon A, 2006. Apoptose. In: *Physiologie humaine appliquée*. pp: 1073-1085.
- Tesse A, Martinez MC, Hugel B, Chalupsky K, Muller CD, Meziani F, Mitolo-Chieppa D, Freyssinet JM and Andriantsitohaina R, 2005. Upregulation of proinflammatory proteins through nf-kappab pathway by shed membrane microparticles results in vascular hyporeactivity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25(12): 2522-2527.
- Tesse A, Meziani F, David E, Carusio N, Kremer H, Schneider F and Andriantsitohaina R, 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(1): H520-525.
- Texereau J, Chiche JD, Taylor W, Choukroun G, Comba B and Mira JP, 2005. The importance of toll-like receptor 2 polymorphisms in severe infections. *Clin Infect Dis*, 41 Suppl 7: S408-415.

- Thery C, Zitvogel L and Amigorena S, 2002. Exosomes: Composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol*, 2(8): 569-579.
- Thomas L, 1972. Germs. *N Engl J Med*, 287(11): 553-555.
- Tinsley KW, Grayson MH, Swanson PE, Drewry AM, Chang KC, Karl IE and Hotchkiss RS, 2003. Sepsis induces apoptosis and profound depletion of splenic interdigitating and follicular dendritic cells. *J Immunol*, 171(2): 909-914.
- Toti F and Freyssinet JM, 2005. An abc for scott syndrome? *Blood*, 106: 396-397
- Toussaint S and Gerlach H, 2009. Activated protein c for sepsis. *N Engl J Med*, 361(27): 2646-2652.
- Tressel SL, Kaneider NC, Kasuda S, Foley C, Koukos G, Austin K, Agarwal A, Covic L, Opal SM and Kuliopulos A, 2011. A matrix metalloprotease-par1 system regulates vascular integrity, systemic inflammation and death in sepsis. *EMBO Mol Med*, 3(7): 370-384.
- Trzeciak S, Cinel I, Phillip Dellinger R, Shapiro NI, Arnold RC, Parrillo JE and Hollenberg SM, 2008. Resuscitating the microcirculation in sepsis: The central role of nitric oxide, emerging concepts for novel therapies, and challenges for clinical trials. *Acad Emerg Med*, 15(5): 399-413.
- Tymk K, Wang X, Lidington D and Ouellette Y, 2001. Lipopolysaccharide reduces intercellular coupling in vitro and arteriolar conducted response in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 281(3): H1397-1406.
- Vallet B, 2003. Bench-to-bedside review: Endothelial cell dysfunction in severe sepsis: A role in organ dysfunction? *Crit Care*, 7(2): 130-138.
- Van Der Meijden PE, Van Schilfgaarde M, Van Oerle R, Renne T, ten Cate H and Spronk HM, 2012. Platelet- and erythrocyte-derived microparticles trigger thrombin generation via factor xiiia. *J Thromb Haemost*, 10(7): 1355-1362.
- van der Pol E, van Gemert MJ, Sturk A, Nieuwland R and van Leeuwen TG, 2012. Single vs. Swarm detection of microparticles and exosomes by flow cytometry. *J Thromb Haemost*, 10(5): 919-930.
- van der Poll T and Herwald H, 2014. The coagulation system and its function in early immune defense. *Thromb Haemost*, 112(1).
- van Deventer SJ, Buller HR, ten Cate JW, Aarden LA, Hack CE and Sturk A, 1990. Experimental endotoxemia in humans: Analysis of cytokine release and coagulation, fibrinolytic, and complement pathways. *Blood*, 76(12): 2520-2526.
- van Eijk IC, Tushuizen ME, Sturk A, Dijkmans BA, Boers M, Voskuyl AE, Diamant M, Wolbink GJ, Nieuwland R and Nurmohamed MT, 2010. Circulating microparticles remain associated with complement activation despite intensive anti-inflammatory therapy in early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 69(7): 1378-1382.
- van Hinsbergh VW, 2011. Endothelium-role in regulation of coagulation and inflammation. *Semin Immunopathol*.
- VanWijk MJ, Nieuwland R, Boer K, van der Post JA, VanBavel E and Sturk A, 2002. Microparticle subpopulations are increased in preeclampsia: Possible involvement in vascular dysfunction? *Am J Obstet Gynecol*, 187(2): 450-456.
- VanWijk MJ, VanBavel E, Sturk A and Nieuwland R, 2003. Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res*, 59(2): 277-287.
- Varga-Szabo D, Braun A and Nieswandt B, 2009. Calcium signaling in platelets. *J Thromb Haemost*, 7(7): 1057-1066.
- Verbist KC, Wang R and Green DR, 2012. T cell metabolism and the immune response. *Semin Immunol*, 24(6): 399-404.
- Verkleij AJ, Zwaal RF, Roelofsen B, Comfurius P, Kastelijn D and 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(2): 178-193.
- Villet S, Chiolero RL, Bollmann MD, Revelly JP, Cayeux RNM, Delarue J and Berger MM, 2005. Negative impact of hypocaloric feeding and energy balance on clinical outcome in icu patients. *Clin Nutr*, 24(4): 502-509.
- Vincent JL and De Backer D, 2005. Microvascular dysfunction as a cause of organ dysfunction in severe sepsis. *Crit Care*, 9 Suppl 4: S9-12.
- Wang C, Sun J, Zheng J, Guo L, Ma H, Zhang Y, Zhang F and Li E, 2014. Low-dose hydrocortisone therapy attenuates septic shock in adult patients but does not reduce 28-day mortality: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Anesth Analg*, 118(2): 346-357.
- Wang JG, Williams JC, Davis BK, Jacobson K, Doerschuk CM, Ting JP and Mackman N, 2011. Monocytic microparticles activate endothelial cells in an il-1beta-dependent manner. *Blood*, 118(8): 2366-2374.
- Wanten G, 2006. An update on parenteral lipids and immune function: Only smoke, or is there any fire? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 9(2): 79-83.
- Ward PA, Guo RF and Riedemann NC, 2012. Manipulation of the complement system for benefit in sepsis. *Crit Care Res Pract*, 2012: 427607.
- White B, Schmidt M, Murphy C, Livingstone W, O'Toole D, Lawler M, O'Neill L, Kelleher D, Schwarz HP and Smith OP, 2000. Activated protein c inhibits lipopolysaccharide-induced nuclear translocation of nuclear factor kappa b (nf-kappa b) and tumour necrosis factor alpha (tnf-alpha) production in the thp-1 monocytic cell line. *Br J Haematol*, 110(1): 130-134.
- Willekens FL, Werre JM, Kruijt JK, Roerdinkholder-Stoelwinder B, Groenen-Dopp YA, van den Bos AG, Bosman GJ and van Berkel TJ, 2005. Liver kupffer cells rapidly remove red blood cell-derived vesicles from the circulation by scavenger receptors. *Blood*, 105(5): 2141-2145.
- Wolf P, 1967. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol*, 13(3): 269-288.
- Wong HR, Cvijanovich NZ, Hall M, Allen GL, Thomas NJ, Freishtat RJ, Anas N, Meyer K, Checchia PA, Lin R, Bigham MT, Sen A, Nowak J, Quasney M, Henricksen JW, Chopra A, Banschbach S, Beckman E, Harmon K, Lahni P and Shanley TP, 2012. Interleukin-27 is a novel candidate diagnostic biomarker for bacterial infection in critically ill children. *Crit Care*, 16(5): R213.
- Yaguchi A, Lobo FL, Vincent JL and Pradier O, 2004. Platelet function in sepsis. *J Thromb Haemost*, 2(12): 2096-2102.
- Yaqoob P and Shaikh SR, 2010. The nutritional and clinical significance of lipid rafts. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 13(2): 156-166.
- 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 and Baud L, 2012. Calpastatin controls polymicrobial sepsis by limiting procoagulant microparticle release. *Am J Respir Crit Care Med*, 185(7): 744-755.
- Zafrani L, Ince C and Yuen PS, 2013. Microparticles during sepsis: Target, canary or cure? *Intensive Care Med*.
- Zeerleder S, Schroeder V, Hack CE, Kohler HP and Wuillemin WA, 2006. Tafi and pai-1 levels in human sepsis. *Thromb Res*, 118(2): 205-212.
- Zernecke A, Bidzhekov K, Noels H, Shagdarsuren E, Gan L, Denecke B, Hristov M, Koppel T, Jahantigh MN, Lutgens E, Wang S, Olson EN, Schober A and Weber C, 2009. Delivery of microrna-126 by apoptotic bodies induces cxcl12-dependent vascular protection. *Sci Signal*, 2(100): ra81.

- Zhao Y, Joshi-Barve S, Barve S and Chen LH, 2004. Eicosapentaenoic acid prevents lps-induced tnf-alpha expression by preventing nf-kappab activation. *J Am Coll Nutr*, 23(1): 71-78.
- Zhou F, Peng Z, Murugan R and Kellum JA, 2013. Blood purification and mortality in sepsis: A meta-analysis of randomized trials. *Crit Care Med*, 41(9): 2209-2220.
- Zwaal RF, Comfurius P and Bevers EM, 2005. Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. *Cell Mol Life Sci*, 62(9): 971-988.
- Zwaal RF and Schroit AJ, 1997. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood*, 89(4): 1121-1132.
- Zwicker JJ, Trenor CC, 3rd, Furie BC and Furie B, 2011. Tissue factor-bearing microparticles and thrombus formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31(4): 728-733.

Annexes

Annexe 1

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 (PtdSer) 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 PtdSer 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 PtdSer 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 (PtdSer) 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 PtdSer, 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

(PtdCho) are the main lipids of the outer leaflet whereas phosphatidylserine (PtdSer) and phosphatidylethanolamine (PtdEth) 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 PtdSer and PtdEth 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]. PtdSer 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

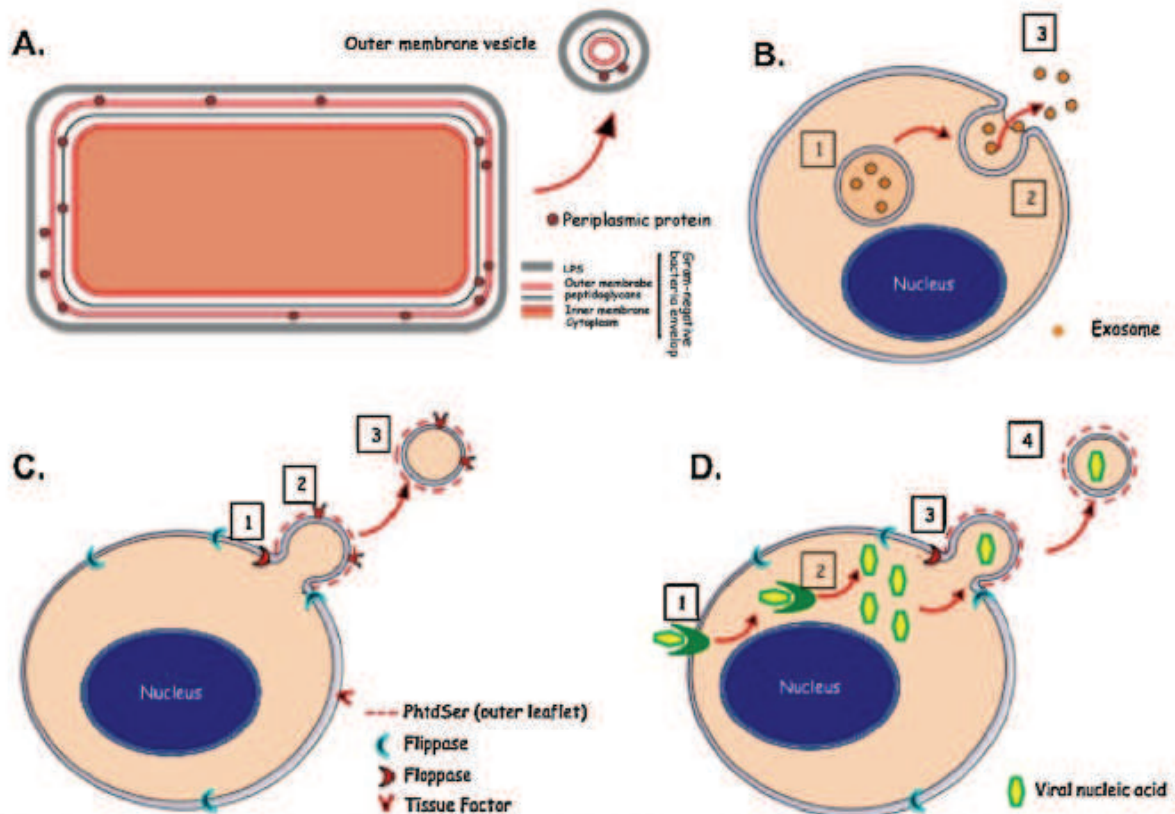


Fig. 1. Shedding from prokaryotes and eukaryotes: different types of microvesicles. A. Gram-negative bacteria feature the lipopolysaccharide (LPS) anchored in the outer bilayer membrane, peptidoglycans, and an inner bilayer membrane. Outer membrane vesicles (OMV) disseminate the LPS bound to the outer 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

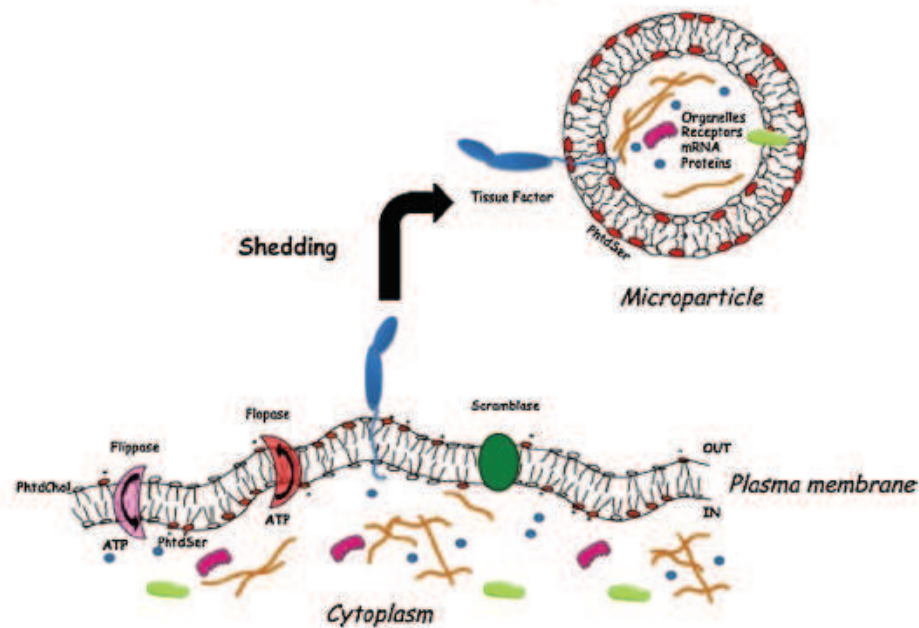


Fig. 2. Microparticle: an overview. In resting cells, phosphatidylcholine (PtdChol, white circles) is the major outer leaflet component while negatively charged phosphatidylserine (PtdSer, red circles) is found in the inner leaflet; this asymmetry is maintained by flippase, an ATP-dependent aminophospholipid 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

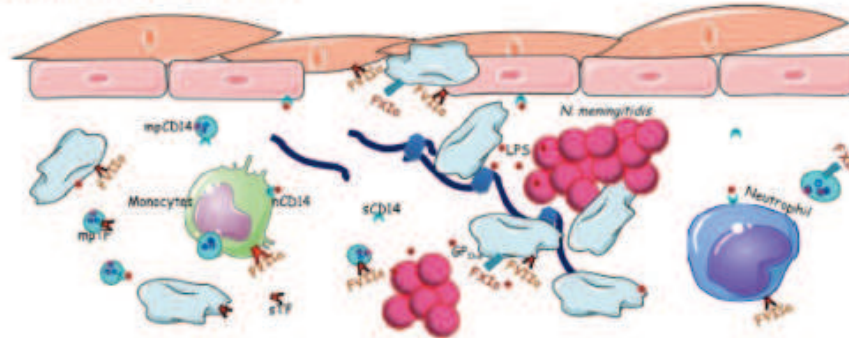
Severe sepsis is characterized by a systemic inflammatory response syndrome associated with hypotension. Septic shock, the more severe form of infection, is defined by severe sepsis with persistent hypotension despite fluid loading and use of vasopressor.

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

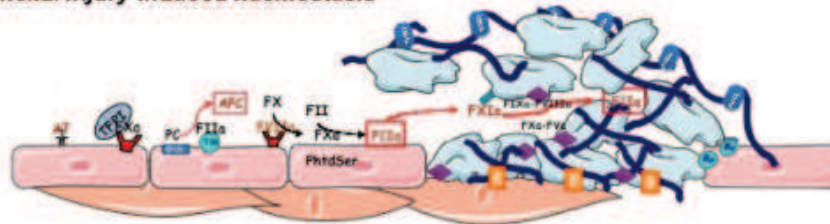


Fig. 3. Physiological hemostasis and pathogen-induced coagulopathy. A. Pathogen-induced hemostasis differs greatly from normal hemostasis. The lipopolysaccharide (LPS) activates endothelial cells and monocytes after binding to its sensor CD14/MD-2/TLR4 complex. TF is up regulated and PtdSer externalization occurs allowing coagulation factors assembly. Microparticles are generated from activated monocytes, platelets, and endothelial cells bearing not only TF but also GPIIb 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 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 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 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/IIIa 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 PhtdSer externalization after cell endocytosis. The resulting viral particles express PhtdSer 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 PhtdSer, 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 PhtdSer 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] Hensleit 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] Meziani F, Delabranche X, Asfar F, Toti F. Bench-to-bedside review: circulating microparticles—a new player in sepsis? *Crit Care* 2010;14:236.
- [11] Frey B, Gaubl 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 Trosleid 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 GPIIb 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, Charunwatthana 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, Coltel 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] Faïlle 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, Popemack 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, Fumrohr 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.

Annexe 2

Nature et signification des microparticules dans le sepsis*

The nature and significance of microparticles in sepsis

J. Boisramé-Helms · X. Delabranche · F. Toti · F. Meziani

Reçu le 11 septembre 2012 ; accepté le 16 octobre 2012
© SRLF et Springer-Verlag France 2012

Résumé Le choc septique est caractérisé par une intense activation cellulaire inflammatoire, à l'origine d'un remodelage de la membrane aboutissant à la libération de microparticules. Les microparticules constituent une réserve de bio-effecteurs qui modulent de nombreuses fonctions vasculaires. Au cours du choc septique, l'interaction hôte-pathogène peut être responsable de la génération de microparticules procoagulantes d'origine endothéliale, plaquettaire, érythrocytaire ou granulocytaire, susceptibles d'activer la réponse inflammatoire, l'apoptose cellulaire et la coagulation. Certaines microparticules pourraient promouvoir l'importante dysfonction vasculaire observée au cours du choc septique, participer à la modulation du statut oxydant ou encore, participer à la génération d'un état de coagulopathie disséminée. Ce travail constitue une mise au point sur les dernières connaissances accumulées sur les propriétés biologiques des microparticules pour tenter d'identifier leur implication dans le choc septique, comme marqueur biologique ou cible thérapeutique potentielle.

Mots clés Microparticules · Sepsis · Dysfonction endothéliale · Coagulation · Inflammation

J. Boisramé-Helms · X. Delabranche · F. Meziani (✉)
Service de réanimation médicale, nouvel hôpital civil,
hôpitaux universitaires de Strasbourg, 1, place de l'Hôpital,
F-67091 Strasbourg cedex, France
e-mail : ferhat.meziani@chru-strasbourg.fr

J. Boisramé-Helms · X. Delabranche · F. Toti · F. Meziani
UMR 7213 CNRS, Faculté de pharmacie,
Université de Strasbourg, Illkirch, France

F. Toti
Institut d'hématologie et d'immunologie,
Université de Strasbourg,
Faculté de médecine, Strasbourg, France

* Cet article correspond à la conférence faite par l'auteur au congrès de la SRLF 2013 dans la session : *Voies de recherche dans le sepsis*.

Abstract Septic shock is characterized by an increased inflammatory process and cell activation, inducing membrane remodeling and microparticles release. These microparticles represent a pool of bioactive effectors that modulate several vascular functions. During sepsis, host-pathogen interaction leads to the generation of endothelium-, platelet-, erythrocyte- and granulocyte-derived procoagulant microparticles, which could promote cellular inflammatory response, apoptosis and activate coagulation. Microparticles may also potentially participate in the arterial dysfunction characterizing septic shock, tune the oxidative status and induce procoagulant state. This review focuses on the latest knowledge accumulated on the biological properties of microparticles in order to identify their involvement in sepsis or septic shock, as a biological marker or potential therapeutic target.

Keywords Microparticles · Sepsis · Endothelial dysfunction · Coagulation · Inflammation

Introduction

Le choc septique est caractérisé par une intense dysfonction vasculaire, avec une vasoplégie réfractaire aux traitements vasopresseurs et associée à une défaillance multiviscérale [1], dont les mécanismes ne sont pas encore parfaitement élucidés. Ils associeraient des anomalies de la coagulation et de la perfusion à une atteinte cytotoxique directe par les agents infectieux, ou indirecte par les médiateurs de l'inflammation. Au cours du choc septique, l'intense activation cellulaire est à l'origine du bourgeonnement de la membrane plasmique qui est caractérisée par la libération de microparticules dans le milieu environnant.

Bientôt cinquantenaires dans leur description, les microparticules connaissent un intérêt croissant en recherche clinique, alors qu'elles ont longtemps été considérées comme des débris cellulaires dépourvus de fonction biologique propre, témoins d'une activation ou d'une destruction cellulaire [2]. Ces « entités membranaires » se comportent

comme de véritables effecteurs cellulaires capables de moduler de nombreuses réponses vasculaires et tissulaires [3]. En effet, elles véhiculent un signal biologique propre aux conditions de leur émission par la cellule parentale ; leurs caractéristiques membranaires leur confèrent des propriétés généralement procoagulantes, pro-inflammatoires et pro-apoptotiques, mais aussi pro-fibrinolytiques. Selon le contexte physiopathologique, les microparticules peuvent s'avérer bénéfiques ou délétères pour l'organisme [4]. Chez l'homme, en dehors de toute situation pathologique, les microparticules sont détectables à de faibles concentrations dans le sang et dans les fluides biologiques et témoignent de l'homéostasie cellulaire des tissus [5,6]. Dans le compartiment vasculaire, elles seraient principalement d'origine plaquettaire [7]. Des taux élevés de microparticules circulantes sont retrouvés dans de nombreuses pathologies thrombotiques, inflammatoires, traumatiques ou cancéreuses [8-12].

Au cours du choc septique, une génération excessive de microparticules d'origine endothéliale, plaquettaire et monocyttaire, mais aussi érythrocytaire ou granulocytaire, est rapportée. Dans ce contexte particulier, leurs propriétés pro-inflammatoires et pro-apoptotiques favoriseraient la survenue d'un syndrome de défaillance multiviscérale. Chez le rat, il a été démontré que les microparticules pourraient ainsi promouvoir l'importante dysfonction vasculaire observée au cours du choc septique, participer à la modulation du statut oxydant ou encore contribuer à un état procoagulant [13].

Cette revue décrit brièvement les différentes propriétés des microparticules et leurs effets sur les réponses vasculaires mises en jeu au cours du sepsis ou du choc septique, ainsi que leur intérêt comme marqueur biologique ou cible thérapeutique.

Propriétés physicochimiques des microparticules

Les microparticules libérées dans l'espace extracellulaire et détectées dans les fluides biologiques sont des fragments sub-microniques de membrane plasmique dont la taille varie de 0,05 à 1 µm de diamètre [14]. Elles sont émises par la cellule parentale sous l'effet d'un stress provoquant le réarrangement des phospholipides anioniques entre les deux feuillets de la membrane qui, déstabilisée, bourgeonne [15]. Toute cellule est susceptible d'émettre des microparticules pour autant qu'un stress approprié lui soit appliqué. Les microparticules détectées dans le plasma dérivent pour leur majorité des cellules circulantes (plaquettes, leucocytes et érythrocytes) et des cellules qui composent la paroi vasculaire, principalement les cellules endothéliales, les macrophages et les cellules musculaires lisses [14]. Les microparticules portent les caractères spécifiques de la cellule émettrice. Ainsi, les

antigènes de surface permettent l'identification de l'origine cellulaire, parfois même du type de stress appliqué lorsqu'il se traduit par des modifications de la composition protéique membranaire [16]. Les microparticules ont la capacité de fusionner avec les membranes plasmiques d'autres cellules ou microparticules, et sont susceptibles d'acquérir des antigènes différents de ceux de la cellule parentale et de les transmettre [17,18]. In vivo, le thrombus en formation constitue un exemple de focalisation des microparticules leucocytaires et plaquettaires favorisant la constitution de nouvelles espèces hybrides exhibant des antigènes propres aux deux lignées [19].

Dans le vaisseau, les microparticules sont considérées comme procoagulantes en raison de la phosphatidylsérine (PtdSer) exposée dans le feuillet externe de leur membrane. C'est un phospholipide anionique qui constitue la surface catalytique nécessaire à la fixation des facteurs de la coagulation vitamine K-dépendants plasmatiques et à leur assemblage sous la forme des complexes de la cascade de la coagulation. En outre, certaines microparticules émises par les cellules endothéliales ou les monocytes portent du facteur tissulaire (FT) actif, qui est l'initiateur cellulaire de la cascade de la coagulation (voir ci-après).

Les propriétés d'effecteur cellulaire des microparticules reposent sur leur capacité à se lier à des cellules cibles naïves, auxquelles elles transmettent des médiateurs protéiques, lipidiques ou nucléotidiques (miRNA) (Fig. 1).

Composition des microparticules et mécanismes de formation

La membrane des microparticules reflète donc l'état d'activation cellulaire, notamment par la composition du feuillet externe en phospholipides anioniques, mais aussi parfois par l'enrichissement en protéines particulières exprimées en grande proportion par la membrane des cellules activées, comme la E-sélectine, la P-sélectine ou le FT [20,21]. De plus, elles contiennent des protéines et récepteurs transmembranaires ; ceux-ci peuvent être sélectivement exportés ou au contraire exclus de la microparticule en fonction de leur regroupement transversal dans les domaines lipidiques membranaires appelés rafts, qui sont réorganisés au cours du stress, ainsi que des composés cytosoliques (enzymes, facteurs de transcription, ARN messagers, interleukine (IL)-1, regulated and normal T-cell expressed and secreted [RANTES]).

Les microparticules et leurs propriétés sont à distinguer d'une autre forme de vésicule d'origine endosomale, les exosomes qui ne portent pas de PtdSer, sont de taille inférieure et fortement enrichis en protéines de la famille des tétraspanines [22].

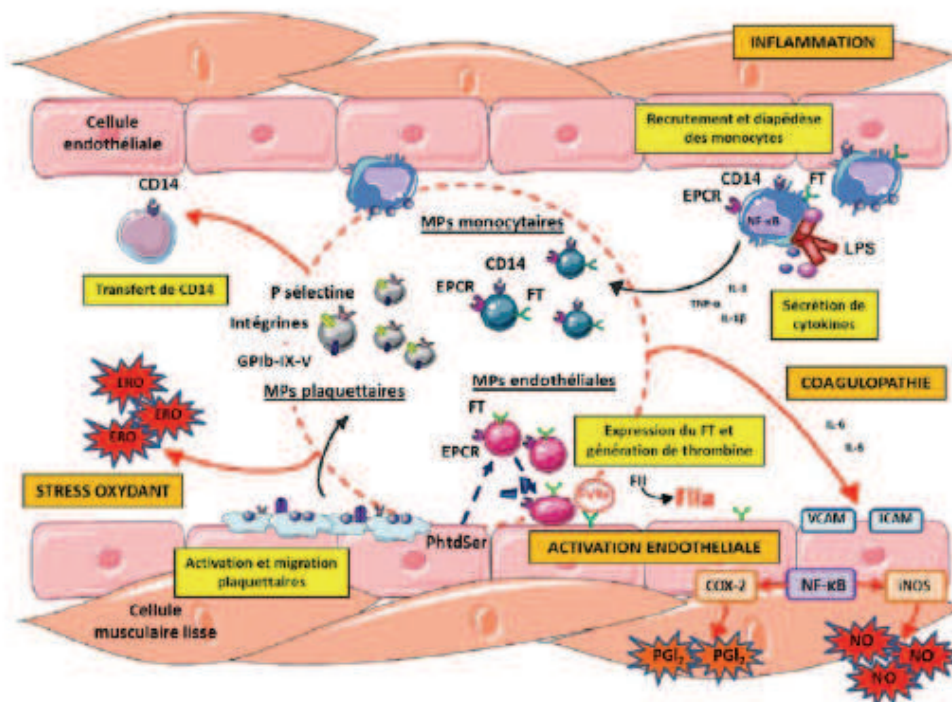


Fig. 1 Au cours du choc septique, l'interaction hôte-pathogène est responsable de la génération de microparticules procoagulantes d'origine endothéliale, plaquettaire, érythrocytaire et granulocytaire. Ces microparticules interviennent dans la régulation de l'homéostasie vasculaire. Il a été démontré 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, induisant 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 PhtdSer 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 receptor*, récepteur de la protéine C ; ERO : espèces réactives de l'oxygène ; FII : prothrombine ; FIIa : thrombine ; FT : facteur tissulaire ; FVIIa : facteur VII activé ; GPIb : glycoprotéine Ib ; ICAM-1 : *intercellular adhesion molecule-1*, molécule d'adhésion intercellulaire 1 ; IL-1β : interleukine-1 bêta ; IL-6 : interleukine-6 ; IL-8 : interleukine-8 ; iNOS : NO synthétase inducible ; LPS : lipopolysaccharides ; MPs : microparticules ; Nf-κB : facteur de transcription nucléaire-kappa B ; NO : monoxyde d'azote ; PGI2 : prostacycline ; PhtdSer : phosphatidylsérine ; TNF-α : facteur de nécrose tumorale-alpha ; VCAM-1 : *vascular cell adhesion molecule-1*, molécule d'adhésion cellulaire vasculaire 1

La distribution asymétrique des phospholipides de la membrane plasmique et sa réorganisation après activation cellulaire sont gouvernés par un ensemble de transporteurs (flippase, floppase et scramblase), qui assurent la translocation des lipides entre les deux feuilletts [23]. Au repos, la PhtdSer et la phosphatidyléthanolamine, les deux aminophospholipides susceptibles d'exhiber une charge négative, sont séquestrés dans le feuillet interne. Elles sont transloquées dans le feuillet externe après activation cellulaire, tandis que les fortes concentrations calciques cytosoliques favorisent l'inhibition de la translocase responsable de

l'internalisation des phospholipides anioniques, mais aussi l'activation des calpaines et la dégradation du cytosquelette qui facilitent le bourgeonnement cellulaire. La redistribution des phospholipides anioniques est généralement considérée comme dépendante des entrées calciques qui peuvent être mobilisées en réponse à un agoniste cellulaire via les canaux SOCE (*Store Operated Channel Entry*), mais aussi d'autres canaux calciques comme P2X1 dans les plaquettes. D'autres canaux ioniques comme les Gardos channels (canaux potassiques) ont été impliqués dans ces remaniements [23].

Microparticules et réponse inflammatoire

Au cours des infections à bacilles gram-négatifs, la réponse inflammatoire induite par le lipopolysaccharide (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 (*LPS binding protein*) 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 [24].

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 [24]. 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 [25]. Les mécanismes d'amplification de la réponse monocyttaire 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 [26]. 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 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 [27,28]. 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 [29].

La contribution des récepteurs P2X7 à la réponse inflammatoire est multiple et les interactions avec les microparticules 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]. 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 [31].

Enfin, les microparticules 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 [32].

Effets des microparticules sur l'homéostasie vasculaire

Les microparticules, en tant que bio-effecteurs, pourraient intervenir dans la genèse de la dysfonction cardiocirculatoire 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 I...); elles constituent un marqueur d'activation, voire d'apoptose, mais aussi de dysfonction endothéliale [33,34]. 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 [35–37] et parfois sur les cellules musculaires lisses [37,38] 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 [39]. Au cours de la prééclampsie, les concentrations circulantes des microparticules lymphocytaires et granulocytaires sont augmentées [9]. Ces dernières sont capables d'induire une hyporéactivité vasculaire chez les souris gestantes, via une augmentation de l'expression de la NO synthétase inducible (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) [40,41]. 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 [35], par diminution et/ou inhibition de la NO synthétase endothéliale (eNOS) [36,42].

Certaines microparticules pourraient également promouvoir l'importante vasoplégie observée au cours du sepsis [13,43]. 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 [44]. Plus récemment, il a été montré que des microparticules d'origine lymphocytaire étaient capables d'induire une hyperactivité vasculaire en induisant la synthèse, dans la média, de la iNOS et de la COX-2 [37].

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 [45,46]. 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 [47]. 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 thromboxano-A₂, métabolite vasoconstricteur dérivé de l'acide arachidonique et puissant vasoconstricteur, et peuvent ainsi participer à la régulation du tonus vasculaire [38].

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 [48]. En outre, les polyphosphates bactériens favoriseraient une activation de la phase « contact » de la coagulation et une inhi-

bition 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 [49].

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 [50]. 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 [51,52]. Dans la coagulopathie du choc septique, le FT 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 [53]. Il a été montré que les microparticules monocytaires participent à la dissémination d'un potentiel procoagulant en exprimant le FT à leur surface [10,43,54,55]. La génération de thrombine est possible à la surface des microparticules porteuses du FT 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 FT 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 [10,52]. 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 [32].

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 [56,57]. 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 [58]. On peut noter également que les microparticules endothéliales circulantes contribuent à la formation de larges agrégats plaquettaire dans certaines atteintes cardiovasculaires [59]. Enfin les microparticules, qu'elles soient endothéliales ou leucocytaires, participeraient au couplage entre inflammation et thrombose [60,61].

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 [62]. 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 [21]. Bien que les microparticules monocytaires induites par le LPS soient globalement procoagulantes en raison du FT qui prédomine sur l'activité de la thrombomoduline [22], 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 [50]. 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 [63,64].

Les microparticules, marqueur pronostique ?

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, athéromatose, 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 [65]. De même, chez le patient insuffisant rénal chronique au stade terminal, le taux de microparticules endothéliales est corrélé au risque de survenue d'événement cardiovasculaire sévère [66]. Elles permettraient également d'évaluer le risque cardiovasculaire chez les insuffisants cardiaques chroniques [67] et les insuffisants coronariens [68], ou encore le risque d'accident vasculaire ischémique chez les patients présentant des facteurs de risque cardiovasculaire [69].

Au cours des maladies infectieuses, les cytokines et chimiokines 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 [50]. 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 [70]. La concentration circulante de microparticules totales n'est pas toujours modifiée en situation pathologique, mais l'augmentation d'un type particulier de microparticules 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 plaquettaire porteuses de protéines d'adhésion (GPIIIa, P-sélectine) ou procoagulantes (FT) [71,72]. De même, un traitement par glitazone, un ligand de PPAR- γ , dans le syndrome métabolique, diminue le taux de microparticules endothéliales [73]. 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) [74]. De nombreux essais cliniques sont actuellement en cours, afin

d'évaluer les microparticules comme biomarqueur de l'efficacité de différents traitements [75].

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 [56]. 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 les facteurs de la coagulation Va et VIIIa et le TFPI (*Tissue Factor Pathway Inhibitor*) [76–79], sans avoir apporté la preuve de son bénéfice sur la mortalité des patients en choc septique [80].

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 [81]. 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 [82,83].

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 [19]. 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 [84].

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.

Conflit d'intérêt : les auteurs déclarent ne pas avoir de conflit d'intérêt.

Références

- Parrillo JE (1993) Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N Engl J Med* 328:1471–7
- Wolf P (1967) The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol* 13:269–88
- 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
- Tushuizen ME, Diamant M, Sturk A, Nieuwland R (2011) Cell-derived microparticles in the pathogenesis of cardiovascular disease: friend or foe? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31:4–9
- Meziani F (2008) Microparticles are vectors of paradoxical information in vascular cells including the endothelium: role in health and diseases. *Pharmacol Rep* 60:75–84
- Berckmans RJ, Nieuwland R, Boing AN, et al (2001) Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb Haemost* 85:639–46
- Flaumenhaft R, Dilks JR, Richardson J, et al (2009) Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles. *Blood* 113:1112–21
- 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
- VanWijk MJ, Nieuwland R, Boer K, et al (2002) Microparticle subpopulations are increased in preeclampsia: possible involvement in vascular dysfunction? *Am J Obstet Gynecol* 187:450–6
- Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, et al (2000) Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood* 95:930–5
- Sabatier F, Damon P, Hugel B, et al (2002) Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes* 51:2840–5
- Leroyer AS, Tedgui A, Boulanger CM (2008) Role of microparticles in atherothrombosis. *J Intern Med* 263:528–37
- 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
- Freyssinet JM (2003) Cellular microparticles: what are they bad or good for? *J Thromb Haemost* 1:1655–62
- Zwaal RF, Schroit AJ (1997) Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* 89:1121–32

16. Baj-Krzyworzeka M, Majka M, Pratico D, et al (2002) Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. *Exp Hematol* 30:450–9
17. Rauch U, Bondeman D, Bohmann B, et al (2000) Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by CD15 and tissue factor. *Blood* 96:170–5
18. Scholz T, Temmler U, Krause S, et al (2002) Transfer of tissue factor from platelets to monocytes: role of platelet-derived microvesicles and CD62P. *Thromb Haemost* 88:1033–8
19. Mause SF, Weber C (2010) Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ Res* 107:1047–57
20. Morel O, Ohlmann P, Epailly E, et al (2008) Endothelial cell activation contributes to the release of procoagulant microparticles during acute cardiac allograft rejection. *J Heart Lung Transplant* 27:38–45
21. 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
22. Thery C, Zitvogel L, Amigorena S (2002) Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2:569–79
23. Morel O, Jesel L, Freyssinet JM, Toti F (2011) Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31:15–26
24. Guha M, Mackman N (2001) LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal* 13:85–94
25. 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
26. Dubyak GR (2012) P2X7 receptor regulation of non-classical secretion from immune effector cells. *Cd1 Microbiol* 14:1697–706
27. Chiao CW, Tostes RC, Webb RC (2008) P2X7 receptor activation amplifies lipopolysaccharide-induced vascular hyporeactivity via interleukin-1 beta release. *J Pharmacol Exp Ther* 326:864–70
28. MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, et al (2001) Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity* 15:825–35
29. Wang J-G, Williams JC, Davis BK, et al (2011) Monocytic microparticles activate endothelial cells in an IL-1 β -dependent manner. *Blood* 118:2366–74
30. Qu Y, Dubyak GR (2009) P2X7 receptors regulate multiple types of membrane trafficking responses and non-classical secretion pathways. *Purinergic Signal* 5:163–73
31. Brown GT, McIntyre TM (2011) Lipopolysaccharide signaling without a nucleus: kinase cascades stimulate platelet shedding of proinflammatory IL-1 β -rich microparticles. *J Immunol* 186:5489–96
32. Furlan-Freguia C, Marchese P, Gruber A, et al (2011) P2X7 receptor signaling contributes to tissue factor-dependent thrombosis in mice. *J Clin Invest* 121:2932–44
33. Chironi GN, Simon A, Boulanger CM, et al (2010) Circulating microparticles may influence early carotid artery remodeling. *J Hypertens* 28:789–96
34. Densmore JC, Signorino PR, Ou J, et al (2006) Endothelium-derived microparticles induce endothelial dysfunction and acute lung injury. *Shock* 26:464–71
35. Boulanger CM, Scoazec A, Ebrahimi T, et al (2001) Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. *Circulation* 104:2649–52
36. 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
37. 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
38. Pfister SL (2004) Role of platelet microparticles in the production of thromboxane by rabbit pulmonary artery. *Hypertension* 43:428–33
39. 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
40. Meziani F, Tesse A, David E, et al (2006) Shed membrane particles from preeclamptic women generate vascular wall inflammation and blunt vascular contractility. *Am J Pathol* 169:1473–83
41. 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:H520–5
42. Amabile N, Guerin AP, Lenoir 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
43. Morel N, Morel O, Delabranche X, et al (2006) [Microparticles during sepsis and trauma. A link between inflammation and thrombotic processes]. *Ann Fr Anesth Reanim* 25:955–66
44. 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
45. 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
46. 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
47. Janiszewski M, Do Carmo AO, Pedro MA, et al (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
48. Arnane D, Bellissant E, Cavillon JM (2005) Septic shock. *Lancet* 365:63–78
49. Dhainaut JF, Charpentier J (2002) CIVD et défaillance d'organes : arguments expérimentaux et cliniques. *Réanimation* 11:599–607
50. Delabranche X, Berger A, Boisramé-Helms J, Meziani F (2012) Microparticles and infectious diseases. *Med Mal Infect* 42:335–43
51. 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
52. Morel O (2005) Les MP circulantes : rôles physiologiques dans les maladies inflammatoires et thrombotiques. *Rev Med Interne* 2:791–801
53. Lane DA, Philippou H, Huntington JA (2005) Directing thrombin. *Blood* 106:2605–12
54. Geisbert TW, Young HA, Jahrling PB, et al (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
55. 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
56. Perez-Casal M, Downey C, Fukudome K, et al (2005) Activated protein C induces the release of microparticle-associated endothelial protein C receptor. *Blood* 105:1515–22
57. Meziani F, Delabranche X, Mortaza S, Asfar P (2008) Les microparticules circulantes : un nouvel acteur dans le sepsis ? *Réanimation* 17:120–5

58. van der Meijden PEJ, van Schilfgaarde M, van Oerle R, et al (2012) Platelet- and erythrocyte-derived microparticles trigger thrombin generation via factor XIIa. *J Thromb Haemost* 10:1355–12
59. 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
60. Leroyer A (2010) Endothelial-derived microparticles: Biological conveyers at the crossroad of inflammation thrombosis and angiogenesis. *Thromb Haemost* 104:456–63
61. Distler JHW, Huber LC, Gay S, et al (2006) Microparticles as mediators of cellular cross-talk in inflammatory disease. *Autoimmunity* 39:683–90
62. Dejouvencel T, Dœuvre L, Lacroix R, et al (2010) Fibrinolytic cross-talk: a new mechanism for plasmin formation. *Blood* 115:2048–56
63. Dalli J, Rosignoli G, Hayhoe RPG, et al (2010) CFTR Inhibition Provokes an Inflammatory Response Associated with an Imbalance of the Annexin A1 Pathway. *The American Journal of Pathology* 177:176–86
64. Morel O, Toti F, Morel N, Freyssinet JM (2009) Microparticles in endothelial cell and vascular homeostasis: are they really noxious? *Haematologica* 94:313–7
65. 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
66. Amabile N, Guérin AP, Tedgui A, et al (2012) Predictive value of circulating endothelial microparticles for cardiovascular mortality in end-stage renal failure: a pilot study. *Nephrol Dial Transplant* 27:1873–80
67. Nozaki T, Sugiyama S, Koga H, et al (2009) Significance of a multiple biomarkers strategy including endothelial dysfunction to improve risk stratification for cardiovascular events in patients at high risk for coronary heart disease. *J Am Coll Cardiol* 54:601–8
68. Sirming J-M, Losch J, Walenta K, et al (2011) Circulating CD31 +/-Annexin V+ microparticles correlate with cardiovascular outcomes. *Eur Heart J* 32:2034–41
69. Jung K-H, Chu K, Lee S-T, et al (2009) Circulating endothelial microparticles as a marker of cerebrovascular disease. *Ann Neurol* 66:191–9
70. 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
71. Sommeijer DW, Joop K, Leyte A, et al (2005) Pravastatin reduces fibrinogen receptor gpIIb on platelet-derived microparticles in patients with type 2 diabetes. *J Thromb Haemost* 3:1168–71
72. Mobarez F, He S, Brøgersen A, et al (2011) Atorvastatin reduces thrombin generation and expression of tissue factor, P-selectin and GPIIb on platelet-derived microparticles in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Thromb Haemost* 106:344–52
73. Esposito K, Ciotola M, Giugliano D (2006) Pioglitazone reduces endothelial microparticles in the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:1926
74. Bardelli C, Amoruso A, Federici Canova D, et al (2012) Auto-crine activation of human monocyte/macrophages by monocyte-derived microparticles and modulation by PPAR γ ligands. *Br J Pharmacol* 165:716–28
75. Martínez MC, Tual-Chalot S, Leonetti D, Andriantsitohaina R (2011) Microparticles: targets and tools in cardiovascular disease. *Trends Pharmacol Sci* 32:659–65
76. Semoun N, Baron-Menguy C, Burban M, et al (2009) 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:H277–82
77. Sennoun N, Levy B (2010) Effets hémodynamiques de la protéine C activée dans le choc septique. *Réanimation* 19:142–5
78. Sennoun N, Meziani F, Dessebe O, et al (2009) Activated protein C improves lipopolysaccharide-induced cardiovascular dysfunction by decreasing tissular inflammation and oxidative stress. *Crit Care Med* 37:246–55
79. 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
80. Mosnier LO, Zlokovic BV, Griffin JH (2007) The cytoprotective protein C pathway. *Blood* 109:3161–72
81. Rautou PE, Mackman N (2012) Deletion of microvesicles from the circulation. *Circulation* 125:1601–4
82. Martínez MC, Andriantsitohaina R (2011) Microparticles in angiogenesis: therapeutic potential. *Circ Res* 109:110–9
83. Martínez MC, Larbret F, Zobairi F, et al (2006) Transfer of differentiation signal by membrane microvesicles harboring hedgehog morphogens. *Blood* 108:3012–20
84. Zernecke A, Bidzhikov K, Noels H, et al (2009) Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal* 2:ra81

Annexe 3

Endothelial Dysfunction in Sepsis

Julie Boisramé-Helms^{1,2}, Hélène Kremer^{2,3}, Valérie Schini-Kerth² and Ferhat Meziani^{*1,2}

¹Service de réanimation médicale, Nouvel Hôpital Civil. Hôpitaux Universitaires de Strasbourg. 1, place de l'hôpital, 67031 Strasbourg, France; ²Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, UMR 7213 CNRS, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie. 74, route du Rhin, 67401 Illkirch, France; ³Service de cardiologie, Nouvel Hôpital Civil. Hôpitaux Universitaires de Strasbourg. 1, place de l'hôpital, 67031 Strasbourg, France

Abstract: The endothelium takes part in the regulation of numerous physiological functions and lies at the interface of circulating blood and the vessel wall. Under physiological conditions, it is responsible for anticoagulant and anti-adhesive properties, and it regulates vasomotor tone and vascular homeostasis. Endothelial dysfunction has been associated with many pathophysiological processes, such as inflammation and oxidative and nitrosative stresses. Endothelial cells are precociously exposed to circulating signaling molecules and physical stresses, like in sepsis and septic shock. Septic shock is associated with hypotension and frequently with disseminated intravascular coagulation contributing to multiple organ failure and a high mortality rate. Impairment of endothelial function leads to phenotypic and physical changes of the endothelium, with deregulated release of potent vasodilators nitric oxide and prostacyclin, reduction of vascular reactivity to vasoconstrictors, associated with leukocytes' and platelets' aggregation, and increase in inducible nitric oxide synthase expression that can exert a negative feedback on endothelial nitric oxide synthase expression, with subsequent deregulation of nitric oxide signaling.

Endothelial dysfunction therefore plays a major role in the pathophysiology of septic shock and organ dysfunction, and has been suggested to be a predictor of mortality in sepsis. Thus, early detection of endothelial dysfunction could be of great interest to adapt treatment in initial stage of sepsis. Current therapeutics used in sepsis mostly aim at controlling inflammation, vascular function and coagulation. Fluid administration, vasopressors, vasodilators and recombinant human activated protein C are also part of the treatments with the ultimate goal to exert beneficial effects on organ function and survival.

Keywords: Endothelial dysfunction, inflammation, oxidative stress, sepsis.

INTRODUCTION

The endothelium could be considered as a key organ which can regulate numerous physiological processes and whose dysfunction plays a major role in the development of many diseases, like sepsis. This review will focus on the physiological role of the endothelium, followed by the endothelial activation and dysfunction in the pathophysiology of sepsis, and finally provide an overview of the different therapeutics that might contribute to restore a protective effect of the endothelium with subsequent improvement of survival.

1. ENDOTHELIUM STRUCTURE AND FUNCTION

The endothelium is composed of a monolayer of cells lining arterial and venous blood vessels and lymphatics, with an estimated total mass of about 1.5 kg and an approximate covering area of four tennis courts. Endothelial cells lie at the interface of circulating blood and the vessel wall, which is composed of several layers of vascular smooth muscle cells and the adventitia. Therefore, endothelial cells play a

'gate-keeping role' and take part in numerous important physiological functions [1]. Finally, the endothelium is characterized by an important heterogeneity in structure and function, which notably depends on the vascular bed considered.

1. Structure and Function of Endothelial Cells Vary According to Vascular Beds

Endothelial cells phenotype and functions may differ and adapt to the vessels type, the organ considered, the nature of underlying tissue's demands and the stresses the vessels will be exposed to. The vascular tree is indeed made up of different types of vessels, namely large arteries, arterioles, capillaries, venules and larger veins. The arterial system is subdivided in "conductance arteries", which are made of elastic and large vessels, and "resistance arteries" which are small or intermediate vessels, with a larger muscular component in the media, allowing them to regulate and preserve blood pressure in physiological and pathological situations. Finally, many exchanges take place in capillaries.

2. Role in the Regulation of Vascular Tone

The endothelium regulates blood pressure and blood flow by modulating the arterioles tone, *via* numerous physical and chemical factors originating from the vascular lumen and

*Address correspondence to this author at the Service de Réanimation Médicale - Nouvel Hôpital Civil, 1, place de l'Hôpital, F-67091 STRASBOURG cedex, France; Tel: +33 (0) 369 550 434; Fax: +33 (0) 369 551 859; E-mail: ferhat.meziani@chru-strasbourg.fr

surrounding tissues. Thus, it has been demonstrated that *in vitro* dilatation response of isolated arteries to acetylcholine is abolished when endothelial cells are removed or impaired [2]. Indeed, endothelial cells are able to secrete and/or release several vasoactive components, in response to various mechanical and chemical stimuli: shear stress, substances released from autonomic and sensory nerves (e.g. acetylcholine, norepinephrine, adenosine triphosphate ATP, substance P), circulating hormones (e.g. adiponectin, vasopressin, catecholamines, insulin, angiotensin II), coagulation- and platelets-derived products (serotonin, adenosine diphosphate ADP, thrombin), and autacoids produced by endothelial and vascular smooth muscle cells themselves (bradykinin, ADP/ATP/UTP, angiotensins, endothelin). Endothelial cells can thus release vasodilator substances like nitric oxide (NO[•]), endothelium derived hyperpolarizing factor (EDHF), and prostacyclin (PGI₂), but are also able to secrete vasoconstrictors like prostanoids, for example thromboxane A₂, reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS), endothelin, angiotensin II, serotonin and histamine [3].

The endothelium-dependent control of vascular tone is the result of the activation, interaction and balance between several cellular pathways. The first one is the NO[•] pathway. NO[•] is a gaseous transmitter, constitutively produced by the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) from L-arginine and which rapidly diffuses across membranes into the bloodstream and in the vascular smooth muscle cells. It activates soluble guanylyl cyclase (sGC), which in turn catalyzes the formation of cyclic guanosine monophosphate (cGMP), finally leading to the relaxation of the vascular smooth muscle. Moreover, NO[•] assumes a major role in preserving a normal endothelial function, especially in "conductance" vessels like the aorta. Endothelium-derived relaxation and/or production of endothelium-derived NO[•] by the eNOS can be used as an indicator of endothelial cell function. The NO[•] pathway can be activated in response to chemical factors' binding to their endothelial specific receptors, which requires an elevation of intracellular free calcium concentration, formation of a complex with calmodulin and the removal of the inhibitory caveolin from eNOS, leading to its activation. It can also be activated in response to mechanical factors, like shear stress which activates eNOS via a calcium-independent phosphorylation of eNOS on the serine residue 1177; eNOS phosphorylation is mediated by phosphorylation and activation of protein kinase Akt, which is itself phosphorylated by phosphatidylinositol-3-kinase (PI₃K). This mechanism plays a major role in the regulation of eNOS in physiological and pathological conditions. There are two other forms of NOS, neuronal NOS (nNOS) and inducible NOS (iNOS), the latter one being mainly activated by pro-inflammatory cytokines. Finally, NO[•] also inhibits the activation and adherence of platelets to the endothelium [4].

EDHF pathway is another important signaling pathway, which has an important role in "resistance" arteries. In response to various stimuli, EDHF induces an endothelial hyperpolarization secondary to small and intermediate calcium-induced activated potassium channel activation [5]. The transmission of endothelial hyperpolarization to vascular smooth muscle cells could either involve potassium ions efflux, activating smooth muscle potassium channels and/or sodium/potassium-ATPase, or an electrical coupling between

endothelial and smooth muscle cells through myo-endothelial gap junctions. Hyperpolarization prevents voltage-dependent calcium channel activation, resulting in a decrease in intracellular calcium concentration and relaxation of vascular smooth muscle cells.

Arachidonic acid-derived products can also take part in the regulation of vascular tone by endothelial cells. The metabolism of arachidonic acid by cyclo-oxygenase (COX) results in the release of several vasoactive factors, like prostacyclin or PGI₂ which is a powerful vasodilator. PGI₂ binds to vascular smooth muscle receptors to stimulate the formation of cyclic AMP by adenylyl cyclase, with the subsequent activation of protein kinase A leading ultimately to smooth muscle cells relaxation [6]. Vasoconstrictive prostanoids may also derive from arachidonic acid metabolism [7] and are able to decrease endothelium-dependent relaxation induced by acetylcholine in normal arteries [8, 9]. Under physiological conditions, the effects induced by low levels of vasoconstrictive prostanoids are attenuated by the influence of prostacyclin, NO[•] and EDHF.

In response to chemical agonists binding to their respective endothelial receptors or to shear stress, endothelial cells are also able to generate ROS such as superoxide anion (O₂^{-•}) and hydrogen peroxide (H₂O₂). Small and transient amounts of O₂^{-•} can be beneficial for the endothelial function, through activation of eNOS via Src/PI₃-kinase/Akt pathway [10]. However, high levels of ROS/RNS generated in pathological situations may lead to vasoconstriction, since O₂^{-•} binds to NO[•] to form peroxynitrite (ONOO⁻), resulting in a reduced bioavailability of NO[•].

In addition, in response to various stimuli, endothelial cells are also able to synthesize prohormones, such as big endothelin, and endothelin-converting enzymes to produce endothelin-1, as reported in pulmonary vasculature [11]. At their luminal surface, endothelial cells also express angiotensin conversion enzyme which can transform angiotensin 1 into angiotensin 2 [12]. These two vasoactive peptides promote vasoconstriction and smooth muscle cells proliferation, thus participating to endothelial dysfunction in various diseases. Endothelial function is not only characterized by a tightly regulated vasomotor tone, but also by semi-permeable properties.

3. Endothelial Permeability

The endothelium is semi-permeable, but the degree of permeability differs according to the organ, vessel type and situation (physiological or not) considered. The junctional composition of intercellular space indeed varies across the vascular tree. "Conductance" arteries have, for example, numerous tight junctions compared to capillaries, in which physiological regulated transfer of fluids and small molecules occurs via a para-cellular way. Traffic via a trans-cellular way is also possible thanks to trans-endothelial channels or transcytosis mediated by caveolae and vesiculo-vacuolar organelles, and is used more for macromolecules traffic [13].

4. Anti-/Pro-thrombotic Properties

The endothelium constitutes an antithrombotic surface preventing inappropriate coagulation activation and inhibiting platelets' activation [14]. Endothelial cells have to pre-

serve adequate blood viscosity and promote a clot formation when vascular wall is injured. The endothelial cells luminal surface is called glycocalyx and is made of proteoglycans, including plasminogen and sulfate glycoaminoglycans [15]; it plays a major barrier role, takes part in normal vessel wall homeostasis [16-18] and provides an anticoagulant layer, thanks to negative electrical charges that repel circulating platelets and to an interaction with vitamin K-dependent coagulation factors.

The endothelium contributes to the haemostatic balance by expressing numerous pro- and anti-coagulant proteins. Tissue factor pathway inhibitor (TFPI), heparin (an antithrombin III cofactor), thrombomodulin (which activates protein C), endothelial protein C receptor (EPCR), tissular plasminogen activator (t-PA) and ecto-ADPase are amongst the anti-coagulant/anti-aggregant factors the endothelium expresses [13]. Beside vasodilative properties, prostacyclin and NO[•] also have an anti-aggregant action. Moreover, endothelial cells can contribute to the capture and degradation of thrombogenic substances like ADP and 5-hydroxytryptophan [19]. Finally, the endothelium produces numerous factors which contribute to its pro-coagulant/pro-aggregant properties, such as tissue factor (TF), plasminogen activator inhibitor (PAI)-1, von Willebrand factor (vWF) and protease activated receptors (PAR) [13, 20].

5. Adhesion Properties

Endothelial cells express adhesion molecules that can be regulated by mechanical or biochemical stimulations and are responsible for intercellular interactions and adhesions. These processes involve three super-families of adhesion molecules, namely integrins, selectins and immunoglobulin superfamily (intercellular molecule adhesion ICAM-1 and -2 and vascular cell adhesion molecule VCAM-1). The adhesion between leukocytes and endothelium, the "rolling" phenomenon and transmigration of these leukocytes in the underlying tissue, which occurs during inflammatory process, is triggered by selectins. E-selectin is highly specifically expressed in endothelial cells after cytokines activation, whereas L-selectin is expressed in leukocytes and P-selectin is stored and released by Weibel-Palade bodies after endothelial cells' activation or expressed in megakaryocytes. ICAM-1, ICAM-2 and VCAM-1 are expressed in endothelial cells, in response to inflammatory conditions.

Adhesion between endothelial cells and others blood cells is also possible: for example, in response to a stimulus, the endothelial Willebrand factor interacts with the GP Ib-IX and GP IIb-IIIa localized on platelet surface, inducing platelets adhesion and aggregation. Finally, endothelial cells can interact with bacterial components, like lipopolysaccharide (LPS), or cytokines, leading to activation of intracellular inflammation pathways. All these phenomena contribute to the body defense against pathogen agents: endothelial cells recruit leukocytes, allow their migration to infected sites, release inflammatory mediators and promote local coagulation phenomena to prevent hematogenous spread of the infection [21].

II. ENDOTHELIAL DYSFUNCTION

Endothelial dysfunction occurs when the equilibrium described previously is altered. In many diseases, this dys-

function is characterized at varying degrees by procoagulant, proadhesive and vasoconstrictive effects [22]. The vascular tone is deregulated when vasodilators production decreases and/or vasoconstrictors production increases. It can also be the consequence of a decreasing/increasing sensibility of vascular smooth muscle cells to vasodilators/vasoconstrictors respectively. Once again, there are some differences according to vascular bed. For example, endothelial dysfunction is essentially dependent on NO[•] pathway in "conductance" arteries, whereas in "resistance" arteries, EDHF takes a particular importance, especially in small vessels. Activation of angiotensin renin system or/and endothelin-1 system in systemic and pulmonary hypertension induces media proliferation, vasoconstriction and ROS/RNS productions leading to endothelial dysfunction [23].

ROS and RNS play a major role in the generation of endothelial dysfunction, through cells, DNA and proteins damages and through the deleterious effects of O₂^{•-} and ONOO[•]. They indeed have vasoconstrictive effects, by potentiating other endothelium-dependent contraction factors, such as prostanoids, or by reducing NO[•] bioavailability, due to O₂^{•-} binding [24].

Endothelial permeability increases during inflammation, inducing fluid or small molecules to transfer toward underlying tissue. Equilibrium between adhesion molecules can be deregulated, leading to interaction between endothelial cells and leukocytes and therefore to leukocytes extravasation. In endothelial dysfunction, imbalance between pro- and anti-coagulant factors is frequently responsible for the arterial thrombi or microthrombi we observe in cardiovascular diseases such as diabetes, atherosclerosis or chronic kidney diseases.

In the different pathologies in which endothelial dysfunction takes part, several mechanisms leading to endothelial dysfunction are common, while others are more specific and depend on the pathology considered. Study and detection of endothelial dysfunction are important as it is involved in the early stage of most diseases and often represents a pejorative prognostic factor. Moreover, it sometimes could be used as a therapeutic target. For example, angiotensin-converting inhibitors, used in hypertension, improve endothelial function by decreasing amounts of the vasoconstrictor angiotensin II and essentially by increasing amounts of the vasodilator bradykinin [23].

III. ENDOTHELIAL DYSFUNCTION DURING SEPSIS

Sepsis results from systemic inflammatory response of organism to severe infection. It is defined by two or more of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) criteria (changes in body temperature, tachycardia, tachypnea and/or hypocapnia, and changes in the number of white blood cells and/or immaturity of white blood cells) [25]. Sepsis and its complications represent a continuum in clinical and pathophysiological severity. Severe sepsis is thus associated with organ dysfunction, hypoperfusion or hypotension and septic shock is associated with hypotension despite adequate fluid resuscitation [26]. Septic shock is one of the major causes of death in the non-coronary intensive care units and is responsible for about 150000 deaths in Europe and 200000 in United States of America [27, 28].

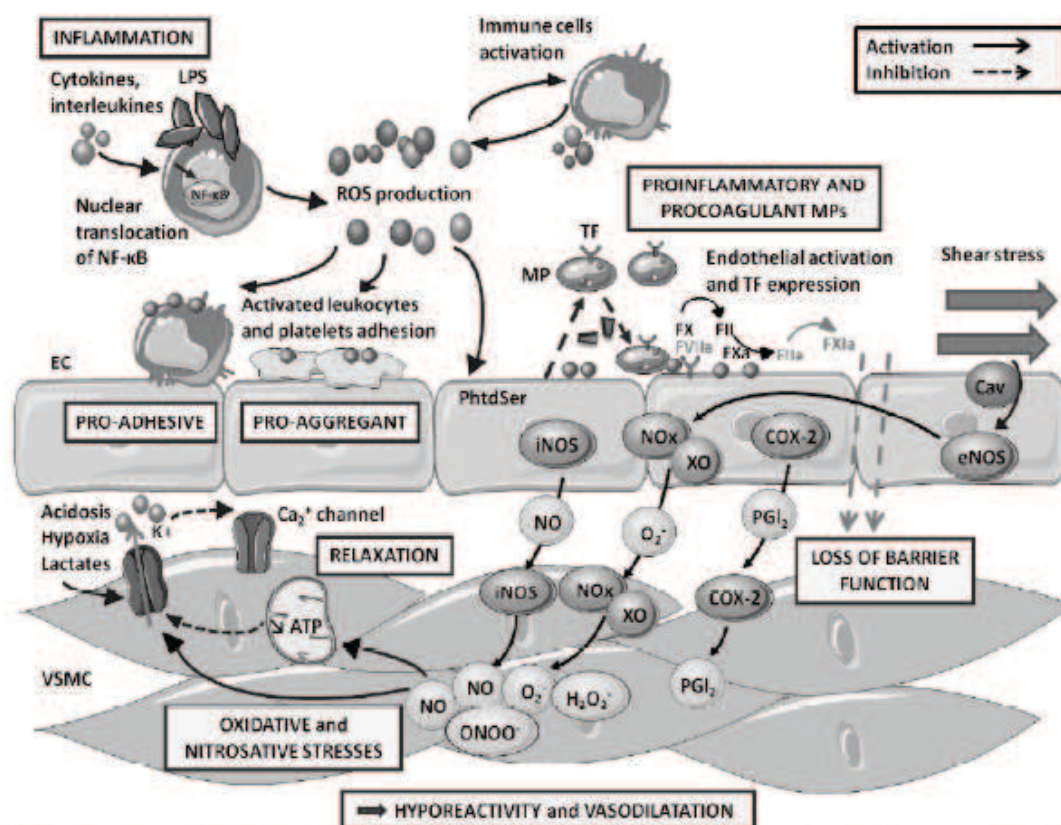


Fig. (1). Mechanisms of vascular dysfunction in sepsis. When invading an organism, pathogen agents activate numerous inter and intra cellular signaling pathways, notably leading to systemic inflammation and major oxidative and nitrosative stresses. The endothelium subsequently undergoes multiple phenotypic and functional changes, responsible for an endothelial dysfunction: the endothelium becomes pro-adhesive and pro-aggregant, supports the generation of proinflammatory and procoagulant microparticles, barrier function is lost and vascular tone is deregulated, which leads to vascular hyporeactivity and vasodilatation. ATP adenosine triphosphate, Ca²⁺ calcium, Cav caveolin-1, COX-2 cyclooxygenase-2, EC endothelial cell, eNOS endothelial nitric oxide synthase, factor VII, FII factor II, FIIa activated factor II, FVIIa activated, FX factor X, FXa activated factor X, H₂O₂ hydrogen peroxide, iNOS inducible nitric oxide synthase, K⁺ potassium, LPS lipopolysaccharide, MP microparticle, NF-κB nuclear factor kappa B, NO nitric oxide, NOx nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase, O₂⁻ superoxide anions, ONOO⁻ peroxynitrite, PGI-2 prostacyclin, ROS reactive oxygen species, TF tissular factor, VSMC vascular smooth muscle cell, XO xanthine oxidase.

Death of patients is usually due to circulatory failure resistant to catecholamines, along with multiple organ dysfunction (cardiac, renal and hepatic) [29]. Pathophysiology of sepsis and organ dysfunction is not yet totally understood, but includes intense cellular activation with an overproduction of inflammatory mediators, coagulation and perfusion abnormalities and direct injuries due to infectious agents. This leads to SIRS, with subsequent multiple organ dysfunctions including, disseminated intravascular coagulation (DIC), microvascular leakage, and vascular and endothelial dysfunction [30].

1. The Inflammatory Endothelium

The endothelium is one of the first targets of the inflammatory response during sepsis and is precociously exposed to a "cytokines storm" [31]. Endothelial activation can thus be defined as an up-regulation of adhesion molecules by proinflammatory cytokines [32]. Cells undergo multiple injuries like cell swelling, vacuolization, and denudation, that may for example be mediated by LPS, known to be a critical

mediator of endotoxemia [33]. Secondary to this activation, leukocytes are recruited by chemokines and adhesion molecules and extravasate into surrounding tissue; they are responsible for the production of ROS and RNS, proteases and cytotoxic enzymes [32]. Sepsis is indeed also associated with intense oxidative and nitrosative stresses, due to an excessive ROS and RNS release and a decrease in endogenous antioxidant defenses, leading to cellular and particularly endothelial and vascular smooth cells injuries [34, 35]. Inflammatory stimuli and oxidative/nitrosative stresses account for phenotypic changes on endothelium [36]. Indeed, inflammation favors molecular adhesion, leukocytes activation and *in situ* thrombosis. Altered vasomotor tone, leukocytes and platelets adhesions, increase of capillary permeability and activation of the clotting cascade with fibrin deposition lead to a procoagulant state and a heterogeneous capillary perfusion with reduced capacity for tissue oxygen extraction [37]. Endotoxemia disrupts endothelial intercellular signaling, because of a poor distribution of blood flow [38]. Endothelial cells adapt to these changes in an appropriate way (endothelial

activation) or not (endothelial dysfunction). The endothelium becomes pro-adhesive, as NO[•] doesn't anymore inhibit platelets' adhesion and the expression of adhesion molecules receptors involved in platelets' and leukocytes' adhesion; it moreover becomes procoagulant because of increased expression of TF and decreased expression of thrombomodulin and activated protein C.

Mechanical forces are also profoundly modified during distributive shocks like septic shock, characterized by a major hypovolemia, due to fluid capillary leakage and endothelial dysfunction, and an intense vasoplegia. Blood flow is redistributed to the organs, while peripheral tissues undergo intense vasoconstriction, thus modifying shear stress. In a mesenteric artery ligation model in mice, Bakker *et al.* [39] showed that inflammatory response may initiate shear stress-induced arterial remodeling. After arterial ligation, the authors indeed showed fast changes in vascular tone, leading to an inflammatory response, with macrophages recruitment and increase in pro-inflammatory cytokines, and finally to arterial remodeling. They therefore suggest that inflammatory cytokines may up-regulate the expression of metalloproteinases (MMP), which can degrade matrix proteins and intercellular connections, thus taking part in vascular remodeling.

Altered endothelial properties may be involved in microcirculatory failure and more generally in organ failure [30]. Microcirculatory dysfunction is known to be a critical element of the pathogenesis of severe sepsis and septic shock [37]. One of the consequences of the activation/dysfunction of endothelial cells during sepsis phenomenon is a complex disturbance of the microcirculatory homeostasis. Without treatment, this disruption can lead to impaired oxygen transport resulting in cellular hypoxia, organ dysfunction and death [26]. Endothelial cells are impaired, with subsequent increased permeability and apoptosis [40]. The endothelium thus inhibits vasodilatation, becomes prothrombotic and antifibrinolytic and promotes platelets and leukocytes adhesion, leading to an inhomogeneous blood flow and tissue hypoxia [41]. In a septic shock model of peritonitis by cecal ligation and puncture in rats, Lam *et al.* [42] used intravital videomicroscopy and showed that sepsis altered microvascular perfusion, with increased microcirculation flow heterogeneity and reduced functional capillary density. These microcirculatory disorders may appear without any hemodynamic global effect (absence of hypotension) [43] or can be responsible for an inadequate oxygen transport and thus tissue hypoxia [44], which can persist despite achievement of normal global oxygen delivery [36]. Therefore, microcirculation's dysfunction may appear as a major mechanism in the development of multiple organ failure [45]. Arterial hypotension and the important hypovolemia during septic shock may both be explained by microcirculatory dysfunction. Hypotension may be due to an impairment of arteriolar response to vasoactive agents and hypovolemia to endothelial injuries and capillary leakage.

Endothelial cells are able to adapt very quickly to environmental stimuli, which can be either chemical (e.g. pro-inflammatory like TNF- α or IL-1, LPS) or physical (e.g. shear stress or hypoxia). The nuclear factor kappa B (NF- κ B) (p65/p50) plays a major role in the inflammatory stimulation of endothelium; it can be activated *via* a classical pathway-

and released after phosphorylation, ubiquitination and degradation of I κ B α . RelA(p65)-p50 dimers are subsequently released, translocated into nucleus, and activate genes transcription of adhesion molecules, COX-2, TF, plasminogen activator inhibitor-1. In an alternative activation pathway (non-canonical pathway), NF- κ B is activated after proteolysis of p100 protein, an inhibitor of RelB. Finally, in endothelial cells, NF- κ B can also be activated *via* pathogens domain recognition receptors of the innate system, namely toll-like receptors 2 and 4 (TLR-2 and TLR-4), both of which are increased under inflammatory conditions [46]. Moreover, pro-inflammatory cytokines are responsible for the synthesis of numerous protein-G related factors (COX, phospholipase A2, 5-lipoxygenase and acetyltransferase), which promote inflammation *via* secretion of prostaglandins, leucotrienes and platelet-activating factor [34].

Sepsis is therefore responsible for an intense cellular activation; endothelial cells will amplify the inflammatory response by releasing proinflammatory cytokines, which contribute to spreading of microcirculatory injuries [45]. In a mouse endotoxemic shock model, Meziani *et al.* [47] demonstrated that human serum albumin reduced endotoxemia-induced inflammation, by decreasing the up-regulation of I κ B α , thus blunting the activation of NF- κ B. Moreover, human serum albumin was shown to have antioxidant properties, by reducing LPS-induced oxidative and nitrosative stresses, with a subsequent beneficial effect on endothelial dysfunction: albumin indeed increased eNOS activation, enhanced Nrf-2 expression and plasma glutathione concentration, and decreased circulating and tissular O₂^{•-} production, thus preventing its interaction with NO[•] and the production of the highly toxic ONOO⁻ [48]. These observations enhance the major role of oxidative and nitrosative stresses in diseases like sepsis.

2. Role of Oxidative and Nitrosative Stresses

Oxidative or nitrosative stress is defined by an imbalance between ROS or RNS production and antioxidative defenses. It may result from a decrease in antioxidant level and/or an increase in ROS level (O₂^{•-}, H₂O₂...). RNS include NO[•], dioxide nitrogen radicals and species which are not radicals [49]. Oxidative and nitrosative stresses may have many consequences, among them the stimulation of defense mechanisms (effective or not), cellular injuries (lipids, DNA, proteins...) or even cells death (apoptosis or necrosis) [49]. In some pathological states like sepsis, oxidative and nitrosative stresses increase, partly because of hypoxia and inflammation [50]. Main sources of ROS production are the mitochondrial respiratory chain, xanthine oxidase, immune activated cells, arachidonic acid metabolism and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase [51]. LPS stimulates the assembly of the NADPH oxidase in neutrophils [52] and increases the expression of Rac2, a small protein that binds to the GTP, associated with p47phox and p67phox, two subunits necessary for the good functioning of NADPH oxidase, p91phox. The overproductions of ROS and RNS after exposure to LPS were demonstrated in various models of septic shock in macrophages and lymphocytes [51]. Neutrophils and macrophages can also produce NO[•], with subsequent formation of the potent oxidant ONOO⁻ and

HO[•], ROS and RNS are also responsible for the oxidation of DNA and proteins, lipids peroxidation, changes of structural proteins and functional changes [53]. Oxidative injuries could occur in mitochondrial membranes, resulting in a membrane depolarization, a decoupling of oxidative phosphorylation and alteration of respiratory chain. It could finally lead to mitochondrial injuries, with liberation of cytochrome c, caspases activation and apoptosis [54]. Finally, the overproduction of NO[•] by the iNOS could contribute to hypotension, myocardial depression and vascular hyporeactivity during septic shock [55].

3. Loss of Anticoagulant Properties

Inflammation leads to a systemic activation of coagulation, impaired fibrinolysis and is associated with fibrin deposition, tissue ischemia and necrosis; moreover, it is associated with an increased risk of death in critically ill patients [40]. Septic shock is indeed characterized by a procoagulant and antifibrinolytic state, leading to DIC, pathological generation of thrombin, widespread microvascular thrombosis and hemostasis factors consumption, responsible for many sites' bleeding. The more severe the sepsis becomes, the less efficient negative regulation systems become; plasma concentration of natural anticoagulants (protein C, protein S, thrombomodulin and antithrombin III) is reduced in early stages of severe infections: fibrinolysis is particularly affected and the TFPI, which limits the activation of coagulation by interacting with the X factor, is less active. The role of coagulation in sepsis is not limited to the formation of micro-thrombi. Indeed, inflammation and coagulation are tightly linked. Inflammation-induced coagulation is mediated by pro-inflammatory cytokines, such as interleukine-6 (IL-6), playing a role in the initiation of coagulation activation, tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukine-1 (IL-1), which take part in the regulation of anticoagulation under physiological conditions [56]. Moreover, factor Xa, thrombin and TF/FVII complex have proinflammatory properties. They thus stimulate endothelial production of IL-6 and IL-8 by increasing the membrane expression of molecules promoting leukocytes' adhesion, such as E-selectin, which adheres to the circulating white blood cells to facilitate cell rolling, VCAM-1, ICAM-1, which solidify cellular bonds for transmigration and monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1). In addition, protein C regulates the endothelium-mediated activation of inflammation via G-protein-coupled PARs, notably localized in the vasculature of endothelial cells and whose activation causes the production of cytokines responsible for inflammatory tissue damage [57]. The activation of coagulation is a consequence of inflammation, but also directly contributes to the pathophysiology of sepsis. Shapiro *et al.* [58] showed that these endothelial biomarkers in septic patients are correlated with sepsis severity, organ dysfunction and sepsis outcomes. This was reinforced by the findings of Furian *et al.* [59], who recently evaluated echocardiography-based indices of myocardial function and markers of vascular inflammation and endothelial dysfunction in the early phases of severe sepsis and showed ventricular systolic dysfunctions are directly associated with markers of endothelial dysfunction and a poor prognosis.

4. Generation of Procoagulant and Proinflammatory Microparticles

Cellular dysfunction in septic shock leads to the production of numerous mediators, including microparticles (MPs). MPs are submicron vesicles, released in the extracellular environment through a membrane reorganization and blebbing process following cell activation or apoptosis. They express several cell surface markers, which can vary according to MPs cellular origin and to the process leading to MPs formation; they are also able to acquire and transmit other antigens [60]. MPs are vectors of intercellular exchange of biologic information in health and in several diseases [61]. The endothelium is one of the main targets of circulating MPs [62, 63]. Thus, during sepsis, circulating MPs have procoagulant and pro-inflammatory properties and may activate inflammatory processes, cells apoptosis, leading to multiple organic failures [64].

MPs indeed play a major role in coagulation by exposing phosphatidylserine on their outer membrane: they constitute a catalytic surface for the assembly of coagulation factors and act as a support for thrombin generation. Moreover, monocytes derived MPs can express TF on their surface [60], thus initiating the coagulation cascade. At last, the release of GPIIb α -presenting MPs by activated platelets may in turn be responsible for an increased production of thrombin following platelet FXI activation by thrombin; FXIa is thus able to cleave and activate FIX with no further dependence upon the initial TF-FVIIa complex [65-67].

MPs may also display antithrombotic activities. In severe sepsis, a treatment by recombinant human activated Protein C (rhAPC) induces the generation of endothelial MPs bearing the anticoagulant EPCR [68]. The MPs generated by activated protein C may therefore be beneficial in septic shock by decreasing the inflammatory response [69, 70], but also by modulating the haemostatic response. They indeed have anticoagulant properties, by delaying the formation of thrombin and could help restore the balance between pro- and anti-thrombotic systems and thus avoid the onset of DIC [71]. In rhAPC-treated patients, Pérez-Casal *et al.* [72] recently pointed out the clinical relevance of MP-associated APC as bioactive effectors: these MPs are stable and measurable and they express anticoagulant activity, modulate anti-apoptotic gene expression and provide an endothelial barrier protective effect through APC bound to them.

Endothelial MPs could play a role in the spreading of the sepsis inflammatory responses leading to multiple organ dysfunction [73, 74]. Barry *et al.* [75] demonstrated that the arachidonic acid presented by MPs allows them to up-regulate the expression of COX-2 and intercellular adhesion molecules. They may also provoke vascular inflammation via lysophosphatidic acid and facilitate chemotactic migration of platelets or leukocytes to the endothelium, thus playing the role of a trigger for the production of cytokines (IL-1 β , IL-8 and TNF- α) [76]. The proinflammatory cytokines themselves could contribute to the production of MPs [77], thus altering the vascular function by an amplified inflammatory process. The platelet activating factor present in endothelial cells and leukocytes is also involved in the pro-inflammatory effect of MPs [78].

5. Vasomotor Tone Abnormalities

Sepsis is characterized by a vascular dysfunction, which is partly due to impairment of endothelium-dependent vasorelaxation [79-81] caused by a loss of NO[•] bioactivity in the vessel wall. Endotoxin challenge involves eNOS activity in its early phase; later, pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 or interferon-gamma, induce the synthesis iNOS, whose expression can exert a negative feedback on eNOS expression during endotoxemia [82-84]. The induction of iNOS leads to an overproduction of NO[•] and has been shown to play a major role in endotoxemia-induced vascular hyporeactivity in several experimental models [85, 86] as well as in small vessels in patients with septic shock [87]. Abnormal endothelial-dependent vascular relaxation is attributed to alteration of endothelial cell surface receptors, dysfunction of signal transduction pathways and down-regulation and/or degradation of eNOS by pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , as well as by ROS/RNS or bacterial endotoxin [88]. In a model of septic shock, Wang *et al.* [89] thus showed that inhibition of the biological activity of TNF- α protects vascular endothelial cells' function. Finally, during sepsis, numerous stimuli potentially activate endothelium ATP-dependent potassium channels, like NO[•] or ONOO⁻, hypoxia, acidosis, or hyperlactatemia. An excessive activation of potassium channels may lead to an hyperpolarization and inhibition of voltage-dependent calcium channels, with subsequent excessive cell relaxation, vasodilatation, finally leading to hypotension and vascular hyporeactivity [90]. NO[•] or ONOO⁻ can also activate large-conductance calcium-activated potassium channels, therefore taking part in vasoplegia during septic shock [91].

6. Loss of Barrier Function Properties

In sepsis, the endothelial barrier function is altered. The endothelium permeability is increased due to injured tight junctions and possibly injured endothelial glycocalyx [92], leading to fluid leakage from the intravascular space with subsequent edema, oxygen extraction deficit and tissue hypoxia [93]. Loss of the integrity of adherens junctions by deregulation of its components phosphorylation, due to inflammatory mediators, is responsible for the internalization of their major component, the vascular endothelial cadherin (VE-cadherin), and for endothelium leakage [94]. In mice models of sepsis, a protein, Slit2N, was shown to inhibit VE-cadherin endocytosis, thus preventing vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced microvascular leakage and improving mice survival [95]. Furthermore, endothelial cytoskeleton plays a role in endothelial barrier disruption: members of the Rho family of guanosine triphosphatases (GTPases) regulate actin filaments, a main structural component of the cytoskeleton. In inflammatory pathologies, such as sepsis, Ras homolog gene family member A (RhoA) is activated and disrupts actin filaments structure, thus increasing the endothelium permeability [95]. During sepsis, there is also infiltration, deposition and oxidation of LDL in subendothelial space; oxidized LDL allow the expression of adhesion molecules and chemokine receptors on endothelial cells surface, causing an infiltration of vascular wall by monocytes and T lymphocytes. Leukocytes adhesion and migration are mediated by endothelial cells, *via* a tightly regulated cascade involving adhesion molecules (P-selectin,

E-selectin, ICAM-1, VCAM-1) [50]. The pro-adhesive phenotype of activated endothelium is enhanced by changes in circulating cells activated by sepsis, including activated leukocytes, but also distorted erythrocytes and consequent increased blood viscosity, aggregation and adhesion [36].

IV. ENDOTHELIUM AS A THERAPEUTIC TARGET

Endothelial dysfunction is a predictor of mortality in sepsis. In an observational study, Duffy *et al.* [96] have indeed demonstrated that impaired endothelium-dependant vasodilatation, assessed by pulse wave analysis, is an independent predictor of mortality in critical illness. This *in vivo* bedside assessment of systemic endothelial function may improve stratification of the critically ill patients and help target new potential endothelial therapies. Early detection of microvascular dysfunction may indeed allow to identify hypoperfusion at an early stage of sepsis and adapt treatment before organ failure appears [45].

Direct biomarkers reflecting endothelial damage could be of great interest during sepsis, but are not yet validated and not commonly used in daily clinical routine [97]. As for imaging techniques, they remain mainly used for research purpose. Several methods can however be used to monitor microcirculatory function at the bedside of septic patients [98] and could therefore ascertain distributive alterations of oxygen transport in sepsis or assess the potential efficiency of treatments undertaken [43, 45]. They include near infrared spectroscopy (NIRS), which measures oxy- and deoxy-hemoglobin in tissues and sidestream dark field (SDF), which uses reflected polarized light to visualize deeper lying microcirculation noninvasively and the flow of red blood cells in the microvessels, as polarized light is absorbed by hemoglobin. Orthogonal polarization spectral imaging technique (OPS) is more prone to artifacts and is no more used [99].

The treatments available to correct endothelial dysfunction in septic patients are rather limited and aim at controlling inflammation, vascular function and coagulation. However, in preclinical studies, some therapeutic approaches improved endothelial function and exerted beneficial effects on organ function and survival.

1. Fluid Resuscitation and Vasopressors

First of all, in the early phases of severe sepsis, fluid resuscitation with crystalloids or colloids may partly correct blood flow heterogeneity and shunting [100], through increased perfusion pressure, decreased microvascular blood viscosity and/or local vasodilatation [101]; the type of solution does not seem to influence the response to fluids. Transfusion may improve oxygen delivery [102]. Human serum albumin could also have beneficial effects on endothelial dysfunction, by reducing endotoxemia-induced inflammation and decreasing both oxidative and nitrosative stresses [47, 48]. In septic shock, inotropic and vasopressive agents are used to counteract the intense vasoplegia and may help maintain microcirculation in a perfused state; however, vasopressors can also worsen microcirculation flow heterogeneity and reduce functional capillary density, because of intense peripheral vasoconstriction [45]. Moreover, in a recent review, Boerma *et al.* [103] pointed out that there was no solid clinical

cal data available to support the beneficence of increasing mean arterial pressure in term of microcirculatory perfusion and/or oxygenation. At last, although these treatments may be beneficial in term of global hemodynamic effect, they usually only have a limited impact on endothelial and microcirculatory dysfunctions, because of the complexity of these injuries [99].

2. Vasodilators

Vasodilators such as NO[•] donors have been proposed to compensate for heterogeneity in microcirculatory blood flow [100]; in sepsis, NO[•] may be beneficial through recruitment of the microcirculation as it takes part in both modulation of leukocyte-endothelial interactions and microvessel vasodilation. However, in a double-blind randomized placebo controlled trial bearing on seventy septic patients, Boerma *et al.* [104] concluded that intravenous nitroglycerin after a strict resuscitation protocol does not promote sublingual microcirculatory blood flow. On the other hand, although NO[•] overproduction due to iNOS upregulation may contribute to arterial hypotension in sepsis, non selective NOS inhibition is known to aggravate the impairment of microvascular perfusion, by worsening leukocytes and platelets adhesion, increasing microthrombosis and microvascular permeability, causing decreased splanchnic and myocardial blood flow and defects in tissue oxygenation [36]. A phase III randomized controlled trial on non-selective NOS inhibitors was stopped early because of increased mortality in the NOS inhibition group [105]. Trzeciak therefore suggests that, in sepsis, upregulation of NO[•] may be adaptive and in fact, protective [36].

As far as the regulation of vascular production and activity of NO[•] is concerned, hydrogen sulfide (H₂S) is a gaseous transmitter, which has also aroused some interest in septic shock during the last decades [106, 107]. Indeed, the combination of H₂S and NO[•] could form a product with little or no vascular activity *in-vitro* or *in vivo*, thought to be a nitrothiol [108]. The combination of sodium hydrogen sulfide (NaHS) with NO[•] donor was shown to inhibit the vasorelaxant effect of acetylcholine and histamine on aorta rings of rats, while intravenous injection of NaHS in anesthetized rats increased mean arterial pressure, reduced in the presence of an inhibitor of NO[•] synthase (L-NAME). Excessive levels of H₂S could contribute to the hypotension of septic shock; Hui *et al.* [109] showed that H₂S production was significantly increased in arteries of septic or endotoxemic rats and that level of endogenous H₂S were inversely correlated with blood pressure and cardiac function. Regarding the incomplete data, the use of H₂S as an adjuvant treatment in intensive care is therefore at an experimental stage and far from a clinical use for septic shock resuscitation [110].

3. Recombinant Human Activated Protein C

Another approach to improve endothelial function during sepsis would be recombinant human activated protein C (rhAPC) activated protein C is a potent anticoagulant and profibrinolytic enzyme, able to inactivate coagulation factors Va and VIIIa and TFPI [111]. Pro-inflammatory cytokines such as TNF- α decrease the activity of thrombomodulin, which interacts with the protein C to form activated protein

C [34]. Recent studies show that the occurrence of DIC in septic shock is a precursor of multiple organ failure [112] and a decrease of protein C in septic patients is correlated with an increased risk of mortality [113]. During septic shock, treatment with rhAPC leads to a 19% reduction in relative risk of mortality [114], an effect attributed to its anticoagulant and anti-inflammatory properties. The PROWESS trial (Recombinant Human Activated Protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis) [114] showed that treatment with rhAPC was associated with faster recovery of cardiovascular failure. But in rodent models of endotoxemia, rhAPC also demonstrated a protective effect on microcirculation through the inhibition of leukocyte-endothelial interaction, inhibition of subsequent leukocytes adherence to the endothelium and suppression of inflammatory cytokine production [115-117]. Moreover, Sennoun *et al.* [69] reported that rhAPC improved both endothelial dysfunction and arterial contractility induced by bacterial LPS in isolated mouse arteries, through an increase in eNOS activation, a reduction of LPS-induced upregulation of NF- κ B and iNOS expression. At last, De Backer *et al.* [118] used OPS to visualize sublingual microcirculation and investigate the effects of rhAPC on septic patients; they showed an early increase of perfused capillaries. In spite of these interesting experimental data, notably endothelial properties, rhAPC would be not improve patients' survival and has therefore been recently removed from the available pharmacological tools.

CONCLUSION

Regarding the major role of microcirculatory dysfunction in the pathophysiology of sepsis and organ failure, the endothelium appears to be a key therapeutic target. So far however, no ideal treatment has been identified and further work is therefore needed to shed light on potential therapeutics of microcirculatory dysfunction during sepsis and the possibility to monitor microcirculation in critical patients. To date, the best approach seems to be a multimodal therapy targeting the different mechanisms involved in microcirculatory distress.

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENT

Declared none.

REFERENCE

- [1] Cryer A. Scale and diversity of interaction at the vascular endothelium. Biochemical interactions of the endothelium. Amsterdam: Elsevier, 1983.
- [2] Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288(5789):373-6.
- [3] Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EH, Feletou M. Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol (Oxf)*. 2009;196(2):193-222.
- [4] Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*. 2007;87(1):315-424.
- [5] Feletou M, Vanhoutte PM. EDHF: an update. *Clin Sci (Lond)*. 2009;117(4):139-55.

- [6] Adelstein RS, Hathaway DR. Role of calcium and cyclic adenosine 3':5' monophosphate in regulating smooth muscle contraction. Mechanisms of excitation-contraction coupling in smooth muscle. *Am J Cardiol.* 1979;44(5):783-7.
- [7] Moncada S, Vane JR. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂, and prostacyclin. *Pharmacol Rev.* 1978;30(3):293-331.
- [8] Luscher TF, Cooke JP, Houston DS, Neves RJ, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent relaxations in human arteries. *Mayo Clin Proc.* 1987;62(7):601-6.
- [9] Luscher TF, Raji L, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent vascular responses in normotensive and hypertensive Dahl rats. *Hypertension.* 1987;9(2):157-63.
- [10] Anselm E, Chataigneau M, Ndiaye M, Chataigneau T, Schini-Kerth VB. Grape juice causes endothelium-dependent relaxation via a redox-sensitive Src- and Akt-dependent activation of eNOS. *Cardiovasc Res.* 2007;73(2):404-13.
- [11] Barton M. The discovery of endothelium-dependent contraction: the legacy of Paul M. Vanhoutte. *Pharmacol Res.* 2011; 63(6):455-62.
- [12] Johnson AR, Erdos EG. Metabolism of vasoactive peptides by human endothelial cells in culture. Angiotensin I converting enzyme (kininase II) and angiotensinase. *J Clin Invest.* 1977;59(4):684-95.
- [13] Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res.* 2007; 100(2):158-73.
- [14] Ellis CG, Jagger J, Sharpe M. The microcirculation as a functional system. *Crit Care.* 2005;9 Suppl 4:S3-8.
- [15] Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MA, oude Egbrink MG. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Phlegm Arch.* 2007;454(3):345-59.
- [16] Adamson RH. Permeability of frog mesenteric capillaries after partial pronase digestion of the endothelial glycocalyx. *J Physiol.* 1990;428:1-13.
- [17] Huxley VH, Williams DA. Role of a glycocalyx on coronary arteriole permeability to proteins: evidence from enzyme treatments. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278(4): H1177-85.
- [18] van Haaren PM, VanBavel E, Vink H, Spaan JA. Localization of the permeability barrier to solutes in isolated arteries by confocal microscopy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285(6): H2848-56.
- [19] Stoltz JF, Boisseau M, Muller S, Wang X, Legrand S, Labrador MV. [Hemorheology and vascular endothelial cells]. *J Mal Vasc.* 1999;24(2):99-109.
- [20] Aird WC. Vascular bed-specific hemostasis: role of endothelium in sepsis pathogenesis. *Crit Care Med.* 2001;29(7 Suppl):S28-34; discussion S-5.
- [21] Bentz GL, Jarquin-Pardo M, Chan G, Smith MS, Sinzger C, Yurochko AD. Human cytomegalovirus (HCMV) infection of endothelial cells promotes naive monocyte extravasation and transfer of productive virus to enhance hematogenous dissemination of HCMV. *J Virol.* 2006;80(23):11539-55.
- [22] Aird WC. Endothelium in health and disease. *Pharmacol Rep.* 2008;60(1):139-43.
- [23] Mombouli JV, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *J Mol Cell Cardiol.* 1999;31(1):61-74.
- [24] Shi Y, Vanhoutte PM. Reactive oxygen-derived free radicals are key to the endothelial dysfunction of diabetes. *J Diabetes.* 2009;1(3):151-62.
- [25] Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. 1992. *Chest.* 2009;136(5 Suppl):e28.
- [26] Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood.* 2003;101(10):3765-77.
- [27] Russell JA. Management of sepsis. *N Engl J Med.* 2006;355(16):1699-713.
- [28] Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Intensive Care Med.* 2008; 34(1):17-60.
- [29] Parrillo JE. Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N Engl J Med.* 1993;328(20):1471-7.
- [30] Xu H, Ye X, Steinberg H, Liu SF. Selective blockade of endothelial NF-kappaB pathway differentially affects systemic inflammation and multiple organ dysfunction and injury in septic mice. *J Pathol.* 2010;220(4):490-8.
- [31] Danese S, Dejana E, Fiocchi C. Immune regulation by microvascular endothelial cells: directing innate and adaptive immunity, coagulation, and inflammation. *J Immunol.* 2007;178(10):6017-22.
- [32] Sadik NA, Mohamed WA, Ahmed MI. The association of receptor of advanced glycosylated end products and inflammatory mediators contributes to endothelial dysfunction in a prospective study of acute kidney injury patients with sepsis. *Mol Cell Biochem.* 2011.
- [33] Ghaly T, Rabadi MM, Weber M, et al. Hydrogel-embedded endothelial progenitor cells evade LPS and mitigate endotoxemia. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2011;301(4):F802-12.
- [34] Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM. Septic shock. *Lancet.* 2005;365(9453):63-78.
- [35] Taylor DE, Piantadosi CA. Oxidative metabolism in sepsis and sepsis syndrome. *J Crit Care.* 1995;10(3):122-35.
- [36] Trzeciak S, Cmel I, Phillip Dellinger R, et al. Resuscitating the microcirculation in sepsis: the central role of nitric oxide, emerging concepts for novel therapies, and challenges for clinical trials. *Acad Emerg Med.* 2008;15(5):399-413.
- [37] Vincent JL, De Backer D. Microvascular dysfunction as a cause of organ dysfunction in severe sepsis. *Crit Care.* 2005;9 Suppl 4:S9-12.
- [38] Tymi K, Wang X, Lidington D, Ouellette Y. Lipopolysaccharide reduces intercellular coupling *in vitro* and arteriolar conducted response *in vivo*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;281(3):H1397-406.
- [39] Bakker EN, Matlung HL, Bonta P, de Vries CJ, van Rooijen N, Vanbavel E. Blood flow-dependent arterial remodelling is facilitated by inflammation but directed by vascular tone. *Cardiovasc Res.* 2008;78(2):341-8.
- [40] Vallet B. Bench-to-bedside review: endothelial cell dysfunction in severe sepsis: a role in organ dysfunction? *Crit Care.* 2003;7(2):130-8.
- [41] Lee WL, Liles WC. Endothelial activation, dysfunction and permeability during severe infections. *Curr Opin Hematol.* 2011;18(3):191-6.
- [42] Lam C, Tymi K, Martin C, Sibbald W. Microvascular perfusion is impaired in a rat model of normotensive sepsis. *J Clin Invest.* 1994;94(5):2077-83.
- [43] Sakr Y, Dubois MJ, De Backer D, Creteur J, Vincent JL. Persistent microcirculatory alterations are associated with organ failure and death in patients with septic shock. *Crit Care Med.* 2004;32(9):1825-31.
- [44] Ellis CG, Bateman RM, Sharpe MD, Sibbald WJ, Gill R. Effect of a maldistribution of microvascular blood flow on capillary O₂ extraction in sepsis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;282(1):H156-64.
- [45] Nencioni A, Trzeciak S, Shapiro NI. The microcirculation as a diagnostic and therapeutic target in sepsis. *Intern Emerg Med.* 2009;4(5):413-8.
- [46] van Hinsbergh VW. Endothelium-role in regulation of coagulation and inflammation. *Semin Immunopathol.* 2011.
- [47] Kremer H, Baron-Menguy C, Tesse A, et al. Human serum albumin improves endothelial dysfunction and survival during experimental endotoxemia: concentration-dependent properties. *Crit Care Med.* 2011;39(6):1414-22.
- [48] Mezzani F, Kremer H, Tesse A, et al. Human serum albumin improves arterial dysfunction during early resuscitation in mouse endotoxic model via reduced oxidative and nitrosative stresses. *Am J Pathol.* 2007;171(6):1753-61.
- [49] Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004; 142(2):231-55.
- [50] Peters K, Unger RE, Brunner J, Kirkpatrick CJ. Molecular basis of endothelial dysfunction in sepsis. *Cardiovasc Res.* 2003; 60(1):49-57.
- [51] Victor VM, Rocha M, De la Fuente M. Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis. *Int Immunopharmacol.* 2004; 4(3):327-47.

- [52] DeLeo FR, Renee J, McCormick S, *et al.* Neutrophils exposed to bacterial lipopolysaccharide upregulate NADPH oxidase assembly. *J Clin Invest.* 1998;101(2):455-63.
- [53] Zimmerman JJ. Defining the role of oxyradicals in the pathogenesis of sepsis. *Crit Care Med.* 1995;23(4):616-7.
- [54] Nathan AT, Singer M. The oxygen trail: tissue oxygenation. *Br Med Bull.* 1999;55(1):96-108.
- [55] Kirkeboen KA, Strand OA. The role of nitric oxide in sepsis—an overview. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1999;43(3):275-88.
- [56] van Deventer SJ, Buller HR, ten Cate JW, Aarden LA, Hack CE, Sturk A. Experimental endotoxemia in humans: analysis of cytokine release and coagulation, fibrinolytic, and complement pathways. *Blood.* 1990;76(12):2520-6.
- [57] Levi M. The coagulant response in sepsis and inflammation. *Haemostaseologie.* 2010;30(1):10-2, 4-6.
- [58] Shapiro NI, Schuetz P, Yano K, *et al.* The association of endothelial cell signaling, severity of illness, and organ dysfunction in sepsis. *Crit Care.* 2010;14(5):R182.
- [59] Furian T, Aguiar C, Prado K, *et al.* Ventricular dysfunction and dilation in severe sepsis and septic shock: Relation to endothelial function and mortality. *J Crit Care.* 2011. In press.
- [60] Meziani F, Delabranche X, Asfar P, Toi F. Bench-to bedside review: circulating microparticles—a new player in sepsis? *Crit Care.* 2010;14(5):236.
- [61] Meziani F, Tesse A, Andriantsitohaina R. Microparticles are vectors of paradoxical information in vascular cells including the endothelium: role in health and diseases. *Pharmacol Rep.* 2008;60(1):75-84.
- [62] 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(13):1653-9.
- [63] Chironi GN, Simon A, Boulanger CM, *et al.* Circulating microparticles may influence early carotid artery remodeling. *J Hypertens.* 2010;28(4):789-96.
- [64] 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(6):2045-50.
- [65] Engelmann B. Initiation of coagulation by tissue factor carriers in blood. *Blood Cells Mol Dis.* 2006;36(2):188-90.
- [66] Eilertsen KE, Osterud B. The role of blood cells and their microparticles in blood coagulation. *Biochem Soc Trans.* 2005;33(Pt 2):418-22.
- [67] Roberts HR, Hoffman M, Monroe DM. A cell-based model of thrombin generation. *Semin Thromb Hemost.* 2006;32 Suppl 1:32-8.
- [68] 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(4):1515-22.
- [69] Sennoun N, Baron-Menguy C, Burban 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(1):H277-82.
- [70] Sennoun N, Meziani F, Dessebe O, *et al.* Activated protein C improves lipopolysaccharide-induced cardiovascular dysfunction by decreasing tisular inflammation and oxidative stress. *Crit Care Med.* 2009;37(1):246-55.
- [71] Morel N, Morel O, Delabranche X, *et al.* Microparticules circulantes au cours des traumatismes graves et des sepsis : un élément du couplage inflammation-thrombose. *Ann Fr Anesth Reanim.* 2006;25(9):955-66.
- [72] 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(4):R195.
- [73] Ogura H, Tanaka H, Koh T, *et al.* Enhanced production of endothelial microparticles with increased binding to leukocytes in patients with severe systemic inflammatory response syndrome. *J Trauma.* 2004;56(4):823-30; discussion 30-1.
- [74] Densmore JC, Signorino PR, Ou J, *et al.* Endothelium-derived microparticles induce endothelial dysfunction and acute lung injury. *Shock.* 2006;26(5):464-71.
- [75] Bany 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(11):7545-56.
- [76] Lynch SF, Ludlam CA. Plasma microparticles and vascular disorders. *Br J Haematol.* 2007;137(1):36-48.
- [77] Nomura S, Imamura A, Okuno M, *et al.* Platelet-derived microparticles in patients with arteriosclerosis obliterans: enhancement of high shear-induced microparticle generation by cytokines. *Thromb Res.* 2000;98(4):257-68.
- [78] Wolf P, Nghiem DX, Walterscheid JP, *et al.* Platelet-activating factor is crucial in psoralen and ultraviolet A-induced immune suppression, inflammation, and apoptosis. *Am J Pathol.* 2006;169(3):795-805.
- [79] Leclerc J, Pu Q, Corseaux D, *et al.* A single endotoxin injection in the rabbit causes prolonged blood vessel dysfunction and a procoagulant state. *Crit Care Med.* 2000;28(11):3672-8.
- [80] Parker JL, Adams HR. Selective inhibition of endothelium-dependent vasodilator capacity by *Escherichia coli* endotoxemia. *Circ Res.* 1993;72(3):539-51.
- [81] Umans JG, Wylam ME, Samsel RW, Edwards J, Schumacker PT. Effects of endotoxin *in vivo* on endothelial and smooth-muscle function in rabbit and rat aorta. *Am Rev Respir Dis.* 1993;148(6 Pt 1):1638-45.
- [82] Connelly L, Madhani M, Hobbs AJ. Resistance to endotoxin shock in endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) knock-out mice: a pro-inflammatory role for eNOS-derived NO *in vivo*. *J Biol Chem.* 2005;280(11):10040-6.
- [83] Doursout MF, Oguchi T, Fischer UM, *et al.* Distribution of NOS isoforms in a porcine endotoxin shock model. *Shock.* 2008;29(6):692-702.
- [84] Chauhan SD, Seggara G, Vo PA, Macallister RJ, Hobbs AJ, Ahluwalia A. Protection against lipopolysaccharide-induced endothelial dysfunction in resistance and conduit vasculature of iNOS knockout mice. *FASEB J.* 2003;17(6):773-5.
- [85] O'Brien AJ, Wilson AJ, Sibbald R, Singer M, Clapp LH. Temporal variation in endotoxin-induced vascular hyporeactivity in a rat mesenteric artery organ culture model. *Br J Pharmacol.* 2001;133(3):351-60.
- [86] Stoclet JC, Muller B, Andriantsitohaina R, Kleschyov A. Overproduction of nitric oxide in pathophysiology of blood vessels. *Biochemistry (Mosc).* 1998;63(7):826-32.
- [87] Stoclet JC, Martinez MC, Ohlmann P, *et al.* Induction of nitric oxide synthase and dual effects of nitric oxide and cyclooxygenase products in regulation of arterial contraction in human septic shock. *Circulation.* 1999;100(2):107-12.
- [88] Zhou M, Wang P, Chaudry IH. Endothelial nitric oxide synthase is downregulated during hyperdynamic sepsis. *Biochim Biophys Acta.* 1997;1335(1-2):182-90.
- [89] Wang P, Wood TJ, Zhou M, Ba ZF, Chaudry IH. Inhibition of the biologic activity of tumor necrosis factor maintains vascular endothelial cell function during hyperdynamic sepsis. *J Trauma.* 1996;40(5):694-700; discussion 1-1.
- [90] Landry DW, Oliver JA. The ATP-sensitive K⁺ channel mediates hypotension in endotoxemia and hypoxic lactic acidosis in dog. *J Clin Invest.* 1992;89(6):2071-4.
- [91] Cauwels A, Brouckaert P. Critical role for small and large conductance calcium-dependent potassium channels in endotoxemia and TNF toxicity. *Shock.* 2008;29(5):577-82.
- [92] Marechal X, Favory R, Joulin O, *et al.* Endothelial glycocalyx damage during endotoxemia coincides with microcirculatory dysfunction and vascular oxidative stress. *Shock.* 2008;29(5):572-6.
- [93] Schouten M, Wiersinga WJ, Levi M, van der Poll T. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J Leukoc Biol.* 2008;83(3):536-45.
- [94] Goldenberg NM, Steinberg BE, Slutsky AS, Lee WL. Broken barriers: a new take on sepsis pathogenesis. *Sci Transl Med.* 2011;3(88):88ps25.
- [95] London NR, Zhu W, Bozza FA, *et al.* Targeting Robo4-dependent Slit signaling to survive the cytokine storm in sepsis and influenza. *Sci Transl Med.* 2010;2(23):23ra19.
- [96] Duffy MJ, Mullan BA, Craig TR, *et al.* Impaired endothelium-dependent vasodilation is a novel predictor of mortality in intensive care. *Crit Care Med.* 2011;39(4):629-35.
- [97] Paulus P, Jennewein C, Zacharowski K. Biomarkers of endothelial dysfunction: can they help us deciphering systemic inflammation and sepsis? *Biomarkers.* 2011;16 Suppl 1:S11-21.
- [98] Siegemund M, van Bommel J, Ince C. Assessment of regional tissue oxygenation. *Intensive Care Med.* 1999;25(10):1044-60.

- [99] De Backer D, Donadello K, Taccone FS, Ospina-Tascon G, Salgado D, Vincent JL. Microcirculatory alterations: potential mechanisms and implications for therapy. *Ann Intensive Care*. 2011;1(1):27.
- [100] Ospina-Tascon G, Neves AP, Occhipinti G, *et al*. Effects of fluids on microvascular perfusion in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med*. 2010;36(6):949-55.
- [101] Pottecher J, Derudder S, Teboul JL, *et al*. Both passive leg raising and intravascular volume expansion improve sublingual microcirculatory perfusion in severe sepsis and septic shock patients. *Intensive Care Med*. 2010;36(11):1867-74.
- [102] Rivers E, Nguyen B, Havstad S, *et al*. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 2001;345(19):1368-77.
- [103] Boerma EC, Ince C. The role of vasoactive agents in the resuscitation of microvascular perfusion and tissue oxygenation in critically ill patients. *Intensive Care Med*. 2010;36(12):2004-18.
- [104] Boerma EC, Koopmans M, Konijn A, *et al*. Effects of nitroglycerin on sublingual microcirculatory blood flow in patients with severe sepsis/septic shock after a strict resuscitation protocol: a double-blind randomized placebo controlled trial. *Crit Care Med*. 2010;38(1):93-100.
- [105] Lopez A, Lorente JA, Steingrub J, *et al*. Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock. *Crit Care Med*. 2004;32(1):21-30.
- [106] Elsey DJ, Fowkes RC, Baxter GF. Regulation of cardiovascular cell function by hydrogen sulfide (H₂S). *Cell Biochem Funct*. 2010;28(2):95-106.
- [107] Ali MY, Ping CY, Mok YY, *et al*. Regulation of vascular nitric oxide *in vitro* and *in vivo*: a new role for endogenous hydrogen sulphide? *Br J Pharmacol*. 2006;149(6):625-34.
- [108] Whiteman M, Li L, Kostetski I, *et al*. Evidence for the formation of a novel nitrosothiol from the gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulphide. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;343(1):303-10.
- [109] Hui Y, Du J, Tang C, Bin G, Jiang H. Changes in arterial hydrogen sulfide (H₂S) content during septic shock and endotoxin shock in rats. *J Infect*. 2003;47(2):155-60.
- [110] Boissramé-Helms J, Asfar P, Rademacher P, Meziani F. Effets cardiovasculaires de l'hydrogène sulfuré. *Réanimation*. 2012;21:S467-S74.
- [111] Mosnier LO, Zlokovic BV, Griffin JH. The cytoprotective protein C pathway. *Blood*. 2007;109(8):3161-72.
- [112] Dhainaut JF, Charpentier J. CIVD et défaillance d'organes : arguments expérimentaux et cliniques. *Réanimation*. 2002; 11:599-607.
- [113] Toussaint S, Gerlach H. Activated protein C for sepsis. *N Engl J Med*. 2009;361(27):2646-52.
- [114] Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, *et al*. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med*. 2001;344(10):699-709.
- [115] Iba T, Kidokoro A, Fukunaga M, Nagakari K, Shirahama A, Ida Y. Activated protein C improves the visceral microcirculation by attenuating the leukocyte-endothelial interaction in a rat lipopolysaccharide model. *Crit Care Med*. 2005;33(2):368-72.
- [116] Hoffmann JN, Vollmar B, Laschke MW, *et al*. Microhemodynamic and cellular mechanisms of activated protein C action during endotoxemia. *Crit Care Med*. 2004;32(4):1011-7.
- [117] Lehmann C, Meissner K, Knock A, *et al*. Activated protein C improves intestinal microcirculation in experimental endotoxaemia in the rat. *Crit Care*. 2006;10(6):R157.
- [118] De Backer D, Verdant C, Chierago M, Koch M, Gullo A, Vincent JL. Effects of drotrecogin alfa activated on microcirculatory alterations in patients with severe sepsis. *Crit Care Med*. 2006;34(7):1918-24.

Annexe 4

DEXAMETHASONE AND RECOMBINANT HUMAN ACTIVATED PROTEIN C IMPROVE MYOCARDIAL FUNCTION AND EFFICIENCY DURING EXPERIMENTAL SEPTIC SHOCK

Authors: Jérémie Lemarié (1) (2)
Alice Blet (1) (6) (7) (8)
Youcef Bouazza (1)
Julie Boisramé-Helms (3) (4)
Ferhat Meziani (3) (4)
Bruno Levy (1) (5)

Affiliation:

- (1) Groupe CHOC, INSERM U1116, Faculté de Médecine de Nancy, Université de Lorraine, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.
- (2) Service de réanimation médicale, Hôpital Central, 29 avenue de Lattre de Tassigny, CO 60034, 54035 NANCY CEDEX
- (3) Service de réanimation médicale, Nouvel Hôpital Civil, Hôpitaux universitaires de Strasbourg, 1 place de l'hôpital, 67031 Strasbourg, France.
- (4) EA 3072, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Faculté de médecine, Université de Strasbourg, Strasbourg, France
- (5) Service de réanimation Médicale, Institut Lorrain du Cœur et des Vaisseaux, Centre Hospitalier Universitaire de Nancy, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.
- (6) Département d'Anesthésie-Réanimation, Centre de Traitement des Brûlés, groupe hospitalier Lariboisière Saint-Louis, Assistance publique-Hôpitaux de Paris, 75010 Paris, France
- (7) Université Paris-VII-Denis-Diderot, 75013 Paris, France
- (8) Inserm UMR 942, « biomarqueurs et cœur », 75010 Paris, France

Contact information: Bruno Levy, E-mail: b.levy@chu-nancy.fr / mail adress: (5) / Tel number : 003383154469 / Fax number : 0033154220

Disclosures: No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

Running Head: Steroids & APC improve septic cardiomyopathy

ACCEPTED

ABSTRACT

Corticosteroids have been shown to reduce short-term mortality during septic shock and therefore recommended in the most severe patients as adjuvant therapy. Until recently, recombinant human Activated Protein C (APC) was also considered in the management of more severe cases. As myocardial depression has long been recognized as a manifestation of organ dysfunction during septic shock, we examined whether corticosteroids (dexamethasone, DEXA, 150µg/kg/h) and/or APC (33µg/kg/h) treatments improve sepsis-induced cardiac dysfunction during cecal ligation and puncture (CLP)-induced septic shock in Wistar rats. All rats received intravenous saline resuscitation (10 mL/kg/h) and antibiotics. Eighteen hours after surgery, anesthesia was performed (Isoflurane) and myocardial function was assessed using a conductance catheter introduced into the left ventricle. Rats were then sacrificed; blood and heart were harvested for biological analysis, including radical oxygen species determination. CLP induced hypotension, depression of myocardial systolic performance (demonstrated by significant decreases in dP/dt_{max} , end-systolic pressure-volume relationship, and preload recruitable stroke work) and alteration of diastolic function (dP/dt_{min}) while DEXA, APC and their combination thereof allowed correction of hemodynamic disorders and improved myocardial mechanical efficiency. CLP was associated with higher levels of nitric oxide (NO) and superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) in heart (electron paramagnetic resonance studies), and consequently, peroxynitrite. DEXA and APC also improved cardiac dysfunction by down-regulating the iNOS pathway and reducing myocardial oxidative stress.

Key words: sepsis-induced cardiac dysfunction; radical oxygen species; conductance catheter study; cecal ligation and puncture; corticosteroids.

INTRODUCTION

Cardiovascular dysfunction is a major contributor in septic shock-induced mortality ¹. Septic shock is characterized by both an alteration in vascular tone ² and also by a systolic and diastolic biventricular dysfunction ³. In clinical practice, volume-resuscitated patients exhibit high cardiac output and low systemic resistance with myocardial depression despite the high cardiac output. The overall incidence of global left ventricular hypokinesia in septic shock patients without any prior cardiac history is 60%, a value much higher than previously described ⁴. In 10-20% of septic shock patients, septic cardiomyopathy mimics a cardiogenic shock state with impaired cardiac output leading to death ⁵. Several hypotheses have been proposed to explain sepsis-induced cardiac dysfunction, including the infiltration of activated leukocytes ⁶, and the effects of cytokines such as TNF- α and IL-1 β , identified as "circulating myocardial depressant factors"⁷. Most of the deleterious effects of proinflammatory cytokine have been attributed to the overproduction of nitric oxide (NO), which may exert detrimental effects on the myocardium ⁸. The inhibition of NO synthase activity has been shown to prevent endotoxin-induced myocardial dysfunction ⁹. Conversely, under normal levels, NO is necessary for normal cardiac physiology and plays a protective role in the ischemic heart through numerous mechanisms ^{10,11}. Recent studies have highlighted the negative inotropic role of peroxynitrite ^{12,13}. Indeed, the direct toxicity of nitric oxide is modest but is greatly enhanced by reacting with superoxide (O₂⁻) to form peroxynitrite (ONOO⁻) ¹⁴.

Corticosteroids are recommended as an adjuvant therapy for adult septic shock patients unresponsive to fluid resuscitation and vasopressors ¹⁵. While their

intracellular mechanisms of action are not completely elucidated, it has been shown that they involve genomic and non-genomic mechanisms¹⁶. Genomic mechanisms lead to inhibition of the NF- κ B pathway, resulting in reduced expression of inducible NO synthase (iNOS)¹⁷. Over the past decade, a better understanding of sepsis pathophysiology has emerged focused on the tight coupling of inflammation and coagulation processes¹⁸. Activated Protein C (APC), a systemic endogenous anticoagulant and anti-inflammatory factor, has also been considered in the management of septic patients. Despite the disappointing results of the PROWESS SHOCK study¹⁹, many large scale clinical studies found beneficial effects of APC use during sepsis²⁰⁻²². Anticoagulant properties do not appear to be the most important cause of this benefit. APC also demonstrates cytoprotective, anti-apoptotic and anti-inflammatory properties which are probably at the origin of its beneficial effects²³. Lastly, APC has been demonstrated to inhibit NF- κ B, TNF- α ²⁴ or iNOS²⁵ pathways.

Corticosteroids and APC improve vascular function in sepsis experimental models but data are scarce regarding their effects on myocardial function during septic shock. In a previous study from our group²⁶, we have observed an improvement in left ventricular ejection fraction evaluated by echocardiography with APC after LPS challenge in rats. Nevertheless, due to important dependency to load conditions, ejection fraction cannot reliably evaluate intrinsic contractility, particularly in the context of low blood pressure. We therefore decided to evaluate contractile cardiac function by load-independent parameters using conductance catheter, in order to discriminate vascular effects – extensively studied at this stage – and cardiac effects. Since the pathophysiology of vascular and myocardial dysfunction during sepsis

share multiple pathways, we tested the hypothesis that (a) corticosteroids and/or APC improve sepsis-induced myocardial dysfunction in a cecal ligation and puncture (CLP) model of septic shock, and that (b) this improvement involves down-regulation of the iNOS pathway with a decreased production of radical oxygen species.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male Wistar rats weighing 380 to 420 g were obtained from the Centre d'élevage Depré (St Doulchard, France). All experiments were conducted in accordance with the National and European Institutes of Health guidelines for the use of laboratory animals and were approved by the University of Lorraine. The investigation conforms to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the U.S. National Institutes of Health.

Shock model

Rats were anesthetized with Isoflurane (induction $F_i = 3\%$ then 1.5%) with $F_{iO_2} = 60\%$. A 2cm midline incision was made through the abdominal wall, the cecum was ligated at half the distance between the distal pole and the base of the cecum, and subsequently punctured once with a 21-gauge needle. The cecum was slightly squeezed to expel a small amount of stool from the puncture site to ensure a full-thickness perforation. The bowel was returned to the abdominal cavity and the incision was closed. A midline incision was also made in the anterior neck area. The right external jugular vein was catheterized (tubing PE-50) under sterile conditions, and tunneled subcutaneously to the back of the neck. The exteriorized tubing was routed out of the animal cage through a helical stainless steel wire spring to protect

the tubing from manipulation by the animal and attached to a swivel device. The sham operation consisted of laparotomy and manipulation of the cecum without ligation or puncture. Neck surgery with catheterization for infusion was similar in the other groups except the control group which did not undergo surgery (only conductance catheter studies were performed without any prior intervention).

Treatment protocol

During the first four hours, rats were placed under a heating lamp until full awakening and an analgesic was administered through the central line (nalbuphin: 1mg/kg over 2 minutes). Four hours after the surgery, all rats (except controls which were not instrumented) received antibiotics (imipenem: 10 mg/kg over 10 minutes) and a continuous infusion of saline (10mL/kg/h) for a total duration of 14 hours (from the 4th hour to the 18th hour). At this point, instrumented rats were randomly divided into 6 groups comprised of 5 rats each: control, sham, peritonitis (CLP), dexamethasone 150µg/kg/h (DEXA), recombinant human activated protein C (rhAPC) 33µg/kg/h (Lilly, Indianapolis, USA), DEXA+APC 150µg/kg/h-33µg/kg/h, diluted in the saline solution used for continuous fluid loading.

Surgical procedures for left ventricular catheterization

Eighteen hours after surgery, rats were anesthetized again with isoflurane. The neck incision was reopened to expose the trachea and the left carotid artery. After intubating the trachea, the animal was then paralyzed (pancuronium 2mg/kg) and placed on positive pressure ventilation using a rodent ventilator (Model 683, Harvard Apparatus) with FiO₂ = 60%, respiratory rate = $53.5 * \text{weight}^{-0.26}$, tidal volume = $6.2 * \text{weight}^{1.01}$. A temperature probe was inserted into the rectum and central body temperature was maintained between 36.7 and 37.3 °C using a heating pad and

lamp. During the experiments, rats were perfused continuously with isotonic saline 10mL/kg/h. A bisubcostal incision was made to access the inferior wall of the diaphragm with an electrocautery system (MD 62, KLS Martin Group, Germany). Thereafter, the diaphragm was opened and a 3-0 suture was passed around the inferior vena cava (IVC) just above the diaphragm in order to perform IVC occlusions by pulling the suture. A 2-F conductance catheter (SPR-838, Millar Instruments, Houston, TX) was calibrated beforehand to convert raw arbitrary relative volume unit to true volume using calibration wells with known diameters (calibration cuvette 910-1048, Millar Instruments) containing heparinized blood from the same species of rat and heated at 37°C. Conductance catheter was inserted into the right carotid artery and advanced into the left ventricle. The proper positioning of the catheter was assessed by visual aspect of pressure-volume (PV) loops. The catheter was interfaced with a PV analog signal amplifier and data were collected with an analog-to-digital converter (Millar Pressure Conductance Unit model 200, Millar Instruments Inc, Houston, TX). All variables were displayed and recorded using IOX 2.2.4.6® software (EMKA Technologies, France). After a 10-minute rest period, saline calibration was performed (40µL hypertonic saline, 30%, bolus injection through central venous line) to estimate the parallel volume. After a further 10-minute rest period, the left ventricular pressure and volume were measured at steady state. A series of other parameters were also measured including heart rate (HR), stroke volume (SV), maximum pressure (Pmax), cardiac output (CO), pressure development during isovolumic contraction (dp/dt_{max}) and relaxation (dp/dt_{min}). Upon completion of this step, inferior vena cava occlusion was performed by briefly lifting the ligature around the IVC in order to temporarily modify preload conditions. The left ventricular

end-systolic and end-diastolic pressure volume relationships (Ees and EDPVR) were obtained, as well as time-varying maximum elastance (E_{max}), preload-recruitable stroke work (PRSW), pressure-volume area (PVA), potential energy (PE) and stroke work (SW). Just before sacrifice, arterial blood was collected by heart puncture, allowing blood gas analysis. Plasma was isolated by centrifuging the blood immediately after collection and stored at -80°C . Finally, the myocardial ventricular tissue was sectioned for nitric oxide and superoxide measurements.

Electronic Paramagnetic Resonance (EPR) Studies

The EPR protocol has previously been described by Mostefai²⁷ and Khoo et al.²⁸. Briefly, for superoxide anion spin trapping, right ventricles were treated for 45 min at 37°C with desferoxamine-chelated Krebs-HEPES solution containing 1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine (CMH, 500 mmol/L; Noxygen, Elzach, Germany), desferoxamine (25mmol/L), and diethyldithiocarbamate (DETC, 5mmol/L). The reaction was stopped by putting the samples in ice. Samples were then frozen in liquid N_2 and analyzed by EPR. For NO spin trapping, the technique was based on the use of colloid iron (II) diethyldithiocarbamate [$\text{Fe}(\text{DETC})_2$], to trap NO from left ventricles.

Statistical analysis

After testing for their normal distribution (Kolmogorov-Smirnov test), data are presented as mean \pm standard deviation, where n represents the number of rats. Data were analyzed with statistical software GraphPad Prism version 4.0 (San Diego, CA, USA). Between-group differences were tested by one-way analysis of variance with Bonferroni correction. P values less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Model characteristics

When compared to sham animals, CLP was associated with arterial hypotension (mean arterial pressure (MAP): 109 ± 12 vs. 77 ± 13 mmHg), no changes in heart rate and increased lactate level (2.7 ± 0.8 vs. 5.7 ± 2.5 mmol.L⁻¹) (Table 1).

CLP decreases systolic and diastolic myocardial function (table 2).

Changes detected by conductance catheter readings confirmed that LV systolic function was impaired in CLP rats compared to sham animals. Cardiac output was higher in septic animals while LV maximal rate of pressure development (dP/dt_{max}) was significantly lower than in sham-treated animals (7213 ± 1787 vs. 11570 ± 1242 mmHg.min⁻¹, $p < .001$). Preload recruitable stroke work (PRSW), a load-independent measure of systolic function, was significantly lower in peritonitis than in sham-treated animals (48 ± 18 vs. 104 ± 55 mmHg, $p < .01$). Similar results were found using the slope of the end-systolic pressure volume relationship (Ees). Conversely, ejection fraction was not different between these groups.

Furthermore, pressure–volume catheter readings obtained with this model accurately detailed abnormal changes in LV diastolic function in peritonitis. DP/dt_{min} was decreased by 38% and 37% during CLP in comparison with control and sham rats respectively ($p < .01$). End diastolic pressure volume relationship (EDPVR) was not statistically different between experimental groups.

CLP decreases myocardial efficiency.

Pressure-Volume Area (PVA), an index of myocardial oxygen consumption, was significantly higher in CLP animals (42.1 ± 9.5 vs. 15.6 ± 6.6 mL.mmHg, $p < .01$).

Nevertheless, mechanical efficiency (SW to PVA ratio) was significantly depressed during CLP (0.47 ± 0.07 in CLP rats compared to 0.67 ± 0.07 in control and 0.76 ± 0.12 in sham rats, $p < .01$).

Ventricular dysfunction is associated with increased NO and superoxide anion production.

Myocardial NO and superoxide anion levels were significantly higher in the CLP group than in controls or sham-treated rats (figure 1).

Comparative effects of APC, DEXA and their combination

DEXA, APC and their combination thereof improve systemic hemodynamics.

MAP was restored by DEXA and APC + DEXA. A non-significant improvement in MAP ($p = .09$) was observed in APC-treated rats when compared to CLP rats. Cardiac output was restored to basal values with all treatments. Lactate levels decreased in all treated groups (table 1).

DEXA, APC and their combination thereof improve ventricular function and cardiac efficiency.

Sepsis-induced decreases in dP/dt_{max} , dP/dt_{min} , Ees and PRSW were significantly corrected by all treatments (table 2). Conversely, values of ejection fraction were similar between all groups. Treatments decreased myocardial oxygen consumption and improved myocardial mechanical efficiency (table 3).

Improvements in myocardial function are associated with a decrease in myocardial NO and superoxide anion.

Lastly, myocardial NO and superoxide anion levels decreased in all treated groups except for superoxide anion in the DEXA group. Nonetheless, addition of DEXA to APC enabled an even greater decrease in NO and superoxide anion levels than with APC alone, reaching levels observed in sham and control animals (figure 1).

DISCUSSION

Characterization of the links between inflammation, coagulation, the immune and neuroendocrine systems along with randomized studies has led to international recommendations for the use of low-dose hydrocortisone and, until recently, the use of rhAPC in the early management of septic shock ¹⁵. In the present study, we report that APC and dexamethasone improve sepsis-induced cardiac dysfunction. These effects were associated with an important decrease in NO and radical oxygen species production.

Model characteristics

Since the endotoxemia model is probably far from the clinical setting, we used a more relevant protocol of CLP, combining volume resuscitation, antibiotics and delayed treatment (4 hours after CLP induction). The use of a high-volume fluid therapy led to a hyperdynamic model and represents the large majority of resuscitated septic patients. Moreover, close to human septic shock and despite a hyperkinetic state, CLP rats displayed a systolo-diastolic myocardial dysfunction associated with an increase in myocardial oxygen consumption leading to a decrease in myocardial efficiency. Importantly, as extensively described ²⁹, concerns about the ability of ejection fraction to identify cardiac dysfunction were clearly outlined. Altered contractility combined with low afterload in the CLP group have certainly masked changes in ejection fraction. Finally, we observed an association between decreased myocardial function and myocardial NO and superoxide anion overproduction.

APC and DEXA improve myocardial function

We showed that both treatments improved systolic and diastolic dysfunction. Regarding APC, this is consistent with the findings of Favory et al. who reported a correction of *ex-vivo* systolic dysfunction with murine APC infusion during

experimental endotoxin shock³⁰. In this study, intrinsic contractile cardiac function was assessed by means of isolated heart perfusion, a method that informs about contractile function but which cannot take into account the peripheral influences from nervous or humoral systems, unlike conductance catheter studies. In this latter study, beneficial effects of APC were also associated with attenuation of endotoxin-induced inflammatory response and a reduction of plasma levels of nitrite/nitrate.

Similarly, it is now well recognized that corticosteroids during septic shock improve shock outcome in the most severe patients³¹. DEXA has been shown to improve arterial contractility and endothelial dysfunction in septic shock rats²⁶. Nevertheless, data concerning myocardial effects of glucocorticoids during septic shock are scarce. Using hydrocortisone, Feng et al.³² noted an improvement in dP/dtmax in CLP-induced septic rabbits, while Wang et al.³³ observed a decrease in myocardial NO and iNOS expression, as well as troponin levels in septic rats. In the present study, using relevant parameters of systolic and diastolic function, we found that DEXA improved systolic and diastolic function. Similarly to human septic shock, we observed a marked decrease in sepsis-induced hyperkinetic state with both drugs³⁴. This effect may be related to an increase in afterload secondary to the improvement in vascular reactivity but also to the decrease in myocardial oxygen consumption.

APC and DEXA improve cardiac efficiency.

Mechanical efficiency has long been assessed by the stroke work to pressure-volume area ratio (SW/PVA)³⁵. SW/PVA reflects the mechanical efficiency of converting the total mechanical energy (PVA) available to the left ventricle to external work (SW). In our study, we found a significant alteration of SW/PVA during CLP, which was normalized after APC and/or DEXA infusion. Septic shock induced a severe alteration of energetic myocardial efficiency, related to an important increase in energy

consumption in excitation-contraction coupling, as previously reported ³⁶. During severe sepsis, the heart is in a state of considerable “oxygen waste” due to increased energy utilization for electronic work, most likely partly secondary to decreased efficiency of the mitochondria ³⁶. Peroxynitrite has been involved in the alteration of almost every component of the mitochondrial electron transport chain through mechanisms involving cysteine oxidation, tyrosine nitration and damage of iron sulphur centers ³⁷. Although we only indirectly estimated peroxynitrite formation in the myocardium, we can hypothesize that improvement in cardiac efficiency observed after APC and/or DEXA infusion is at least partly mediated by inhibition of ROS production, and specifically peroxynitrite in the heart. This hypothesis was confirmed by Lancel et al. who found an improvement in myocardial contractile dysfunction in endotoxin-treated rats with the use of peroxynitrite neutralizers ¹².

Effects on radical oxygen species (ROS) production

Although we did not extensively investigate the pathways implicated in sepsis-induced cardiac dysfunction, our results confirm that septic cardiomyopathy is associated with an overproduction of NO and superoxide anion and that both APC and DEXA decreased this production. In a previous study, we similarly demonstrated that these two drugs also decreased NO and superoxide anion overproduction at the vascular level. Peroxynitrite is known to play a major role in sepsis-induced cardiomyopathy. Although we did not evaluate peroxynitrite production at the cardiac level, it is well demonstrated that when both superoxide and NO are synthesized within a few cell diameters of each other, they combine spontaneously to form peroxynitrite by a diffusion-limited reaction ³⁷. So we can readily hypothesize that limitation of peroxynitrite formation is at least partly responsible for our findings on improvement of sepsis-induced cardiac dysfunction by APC and DEXA.

When considering hemodynamic or contractility parameters, administration of APC or DEXA alone allowed almost a complete restoration of these parameters to the level of control ones. Identifying a further effect in the APC+DEXA group was then unlikely. Nevertheless, NO and superoxide anion levels in heart were decreased by APC or DEXA alone and co administration induced a much more reduction, suggesting an additive effect.

Limitations

Firstly, on October 25, 2011, Eli Lilly and Company announced the voluntary withdrawal of Xigris (drotrecogin alfa [activated]) following the negative results of its most recent clinical trial, the PROWESS-SHOCK study¹⁹. Despite these disappointing results, there were numerous pre-clinical studies demonstrating potential benefits effects of APC. Thus, even if the present results do not lead to further progress in the clinical area, they are nonetheless valuable from a pathophysiological point of view. Moreover, many reasons other than product inefficiency may explain a negative result. An unfavorable benefit-risk balance related to hemorrhagic complications may have mitigated the undeniable effects of APC and the development of new molecules sharing the same beneficial pathways without anticoagulant drawback should be encouraged.

Secondly, and because APC and corticosteroids display a myriad of genomic and non-genomic effects, we were not able to explore all implicated cellular pathways. We therefore chose to focus on ROS production, and in particular on NO and superoxide anion. Many publications have identified APC and corticosteroids as iNOS inhibitor, and there is mounting evidence against the deleterious role of iNOS in sepsis-induced organ dysfunction. However, ischemia/reperfusion (IR) phenomenon is a contributor of organ dysfunction during septic shock and the role of iNOS during

IR is much more controversial³⁸. Moreover, a recent study has pointed out the participation of mitochondrial NOS in sepsis-induced cardiomyopathy³⁹. As our work was not designed for it, we were not able to differentiate between these several isoforms of NOS.

Finally, the choice of dexamethasone, which is fivefold more anti-inflammatory than hydrocortisone, as well as the dose delivered should be discussed. In clinical practice, low-dose corticosteroid therapy is preferred to high doses because high dosages have been associated with an increase in the risk of death³¹. Nevertheless, when reviewing the experimental literature, all of the studies reported an improvement in survival independently of the molecule, the dose, and the presence of mineralocorticoid effect. This may be explained by the fact that the deleterious effects of high doses in clinical setting are generally related to infections which are not present in a short and lethal model of septic shock.

CONCLUSIONS

APC and corticosteroids not only improve sepsis-induced vascular dysfunction but also sepsis-induced cardiac dysfunction and myocardial energetic efficiency in a rat model of hyperdynamic septic shock. These effects are mediated by the limitation of NO and superoxide anion production in the myocardium.

Author contributions: J.L., Y.B. and B.L. conception and design of research; J.L. and A.B. performed surgery and hemodynamic measurements; J.B-H and F.M. performed EPR studies; J.L. and B.L. analyzed data and interpreted results of experiments; J.L. prepared figures and drafted manuscript; J.L. and B.L. edited and revised manuscript; All authors approved final version of manuscript.

REFERENCES

1. Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM: Septic shock. *The Lancet* 365:63–78, 2005.
2. Levy B, Collin S, Sennoun N, Ducrocq N, Kimmoun A, Asfar P, Perez P, Meziani F: Vascular hyporesponsiveness to vasopressors in septic shock: from bench to bedside. *Intensive Care Med* 36:2019–2029, 2010.
3. Merx MW, Weber C: Sepsis and the Heart. *Circulation* 116:793–802, 2007.
4. Rabuel C, Mebazaa A: Septic shock: a heart story since the 1960s. *Intensive Care Med* 32:799–807, 2006.
5. Fernandes Jr CJ, Akamine N, Knobel E: Myocardial depression in sepsis. *Shock* 30:14–17, 2008.
6. Madorin WS, Rui T, Sugimoto N, Handa O, Cepinskas G, Kvietys PR: Cardiac myocytes activated by septic plasma promote neutrophil transendothelial migration: role of platelet-activating factor and the chemokines LIX and KC. *Circ Res* 94:944, 2004.
7. Parrillo JE, Burch C, Shelhamer JH, Parker MM, Natanson C, Schuette W: A circulating myocardial depressant substance in humans with septic shock. Septic shock patients with a reduced ejection fraction have a circulating factor that depresses in vitro myocardial cell performance. *J Clin Invest* 76:1539, 1985.
8. Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD, Watkins SC, Hattler BG, Simmons RL: Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science* 257:387–389, 1992.

9. Shan Q, Bourreau JP: Cardiac and vascular effects of nitric oxide synthase inhibition in lipopolysaccharide-treated rats. *Eur J Pharmacol* 406:257–264, 2000.
10. Roberts BW, Mitchell J, Kilgannon JH, Chansky ME, Trzeciak S: Nitric Oxide Donor Agents for the Treatment of Ischemia/Reperfusion Injury in Human Subjects: A Systematic Review. *Shock* 39:229–239, 2013.
11. Jones SP, Bolli R: The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* 40:16–23, 2006.
12. Lancel S, Tissier S, Mordon S, Marechal X, Depontieu F, Scherpereel A, Chopin C, Neviere R: Peroxynitrite decomposition catalysts prevent myocardial dysfunction and inflammation in endotoxemic rats. *J Am Coll Cardiol* 43:2348–2358, 2004.
13. Ferdinandy P, Danial H, Ambrus I, Rothery RA, Schulz R: Peroxynitrite Is a Major Contributor to Cytokine-Induced Myocardial Contractile Failure. *Circ Res* 87:241–247, 2000.
14. Beckman JS, Koppenol WH: Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol Cell Physiol* 271:C1424–1437, 1996.
15. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, Reinhart K, Angus DC, Brun-Buisson C, Beale R, Calandra T, Dhainaut J-F, Gerlach H, Harvey M, Marini JJ, Marshall J, Ranieri M, Ramsay G, Sevransky J, Thompson BT, Townsend S, Vender JS, Zimmerman JL, Vincent J-L: Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Intensive Care Med* 34:17–60, 2007.

16. Rhen T, Cidlowski JA: Antiinflammatory action of glucocorticoids—new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med* 353:1711, 2005.
17. Thiemermann C: Corticosteroids and cardioprotection. *Nat Med* 8:453–455, 2002.
18. Esmon CT: Interactions between the innate immune and blood coagulation systems. *TRENDS Immunol* 25:536–542, 2004.
19. Ranieri VM, Thompson BT, Barie PS, Dhainaut J-F, Douglas IS, Finfer S, Gårdlund B, Marshall JC, Rhodes A, Artigas A, Payen D, Tenhunen J, Al-Khalidi HR, Thompson V, Janes J, Macias WL, Vangerow B, Williams MD: Drotrecogin Alfa (Activated) in Adults with Septic Shock. *N Engl J Med* 366:2055–2064, 2012.
20. Kalil AC, LaRosa SP: Effectiveness and safety of drotrecogin alfa (activated) for severe sepsis: a meta-analysis and metaregression. *Lancet Infect Dis* 12:678–686, 2012.
21. Rimmer E, Kumar A, Doucette S, Marshall J, Dial S, Gurka D, Dellinger RP, Sharma S, Penner C, Kramer A, Wood K, Ronald J, Kumar A, Turgeon AF, Houston DS, Zarychanski R: Activated protein C and septic shock. *Crit Care Med* 40:2974–2981, 2012.
22. Casserly B, Gerlach H, Phillips GS, Marshall JC, Lemeshow S, Levy MM: Evaluating the use of recombinant human activated protein C in adult severe sepsis. *Crit Care Med* 40:1417–1426, 2012.

23. Xu J, Ji Y, Zhang X, Drake M, Esmon CT: Endogenous activated protein C signaling is critical to protection of mice from lipopolysaccharide induced septic shock. *J Thromb Haemost* 7:851–856, 2009.
24. Yuksel M, Okajima K, Uchiba M, Horiuchi S, Okabe H: Activated protein C inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha production by inhibiting activation of both nuclear factor-kB and activator protein-1 in human monocytes. *Thromb Haemost* 88:267–273, 2002.
25. Isobe H, Okajima K, Uchiba M, Mizutani A, Harada N, Nagasaki A, Okabe K: Activated Protein C Prevents Endotoxin-Induced Hypotension in Rats by Inhibiting Excessive Production of Nitric Oxide. *Circulation* 104:1171–1175, 2001.
26. Nacira S, Meziani F, Dessebe O, Cattan V, Collin S, Montemont C, Gibot S, Asfar P, Ramarosan A, Regnault V, Slama M, Lecompte T, Lacolley P, Levy B: Activated protein C improves lipopolysaccharide-induced cardiovascular dysfunction by decreasing tissular inflammation and oxidative stress: *Crit Care Med* 37:246–255, 2009.
27. Mostefai HA, Meziani F, Mastronardi ML, Agouni A, Heymes C, Sargentini C, Asfar P, Martinez MC, Andriantsitohaina R: Circulating Microparticles from Patients with Septic Shock Exert Protective Role in Vascular Function. *Am J Respir Crit Care Med* 178:1148–1155, 2008.
28. Khoo JP, Alp NJ, Bendall JK, Kawashima S, Yokoyama M, Zhang Y-H, Casadei B, Channon KM: EPR quantification of vascular nitric oxide production in genetically modified mouse models. *Nitric Oxide* 10:156–16, 2004.

29. Zaky A, Deem S, Bendjelid K, Treggiari MM: Characterization of Cardiac Dysfunction in Sepsis: An Ongoing Challenge. *Shock* 41:12–24, 2014.
30. Favory R, Lancel S, Maréchal X, Tissier S, Neviere R: Cardiovascular protective role for activated protein C during endotoxemia in rats. *Intensive Care Med* 32:899–905, 2006.
31. Annane D, Bellissant E, Bollaert P-E, Briegel J, Confalonieri M, De Gaudio R, Keh D, Kupfer Y, Oppert M, Meduri GU: Corticosteroids in the Treatment of Severe Sepsis and Septic Shock in Adults: A Systematic Review. *JAMA* 301:2362–2375, 2009.
32. Feng E, Sun H, Xia Y: Effects of hydrocortisone on myocardial function in early stage of sepsis in rabbits. *Chin Crit Care Med* 21:719–721, 2009.
33. Wang Y, Fan X, Zhou T, Qi Y, Chen H, Qian S: Effects of hydrocortisone on circulating and intramyocardial inflammatory mediators in severe septic rats with myocardial injury induced by *Escherichia coli*. *Chin J Pediatr* 44:131–135, 2006.
34. Schelling G, Kilger E, Kuprat G, Hemmer B, Hummel T, Lenhart A, Heyduck M, Stoll C, Peter K, Briegel J: Stress doses of hydrocortisone reverse hyperdynamic septic shock: a prospective, randomized, double-blind, single-center study. *Crit Care Med* 27:723–732, 1999.
35. Gibbs C: Cardiac energetics. *Physiol Rev* 58:174-254, 1978.
36. Aghajani E, Korvald C, Nordhaug D, Sager G, Revhaug A, Myrnes T: *E. coli* sepsis induces profound mechanoenergetic inefficiency in the porcine left ventricle. *Shock* 21:103-109, 2004.

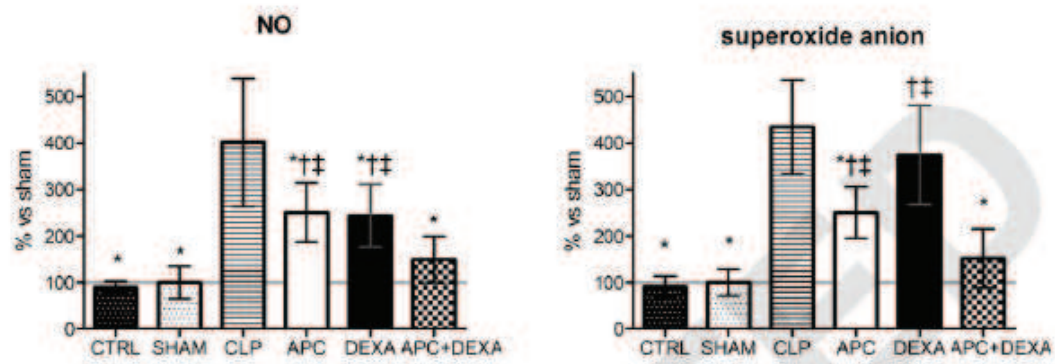
37. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L: Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87:315, 2007.
38. Heusch G, Boengler K, Schulz R: Cardioprotection Nitric Oxide, Protein Kinases, and Mitochondria. *Circulation* 118:1915–1919, 2008.
39. Xu C, Yi C, Wang H, Bruce IC, Xia Q: Mitochondrial nitric oxide synthase participates in septic shock myocardial depression by nitric oxide overproduction and mitochondrial permeability transition pore opening. *Shock* 37:110–115, 2012.

ACCEPTED

FIGURE LEGEND

Figure 1: Quantification of the amplitude of Nitric oxide (NO)-Fe(DETC)₂ and superoxide anion (O₂⁻)-CMH levels in heart at H18 post CLP, as measured by electronic paramagnetic resonance. NO and O₂⁻ levels were significantly higher in CLP rats. APC allowed a significant decrease in radical oxygen species. DEXA allowed a decrease in NO levels but not O₂⁻. Combination of APC plus DEXA allowed a normalization of NO and O₂⁻ levels to control (CTRL) or sham values. * p < .05 vs. CLP; † p < .05 vs. rats that have not undergone CLP (control and sham); ‡ p < .05 vs. rats receiving APC+DEXA; mean ± SEM; n = 5 for each group.

Figure 1



TABLES

Table 1: Major hemodynamic variables and blood lactate levels (H18 post CLP)

	CTRL	SHAM	CLP	APC	DEXA	APC+DEXA
Heart rate (bpm)	427 ± 18	429 ± 12	419 ± 26	413 ± 33	419 ± 18	414 ± 41
MAP (mmHg)	111 ± 15*	109 ± 12*	77 ± 13	94 ± 13	110 ± 7*	104 ± 8*
Pmax (mmHg)	147 ± 14*	141 ± 11*	108 ± 10	125 ± 11	138 ± 9*	137 ± 3*
CO (mL.min ⁻¹)	39 ± 8*	40 ± 14*	92 ± 22	52 ± 18*	42 ± 7*	51 ± 20*
Blood lactate (mmol.L ⁻¹)	3.0 ± 1.0*	2.7 ± 0.8*	5.7 ± 2.5	2.7 ± 0.4*	2.8 ± 0.8*	3.0 ± 0.4*

* p <.05 vs. CLP; mean ± SD; n = 5 for each group. bpm, beats per minute; MAP, mean arterial pressure; Pmax, maximal left ventricular pressure; CO, cardiac output

Table 2: Systolic and diastolic parameters in the various experimental groups (H18 post CLP)

	CTRL	SHAM	CLP	APC	DEXA	APC+DEXA
dP/dtmax (mmHg.s ⁻¹)	11890 ± 1417*	11570 ± 1242*	7213 ± 1787	10750 ± 2064*	10910 ± 919*	10110 ± 910*
Ees (mmHg.μL ⁻¹)	1.41 ± 0.43*	1.19 ± 0.51*	0.28 ± 0.09	0.90 ± 0.14*	0.78 ± 0.12*	1.02 ± 0.05*
PRSW (mmHg.μL)	103 ± 27*	104 ± 55*	48 ± 18	106 ± 43*	82 ± 17*	111 ± 54*
Ejection fraction (%)	63 ± 12	63 ± 13	67 ± 10	63 ± 29	67 ± 12	63 ± 7
dP/dtmin (mmHg.s ⁻¹)	-10730 ± 1410*	-10050 ± 1045*	-6347 ± 1000	-8853 ± 1313*	-9682 ± 1196*	-9853 ± 484*

* p <.05 vs. CLP; mean ± SD; n = 5 for each group. dP/dtmax: first derivative of maximal developed pressure during isovolumetric contraction; Ees: End Systolic Pressure Volume Relationship; PRSW: Preload Recrutable Stroke Work; dP/dtmin: first derivative of minimal developed pressure during isovolumetric relaxation.

Table 3: Energetics and mechanical efficiency in the various experimental groups
(H18 post CLP)

	CTRL	SHAM	CLP	APC	DEXA	APC+DEXA
Pressure volume area (PVA) (mL.mmHg)	17.0 ± 9.5*	15.6 ± 6.6*	42.1 ± 9.5	15.2 ± 3.5*	18.3 ± 6.7*	13.9 ± 3.2*
Mechanical efficiency (SW/PVA)	0.67 ± 0.07*	0.76 ± 0.12*	0.47 ± 0.07	0.79 ± 0.11*	0.72 ± 0.11*	0.76 ± 0.07*

* p < .05 vs. CLP; mean ± SD; n = 5 for each group. SW: stroke work.

Les microparticules dans le choc septique, marqueurs pathogènes et cibles thérapeutiques potentielles

Résumé

Le choc septique est caractérisé par une intense activation cellulaire marquée par une génération excessive de microparticules (MPs), libérées dans l'espace extracellulaire suite à un remaniement de la membrane plasmique. Les MPs participeraient à la dysfonction cardiovasculaire et à la coagulopathie du choc septique.

Nous avons exploré l'intérêt des MPs circulantes comme marqueurs pathogènes, en étudiant l'effet d'acides gras exogènes sur le remodelage de la membrane plasmique et la genèse des MPs, in-vitro dans un modèle de cellules en culture stimulées par une endotoxine et in vivo chez le rat septique. Nous avons ensuite caractérisé l'activation cellulaire du choc septique chez l'homme, en utilisant les MPs circulantes comme témoins de la dysfonction du compartiment vasculaire, puis montré la place des MPs comme cibles thérapeutiques potentielles au cours du choc septique, par leur modulation pharmacologique dans un modèle de choc septique chez le rat.

Nous montrons ainsi l'intérêt des MPs comme un nouvel outil dans l'exploration de nouvelles pistes physiopathologiques du choc septique et comme cibles pharmacologiquement modulables à des fins éventuellement thérapeutiques.

Mots clés : microparticules, choc septique, coagulation intravasculaire disséminée, protéine C activée, endothélium, inflammation, hémostasie.

Résumé en anglais

Septic shock is characterized by an intense cell activation marked by an excessive generation of microparticles (MPs), released into the extracellular space after plasma membrane remodeling. MPs take part in cardiovascular dysfunction and coagulopathy of septic shock.

We investigated the role of circulating MPs as pathogenic markers, by studying the effects of exogenous fatty acids on plasma membrane remodeling and MP generation, in vitro with cultured cells stimulated by an endotoxin and in vivo in septic rats. We have then characterized the cellular activation of septic shock in humans, using circulating MPs as evidence of vascular dysfunction and shown the place of MPs as potential therapeutic targets, through their pharmacological modulation in a rat model of septic shock.

We have therefore shown the interest of MPs as a new tool to explore septic shock pathophysiology and as therapeutic targets than can be pharmacologically modulated.

Key words: microparticles, septic shock, disseminated intravascular coagulation, activated protein C, endothelium, inflammation, hemostasis.