

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Unité de Recherche INSERM UMR_S 1260 « Nanomédecine Régénérative »

THÈSE présentée par :

Louise CHOMEL

soutenue le : **19 septembre 2023**

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

Discipline/ Spécialité : **Hématologie et Physiopathologie Vasculaire**

**Étude des mécanismes d'activation des
polynucléaires neutrophiles au cours du choc
septique associée à une coagulation
intravasculaire disséminée (CIVD)**

THÈSE co-dirigée par :

M. MEZIANI Ferhat

Professeur, INSERM UMR_S 1260, Université de Strasbourg

M. MAUVIEUX Laurent

Professeur, INSERM UMR_S 1113, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme CHOLLET-MARTIN Sylvie

Professeur, INSERM UMR 996, Université de Paris

Mme VENET Fabienne

Professeur, INSERM U111, Université de Lyon

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mme BIANCHINI Elsa

Enseignant-chercheur, INSERM UMR_S1176, Université de Paris

M. PREVOST Gilles

Directeur de recherche, UR7290, Université de Strasbourg

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à adresser mes plus sincères remerciements aux membres de mon jury, **Madame le Professeur Chollet-Martin, Madame le Professeur Venet, Madame le Docteur Bianchini et Monsieur le Docteur Prevost**, pour avoir pris le temps de juger ce travail.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers mon directeur de thèse, **Monsieur le Professeur Meziani**. Sa persévérance, sa rigueur scientifique et son exigence ont joué un rôle essentiel dans l'aboutissement de ce travail, et resteront pour moi un exemple. Sa bienveillance et sa générosité ont grandement contribué à mon développement tant professionnel que personnel. Je le remercie pour sa direction attentive et son soutien constant au long de cette thèse. Merci.

Je tiens à remercier vivement mon co-directeur de thèse, **Monsieur le Professeur Mauvieux** pour son accompagnement tout au long de ce travail. Sa présence bienveillante et sa patience ont été d'une précieuse aide. Je le remercie chaleureusement pour le partage enthousiaste de ses connaissances et compétences qui a enrichi mon parcours académique.

Merci à tous mes collègues de l'UMR1260 pour leur accueil. Merci à **Margaux, Marine, Céline et Hélène** pour tous ces moments précieux partagés au laboratoire. Mes remerciements vont également au **Docteur Mohamad Kassem**, dont la transmission des connaissances et le soutien ont facilité mon intégration au sein de notre équipe. Je tiens également à exprimer ma reconnaissance à **Madame le Professeur Toti** et à **Fatiha Zobairi** pour leurs conseils avisés et leur écoute.

Je souhaite également remercier les techniciennes en essais cliniques ainsi que l'équipe médicale du service de médecine intensive et réanimation du NHC pour leur aide et disponibilité. Un grand merci à **Madame le Professeur Julie Helms** et à **Monsieur le Docteur Hamid Merdji** pour avoir partagé leurs connaissances. Je tiens tout particulièrement à exprimer ma gratitude au **Docteur Julien Demiselle** pour avoir rendu cette dernière année de thèse plus agréable grâce à son soutien et son humour. Leurs encouragements et leurs conseils précieux ont été déterminant pour l'évolution de ma vocation professionnelle. Un immense merci à tous.

Merci à **Isa** et **Eme** pour leur écoute et leur soutien constant pendant ma thèse. Votre présence à chaque instant a vraiment participé à ma réussite. Merci à Seb, à mes amis pour leurs encouragements.

Enfin, je souhaite remercier ma famille. A toi ma **Jeanne**, merci de n'être jamais très loin, de me redonner force et courage quand j'en avais besoin. Merci particulier à ma **Maman** pour la relecture attentive de ce manuscrit. Merci **Papa** de toujours savoir quand j'ai besoin d'un mot d'encouragement. Merci à **mes parents** pour avoir toujours cru en moi, merci d'être des modèles de persévérance, merci de votre soutien indéfectible dans tous mes projets. Merci pour votre confiance et votre amour.

A toi ma Lily, mon modèle de force et d'espérance à jamais.

Table des matières

REMERCIEMENTS	4
LISTE DES TABLEAUX.....	10
LISTE DES FIGURES.....	11
LISTE DES ABBREVIATIONS.....	13
INTRODUCTION.....	15
<i>I Du sepsis à la coagulopathie.....</i>	<i>16</i>
I.A Sepsis et choc septique : généralités	16
I.A.1 Définitions.....	16
I.A.2 Épidémiologie	17
I.A.3 Étiologies.....	18
L'infection virale au SARS-CoV-2	19
I.A.4 Diagnostic.....	21
I.B La Coagulation Intravasculaire Disséminée.....	23
I.B.1 Définition	23
I.B.2 Épidémiologie	23
I.B.3 Diagnostic.....	24
I.B.4 Pistes thérapeutiques dans la CIVD	26
a. Prévenir les complications thrombotiques.....	27
b. Restaurer l'équilibre entre la coagulation et la fibrinolyse	28
<i>II Physiopathologie du choc septique et de la CIVD</i>	<i>31</i>
II.A Reconnaissance du pathogène et activation des cellules de l'immunité dans l'inflammation systémique aigue	31
II.A.1 Reconnaissance du pathogène et réponse cytokinique	31
a. Les Récepteurs « Toll-Like ».....	32
Les TLRs dans des conditions physiologiques.....	32
Implication des TLRs dans le choc septique	35
Implication des TLRs dans la COVID-19	37
b. Voies de signalisation des TLRs.....	41
II.A.2 Réponse des cellules de l'immunité innée	42
Les Monocytes	44
II.A.3 Réponse Immunitaire adaptative	46

II.A.4	Des réponses pro et anti-inflammatoires concomitantes	48
II.A.5	La réponse inflammatoire au SARS-CoV-2.....	51
II.B	Activation vasculaire aigue	53
II.B.1	Activation endothéliale.....	53
II.B.2	Activation plaquettaire	55
II.C	Dérégulations de l'hémostase dans la CIVD associée au choc septique	56
II.C.1	Activation de la coagulation	57
II.C.2	La fibrinolyse	58
II.C.3	Dérégulations de l'hémostase au cours du choc septique.....	60
II.C.4	Des liens étroits entre immunité et coagulation : l'immunothrombose.....	61
III	Les Polynucléaires Neutrophiles dans la réponse de l'hôte à l'infection.....	64
III.A	Rappels Physiologiques	64
III.A.1	Caractéristiques	64
	Les récepteurs impliqués dans la réponse immunitaire	64
	Les récepteurs Fc γ RIII (CD16).....	65
III.A.2	Chimiotactisme	66
III.A.3	Fonctions des PNN	68
a.	La phagocytose	68
b.	Le métabolisme oxydatif.....	68
III.B	La NETose.....	70
III.B.1	Formation des Neutrophil Extracellular Traps.....	70
a.	Mécanismes	70
b.	Décondensation de la chromatine et élongation de l'ADN au cours du cycle cellulaire	72
	La réplication de l'ADN	72
	Le complexe Mini Chromosome Maintenance	72
c.	La décondensation de l'ADN au cours de la NETose	74
	La Peptidyl-arginine déiminase 4.....	76
	Les protéases des granules primaires du neutrophile	78
	La myéloperoxydase	78
III.B.2	Les NETS dans la défense anti microbienne	79
III.B.3	Les NETs participent à l'activation de la coagulation	80
III.C	Les Dysfonctions des PNN au cours du choc septique	83
III.C.1	La granulopoïèse d'urgence.....	83
III.C.2	L'apoptose.....	84
III.C.3	Migration et adhésion des polynucléaires neutrophiles altérées	85
III.C.4	Altération des fonctions des Neutrophiles	88
a.	La capacité phagocytaire des PNN.....	88
b.	Le métabolisme oxydatif altéré	89

III.C.5	Dérégulation de l'Immunothrombose	89
OBJECTIFS	94
TRAVAUX PERSONNELS	98
<i>I</i>	<i>Article 1: TLR1-10 protein expression in circulating human white blood cells during bacterial and COVID-19 infection.....</i>	<i>99</i>
	Résultats et figures complémentaires	120
<i>II</i>	<i>Signature Protéomique des Polynucléaires Neutrophiles spécifiques des patients avec un choc septique associé à une coagulation intravasculaire disséminée.....</i>	<i>124</i>
II.A	Contexte.....	124
II.B	Objectifs.....	124
II.C	Matériels et Méthodes	124
II.C.1	Patients	124
II.C.2	Déroulement de l'étude.....	125
II.C.3	Prélèvements sanguins	125
II.C.4	Isolement des polynucléaires neutrophiles.....	126
II.C.5	Analyse Protéomique.....	126
II.C.6	Western Blot	127
II.C.7	Induction et inhibition de la NETose in-vitro.....	127
II.C.8	Immunofluorescence	128
II.C.9	Mesure de l'activité phagocytaire des PNN	129
II.C.10	Génération de Plasmine in-vitro	129
II.C.11	Statistique	130
II.D	Résultats	132
II.D.1	Caractéristiques des patients	132
II.D.2	Les patients avec une CIVD du choc septique présentent une signature protéique spécifique 132	
a.	Analyse de la diminution sélective de l'abondance protéique dans les neutrophiles lors de la CIVD induite par le choc septique	134
b.	Les neutrophiles des patients en CIVD surexpriment un groupe de protéines impliquées dans la réplication de l'ADN	136
II.D.3	L'inhibition de l'activité du complexe MCM bloque la NETose dans un modèle in vitro de stimulation bactérienne et non bactérienne	138
II.D.4	L'inhibition du complexe MCM préserve la fonctionnalité des neutrophiles	141
a.	La capacité de phagocytose est intacte après l'inhibition du complexe MCM sur des neutrophiles stimulés	141

b.	La production de plasmine des PNN est conservée après inhibition du complexe MCM	142
II.E	Conclusion.....	145
DISCUSSION	147
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	159
REFERENCES	164
ANNEXES	212
<i>I</i>	<i>ANNEXE 1 : Précisions méthodologiques sur l'analyse protéomique des polynucléaires neutrophiles des patients en choc septique avec ou sans CIVD</i>	<i>212</i>
I.A	Digestion en gel et préparation des échantillons pour la spectrométrie de masse	212
I.B	Analyse LC-MS/MS	212
I.C	Analyse bio-informatique	213
<i>II</i>	<i>ANNEXE 2: Septic Shock as a trigger of arterial stress-induced premature senescence: a new pathway involved in the post sepsis long term cardiovascular complications</i>	<i>215</i>
RESUME	227
ABSTRACT	227

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : SCORE SOFA (SEPSIS-RELATED ORGAN FAILURE ASSESSMENT)	21
TABLEAU 2 : LES SCORES DIAGNOSTIQUES DE LA CIVD DU CHOC SEPTIQUE.	25
TABLEAU 3 : LES RECEPTEURS TOLL-LIKE ET LEURS LIGANDS	34
TABLEAU 4: ROLE DES RECEPTEURS TOLL-LIKE DANS LES CHOCES ENDOTOXINIQUES ET LES SEPSIS BACTERIENS.	36
TABLEAU 5: FONCTIONS DES PRINCIPALES CELLULES DE L'IMMUNITE INNEE.	43
TABLEAU 6 : PRINCIPAUX RECEPTEURS DES NEUTROPHILES.	65
TABLEAU 7: PRODUCTION DE CHIMIOKINES ET CYTOKINES PAR LES NEUTROPHILES	69
TABLEAU 8: TABLEAU D'EXPRESSION DES MFI DES 10 TLRs ET DU CD180 SUR DES LEUCOCYTES HUMAINS	122
TABLEAU 9 : CARACTERISTIQUES CLINIQUES DES PATIENTS A L'ADMISSION	131

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1: ILLUSTRATION DES CRITERES DIAGNOSTIQUES DU SEPSIS ET DU CHOC SEPTIQUE.	16
FIGURE 2: INCIDENCE DU SEPSIS PAR PAYS, EXPRIMEE EN NOMBRE DE NOUVEAUX CAS POUR 100 000 PERSONNES/AN	17
FIGURE 3 : CARACTERISTIQUES PHYSIOPATHOLOGIQUES DES CIVD HEMORRAGIQUES OU THROMBOTIQUES.....	24
FIGURE 4 : LES PISTES THERAPEUTIQUES DANS LE TRAITEMENT DE LA CIVD DU CHOC SEPTIQUE.....	26
FIGURE 5: INTERACTIONS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES AU COURS DE LA PHYSIOPATHOLOGIE DE LA CIVD.....	29
FIGURE 6 : LOCALISATION ET SPECIFICITE DES PRRS	31
FIGURE 7: STRUCTURE D'UN RECEPTEUR TOLL-LIKE.....	33
FIGURE 8: RECONNAISSANCE DU SARS-COV-2 PAR LES RECEPTEURS TOLL-LIKE (TLR).....	39
FIGURE 9: RECEPTEURS DE SURFACE CELLULAIRE ET INTRACELLULAIRE (PRRS) RESPONSABLES DE LA RECONNAISSANCE DES PAMPs ET DES DAMPs (OU ALARMINES).....	42
FIGURE 10: PRINCIPALES CELLULES DE L'IMMUNITE INNEE.....	43
FIGURE 11: SOUS-POPULATIONS MONOCYTAIRES CHEZ L'HOMME EN FONCTION DE L'EXPRESSION DU CD14 ET DU CD16 EN CYTOMETRIE EN FLUX.....	45
FIGURE 12: LA RELATION ENTRE LES DIFFERENTS STADES DE LA REPOSE IMMUNITAIRES.....	46
FIGURE 13: REPONSES PRO- ET ANTI-INFLAMMATOIRES DU SYSTEME IMMUNITAIRE AU COURS DU SEPSIS ET DU CHOC SEPTIQUE ...	48
FIGURE 14: IMPACT DU SEPSIS SUR LES CELLULES DU SYSTEME IMMUNITAIRE INNEE ET ADAPTATIF	50
FIGURE 15: L'IMMUNOTHROMBOSE DANS LES FORMES SEVERES DE COVID-19	52
FIGURE 16: MODIFICATIONS DE L'ENDOTHELIUM VASCULAIRE EN REPOSE AUX STIMULI INFLAMMATOIRES AU COURS DU SEPSIS.	54
FIGURE 17 : ROLES PRO-INFLAMMATOIRES DES PLAQUETTES AU COURS DU SEPSIS.....	55
FIGURE 18 : EXPRESSION DU FACTEUR TISSULAIRE ET INITIATION DE LA CASCADE DE COAGULATION.	57
FIGURE 19: LES VOIES "INTRINSEQUES" ET "EXTRINSEQUES" DE LA COAGULATION ET LE ROLE DE LA THROMBINE.	58
FIGURE 20: LE ROLE CENTRAL DE LA PLASMINE DANS LA FIBRINOLYSE ET SES MECANISMES DE REGULATION.....	59
FIGURE 21: ROLE DE L'IMMUNOTHROMBOSE DANS LA DEFENSE IMMUNITAIRE.....	62
FIGURE 22 : NEUTROPHILES : DEVELOPPEMENT, MIGRATION, ADHESION ET FONCTIONS.....	67
FIGURE 23: LES DEUX VOIES PERMETTANT LA FORMATION DES NETS.....	71
FIGURE 24: IMPLICATION DU COMPLEXE MCM DANS L'INITIATION ET L'ELONGATION DE LA REPLICATION DE L'ADN CHEZ LES EUCARYOTES.....	73
FIGURE 25: STRUCTURE DU COMPLEXE <i>MINI CHROMOSOME MAINTENANCE</i> . EN FORME INACTIVE, L'ANNEAU EST OUVERT ENTRE LES PROTEINES MCM2 ET MCM5. EN FORME ACTIVE, L'ANNEAU EST FERME, L'ACTIVITE HELICASE PEUT COMMENCER. ISSU DE N. E. SIMON & SCHWACHA, 2014.....	74
FIGURE 26: MODIFICATIONS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DU POLYNUCLEAIRE NEUTROPHILE AU COURS DE LA NETOSE.	75
FIGURE 27: LES VOIES DE CITRULLINATION DANS LA SANTE ET LES MALADIES	77
FIGURE 28: LES NETs PARTICIPENT A LA GENERATION DE FIBRINE VIA UNE DEREGULATION DE LA COAGULATION.	82
FIGURE 29: DYSFONCTIONS DE LA REPOSE IMMUNITAIRE INNEE AU COURS DU CHOC SEPTIQUE.....	87
FIGURE 30: L'IMMUNOTHROMBOSE DEREGULEE	90
FIGURE 31: FLOW CYTOMETRY ANALYSIS OF LEUKOCYTES FROM PATIENTS.....	120

FIGURE 32: PERCENTAGE OF SUBPOPULATION MONOCYTES IN SEPTIC SHOCK AND COVID-19 PATIENTS COMPARED TO HEALTHY VOLUNTEERS.	121
FIGURE 33: TLR4 DIFFERENTIAL EXPRESSION IN THE SUBPOPULATIONS OF MONOCYTES IN PATIENT GROUPS.	121
FIGURE 34: SCHEMA METHODOLOGIQUE DE LA GENERATION DE PLASMINE A PARTIR DE POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES IN-VITRO.	130
FIGURE 35: ANALYSE BIO-INFORMATIQUE DES PROTEINES DIFFERENTIELLEMENT EXPRIMEES CHEZ LES PATIENTS EN CHOC SEPTIQUE AVEC OU SANS CIVD.	133
FIGURE 36 : REPRESENTATION DES RESEAUX FONCTIONNELS DES PROTEINES MOINS ABONDANTES DANS LES NEUTROPHILES DES PATIENTS AVEC UNE CIVD DU CHOC SEPTIQUE PAR RAPPORT AUX PATIENTS SANS CIVD A L'ADMISSION.	135
FIGURE 37: LES NEUTROPHILES DES PATIENTS ATTEINTS DE CIVD AVEC CHOC SEPTIQUE ONT UNE EXPRESSION REDUITE (p<0.05) DES PROTEINES PTX3 (A), PAD4 (B), MMP9 (C) ET LCN2 (D) PAR RAPPORT AUX PATIENTS EN CHOC SEPTIQUE A L'ADMISSION.	136
FIGURE 38: REPRESENTATION DES RESEAUX FONCTIONNELS DES PROTEINES PLUS ABONDANTES DANS LES NEUTROPHILES DES PATIENTS AVEC UNE CIVD DU CHOC SEPTIQUE.	137
FIGURE 39 : IMAGES REPRESENTATIVES D'IMMUNOFLUORESCENCE DE POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES NON STIMULES (A), STIMULES AVEC <i>ESCHERICHIA COLI</i> (B) OU AVEC DE LA PMA (C).	139
FIGURE 40 : INHIBITION DE LA NETOSE DOSE DEPENDANTE DE LA CIPROFLOXACINE IN VITRO.	140
FIGURE 41: IMAGES REPRESENTATIVES D'IMMUNOFLUORESCENCE DE POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES STIMULES AVEC <i>ESCHERICHIA COLI</i> (A) OU AVEC DE LA PMA (B) ET TRAITES AVEC DE LA CIPROFLOXACINE.	141
FIGURE 42: MESURE DE L'INTENSITE DE FLUORESCENCE DE BACTERIES <i>ESCHERICHIA COLI</i> MARQUEE AU FITC SUR DES NEUTROPHILES NON STIMULES (A), STIMULES AVEC DU PMA (B), STIMULES AVEC DU PMA ET TRAITES AVEC DE LA CIPROFLOXACINE (C).	142
FIGURE 43: GENERATION DE PLASMINE A DES DOSES CROISSANTES D'UROKINASE (UPA) SUR DES POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES NON STIMULES (LIGNE NOIR), STIMULES PAR <i>ESCHERICHIA COLI</i> (A, LIGNE ROUGE VIF), STIMULES PAR LA PMA (B, LIGNE BLEU VIF) ET STIMULES ET TRAITES AVEC DE LA CIPROFLOXACINE (A, LIGNE ROUGE SOMBRE OU B, LIGNE BLEU SOMBRE).	144

LISTE DES ABBREVIATIONS

ACE2 : *Angiotensin-converting enzyme 2*
Ag : Antigènes
AMP : Peptides antimicrobiens
APACHE II: *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II*
AT: Antithrombine
BCR: *B-Cell Receptor*
CIVD/ DIC : *Coagulation Intravasculaire Disséminée /Disseminated Intravascular Coagulation*
CLR : C-type lectin Receptors
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
COVID-19 : *COronaVirus Disease-19*
CPA : Cellules Présentatrices d'antigènes
CRP : Protéine C Réactive
DAMPs : *Damaged Associated Molecular Patterns*
EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique
ERN : Espèce Réactive à l'Azote
ERO/ROS : Espèce Réactive à l'Oxygène / *Reactive Oxygene Species*
ERK: *Extracellular Regulated Kinases*
FDR: *False Discovery Rate*
fMLP: formylmethionyl Leucyl Phenylalanine
FT : Facteur Tissulaire
GMP : Cellules Progénitrices des Monocytes et des Granulocytes
GO: Gene Ontology
GSDMD: Gasdermin D
HBPM : Héparine à Bas Poids Moléculaire
HLA: *Human Leukocyte Antigen*
HMGB1: High-Mobility Group Box 1 Protein
HNF : Héparine Non Fractionnée
IA : Intelligence Artificielle
ICU: Intensive Care Unit
Ig: Immunoglobuline
INR: *International Normalized Ratio*
iNOS: NO synthetase inductible
IQR: Interquartile Range
ISTH: *International Society for Acute Medicine*
JAAM: *Japanese Association for Acute Medicine*
LBP: *LPS Binding Protein*
LPS: Lipopolysaccharide
MAPK: *Mithogen Activated Protein Kinase*
MCM: Mini Chromosome Maintenance
MFI: *Mean Fluorescence Intensity*
MPO: Myeloperoxydase
MV: Microvésicules
MyD88: *Myeloid Differentiation Factor 88*
NAPDH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

NE : *Neutrophil Elastase* (Elastase du Neutrophile)
NET: *Neutrophil Extracellular Trap*
Nf-κB: *Nuclear Factor Kappa B*
NLR: Nucleotide binding oligomerization domain-like Receptors
NO : *Nitric Oxid* / Monoxyde d'azote
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PAD4: Peptidylarginine deiminase 4
PAMPs: *Pathogen Associated Molecular Patterns*
PAR : Récepteurs activés par les Protéases
PBS : Phosphate Saline Solution
PCa : Protéine C activée
PCT : Procalcitonine
PD-1: *Programmed Death 1*
PFA : Paraformaldéhyde
PKC : Protéine Kinase C
PMA : phorbol myristate acetate
PNN : Polynucléaires Neutrophiles
PRRs : *Pattern Recognition Receptors*
PSGL-1 : Ligand 1 de la glycoprotéine P-selectine
qSOFA: *Quick SOFA*
RANTES: *Regulated on Activation, normal T cell Expressed and Secreted*
RLR: Retinoic Acid Inducible gene-1 like Receptors
SARS-CoV-2 : *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*
SDRA : Syndrome de Détresse Respiratoire Aigu
SIC: *Sepsis Induced Coagulopathy*
SOFA: *Sepsis-related Organ Failure Assessment*
TAFI: *Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor*
TCR : *T-Cell Receptor*
TFPI: *Tissue Factor Pathway Inhibitor*
TIR : *Toll/Interleukin-1 Receptor*
TIRAP: *Toll-Interleukin 1 Receptor Domain Containing Adaptor Protein*
TLR: Toll-Like Receptors
TM: Thrombomoduline
TNF-α : *Tumor Necrosis Factor α*
TRAM: *TRIF Related Adaptor Molecule*
TRIF: *TIR-domain containing adaptor inducing Interferon β*
t-PA: Activateur tissulaire du Plasminogène
uPA: urokinase
WBC: *White Blood Cells*

INTRODUCTION

I Du sepsis à la coagulopathie

I.A Sepsis et choc septique : généralités

I.A.1 Définitions

Depuis le premier symposium en 1991, plusieurs conférences de consensus et de nombreuses publications ont été consacrées à la définition du sepsis dans le but d'établir des critères standardisés et d'améliorer le diagnostic précoce. Les définitions les plus récentes du sepsis et du choc septique ont été présentées lors de la dernière conférence en 2016 (**Figure 1**, (Singer et al., 2016)).

Ainsi, le sepsis est défini comme une réponse systémique aiguë à une infection provoquant une dysrégulation de l'organisme entraînant une ou des défaillances d'organes, mettant en jeu le pronostic vital du patient.

La dysfonction d'organes est liée à 3 grands mécanismes qui s'associent et s'aggravent mutuellement :

- l'activation majeure dérégulée de l'immunité, notamment par l'orage cytokinique
- la dysfonction de plusieurs voies métaboliques
- l'état de choc avec une dysfonction vasculaire

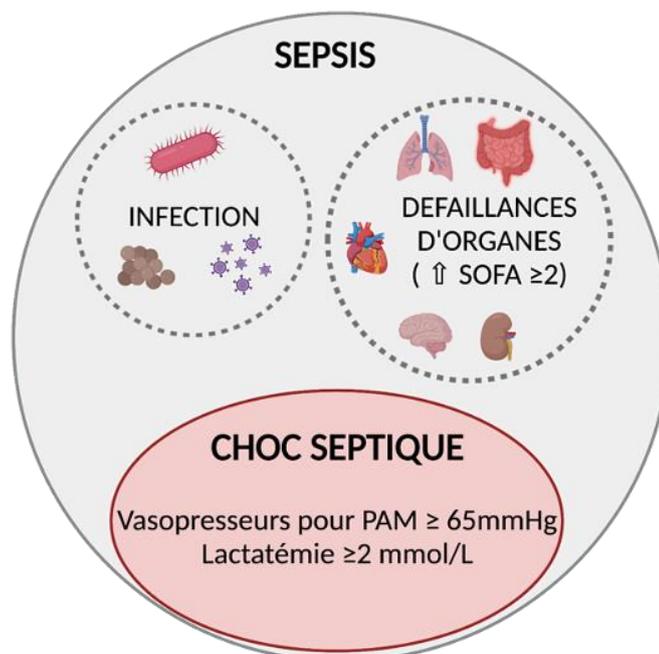


Figure 1: Illustration des critères diagnostiques du sepsis et du choc septique.
Adaptée de Singer et al., 2016

Le choc septique est la forme la plus sévère d'une infection. C'est un sepsis sévère, auquel s'ajoutent deux critères :

- une hypotension artérielle réfractaire au remplissages vasculaires nécessitant un recours aux vasopresseurs pour maintenir une pression artérielle supérieure ou égale à 65mmHg ;
- une hyperlactatémie supérieure à 2mM.

Ainsi, les dernières définitions mettent clairement en évidence la dérégulation de la réponse de l'hôte, reflétant une meilleure compréhension de la physiopathologie du sepsis.

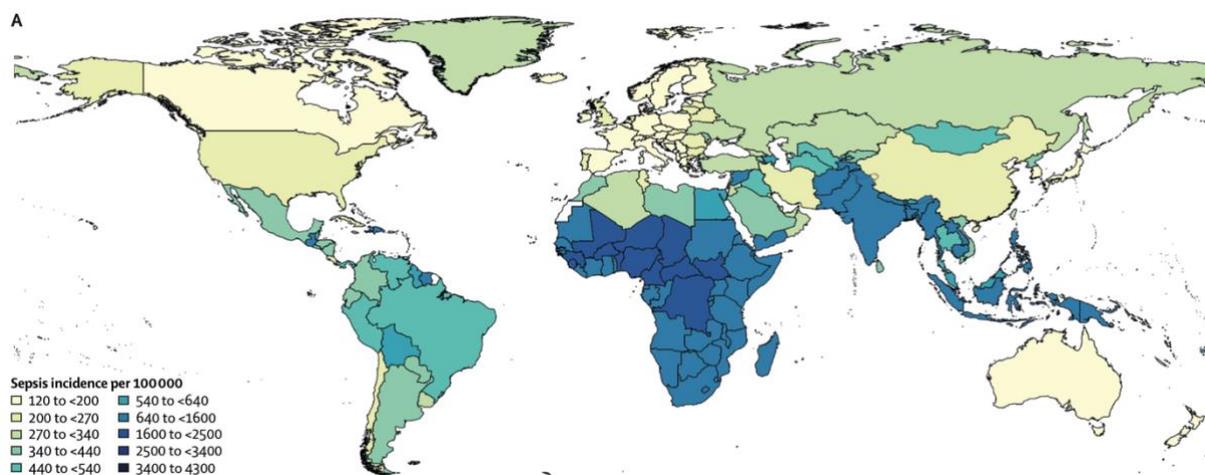


Figure 2: Incidence du sepsis par pays, exprimée en nombre de nouveaux cas pour 100 000 personnes/an
Issu de Rudd et al., 2020

I.A.2 Épidémiologie

Le sepsis est la principale cause de décès dans les infections. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) attribue au sepsis 1 décès sur 5 dans le Monde, ce qui représente environ 11 millions de décès par an. En Europe, le sepsis est responsable de 700 000 morts dont 45 000 en moyenne en France (Rudd et al., 2020; Seymour et al., 2016). D'importantes disparités géographiques (**Figure 2**) sont observées avec une incidence et une mortalité plus importantes en Afrique subsaharienne et en Asie du Sud-Est.

Dans les pays occidentaux, le choc septique représente 10 à 15% des admissions en réanimations (J.-L. Vincent, Jones, et al., 2019). En France, l'âge médian des patients ainsi

admis est de 68 ans [IQR, 58-78], avec une nette prédominance masculine (64%) (Quenot et al., 2013). En 2015, le taux d'incidence du choc septique était de 171 cas pour 100 000 habitants par an, chiffre en augmentation de 35% sur 5 ans. Malgré les avancées réalisées dans le développement de traitements anti-infectieux efficaces et une prise en charge adaptée, la mortalité du choc septique reste élevée, avec une moyenne de 42% à 28 jours (Dupuis et al., 2020).

L'incidence du sepsis et du choc septique devrait poursuivre son augmentation, principalement du fait de l'augmentation de la prévalence des populations vulnérables (population vieillissante, augmentation des pathologies chroniques et des patients immunodéprimés). A titre d'exemple, selon les critères retenus pour le choc septique aux États-Unis, l'incidence pourrait augmenter dans le futur de 5 % à 20 % par an (Kadri et al., 2017).

Ce qui a conduit l'OMS à définir en 2017 la prévention, le diagnostic et la prise en charge du sepsis comme une priorité mondiale en termes de santé publique (World Health Assembly, 2017).

I.A.3 Étiologies

Dans le sepsis, l'infection initiale peut se développer à partir de n'importe quel tissu ou organe du corps et se propager à travers le système circulatoire. Les infections affectent le plus souvent par ordre décroissant les poumons (64%), les organes abdominaux (20%), entraînant une bactériémie (20%) et bactériurie (14%) (Karlsson et al., 2007; J.-L. Vincent et al., 2006, 2009) . L'infection peut être d'origine communautaire ou nosocomiale. Néanmoins, 80% des cas de sepsis traités à l'hôpital sont d'origine communautaire.

La majorité des cas de sepsis sont causés par des infections bactériennes. Les bacilles gram négatif, tels notamment *Escherichia coli*, *Klebsiella* et *Pseudomonas aeruginosa*, sont les plus fréquemment impliqués, représentant de 40% à 60% des cas de sepsis. Les cocci gram positif, en particulier *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pneumoniae*, constituent la deuxième cause la plus courante de sepsis. Le sepsis peut également être causé par d'autres agents pathogènes, tels que des champignons, des parasites ou des virus comme le SARS CoV-2.

L'infection virale au SARS-CoV-2

Le virus à l'origine de la pandémie mondiale de COVID-19 (COronaVirus Disease-19). est un nouveau coronavirus appelé « SARS-CoV-2 » (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*), identifié pour la première fois chez l'homme en décembre 2019 (Zhou et al., 2020). Il possède une structure sphérique enveloppée caractérisée par quatre protéines : la protéine de spicule (*Spike, S*) permettant son entrée dans les cellules hôtes en se liant au récepteur ACE2 (*Angiotensin-converting enzyme 2*) (Watanabe et al., 2020; Zhang et al., 2021), la protéine de membrane (M) impliquée dans l'assemblage viral (Neuman et al., 2011), la protéine d'enveloppe (E) favorisant la libération des particules virales (Boson et al., 2021; Cabrera-Garcia et al., 2021) et enfin, la protéine de nucléocapside (N) associée à l'ARN génomique et jouant un rôle dans l'encapsidation du génome viral et la modulation des voies de signalisation cellulaire (Cubuk et al., 2021). Ces glycoprotéines forment une enveloppe virale en forme de couronne, caractéristique de cette famille de virus.

L'infection par le SARS-CoV-2 peut-être asymptomatique ou entraîner des signes cliniques peu spécifiques similaires à ceux du sepsis. Cependant, chez certains patients, en particulier ceux avec des facteurs de risque de sévérité, les symptômes peuvent s'aggraver, se manifestant par une atteinte respiratoire basse pouvant aller jusqu'à un syndrome de détresse respiratoire aiguë (Matheson & Lehner, 2020).

Les patients infectés par le SARS-Cov-2 peuvent être classés en cinq catégories en fonction de la gravité des signes cliniques (*Clinical Spectrum*, n.d.) :

- Forme asymptomatique ou présymptomatique : individus testés positifs au SARS-CoV-2 à l'aide d'un test virologique mais ne présentant aucun symptôme compatible avec la COVID-19
- Forme mineure : individus ayant des symptômes variés de la COVID-19 mais n'ayant pas de dyspnée, de gêne respiratoire ou sans anomalie à l'imagerie thoracique
- Forme modérée : individus présentant des signes d'affection des voies respiratoires basses lors de l'examen clinique ou à l'imagerie et ayant une saturation en oxygène mesurée par oxymétrie de pouls (SpO_2) $\geq 94\%$ en air ambiant
- Forme sévère : individus ayant une $SpO_2 < 94\%$ en air ambiant, un rapport de la pression partielle artérielle en oxygène et de la fraction inspirée d'oxygène (PaO_2/FiO_2) $< 300\text{mmHg}$, une fréquence respiratoire > 30 cycles / min, et /ou un infiltrat pulmonaire $> 50\%$
- Forme critique : individus présentant un SDRA, un choc septique, et/ou une défaillance multiviscérale.

La COVID-19 se présente avec une grande diversité de signes cliniques et de gravité, suggérant une implication complexe du système immunitaire. Ces observations ont conduit les cliniciens à considérer les formes sévères de COVID-19 comme étant associées à un état de sepsis viral (H. Li et al., 2020)

Finalement, il est utile de signaler que chez près de 40% des patients hospitalisés en réanimation pour sepsis, aucun microorganisme n'est identifié (Phua et al., 2013; Thorndike & Kollef, 2020). Pourtant, l'isolement et l'identification du microorganisme pathogène est un élément crucial du diagnostic de sepsis.

I.A.4 Diagnostic

Le diagnostic de sepsis repose sur la présence d'une infection associée à une défaillance d'organes.

La dysfonction d'organes est quantifiée par le score SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment), résumé dans le **Tableau 1** ci-dessous. Ce score se quantifie de 0 à 24 points, il est considéré comme positif s'il est supérieur ou égal à deux dans le sepsis. Bien corrélé à la gravité, il évalue l'importance clinique d'un sepsis sur l'évaluation fonctionnelle de 6 systèmes organiques : hémodynamiques, respiratoires, neurologique, rénale, hépatique et hémostatique (J. L. Vincent et al., 1996).

Tableau 1 : Score SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment)

^a avec assistance respiratoire ; ^b catécholamines administrées pendant au moins une heure (doses en µg/kg/min). PAM : pression artérielle moyenne ; Dopa : dopamine ; Epi : épinephrine ; Norepi : norépinephrine ; SNC : système nerveux central. **D'après J. L. Vincent et al., 1996.**

Organe / Système	0	1	2	3	4
Respiration PaO ₂ /FiO ₂ (mmHg)	> 400	≤ 400	≤ 300	≤ 200 ^a	≤ 100 ^a
Coagulation Plaquettes (10 ⁹ /L)	> 150	≤ 150	≤ 100	≤ 50	≤ 20
Hépatique Bilirubine (µmol/L)	< 20	20-32	33-101	102-204	> 204
Cardiovasculaire Hypotension	PAM ≥ 70 mmHg	PAM < 70 mmHg	Dopa ≤ 5 ^b or Dobutamine (any dose)	Dopa > 5 or Epi ≤ 0.1 or Norepi ≤ 0.1 ^b	Dopa > 15 or Epi > 0.1 or Norepi > 0.1 ^b
SNC Score de Glasgow	15	13-14	10-12	6-9	< 6
Rénal Creatinine (µmol/L) Urines émises (mL/j)	< 110	110-170	171-299	300-440 < 500	> 440 < 200

Ce score SOFA est, cependant, relativement peu applicable au lit du malade à cause de ces nombreux critères et la nécessité d'avoir les résultats des examens biologiques. Les dernières recommandations (Evans et al., 2021) conseillent d'utiliser une version simplifiée du SOFA, le « quickSOFA » (qSOFA) afin de permettre au clinicien d'évaluer rapidement les patients avec un risque de défaillances d'organes, et donc de sepsis. Le qSOFA utilise 3 variables cliniques : une pression artérielle systolique basse (≤100 mmHg), une fréquence respiratoire haute (≥ 22 respirations/min) et un score de Glasgow (<15). Lorsque deux ou trois de ces variables sont présentes simultanément, le patient est considéré comme positif au qSOFA.

Le diagnostic de choc septique sera posé suite à la persistance des signes d'hypoperfusion malgré une expansion volémique adéquate associée à une hyperlactatémie, avec la nécessité d'introduction d'un support vasopresseur.

Le diagnostic rapide de sepsis reste un défi en raison de la variabilité des réponses de l'organisme à l'infection, ce qui peut entraîner des retards dans la prise en charge et augmenter la mortalité. Un diagnostic à tort de sepsis conduit à une utilisation excessive d'antibiotiques, participant ainsi à l'augmentation de la résistance à ces produits. Un diagnostic précis et rapide dans le sepsis est essentiel pour réduire la morbidité et la mortalité.

Au cours des 10 dernières années, la recherche de biomarqueurs s'est appuyée sur le « machine learning » et l'intelligence artificielle (IA). L'étude de Nemati *et al.* a montré que leur algorithme, avec une AUC de 0.85 pouvait détecter le sepsis chez des patients de réanimation 4 à 12 heures avant les manifestations cliniques (Nemati et al., 2018). Les modèles d'IA ont un grand potentiel pour améliorer le diagnostic précoce des patients en sepsis (Schinkel et al., 2019). L'IA, le « machine learning » et le « big data » ont également prouvé leur efficacité dans la capacité à détecter différents phénotypes de patients. Le « machine learning » a permis à Seymour *et al.* de montrer, qu'à partir des données démographiques, des valeurs de laboratoires et des dysfonctions d'organes de 63 358 patients en sepsis, il était possible de distinguer quatre phénotypes distincts de sepsis. Ces phénotypes s'avèrent fortement corrélés avec les caractéristiques de la réponse immunitaire de l'hôte, à l'évolution clinique du patient et à la mortalité (Seymour et al., 2016). Bien que la grande majorité des études soient des études rétrospectives, ces résultats associant le « machine learning », l'IA et le big data pourraient permettre de mieux stratifier les patients et améliorer leur traitement.

Néanmoins, jusqu'à présent, aucun biomarqueur spécifique du sepsis et du choc septique n'a été identifié sur le plan biologique (Faix, 2013; Kyriazopoulou et al., 2021). La présence d'une hyperlactatémie est l'un des critères du choc septique et cette augmentation est corrélée à la mortalité. Les recommandations de la campagne « Surviving Sepsis » conseillent aux cliniciens la mesure du taux de lactate dans le sérum dès la première heure du diagnostic (Evans et al., 2021). Cependant, ce marqueur reflète une hypoxie et une hypoperfusion tissulaire, il n'est donc pas spécifique ni au sepsis ni au choc septique.

Certaines valeurs biologiques peuvent être des marqueurs pour les cliniciens comme l'hyperleucocytose, ou *a contrario* la leuco-neutropénie, l'augmentation de la protéine C réactive (CRP) ou la procalcitonine (PCT) (Kyriazopoulou et al., 2021). L'atteinte systémique du sepsis et du choc septique provoque de nombreuses altérations des analyses biologiques, témoignant des défaillances d'organes, que ce soit au niveau rénal, hépatique ou encore vasculaire avec les stigmates de la coagulation intravasculaire disséminée (CIVD).

I.B La Coagulation Intravasculaire Disséminée

I.B.1 Définition

La CIVD est une complication thrombo-hémorragique associée au choc septique, engageant aggravant le pronostic vital des patients. La Société Internationale de Thrombose et d'Hémostase (ISTH) a défini la CIVD comme un syndrome acquis caractérisé par une activation systémique anormale de la coagulation au sein du système vasculaire avec une formation de *microthrombi* fibrineux intravasculaires et viscéraux (Taylor et al., 2001). Ce processus entraîne la consommation des facteurs humoraux et cellulaires de l'hémostase, suivi d'une fibrinolyse inadéquate. La CIVD est un syndrome multi-thrombotique engageant principalement la microcirculation, aggravant des lésions microvasculaires systémiques par ischémie et des dysfonctions d'organes (Popescu et al., 2022).

La CIVD est une complication associée à de multiples pathologies, provenant de différentes origines : infectieuses, obstétricales, traumatiques, hématologiques, ainsi que des syndromes de lyse tumorale associés aux maladies hématologiques et néoplasiques. Un quart des CIVD serait associé au choc septique (Popescu et al., 2022).

Dans ce présent travail, j'aborderai seulement la description de la coagulopathie associée au choc septique.

I.B.2 Épidémiologie

L'incidence de la CIVD varie en fonction du tableau clinique, de l'affection sous-jacente, des critères de diagnostic avec une composante géographique (Gando et al., 2016). Les taux de mortalité varient de 31 à 86% malgré des traitements adaptés (Iba et al., 2023; Popescu et al., 2022). La mortalité des patients avec une CIVD est néanmoins toujours supérieure à celle des

patients sans CIVD (Gando et al., 2016). On observe une surmortalité des patients avec une CIVD du choc septique, 43% comparé aux 27% chez les patients sans CIVD, $p < 0,05$. De plus, 81% des patients en choc septique atteints d'une CIVD ont une défaillance multiviscérale persistante au 7ème jour contre 49% des patients sans CIVD, $p < 0,05$ (Helms et al., 2022).

I.B.3 Diagnostic

La progression de la CIVD est généralement décrite en deux étapes. La première, dite « biologique » ou « pré-CIVD » est asymptomatique, au cours de laquelle le système de coagulation est encore compensé. Ensuite, survient la deuxième étape, plus « clinique » caractérisée par l'apparition d'une symptomatologie qui peut se manifester sous deux phénotypes distincts : hémorragique ou thrombotique (**Figure 3**, (Popescu et al., 2022)). Dans la grande majorité des cas, la CIVD septique est associée à un phénotype thrombotique.

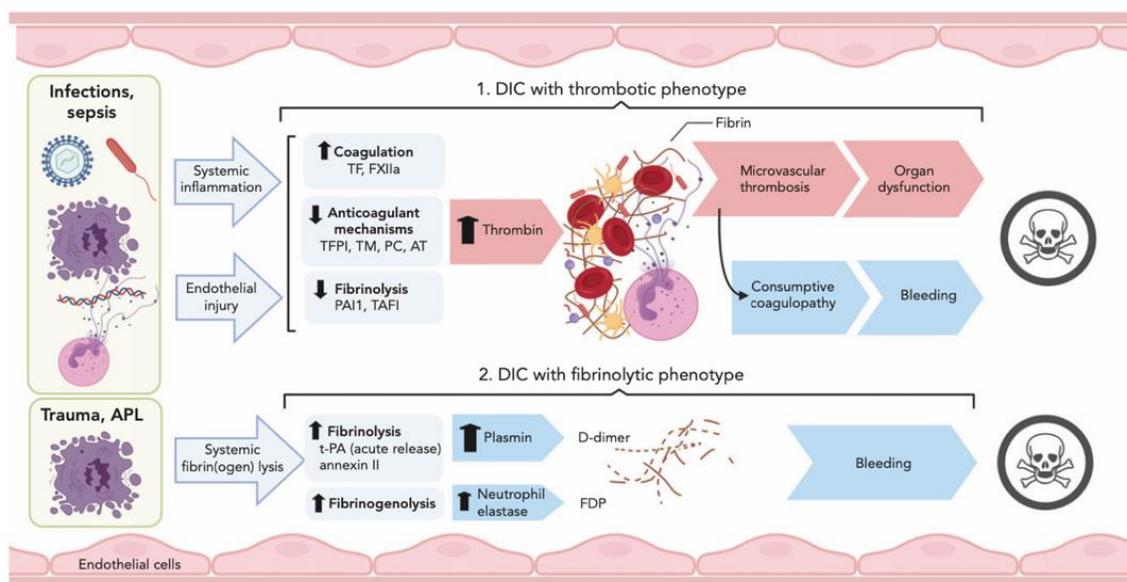


Figure 3 : Caractéristiques physiopathologiques des CIVD hémorragiques ou thrombotiques. D'après Popescu et al., 2022.

A ce jour, il n'y a aucun « gold-standard » ni aucun test spécifique de laboratoire pour diagnostiquer une CIVD. C'est pourquoi, plusieurs scores diagnostiques, décrits dans le **Tableau 2** ci-dessous ont été établis, prenant en compte des paramètres de l'hémostase classique. Pour diagnostiquer une CIVD dans le cadre d'un sepsis ou d'un choc septique, les scores les plus couramment utilisés sont ceux de l'ISTH et de la Société de Médecine Intensive Japonaise (JAAM). Selon ces scores un diagnostic de CIVD peut être établi si le score ISTH est supérieur ou égal à 5 (Taylor et al., 2001), ou si le score JAAM-DIC est égal ou supérieur à 4

(Iba et al., 2016). Les scores JAAM-DIC et ISTH semblent avoir des performances similaires pour diagnostiquer une CIVD chez des patients en choc septique (Helms et al., 2020). Les dernières recommandations formulées par Iba *et al.* conseillent l'utilisation d'un score simplifié, le « Sepsis-Induced coagulopathy » ou SIC, pour les patients septiques avec une thrombopénie et qui pourraient bénéficier d'une anticoagulation à la phase précoce de la CIVD (Iba et al., 2019). Le score SIC repose sur des éléments diagnostics simples : l'INR, le taux de plaquettes et le score SOFA. Si le score est positif, il est éventuellement suivi du calcul du score ISTH.

Tableau 2 : Les scores diagnostiques de la CIVD du choc septique.

CIVD: Coagulation Intravasculaire Disséminée, ISTH: International Society on Thrombosis and Haemostasis, JAAM: Japanese Association for Acute Medicine, SIC : Sepsis Induced Coagulopathy, SOFA : Sepsis related Organ Failure Assessment). **D'après Iba et al., 2016, 2019; Taylor et al., 2001.**

Paramètres	ISTH	JAAM- DIC	SIC
Antithrombine (%)	-	[0] >70 [1] <70	-
Plaquettes (.10 ⁹ /L)	[0] >100 [1] 50-99 [2] <50	[0] >120 [1] 80 – 119 ou -30% en 24h [3] <80 ou - 50% en 24h	[0] >150 [1] 100 - 150 [2] <100
Taux de Prothrombine (%) / INR	[0] >64 [1] 35-64 [2] <35	[0] >64 [1] <64	[0] <1,2 [1] 1,2 – 1,4 [2] >1,4
Fibrinogène (g/L)	[0] >1,0 [1] <1,0	-	-
D-dimères (µg/mL)	[0] >0,5 [2] 0,5-4,0 [3] >4,0	[0] <5000 [1] 5,0 -15,0 [2] >15,0	-
Score SOFA	-	-	[1] 1 [2] >2
Diagnostic de CIVD	Score ≥ 5 points	Score ≥ 4 points	Score ≥ 4 points

Cependant, ces scores sont peu utilisés en pratique clinique notamment en raison de leurs relatives imperfections. Aucun de ces scores ne permet de détecter les patients avec une CIVD asymptomatique, pourtant ces patients présentent une gravité et un taux de mortalité similaires à ceux ayant une CIVD diagnostiquée à l'admission en réanimation (Delabranche et al., 2016). Les performances diagnostiques des scores varient en fonction de la pathologie initiale, ainsi que de la CIVD (Helms et al., 2020). En outre, ces scores ne permettent pas de distinguer les phénotypes thrombotiques ou hémorragiques des patients avec une CIVD. La

prise en charge thérapeutique des patients atteints d'une CIVD n'est pas standardisée, mais pourrait dépendre du stade évolutif de la CIVD (thrombotique, hémorragique, fibrinolytique), mettant en évidence l'importance d'une stratification préalable appropriée des patients (Helms et al., 2020).

I.B.4 Pistes thérapeutiques dans la CIVD

A l'heure actuelle, tout comme pour son diagnostic, aucun *consensus* n'existe pour le traitement de la CIVD associée au choc septique. La prise en charge se concentre principalement sur le traitement de la pathologie sous-jacente, c'est-à-dire l'urgence du traitement anti-infectieux. Toutefois, différentes approches complémentaires sont actuellement à l'étude afin de prévenir les complications thrombotiques et rétablir l'équilibre entre la coagulation et la fibrinolyse (**Figure 4**, (Helms, Iba, et al., 2023)).

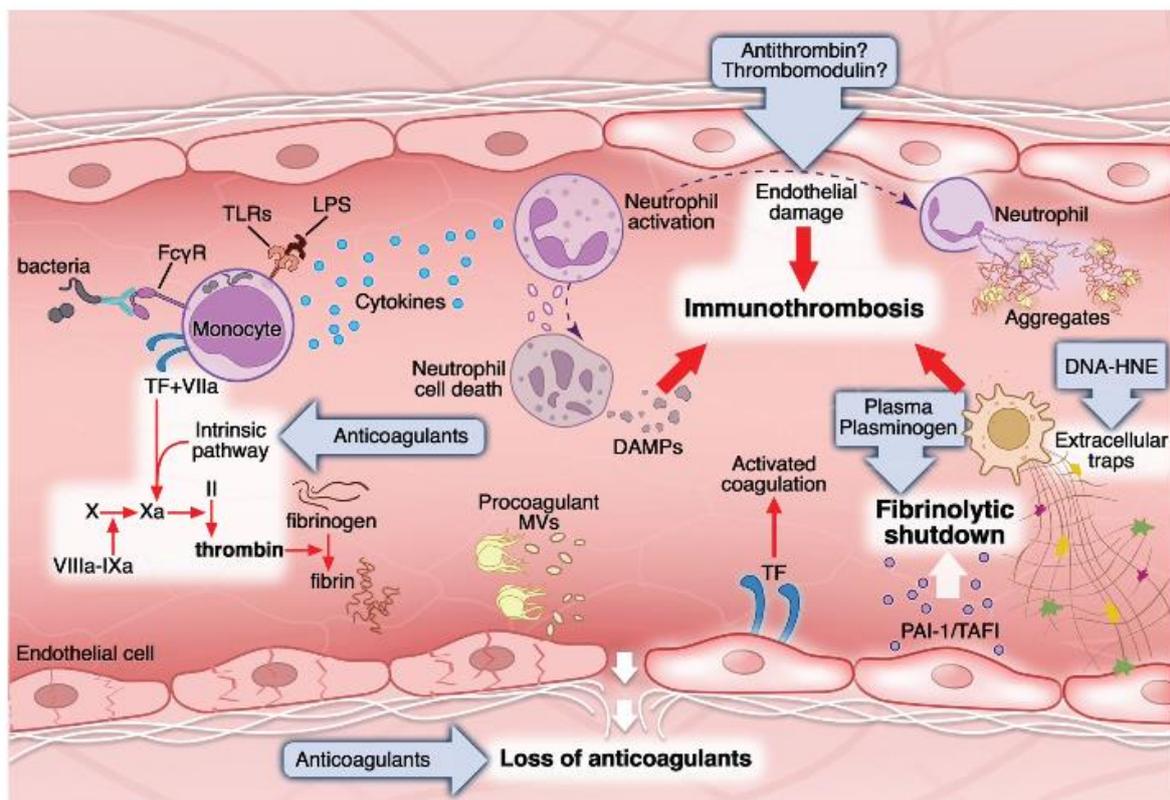


Figure 4 : Les pistes thérapeutiques dans le traitement de la CIVD du choc septique.
D'après Helms et al., 2023

a. Prévenir les complications thrombotiques

L'anticoagulation pourrait réduire la micro-thrombose disséminée en prévenant l'activation excessive de la coagulation et l'immunité. Dans ce cadre, différentes études ont examiné l'utilisation de l'héparine non fractionnée (HNF) ou des héparines à bas poids moléculaires (HBPM) afin d'associer les effets anticoagulants, qui inactivent le facteur Xa et certaines protéases de la coagulation, avec les propriétés immunomodulatrices et anti-inflammatoires de l'héparine (Meziani et al., 2017). C'est ainsi que, plusieurs méta-analyses, dont celle de Wang *et al.* ont montré une réduction de la mortalité chez les patients en sepsis sévère traités par héparine (C. Wang *et al.*, 2014). Cependant, des études randomisées à plus grande échelle sont nécessaires pour confirmer ces résultats. Une étude en double-aveugle portant sur 125 malades atteints de CIVD a comparé l'effet de l'héparine à ceux d'une HBPM, la FR-860 et suggère que le groupe traité avec la HBPM a un taux d'amélioration supérieur (Sakuragawa et al., 1993). Des études *in vivo* ont montré que des inhibiteurs de la coagulation, tels que l'antithrombine ou la protéine C activée, améliore la survie d'animaux septiques (Fourrier et al., 1995; Giebler et al., 1999). Cependant, les études de phase III réalisées chez l'Homme ont conduit à l'arrêt de l'utilisation de l'antithrombine et de la protéine C activée ; leur utilisation chez les patients en CIVD n'améliore pas leur survie et augmente même le risque de complications hémorragiques (Allingstrup et al., 2016; Dhainaut et al., 2003; Warren et al., 2001).

Étant donné les controverses entourant l'utilisation des anticoagulants, les recherches se sont orientées vers l'utilisation de la thrombomoduline comme une alternative potentielle pour prévenir les complications thrombotiques.

La thrombomoduline (TM), glycoprotéine transmembranaire exprimée principalement par les cellules endothéliales, joue un rôle essentiel dans la régulation de l'hémostase. Elle forme un complexe avec la thrombine, activant la protéine C et inhibant les cofacteurs Va et VIIIa, limitant ainsi l'amplification de la cascade de la coagulation (Levi & van der Poll, 2013; Weiler & Isermann, 2003). Dans le cas du choc septique, l'expression de TM est régulée négativement, entraînant un défaut d'activation de la protéine C. La thrombomoduline présente des propriétés anticoagulantes et anti-inflammatoires grâce à son domaine de type lectine qui inhibe la cascade du complément, l'adhésion des leucocytes à l'endothélium,

neutralise le lipopolysaccharide (LPS) et dégrade la protéine pro-inflammatoire à haute mobilité du groupe 1 (HMGB1) (Ito & Maruyama, 2011; Y.-H. Li *et al.*, 2012; Weiler & Isermann, 2003). Ces caractéristiques font de la TM une cible particulièrement intéressante dans le traitement de la CIVD septique. Dans un essai incluant 92 patients avec une CIVD associée au choc septique a montré que le traitement par la thrombomoduline recombinante humaine diminuait le taux de D-dimères et améliorait la rémission, sans améliorer la survie, des patients en CIVD comparé au groupe contrôle (Hagiwara *et al.*, 2016). L'étude SCARLET, une étude internationale randomisée contrôlée, a évalué l'effet de la thrombomoduline recombinante humaine (ART-123) chez des patients atteints de sepsis et de coagulopathie. Bien qu'aucune réduction significative de la mortalité à J28 n'ait été observée dans l'ensemble de l'analyse, ART-123 a montré une plus grande efficacité chez les sous-groupes de patients présentant une coagulopathie persistante et ceux n'ayant pas reçu de traitement concomitant par héparine (J.-L. Vincent, Francois, *et al.*, 2019). Une analyse rétrospective effectuée sur une cohorte de patients français a corroboré ces résultats (François *et al.*, 2021). Ces résultats prometteurs soutiennent l'utilisation potentielle de la thrombomoduline dans le traitement de la CIVD induite par le choc septique.

Dans la coagulopathie septique, les traitements anticoagulants seraient utilisés pour améliorer la réponse de l'hôte face aux conséquences de l'infection. L'activation excessive et dérégulée de la coagulation peut être néfaste pour le patient. Il est donc crucial de distinguer les patients souffrant de choc septique en fonction du niveau d'activation de la coagulation et des mécanismes régulateurs, afin de déterminer si elle est bénéfique car adaptée, ou délétère si elle est excessive. Les patients présentant une activation délétère pourraient bénéficier d'un traitement anticoagulant, contrairement aux patients avec une coagulation contrôlée.

b. Restaurer l'équilibre entre la coagulation et la fibrinolyse

Un autre objectif reconnu dans la recherche thérapeutique face à la CIVD septique est la correction du déséquilibre de la balance entre les acteurs de la coagulation et la fibrinolyse. Ainsi des études sur des patients en choc septique ont récemment montré qu'une supplémentation ou un apport de protéines plasmatiques *via* l'administration de plasma frais réduirait le risque hémorragique, augmenterait l'efficacité de l'héparine participant ainsi à

une amélioration de la survie et du risque d'évolution vers une coagulopathie (El-Nawawy et al., 2021; Helms, Iba, et al., 2023; Stahl et al., 2020; Weng et al., 2021).

Dans une récente étude de preuve de concept sur des patients en choc septique, il a été montré que l'élastase liée à l'ADN des *Neutrophil Extracellular Traps* (NET) dégrade le plasminogène, réduisant ainsi la formation de plasmine et entraînant une diminution de la fibrinolyse (Cruz et al., 2019). Cette hypofibrinolyse joue un rôle essentiel dans le développement d'une CIVD et dans la dysfonction multiviscérale associée. Par ailleurs, une diminution significative de la concentration en plasminogène a été observée chez ces patients. La diminution du plasminogène, dû à la fibrinolyse, ne suffit pas à expliquer la persistance des *microthrombi* dans le contexte de la CIVD septique. Elle pourrait être expliquée par la protéolyse des NETs par l'élastase liée à l'ADN, qui est résistante à son principal inhibiteur l' α 1-protéinase. En conséquence, l'élastase clive le plasminogène en fragments qui ne peuvent plus générer de la plasmine. Dans ce contexte, le sivelestat, un inhibiteur sélectif de l'élastase des neutrophiles, a été utilisé avec succès chez des patients en sepsis associés à un syndrome de détresse respiratoire aiguë et une CIVD, améliorant leur évolution par rapport au groupe témoin (Hayakawa et al., 2010). Un article a également évoqué que l'utilisation du sivelestat dans la COVID-19 pourrait prévenir les complications, et notamment des CIVD (Sahebnasagh et al., 2020). Cibler l'insuffisance fibrinolytique est donc une piste thérapeutique prometteuse dans la CIVD septique.

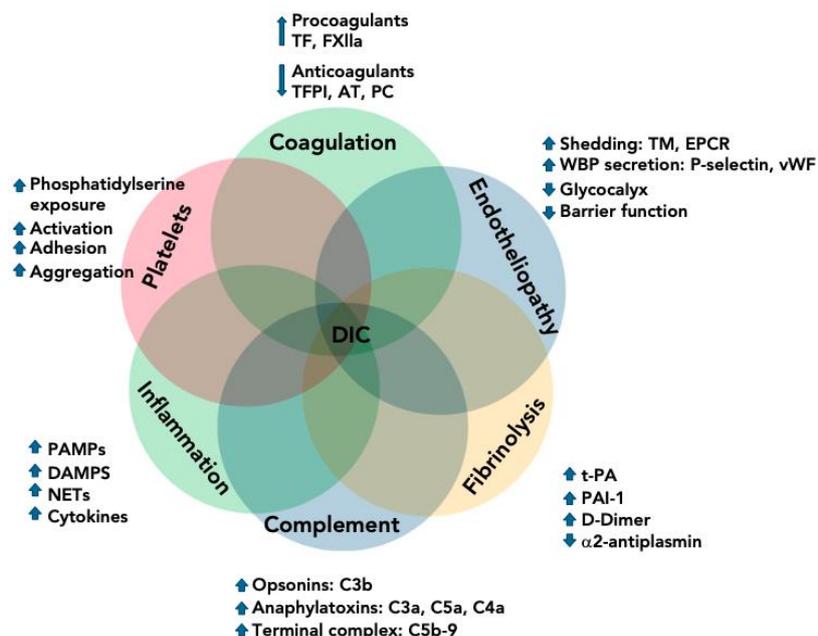


Figure 5: Interactions moléculaires et cellulaires au cours de la physiopathologie de la CIVD. Issu de Popescu et al., 2022.

Le traitement de la CIVD septique demeure un challenge du fait de la complexité de sa physiopathologie (**Figure 5**). Il s'agirait sans doute de trouver un équilibre ou une association entre les différentes pistes thérapeutiques présentées. L'étude de Miyoshi *et al.* a d'ailleurs montré que des patients avec une CIVD septique et une détresse respiratoire sévère présentaient un taux de survie à 60 jours plus élevé lorsqu'ils étaient traités avec une combinaison de TM recombinante et de sivelestat par rapport aux patients traités en monothérapie (Miyoshi et al., 2014).

II Physiopathologie du choc septique et de la CIVD

II.A Reconnaissance du pathogène et activation des cellules de l'immunité dans l'inflammation systémique aigue

II.A.1 Reconnaissance du pathogène et réponse cytokinique

En réponse à l'exposition à un microorganisme pathogène tel que des virus, des bactéries, des champignons ou des parasites, la réponse immunitaire innée se déclenche en quelques minutes (Duan & Mukherjee, 2016). Les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques jouent un rôle essentiel dans l'initiation de cette réponse en détectant les signaux moléculaires de dangers spécifiques des pathogènes, tels que les PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*) ainsi que les DAMPs (*Damaged Associated Molecular Patterns*), libérés par les cellules de l'organisme en réponse à des dommages cellulaires ou à des lésions tissulaires (Mogensen, 2009).

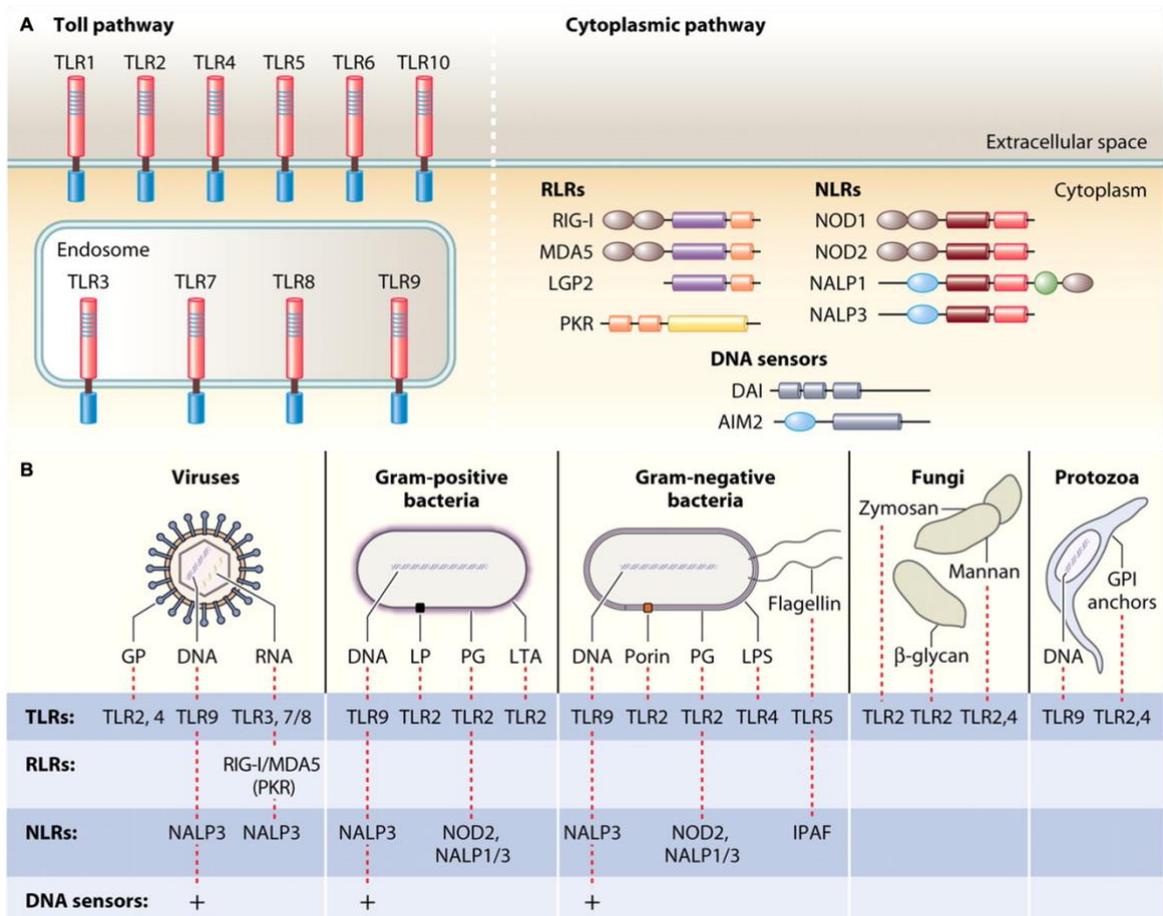


Figure 6 : Localisation et spécificité des PRRs
D'après Mogensen, 2009.

Les PRRs (*Pattern Recognition Receptors*), présents notamment à la surface des cellules immunitaires, sont chargés de reconnaître ces signaux. Les PRRs peuvent être transmembranaires, intracytoplasmiques ou endosomaux (**Figure 6A**). Les PRRs reconnaissent de manière spécifique (**Figure 6B**) les motifs microbiens tels que le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries à gram négatif, mais également les molécules endogènes comme la protéine HMGB1, l'ADN ou l'ARN extracellulaire ou encore les alarmines (Pugin, 2012). Les PRRs englobent quatre grandes familles de récepteurs : les C-type Lectin Receptors (CLRs), les Retinoic acid inducible gene 1-Like Receptors (RLR), les Nucleotide-binding Oligomerization domain-Like Receptors (NLR) et les Toll-Like Receptors (TLRs), récepteurs les plus étudiés des PRRs.

a. Les Récepteurs « Toll-Like »

Cette famille de récepteurs a été initialement identifiée dans l'embryon de drosophile où ils jouent un rôle dans l'établissement de la polarité dorso-ventrale. Le strasbourgeois Jules Hoffmann a été récompensé par le prix Nobel de Physiologie ou Médecine en 2011 pour sa découverte de l'implication des TLRs dans l'immunité de la drosophile adulte (Tauszig et al., 2000). Peu de temps après cette découverte, des récepteurs similaires ont été observés chez les mammifères, qui ont été associés à la résistance aux infections virales, bactériennes et fongiques (Rock et al., 1998).

Les TLRs dans des conditions physiologiques

Les dix récepteurs TLRs décrits chez l'homme peuvent être classés en deux groupes en fonction de leur localisation cellulaire (**Tableau 3**) : ceux ancrés à la membrane plasmique tels que TLR1, TLR2, TLR4, TLR6 et TLR10 et ceux qui se trouvent à l'intérieur des cellules sur la membrane des endosomes TLR3, TLR7, TLR8, TLR9.

Ces récepteurs peuvent être présents à la surface de nombreuses cellules immunitaires ou non, tels que les macrophages et les monocytes, les lymphocytes, les neutrophiles, les cellules dendritiques ou encore les cellules endothéliales, les cellules épithéliales ou les cardiomyocytes (Kawasaki & Kawai, 2014).

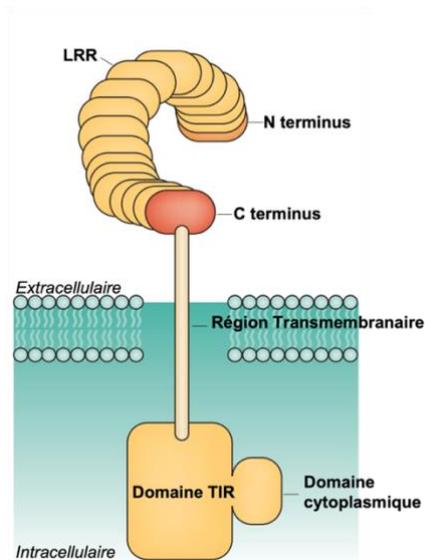


Figure 7: Structure d'un récepteur Toll-like.

C-terminus : carboxyl terminus ; LRR : Leucine Rich Repeat ; N-terminus : amino terminus ; domaine TIR : Toll / Interleukin-1 Receptor containing domain. **Modifié d'après Gay et al., 2006.**

Les TLRs sont des glycoprotéines transmembranaires de type I, composés principalement de 3 domaines (**Figure 7**, Duan & Mukherjee, 2016) :

- un domaine N terminal extracellulaire, composé de 18 à 25 copies d'un motif « Leucine Rich Repeat »,
- un domaine transmembranaire,
- d'un domaine terminal intracellulaire comprenant un domaine « TIR », *Toll/Interleukin-1-receptor*.

Le domaine N terminal des TLR permet la reconnaissance et la fixation des PAMPs et des DAMPS, tels que le LPS bactérien pour le TLR4, les acides nucléiques viraux pour le TLR3, les TLR7, TLR8 ou encore les oligonucléotides non méthylés riches en motif CpG pour le TLR9 ; et d'autres motifs moléculaires associés aux microorganismes (F. Chen et al., 2021; Duan & Mukherjee, 2016). Les principaux ligands des récepteurs TLR sont présentés dans le **Tableau 3**.

Tableau 3 : Les récepteurs Toll-like et leurs ligands

CpG : Cytidine-Phosphate-Guanosine ; DAMP : Damade-Associated Molecular Pattern; ds: double-stranded; HMGB1: High-mobility group box 1; Hsp : Heat-Shock protein; LDL, Lowdensity lipoprote in; LPS: lipopolysaccharide; miARN : Micro ARN; mtADN: AND mitochondrial, MyD88: Myeloid Differentiation Factor88; PAMP: Pathogen-Associated Molecular Patter; TIRAP: TIR domain containing adaptor protein: TLR: toll-like Receptor : TRAM : TRIF-related adaptor molecule; TRIF: TIR domain containing adaptor inducing IFN- β mediated transcription factor. **D’après Chen et al., 2021; Duan & Mukherjee, 2016.**

TLR	Localisation	Molécule Adaptatrice	PAMPs	DAMPs	Distribution dans les Cellules Hématopoïétiques
TLR1	Membrane	MyD88/TIRAP	Triacyl Lipopetide	-	Monocytes, Cellules dendritiques, mastocytes, éosinophiles, basophiles
TLR2	Membrane	MyD88/TIRAP	Lipoproteins, zymosan, LPS atypique, petipdoglycane, lipoarabinomannane	Hsp60, Hsp770, glycoprotéine96, HMGB1, acide hyaluronic, matrix metalloproteinase 2	Monocytes, Cellules dendritiques, mastocytes, éosinophiles, basophiles
TLR3	Endosome	TRIF	dsARN	ARNm	Macrophages, cellules dendritiques, épithélium intestinal
TLR4	Membrane et Endosome	MyD88/TIRAP TRIF/TRAM	LPS, taxol, protéines de fusion et de l’enveloppe	Hsp60, Hsp70, Hsp72, Hsp22, Acide hyaluronique, fibrinogène, HMGB1	Macrophages, cellules dendritiques, mastocytes, eosiphiles
TLR5	Membrane	MyD88	Flagelline	HMGB1	Epithélium intestinal, macrophages, cellules dendritiques
TLR6	Membrane	MyD88/TIRAP	di-acyl lipopetides, lipoteichoic acid, β glucan	β amyloid et LDL oxydé	Monocytes, Cellules dendritiques, mastocytes, éosinophiles, basophiles
TLR7	Endosome	MyD88	ssRNA, imidazoquinoline, loxoribine, bropirimidne	ssARN, miARN	Cellules dendritiques, macrophages, éosinophiles, LymphocytesB
TLR8	Endosome	MyD88	ssRNA, midazoquinoline	ssARN	Macrophages, neutrophiles
TLR9	Endosome	MyD88	ADN ave motid CpG non méthylés, dsADN, hemozoin	Compelxe de chromatin/igG, mtADN	Plasmocytes, eosinophiles, Lymphocytes B, basophiles
TLR10	Membrane	MyD88	Lipopeptides	-	Plasmocytes, eosinophiles, Lymphocytes B, basophiles

À la suite de la liaison des ligands, les TLRs se regroupent en dimères. Ces dimères peuvent prendre la forme d’hétérodimères pour les TLR1/2 et les TLR1/6, ou d’homodimères pour les autres. Lorsque les TLRs se dimérisent, un complexe se forme entre les domaines TIR des TLRs du dimère, ce qui déclenche les voies de signalisation en recrutant les molécules adaptatrices. Quatre protéines principales sont recrutées en fonction du TLR activé et de la cellule concernée (**Tableau 3**). Parmi ces protéines, on retrouve MyD88 (*Myeloid Differentiation Factor 88*), la plus fréquemment impliquée, ainsi que TRIF (*TIR-domain containing adaptor-inducing Interferon β*), TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*) et TIRAP (*Toll-Interleukin-1 Receptor domain containing adaptor protein*) (Pandey et al., 2014).

Implication des TLRs dans le choc septique

Les récepteurs TLR jouent un rôle essentiel dans la reconnaissance des agents pathogènes et dans la cascade inflammatoire. La recherche autour du choc septique s'est donc attachée à comprendre l'implication des TLRs, que ce soit dans des études précliniques ou cliniques.

De très nombreuses études précliniques sur les rongeurs se sont intéressées aux potentiels rôles des TLRs dans la pathogénèse du sepsis. Ces études ont établi le rôle mécanique de la signalisation TLR à travers des approches dites de « perte de fonctions » comme des modèles murins génétiquement modifiés, des inhibiteurs pharmacologiques des TLRs ou encore des stimulations des voies de signalisation par des ligands des TLRs. Le **Tableau 4** ci-dessous résume les résultats de ces recherches.

Ces résultats soulignent la complexité du rôle des TLRs dans le sepsis, il devient essentiel d'approfondir notre compréhension des mécanismes régulant ces récepteurs afin d'identifier des stratégies thérapeutiques spécifiques dans le contexte du choc septique. En effet, la réponse systémique caractéristique de l'état de choc, impliquant un grand nombre de médiateurs, est une cible potentiellement bénéfique et prometteuse, mais elle s'est avérée être à double tranchant (Tidswell et al., 2010), comme en témoignent les études sur le TLR4.

Tableau 4: Rôle des récepteurs Toll-like dans les chocs endotoxiques et les sepsis bactériens.
Adapté de Chen et al., 2021.

TLRs	Sepsis
TLR2	<ul style="list-style-type: none"> Les souris TLR2^{-/-} ont un meilleur taux de survie, une fonction cardiaque nettement améliorée, une production de cytokines systémiques et myocardiques atténuée, une fonction de coagulation améliorée, une numération plaquettaire et des taux de facteur tissulaire plasmatique proches de la normale par rapport aux souris WT 24 h après la CLP. Des modèles chimériques démontrent que c'est le TLR2 non hématopoïétique qui contribue à l'altération des neutrophiles et de la fonction cardiaque dans le sepsis. La lipoprotéine associée au peptidoglycane induit la cascade de signalisation TLR2/MyD88 pour activer le dysfonctionnement des cardiomyocytes et les réponses inflammatoires. L'activation de TLR2 par les lipoprotéines bactériennes stimule la fonction endothéliale et les voies de la coagulation ; et contribue à l'activation endothéliale, à la coagulopathie et à la fuite vasculaire dans le sepsis. Les rythmes circadiens des cellules immunitaires médient les variations diurnes de la sévérité du sepsis murin via un mécanisme dépendant de TLR2. La déplétion des neutrophiles médiée par TLR2 exacerbe le sepsis bactérien. TLR2 et TLR4 contribuent à la déplétion induite par le sepsis des cellules dendritiques de la rate
TLR3	<ul style="list-style-type: none"> La suppression systémique de TLR3 pourrait permettre de prolonger la survie, d'améliorer la fonction cardiaque et de réduire l'infiltration de cellules inflammatoires chez des souris TLR3^{-/-}.
TLR4	<ul style="list-style-type: none"> TLR4 est le médiateur de l'activation de NF-κB induite par l'endotoxine, de la production de cytokines et de la dysfonction cardiaque. Des études sur les chimères indiquent que le TLR4 dans les cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse est responsable du dysfonctionnement cardiaque lors d'un choc endotoxique. La signalisation TLR4 entraîne une altération de la migration des neutrophiles et une déplétion des cellules dendritiques dans le sepsis polymicrobien. Alors que la délétion de TLR4 confère clairement un bénéfice de survie en cas de choc endotoxique ou de sepsis bactérien à Gram négatif (léta), elle n'offre aucun bénéfice de survie, voire un effet délétère, en cas de sepsis à Gram négatif ou polymicrobien modéré.
TLR5	<ul style="list-style-type: none"> La flagelline bactérienne active la réponse immunitaire innée et induit une inflammation myocardique marquée et un dysfonctionnement contractile via TLR5. La signalisation Flagelline-TLR5 favorise la réparation et la survie endothéliales dans le sepsis.
TLR7	<ul style="list-style-type: none"> Le TLR7 est le médiateur de l'activation de la coagulation et de la coagulopathie dans le sepsis murin. Les macrophages dérivés de la moelle osseuse traités avec un agoniste du TLR7 présentent des augmentations marquées de l'expression du facteur tissulaire. Après une CLP, les souris TLR7^{-/-} présentent moins de cytokines plasmatiques, un choc circulatoire réduit, moins de lésions organiques et une survie significativement améliorée comparés aux souris WT.
TLR9	<ul style="list-style-type: none"> TLR9 contribue à la production de cytokines, à l'apoptose splénique et aux lésions rénales au cours d'un sepsis polymicrobien Par rapport aux souris WT, les souris TLR9^{-/-} présentent des taux sériques de cytokines inflammatoires plus faibles, une clairance bactérienne plus élevée et un taux de survie plus important après une CLP.

Pendant le choc septique, la reconnaissance du lipopolysaccharide (LPS) par le TLR4 joue un rôle crucial dans la défense de l'hôte (Bosmann & Ward, 2013). Les monocytes et les macrophages détectent le LPS qui est lié à la protéine de liaison *LPS Binding Protein* (LBP) formant le complexe LPS-LBP. Ce complexe se lie à son tour au récepteur CD14, qui est le corécepteur du TLR4 exprimé à la surface des cellules myéloïdes. La protéine adaptatrice MD-2, également associée au TLR4 à la surface cellulaire, facilite la formation du complexe CD14/TLR4 et initie la transduction du signal, notamment la voie de signalisation NF-κB (Guha & Mackman, 2001).

Des études précliniques sur des souris, ciblant le TLR4, ont révélé des résultats contradictoires qui semblent être associés à la gravité de l'infection. En effet, bloquer le TLR4 serait bénéfique en protégeant contre le choc circulatoire sévère endotoxique et le sepsis bactérien à Gram négatif léthal, en atténuant la réponse inflammatoire systémique et en améliorant la survie (Ehrentaut et al., 2011; Feng et al., 2011; Roger et al., 2009).

De nombreuses études cliniques sur le sepsis se sont également intéressées à moduler la réponse inflammatoire systémique *via* le récepteur TLR4. Une des plus récentes est l'étude ACCESS, celle-ci avait pour objectif d'évaluer l'effet thérapeutique de l'eritoran, un lipodisaccharide synthétique, dans un contexte de choc septique ; les résultats furent contradictoires au fur à mesure des différentes phases et viennent corroborer la dualité remarquée dans les études précliniques. L'eritoran est un analogue structurel du LPS et qui se fixe au complexe MD2-TLR4 et bloque la liaison LPS-TLR4 (B. S. Park et al., 2009). L'étude de phase I a montré une amélioration des signes cliniques qu'après une injection d'une faible dose de LPS chez les volontaires sains traités avec de l'eritoran, ainsi qu'une baisse de la production de la CRP, du TNF- α et de l'IL-6 comparés au groupe non traité (Lynn et al., 2003). L'étude de phase II visait à évaluer l'effet de l'eritoran sur la mortalité de patients en choc septique. Aucune réduction de la mortalité globale n'a été observée (Tidswell et al., 2010). Néanmoins, une analyse de la mortalité à 28 jours post stratification en fonction du score APACHE II (*Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II*) a montré que parmi les patients avec un sepsis léger (score 21) traités avec l'eritoran avaient un taux de mortalité plus élevé comparé aux patients traités avec un placebo. *A contrario*, la mortalité des patients traités avec l'eritoran avec un sepsis plus sévère (score 4) était diminuée par rapport au groupe placebo. Ces résultats sont similaires à ceux observés dans les études précliniques. Enfin, une étude de phase III a cherché à investiguer cette baisse de la mortalité chez les patients avec un sepsis sévère. Après 5 ans d'étude, aucune différence de mortalité à 28 jours et à 12 mois n'a été observé entre les patients traités avec l'eritoran et le groupe placebo (Opal et al., 2013). L'échec de cette étude ACCESS est sans doute multifactoriel et peut reposer sur une grande hétérogénéité des patients (scores de gravités, comorbidités) mais également sur une faible proportion des patients en choc septique avec des faibles concentrations plasmatiques en endotoxines, pouvant expliquer que certains patients n'ont pas répondu à l'eritoran qui cible pourtant le TLR4.

Implication des TLRs dans la COVID-19

Lors d'une infection par le SARS-CoV-2, la réponse immunitaire innée se déclenche rapidement pour restreindre l'entrée et la réplication virale, et éliminer les cellules infectées afin de limiter la contagion et déclencher la réponse adaptative. Cette réaction est initiée par la reconnaissance du virus grâce aux récepteurs présents à la surface des cellules de

l'immunité innée, notamment les polynucléaires neutrophiles. Parmi ces récepteurs, les TLRs jouent un rôle crucial dans la physiopathologie de la réponse immunitaire innée à l'infection au SARS-CoV-2.

Le TLR4 a été le premier TLR identifié *in silico* comme récepteur majeur de la reconnaissance du SARS-CoV-2. En effet, la protéine S de la couronne du virus est reconnue spécifiquement par le TLR4, faiblement exprimé à la surface des cellules résidentes du tissu pulmonaire dont les pneumocytes alvéolaires de type I et II (Aboudounya & Heads, 2021). L'affinité de la liaison entre la glycoprotéine S du SARS-CoV-2 et le TLR4 semble plus forte que celle pour l'ACE2 (Choudhury & Mukherjee, 2020). Le TLR4 permet également la reconnaissance et la liaison de DAMPs (**Tableau 3**) tels que la protéine HMGB1 ou les phospholipides oxydés, libérés dans les poumons suite au stress oxydatif causé par l'infection (Imai et al., 2008). Les études *in silico* ont été confirmés par les analyses *in vitro* et chez l'homme. En effet, l'expression de l'ARN du TLR4 ainsi que les molécules de ses voies de signalisation sont significativement surexprimés sur les cellules mononucléaires du sang des patients présentant une forme sévère de COVID-19 en comparaison aux patients avec une forme modérée (Sohn et al., 2020; Zheng et al., 2021). Deux études récentes ont corroboré que la protéine S induit la production de cytokines pro-inflammatoires dans les monocytes et les macrophages de manière dépendante du TLR4 (Shirato & Kizaki, 2021; Y. Zhao et al., 2021). Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour élucider l'interaction entre le TLR4 et la protéine S.

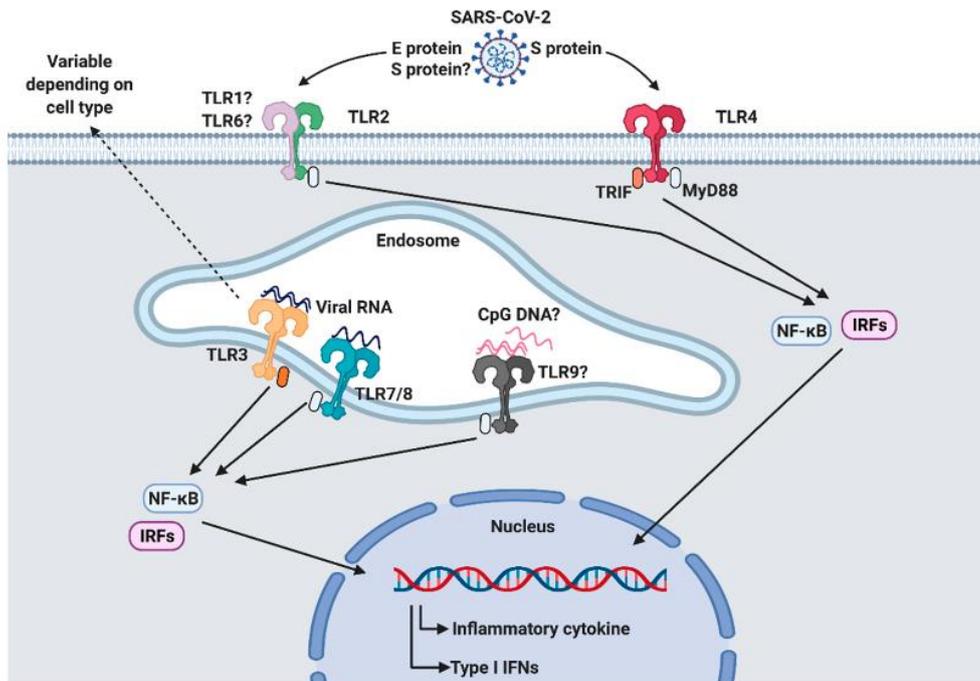


Figure 8: Reconnaissance du SARS-Cov-2 par les récepteurs Toll-like (TLR).

Les TLRs sont chargés de reconnaître les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) issus des agents pathogènes envahissants. Les TLRs membranaires, TLR2 et TLR4, ainsi que certains TLRs endosomaux, TLR3, TLR7/8 et TLR9 sont considérés comme impliqués dans la détection de l'infection par le SARS-CoV-2. Lorsqu'ils sont activés, les TLR déclenchent des voies de signalisation en aval en recrutant des molécules adaptatrices telles que MyD88 et TRIF, ce qui entraîne la production ultérieure de cytokines inflammatoires et d'interféron de type I par l'activation des facteurs de transcription NF-κB et IRFs. **Issu de Jung & Lee, 2021.**

Très tôt après le début de la pandémie, des études *in silico* ont suggéré que plusieurs TLRs, dont les TLR2, TLR3, TLR4, TLR7/8 et TLR9, étaient impliqués dans la reconnaissance des PAMPs du SARS-CoV-2. Ces récepteurs contribuent aux réponses antivirales contre l'infection au SARS-CoV-2 (**Figure 8**, (Jung & Lee, 2021)).

Bien qu'étant le plus étudié, le TLR4 n'est pas le seul TLR impliqué dans la reconnaissance du SARS-CoV-2. Il a ainsi été montré que la protéine E du virus est spécifiquement détectée par le TLR2 (Sariol & Perlman, 2021; Zheng et al., 2021). Cette protéine E induit une inflammation dépendante du TLR2 chez la souris, et l'utilisation d'un inhibiteur du TLR2a montré une protection contre les infections critiques par le SARS-CoV-2 chez la souris (Zheng et al., 2021).

Au niveau intracellulaire, le génome du SARS-CoV-2 peut être reconnu par les TLRs endosomaux (TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9) qui ont pour ligands l'ADN et l'ARN monocaténaire (**Tableau 3**). Dans des sphéroïdes de poumons, les niveaux d'expression des TLR3 et TLR7/8, ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires et d'IFN de type I, ont été augmentés

en réponse à l'infection par le virus (Bortolotti et al., 2021). D'autres études ont montré que les fragments d'ARN simple brin du génome du SARS-CoV-2 activent les voies dépendantes du TLR7/8 et MyD88 dans les cellules dendritiques humaines, induisant ainsi la production de cytokines pro-inflammatoires et la maturation des cellules dendritiques (Salvi et al., 2021).

Plusieurs récepteurs Toll-like, tels que les TLR2, TLR4, TLR3, TLR7 et TLR8, ont été identifiés comme des senseurs de la reconnaissance de l'infection par le SARS-CoV-2. Ces TLRs sont activés par divers composants viraux tels que la protéine S, la protéine E et l'ARN simple brin. Bien que les réponses immunitaires médiées par les TLRs soient essentielles pour protéger l'hôte, une inflammation excessive et incontrôlée peut entraîner des conséquences sévères, comme que le choc septique ou le SDRA. Par conséquent, plusieurs approches thérapeutiques immunomodulatrices ont été suggérées pour atténuer l'hyperinflammation consécutive à l'infection par le SARS-CoV-2. Des essais cliniques évaluent l'efficacité de différentes approches. L'inhalation d'une solution PUL-042 bloquant les TLR2/6/9 a été testée pour réduire le taux d'infection, la progression et la gravité du COVID-19 (Schijns & Lavelle, 2020). La famotidine a également été testée dans le but d'inhiber les réponses inflammatoires médiées par le TLR3 et améliorer les signes cliniques des patients atteints de COVID-19 (Malone et al., 2021; Mukherjee et al., 2021; Samimagham et al., 2020). Parallèlement, des modulateurs de TLR4, tels que l'EB05, l'éritoran, la naltrexone, le curcuma, font également l'objet d'évaluations cliniques pour le traitement de la COVID-19 (Varghese *et al.*, 2021; X. Wang *et al.*, 2016; Youn *et al.*, 2006).

Dans le cadre de mon travail de thèse, l'approche physiopathologique de la COVID-19 va se concentrer uniquement sur l'étude cellulaire des récepteurs Toll-like. Ces récepteurs sont essentiels dans la réponse immunitaire face à l'infection, mais leur expression et l'intensité de leur réponse peuvent varier d'un individu à l'autre. Ainsi, des variations génétiques affectant les protéines impliquées dans la reconnaissance du pathogène pourraient contribuer à la susceptibilité de certains individus à l'infection. Par exemple, certains polymorphismes, notamment ceux touchant le TLR4 et diminuant son interaction avec le LPS, ont été identifiées comme des facteurs de risque de choc septique lors d'une infection par un bacille gram négatif (Lorenz *et al.*, 2002).

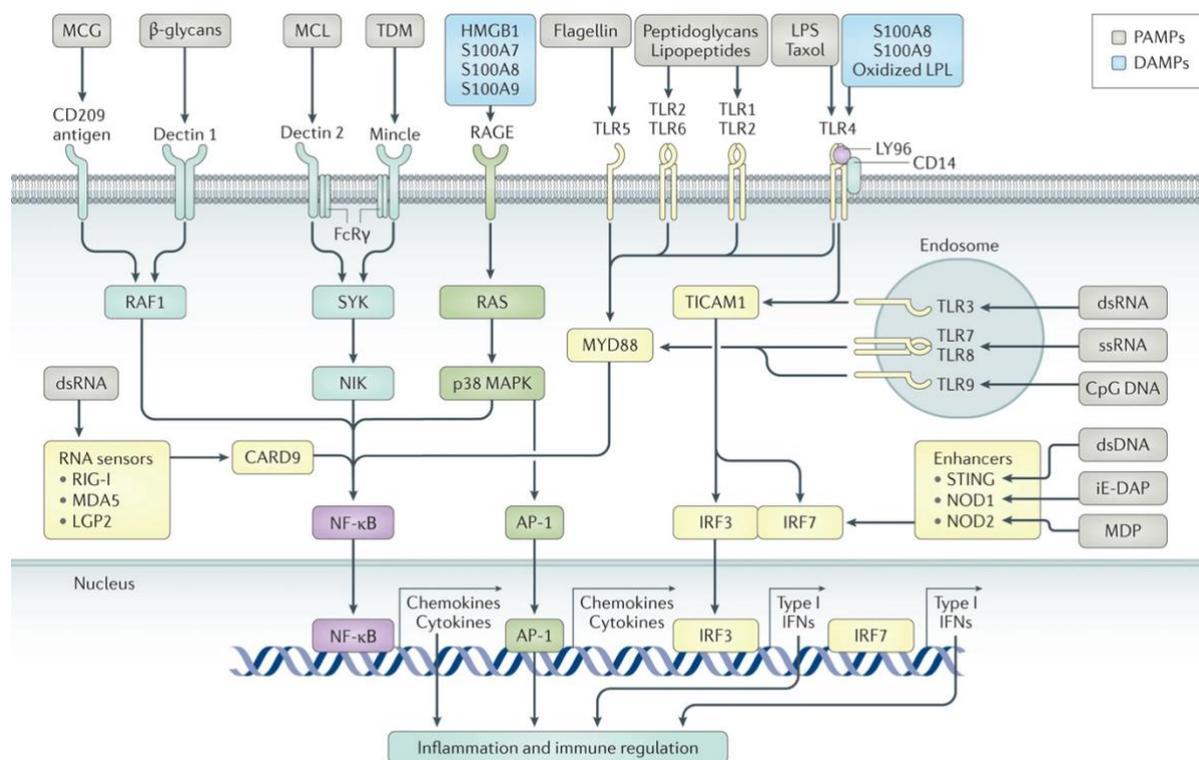
Il paraît nécessaire, aux vues de ces résultats contradictoires, d'aborder de façon globale l'expression des récepteurs Toll-like pour de mieux comprendre l'implication des dix récepteurs et de leurs voies de signalisation dans les infections chez l'homme.

b. Voies de signalisation des TLRs

Les voies de signalisation des TLRs peuvent être séparées en deux voies distinctes mais convergentes en fonction de la molécule adaptatrice recrutée : la voie MyD88 dépendante et la voie TRIF dépendante. La voie de signalisation prédominante des TLRs est la voie dépendante de MyD88 qui est activée par la grande majorité des TLRs, à l'exception du TLR3.

La voie MyD88 aboutit à l'activation du facteur de transcription NF- κ B (*Nuclear factor kappa B*) et les protéines kinases MAPKs (*Mithogen Activated Protein Kinases*). La voie dépendante de TRIF, utilisée après l'activation des TLR3 et TLR4, conduit à l'induction de l'interféron de type 1 (IFN) et à l'expression de cytokines pro-inflammatoires *via* l'activation du facteur de transcription IRF3 (**Figure 9**, (Hotchkiss et al., 2016)).

Ces différentes cascades d'activation aboutissent à la transcription de gènes de l'inflammation, la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*), l'IL-1 et l'IL-6, ainsi que des molécules antimicrobiennes telles que l'oxyde nitrique ou monoxyde d'azote (NO) ou les défensines (Paludan et al., 2021). L'infection bactérienne, mais également les lésions tissulaires peuvent parfois provoquer une concentration excessive en PAMPs et DAMPs, ce qui conduit à une amplification des réponses moléculaires et à la survenue d'un « orage cytokinique » (Chousterman et al., 2017). Ce dernier se caractérise par, à la fois une intensification de la réponse cytokinique elle-même, et par une stimulation des cellules du système immunitaire inné et adaptatif pouvant aboutir aux lésions tissulaires (Delano & Ward, 2016).



Nature Reviews | Disease Primers

Figure 9: Récepteurs de surface cellulaire et intracellulaire (PRRs) responsables de la reconnaissance des PAMPs et des DAMPs (ou alarmines).

CARD9: caspase recruitment domain-containing protein 9 ; dsDNA: double-stranded DNA; dsRNA: double-stranded RNA; FcR γ : Fc γ receptor; HMGB1: high-mobility group protein B1; iE-DAP: d-glutamyl-meso-diaminopimelic acid; LGP2: laboratory of genetics and physiology 2 (also known as DHX58); LPL: lipoprotein lipase; LPS: lipopolysaccharide; LY96: lymphocyte antigen 96; MAPK: mitogen-activated protein kinase; MCG: mannose-containing glycoprotein; MDA5: melanoma differentiation-associated protein 5 (also known as IFIH1); MDP: muramyl dipeptide; MCL: mannose-capped lipoarabinomannan; Mincle: also known as CLEC4E; MYD88: myeloid differentiation primary response protein 88; NIK: NF- κ B-inducing kinase (also known as MAP3K14); NOD: nucleotide-binding oligomerization domain; RAF1: RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase; RAGE: advanced glycosylation end product-specific receptor; RIG-I: retinoic acid-inducible gene 1 protein (also known as DDX58); ssRNA, single-stranded RNA; STING: stimulator of interferon genes protein; SYK: spleen tyrosine kinase; TDM: trehalose-6,6'-dimycolate; TICAM1: TIR domain-containing adaptor molecule 1). **Issue de Hotchkiss et al., 2016.**

II.A.2 Réponse des cellules de l'immunité innée

Après leur recrutement et leur activation *via* les PRRs, la réponse des cellules de l'immunité innée joue un rôle crucial dans la réponse inflammatoire et par conséquent dans la physiopathologie du choc septique.

La réponse immunitaire innée implique un grand nombre de cellules à la fois des cellules hématopoïétiques mais également des cellules dites « non professionnelles » comme les cellules épithéliales ou les cellules endothéliales (**Figure 10**).

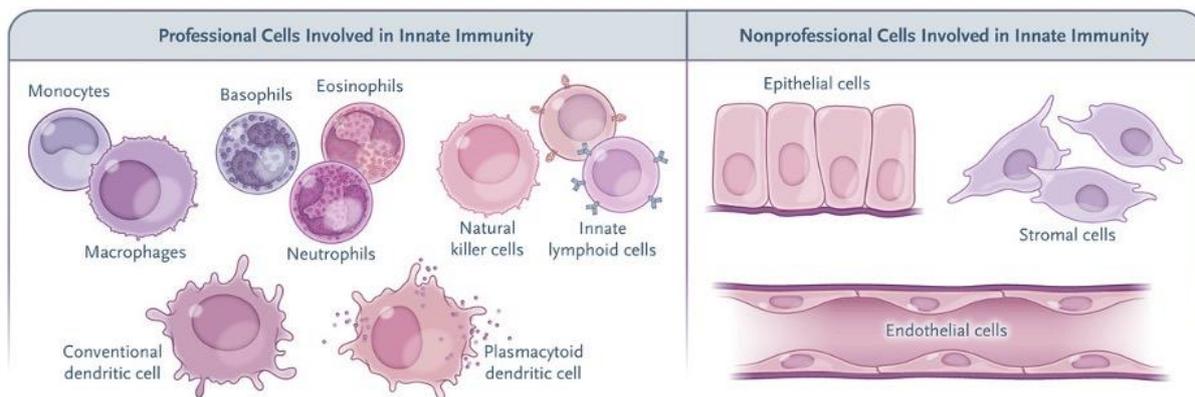


Figure 10: Principales cellules de l'immunité innée.
Adaptée de Mantovani & Garlanda, 2023.

Parmi les cellules hématopoïétiques, les cellules myéloïdes phagocytaires, telles que les monocytes et macrophages, les cellules dendritiques et les polynucléaires neutrophiles (PNN) sont les principaux acteurs de la défense contre le pathogène (Turvey & Broide, 2010). Outre leur capacité phagocytaire, ces cellules possèdent un ensemble de fonctions (**Tableau 5**) qui leur permettent de participer activement à la réponse moléculaire contre l'agent pathogène. Elles sécrètent des cytokines pro-inflammatoires, du lysozyme et libèrent des peptides antimicrobiens (AMPs).

Tableau 5: Fonctions des principales cellules de l'immunité innée.
Adapté de « Effet de l'inhibition ciblée des interférons de type I sur l'endothélium vasculaire au cours du sepsis » par Raphaël Clere-Jehl.

Type de Cellules	Fonctions dans l'immunité Innée
Monocytes (sang) /Macrophages (tissus)	<ul style="list-style-type: none"> • Phagocytose • Sécrétion d'AMPs (défensines) • Macrophages : Présentation d'antigènes • Macrophages : polarisation • Sécrétion de cytokines (TNF, IL-1, IL-6, IL-12) • Production de ROS
Polynucléaires Neutrophiles	<ul style="list-style-type: none"> • Phagocytose • NETose • Sécrétion d'AMPs (défensines, cathélicidine) • Dégranulation
Cellules dendritiques	<ul style="list-style-type: none"> • Phagocytose • Présentation d'antigène • Sécrétion de cytokines (IL-10, IFN, IL-12, IL-18, IL-15)
Mastocytes	<ul style="list-style-type: none"> • Vasodilatation par libération d'histamines • Production d'espèces réactives de l'oxygène • Sécrétion d'AMPs (cathélicidine)
Cellules lymphoïdes innées (ex : Natural Killers)	<ul style="list-style-type: none"> • Destruction d'agents pathogènes • Sécrétion de cytokines immunomodulatrices (IFN-γ)

Les Monocytes

Les monocytes, sont des cellules mononuclées de la lignée myéloïde, qui représentent 5 à 10% des leucocytes circulants chez l'homme. Au cours de l'inflammation, les monocytes sont recrutés au niveau des tissus où ils vont se différencier en macrophages ou en cellules dendritiques. Les monocytes participent au contrôle des infections (bactériennes, virales ou fongiques) par le mécanisme de phagocytose et de dégradation dans les phagolysosomes grâce à des granulations lysosomales similaires à celle des PNN. Ces cellules sont néanmoins capables de survivre à cette phagocytose, ce qui les différencie des neutrophiles.

Il existe trois catégories de monocytes en fonction de l'expression des marques CD14 et CD16, récepteur IIa de faible affinité de la fraction constante des immunoglobulines G.

On distingue (**Figure 11**, (K. Wong et al., 2012)):

- (i) les monocytes classiques (CD14++ CD16-) qui représentent 85% des monocytes circulants ; ils sont connus pour être rapidement recrutés sur le site de l'infection et au niveau des lésions tissulaires ainsi que pour avoir une activité phagocytaire très importantes
- (ii) les monocytes non classiques (CD14+CD16++) qui constituent 10% des monocytes circulants ; également recrutés rapidement mais avec une activité phagocytaire réduite
- (iii) les monocytes intermédiaires (CD14++CD16+) ne représentent que 5% des monocytes circulants et ont des fonctions très différentes des autres sous populations, ils participent à la stimulation et la prolifération des cellules T et à la production de ROS.

Les patients en choc septiques auraient une augmentation à la fois des monocytes intermédiaires (qui représenteraient environ 18% des monocytes circulants), mais également une augmentation des monocytes non classiques (Mukherjee et al., 2015; K. Wong et al., 2012).

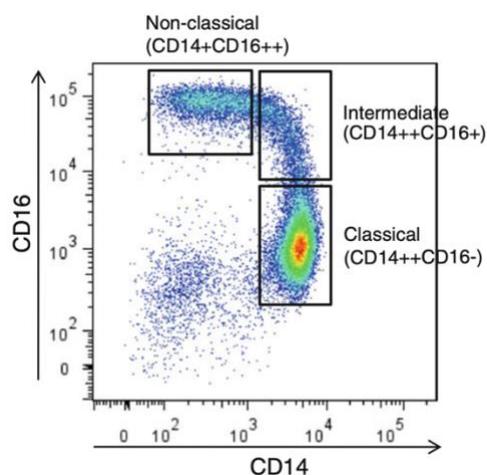


Figure 11: Sous-populations monocytaires chez l'Homme en fonction de l'expression du CD14 et du CD16 en cytométrie en flux. D'après Wong et al., 2012.

Lors d'une infection, le recrutement des monocytes est déterminé par des chimiokines qui se lient aux récepteurs exprimés à leur surface. Après la reconnaissance du pathogène par les PRRs, les monocytes vont s'activer grâce à leurs fonctions immunitaires : la phagocytose des pathogènes, la présentation des antigènes par l'intermédiaire du CMH de type II, ainsi que la production de cytokines et de facteurs de croissance.

Le sepsis induit, de façon différée une désactivation des monocytes. Cette désactivation est caractérisée par une diminution de l'expression membranaire du HLA-DR (*Human Leukocyte Antigen*), une altération de la production de cytokines pro-inflammatoire (TNF, IL-1, IL-6, IL-12), une augmentation de la production d'IL-10, une diminution du récepteur de chimiokine CX3CR1 impliqué dans l'adhésion et le recrutement tissulaire, et enfin une surexpression des molécules inhibitrices de type PD-1 (*Programmed Death-1*). La désactivation des monocytes viserait donc à réguler négativement la réponse inflammatoire (Grimaldi & Pène, 2012; Nedeva, 2021).

La majorité de mon travail de thèse a porté sur l'étude des polynucléaires neutrophiles dans la physiopathologie de la coagulopathie associée au choc septique. La troisième partie de cette introduction détaillera les principales fonctions et dysfonctions de ces cellules. A l'instar des différentes fonctions des cellules de l'immunité innée dans l'élimination du pathogènes, elles vont également activer le système immunitaire adaptatif.

II.A.3 Réponse Immunitaire adaptative

Après le développement de l'immunité innée, qui permet la reconnaissance des motifs microbiens des agents pathogènes, le système adaptatif s'active dans les jours suivant l'exposition aux pathogènes (**Figure 12**). L'immunité adaptative repose sur des récepteurs aux antigènes (Ag) spécifiques aux agents pathogènes qui sont reconnus par les cellules présentatrices d'antigènes qui vont ensuite les présenter aux autres cellules immunitaires dont les lymphocytes. Cette reconnaissance spécifique confère à la réponse immunitaire adaptative une meilleure sensibilité et spécificité. En outre, la mémoire immunologique des lymphocytes renforce la protection contre les réinfections.

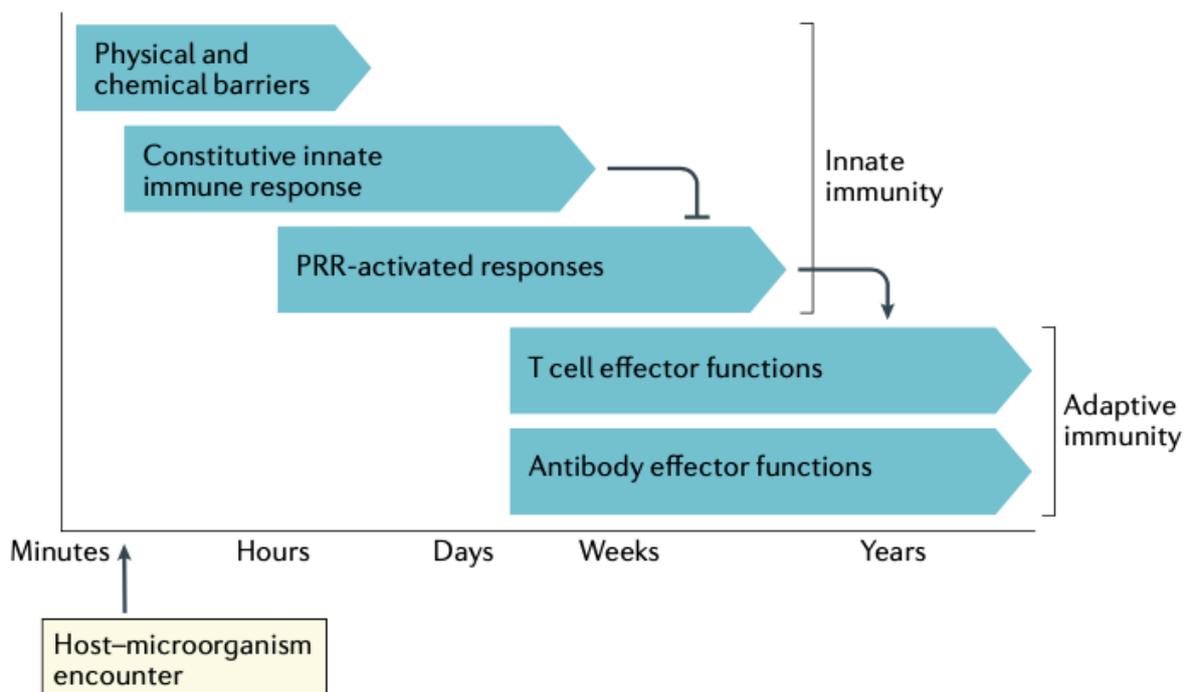


Figure 12: La relation entre les différents stades de la réponse immunitaires

Une première ligne de défense est exercée par des barrières naturelles physiques et chimiques (peau, muqueuse, mucus, etc..). Les mécanismes immunitaires innés constitutifs fonctionnent dès qu'un signal de danger est détecté et éliminent les micro-organismes nuisibles par des mécanismes spécifiques non inflammatoires qui fonctionnent indépendamment des PRRs. Ces mécanismes empêchent l'établissement de l'infection et l'accumulation de PAMPs, limitant ainsi l'activation des réponses immunitaires innées inductibles basées sur les PRRs. Si l'immunité basée sur les PRRs est activée, en raison du niveau de PAMPs dépassant un certain seuil, cela conduit à une inflammation et favorise l'activation de la réponse immunitaire adaptative médiée par les cellules T et les anticorps. **Issue Paludan et al., 2021.**

La réponse immunitaire adaptative est initiée lorsque des lymphocytes T ou B rencontrent des antigènes spécifiques à leurs récepteurs. Les lymphocytes T sont divisés en deux grandes sous

populations les lymphocytes T-CD4+, également appelés Th auxiliaires ou Th (*T helper*) et les lymphocytes T-CD8+ ou lymphocytes cytotoxiques.

L'activation des lymphocytes T naïfs (ou Th0) nécessite 3 signaux : (i) l'activation du TCR (*T-cell receptor*), (ii) l'activation des récepteurs de co-stimulation positive, le CD28 et (iii) la stimulation par les cytokines activatrices.

La mise en place de l'immunité adaptative est donc notamment médiée par les cellules dendritiques ou encore appelées cellules présentatrices d'antigènes (CPA). A l'interface entre l'immunité innée et adaptative, ces CPA ont la capacité d'endocyter les antigènes, les dégrader puis de les exprimer à leur surface en association au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (Iwasaki & Medzhitov, 2015). Le CMH de type II permet de présenter les antigènes exogènes aux lymphocytes T-CD4+, tandis que le CMH de type I présente les molécules aux lymphocytes cytotoxiques (Blum et al., 2013). Les liaisons Ag/CMH, CD28/CD80 ou CD28/CD86 vont être reconnus par les lymphocytes circulants T naïfs (ou Th0). Suite à l'exposition à leur Ag spécifique, les lymphocytes naïfs prolifèrent et se différencient en lymphocytes T effecteurs Th1 et Th2, qui subissent une expansion clonale caractérisée par leur spécificité antigénique (Verbist et al., 2012). Les lymphocytes Th1 sécrètent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-2, l'IL-12, le TNF- α , l'IFN- γ , qui assurent la défense contre les pathogènes extracellulaires en favorisant la production d'anticorps et en stimulant l'activité microbicide des macrophages envers les pathogènes intracellulaires. Quant aux lymphocytes Th2, ceux-ci jouent un rôle immunomodulateur par l'intermédiaire des médiateurs humoraux tels que l'IL-4, l'IL-5, l'IL-9, l'IL-10.

L'activation des lymphocytes B nécessite à la fois la reconnaissance et la liaison entre l'antigène et le récepteur de la cellule B (BCR), mais aussi une interaction avec les lymphocytes T auxiliaires spécifiques de l'antigène.

Au cours du choc septique, l'apoptose des cellules immunitaires et certaines cytokines anti-inflammatoires contribuent à l'évolution vers un état d'immunodépression secondaire.

II.A.4 Des réponses pro et anti-inflammatoires concomitantes

Classiquement, il était admis que la réponse immunitaire de l'hôte face au sepsis se déroulait en deux phases distinctes : une phase initiale hyperinflammatoire sur quelques jours, suivie d'une phase immunosuppressive plus prolongée. Toutefois, des études récentes remettent en cause ce paradigme, révélant que le sepsis contrairement à une infection localisée sans complication, engendre une perturbation complexe de l'équilibre entre les réponses pro et anti-inflammatoires (**Figure 13**). Il a ainsi été démontré que ces réponses surviennent de manière plus précoce et simultanée lors d'un sepsis (Hotchkiss et al., 2013; Jarczak et al., 2021). Ces réponses concomitantes provoquent chez les patients atteints de sepsis sévères des signes marqués d'immunosuppression, qui peuvent avoir des conséquences potentiellement délétères (Venet & Monneret, 2018).

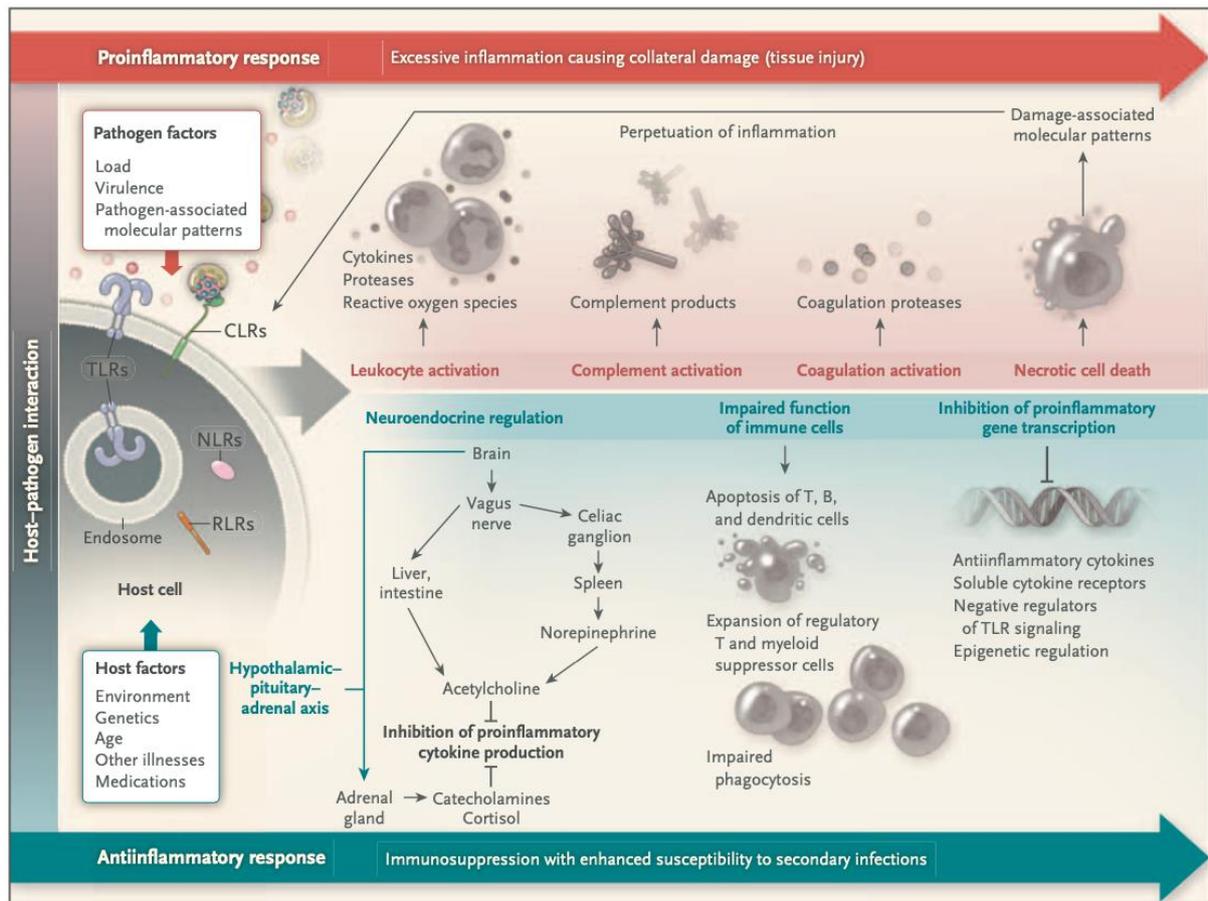


Figure 13: Réponses pro- et anti-inflammatoires du système immunitaire au cours du sepsis et du choc septique
Issue de Angus & Poll, 2013.

La nature, l'étendue et la durée de ces réactions sont déterminées à la fois par les caractéristiques de l'hôte (âge, caractéristiques génétiques, maladies et traitements concomitants) et par les agents pathogènes (charge microbienne, virulence).

Les PRRs, dont les TLRs reconnaissent et provoquent une réponse contre les agents pathogènes (PAMPs). La réponse de l'hôte aboutit à des cascades d'activation des voies de signalisation, comme l'activation de $\text{Nf-}\kappa\text{B}$ aboutissant à la sécrétion de cytokines inflammatoires, et en particulier le $\text{TNF-}\alpha$ et l' $\text{IL-1}\beta$. À la suite de ces phénomènes, les réponses pro-inflammatoires et anti-inflammatoires se déclenchent simultanément (**Figure 13**, (Angus & Poll, 2013)).

La réponse pro-inflammatoire consiste en l'activation et l'infiltration excessive des leucocytes, l'activation du complément, l'activation de la coagulation mais également à la mort des cellules nécrosées relarguant ainsi des DAMPs qui amplifient l'inflammation en activant les mêmes récepteurs que les PAMPs. Lors de la réponse pro-inflammatoire, les cytokines inflammatoires induisent la production et la libération de nombreux médiateurs secondaires, tels que des médiateurs lipidiques (le *Platelet-Activating Factor*, les prostaglandines, les leucotriènes et le facteur tissulaire (FT)), des chimiokines permettant le recrutement et l'activation de cellules immunitaires sur le site de l'infection, ainsi que des espèces réactives à l'oxygène comme le NO (Nedeva et al., 2019). La réponse pro-inflammatoire est une inflammation excessive qui aboutit aux lésions tissulaires.

La réponse anti-inflammatoire provoque notamment une altération de la fonction des cellules immunitaires, comme une modification de la capacité phagocytaire des macrophages, un défaut de maturation des neutrophiles ; mais également une apoptose de nombreux effecteurs cellulaires (cellules dendritiques, lymphocytes T) et une activation du réflexe neuro-inflammatoire *via* le nerf vague (Rosas-Ballina et al., 2011). La réponse anti-inflammatoire induit une immunosuppression chez les patients atteints d'un choc septique les rendant ainsi plus susceptibles à une infection secondaire, notamment aux infections nosocomiales (G. Zhao et al., 2016).

L'ensemble de ces réponses témoignent des nombreux dysfonctionnements et suppressions des cellules immunitaires induits par le sepsis, affectant à la fois le système immunitaire inné et adaptatif (Figure 14, (Nedeva, 2021).

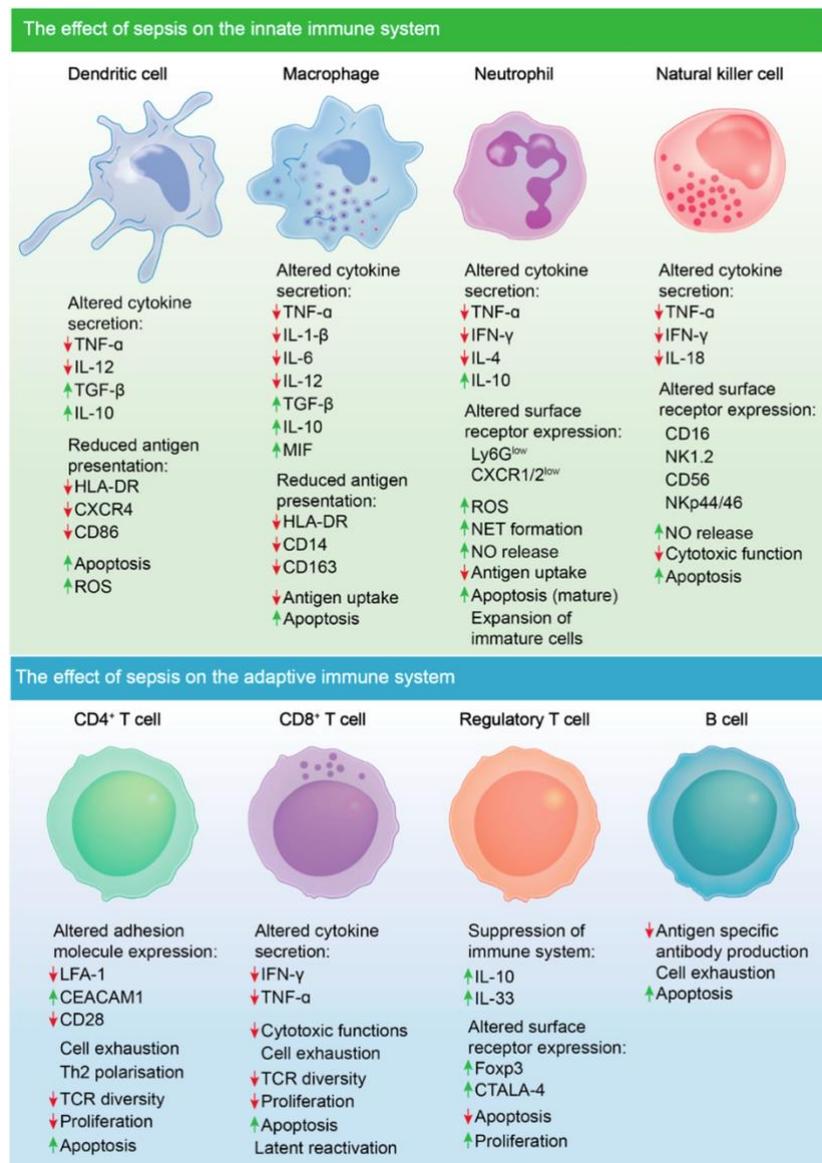


Figure 14: Impact du sepsis sur les cellules du système immunitaire innée et adaptatif

Dans le système immunitaire innée (en vert dans la partie haute), une altération de la sécrétion de cytokines et une réduction de la présentation de l'antigène sont observées dans les cellules dendritiques et les macrophages sentinelles à la suite d'un sepsis. Les cytokines telles que le TNF-α sont réduites et les cytokines telles que l'IL-10 sont régulées à la hausse. L'altération de la sécrétion des cytokines et de l'expression des récepteurs de surface est significative sur les neutrophiles et les cellules NK (*Natural Killer*). Les neutrophiles matures rentrent en apoptose alors qu'on observe une augmentation des neutrophiles immatures dans la circulation. Concernant les altérations du système immunitaire adaptatif (en bleu dans la partie basse), une altération de l'expression des molécules d'adhésion sur les lymphocytes T CD4+ est constatée à la suite d'un sepsis. Une perte de la fonction de ces lymphocytes est aussi observée dû à une diminution des récepteurs TCR. Les lymphocytes T CD8+ ont une diminution de la sécrétion en cytokines et de leurs fonctions cytotoxiques post-sepsis. Les lymphocytes T et B rentrent plus rapidement en apoptose. Une baisse de la production des anticorps spécifiques aux antigènes par les lymphocytes B est observée. Les lymphocytes T régulateurs sont les seules connues pour proliférer et augmenter l'immunosuppression. **Issu de Nedeva, 2021.**

II.A.5 La réponse inflammatoire au SARS-CoV-2

La COVID-19 est une pathologie complexe due à l'infection par le SARS-CoV-2, impliquant une réponse inflammatoire systémique et une activation de la coagulation. La phase virale correspond à l'entrée et à la réplication du virus dans les cellules pulmonaires (Hidalgo et al., 2021).

Suite à l'infection par le SARS-CoV-2, une réponse immunitaire innée rapide se met en place pour limiter la propagation du virus, détruire les cellules infectées et coordonner une immunité adaptative ciblée contre le virus.

Cependant, la physiopathologie de l'infection au SARS-COV-2 est caractérisée par une activation systémique inadaptée du système inflammatoire, similaire à celle observée dans le choc septique, induisant notamment des phénomènes tels que l'orage cytokinique. L'aggravation des symptômes de la COVID-19 est associée à une production excessive de cytokines et de chémokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-8, l'IL-1 β , le CCL2 ou le CXCL8 et antivirales (Interférons de type I et III) (Hu et al., 2021).

Les formes sévères de COVID-19 sont associées à une altération de la réponse à l'infection virale liée aux interférons (Blanco-Melo et al., 2020; G. Chen et al., 2020), une lymphopénie caractérisée par une apoptose accrue des lymphocytes T CD4 et une diminution de la prolifération et un épuisement des cellules cytotoxiques (les lymphocytes CD8 et NK) (Lippi & Plebani, 2020). Ces altérations entraînent une excrétion virale persistante et une production excessive de cytokines, endommageant l'endothélium pulmonaire et altérant ses fonctions barrières et régulatrices de l'inflammation et de la coagulation (Perico et al., 2021). L'épithélium alvéolaire des patients avec des formes sévères de COVID-19 est altéré, des dépôts de fibrines sont observés ainsi que des œdèmes pulmonaires, conduisant à un déséquilibre dans la coagulation et la fibrinolyse.

Par ailleurs, les formes sévères de COVID-19 avec coagulopathie présentent des taux augmentés de D-dimères et des produits de dégradation de la fibrine ainsi qu'une numération plaquettaire diminuée, qui sont corrélés à la mortalité (Al-Samkari et al., 2020; Lippi et al., 2020). Un traitement anticoagulant précoce chez ces patients pourrait réduire le risque de complications thrombotiques et la mortalité (Helms et al., 2021; Rentsch et al., 2021). La phase

prothrombique de la COVID-19 est caractérisée par un processus d'immunothrombose, où les neutrophiles et les NETs jouent un rôle majeur (**Figure 15**, Janiuk et al., 2021; Thierry & Roch, 2020).

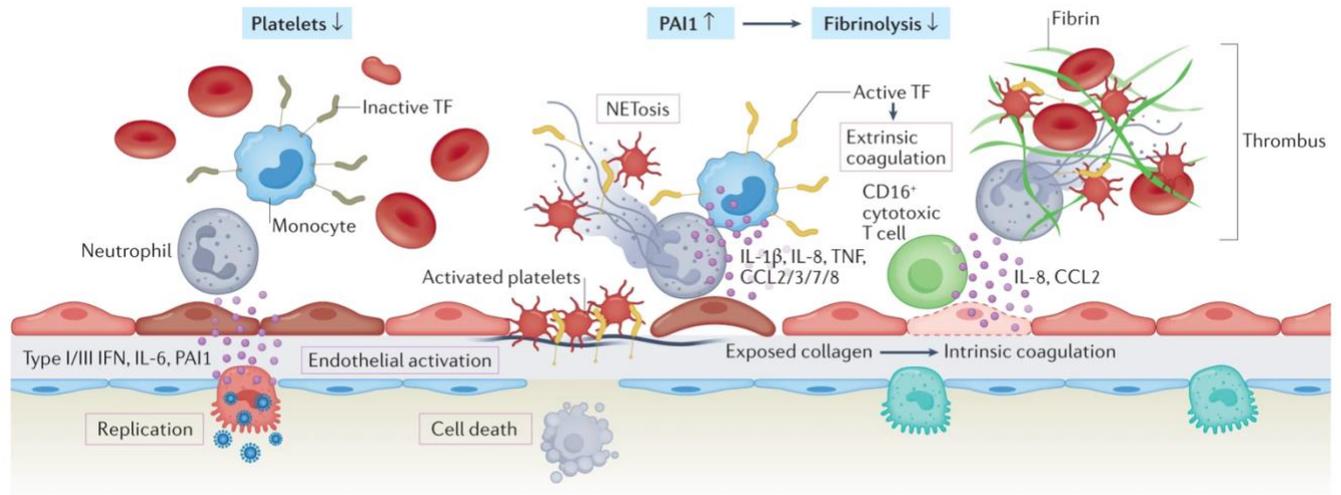


Figure 15: L'immunothrombose dans les formes sévères de COVID-19

Les formes sévères de COVID-19 sont caractérisées par un déséquilibre dans la coagulation, la fibrinolyse, qui pourrait débuter par une perturbation de l'épithélium alvéolaire. Divers stimuli tels que l'hypoxie, les cytokines, les chimiokines et les DAMPs peuvent induire une perméabilité de l'endothélium et de l'épithélium, provoquant la disruption des liaisons cellulaires. Ces stimuli peuvent déclencher l'activation endothéliale, entraîner la mort des cellules endothéliales et recruter des cellules immunitaires (neutrophiles et monocytes). Les lymphocytes T CD16+ peuvent favoriser les lésions des cellules endothéliales microvasculaires et la libération de chimiokines. La matrice extracellulaire exposée peut déclencher à la fois la coagulation extrinsèque (via le facteur tissulaire activé) et la coagulation intrinsèque (par exemple via le collagène, l'ARN ou l'ADN), conduisant aux dépôts de fibrines. Les plaquettes activées se lient à la matrice extracellulaire exposée pour sceller la lésion et stimuler les neutrophiles avec les monocytes pour libérer les *Neutrophils Extracellular Traps* (NET). Les NET contiennent du facteur tissulaire et de l'ADN, stimulant les deux voies de coagulation. Ce processus dirigé par le système immunitaire conduit à la formation de thrombus de fibrine et à l'épuisement des plaquettes. Pendant ce temps, la fibrinolyse peut être réduite en raison de niveaux d'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (PAI1). IFN : Interférons.

Issu de Lamers & Haegmans, 2022.

Ces mécanismes dérégulés post infectieux, peuvent entraîner des complications sévères, telles qu'une thrombose disséminée ou/et une défaillance d'organes. Ainsi, je ne ferai pas de distinction entre ces deux types d'infections dans la suite de mon manuscrit.

II.B Activation vasculaire aigue

II.B.1 Activation endothéliale

L'endothélium, en tant qu'interface réactive et régulée entre le sang et les tissus, a un rôle essentiel de « barrière » contrôlant les échanges entre ces deux compartiments. C'est pourquoi ses fonctions sont capitales pour l'hôte au cours du sepsis. L'endothélium est impliqué dans le maintien de la fonction circulatoire, la régulation de l'hémostase primaire et secondaire, ainsi que dans la réponse immunitaire (Pons *et al.*, 2020).

Les cellules endothéliales détectent les modifications physiques telles les forces de cisaillement, ainsi que les modifications chimiques comme l'hypoxie et les composés bactériens. L'activation endothéliale correspond à la réponse adaptative et contrôlée des cellules endothéliales à ces *stimuli* ; en revanche on parle de dysfonction endothéliale lorsque que cette réponse est excessive et inadaptée (Boisramé-Helms, Delabranche, et al., 2013).

L'intégrité de l'endothélium est préservée par le cytosquelette d'actine, appelé glycocalyx, et les jonctions serrées entre chaque cellule endothéliale. Dans le sepsis, la barrière endothéliale est altérée (**Figure 16**) par de nombreux facteurs tels que la libération excessive de médiateurs inflammatoires et oxydants, l'augmentation de l'expression des molécules d'adhérence (sélectines et intégrines), l'adhésion des plaquettes et des PNNs.

Ces modifications conduisent à une perméabilité de l'endothélium, ce qui entraîne une fuite massive de protéines et liquide vasculaire vers l'espace interstitiel. Cette fuite est responsable de l'hypovolémie intravasculaire et de l'hypoxémie tissulaire (Hotchkiss et al., 2016; Schouten et al., 2008; Vallet, 2003).

Les cellules endothéliales sont des acteurs majeurs de la réponse précoce à une infection. Elles font partie des premières cellules non immunitaires à s'activer (**Figure 10**). L'endothélium peut contribuer à l'aggravation de l'inflammation en sécrétant des molécules pro-inflammatoires, en recrutant les cellules immunitaires, en augmentant sa perméabilité et en favorisant l'activation de la coagulation (Hinsbergh & Venugopal, 2012). Lors d'une infection, les cellules endothéliales perdent leur fonction d'anticoagulant et au contraire acquièrent un phénotype procoagulant et anti-fibrinolytique ; suite à une surexpression du facteur tissulaire (FT) et une

diminution de l'expression de la thrombomoduline (TM) (Boisramé-Helms, Kremer, *et al.*, 2013; Krüger-Genge *et al.*, 2019).

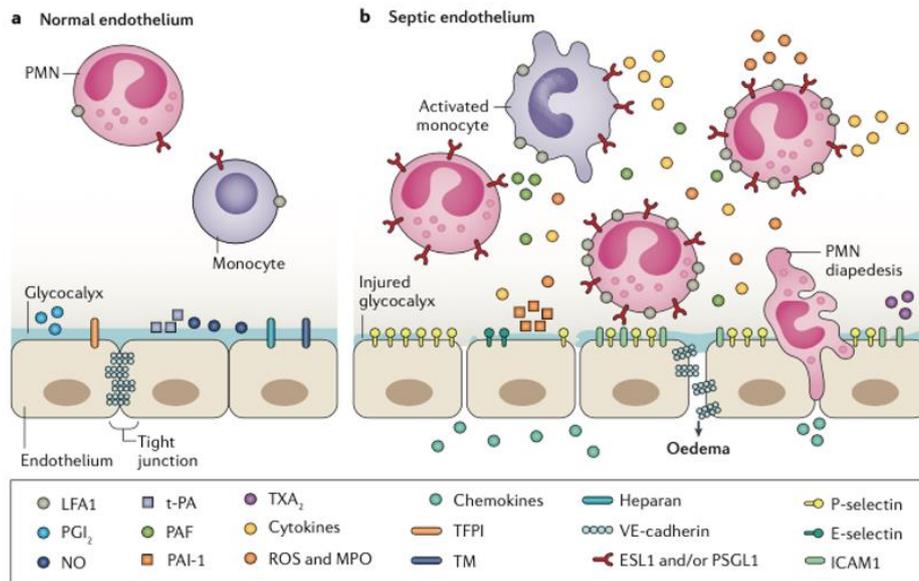


Figure 16: Modifications de l'endothélium vasculaire en réponse aux stimuli inflammatoires au cours du sepsis.

ESL1, E-selectin ligand 1; ICAM1, intercellular adhesion molecule 1; LFA1, lymphocyte function-associated antigen 1; MPO, myeloperoxidase; NO, nitric oxide; PAF, platelet-activating factor; PAI-1, plasminogen activator inhibitor 1; PGI₂, prostaglandin I₂; PMN, polymorphonuclear leukocyte; PSGL1, P-selectin ligand 1; ROS, reactive oxygen species; TFPI, tissue factor pathway inhibitor; TM, thrombomodulin; t-PA, tissue plasminogen activator; TXA₂, thromboxane A₂; VE, vascular endothelial. **Issue de Hotchkiss *et al.*, 2016.**

Ces modifications moléculaires s'accompagnent de perturbations fonctionnelles induites par les *stimuli* inflammatoires, ainsi que par la libération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERN) (Trzeciak *et al.*, 2008). Ces molécules, de même que des composants bactériens, perturbent les voies de signalisation intracellulaire de l'endothélium, notamment en induisant une enzyme : la NO synthétase inducible (iNOS) (A. H. Ding *et al.*, 1988; Walford & Loscalzo, 2003). Cette dernière est exprimée par l'endothélium et les cellules musculaires lisses, elle permet la synthèse de monoxyde d'azote (NO) à partir de L-arginine. En conditions physiologiques, le NO est présent en faible quantité et ses effets sont limités aux cellules voisines (Cauwels, 2007). Le NO agit comme un puissant vasodilatateur en se liant à la guanylate cyclase soluble dans le cytosol des cellules musculaires lisses et entraînant une diminution du calcium intracellulaire à l'origine de la relaxation des cellules musculaires lisses (Horowitz *et al.*, 1996). Cependant, au cours du choc septique, une induction majeure de la transcription d'iNOS se produit, entraînant une synthèse excessive de NO au niveau des

cellules musculaires lisses. Cette surproduction accrue de NO contribue à la vasoplégie du choc septique, nécessitant le recours aux drogues vasopressives (Cauwels, 2007).

II.B.2 Activation plaquettaire

Au cours du sepsis, les dommages causés aux cellules endothéliales associés à l'activation de la cascade de coagulation et à la réponse inflammatoire, entraînent une activation des plaquettes. De plus, ces dernières peuvent également être stimulées par des interactions directes avec les agents pathogènes (**Figure 17**).

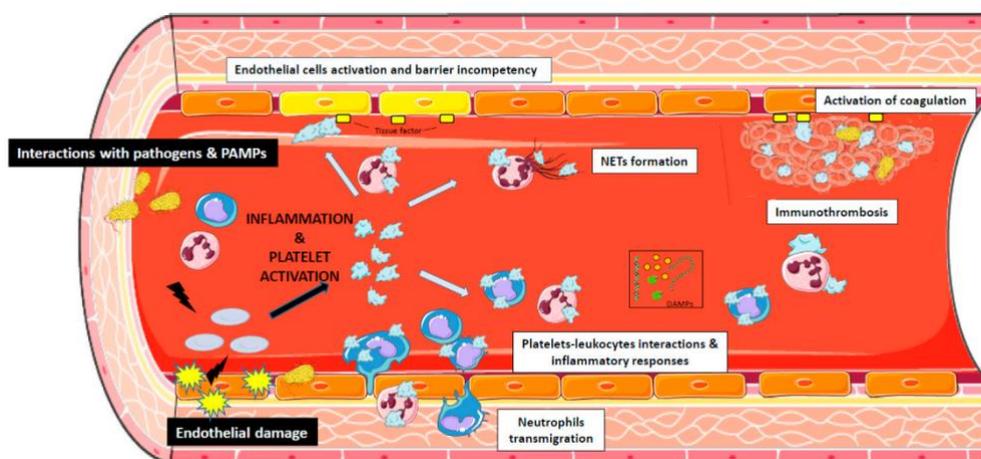


Figure 17 : Rôles pro-inflammatoires des plaquettes au cours du sepsis.

Les lésions endothéliales et les interactions avec les pathogènes, tels que les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs), activent le système immunitaire. Les plaquettes qui interagissent avec l'endothélium, les monocytes et les neutrophiles, en favorisant la formation de Neutrophils Extracellular Traps (NET), la transmigration des neutrophiles, et l'activation de la coagulation à travers les tissus de la coagulation par la libération de facteurs tissulaires et l'immunothrombose. DAMPs : damage associated molecular patterns (microvésicules, ADN libre, protéases). **Issu de Vardon-Bouines et al., 2019.**

Les plaquettes sont des fragments cytoplasmiques anucléés issus de la fragmentation de mégacaryocytes médullaires, ayant une durée de vie de 7 à 10 jours. Au cours de l'hémostase, les plaquettes activées adhèrent et s'agrègent à un endothélium lésé pour former ainsi le clou plaquettaire, qui garantit l'intégrité vasculaire et prévient les hémorragies. Les plaquettes activées participent à la réparation vasculaire et à l'angiogenèse en sécrétant le contenu de leurs granules, notamment les granules α . Par ailleurs, les plaquettes participent à la défense anti-bactérienne *via* la reconnaissance des bactéries par le TLR2 et le TLR4 présents à leur surface et en les présentant ensuite aux cellules phagocytaires (Clark et al., 2007). L'activation plaquettaire est également à l'origine de la libération de médiateurs pro-inflammatoires

(Semple et al., 2011), tels que l'IL-1 β , le RANTES (*Regulated on Activation, Normal Tcell Expressed and Secreted*) qui, en se fixant aux cellules endothéliales, favorise le recrutement des lymphocytes T (Danese et al., 2004; Mause et al., 2005) ou encore l'expression du CD40L. Ce dernier permet une interaction des plaquettes avec les lymphocytes, les cellules dendritiques, les granulocytes, les macrophages et monocytes (Boilard et al., 2010; Inwald et al., 2003; Prasad et al., 2003).

Au cours du choc septique, les médiateurs de l'inflammation sont sécrétés de manière excessive. La concentration en CD40 ligand soluble est corrélée à la mortalité (Lorente et al., 2011). L'inflammation entraîne également une modification des mégacaryocytes qui a pour conséquence une modification des granules des plaquettes. Cela entraîne une diminution de la fonction d'agrégation des plaquettes réduisant ainsi leur rôle hémostatique. Parallèlement, d'autres fonctions sont privilégiées comme la réparation des lésions vasculaires (Yaguchi et al., 2004).

En plus d'une altération des fonctions plaquettaires, les patients en choc septique présentent souvent une diminution du nombre de plaquettes, appelée thrombocytopénie, qui peut avoir plusieurs origines. Cette thrombocytopénie peut être due à une diminution de la production de plaquettes, à une hémodilution, à une destruction médiée par les cellules de l'immunité ou encore à une augmentation de la consommation ou une séquestration des plaquettes. Ce dernier mécanisme peut être observé dans des conditions telles que la CIVD, l'agrégation plaquettaire ou encore dans les thrombi formé par les Neutrophils Extracellular Traps (NETs) (Vardon-Boune et al., 2019).

Par leurs nombreuses interactions, les plaquettes sont des acteurs importants de l'activation vasculaire au cours du choc septique et de la CIVD.

II.C Dérégulations de l'hémostase dans la CIVD associée au choc septique

Lors d'un choc septique, l'activation cellulaire vasculaire entraîne un déséquilibre hémostatique, se traduisant par une génération de thrombine médiée par le facteur tissulaire, une activation excessive et dérégulée de la coagulation, ainsi que d'une altération de la fibrinolyse.

II.C.1 Activation de la coagulation

Les cytokines pro-inflammatoires produites lors d'un sepsis entraînent la transcription et l'expression du facteur tissulaire (FT) à la surface des cellules endothéliales, des plaquettes et des monocytes activés (Pawlinski & Mackman, 2010). Ces cellules libèrent des microvésicules (MVs) qui expriment le FT à leur surface. Ces MVs sont impliquées dans l'activation de la coagulation et de l'inflammation lors du choc septique (Meziani et al., 2010). Le facteur tissulaire est à l'origine de l'activation de la coagulation dans le sepsis (**Figure 18**), par la voie dite « extrinsèque ».

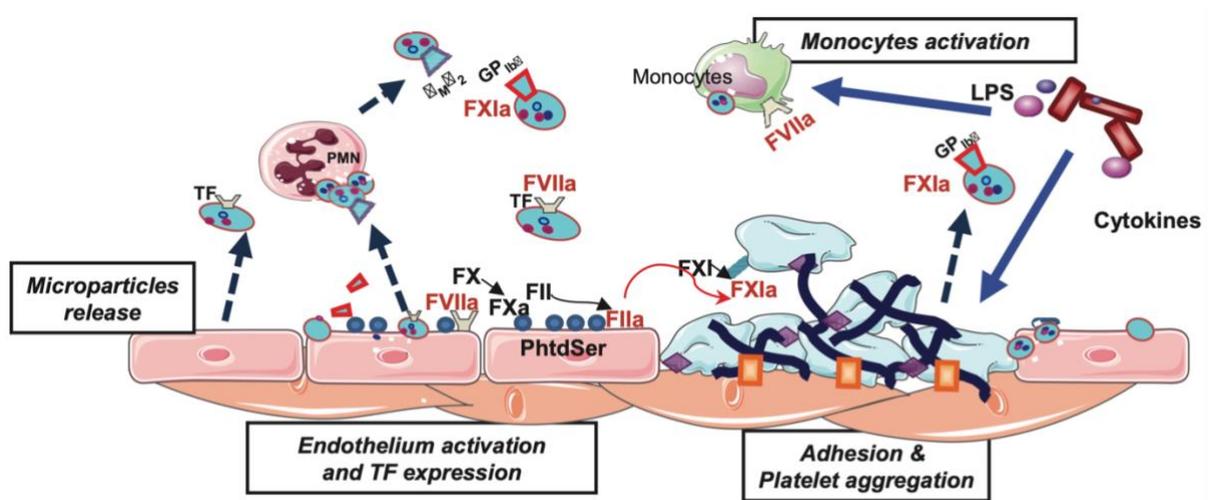


Figure 18 : Expression du facteur tissulaire et initiation de la cascade de coagulation.
D'après Meziani et al., 2010.

Une fois que le FT est exposé à la surface des cellules, il se lie au facteur VII et l'active, formant ainsi un complexe FT-facteur VIIa (VII activé). Ce complexe est ensuite reconnu par le facteur X, ce qui entraîne son activation en facteur Xa. Le facteur Xa est responsable de l'activation de la prothrombine (facteur II), qui à son tour est à l'origine de la génération de thrombine (facteur IIa).

La thrombine a plusieurs rôles dans la cascade de coagulation et dans son amplification (**Figure 19**). Tout d'abord, la thrombine convertit le fibrinogène en monomère de fibrines, initialement soluble mais qui seront secondairement assemblés en un caillot insoluble (Lane et al., 2005). La formation de ce caillot est l'aboutissement du processus de coagulation. Le réseau de fibrines du caillot est stabilisé par le facteur XII, lui-même activé par la thrombine. Enfin, la thrombine active les facteurs XI et VIII qui vont amplifier la coagulation.

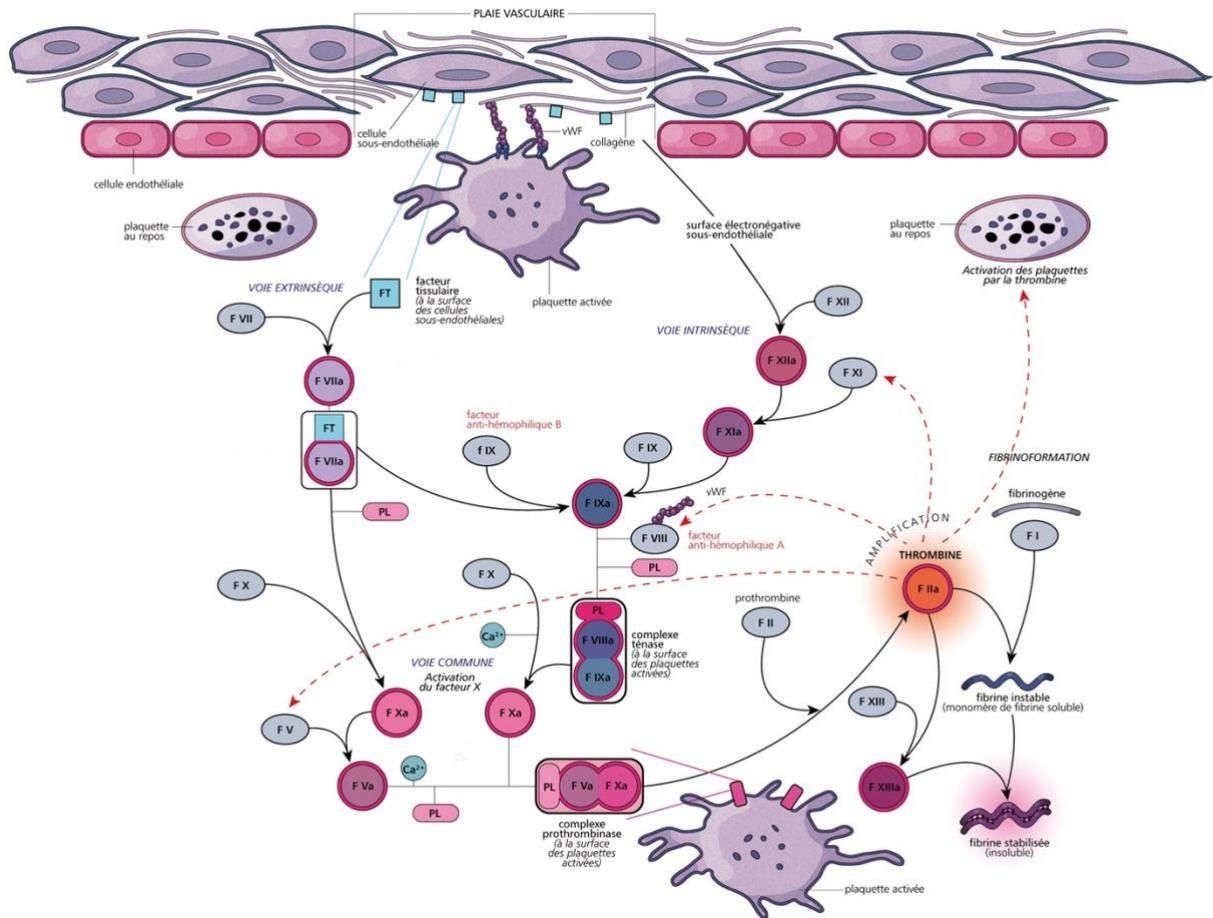


Figure 19: Les voies "intrinsèques" et "extrinsèques" de la coagulation et le rôle de la thrombine.

Chacune des voies de coagulation est en général initiée par une lésion de l'endothélium. La voie intrinsèque débute par l'activation du facteur XII, suivie par l'activation successive des facteurs XI et IX. Le facteur VII agit comme cofacteur du facteur IX pour activer le facteur X. La voie intrinsèque, initiée par le facteur tissulaire qui active le facteur VII, active également le facteur X. Le facteur X est au carrefour entre les deux voies de la coagulation, et, en présence du facteur Va, active le facteur II en thrombine. **Issu de Physiologie de l'hémostase.**

Dans des conditions physiologiques, les voies de la coagulation sont régulées par trois systèmes : l'inhibiteur de la voie du FT (TFPI *Tissue Factor Inhibitor*), la protéine C activée (PCa) qui inactive le facteur Va en le clivant et l'antithrombine (AT), principal inhibiteur de la thrombine.

II.C.2 La fibrinolyse

L'activation du mécanisme de fibrinolyse fait partie des mécanismes régulateurs de la coagulation. En effet, la fibrinolyse est un système protéolytique qui a pour fonction principale la dégradation de deux éléments : les dépôts de fibrine et la matrice extracellulaire (Alessi, n.d.).

Le système fibrinolytique agit en deux étapes (Anglés-Cano, 1994):

- (i) la transformation du plasminogène lié à la fibrine en plasmine sous l'action soit de l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA), présent sur les cellules endothéliales soit de l'urokinase (u-PA), présent sur les cellules rénales et immunitaire ;
- (ii) la dégradation de la fibrine par la plasmine libérant ainsi les produits de dégradation de la fibrine dont les D-dimères.

Les microvésicules émises par les cellules activées jouent également un rôle dans l'activation du système fibrinolytique. En effet, une étude récente a mis en évidence que ces microvésicules pouvaient se lier au plasminogène et induire une génération de plasmine (Plawinski et al., 2023).

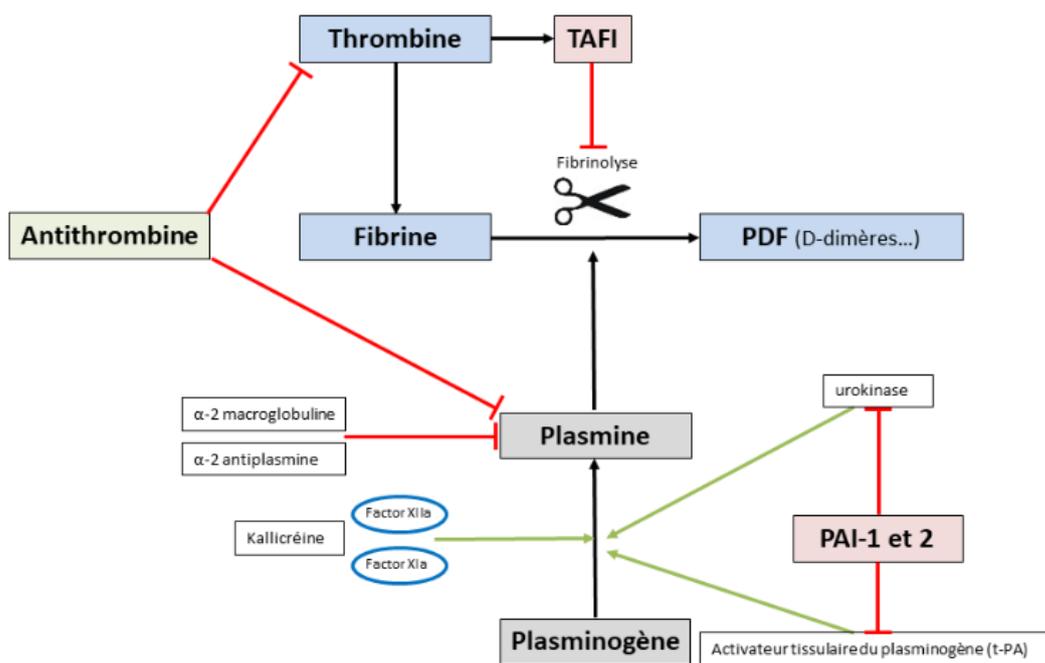


Figure 20: Le rôle central de la plasmine dans la fibrinolyse et ses mécanismes de régulation.

La plasmine est une sérine protéase lysant la fibrine lors du processus de fibrinolyse. Elle est issue de l'activation du plasminogène par l'activateur tissulaire du plasminogène et par l'urokinase. La plasmine est inhibée par l'antithrombine, l'α-2 macroglobuline, et l'α-2 antiplasmine. *Issu de « Effet de l'inhibition ciblée des interférons de type I sur l'endothélium vasculaire au cours du sepsis » par Raphaël Clere-Jehl.*

La génération de plasmine est contrôlée de plusieurs manières (**Figure 20**) : (i) les anti-activateurs du plasminogène, PAI-1 et PAI-2 dirigés respectivement contre le t-PA et l'urokinase ; (ii) les anti plasmines dont l' α -2 anti-plasmine qui va se lier spécifiquement à la fibrine et l' α -2 macroglobuline responsable de l'inhibition de plusieurs composants du système fibrinolytiques ; (iii) l'inhibiteur de la fibrinolyse activé par la thrombine (TAFI) en présence de thrombomoduline (Helms et al., 2022).

II.C.3 Dérégulations de l'hémostase au cours du choc septique

Au même titre que la réponse immunitaire ou que l'activation du complément, l'hémostase et plus particulièrement les mécanismes de coagulation sont nécessaires à la réponse de l'hôte face à l'infection. En effet, l'activation de la coagulation contribue à limiter la croissance et la dissémination du pathogène.

Cependant, lors d'un choc septique, cette activation peut être excessive et donc délétère pour le patient. La formation de *thrombi* dans la microcirculation entraîne un défaut de perfusion tissulaire, ce qui conduit à une hypoxémie tissulaire et, par conséquent, à une défaillance viscérale. Cette formation de microthromboses peut être causée par différents mécanismes, notamment une activation excessive de la coagulation, une perturbation des mécanismes régulateurs, mais également à une insuffisance fibrinolytique.

En effet, l'activation excessive de la coagulation est en partie engendrée par une libération importante de thrombine due à l'expression du facteur tissulaire. Les cellules activées exprimant le FT vont également libérer des microvésicules pro-coagulantes qui vont ainsi participer à l'activation excessive de la coagulation (Meziani *et al.*, 2010; Van Der Meijden *et al.*, 2012). La surproduction de thrombine peut être associée à un défaut de dégradation de la fibrine (van der Poll & Herwald, 2014), résultant d'une augmentation de la sécrétion de PAI-1 par les cellules endothéliales et les plaquettes activées (avec une diminution du t-PA) ainsi que par l'activation du TAFI (Zeerleder et al., 2006). Ces mécanismes, qu'ils agissent conjointement ou individuellement, peuvent entraîner des dysfonctions vasculaires pouvant conduire à une CIVD.

Cette activation incontrôlée de la coagulation est associée à une dérégulation des mécanismes d'inhibition. De plus, la gravité du sepsis est directement liée à l'altération des mécanismes

régulateurs. Au cours des infections graves, les concentrations plasmatiques d'anticoagulants naturels (protéine C, protéine S, antithrombine) diminuent précocement. Cela entraîne une réduction de l'activité du TFPI, conduisant à une diminution de la fibrinolyse. La fibrinolyse est également diminuée par l'augmentation de PAI-1, entraînant ainsi la dysfonction d'organes corrélée à la mortalité dans le choc septique et la CIVD (Hartemink et al., 2010).

Enfin, une récente étude sur des patients en choc septique a montré que l'élastase liée à l'ADN des NETs dégrade le plasminogène en fragments, réduisant ainsi la formation de plasmine et entraînant une diminution de la fibrinolyse (Cruz et al., 2019). Par ailleurs, une diminution significative de la concentration en plasminogène a été observée chez ces patients. Cette diminution ne serait pas liée uniquement à la consommation du plasminogène lors de la fibrinolyse, mais pourrait être expliquée par la protéolyse de l'élastase liée à l'ADN des NETs. Cette dernière est résistante à son inhibiteur l' α -1 protéinase contrairement à l'élastase libre. L'élastase de l'ADN des NETs peut donc cliver le plasminogène en fragments qui perdent leur capacité à générer de la plasmine. L'hypofibrinolyse est un facteur clé dans l'apparition des *microthrombi* disséminés, contribuant ainsi à la défaillance multiviscérale.

II.C.4 Des liens étroits entre immunité et coagulation : l'immunothrombose

L'activation de la coagulation est également impliquée dans la modulation de l'inflammation. Certains facteurs de coagulation activés (FT, Facteur VIIa, Facteur Xa et Facteur IIa) sont directement impliqués dans la réponse pro-inflammatoire de l'endothélium en stimulant la production d'IL-6 et l'expression de certaines molécules d'adhésion telles que la E-sélectine (Levi, 2010; van Hinsbergh, 2012). Les récepteurs activés par les protéases (PAR) sont présents à la surface des plaquettes, des cellules endothéliales ou encore des cellules immunitaires. Une fois activés par des facteurs de coagulation tels que la thrombine, les récepteurs PAR entraînent à la fois une libération de cytokines pro-inflammatoire par l'endothélium mais également une activation et une agrégation des plaquettes (Levi, 2010).

L'« immunothrombose » est un processus biologique qui réunit ces interactions entre le système immunitaire inné et la coagulation (Engelmann & Massberg, 2013a). Ce mécanisme de défense locale entraîne la génération de thrombine et de la formation de *thrombi* en impliquant les dépôts de fibrines, les monocytes, les plaquettes et les neutrophiles.

Afin de lutter contre l'infection et sa propagation, l'immunothrombose active quatre mécanismes distincts mais complémentaires (**Figure 21**) (Bonaventura et al., 2021):

- (1) Endiguement des agents pathogènes dans le réseau de fibrines, limitant ainsi la dissémination des agents pathogènes dans le sang
- (2) Formation de *microthrombi* dans la microcirculation qui permet de contenir l'infection et éviter l'invasion des tissus
- (3) Compartimentalisation de la réponse inflammatoire concentrant ainsi les stratégies antimicrobiennes
- (4) Recrutement de cellules immunitaires supplémentaires sur le site de l'infection

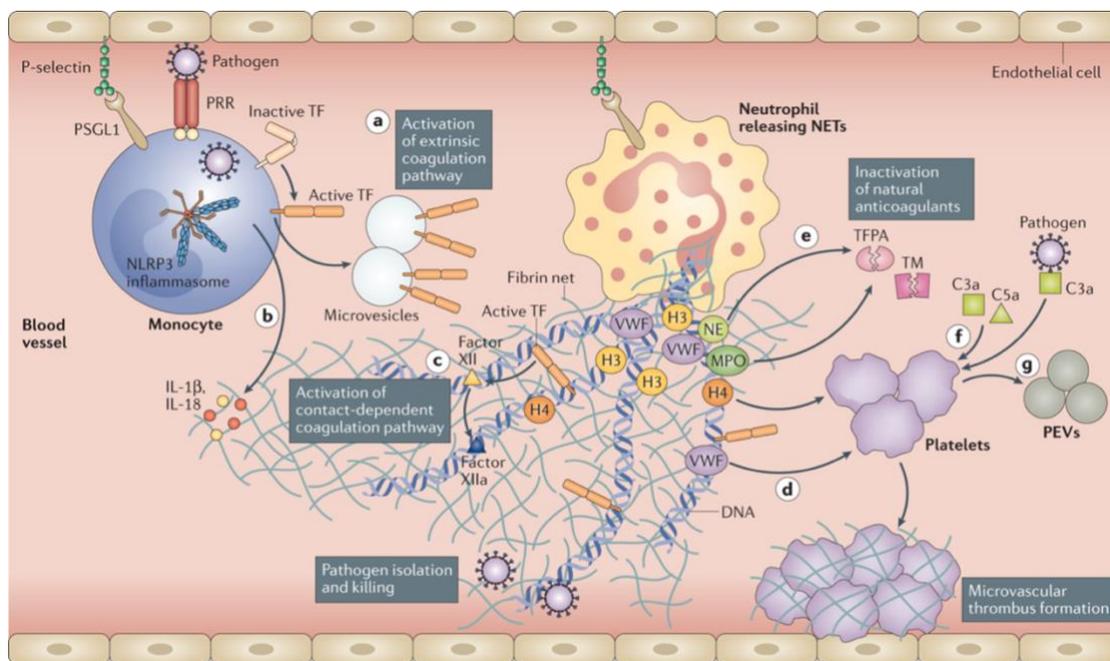


Figure 21: Rôle de l'immunothrombose dans la défense immunitaire.

Après la reconnaissance d'un agent pathogène par les PRRs, les monocytes et les microvésicules dérivées des monocytes libèrent le facteur tissulaire (TF) activé à proximité l'agent pathogène, activant ainsi la voie extrinsèque de la coagulation. Les neutrophiles sont recrutés et contribuent à ce processus par la libération de neutrophil extracellular traps (NET), il s'agit de filaments extracellulaires de chromatine (association d'ADN et d'histones) décondensée recouverts par de nombreuses protéines d'origine principalement granulaire. Ces NETs qui activent directement le facteur XII se lient également au facteur de von Willebrand (VWF) et contribuent au recrutement plaquettaire. Les histones, en particulier H3 et H4, déclenchent l'activation des plaquettes. En outre, l'élastase du polynucléaire neutrophile (NE) et la myéloperoxydase (MPO) présentes dans les NETs clivent et inactivent les anticoagulants naturels (tissu factor pathway inhibitor (TFPI) et thrombomoduline (TM)). Enfin, les NETs peuvent externaliser et lier le TF, favorisant l'activation de la voie extrinsèque de la coagulation. Les plaquettes soutiennent le processus immunothrombotique en activant la voie de coagulation contact-dépendante par la libération de polyphosphates et, avec les cellules endothéliales, peuvent favoriser la génération de fibrines. Les plaquettes peuvent également être activées par C3a et C5a. Les plaquettes activées libèrent de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires dans des « platelet extracellular vesicles » (PEV). Grâce à ce mécanisme, des agents pathogènes sont piégés dans les NETs. **Issu de Bonaventura et al., 2021.**

La physiopathologie du choc septique associe donc une intense réaction immunitaire avec une activation excessive et dérégulée de la coagulation. Ces processus mettent en jeu un grand nombre de cellules du compartiment vasculaire. Une meilleure compréhension de leurs mécanismes d'activation est donc primordiale dans le cadre du choc septique et de ses complications. Le rôle des polynucléaires neutrophiles dans la physiopathologie du choc septique font l'objet des travaux présentés ici.

III Les Polynucléaires Neutrophiles dans la réponse de l'hôte à l'infection

III.A Rappels Physiologiques

III.A.1 Caractéristiques

Les polynucléaires neutrophiles (PNN) ou neutrophiles sont les leucocytes les plus abondants dans la circulation sanguine, ils représentent 60 à 75% des globules blancs totaux. Ces cellules sont caractérisées par un noyau plurilobé et par un cytoplasme riche en granules de trois types. Les granules primaires ou azurophiles correspondent à des lysosomes riches en peptides antibactériens comme la myéloperoxydase, phosphatases acides, hydrolases. Les granules secondaires ou spécifique contiennent des métalloprotéases et de la lactoferrine. Enfin les granules tertiaires sont composés de gélatinases et de l'arginase.

Les neutrophiles sont produits dans la moelle osseuse à partir de cellules hématopoïétiques lors du processus de granulopoïèse (Borregaard, 2010). Ce processus implique la division cellulaire et la différenciation de précurseurs de cellules progéniteurs des monocytes – granulocytes (GMP), et qui ne se divisent (**Figure 22**). La moelle osseuse fabrique environ 50×10^9 neutrophiles et en libèrent 10^{11} par jour dans la circulation sanguine chez un adulte (Borregaard, 2010). Après leur libération dans le sang, les neutrophiles circulants ont une durée de vie courte d'environ 24h. En absence de réponse immunitaire, ces neutrophiles deviennent sénescents sont éliminés par le foie, la rate ou la moelle osseuse (Grieshaber-Bouyer & Nigrovic, 2019). Cependant, lors d'infections, ils peuvent survivre plusieurs jours supplémentaires. Une fois qu'ils ont infiltré les tissus, la demi-vie des PNN peut également être prolongée d'un à deux jours (Lu et al., 2012)

Les récepteurs impliqués dans la réponse immunitaire

Les neutrophiles, premiers acteurs de la réponse immunitaire, sont rapidement recrutés sur le site de l'infection grâce à des médiateurs chimiotactiques. Leur capacité à reconnaître les pathogènes et à répondre aux signaux de dangers repose sur l'expression de récepteurs membranaires spécifiques (**Tableau 6**). Ces récepteurs comprennent les récepteurs Fc, les récepteurs d'adhésion tels que les sélectines et les intégrines, les récepteurs aux chémokines (CXCR1 et 2 qui reconnaissent l'IL-8 ou encore le CXCR4 récepteur de l'IL-12), ainsi que des récepteurs de l'immunité innée tels que les récepteurs Toll-like. Ces récepteurs membranaires

déclenchent plusieurs voies de transduction des signaux intracellulaires notamment l'activation de protéines G et la signalisation calcique (Futosi et al., 2013). Étonnamment, il n'existe pas, à notre connaissance, d'étude exhaustive de l'expression des TLRs dans les PNNs, qui représentent pourtant un rôle majeur dans le sepsis et les conséquences du sepsis.

**Tableau 6 : Principaux récepteurs des neutrophiles.
Issu de Futosi et al., 2013.**

G-protein-coupled receptors	Fc-receptors	Adhesion receptors	Cytokine receptors	Innate immune receptors
<i>Formyl-peptide receptors</i> <ul style="list-style-type: none"> • FPR1 (FPR) • FPR2 (FPRL1) • FPR3 (FPRL2) 	<i>Fcγ-receptors</i> <ul style="list-style-type: none"> • FcγRI • FcγRIIA (human) • FcγRIIB (inhibitory) • FcγRIII (mouse) • FcγRIIIb (human) • FcγRIIV (mouse) 	<i>Selectins and selectin ligands</i> <ul style="list-style-type: none"> • L-selectin • PSGL-1 <i>Integrins</i> <ul style="list-style-type: none"> • LFA-1 ($\alpha_4\beta_2$) • Mac-1 ($\alpha_M\beta_2$) • VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$) 	<i>Type I cytokine receptors</i> <ul style="list-style-type: none"> • IL-4R • IL-6R • IL-12R • IL-15R • G-CSFR • GM-CSFR <i>Type II cytokine receptors</i> <ul style="list-style-type: none"> • IFNAR (IFNα/β-rec.) • IFNGR • IL-10R 	<i>Toll-like receptors</i> <ul style="list-style-type: none"> • TLR1 • TLR2 • TLR4 • TLR5 • TLR6 • TLR7 (?) • TLR8 • TLR9
<i>Classical chemoattractant receptors</i> <ul style="list-style-type: none"> • BLT1 (LTB$_4$-rec.) • BLT2 (LTB$_4$-rec.) • PAFR • C5aR 	<i>Fcα-receptors</i> <ul style="list-style-type: none"> • FcαRI (human) 		<i>IL-1R family</i> <ul style="list-style-type: none"> • IL-1RI • IL1RII (decoy) • IL-18R 	<i>C-type lectins</i> <ul style="list-style-type: none"> • Dectin-1 • Mincle • MDL-1 • Mcl • CLEC-2
<i>Chemokine receptors</i> <ul style="list-style-type: none"> • CXCR1 (human) • CXCR2 • CCR1 • CCR2 	<i>Fcϵ-receptors</i> <ul style="list-style-type: none"> • FcϵRI • FcϵRII 		<i>TNFR family</i> <ul style="list-style-type: none"> • TNFR1 (p55) • TNFR2 (p75) • Fas • LTβR • RANK • TRAIL-R2 • TRAIL-R3 	<i>NOD-like receptors</i> <ul style="list-style-type: none"> • NOD2 • NLRP3
				<i>RIG-like receptors</i> <ul style="list-style-type: none"> • RIG-1 • MDA5

Les récepteurs FcγRIII (CD16)

Les récepteurs Fc sont une famille de récepteurs, généralement des immunoglobulines (Ig), qui reconnaissent et se lient à la partie Fc des autres immunoglobulines. Chaque récepteur Fc reconnaît spécifiquement un type d'immunoglobulines (Ig). Ainsi, lors de la phagocytose, les récepteurs Fcγ permettent une meilleure reconnaissance du pathogène entouré par des IgG. Le neutrophile exprime l'isoforme FcγRIIIb de ce récepteur. Lorsque le CD16b reconnaît le complexe immun formé par les IgG et le pathogène, plusieurs voies de signalisations sont activées, notamment la voie « MAPKK / ERK » (*Mitogen Activated Protein Kinase Kinase, Extracellular Regulated Kinases*), qui entraîne plusieurs réponses cellulaires telles que la NETose, et la production de cytokines ou l'induction de la phagocytose. Lors de la réponse immunitaire, le récepteur FcγRIIIb peut subir des altérations, entraînant soit une diminution de son expression soit une désactivation. En effet, lors de l'activation du neutrophile, la métalloprotéase ADAM17, présente à la surface des neutrophiles, est phosphorylée, ce qui conduit au clivage du récepteur CD16b le rendant inactif (Mishra et al., 2017).

III.A.2 Chimiotactisme

En tant que leucocytes majoritaires dans la circulation sanguine, les neutrophiles jouent un rôle de sentinelles essentielles dans la réponse immunitaire innée, leur permettant de lutter contre les microorganismes pathogènes. Lorsque ces microorganismes réussissent à traverser les barrières physiques de l'organisme (peau, muqueuses), ils pénètrent les tissus et induisent l'activation des cellules endothéliales, qui à leur tour attirent les PNN grâce à l'émission de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF- α , IL-6 ...). Les neutrophiles vont alors migrer par chimiotactisme ou migration dirigée vers le site de l'infection (Zigmond, 1974). La **Figure 22** présente les grandes étapes de cette migration.

En conditions physiologiques, les neutrophiles ne s'attachent que faiblement aux cellules endothéliales. En revanche lors d'une infection, les cellules endothéliales surexpriment deux récepteurs aux sélectines, la P-selectine (CD62P) et la E-sélectine (CD62E) qui reconnaissent respectivement la PSGL-1 (Ligand-1 de la glycoprotéine P sélectine) et la L-sélectine (CD62L) exprimés à la surface des neutrophiles (Borregaard, 2010; Demaret et al., 2014; Ley et al., 2007).

Les neutrophiles fixés à l'endothélium, sont déplacés par le flux sanguin, rompant ainsi la liaison des sélectines. Cette liaison se reforme en aval. Ce processus correspond à l'étape de roulement ou « *rolling* » des PNN. Une fois activés, les neutrophiles expriment à leur surface des intégrines (CD11b/CD18) qui vont être reconnus lors du rolling par les molécules d'adhésion (ICAM-1 et VCAM-1) des cellules endothéliales (González-Amaro & Sánchez-Madrid, 1999). La reconnaissance des intégrines permet l'adhésion ferme des neutrophiles à l'endothélium vasculaire.

La dernière étape de la migration des neutrophiles correspond à la traversée des cellules endothéliales via une voie trans-cellulaire (à travers les cellules endothéliales) ou à travers les jonctions serrées entre les cellules endothéliales. Cette transmigration est dépendante de gradients de chemokines, notamment la formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) ou l'IL-8 (Amulic et al., 2012).

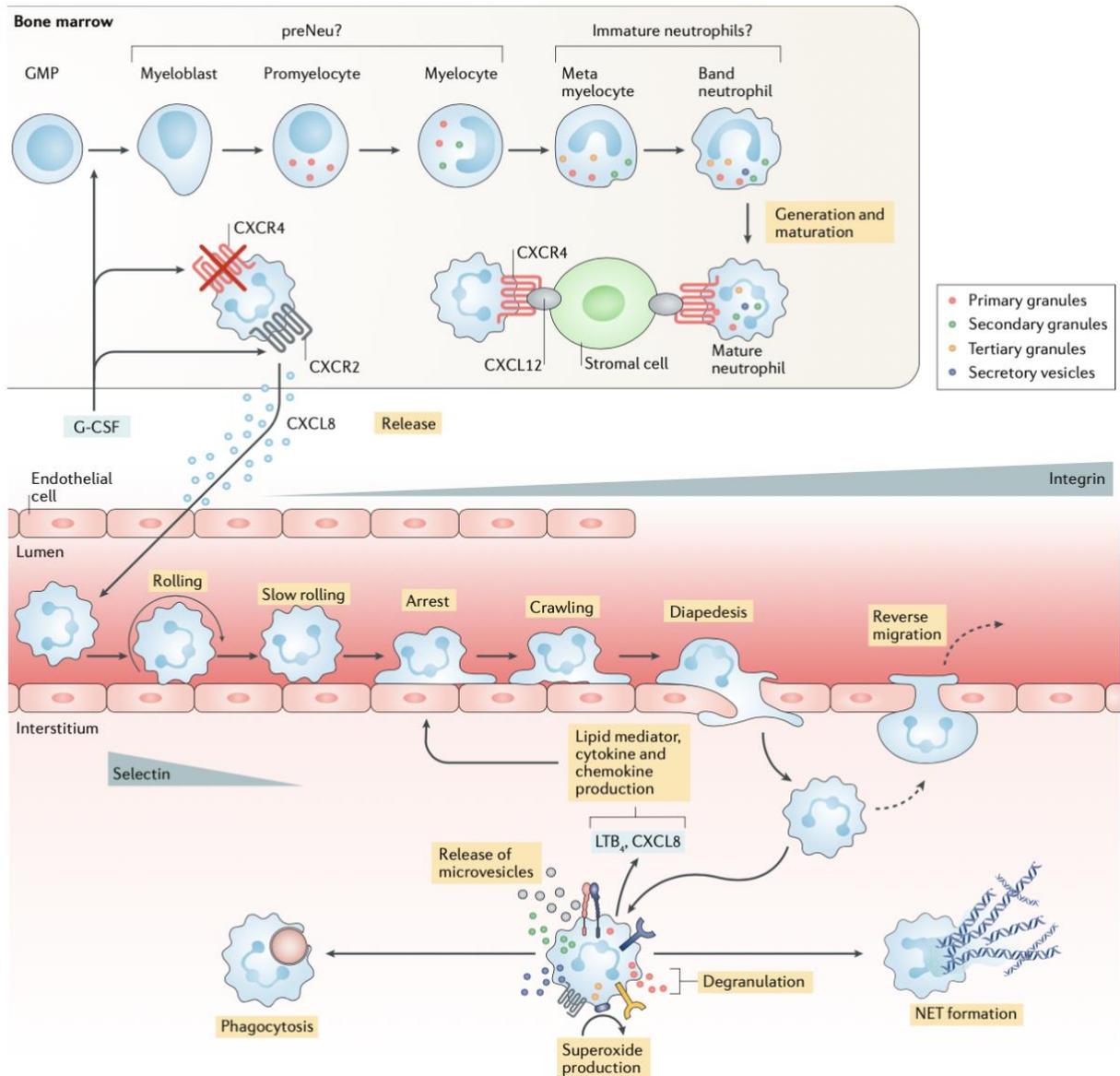


Figure 22 : Neutrophiles : développement, migration, adhésion et fonctions

La génération et la maturation des neutrophiles ont lieu dans la moelle osseuse. Le facteur de stimulation des colonies de granulocytes (G-CSF) est un régulateur essentiel de ces événements et contribue également à la libération des cellules dans la circulation. Lorsqu'ils détectent des stimuli microbiens ou inflammatoires environnementaux, les neutrophiles subissent une cascade de recrutement spécifique et migrent dans les tissus. Sur le site de l'inflammation, les neutrophiles exercent leurs différentes fonctions effectrices, conduisant à l'élimination des micro-organismes envahissants ou favorisant la réponse inflammatoire. CXCL, ligand de la CXC-chemokine ; CXCR, récepteur de la CXC-chemokine ; GMP, progéniteur granulo-monocytaire ; LTB₄, leukotriène B₄ ; NET, neutrophil extracellular trap. **Issu de Németh et al., 2020.**

III.A.3 Fonctions des PNN

Après avoir migré sur le site de l'infection, le neutrophile va reconnaître sa cible et activer ses propriétés bactéricides tels que la phagocytose, la dégranulation, la production de superoxyde ou encore la NETose, qui sera présenté dans une partie spécifique de ce manuscrit.

a. La phagocytose

La phagocytose est la principale fonction des neutrophiles, permettant à ces cellules phagocytaires hautement réactives de détruire les pathogènes. Les neutrophiles ont la capacité de phagocyter plus de 50 bactéries en quelques secondes, ce qui les distingue des macrophages qui réalisent ce processus en plusieurs minutes (van Kessel et al., 2014)

Grâce à l'émission de pseudopodes, les PNN vont enrober le microorganisme pathogène et ainsi l'emprisonner à l'intérieur d'un phagosome. Une fois à l'intérieur du cytoplasme, ce phagosome fusionne avec les lysosomes et forme un phagolysosome (Kruger et al., 2015). Le pH du phagolysosome va d'abord s'alcaliniser avant de s'acidifier permettant la digestion des bactéries capturées tout en protégeant les tissus sains de la toxicité des enzymes des granules. Deux mécanismes de phagocytose, à savoir un mécanisme oxygène-dépendant impliquant la NADPH oxydase (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate) et un mécanisme oxygène-indépendant (Nauseef, 2007) coexistent dans les tissus. Par la suite, la destruction du phagolysosome mobilise de nombreux mécanismes tels que la dégranulation, la libération d'enzymes et de protéines à activité bactéricides comme la MPO (Myéloperoxydase) ou encore l'activation de la NADPH oxydase (Segal, 2005).

b. Le métabolisme oxydatif

Le métabolisme oxydatif est un ensemble de processus métabolique intracellulaire par lesquels les neutrophiles vont sécréter des enzymes lors de la dégranulation, des protéines antimicrobiennes et des espèces réactives de l'oxygène pour détruire les pathogènes.

Le cytoplasme des neutrophiles comporte trois types de granules et des vésicules sécrétrices. Lors d'une infection, la membrane des granules et des vésicules vont fusionner avec la membrane plasmique du neutrophile ou du phagosome. Ce mécanisme de dégranulation permet la libération des différentes enzymes des granules du neutrophile comme la

myéloperoxydase, l'élastase du neutrophile (NE), la lactoferrine, la gélatinase et la collagénase et des métalloprotéases (Cowland & Borregaard, 2016). Tandis que les vésicules sécrétrices libèrent des protéines dérivées du plasma comme l'albumine (Sheshachalam et al., 2014). Le neutrophile contient également des protéines antimicrobiennes (*Bactericidal/Permeability Increasing Protein*, défensines, cathelicidine) qui participent de manière directe ou indirecte à l'élimination des pathogènes.

Les neutrophiles, comme les autres cellules phagocytaires ont la capacité de produire des espèces réactives de l'oxygène (ROS) intracellulaires afin de dégrader des pathogènes de grandes tailles (champignon, parasite) qui ne pourraient pas être phagocytés. Ces ROS sont des produits toxiques issus de la consommation de l'oxygène et sont, en conditions physiologiques, produites et transformées en eau par l'ensemble des cellules de l'organisme (Bedard & Krause, 2007). Le complexe NADPH oxydase de la membrane plasmique est la principale source de production des ROS. Cette production intracellulaire de ROS des neutrophiles leur permet d'augmenter la sécrétion de chimiokines et de cytokines.

En effet, une fois activés par les PAMPs et les DAMPs, les neutrophiles produisent des cytokines pro-inflammatoires, des chimiokines mais également des cytokines anti-inflammatoires et immuno-régulatrices (**Tableau 7**, (Futosi et al., 2013; Witko-Sarsat et al., 2000)). La production de ces molécules participe à la réponse immunitaire innée mais également à l'hématopoïèse et à la fibrinogénèse (Futosi et al., 2013; Tecchio et al., 2014)

Tableau 7: Production de chimiokines et cytokines par les neutrophiles

Cytokines pro-inflammatoires	TNF- α , IL-1 β , IL-12, IL-17, IL-6
Cytokines anti-inflammatoires	IL-1RA, IL-10, IL-4, TGF β
Cytokines immuno-régulatrices	IFN- γ , IFN- α , IFN- β
Facteurs de croissances	G-CSF, GM-CSF, FasL, VEGF
Chimiokines	IL-8, CXCL1, CXCL11, CXCL10, CCL2, CCL3, CCL4, CCL20

III.B La NETose

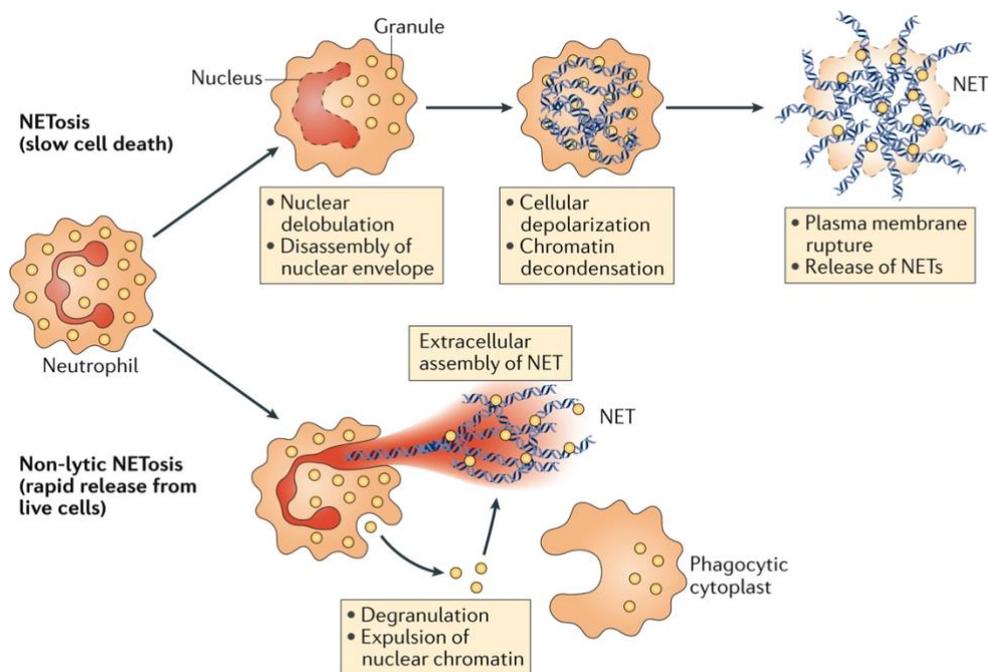
III.B.1 Formation des Neutrophil Extracellular Traps

a. Mécanismes

En complément de leurs fonctions précédemment évoquées, les neutrophiles contribuent également à la défense antimicrobienne par le biais du processus de NETose. Ce mécanisme se caractérise par la formation et l'émission de *Neutrophil Extracellular Traps* (NET) (Brinkmann et al., 2004). Ces NETs sont des filaments de chromatines décondensées, qui sont porteurs de protéines telles que les histones, les protéines des granules (comme l'élastase du neutrophile (NE) et la MPO) ainsi que des protéines cytosoliques (Urban et al., 2009). La NETose peut être déclenchée par divers stimuli (Abi Abdallah et al., 2012; Brinkmann et al., 2004; Saitoh et al., 2012; Urban et al., 2006). Le mécanisme de libération des NETs, leur composition serait dépendant de l'agent pathogène responsable de la stimulation (Parker et al., 2012). Néanmoins, de nombreuses recherches sont encore nécessaires pour élucider la NETose et ses interactions. C'est pourquoi des modèles *in vitro* ont été développés afin d'étudier l'induction de la NETose sur des neutrophiles humains après stimulations (Hoppenbrouwers et al., 2017). Le « gold-standard » dans ces modèles est une stimulation avec le phorbol myristate acetate (PMA) (Brinkmann et al., 2004; Fuchs et al., 2007, 2010); mais il est désormais également possible de stimuler avec des bactéries vivantes comme *Escherichia coli* pour se rapprocher des situations infectieuses (Araújo et al., 2016; Marin-Esteban et al., 2012; Parker et al., 2012).

La formation des NETs est initiée par l'activation des récepteurs membranaires suivie par un changement de la concentration calcique intracellulaire, une activation de la voie de signalisation des kinases et une production de ROS. Ensuite deux mécanismes de NETose sont décrits : la NETose suicidaire et la NETose dite non-lytique (**Figure 23**, (Papayannopoulos, 2018)). La NETose suicidaire dépend de la production de radicaux libre par la NAPDH oxydase 2 (Brinkmann et al., 2012), elle dure 3 à 8 heures après l'activation du neutrophiles et aboutit à la destruction de la cellule en même temps que le relargage du NET. La NETose non lytique est beaucoup plus rapide, active dans les premières minutes après l'exposition au pathogène. Elle concernerait les neutrophiles arrivant en premier sur le site de l'infection et aboutit à la

génération de NET en laissant un cytoplasme anucléé qui conserve ses capacités phagocytaires (Yipp et al., 2012).



Nature Reviews | Immunology

Figure 23: Les deux voies permettant la formation des NETs

La première est une voie de mort cellulaire appelée NETose suicidaire qui commence par la délobulation nucléaire et le désassemblage de l'enveloppe nucléaire et se poursuit par la perte de la polarisation cellulaire, la décondensation de la chromatine et la rupture de la membrane plasmique. La seconde est une forme non lytique de NETose qui peut se produire indépendamment de la mort cellulaire et implique l'expulsion sécrétée de la chromatine nucléaire qui s'accompagne de la libération de protéines de granules par dégranulation. **Issu de Papayannopoulos, 2018.**

Néanmoins, les deux voies de NETose semblent avoir la même suite de modifications morphologiques (Thiam et al., 2020):

- Désassemblages des filaments d'actine
- Libération des microvésicules de la membrane plasmique, vésiculation du réticulum endoplasmique, désassemblage des microtubules et perte des filaments de vimentine
- Décondensation de la chromatine
- Perte des lobules du noyau, perméabilisation des membranes nucléaires et plasmique
- Rupture des membranes du noyau
- Propagation de la chromatine dans le cytoplasme
- Rupture de la membrane plasmique et relargage du NET.

Le mécanisme de NETose met en jeu les enzymes du neutrophile et plus particulièrement la MPO et la NE. Les ROS, générés par la NADPH oxydase, vont activer la MPO. La MPO va à la fois générer des ions halogénés et d'hypochlorite (Metzler et al., 2014) mais également provoquer l'activation et la translocation de la NE vers le noyau. La NE va alors empêcher l'empaquetage de la chromatine en protéolysant les histones (Papayannopoulos et al., 2010). Par la suite, la MPO et la NE vont agir en synergie pour décondenser la chromatine.

b. Décondensation de la chromatine et élongation de l'ADN au cours du cycle cellulaire

La réplication de l'ADN

La chromatine constitue le matériel génétique des cellules. C'est une structure complexe composée principalement d'ADN, d'histones et de protéines non histoniques. L'ADN est constitué de deux brins qui s'enroulent autour de quatre types d'histones (H2A, H2B, H3 et H4) pour former des structures appelées nucléosomes. Ces nucléosomes représentent la première étape de compaction de l'ADN dans la chromatine. Cette dernière s'organise ensuite en structures plus complexes jusqu'à former le chromosome.

Ces structures subissent des changements de structure dynamique, passant de formes condensées ou encore appelées hétérochromatines lors de la division cellulaire à des formes décondensées lors des phases interphasiques (G1, S, G2) du cycle cellulaire. Pendant la phase S (*Synthese*) du cycle cellulaire, a lieu la réplication de l'ADN, une étape primordiale du cycle cellulaire où des brins d'ADN sont synthétisés à partir des brins existants. La réplication de l'ADN se déroule en trois étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison. Lors de l'élongation, l'ADN double brin est déroulé et séparé en deux brins individuels au niveau de la fourche de réplication. Les ADN polymérase, enzymes de réplication, se lient à leur amorce et synthétisent de nouveaux brins d'ADN complémentaires au brin matrice initial en ajoutant des nucléotides. Ainsi, la réplication garantit la formation de deux copies identiques de l'ADN, une pour chaque cellule fille, et assure la transmission précise de l'information génétique lors de la division cellulaire.

Le complexe Mini Chromosome Maintenance

Pendant la phase G1 du cycle cellulaire, des protéines appelées ORC-1 et Cdc6 se lient à la chromatine au niveau de sites spécifiques appelées origines de réplication. La protéine Cdt1

amène sur ces sites de fixation un complexe protéique appelé *Mini Chromosome Maintenance* (MCM) formant ainsi le complexe de pré-réplication (Bell & Dutta, 2002). Lors de la transition entre les phases G1 et S, l'activité des enzymes cycline-dépendantes et des kinases dépendantes de Dbf4 permet la formation de la fourche de réplication en phosphorylant différentes sous-unités des MCM (Sheu & Stillman, 2006). Ces phosphorylations recrutent d'autres composants de la fourche de réplication, tels que les protéines GINS, Cdc45 et l'ADN polymérase (**Figure 24**, (Bochman & Schwacha, 2009)). Cela permet donc d'amorcer la réplication de l'ADN.

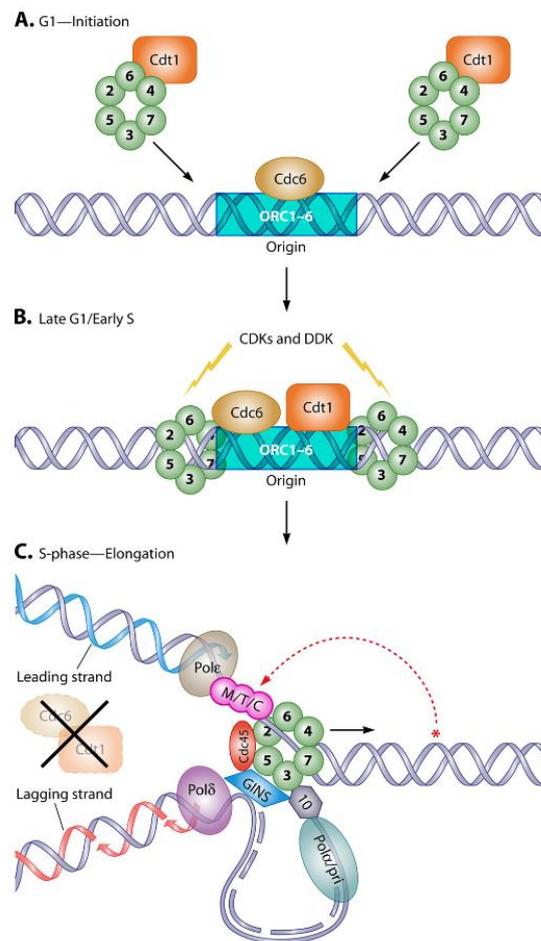


Figure 24: Implication du complexe MCM dans l'initiation et l'élongation de la réplication de l'ADN chez les eucaryotes.

(A) Pendant la phase G1, Cdc6 et Cdt1 recrutent et chargent MCM2-7 sur les origines de réplication (marquées par la liaison d'Ordc1-6) pour former un complexe stable et inactif appelé complexe de pré-réplication (pré-RC). (B) En fin de phase G1/ début de phase S, le pré-RC est activé de manière à dérouler l'ADN par les kinases cycline-dépendantes (CDKs) et les kinases dépendantes de Dbf4 (DDK). Cela facilite le chargement de facteurs de réplication supplémentaires (par exemple, Cdc45, MCM10, GINS, l'ADN polymérase et les ADN polymérase ϵ) et le déroulement de l'ADN à l'origine. (C) Pendant la phase S, Cdc6 et Cdt1 sont dégradés ou inactivés (représentés par des pointillés) pour empêcher la formation supplémentaire de pré-RC, et la réplication bidirectionnelle de l'ADN commence. Lorsque la fourche de réplication rencontre des lésions de l'ADN (astérisque rouge), la réponse du point de contrôle de la phase S (via le complexe Mrc1/Tof1/Csm3) ralentit ou arrête la progression de la fourche de réplication et stabilise l'association de MCM2-7 avec la fourche de replication pendant la réparation de l'ADN. **Issu de Bochman & Schwacha, 2009.**

Le complexe MCM est donc primordial dans la réplication de l'ADN. Composé de six protéines (MCM2, MCM3, MCM4, MCM5, MCM6 et MCM7), il adopte une structure en forme d'anneau avec une ouverture entre les sous unités MCM2 et MCM5 lorsqu'il est inactif (**Figure 25**(Apellániz et al., 2018)). Cette ouverture empêche la formation du domaine ATPase situé à l'interface de MCM2 et MCM5, ce qui bloque le déroulement de l'ADN. Cependant, lors de l'activation de la réplication, le complexe MCM est chargée sur l'ADN. Un changement de conformation du complexe des modifications post traductionnelles sur les différentes sous-unités referme alors l'ouverture entre les protéines MCM2 et MCM5. Cette modification permet de restaurer le site d'hydrolyse de l'ADN. De plus, lorsque le complexe MCM s'associe avec les protéines GINS et Cdc45, il active les activités hélicases des protéines MCM2, MCM4, MCM 6 et MCM7, ce qui lui permet de séparer les brins d'ADN en déroulant la double hélice d'ADN et faciliter la réplication (Moyer et al., 2006).

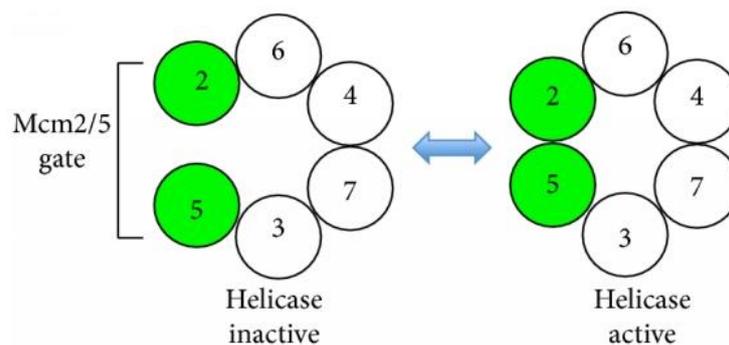


Figure 25: Structure du complexe *Mini Chromosome Maintenance*. En forme inactive, l'anneau est ouvert entre les protéines MCM2 et MCM5. En forme active, l'anneau est fermé, l'activité hélicase peut commencer. Issu de N. E. Simon & Schwacha, 2014.

En raison de leur forte activité tout au long du cycle cellulaire, les protéines MCM2-7 pourraient servir de précieux marqueurs biologiques pour le diagnostic et le pronostic dans de nombreuses pathologies, telles que dans le cancer (Das et al., 2013; Giaginis et al., 2010), ainsi que de potentielles cibles thérapeutiques (N. E. Simon & Schwacha, 2014).

c. La décondensation de l'ADN au cours de la NETose

Les *Neutrophils Extracellular Traps* sont formés par de la chromatine décondensée. Cette caractéristique rend le processus de NETose unique comparé aux autres processus de mort cellulaire tels que l'apoptose, la nécrose ou la pyroptose (de Vasconcelos et al., 2019;

Goldmann & Medina, 2012). Ainsi, il est primordial de comprendre les mécanismes qui provoquent cette décondensation de la chromatine afin de mieux appréhender le processus de NETose.

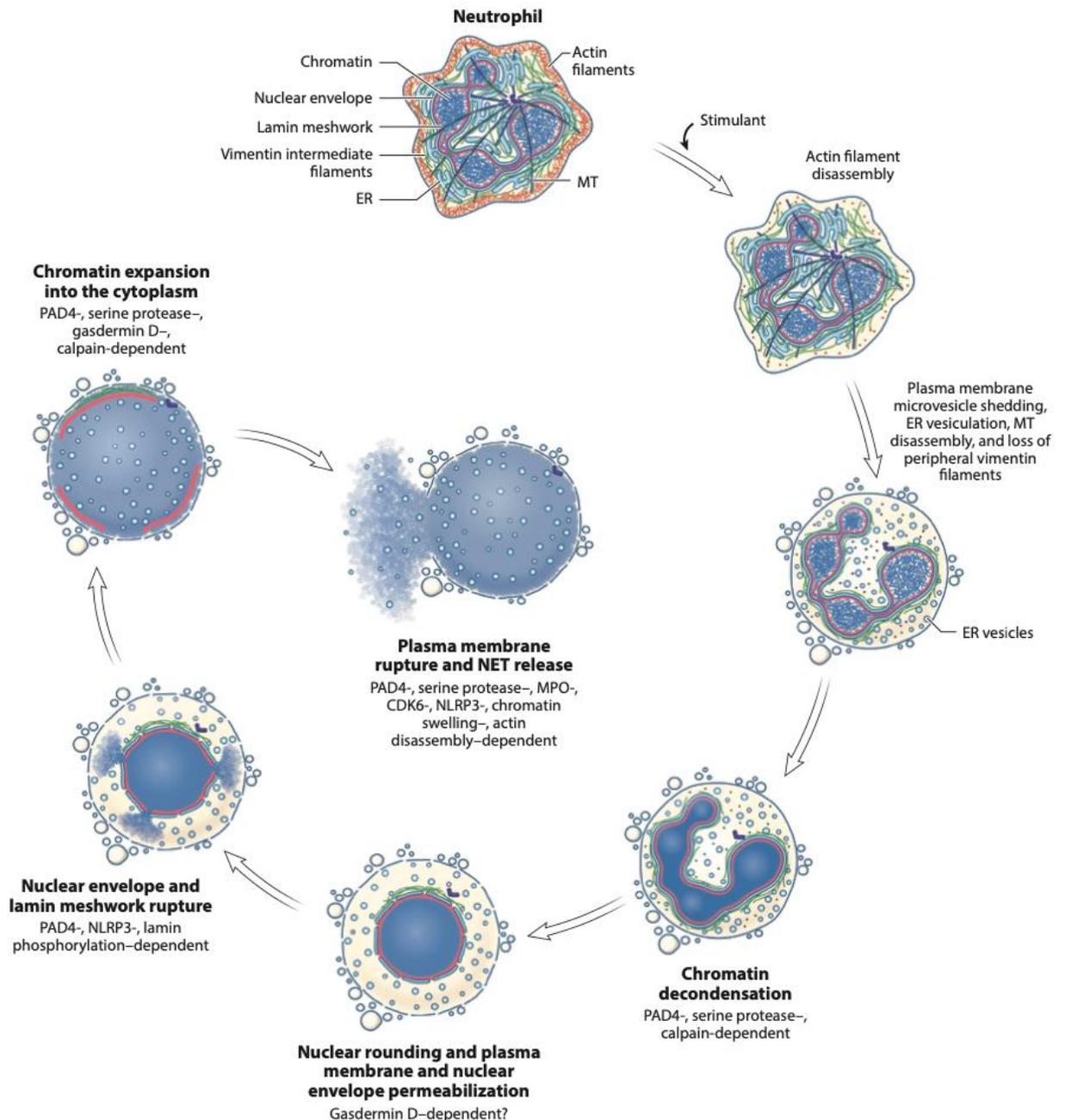


Figure 26: Modifications moléculaires et cellulaires du polynucléaire neutrophile au cours de la NETose.

CDK6, cyclin-dependent kinase 6; ER, endoplasmic reticulum; MPO, myeloperoxidase; MT, microtubule; NET, neutrophil extracellular trap; NLRP3, nucleotide oligomerization domain (NOD)-like receptor protein 3; PAD4, peptidyl arginine deiminase 4. Issu de Thiam et al., 2020.

Au cours de la NETose, la décondensation de la chromatine est caractérisée par une diminution de l'hétérochromatine et une augmentation de l'espace cellulaire occupé par l'ADN, démontrant ainsi une perte d'hétérogénéité de la chromatine (**Figure 26**, (Thiam et al., 2020)). Les régions de la chromatine qui étaient auparavant hautement condensées et peu accessibles aux processus cellulaires deviennent plus uniformes et moins différenciées. Cette décondensation de la chromatine, qui paraît proche de celle qui se produit lors de la réplication de l'ADN, est supposée être régulée par des modifications post traductionnelles des histones tels que la citrullination médiée par la peptidylarginine-déiminase 4 (PAD4) (Y. Wang et al., 2009) ou encore le clivage médié par les sérines protéases (Papayannopoulos et al., 2010).

La Peptidyl-arginine déiminase 4

Dans le contexte de la NETose, la protéine PAD4 convertit l'arginine en citrulline sur les histones, entraînant une perte de leur charge positive des histones (Leshner et al., 2012; Y. Wang et al., 2009). Cette modification post-traductionnelle provoque une décondensation de la chromatine en réduisant l'interaction électrostatique entre les histones et l'ADN. La citrullination joue un rôle important dans de nombreuses pathologies, en particulier dans les processus d'inflammation (**Figure 27**, (Yu & Proost, 2022)).

Des études *in vivo* ont montré que chez des souris déficientes en PAD4 aucun NET n'était relargué après une stimulation au LPS ou au TNF α (Bawadekar et al., 2017). Les neutrophiles issus de souris KO pour PAD4 ne présentent pas d'histones citrullinées ni de NETose après différents stimuli tels que la PMA, le LPS et les ionophores de calcium (P. Li et al., 2010; Martinod et al., 2013). PAD4 semble également essentiel dans la NETose dans certaines pathologies comme la thrombose veineuse profonde, dans le cancer ou encore dans le diabète où son expression est augmentée (Demers et al., 2012; Martinod et al., 2013; S. L. Wong et al., 2015). Cependant, l'inhibition pharmacologique de PAD4 sur des cellules KO ont montré des résultats variables. Certaines études ont montré que l'inhibition des enzymes PAD n'avaient aucun effet sur la NETose après stimulation par la PMA, *Candida albicans* ou des *streptocoques* du groupe B (Kenny et al., 2017; Neeli & Radic, 2013). L'inhibition de PAD4 bloquerait la formation de NET induit par la nicotine mais n'aurait pas d'impact sur la formation des NET induit par les cristaux de cholestérol (Papayannopoulos, 2018). Ces résultats suggèrent que l'implication de PAD4 dans la NETose dépendrait de l'agent stimulant.

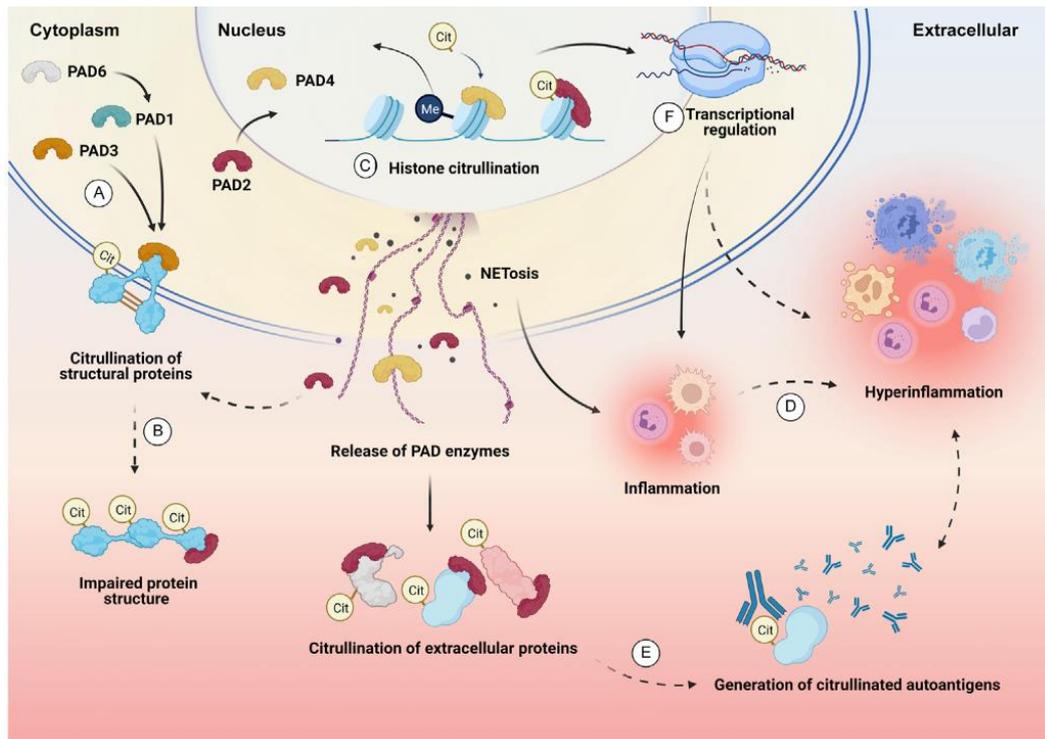


Figure 27: Les voies de citrullination dans la santé et les maladies

Les peptidylarginines déiminases cytoplasmiques (PAD) se concentrent principalement sur la citrullination des protéines structurales pour maintenir l'architecture cellulaire. Suite à la citrullination et à la perte de charges positives, les protéines structurales peuvent subir des changements de conformation entraînant le dépliage et la polymérisation, ce qui confère respectivement de la flexibilité et de la résistance au cytosquelette (A). En cas de maladie, une citrullination aberrante par l'un des PAD peut altérer les protéines structurales et compromettre l'intégrité cellulaire (B). L'expression nucléaire de PAD4 et la translocation de PAD2 vers le noyau permettent à ces enzymes de médier la citrullination des histones (C), ce qui peut déclencher la formation des NETs dans les leucocytes et susciter une réponse inflammatoire en tant que défense cellulaire, mais une activité excessive des PAD conduite à une hyperinflammation (D). En raison de la lyse cellulaire, davantage d'enzymes PAD sont libérées et ont accès à des substrats extracellulaires. PAD4 a des effets épigénétiques sur l'expression des gènes par la citrullination des histones, la déméthylimination ou la modification directe des facteurs de transcription. La signalisation de NF- κ B est particulièrement influencée par l'activité des PAD, ce qui impacte significativement la réponse inflammatoire (F). Les flèches pleines représentent les voies de la citrullination dans la santé ; les flèches en pointillés représentent la citrullination en cas de maladie. **Issu de Yu & Proost, 2022.**

Grâce à sa capacité à citrulliner les histones et à son expression spécifique dans les granulocytes, PAD4 représente un candidat idéal pour réguler la décondensation de la chromatine lors de la NETose, et par extension, il pourrait être une cible potentielle pour l'inhibition de ce processus. Toutefois, il est important de noter que les résultats des dernières études sur l'implication de PAD4 dans la NETose sont contrastés, ce qui souligne la nécessité de mener davantage de recherches pour approfondir la compréhension du mécanisme de décondensation de la chromatine dans la NETose.

Les protéases des granules primaires du neutrophile

Parmi les protéines impliquées dans la décondensation de la chromatine, les protéases sont essentielles. Les sérines protéases des granules primaires des neutrophiles, telles que l'élastase du neutrophile, la protéinase 3 (PR3) la cathepsine G ou encore la calpaïne sont toutes impliquées dans la NETose au cours de laquelle leur activité est libérée dans le cytosol (Papayannopoulos et al., 2010). Des études ont montré que l'élastase du neutrophile et la PR3 peuvent induire la décondensation de la chromatine, et leur inhibition réduit la libération de NETs (Farley et al., 2012). La contribution spécifique de l'élastase du neutrophile est débattue. En effet, la NETose induite par un agent ionophore n'est pas corrélée à l'activité de l'élastase du neutrophile (Kenny et al., 2017) et après une stimulation par la PMA ou par les plaquette, les neutrophiles de souris KO en neutrophile élastase peuvent toujours produire des NETs (Martinod et al., 2016).

En revanche, l'implication des sérines protéases est désormais bien établie. Les protéases médient la décondensation de la chromatine lors de la NETose en clivant les histones libérant ainsi l'ADN. Les produits de dégradation d'histones H2B et H4 ont été observés dans les neutrophiles stimulées par la PMA, et l'inhibition de l'élastase du neutrophile empêche la dégradation de l'histone H4, suggérant que le clivage de l'histone H4 par la neutrophile élastase est crucial pour la décondensation de la chromatine (Papayannopoulos et al., 2010). Cependant, les mécanismes expliquant la dégranulation de ces protéases et leur translocation vers le noyau, leur permettant ainsi d'accéder aux histones, restent inconnus.

Une étude récente a montré que la calpaïne, une protéase activée par le calcium, favorisera la décondensation de la chromatine en présence de PAD4, suggérant ainsi un effet synergique entre la citrullination par PAD4 et le clivage par la calpaïne (Gößwein et al., 2019).

La myéloperoxydase

La MPO, présente dans les granules primaires des neutrophiles, participe également à la décondensation de la chromatine. Les polynucléaires neutrophiles déficients en MPO ne libèrent pas de NETs lorsqu'ils sont stimulés soit par la PMA soit par *Candida albicans* ou par des streptocoques du groupe B (Kenny et al., 2017; Metzler et al., 2011), mais l'inhibition pharmacologique de la MPO ne fait que retarder la NETose, ce qui suggère qu'il suffit d'une quantité limitée de MPO pour induire la NETose. De plus, la MPO pourrait potentialiser l'action

de l'élastase du neutrophile dans la décondensation de la chromatine (Papayannopoulos et al., 2010).

La NETose est un phénomène complexe qui implique de nombreux acteurs cellulaires et moléculaires à l'origine de modifications morphologiques du polynucléaire neutrophile. Ces modifications semblent être précédées par une phase biochimique active (Neubert et al., 2018). Reis *et al.* se sont récemment intéressés à l'étude des voies biochimiques impliquées dans la NETose et ont montré que les neutrophiles stimulés à la ionomycine subissaient une succession de modifications biochimiques et morphologiques avant de relarguer les NETs (Reis et al., 2023). En effet, en quelques minutes, le neutrophile libère des protéines essentielles à la réponse immunitaire, réorganise le cytosquelette, que des protéines impliquées dans le remodelage de l'actine étaient redistribuées dans le noyau. Une citrullination des protéines nucléaires et des protéines associées à l'actine est également observée (Reis et al., 2023). Ces modifications biochimiques aboutissent à la perte de la forme caractéristique du noyau du polynucléaire neutrophile au profit d'une forme sphérique (**Figure 26**).

III.B.2 Les NETS dans la défense anti microbienne

Le maillage constitué par les filaments d'ADN représente une barrière physique qui piège les microorganismes pathogènes et empêche leur dissémination lors d'infections (Urban et al., 2006). Des images de microscopie confocale intravitale ont pu montrer *in vitro* et *in vivo* des NETs capturant des bactéries *Escherichia coli* circulants (Clark et al., 2007; McDonald et al., 2012). A ce jour, la question de savoir pourquoi les neutrophiles optent plutôt pour la NETose que la phagocytose n'a pas encore été entièrement élucidée, l'hypothèse selon laquelle la taille des pathogènes serait déterminant dans le mécanisme choisi semble se confirmer (Branzk et al., 2014; Warnatsch et al., 2017). La première fonction des NET est donc antimicrobienne et plus particulièrement antibactérienne et antifongique. L'activité antimicrobienne des NETs est renforcée grâce à l'action de protéases, à la toxicité des histones ainsi qu'aux protéines des granules tel que la NE et la MPO (Burgener & Schroder, 2020; Hirsch, 1958). La toxicité des histones a été confirmée dans une étude *in vivo* où l'administration d'un anticorps anti-histones a permis de prévenir les lésions observées dans ce modèle murin de syndrome de détresse respiratoire (SDRA) (Abrams et al., 2013). Les histones sont donc impliquées dans la physiopathologie du SDRA et du sepsis (Semeraro et al., 2011; Z. Xu et al., 2015)

Durant la NETose, les pores GSDMD (Gasdermin D) de la membrane plasmique sont clivés en fragments dont le fragment p30 qui va immédiatement se lier à des lipides (K. W. Chen et al., 2018; J. Ding et al., 2016). La GSDMD p30 a pour cible les membranes bactériennes d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus* mais participe également à l'activité antimicrobienne des NET en facilitant la rupture de la membrane plasmique (X. Liu et al., 2016). La GSDMD p30 facilite la sécrétion d'IL-1 β qui va recruter d'autres neutrophiles circulants (Monteleone et al., 2018). A noter qu'une étude récente a néanmoins montré dans un modèle *in vitro* que la NETose était indépendante de la GSDMD (Stojkov et al., 2023).

III.B.3 Les NETs participent à l'activation de la coagulation

Les rôles des NETs ne se limitent pas à la destruction du pathogène mais ils participent également à l'initiation de la coagulation grâce à plusieurs mécanismes d'activation. Tout d'abord, le maillage d'ADN des NETs permet également de piéger des cellules sanguines (plaquettes, globules rouges ...) participant ainsi à la formation de thrombose dans la circulation (Ley et al., 2018; Lu et al., 2012; Rosales, 2018). La présence de ces *microthrombi* participe à la défense de l'hôte dans l'infection (Engelmann & Massberg, 2013b)

Les filaments d'ADN des NETs créent une vaste surface anionique qui, par l'intermédiaire du facteur XII, participe au développement de la phase contact de la coagulation (Iba et al., 2014), qui est associée à l'activation de la coagulation observée lors du sepsis. (Frick et al., 2007). De plus, les composants des NETs bloquent les mécanismes d'anticoagulation et dans le même temps activent leurs propriétés pro-coagulantes. L'anticoagulation est dérégulée par les histones libérés par les PNNs qui inactivent la protéine C activée (Ammollo et al., 2011). Ces histones sont de puissants médiateurs de la thrombose *in vitro* (Z. Xu et al., 2015). De plus, les NETs participent directement en favorisant le clivage de la prothrombine en de thrombine *via* la reconnaissance des histones H3 et H4 par les TLR2 et 4 plaquettaires (Gould et al., 2014).

L'interaction entre les plaquettes activées et les neutrophiles est primordiale dans la réponse à l'infection. Ces interactions sont médiées par plusieurs signaux moléculaires dont la reconnaissance du TLR4 plaquettaire mais surtout la reconnaissance de la P-sélectine présente à la surface des PNN et des plaquettes (Clark et al., 2007; Sreeramkumar et al., 2014). Après activation, les plaquettes vont participer à la formation des NETs (Clark et al., 2007), qui vont-

elles-mêmes faciliter l'agrégation plaquettaire et donc la formation de thrombus. La voie extrinsèque de la coagulation (**Figure 28**) est activée à la fois par l'interaction entre les plaquettes activées et les neutrophiles mais également par une persistance de l'expression du facteur tissulaire, qui ne peut pas être dégradé par son inhibiteur du TFPI à cause de l'activité de la neutrophile élastase (Massberg et al., 2010).

Par ailleurs, dans ce contexte les PNN peuvent exprimer le FT à leur surface et émettre des MVs qui l'expriment (Maugeri et al., 2006). L'expression du FT dans les NETs participe à l'adhésion plaquettaire et amplifie la cascade de coagulation.

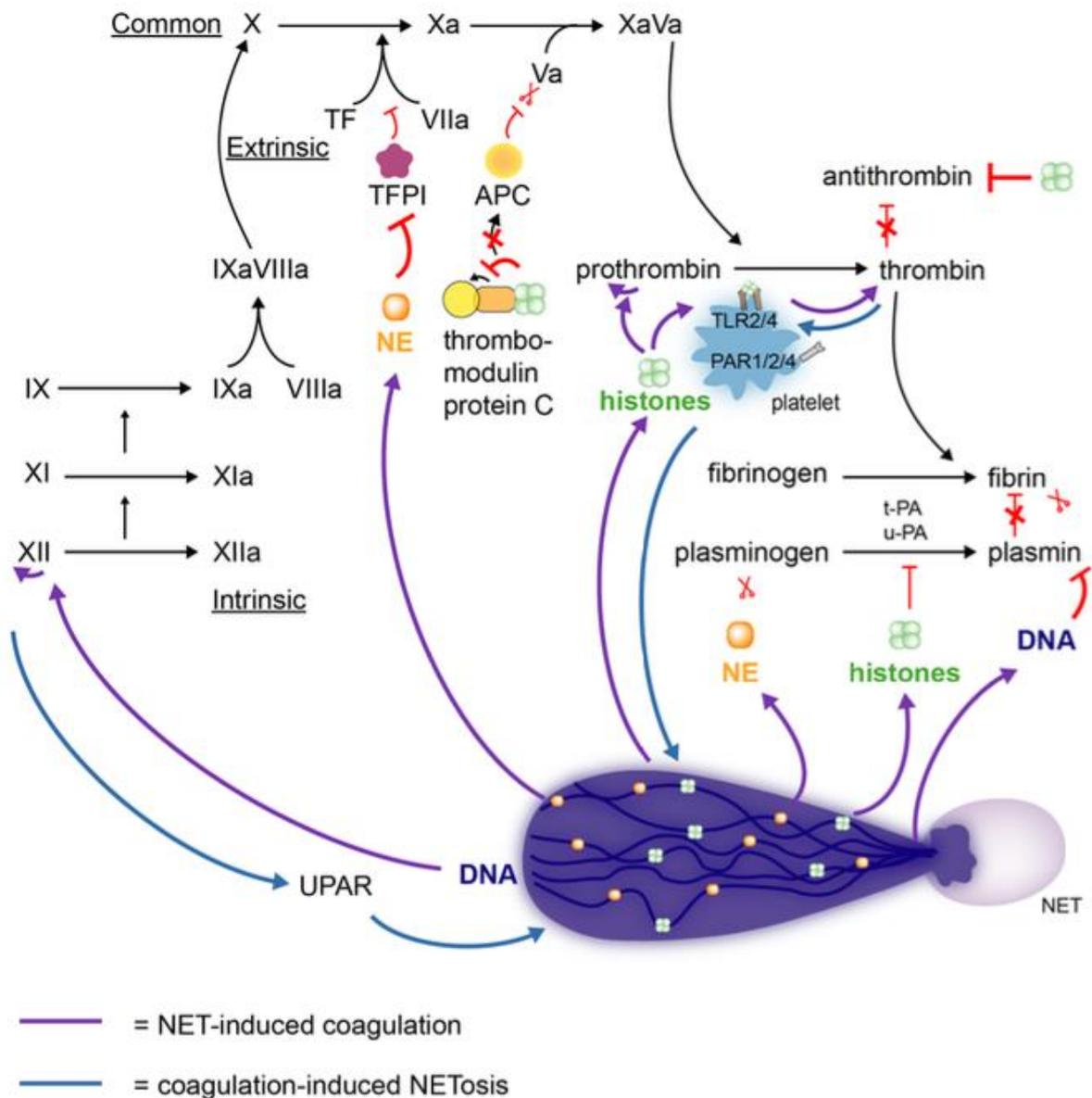


Figure 28: Les NETs participent à la génération de fibrine *via* une dérégulation de la coagulation. Les NETs stimulent la formation de fibrine en déclenchant à la fois la voie extrinsèque (TF [facteur tissulaire]) et intrinsèque (FXII) du système de coagulation (flèches vertes). En outre, les histones sont capables d'empêcher le clivage du FVa par la protéine C activée (APC). Par l'auto-activation de la prothrombine ou l'interaction avec les TLR2 ou 4 (toll-like receptor 2 ou 4) sur les plaquettes, les histones déclenchent directement la génération de thrombine. En plus de stimuler directement la formation de fibrine, les NETs empêchent sa dégradation en altérant le t-PA (activateur du plasminogène de type tissulaire), l'u-PA (activateur du plasminogène de type urokinase), l'antithrombine et la lyse médiée par la plasmine (flèches vertes). Non seulement les NET sont capables d'interagir avec divers composants de la cascade de la coagulation, mais ces composants (FXII et thrombine) peuvent également amorcer la NETose (flèches bleues). UPAR indique le récepteur de l'activateur du plasminogène de type urokinase. **Issu de Meyers et al., 2022.**

Les NETs peuvent survivre plusieurs heures dans la circulation sanguine (Branzk et al., 2014). En conditions physiologiques, les NETs seraient dégradés par la DNaseI, nucléase plasmatique (Kolaczowska et al., 2015). La persistance de la présence des NETs peut devenir délétères pour les patients. Par exemple, des patients atteints de lupus érythémateux systémique ont développé des auto-anticorps se sont formés contre l'ADN, des antigènes du soi et des histones qui vont suractiver les neutrophiles, qui est à l'origine d'un état d'hyperinflammatoire (Gupta & Kaplan, 2016).

Les mécanismes décrits démontrent que l'activation du polynucléaire neutrophile en réponse à l'infection est un mécanisme de défense essentiel et incontournable. La régulation de cette activation est nécessaire pour prévenir des potentiels effets délétères sur l'hôte. Des dysfonctionnements peuvent affecter l'ensemble des fonctions des PNNs.

III.C Les Dysfonctions des PNN au cours du choc septique

III.C.1 La granulopoïèse d'urgence

Les dysfonctions des polynucléaires neutrophiles apparaissent dès leur production médullaire. La granulopoïèse d'urgence est caractérisée par une synthèse rapide de nouveaux neutrophiles en réponse à l'infection. Cette granulopoïèse d'urgence est déclenchée lorsque les neutrophiles sur le site de l'infection sont épuisés et que la production en cytokines pro-inflammatoires est excessive stimulant ainsi la production des progéniteurs (CMP et GMP) des neutrophiles. Les progéniteurs myéloïdes prolifèrent excessivement dans la moelle osseuse afin de remplacer et d'augmenter le nombre de neutrophiles présents sur le site de l'infection, permettant ainsi l'élimination du pathogène (Manz & Boettcher, 2014). Ce relargage massif est à l'origine d'une hyperneutrophilie sanguine chez les patients en choc septique, qui libèrent dans le sang jusqu'à dix fois plus de neutrophiles qu'un individu sain (Farkas, 2020). Ces neutrophiles alors libérés sont des granulocytes immatures (Navarini et al., 2009; Pillay et al., 2010). Les neutrophiles immatures ou « band cells » sont caractérisés par la faible expression des récepteurs membranaire CD 16 et CD10 (Drifte et al., 2013), mais également par des variations morphologiques comme un noyau peu lobé et l'absence de vésicules sécrétrices (Cowland & Borregaard, 2016). Ces modifications engendrent une altération de la reconnaissance des microorganismes pathogènes (Pillay et al., 2010) et une diminution de la capacité phagocytaire (Taneja et al., 2008).

La présence de neutrophiles immatures dans la circulation est associée au risque de mortalité chez les patients en choc septique (Demaret et al., 2015). Les neutrophiles immatures peuvent également refléter la dysfonction d'organes. Leur membrane rigide les empêche de circuler normalement, ce qui entraîne une stagnation dans la microcirculation (Mare et al., 2015). Par ailleurs, des études ont montré que les patients présentant moins de 30% de neutrophiles immatures dans la circulation ont une meilleure survie à 28 jours, tandis que ceux ayant plus de 30% de neutrophiles immatures ont un taux de mortalité plus élevé (Daix et al., 2018)

III.C.2 L'apoptose

Au cours du choc septique, les neutrophiles matures présentent un phénotype hétérogène en raison de leur vieillissement dans la circulation. Ce vieillissement entraîne des modifications dans leur répertoire médullaire et une surexpression de CXCR4. En conséquence, les neutrophiles s'accumulent dans la circulation (Uhl et al., 2016). Lors d'une infection, les neutrophiles peuvent subsister jusqu'à 5 jours dans la circulation en raison d'une apoptose retardée, prolongeant ainsi leur demi-vie (Ng et al., 2019; S. I. Simon & Kim, 2010).

Dans des conditions normales, l'apoptose permet un rétablissement de l'homéostasie en éliminant les neutrophiles inactifs, sénescents ou ayant achevé leur phagocytose (H.-U. Simon, 2003). Des études ont mis en évidence que les neutrophiles des patients en choc septique présentent une résistance à l'apoptose, ce qui empêche leur élimination (Drifte et al., 2013). En effet, les patients en choc septique ont une apoptose diminuée d'environ 15% comparé à des témoins. En revanche, aucune différence n'est observée entre les survivants et les non survivants (Tamayo et al., 2012). De plus, l'apoptose des neutrophiles est étroitement corrélée au degré de sévérité du sepsis (Fialkow et al., 2006).

III.C.3 Migration et adhésion des polynucléaires neutrophiles altérées

Lors d'une infection, les neutrophiles migrent vers le site de l'infection pour détruire les microorganismes pathogènes. Au cours d'un sepsis, la capacité des polynucléaires neutrophiles à migrer sur le site de l'infection est altérée.

En effet, la diminution de l'expression de l'ARN du TLR4, responsable de la reconnaissance des pathogènes, entraîne une migration moindre des neutrophiles vers le site de l'infection (Reddy & Standiford, 2010). Les neutrophiles septiques présentent une diminution de leurs récepteurs CXCR2, essentiels pour leur migration dans les tissus après la reconnaissance des sélectines. Cette diminution est due à l'internalisation causée par la surproduction de monoxyde d'azote et par la diminution des ligands (CXCL1,2-IL-8) pourtant produits en grande quantité (Chishti et al., 2004). Ces altérations sont associées à la sévérité du choc et servent de marqueurs pronostics défavorables (Chishti et al., 2004).

Par ailleurs, certains récepteurs normalement absents à la surface des neutrophiles sont induits, tels que le récepteur aux chémokines CCR2. L'expression de ce récepteur, activé suite à une stimulation des TLR2 et des TLR4, est associée à une infiltration massive des organes vitaux et la défaillance multiviscérale, entraînant l'occlusion de la microcirculation et l'hypoxémie tissulaire (Souto et al., 2011). CCR2 est donc associé à une surmortalité à la phase précoce du choc septique (Astiz et al., 1995).

Cette modification du profil d'expression des récepteurs au chimiotactisme entraîne un défaut qualitatif et quantitatif de migration des neutrophiles (Trevelin et al., 2012). La modification du chimiotactisme entraîne une migration et une infiltration inappropriées des PNNs vers les organes sains tels que les poumons provoquant ainsi des lésions organiques dues à la libération des particules bactéricides et des médiateurs inflammatoires par les neutrophiles (Cohen, 2002; Sônego et al., 2016). Le recrutement insuffisant des PNN est responsable d'un mauvais contrôle local de l'infection et favorise la dissémination bactérienne (Alves-Filho et al., 2008), **Figure 29**.

Les microvésicules (MV) émises par les PNN altèrent également leur migration et contribuent au développement d'un syndrome de défaillance multiviscérale en modulant la réponse inflammatoire et le recrutement des neutrophiles (Meziani *et al.*, 2010; Mortaza *et al.*, 2009;

Reid & Webster, 2012; Walenta *et al.*, 2009). Ces MVs agissent comme des régulateurs du pouvoir migratoire des PNN en réponse à différents stimuli. Par exemple, en présence d'IL-8, les polynucléaires neutrophiles augmentent leur chimiotactisme en exprimant différentes sélectines à leur surface, favorisant ainsi leur migration vers le site infectieux (Nolan *et al.*, 2008). En revanche, en présence d'IL-1 β , le chimiotactisme des neutrophiles est inhibé par l'expression de la molécule anti-inflammatoire Annexine I à la surface des MV neutrophiliques, limitant ainsi leur migration (Dalli *et al.*, 2008). Ces interactions entre MVs émises par les PNN et leur chimiotactisme jouent un rôle essentiel dans la régulation de leur migration.

Une fois sur le site de l'infection, les polynucléaires neutrophiles interagissent avec l'endothélium pour infiltrer les tissus. Lors du choc septique, l'expression des récepteurs de l'adhésion est modifiée. En effet l'expression de la L-selectine est diminuée (Brown *et al.*, 2006). Parallèlement, l'expression de la β -intégrine CD11b semble être modifiée. Plusieurs études ont examiné l'expression du CD11b chez les patients en choc septique. Certaines recherches, comme celle de Chisti *et al.*, ont mis en évidence une augmentation de l'expression de CD11b chez ces patients (Chishti *et al.*, 2004). De même, l'étude de Muller Kobold a souligné un lien entre l'expression accrue du CD11b et la mortalité, avec une expression plus élevée chez les survivants (Muller Kobold *et al.*, 2000). Cependant, d'autres auteurs, comme Martins *et al.* n'ont pas trouvé de différence d'expression de la β -intégrine par rapport aux volontaires sains dans leur cohorte (Martins *et al.*, 2008). Ces résultats contradictoires soulignent la complexité de la régulation de CD11b dans le cadre du choc septique et son potentiel impact sur la migration et l'adhésion des PNN. Au cours du choc septique, l'adhésion cellulaire est altérée en raison d'un relargage excessif de NO provoquant la vasoplégie (Reddy & Standiford, 2010).

De plus, les facteurs libérés au cours du choc septique entraînent des modifications des propriétés physiques du neutrophile, notamment une rigidification des membranes. La rigidité membranaire est corrélée à la sévérité du sepsis. (Skoutelis *et al.*, 2000). Cette rigidité provoque une perte de la capacité des neutrophiles à migrer à travers les jonctions serrées endothéliales.

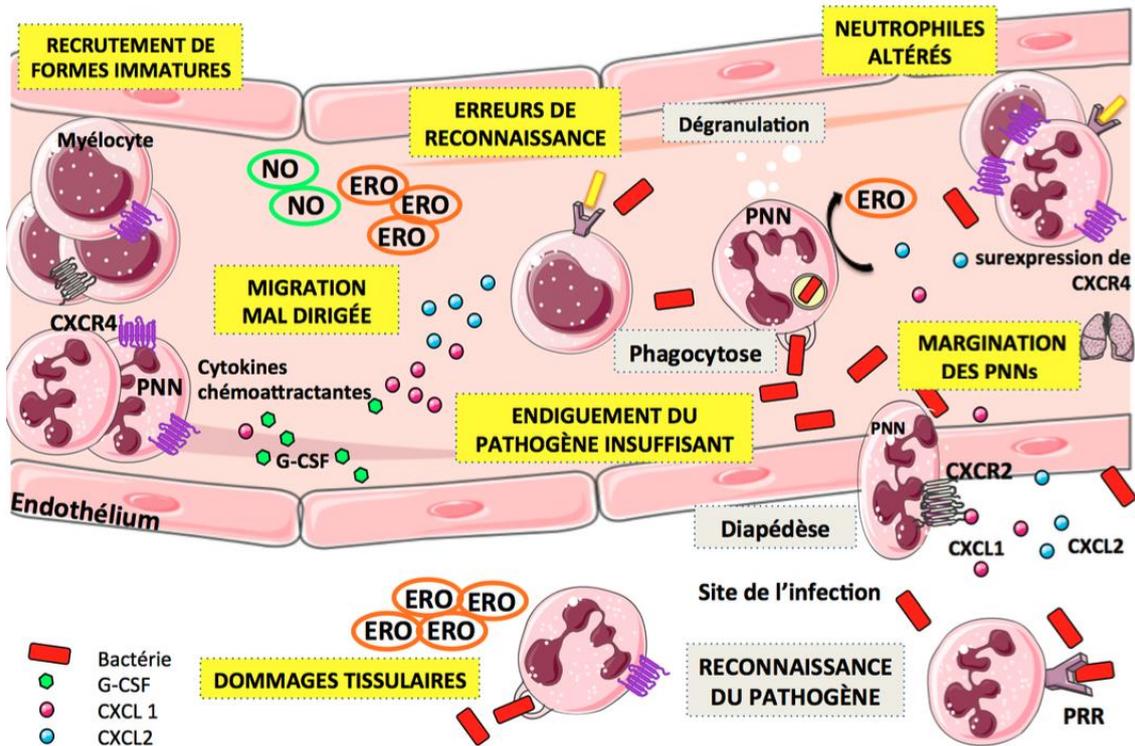


Figure 29: Dysfonctions de la réponse immunitaire innée au cours du choc septique.

Au cours du choc septique, la réponse de l'hôte à l'infection est altérée. D'abord, les cellules de l'hôte peuvent exprimer des signaux de dangers qui miment ceux exprimés à la surface des pathogènes. Par ce biais, les PAMPs et les DAMPs peuvent échapper à la reconnaissance par le PRRs. Néanmoins, la reconnaissance du pathogène induit le relargage de cytokines et d'interleukines, dont certaines comme CXCL1 ou G-CSF, aux effets chémoattractants. Certains PNNs recrutés sur le site de l'infection sont immatures et leurs fonctions de phagocytose sont altérées. Ces cellules entraînent aussi un relargage massif d'ERO, favorisent la margination des PNNs, induisent des dommages tissulaires et surexpriment CXCR4. L'ensemble de ces dysfonctions est à l'origine d'une mauvaise reconnaissance du pathogène, un défaut d'endiguement et d'élimination. CXCR : chemokine receptor, CXCL : chemokine ligand, ERO : espèces réactives de l'oxygène, GCS-F : Granulocyte-Colony Stimulating Factor, NO : monoxyde d'azote, PNNs, polynucléaires neutrophiles. **Issu de Stiel *et al.*, 2018.**

Au cours du choc septique, l'inflammation contribue à la séquestration capillaire en activant les polynucléaires neutrophiles dans la circulation. Cette activation participe à l'occlusion de la microcirculation, à leur migration vers les organes vitaux et à la libération de substances cytotoxiques (cytokines pro-inflammatoires, enzymes ...) puis aux lésions tissulaires et à la défaillance multiviscérale.

III.C.4 Altération des fonctions des Neutrophiles

a. La capacité phagocytaire des PNN

Une fois dans les tissus, les polynucléaires neutrophiles infiltrés dans les tissus vont phagocyter les pathogènes. Ce mécanisme pourtant indispensable est lui aussi altéré lors du choc septique.

En effet, la régulation du pH des phagolysosomes est altérée, conduisant à une alcalinisation insuffisante des neutrophiles chez certains patients, ce qui compromet l'activation des enzymes microbicides et favorise la survie bactériennes (Bjerknes et al., 1989). Cependant dans des études *in vivo*, une diminution de l'acidité des neutrophiles est associée à une surmortalité (Chiswick et al., 2015).

Les études évaluant la capacité totale de phagocytose des neutrophiles des patients en choc septique présentent des résultats contradictoires : certaines révèlent un excès de phagocytose (Martins et al., 2003), d'autres une diminution (Kaufmann et al., 2006) ou encore une capacité inchangée (Demaret et al., 2015). Ces résultats contrastés peuvent être attribués au fait que la mesure de la phagocytose n'a pas été réalisée dans des conditions uniformes et n'a pas toujours pris en compte du taux de neutrophile initial. L'hyperneutrophilie pourrait donc conduire à l'excès de phagocytose observé. Le degré de maturité des neutrophiles doit également être pris en compte lors de l'analyse de la capacité phagocytaire des neutrophiles. En effet, les neutrophiles immatures présentent une capacité phagocytaire réduite, pouvant ainsi expliquer la diminution de la capacité de phagocytose (Drifte et al., 2013; Taneja et al., 2008).

De plus, lors de l'inflammation, les récepteurs du complément CR1 et C5aR, essentiels pour la reconnaissance et la phagocytose des pathogènes opsonisés, peuvent être clivés par des sérines protéases des granules des neutrophiles. Une diminution d'expression de C5aR est également observée suite à son activation excessive entraînant son internalisation. Le déficit de ces récepteurs provoque un défaut de phagocytose et est associé au choc septique (Morris et al., 2011).

Outre la phagocytose, le métabolisme oxydatif des neutrophiles issus de patients en choc septique est également altéré.

b. Le métabolisme oxydatif altéré

Le métabolisme oxydatif est un mécanisme essentiel de la défense contre le pathogène, la production des espèces réactives à l'oxygène (ROS) aboutit à la destruction de la membrane plasmique des pathogènes, l'oxydation des composants de leur ADN permettant l'éviction du microorganisme à l'origine de l'infection. Bien que nécessaire pour lutter contre l'infection, cette production peut également avoir des conséquences néfastes sur l'organisme lorsque l'activation est persistante. La libération excessive de ROS par les PNN contribue à la dysfonction vasculaire du choc septique, ainsi qu'à la fuite vasculaire observée dans les syndromes de détresse respiratoire aiguë d'origine inflammatoire (Fox et al., 2013). La production de ROS diminue lors de la résolution du choc septique tandis qu'elle reste élevée chez les patients décédés, ce qui constitue donc un facteur de pronostic défavorable (Santos et al., 2012)

La production de ROS par les neutrophiles des patients en choc septique suscite des débats, avec des résultats contrastés selon les études et méthodes utilisées. Certaines études montrent une diminution de la production de ROS après stimulation avec la bactérie *Escherichia coli* (Demaret et al., 2015; Hampson et al., 2017), tandis que d'autres indiquent une production réduite après stimulation avec la PMA (Drifte et al., 2013), mais une augmentation en présence de fMLP ou fMLP + TNF α (Kaufmann et al., 2006).

III.C.5 Dérégulation de l'Immunothrombose

Le choc septique induit une réponse immunitaire complexe dans laquelle les neutrophiles sont des acteurs majeurs. À la suite de la reconnaissance des motifs des agents pathogènes, les neutrophiles libèrent des NETs. Cette libération permet aux neutrophiles de participer à l'activation locale de la coagulation (Engelmann & Massberg, 2013a). Les microorganismes pathogènes se retrouvent alors piégés dans des réseaux de fibrine et de NETs formant ainsi de *microthrombi* non-occlusifs dans la microcirculation (Brinkmann et al., 2004). L'immunothrombose crée ainsi une barrière physique qui empêche l'invasion tissulaire (Massberg et al., 2010), tout en favorisant l'accumulation de stratégies antimicrobiennes et le recrutement d'autres cellules immunitaires (D. Luo et al., 2011), amplifiant ainsi la réponse immunitaire. L'immunothrombose peut se restreindre à certains micro-vaisseaux pour contenir la propagation des agents pathogènes, ou au contraire, elle peut s'emballer

entraînant une défaillance macro-circulatoire qui peut être à l'origine de conséquences néfastes sur l'hôte (**Figure 30**).

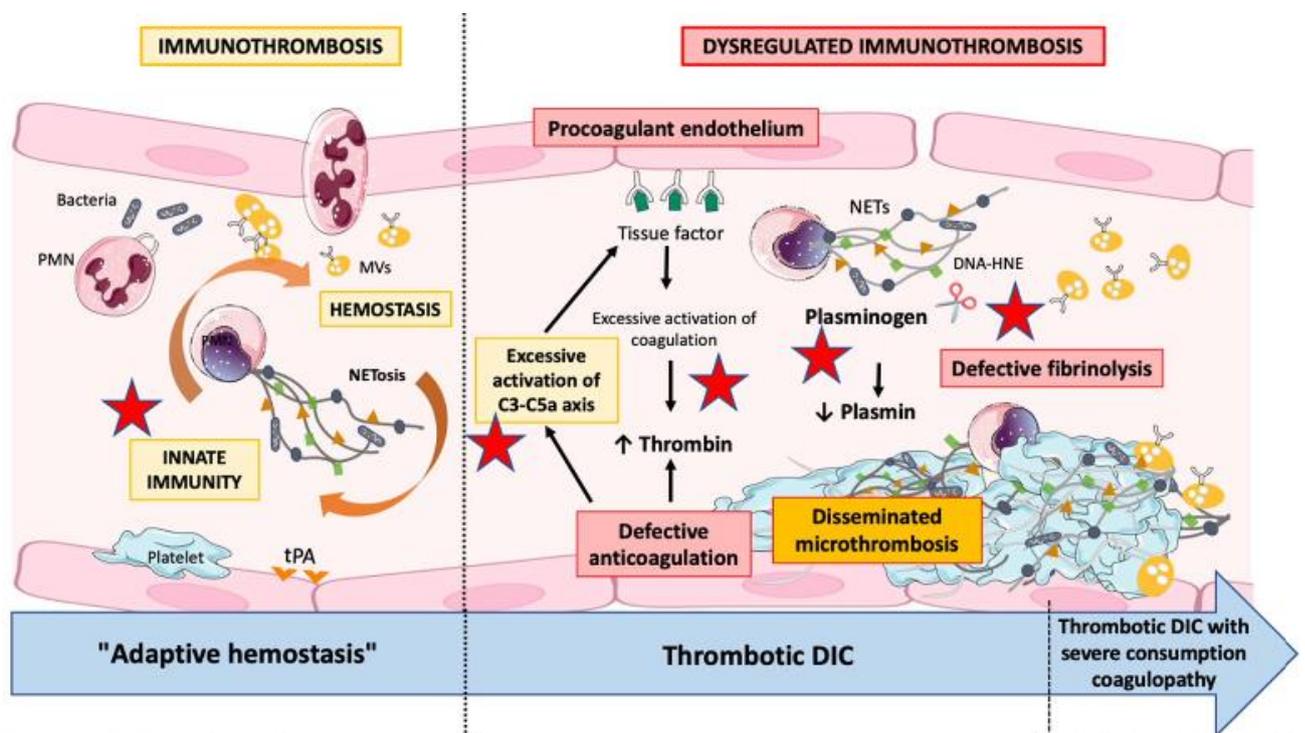


Figure 30: L'immunothrombose dérégulée

L'immunothrombose désigne les interactions entre l'immunité innée et l'hémostase, et contribue à la défense de l'hôte contre le pathogène. La coagulopathie induite par le sepsis résulte d'une dysrégulation de l'immunothrombose, entraînant une génération excessive de thrombine et de *microthrombi* disséminés. Le traitement de la coagulopathie induite par le sepsis devrait dépendre du stade d'activation de la coagulation, bien que aucun des traitements n'ait encore été validée. De nouvelles cibles thérapeutiques (étoiles rouges) sont actuellement à l'étude et pourraient permettre d'améliorer la prise en charge de la coagulopathie induite par le sepsis dans les prochaines années. HNE : *Human Neutrophil Elastase* ; MVs : *Microvésicules* ; NETs : *Neutrophils Extracellular Traps* ; t-PA : *Activateur tissulaire du plasminogène*. Issu de (Helms, Poissy, et al., 2023).

Au cours du choc septique, l'augmentation de la NETose et l'immunothrombose contribuent ainsi à l'apparition de lésions tissulaires (R. H. L. Li & Tablin, 2018; Shen et al., 2017; Stiel et al., 2018b). Associé aux dépassements des mécanismes régulateurs, le choc septique peut dans ce contexte évoluer vers une coagulation intravasculaires disséminée (CIVD) (Gould et al., 2015; Pfeiler et al., 2014). La CIVD a été identifiée comme un facteur indépendant de la mortalité et de la défaillance multiviscérale lors du choc septique (Gando et al., 2016). Ainsi, il est donc crucial pour le clinicien d'identifier les états d'hypercoagulabilité excessive et de les réguler, tout en préservant l'immunothrombose qui reste un mécanisme de défense essentiel (Meziani et al., 2017b).

Les neutrophiles sont des acteurs majeurs de la réponse de l'hôte lors de la CIVD, leur activation ainsi que leur capacité à former des NETs participent activement à la dérégulation de l'immuno-thrombose. Les neutrophiles des patients avec une CIVD associée au choc septique vont former davantage de NETs que les patients sans CIVD (Delabranche *et al.*, 2017; Stiel *et al.*, 2019a). L'activation du neutrophile peut être évaluée grâce au marqueur de fluorescence le NEUT-SFL. Ce biomarqueur est corrélé à la survenue d'une CIVD chez les patients en choc septique (Stiel *et al.*, 2016). Le NEUT-SFL reflète le degré de condensation de l'ADN grâce à un fluorochrome se liant aux acides nucléiques. De nombreuses études se sont intéressées aux composants des NETs afin d'expliquer cette suractivation du neutrophile dans la coagulopathie septique.

Ainsi, l'association MPO-ADN et nucléosomes a permis de mettre en évidence la présence de NETs au cours de la CIVD du choc septique (Delabranche *et al.*, 2017). De plus, l'augmentation des concentrations en ADN libre circulant, libéré par les PNN, constitue un facteur de mortalité indépendant chez les patients en choc septique (Rhodes *et al.*, 2006). Les nucléosomes et les histones extracellulaires relargués au sein des NETs sont reconnus par l'hôte comme des DAMPs et entraînent une augmentation de la formation de *microthrombi* sur le site de l'infection (J. Xu *et al.*, 2009). De plus, les histones et l'ADN libre circulants activent la coagulation de manière indépendante de la cascade de coagulation normale (Barranco-Medina *et al.*, 2013). Cette action est amplifiée par l'effet des sérines protéases, notamment l'élastase du neutrophile, qui favorise également la formation de fibrine en clivant les protéines anti-coagulantes régulatrices telles que le TFPI (Massberg *et al.*, 2010). Enfin l'ADN libre circulant inhibe la fibrinolyse médiée par la plasmine (Gould *et al.*, 2015) en activant PAI-1 et en devenant un inhibiteur compétitif de la plasmine lorsque ses concentrations augmentent (Komissarov *et al.*, 2011). Ainsi, les histones et les nucléosomes extracellulaires semblent jouer un rôle majeur dans la physiopathologie du choc septique, et pourraient être des cibles thérapeutiques grâce à l'utilisation d'anticorps anti-histones ou à la protéine C activée (Borgel & Vieillard-Baron, 2011).

Dans des modèles murins de choc septique par ligature-perforation caecale, les NETs libèrent de l'ADN circulant, entraînant une augmentation des complexes thrombine-antithrombine et des cytokines pro-inflammatoires, notamment l'IL-6 (Mai *et al.*, 2015). L'inhibition de la NETose par l'administration de DNase I améliore les défaillances viscérales et le pronostic en

réduisant la charge bactérienne (Mai *et al.*, 2015; McDonald *et al.*, 2017). Dans une autre étude chez le rat, l'administration de thrombomoduline réduit l'activation de la coagulation et la formation de NETs (Helms *et al.*, 2017). Ces résultats suggèrent que le choc septique entraîne une dérégulation des phénomènes d'immunothrombose, impliquant les neutrophiles en interaction avec les autres cellules du compartiment vasculaire, notamment les plaquettes. Cette dérégulation favorise l'évolution vers un état de coagulation microvasculaire diffus qui contribue à l'hypoperfusion et aux défaillances viscérales.

Les études chez l'homme ont clairement démontré le rôle majeur des NETs dans l'hypercoagulabilité du choc septique, provoquant des *microthrombi* dans la microcirculation. Cette occlusion des capillaires entraîne une diminution de la perfusion tissulaire en oxygène et contribue significativement à la défaillance multiviscérale du choc septique (S. Yang *et al.*, 2016).

La dérégulation de l'immunothrombose au cours du choc septique, en particulier avec la libération excessive de NETs, représente un enjeu crucial dans la physiopathologie de la Coagulation Intravasculaire Disséminée. Des approches visant à inhiber les propriétés des composants des NETs pourraient constituer des pistes prometteuses pour corriger l'immunothrombose dérégulée lors de la CIVD. Cependant, pour mieux réguler l'immunothrombose de manière sélective, il est essentiel d'approfondir la compréhension des mécanismes sous-jacents et des voies cellulaires impliquées dans la formation des NETs.

L'identification d'une signature protéique spécifique aux patients les plus graves pourrait permettre de développer des approches thérapeutiques pour réguler de manière sélective l'immunothrombose, tout en préservant ses fonctions essentielles de défense immunitaires lors du choc septique. Cette approche pourrait participer à l'amélioration du diagnostic ou de la prise en charge des patients avec une CIVD.

OBJECTIFS

Le choc septique correspond à la forme la plus grave de la réponse de l'hôte à une infection par un micro-organisme pathogène. La physiopathologie du choc septique est caractérisée par une réponse inflammatoire systémique exagérée et inappropriée de l'hôte médiée par les cellules immunitaires, associée à une activation de la coagulation. Lorsque les mécanismes régulateurs de ces réponses sont dépassés, l'activation de la coagulation peut évoluer vers la coagulation intravasculaire disséminée (CIVD), qui touche environ un tiers des malades en choc septique augmentant le risque de mortalité. Les polynucléaires neutrophiles (PNN) sont des acteurs précoces de la réponse immunitaire innée de l'hôte à l'infection. Par ces différents mécanismes d'activation, les PNNs participent activement à l'élimination des microorganismes pathogènes. Cependant, cette activation, souvent excessive, peut entraîner un état hyperinflammatoire, pouvant contribuer à l'apparition de lésions tissulaires. Le phénomène de NETose des PNN joue un rôle important dans les interactions entre immunité et coagulation. Ces processus entraînent une activation des PNNs lors de la CIVD associée au choc septique.

L'objectif de ce travail de thèse était donc d'étudier les mécanismes d'activation, en particulier la NETose, des polynucléaires neutrophiles au cours de la CIVD du choc septique. Ce travail de recherche a pour ambition de mieux appréhender la dysfonction vasculaire et d'envisager le neutrophile comme une potentielle cible thérapeutique pour la prévention ou la modulation de l'immuno-thrombose dans la CIVD du choc septique.

Ce manuscrit est structuré autour de la présentation de mes travaux personnels, qui ont abouti à des résultats originaux issus de la recherche expérimentale sur un modèle cellulaire in-vitro, ainsi que de l'investigation clinique chez l'homme, dans le cadre d'une approche translationnelle.

Un premier article en cours de révision pour publication étudie l'expression des récepteurs Toll-like sur les leucocytes humains lors d'infections graves. Cette étude visait à évaluer l'expression des TLRs 1 à 10 et du CD180 sur les neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes de patients avec une infection bactérienne (sepsis ou choc septique) ou une infection virale (COVID-19 modéré ou grave).

Ensuite, une étude protéomique du neutrophile a permis d'obtenir un grand nombre de données chez des patients en choc septique, mettant potentiellement en évidence des

protéines impliquées dans la réponse inflammatoire de la CIVD du choc septique. Mon travail a donc eu pour objectif d'analyser les protéines impliquées dans les réseaux fonctionnels correspondant aux conditions de choc septique, de sélectionner et valider les protéines d'intérêt et d'étudier leur rôle dans le mécanisme de NETose. L'ensemble des résultats de ce travail font l'objet d'un dépôt de brevet, expliquant l'absence de diffusion actuelle, et seront soumis à publication par la suite.

TRAVAUX PERSONNELS

I **Article 1: TLR1-10 protein expression in circulating human white blood cells during bacterial and COVID-19 infection.**

Les récepteurs Toll-like (TLRs) jouent un rôle essentiel dans le système immunitaire en reconnaissant les signaux moléculaires de dangers émis par les microorganismes pathogènes, tels que les PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*) ou libérés par les cellules endommagées tels que les DAMPs (*Damaged Associated Molecular Patterns*). Lorsqu'ils sont activés, ces TLRs activent des voies de signalisation entraînant la production de cytokines pro-inflammatoires, de facteurs chimiotactiques, de peptides antimicrobiens et d'interférons. Ces récepteurs, exprimés à la fois à la surface et à l'intérieur de nombreuses cellules immunitaires telles que les neutrophiles ou les monocytes contribuent à l'initiation de la réponse immunitaire innée. Les TLRs suscitent un intérêt considérable dans la recherche scientifique dans de nombreuses pathologies, mais leur rôle est particulièrement étudié dans le contexte de la réponse aux infections, telles que le choc septique ou la COVID-19. La surexpression du TLR2 et du TLR9 sur les neutrophiles est associée à la mortalité des patients en choc septique, tandis que l'expression du TLR4 est toujours débattu. Par ailleurs, le génome viral du SARS-CoV-2, en particulier le brin d'ARN monocaténaire, est reconnu par le TLR7 et le TLR8, tandis que la protéine Spike active le TLR4. L'objectif de notre recherche a donc été d'évaluer l'expression protéique des récepteurs Toll-like dans les leucocytes des patients avec une infection bactérienne ou virale.

Dans cette étude observationnelle monocentrique, nous avons réalisé une analyse exhaustive de l'expression des dix récepteurs Toll-like humains ainsi que du CD180, une glycoprotéine TLR-like exprimée sur les monocytes et les lymphocytes B. Au total, 73 patients ont été inclus et répartis en quatre groupes en fonction de la gravité de leurs infections (sepsis, choc septique, COVID-19 modéré ou sévère), ainsi que sept témoins. Le choc septique a été diagnostiqué conformément aux recommandations en vigueur et défini selon la troisième définition internationale de consensus. Les patients atteints d'une infection virale avaient une infection par le SARS-CoV-2 confirmée par RT-PCR et ont été répartis en deux groupes : les patients COVID-19 dits modérés admis aux urgences et les patients avec une infection au COVID-19 dite sévère admis aux urgences. L'expression des 10 TLRs et du CD180 a été mesuré en cytométrie en flux dans les neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes. Pour les TLRs

endosomaux (TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9), une perméabilisation des membranes plasmiques a été réalisée avant l'incubation des anticorps monoclonaux. L'expression membranaire a été observé pour les autres TLRs.

Dans ce travail, nous avons observé une forte expression du TLR4 à la surface des neutrophiles, avec une variation significative entre les groupes de patients. Les TLR8 et TLR9 étaient également exprimés, tandis que les niveaux d'expressions des TLR2, TLR3 et TLR7 étaient plus faibles. Concernant les monocytes, seuls les TLR2, TLR4 et le CD180 ont été détectés. L'expression des TLRs sur les lymphocytes est restée inchangée dans notre cohorte. Ainsi, nous avons observés une réduction significative de l'expression du TLR4 et de son corécepteur le CD14 à la surface des neutrophiles des patients en choc septique par rapport aux témoins (MFI = 19 273 vs. 111 691, $p < 0,001$ et MFI = 2 028 vs. 3 025, $p < 0,02$ respectivement). De plus, les patients atteints de COVID-19 sévères présentaient des niveaux élevés d'expression des TLR3 et TLR7 dans les neutrophiles par rapport au groupe témoin ($p = 0,003$ et $p = 0,02$ respectivement), tandis que les patients en choc septique présentaient une augmentation de l'expression du TLR7 dans les neutrophiles. Par ailleurs, un nombre plus élevé de monocytes intermédiaires (CD14+CD16+) a été observé chez les patients en choc septique par rapport aux témoins ($p < 0,001$), mais aucune différence dans l'expression du TLR4 n'a été mise en évidence parmi les sous-populations de monocytes.

En conclusion, cette étude apporte de nouvelles perspectives sur les mécanismes d'activation des TLRs dans des formes sévères d'infection. Des analyses complémentaires sont nécessaires pour évaluer leur corrélation avec les données cliniques des patients et évaluer l'impact potentiel d'une thérapie ciblant les TLRs sur l'activation des neutrophiles.

Ce travail est en cours de « reviewing » dans la revue *Journal of Innate Immunity*. Il a également fait l'objet d'une communication orale lors de la Journée des Jeunes Chercheurs de la Société Française de Réanimation en janvier 2023.

Research Article

TLR1-10 Protein Expression in Circulating Human White Blood Cells during Bacterial and COVID-19 Infections

Louise Chomel ^a, Mathieu Vogt ^b, Julien Demiselle ^{a,c}, Pierrick Le Borgne ^{a,d}, Marine Tschirhart ^a, Valentin Morandea ^a, Hamid Merdji ^{a,c}, Laurent Miguët ^{b,e}, Julie Helms ^{a,c}, Ferhat Meziani ^{a,c}, Laurent Mauvieux ^{b,e}

^a INSERM (French National Institute of Health and Medical Research), UMR 1260, Regenerative Nanomedicine (RNM), CRBS (Centre de Recherche en Biomédecine de Strasbourg), FMTS (Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg), University of Strasbourg, Strasbourg, France

^b INSERM UMR 1113, Interface Recherche Fondamentale et Appliquée en Cancérologie (IRFAC), FMTS (Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg), University of Strasbourg, Strasbourg, France

^c Département of Intensive Care (Service de Médecine Intensive - Réanimation), Hôpital Universitaire de Strasbourg, Strasbourg, France

^d Emergency Department, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

^e Laboratoire d'Hématologie, Hôpitaux universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

Short Title: TLRs expression in human leukocytes during bacterial and viral infections

Corresponding Author:

Laurent Mauvieux, MD ; PhD

Laboratoire d'hématologie,

Hôpital Hautepierre, Hôpitaux Universitaire de Strasbourg

1 Avenue Molière

Strasbourg, FRANCE

Tel: +33 (0)388127527.

E-mail: Laurent.MAUVIEUX@chru-strasbourg.fr

Number of Tables: 1 table

Number of Figures: 3 figures

Word count: 3105 words

Keywords: Toll-Like Receptors – Neutrophils – Monocytes – Septic Shock– COVID-19

Abstract

Toll-like receptors (TLRs) play a crucial role in systemic inflammatory response of sepsis. Increased mortality in patients with septic shock is associated with overexpression of TLR2 and TLR9 on neutrophils, although the role of TLR4 overexpression is still a subject of debate. In addition, the ssRNA of SARS-CoV-2 is recognized by TLR7 and TLR8, while the spike protein activates TLR4. In this study, a comprehensive analysis of the expression was conducted to assess the expression of TLRs 1-10 in white blood cells from patients with bacterial and viral infections. 73 patients were included, divided into 4 groups based on disease severity (sepsis, septic shock, moderate and severe COVID-19), and 7 controls. Notably, we observed a significant reduction in the expression of TLR4 and its co-receptor CD14 in neutrophils of patients with septic shock compared to controls ($p < 0.001$). Furthermore, severe COVID-19 patients exhibited a significant increase in TLR3 and TLR7 levels was observed in neutrophils compared the control group ($p < 0.05$). Patients with septic shock also showed a similar increase in TLR7 in neutrophils ($p < 0.005$) along with elevated intermediate (CD14+CD16+) monocytes compared to controls ($p < 0.001$). However, TLR expression remained unchanged in lymphocytes. This study provided further insights into the mechanisms of TLR activation in various septic conditions. Additional analysis is needed to assess their correlation with patient outcomes and to evaluate the impact of TLR-related therapy on neutrophils activation during septic shock.

Introduction

Toll-like Receptors (TLR) are major sensors of the innate immune system and are involved in the recognition of Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs) and Damage Associated Molecular Patterns (DAMPs). These receptors are found in various innate immune cells including monocytes, lymphocytes, and granulocytes. While TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, and TLR10 recognize their ligands on the cell surface, TLR3, 7, 8, and 9, which are localized intracellularly, detect endosomal nucleic acids from viruses and bacteria.

When activated, TLR signaling pathways trigger an intracellular response which leads to the production of pro-inflammatory cytokines, chemotactic factors, antimicrobial peptides, and interferons. During infections, these pathways play a crucial role in generating the cytokine storm that culminates during septic shock- a life-threatening organ dysfunction characterized by organ dysfunction due to a dysregulated host response to infection [1,2]. The pathophysiology of septic shock is characterized by an excessively amplified systemic inflammatory response from the host, mediated by immune cells activated in response to pathogen invasion [3]. Systemic inflammatory response is triggered by an intense cellular activation, as evidenced by the release of leukocyte microparticles [4]. Among immune cells, neutrophils are particularly activated in septic shock and warrant further investigation [5]. TLR4, which recognizes lipopolysaccharides from bacterial membranes, is one of the most extensively studied TLR. Notably, increased expression of TLR2 and 4 has been reported in neutrophils and monocytes following infection with Gram + bacteria [6], which was not observed by Martins *et al.* [7]. Elevated expression of TLR2 and TLR9 proteins in neutrophils has been associated with lower survival rates in Intensive Care Unit (ICU) patients, while TLR4 has not shown a similar association [8]. However, these studies often relied on measuring mRNA expression rather than protein expression. These inconsistent results highlight the challenges of accurately measuring TLR protein expression, which could have implications for the use of TLR modulating agents in humans. Additionally, many TLR modulating agents have been tested in mice, which have different TLR expression patterns in White Blood Cells (WBC) compared to humans. Furthermore, most studies on TLR signaling have been conducted using genetically modified mice, primarily with loss of function mutations, or in artificial sepsis models.

While TLRs play a role in recognizing in bacterial structures, they can also detect viral patterns, particularly TLR2, TLR3, and TLR7 [9]. Activation of the TLR signaling pathway is an early step recognizing of viral genomic patterns of SARS-CoV-2 [9]. The viral ssRNA of SARS-CoV-2 is recognized by endosomal TLR7 and TLR 8 [10,11] while the spike-protein of the SARS-CoV-2 activates TLR 4 [12]. However, there are conflicting reports about the specific role of TLR during SARS-CoV-2 infection [13–15].

From our perspective, further investigation is necessary to fully understand the responses induced by the modulation of TLRs during sepsis or infection in general. In particular, it would be beneficial to understand why TLR4 blockade resulted in a higher mortality rate among mild sepsis patients compared to those with severe sepsis, as reported in the phase 2 ACCESS clinical trial [16].

In order to improve our understanding of TLRs during infectious conditions, we prospectively analyzed the expression of TLRs and CD180 (RP-105), a toll-like related protein with high TLR4 homology involved in LPS sensing, in WBC of patients with either bacterial (sepsis and septic shock) or viral infection (mild and severe COVID infections) [17–19], and controls. We also studied the expression of CD16 (FcγRIIIB) on neutrophils, which is associated with neutrophils maturation [20,21] and has been described as under-expressed in patients with either sepsis [22,23] or COVID-19 with elevated severity scores [24]. We also analyzed the sub-populations of monocyte (e.g., classical, intermediate, and non-classical subsets), which were reported to be modified in these conditions.

Materials and Methods

Study Design

This was a prospective single-center observational cohort study based on patients admitted to Strasbourg University Hospital conducted from May 2021 to April 2022. The Strasbourg University Hospital Ethic Committee approved this study (#NCT03559569).

Patients

Patients included in this study (n=80) were divided into 5 groups based on their clinical characteristics: septic shock (n=36), severe covid-19 (n=24), healthy donors (n=7), mild covid-19 (n=7) and sepsis (n=6). Septic shock was assessed according to the third international consensus definition (1). COVID-19 patients with confirmed SARS-CoV-2 infection using reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), admitted either to the emergency department (ED) or in the ICU were included. Patients admitted to the ED were classified as “mild covid-19”, whereas patients admitted to the ICU as “severe” COVID-19 patients. Those patients were treated according to international guidelines and local protocols.

Blood Collection and Staining

Blood sampling was performed at admission on BD Vacutainer Plus Blood Collection Tubes (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) that contain EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) anticoagulant. Within 3 hours, blood cells were stained using 14 monoclonal antibodies coupled to a fluorescent dye for the 10 TLRs, CD14, CD16, and CD19 antigens: CD19-APC (clone SJ25C1, #17-0198-42); TLR1-PE (clone GD2.F4, #12-9911-42); TLR3-PE (clone TLR3.7, #12-9039-82), TLR10-PE (clone 3C10C5, #12-2909-42) from Invitrogen; CD16-APC-H7 (clone 3G8, #560195); CD14-PE-Cy7 (clone M59, #562698); TLR4-BV421 (clone TF901, #564401); CD180-BV421 (clone G28-8, #743624) from BD Biosciences; TLR2-PerCP (clone 383936, #FAB2616C); TLR5-A488 (clone 624915, #FAB6704G); TLR7-PerCP (clone 533707, #IC5875C); TLR8-A488 (clone 935166, #IC8999G); TLR9-A405 (clone 26C593R, #IC36583V) from R&D Systems and TLR6-FITC (clone TLR6.127, #ab72362) from Abcam. TLR antibodies were chosen for their specificity and brightness and were previously validated in the peripheral blood cell populations of 20 healthy donors together with isotype controls (data not shown). In brief, blood samples were incubated with the antibodies for 20 minutes in the dark. Then a red blood cell lysing solution (#349202; BD Biosciences) was added, followed by 2 PBS washings. After the last centrifugation, the cell pellet was resuspended in PBS solution. For the endosomal TLRs (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9), plasma cell permeabilization was performed using the Perm2 Solution® (#558052, BD Biosciences) prior to incubation of monoclonal antibodies staining.

Sample Preparation for Flow Cytometry Analysis

Flow cytometry signals were acquired using a three-laser (blue, red, violet) 8-fluorochrome 10-parameter BD FACS Canto II flow cytometer (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA). The initial PMT voltage configuration was run with unstained cells, while the compensation configuration was run with staining in a single tube of all fluorophores used. A total number of 1.106 neutrophils were acquired per sample. FCS files of all patients were analyzed simultaneously using Cytobank™ software (Beckman Coulter, Miami, USA). After doublet exclusion, neutrophils were identified as SSC^{high} CD14⁻ CD16⁺, monocytes as SSC^{low} CD14⁺, T lymphocytes as SSC^{low} CD14⁻ CD16⁻ CD19⁻, B lymphocytes as SSC^{low} CD14⁻ CD16⁻ CD19⁺ and NK cells as SSC^{low} CD14⁻ CD16⁺. Monocytes were subdivided as described by Selimoglu-Buet *et al.*, classical (CD14⁺CD16⁻), intermediate (CD14⁺CD16⁺), and non-classical (CD14^{low}CD16⁺) monocytes respectively [25].

Statistical Analysis

Data, expressed as mean intensity of fluorescence (MFI), were analyzed using GraphPad Prism8® (GraphPad Software, Inc., CA, US). The statistical variance between different groups was determined by applying the Kruskal-Wallis test. A p-value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Clinical and biological characteristics of the cohort

Eighty patients were included during the first COVID-19 infection wave between May 2021 and April 2022 and were composed of patients with septic shock (n=36), severe COVID-19 (n=24), healthy donors (n=7), mild COVID-19 (n=7) and sepsis (n=6). The baseline clinical and biological characteristics and the infection description of this cohort are summarized in Table 1. No obvious bias concerning gender, age, comorbidities, or type of infection was observed between patients. Sepsis and septic shock were in majority associated with Bacillus gram-negative germs. Leukocytes, neutrophils, monocytes, and lymphocytes counts were not different between patient groups.

TLR antigenic expression in circulating WBC populations

The expression of the ten human TLRs was analyzed in neutrophils, monocytes, and lymphocytes (T, B, CD16+ NK cells) from both healthy donors and patients using multiparametric flow cytometry. No significant expression TLRs was observed in T or CD16+ NK cells. In B-cells, the TLR-related protein CD180 was the only protein detected, as previously shown [26].

In neutrophils, antibody staining for TLR1-10 and CD180 revealed the expression of TLR4, with a large variation in positivity between groups, TLR8, TLR9 were also expressed, while TLR2, TLR3, and TLR7 were weakly expressed. In monocytes, only TLR2, TLR4, and CD180 were detected.

TLR4 and CD14 antigenic expression in neutrophils and monocytes populations

TLR4 was studied in conjunction with its co-receptor CD14, which is expressed in neutrophils and monocytes. CD14 facilitates the activation of TLR4 by LPS and regulates the subsequent internalization of the LPS-activated TLR4.

In neutrophils, TLR4 was under-expressed in patients with septic shock (MFI=19 273 vs. 111 691, $p<0.001$), as well as in those with sepsis (MFI 23 745, $p<0.001$) (figure 1A right panel). CD14 expression was also significantly lower in septic shock patients than in healthy volunteers (MFI 2 028 vs. 3 025, $p<0.02$) (figure 1A, left panel). In septic shock patients, a lower expression of TLR4 was associated with reduced CD14 expression on the surface of neutrophils, suggesting altered cellular trafficking of the TLR4-CD14 complex under these conditions. No significant changes in TLR4 or CD14 expression were observed in COVID-19 patients. In monocytes, TLR4 expression was not different from that of healthy donors in all groups (figure 1B, right panel). CD14 was significantly less expressed in monocytes of patients with sepsis and septic shock (MFI 54 854 and 64 294, $p<0.01$) and patients with a severe COVID-19 (MFI 62 5887, $p<0,001$) compared to healthy donors (MFI 99 380) (figure 1B, left panel). This prompted us to investigate TLR4 expression in different monocytes subsets: classical (CD14+CD16-), intermediate (CD14+CD16+), and non-classical (CD14-CD16+) monocytes. In septic shock patients, the proportion of classical monocytes subset was lower than in healthy donors (74.9% vs. 87.4% $p= 0.01$), while the proportion of intermediate

monocytes was higher (14.4% vs. 3.7%, $p < 0.001$). TLR4 expression remained unchanged within these different monocyte subsets, and no significant variation in the proportion of different monocyte subsets was observed in the other groups.

Other TLRs and CD180 (RP105) expression

TLR7, which recognizes single-stranded RNA in endosomes was more highly expressed in neutrophils of patients with severe COVID-19 (MFI 1 053 vs. 513, $p = 0.0193$, figure 2) and in septic shock patients compared to healthy volunteers; MFI= 1 005 vs. 413, $p < 0.05$ respectively, figure 2).

TLR3, which was weakly expressed in neutrophils of healthy donors (MFI = 1024), was more highly expressed in severe COVID-19 patients (MFI = 2 812, $p = 0.003$), but not in the other groups. TLR2, also weakly expressed in neutrophils, was slightly increased in septic shock patients compared to healthy controls ($p = 0.02$). The expression of CD180 (RP105), which is expressed in monocytes and in B cells and is thought to prevent TLR4 activation at least in mice, was not changed in any of the conditions tested [26].

Neutrophil immaturity in severe infections and pro-inflammatory monocytes during septic shock

During neutrophils maturation, CD16 expression is expressed in the late metamyelocyte and band stages. In humans, immature and mature neutrophils are identified as CD16^{low}/CD10⁻ and CD16^{high}/CD10⁺ respectively. However, CD16 expression can be diminished during apoptosis. CD16 is also acquired by human NK cells during their maturation process. We observed that CD16 expression in neutrophils was significantly lower in septic shock patients compared to healthy donors ($p < 0.0001$), and to a lesser extent in sepsis patients ($p < 0.01$) (figure 3), consistent with previous studies [27]. This pattern was not observed in COVID-19 patients, including those with severe and mild forms of the disease. No significant differences in CD16 expression in NK cells were observed between the groups.

Discussion

In this study, our objective was to evaluate the protein expression of the ten human Toll-like receptors (TLRs) in WBC, which has not been previously addressed. Exaggerated and uncontrolled pro-inflammatory signaling triggered by TLRs during infection can lead to sepsis and septic shock [22]. Therefore, we chose to analyze the expression of these proteins either in harmful bacterial infections or viral infectious conditions, compared to healthy donors.

We observed a significant decrease in the expression of TLR4 in sepsis, septic shock, and severe COVID patients, and to a lesser extent, a decrease of CD14 in septic shock patients. This observation differs from other studies that have shown an increase in TLR2 and TLR4 during sepsis and septic shock [6,27]. Conversely, Silva *et al.* found no changes in the protein expression of TLR2, TLR4, or TLR9 and the upregulation of TLR5 in human sepsis patients [28]. Another study reported no modification of TLR4 expression in sepsis [8]. The expression of TLRs is highly sensitive to the environmental conditions of the samples and can easily be affected. For instance, it should be noted that TLR analysis is often performed after neutrophil isolation. In our experiments, we observed that variations in the sample temperature could affect the expression levels of different TLRs (data not shown). The time between sampling and antibody staining, as well as the use of paraformaldehyde for cell fixation before staining, are also important parameters. In this study, the evaluation of TLR expression was performed under conditions closely resembling routine flow cytometry tests using standard EDTA tubes sampled either upon patient admission or within 12 hours of diagnosis and stored at room temperature.

The decrease of TLR4 and CD14 in septic shock patients may be supported by previous physiopathological studies. In a cell line model, it was demonstrated that TLR4 is internalized after exposure to LPS, and this internalization depends on CD14. Internalization of TLR4 and CD14 terminates the initial phase of MYD88 signaling and initiates a second phase of TRIF dependent signaling, leading to an IFN type 1 response [29]. It is known that endosomal TLR4 interacts with TRIF, sustains NF- κ B stimulation [30], and initiates ubiquitination and degradation of TLR4. This mechanism, following endosome maturation and lysosomal degradation of TLR4 determines the duration and magnitude of the TRIF-dependent signaling [31–33]. This mechanism was demonstrated in a cell line model, showing that the

internalization of TLR4 in endosomes containing LPS led to lysosomal degradation and the signal termination [33]. Pathogenic and commensal bacteria also utilize this mechanism to prevent inflammatory endocytosis as part of the immune-evasion strategy [34]. Additionally, it has been shown in vivo that exposure to lipopolysaccharide in human blood leukocytes induces cross-tolerance to multiple TLR ligands, including TLR4 [35].

Activation of the TLRs in COVID-19 infection is due to the interaction of TLRs with virus particles [36] leading to the production of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 β . We observed up-regulation of TLR3 and TLR7 in COVID patients. In endosomal compartments, TLR3, TLR7 and TLR8, and TLR9 are known to respond to double-stranded RNA, single-stranded RNA, and unmethylated CpG DNA [37]. It has been suggested that TLR2, TLR3, TLR4, TLR7/8, and TLR9 contributed to antiviral responses against SARS-CoV-2 infection [11]. TLR3 senses dsRNA in endosomes, and its stimulation leads to the TRIF-dependent production of proinflammatory cytokines and type I IFNs. TLR7 and TLR8 recognized ssRNA. In SARS-CoV-2 infected cellular spheroids, and activate the MyD88-dependent signaling [38]. In addition to TLR, other receptors such as RIG-I-like receptors (RLRs), Nod-like receptors (NLRs), AIM2-like receptors (ALRs), C-type lectin receptors (CLRs), and intracellular DNA sensors such as cGAS may be involved in COVID-19 response [39]. These receptors were not investigated in our study.

We also observed an increase in intermediate monocytes and a decrease in classical monocytes in septic shock patients. No modification of monocytes subpopulations was observed in our series of COVID patients, which differs from the mild increase of classical monocytes subset and a slight decrease in non-classical monocytes described by Parackova *et al.* [40]. An elevated proportion of CD16^{dim} neutrophils (immature subset) has been associated with an increased risk of death after septic shock [23,40]. We observed that the decrease of CD16 was more pronounced in septic shock compared to sepsis patients. It has been recently shown that experimental administration of LPS in human leads to an increase of CD16^{dim} immature neutrophils [20]. Carissimo *et al.* proposed that an abnormal immature neutrophil ratio could serve as an early marker for severe COVID-19 [41]. In our series, CD16 expression appeared to decrease in neutrophils of severe COVID patients, but this decrease was not statistically significant.

Conclusion

Our data highlighted the specific modulation of TLRs expression in neutrophils during severe infectious conditions. TLR inhibitors or agonists used as vaccine adjuvants have shown to elicit immune responses, as reviewed recently by Sun *et al.* [39]. It is crucial to further characterize the effects of TLR-related therapy in neutrophils to assess the potential deleterious or beneficial effects.

References

1. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016 Feb 23;315(8):801–10.
2. Delabranche X, Quenot JP, Lavigne T, Mercier E, François B, Severac F, et al. Early Detection of Disseminated Intravascular Coagulation During Septic Shock: A Multicenter Prospective Study. *Critical Care Medicine*. 2016 Oct;44(10):e930.
3. Hotchkiss RS, Moldawer LL, Opal SM, Reinhart K, Turnbull IR, Vincent JL. Sepsis and septic shock. *Nat Rev Dis Primers*. 2016 Jun 30;2:16045.
4. Delabranche X, Boisramé-Helms J, Asfar P, Berger A, Mootien Y, Lavigne T, et al. Microparticles are new biomarkers of septic shock-induced disseminated intravascular coagulopathy. *Intensive Care Med*. 2013 Oct;39(10):1695–703.
5. Stiel L, Meziani F, Helms J. Neutrophil Activation During Septic Shock. *Shock*. 2018;49(4):371–84.
6. Härter L, Mica L, Stocker R, Trentz O, Keel M. Increased expression of toll-like receptor-2 and -4 on leukocytes from patients with sepsis. *Shock*. 2004 Nov;22(5):403–9.
7. Martins PS, Brunialti MKC, Martos LSW, Machado FR, Assunção MS, Blecher S, et al. Expression of cell surface receptors and oxidative metabolism modulation in the clinical continuum of sepsis. *Crit Care*. 2008;12(1):R25.
8. Lenz M, Draxler DF, Zhang C, Kassem M, Kastl SP, Niessner A, et al. Toll like receptor 2 and 9 expression on circulating neutrophils is associated with increased mortality in critically ill patients. *Shock*. 2019 Nov 4;
9. Birra D, Benucci M, Landolfi L, Merchionda A, Loi G, Amato P, et al. COVID 19: a clue from innate immunity. *Immunol Res*. 2020 Jun 1;68(3):161–8.
10. Khanmohammadi S, Rezaei N. Role of Toll-like receptors in the pathogenesis of COVID-19. *J Med Virol*. 2021 May;93(5):2735–9.
11. Jung HE, Lee HK. Current Understanding of the Innate Control of Toll-like Receptors in Response to SARS-CoV-2 Infection. *Viruses*. 2021 Nov;13(11):2132.
12. Sohn KM, Lee SG, Kim HJ, Cheon S, Jeong H, Lee J, et al. COVID-19 Patients Upregulate Toll-like Receptor 4-mediated Inflammatory Signaling That Mimics Bacterial Sepsis. *J Korean Med Sci*. 2020 Sep 28;35(38):e343.
13. Jaiswal SR, Mehta A, Bhagwati G, Lakhchaura R, Aiyer H, Khamar B, et al. Innate Immune Response Modulation and Resistance to SARS-CoV-2 infection: A Prospective Comparative Cohort Study in High Risk Healthcare Workers [Internet]. *Infectious Diseases (except HIV/AIDS)*; 2020 Oct [cited 2023 Feb 16]. Available from: <http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.10.20.20214965>

14. Zhang Q, Bastard P, Liu Z, Le Pen J, Moncada-Velez M, Chen J, et al. Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science*. 2020 Oct 23;370(6515):eabd4570.
15. Shaath H, Vishnubalaji R, Elkord E, Alajez NM. Single-Cell Transcriptome Analysis Highlights a Role for Neutrophils and Inflammatory Macrophages in the Pathogenesis of Severe COVID-19. *Cells*. 2020 Nov;9(11):2374.
16. Tidswell M, Tillis W, Larosa SP, Lynn M, Wittek AE, Kao R, et al. Phase 2 trial of eritoran tetrasodium (E5564), a toll-like receptor 4 antagonist, in patients with severe sepsis. *Crit Care Med*. 2010 Jan;38(1):72–83.
17. Bastiaansen AJNM, Karper JC, Wezel A, de Boer HC, Welten SMJ, de Jong RCM, et al. TLR4 accessory molecule RP105 (CD180) regulates monocyte-driven arteriogenesis in a murine hind limb ischemia model. *PLoS One*. 2014;9(6):e99882.
18. Candel S, Sepulcre MP, Espín-Palazón R, Tyrkalska SD, de Oliveira S, Meseguer J, et al. Md1 and Rp105 regulate innate immunity and viral resistance in zebrafish. *Dev Comp Immunol*. 2015 Jun;50(2):155–65.
19. Kimoto M, Nagasawa K, Miyake K. Role of TLR4/MD-2 and RP105/MD-1 in innate recognition of lipopolysaccharide. *Scand J Infect Dis*. 2003;35(9):568–72.
20. Bongers SH, Chen N, van Grinsven E, van Staveren S, Hassani M, Spijkerman R, et al. Kinetics of Neutrophil Subsets in Acute, Subacute, and Chronic Inflammation. *Front Immunol*. 2021 Jun 24;12:674079.
21. Guérin E, Orabona M, Raquil MA, Giraudeau B, Bellier R, Gibot S, et al. Circulating Immature Granulocytes With T-Cell Killing Functions Predict Sepsis Deterioration*: *Critical Care Medicine*. 2014 Sep;42(9):2007–18.
22. Hanna MOF, Abdelhameed AM, Abou-Elalla AA, Hassan RM, Kostandi I. Neutrophil and monocyte receptor expression in patients with sepsis: implications for diagnosis and prognosis of sepsis. *Pathog Dis*. 2019 Aug 1;77(6):ftz055.
23. Demaret J, Venet F, Friggeri A, Cazalis MA, Plassais J, Jallades L, et al. Marked alterations of neutrophil functions during sepsis-induced immunosuppression. *J Leukoc Biol*. 2015 Dec;98(6):1081–90.
24. Hoffmann J, Etati R, Brendel C, Neubauer A, Mack E. The Low Expression of Fc-Gamma Receptor III (CD16) and High Expression of Fc-Gamma Receptor I (CD64) on Neutrophil Granulocytes Mark Severe COVID-19 Pneumonia. *Diagnostics (Basel)*. 2022 Aug 19;12(8):2010.
25. Selimoglu-Buet D, Wagner-Ballon O, Saada V, Bardet V, Itzykson R, Bencheikh L, et al. Characteristic repartition of monocyte subsets as a diagnostic signature of chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*. 2015 Jun 4;125(23):3618–26.

26. Schultz TE, Blumenthal A. The RP105/MD-1 complex: molecular signaling mechanisms and pathophysiological implications. *J Leukoc Biol.* 2017;101(1):183–92.
27. Tansho-Nagakawa S, Ubagai T, Kikuchi-Ueda T, Koshio O, Koshibu Y, Kikuchi H, et al. Analysis of membrane antigens on neutrophils from patients with sepsis. *J Infect Chemother.* 2012 Oct;18(5):646–51.
28. Silva SC, Baggio-Zappia GL, Brunialti MKC, Assunção MSC, Azevedo LCP, Machado FR, et al. Evaluation of Toll-like, chemokine, and integrin receptors on monocytes and neutrophils from peripheral blood of septic patients and their correlation with clinical outcomes. *Braz J Med Biol Res.* 2014 May;47(5):384–93.
29. Roy S, Karmakar M, Pearlman E. CD14 mediates Toll-like receptor 4 (TLR4) endocytosis and spleen tyrosine kinase (Syk) and interferon regulatory transcription factor 3 (IRF3) activation in epithelial cells and impairs neutrophil infiltration and *Pseudomonas aeruginosa* killing in vivo. *J Biol Chem.* 2014 Jan 10;289(2):1174–82.
30. Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I, Kagan JC. Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annu Rev Immunol.* 2015;33:257–90.
31. Ciesielska A, Matyjek M, Kwiatkowska K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol Life Sci.* 2021;78(4):1233–61.
32. Watts C. Location, location, location: identifying the neighborhoods of LPS signaling. *Nat Immunol.* 2008 Apr;9(4):343–5.
33. Husebye H, Halaas Ø, Stenmark H, Tunheim G, Sandanger Ø, Bogen B, et al. Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. *The EMBO Journal.* 2006 Feb 22;25(4):683–92.
34. Tan Y, Zanoni I, Cullen TW, Goodman AL, Kagan JC. Mechanisms of Toll-like receptor 4 endocytosis reveal a common immune-evasion strategy used by pathogenic and commensal bacteria. *Immunity.* 2015 Nov 17;43(5):909–22.
35. de Vos AF, Pater JM, van den Pangaart PS, de Kruif MD, van 't Veer C, van der Poll T. In vivo lipopolysaccharide exposure of human blood leukocytes induces cross-tolerance to multiple TLR ligands. *J Immunol.* 2009 Jul 1;183(1):533–42.
36. Patra R, Chandra Das N, Mukherjee S. Targeting human TLRs to combat COVID-19: A solution? *J Med Virol.* 2021 Feb;93(2):615–7.
37. McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, Wack A, O'Garra A. Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol.* 2015 Feb;15(2):87–103.
38. Bortolotti D, Gentili V, Rizzo S, Schiuma G, Beltrami S, Strazzabosco G, et al. TLR3 and TLR7 RNA Sensor Activation during SARS-CoV-2 Infection. *Microorganisms.* 2021 Aug 26;9(9):1820.
39. Sun H, Chan JFW, Yuan S. Cellular Sensors and Viral Countermeasures: A Molecular Arms Race between Host and SARS-CoV-2. *Viruses.* 2023 Feb;15(2):352.

40. Parackova Z, Zentsova I, Bloomfield M, Vrabcova P, Smetanova J, Klopcer A, et al. Disharmonic Inflammatory Signatures in COVID-19: Augmented Neutrophils' but Impaired Monocytes' and Dendritic Cells' Responsiveness. *Cells*. 2020 Oct;9(10):2206.
41. Carissimo G, Xu W, Kwok I, Abdad MY, Chan YH, Fong SW, et al. Whole blood immunophenotyping uncovers immature neutrophil-to-VD2 T-cell ratio as an early marker for severe COVID-19. *Nat Commun*. 2020 Oct 16;11(1):5243.

Figure Legends

Table 1: Characteristics of patients on admission

NA: Not Available, * $p < 0.05$ compare to mild COVID, # $p < 0.05$ compared to sepsis

Figure 1 Box plot representation of cell surface expression of TLR4 and CD14 in neutrophils (A) and monocytes (B) in septic shock and COVID-19 patients compared to healthy donors.

The results are presented as mean fluorescence intensity (MFI). The main body of the boxplots show the 1st and 3rd quartiles. Horizontal lines in each box represent the median.

* $p < 0.01$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0,0005$ (Kruskall Wallis test).

Figure 2 Box plot representation of intracellular expression of TLR3 and TLR7 in neutrophils in septic shock and COVID-19 patients compared to healthy donors.

The results are presented as mean fluorescence intensity (MFI). The main body of the boxplots show the 1st and 3rd quartiles. Horizontal lines in each box represent the median.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ (Kruskall Wallis test).

Figure 3 Box plot representations of cell surface CD16 expression in septic shock and COVID-19 patients compared to healthy donors.

The results are presented as mean fluorescence intensity (MFI). The main body of the boxplots show the 1st and 3rd quartiles. Horizontal lines in each box represent the median.

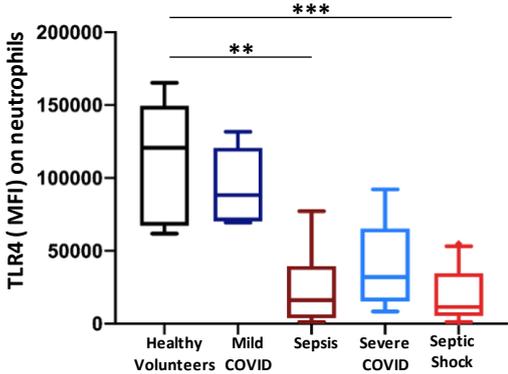
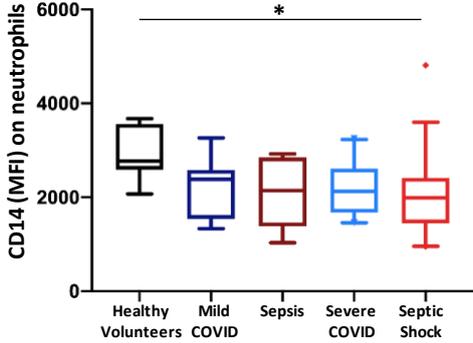
*** = $p < 0.0001$, # = $p < 0.001$ (Kruskall Wallis test). The box ranges from the first (Q1) to the third quartile (Q3). The line across the box indicates the median. The whiskers are lines extending from Q1 and Q3.

Table 1

Characteristics	Mild COVID	Severe COVID	Sepsis	Septic Shock
	n=7	n=23	n=6	n=35
Age (yr), Med [IQR]	81 [68-86]	59 [54-64]*	61 [48-77]	68 [62-74]
Male sex, n (%)	5 (71.4)	17 (73.9)	3 (11)	25 (74)
SAPS II, Med [IQR]	NA	32 [29-44]	56 [31-82]	69 [50-85]
SOFA inclusion, Med [IQR]	1 [0-6]	4 [4-6]	4 [3-10]	13 [10-15]#
Preexisting conditions, n (%)				
Chronic hypertension	5 (71.4)	11 (47.8)	3 (10)	28 (80)
Diabetes	4 (57.1)	6 (26)	2 (33)	5 (14)
Chronic heart failure	0	1 (4.3)	0	6 (17.1)
Ischemic heart disease	1 (14.3)	0	2 (33)	3 (8.6)
Chronic kidney disease	0	0	0	6 (17.1)
Liver cirrhosis	0	0	0	1 (2.9)
Chronic obstructive pulmonary disease	0	0	0	10 (28.6)
Cancer	1 (14.3)	1 (4.3)	1 (16.7)	11 (31.4)
Infection, n (%)				
Source of infection				
Lung	7 (100)	23 (100)	3 (50)	18 (51.4)
Abdominal	-	-	0	3 (8.6)
Urinary tract	-	-	3 (50)	8 (22.8)
Bloodstream infection	-	-	2 (11.7)	15 (42.9)
Nosocomial infection	0	5 (21.7)	0	6 (17.1)
Immunosuppression	0	0	0	1 (2.9)
Involved bacteria				
Cocci gram positive			1 (16.7)	5 (14.3)
Bacillus gram negative			4 (66)	20 (57.1)
Organ-support at inclusion				
MAP min (mmHg)	NA	70 [62-81]	68 [62-78]	59 [53-64]#
PaO ₂ /FiO ₂ ratio (mmHg)	NA	115 [85-135]	186 [72-390]	156 [112-232]
Invasive Mechanical Ventilation, n (%)	0	11 (52.2)*	2 (33.3)	26 (74.3)#
Biological findings, Med [IQR]				
Serum lactate (mmol/L)	0.8 [0.7-1]	1.1 [0.8-1.9]	2.2 [1-3.6]	3 [1.9-4.7]
Leucocytes count (G/L)	6.6 [5.3-13.4]	7.9 [5.7-10.9]	16.9 [15.5-23.7]	9.8 [5.3-20.9]
Neutrophil count (G/L)	5.8 [3.8-10.9]	6.1 [4.5-8.5]	14.1 [12-21.1]	9.3 [5.9-19.5]
Monocyte count (G/L)	0.7 [0.3-1]	0.5 [0.3-0.6]	1 [0.4-1.4]	0.6 [0.2-1.]
Lymphocyte count (G/L)	0.7 [0.5-1.3]	0.9 [0.6-1]	1 [0.6-1.4]	0.5 [0.4-0.9]
NEUT-SFL (AU)	49 [49-52]	51 [47-53]	49 [48-60]	65 [55-75]#

Figure 1

A



B

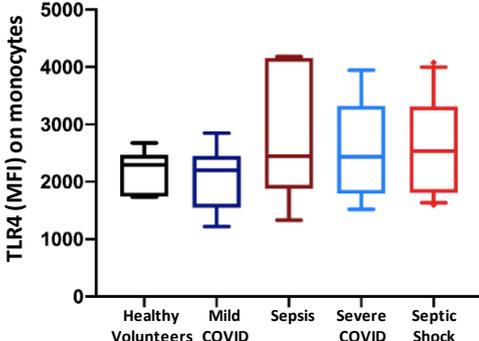
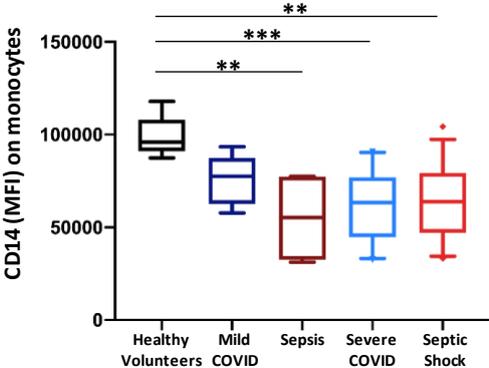


Figure 2

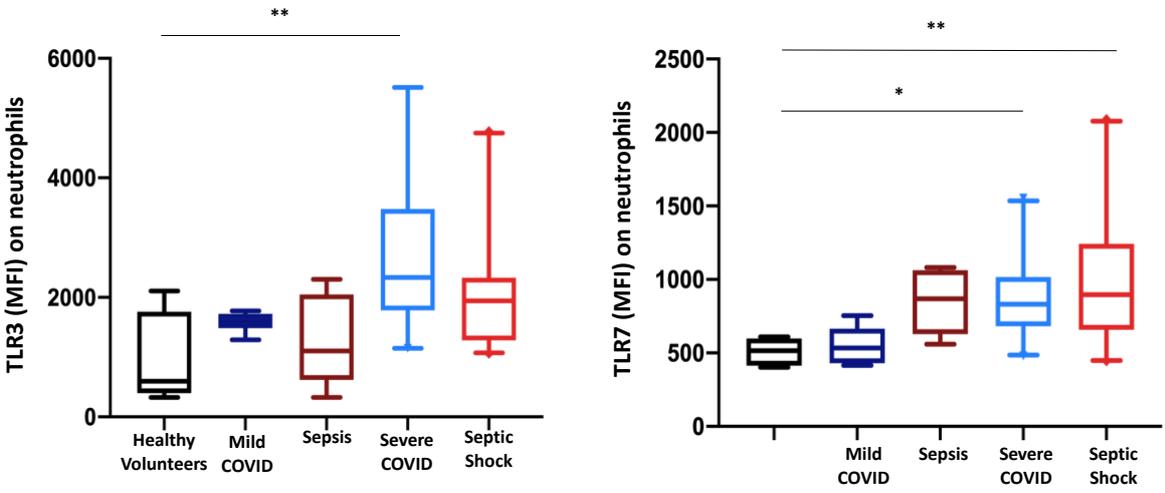
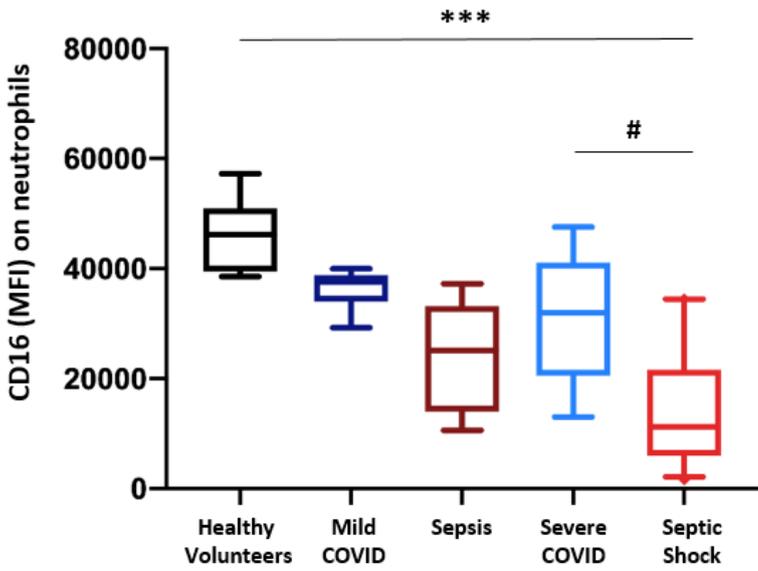


Figure 3



Résultats et figures complémentaires

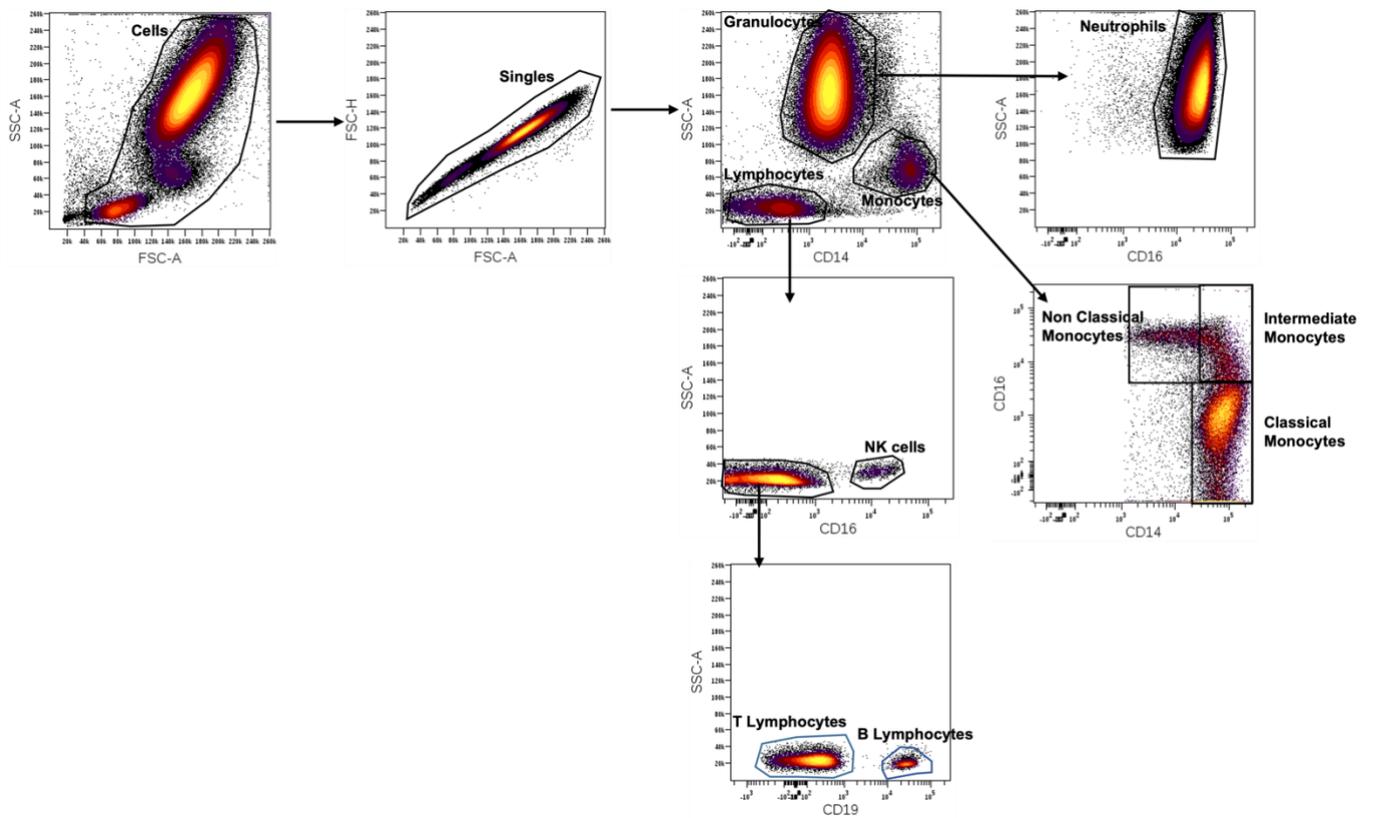


Figure 31:Flow cytometry analysis of leukocytes from patients

Flow cytometry analysis of leukocytes from patients. Dot plot shows the gating strategy to identify neutrophils, monocytes, T lymphocytes, B lymphocytes and NK cells. Cells were selected on side scatter area against forward scatter area. Cells were then gated on a forward scatter height against forward scatter area plot carried out exclusion of doublets. Leukocytes were differentiated with a CD14 antibody and side scatter area plot. Neutrophils are identified as: $SSC^{high} CD14^{-} CD16^{+}$; monocytes as $SSC^{low} CD14^{+}$ and subdivided into classical monocytes $CD14^{+}CD16^{-}$, intermediate monocytes $CD14^{+}CD16^{+}$, non-classical monocytes $CD14^{-}CD16^{+}$; T lymphocytes as $SSC^{low} CD14^{-} CD16^{-} CD19^{+}$; B lymphocytes as $SSC^{low} CD14^{-} CD16^{-} CD19^{+}$ and NK cells as $SSC^{low} CD14^{-} CD16^{+}$. FSC-H, Forward Scatter Height; FSC-A, Forward scatter Area; SSC-A, Side Scatter Area.

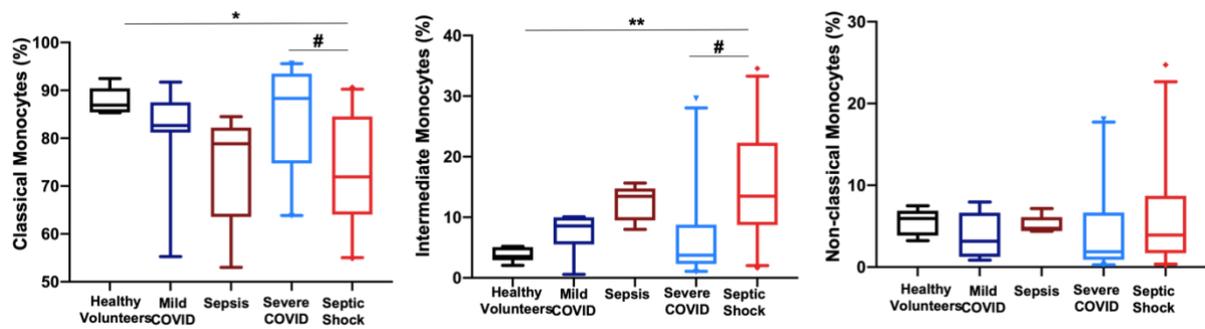


Figure 32: Percentage of subpopulation monocytes in septic shock and covid-19 patients compared to healthy volunteers.

Subpopulations of monocytes are expressed in percentages of total monocytes. Results are represented as Mean \pm SEM. The non-parametric Kruskal-Wallis test was used to compare the results between groups. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.005$ compared to healthy volunteers and # $p < 0.005$ compared to septic shock.

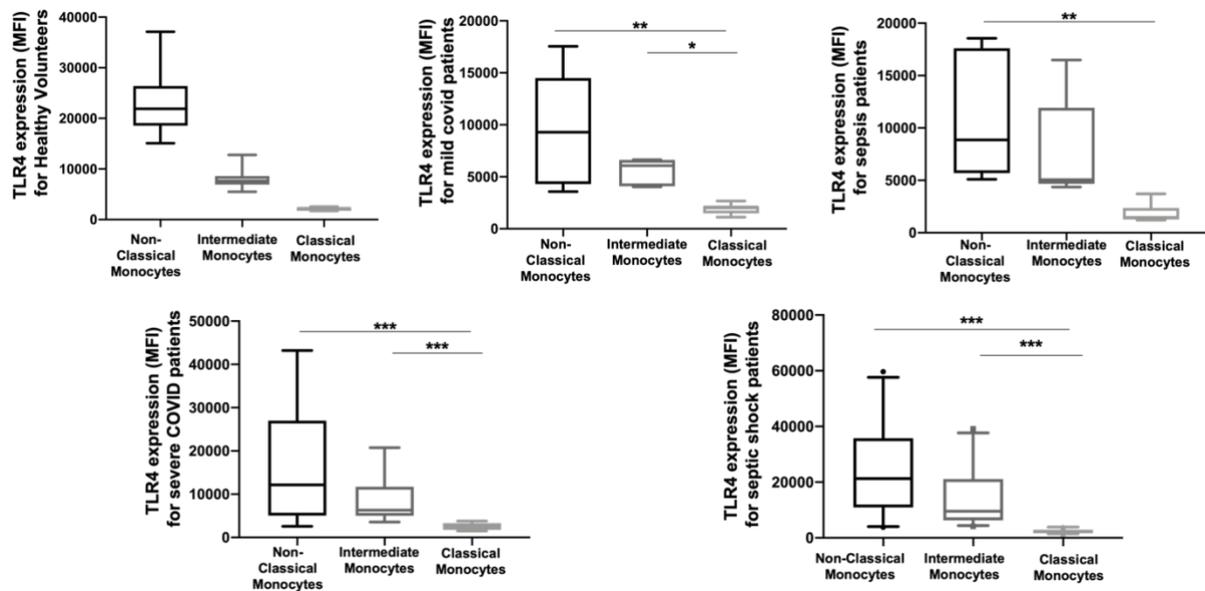


Figure 33: TLR4 differential expression in the subpopulations of monocytes in patient groups.

Surface TLR4 expression is given in the mean fluorescence intensity ratio (RFI), obtained by dividing the mean fluorescence intensity of patients compared to healthy volunteers on neutrophils. Results are represented as Mean \pm SEM. The non-parametric Kruskal-Wallis test was used to compare the results between groups. * $p < 0.05$ compared to non-classical monocytes.

Tableau 8: Tableau d'expression des MFI des 10 TLRs et du CD180 sur des leucocytes humains

		Neutrophiles										
		TLR1	TLR2	TLR3	TLR4	TLR5	TLR6	TLR7	TLR8	TLR9	TLR10	CD180
Patients	Témoins	325 ± 118	423 ± 134	1 025 ± 766	111 691 ± 38 305	553 ± 90	241 ± 56	513 ± 79	990 ± 160	2 063 ± 452	133 ± 33	1 465 ± 435
	Covid modéré	238 ± 72	342 ± 56	1 573 ± 161	94 017 ± 26 633	545 ± 93	241 ± 20	544 ± 134	1 006 ± 77	2 636 ± 660	123 ± 18	1 549 ± 260
	Covid grave	381 ± 153	428 ± 229	2 812 ± 1 318	40 549 ± 26 971	477 ± 108	273 ± 97	874 ± 254	1 371 ± 355	2 236 ± 809	110 ± 34	1 968 ± 630
	Sepsis	200 ± 82	347	1 253 ± 761	23 746 ± 28 127	640 ± 28	268 ± 23	1 053 ± 536	1 180 ± 889	4 211 ± 3 509	115 ± 8	2 834 ± 1 648
	Choc Septique	435 ± 212	729 ± 371	2 118 ± 1 072	19 274 ± 16 650	629 ± 221	357 ± 145	1 005 ± 462	1 184 ± 470	2 832 ± 919	213 ± 178	2 747 ± 1 078
		Monocytes										
		TLR1	TLR2	TLR3	TLR4	TLR5	TLR6	TLR7	TLR8	TLR9	TLR10	CD180
Patients	Témoins	670 ± 242	1 814 ± 264	519 ± 219	2 186 ± 359	189 ± 34	173 ± 34	362 ± 37	362 ± 37	397 ± 107	192 ± 20	7 382 ± 2 405
	Covid modéré	366 ± 191	900 ± 211	853 ± 98	2 098 ± 548	262 ± 56	179 ± 26	412 ± 49	430 ± 50	733 ± 92	177 ± 52	7 407 ± 2 771
	Covid grave	527 ± 245	1 495 ± 398	885 ± 288	2 539 ± 818	203 ± 38	185 ± 22	654 ± 242	734 ± 169	660 ± 310	147 ± 31	6 118 ± 3 298
	Sepsis	221 ± 141	1 112 ± 419	875 ± 510	2 769 ± 1158	234 ± 47	151 ± 38	600 ± 156	465	1 607	159 ± 75	5 347 ± 2 027
	Choc Septique	523 ± 282	1 971 ± 905	1199 ± 410	2 668 ± 819	297 ± 83	259 ± 86	628 ± 292	585 ± 215	1 029 ± 518	221 ± 142	3 688 ± 1 968
		Lymphocytes B										
		TLR1	TLR2	TLR3	TLR4	TLR5	TLR6	TLR7	TLR8	TLR9	TLR10	CD180
Patients	Témoins	176 ± 44	69 ± 8	228 ± 117	312 ± 62	146 ± 27	109 ± 13	132 ± 22	260 ± 50	578 ± 230	143 ± 46	12 296 ± 3 844
	Covid modéré	77 ± 40	74 ± 14	385 ± 103	360 ± 121	148 ± 12	107 ± 21	170 ± 70	281 ± 54	684 ± 95	105 ± 38	11 858 ± 1 265
	Covid grave	108 ± 50	65 ± 17	372 ± 141	451 ± 195	128 ± 47	107 ± 40	283 ± 147	364 ± 97	699 ± 396	52 ± 30	10 184 ± 3 486
	Choc Septique	92 ± 38	91 ± 29	441 ± 149	440 ± 199	151 ± 41	121 ± 47	273 ± 151	285 ± 104	1025 ± 536	111 ± 176	9 856 ± 2 781
			Lymphocytes T									
		TLR1	TLR2	TLR3	TLR4	TLR5	TLR6	TLR7	TLR8	TLR9	TLR10	CD180
Patients	Témoins	73 ± 20	62 ± 7	260 ± 131	64 ± 29	164 ± 18	109 ± 12	120 ± 27	273 ± 29	579 ± 169	32 ± 3	355 ± 87
	Covid modéré	63 ± 17	56 ± 4	408 ± 79	129 ± 38	171 ± 14	121 ± 16	143 ± 88	302 ± 61	609 ± 72	39 ± 10	478 ± 177
	Covid grave	69 ± 16	76 ± 22	402 ± 150	186 ± 49	143 ± 19	110 ± 16	287 ± 158	416 ± 143	463 ± 411	31 ± 6	691 ± 235
	Choc Septique	69 ± 20	104 ± 47	442 ± 190	205 ± 75	163 ± 26	111 ± 51	222 ± 77	317 ± 130	817 ± 441	40 ± 14	687 ± 292
			Lymphocytes NK									
		TLR1	TLR2	TLR3	TLR4	TLR5	TLR6	TLR7	TLR8	TLR9	TLR10	CD180
Patients	Témoins	91 ± 26	59 ± 14	292 ± 156	721 ± 367	164 ± 18	116 ± 12	142 ± 24	313 ± 35	545 ± 206	36 ± 6	367 ± 103
	Covid modéré	84 ± 35	62 ± 17	477 ± 97	453 ± 241	171 ± 14	119 ± 17	167 ± 86	352 ± 75	690 ± 232	39 ± 13	228 ± 236
	Covid grave	88 ± 35	58 ± 7	510 ± 180	405 ± 184	142 ± 17	116 ± 28	323 ± 175	521 ± 154	353 ± 272	34 ± 11	708 ± 259
	Choc Septique	79 ± 24	75 ± 34	559 ± 190	701 ± 415	172 ± 40	126 ± 31	248 ± 101	398 ± 173	950 ± 407	42 ± 14	701 ± 216

II Signature Protéomique des Polynucléaires Neutrophiles spécifiques des patients avec un choc septique associé à une coagulation intravasculaire disséminée

II.A Contexte

La Coagulation Intravasculaire Disséminée (CIVD) est une complication sévère du choc septique, caractérisée par une intense activation cellulaire, une coagulation excessive, associée à une dérégulation des mécanismes régulateurs. L'immuno-thrombose, combinant réponses immunitaires *via* le neutrophile et la coagulation, joue un rôle essentiel dans la physiopathologie de la CIVD. Tout en participant à la reconnaissance, à l'endiguement et à la destruction du pathogène, l'immuno-thrombose peut également avoir des effets délétères en activant excessivement la coagulation et en perturbant les systèmes régulateurs anticoagulants et fibrinolytiques. Le neutrophile est un acteur majeur de ce processus. Notre équipe a montré que les patients avec une CIVD présentent une augmentation de la NETose, qui peut contribuer à la fois aux effets bénéfiques et délétères de l'immuno-thrombose.

II.B Objectifs

L'objectif de notre étude, basée sur l'analyse des données issues d'une étude protéomique, était donc de mieux comprendre l'activation des neutrophiles et, plus spécifiquement, la formation de NETs lors de la CIVD associée au choc septique. En effet, des signatures protéiques pourraient guider vers de nouvelles cibles thérapeutiques et une meilleure compréhension des mécanismes sous-tendant la survenue de la CIVD au cours du choc septique.

II.C Matériels et Méthodes

II.C.1 Patients

Vingt patients majeurs en choc septique admis dans les unités de réanimation médicales du Nouvel Hôpital Civil de Strasbourg ont été inclus dans cette étude dont 9 qui ont présenté une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD). Le choc septique a été diagnostiqué selon la définition de la dernière conférence internationale de consensus (Singer et al., 2016), et la CIVD si le score JAAM-DIC 2016 était d'au moins 4 au cours des premières 24 heures du choc septique (Iba et al., 2016). Les femmes enceintes, les patients sous protection juridique et les patients pour lesquels une décision de limitation thérapeutique avait été prise du fait d'une

pathologie préexistante (cancer en phase terminale, insuffisance cardiaque) ont été exclus. Les patients présentant une agranulocytose (PNNs<0,5G/L) étaient également exclus. Le comité d'éthique et le comité de protection des personnes des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg ont approuvé ce protocole. Le consentement éclairé a été recueilli auprès du patient, ou de sa personne de confiance s'il n'était pas en mesure de donner son consentement à l'admission. Dans ce dernier cas, le patient a confirmé par écrit son consentement dès que possible.

Des prélèvements sanguins de volontaires sains ont été réalisés à l'Etablissement Français du Sang dans le cadre d'une convention inter-établissement afin de rassembler une bibliothèque de protéines de référence.

II.C.2 Déroulement de l'étude

Il s'agit d'une étude observationnelle non interventionnelle. Les soins ont été administrés conformément aux recommandations en vigueur des sociétés savantes nationales et internationales. Les prélèvements ont été couplés aux autres analyses sanguines effectuées en routine.

II.C.3 Prélèvements sanguins

Dix millilitres de sang ont été prélevés à l'admission, dans les douze heures suivant le diagnostic de choc septique, au troisième jour et au septième jour à l'aide de tubes de prélèvements sanguin BD Vacutainer Plus (Becton Dickinson, Le pont de Claix, France) Contenant un anticoagulant EDTA (Acide Éthylène Diamine Tétra acétique). Les échantillons sanguins ont été prélevés à partir d'un cathéter artériel, destiné à la surveillance invasive de la pression artérielle et aux prélèvements sanguins rendus nécessaires par l'état du patient. Cinq millilitres de sang total a également été prélevé dans des tubes contenant du citrate pour réaliser les tests d'hémostase de routine utilisés pour diagnostiquer la CIVD. Les volontaires sains ont été prélevés par ponction veineuse périphérique.

II.C.4 Isolement des polynucléaires neutrophiles

A chaque temps, deux tubes EDTA ont été utilisés pour isoler les polynucléaires neutrophiles par sélection immuno-magnétique négative à l'aide d'un kit commercial EasySep® (#19666, Stemcell Technologies, Canada) (Peters et al., 2005). Des billes magnétiques, liées à des anticorps ciblant spécifiquement les protéines de surface de toutes les cellules hématopoïétiques circulantes sauf les PNN, ont été ajoutées au sang total. Ensuite, le tube contenant sang total et billes est placé dans un aimant qui permet de séparer les cellules marquées des cellules non marquées. Une fois la fraction négative récupérée, les neutrophiles collectés ont été lavés deux fois avec du tampon de solution saline phosphate (PBS, Euromedex, France) afin d'éliminer toutes les protéines plasmatiques. La suspension neutrophilique a été contrôlée par réalisation d'une formule par fluorocytométrie automatisée (Sysmex™ XN20® analyzer, Sysmex Corporation, Kobe, Japon) permettant de compter les PNN et de vérifier leur pureté. La pureté moyenne était de $96,36\% \pm 0,363$. 1.10^6 PNN ont été aliquotés en culots secs dans des eppendorfs dédiés et conservés à -80°C .

II.C.5 Analyse Protéomique

Les protéines des neutrophiles isolés ont été extraies dans un tampon de type Laemmli et $7,5\mu\text{g}$ de protéines ont été concentrées dans une bande de stacking d'un gel 1D SDS-PAGE suivie d'une réduction des cystéines pour casser les ponts disulfures, d'une alkylation pour éviter la reformation de pont disulfures et d'une digestion enzymatique par l'ajout d'une solution de trypsine afin d'obtenir des peptides analysés par spectrométrie de masse. Les analyses ont été effectuées sur un système nanoACQUITY Ultra Performance LC (Waters Corporation, Milford, USA) coupé à un spectromètre de masse Q-Exactive Plus Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Massachussets, USA) avec un mode d'acquisition « données dépendantes ». La quantification sans marquage a été réalisée à l'aide du logiciel MaxQuant (v.1.6.0.16, Institut Max Planck de biochimie, Martinsried, Allemagne, (Cox et al., 2014)). L'analyse d'enrichissement des termes de Gene Ontology (GO) des protéines différenciellement abondantes et des réseaux protéiques a été réalisée à l'aide du logiciel STRING v.12 (Szklarczyk et al., 2023).

La méthode expérimentale et l'analyse protéomique sont détaillées en Annexe 1.

II.C.6 Western Blot

Les protéines ont été extraites des neutrophiles des patients à l'aide d'un tampon de lyse RIPA (#10017003, Thermofisher, Waltham, USA), supplémenté d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases (#04693116001 et #4906845001, Roche, Suisse). Les protéines (25g) ont été séparées par un gel SDS-PAGE à 12%. (#161075, Biorad, USA) à 110V pendant 2 heures puis transférées par électrophorèse sur une membrane de nitrocellulose (#IB23002, Thermofisher, USA). Les sites de liaison non spécifiques de la membrane ont été bloqués avec 5% d'albumine sérique bovine (BSA, Euromédex, France) diluée dans du tampon Tris salin (TBS, Euromedex, France) pendant 1 heure à température ambiante. Les protéines d'intérêts ont été marquées avec des anticorps primaires spécifiques incubés pendant la nuit à 4°C. Ces anticorps ont été dilués dans une solution de blocage au 1/1000 : anti-PTX3 monoclonal de lapin (ab125007), anti-PAD4 monoclonal de souris (ab128086), anti-MMP9 monoclonal de lapin (ab38898), anti-NGAL monoclonal de souris (ab23477), tous provenant de chez Abcam. Les membranes ont été lavées trois avec du TBS – T (TBS avec 0,1% de Tween-20) et incubées pendant 1 heure à température ambiante avec des anticorps secondaires marqués à la peroxydase : anti-lapin et anti souris (#7074S et #7076S, Cell Signaling Technology, USA). L'immunomarquage a été révélé par une solution de chimiluminescence. Le signal de chimiluminescence a été enregistré avec iBright CL100 et analysé à l'aide du logiciel ImageStudioLive (V.5.2.5, Li-COR Biosciences, USA). Une normalisation quantitative par rapport à la protéine de référence GAPDH a été réalisée pour chaque protéine d'intérêt en utilisant l'anticorps spécifique correspondant (anti-GAPDH monoclonal de souris, ab8245).

II.C.7 Induction et inhibition de la NETose in-vitro

Pour induire la NETose in-vitro, les neutrophiles de volontaires sains ont été isolés, comme décrit précédemment. Après leur séparation des autres cellules du sang total, les PNN ont été mis en suspension dans du tampon Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS, #P04-32505, Dominique Dutscher, France) à une concentration permettant une distribution de 400 000 cellules par puits. Les expériences ont été réalisées dans des plaques de culture 24 puits avec une lamelle de verre au fond pour l'immunofluorescence ou une plaque de culture 96 puits pour la génération de plasmine.

Afin d'induire la NETose, les polynucléaires neutrophiles ont été incubés à 37°C avec 5% de CO₂ pendant 4 heures en présence d'une souche bactérienne d'*Escherichia coli* (MOI 100), spécifiquement choisie pour sa résistance aux fluoroquinolones. Ces bactéries induisent la formation des NETs en utilisant la voie d'activation de la protéine kinase C (PKC) (Kenny et al., 2017), tout comme le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) qui a été utilisé comme témoin positif. Les PNN ont été stimulés avec 50nM de PMA (#P1585, Sigma-Aldrich, USA) dans les mêmes conditions que les bactéries. De plus, dans certaines conditions, les neutrophiles ont été simultanément incubés avec les bactéries ou la PMA et traités avec de la ciprofloxacine (#17850, Merck, Allemagne).

II.C.8 Immunofluorescence

Après stimulation, les PNN ont été fixés sur les lames en utilisant une solution de paraformaldéhyde à 4% (PFA, #J19943-K2, Thermofisher, USA) pendant 30 minutes, puis rincées trois fois avec du PBS. Une fois perméabilisés avec une solution de 0.2% de Tween20 pendant 15 minutes, les sites antigéniques des PNNs ont été bloqués avec une solution de BSA à 10% pendant 3 heures. Les cellules ont été incubées avec des anticorps primaires spécifiques : un anticorps de lapin anti neutrophile élastase (#481001, 1/1000, Merck, Allemagne) ou un anticorps anti-myéloperoxydase (#MA-180878, 1/400, Thermofisher, USA), ainsi qu'un anticorps de lapin anti-MCM2 (#3619S, 1/500, Cell Signaling technology, USA), pendant toute la nuit à 4°C. Après trois rinçages, les cellules ont ensuite été incubées à l'obscurité pendant 1 heure à température ambiante avec les anticorps secondaires appropriés : l'anticorps de chèvre anti-souris Alexa Fluor 488 et l'anticorps de chèvre anti-lapin Alexa Fluor 647 (respectivement #A11001 et #A21245, Thermofisher, USA). Après trois lavages supplémentaires, les lames ont été contremarquées avec une solution Hoechst 33342 pour marquer l'ADN (NucBlue™ Live ReadyProbes, #R37605, Thermofisher, USA) avant d'être montées sous une lamelle en utilisant le milieu de montage Prolong Gold (#P10144). Les images en immunofluorescence ont été acquises à l'aide d'un microscope Zeiss Axio Imager M2 Apotome (PIC-STRA, CRBS, Strasbourg, France) et analysées à l'aide du logiciel ImageJ.

II.C.9 Mesure de l'activité phagocytaire des PNN

Les neutrophiles ont été stimulés avec de la PMA à 50nM et traités avec de la ciprofloxacine dans des tubes de 5mL. Après 4 heures de stimulation, les tubes ont été centrifugés pendant 15 minutes à 800g, et les neutrophiles ainsi que les NETs ont été remis en suspension avec du plasma issu d'un prélèvement sanguin hépariné de volontaires sains. Des bactéries d'*Escherichia coli* opsonisées marquées au FITC (Réactif B, PHAGOTEST™, Glycotope Biotechnology, Allemagne) ont été ajoutées à tous les tubes. Les tubes témoins ont été incubés sur glace, tandis que les tubes d'essai ont été incubés à 37°C pendant 30 minutes. Après l'ajout d'une solution de blocage et trois lavages, une analyse en cytométrie en flux a été réalisée pour mesurer le nombre de bactéries phagocytées par neutrophile en fonction de l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) du FITC.

II.C.10 Génération de Plasmine in-vitro

Les neutrophiles ont étéensemencés dans des plaques 96 puits à une concentration de 4×10^5 , puis stimulés avec *Escherichia coli* ou PMA et enfin traités avec de la ciprofloxacine selon les étapes précédemment décrites. Après 4 heures de stimulation, les plaques ont été centrifugés pendant 15 min à 800g, permettant de retirer les surnageants et de fixer les NETs au fond de la plaque. La NETose a été confirmée en visualisant les NETs avec une coloration Hoechst et en détectant l'activité de la neutrophile élastase. Ensuite, de l'urokinase Therasolv® a été incubé à quatre concentrations (0,2,3,4.5nM) sur les NETs pendant 1heure à 37°C avec 5% de CO₂ afin de permettre la liaison de l'uPAR (urokinase-type plasminogen activator receptor). Après une étape de centrifugation pour éliminer l'excès d'uPA, une solution de plasminogène à 0.5µM a été ajoutée pour déclencher la génération de plasmine. La cinétique de transformation du plasminogène en plasmine a été suivie pendant 2 heures en mesurant la libération du méthyl(malonyl)hydroxy-prolylarginine -p-nitroanil169-135ide (pNA) émettant une absorbance à 405nm à l'aide d'un lecteur de plaques (**Figure 34**). Les vitesses initiales de la réaction ont été calculées en utilisant un programme informatique dédié.

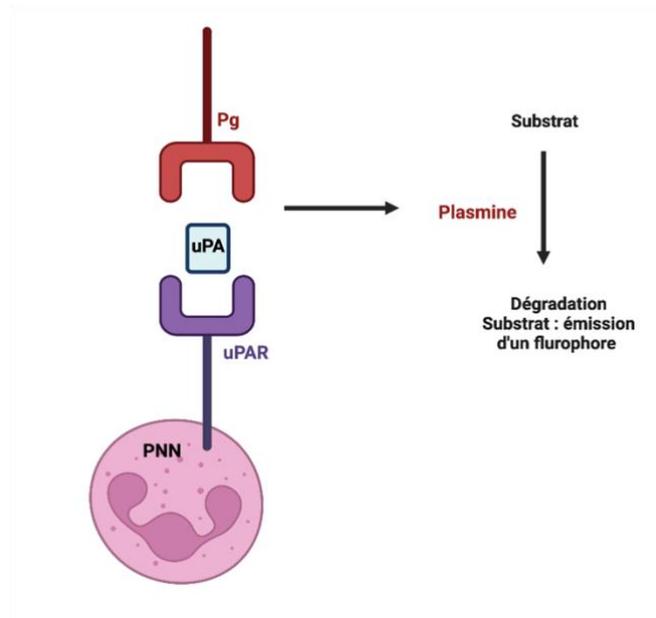


Figure 34: Schéma méthodologique de la génération de plasmine à partir de polynucléaires neutrophiles in-vitro.

II.C.11 Statistique

Les données, exprimées sous forme de moyenne \pm écart-type, ont été analysées à l'aide du logiciel GraphPad Prism8® (GraphPad Software, Inv. CA, USA). « n » représente le nombre de patients ou le nombre d'expériences. Les valeurs moyennes ont été comparées en utilisant le test de Mann-Whitney pour l'analyse des western-blots. La variance statistique entre différents groupes a été déterminée en appliquant un test d'analyse de variance à deux facteurs (ANOVA) pour la génération de plasmine. Une valeur de $p < 0.05$ a été considérée comme statistiquement significative. Toutes les mesures ont été réalisées au moins trois fois séparément.

Tableau 9 : Caractéristiques cliniques des patients à l'admission

Tous les patients inclus ont un choc septique. CIVD : Coagulation Intravasculaire Disséminée; IGS II : Index de Gravité Simplifiée II ; SOFA: Sepsis-related Organ Failure Assessment. * p<0,05

	CIVD - n=10	CIVD + n=10
Caractéristiques (moyenne ± SD)		
Age (années)	68 ± 8	65 ± 17
Sexe (n, hommes/femmes)	6	5
IGS II	57 ± 19	56 ± 16
SOFA à l'admission	10.1 ± 3.2	12.3 ± 3.3
Mortalité à J7	1	2
Traitements (n)		
Ventilation Mécanique	9	10
Épuration extra-rénale	1	5
Norépinephrine	10	10
Épinéphrine	3	4
Dobutamine	0	4
Plasma frais	1	2
Concentrés plaquettaires	0	2
Fibrinogène	0	0
Facteurs coagulants	0	0
Héparine	10	10
Biologie (Médiane [IQR])		
Procalcitonine (mg/L)	8.9 [2,60-15,3]	62.5 [29.5-193.0]*
pH	7,34 [7,25-7,45]	7,19 [7,15-7,27]*
Leucocytes (G/L)	13.7 [9.7-19.8]	10,0 [4,9-26,5]
Neutrophiles (G/L)	11.6 [10.5-16.8]	9.4 [5.6-20.9]
Lymphocytes (G/L)	0.67 [0.44-1.4]	0.42 [0.31-0.88]
Monocytes (G/L)	0.67 [0.52-1.1]	0.31 [0.13-0.73]
Hémoglobine (g/dL)	10.3 [8.5-13.3]	11.4 [10.0-12.8]
Plaquettes (G/L)	188 [129-492]	157 [124-252]
Temps de prothrombine (%)	50 [41-83]	42 [33-71]
D-dimères (mg/L)	2.9 [1.3-4.4]	9.5 [3.2-18.3]*
Antithrombine (%)	61 [40-83]	55 [40-76]
Fibrinogène (G/L)	5.6 [5.0 -7.9]	4.5 [3.2-7.0]

II.D Résultats

II.D.1 Caractéristiques des patients

Vingt patients ont été inclus dans l'étude, tous répondant aux critères de choc septique à leur admission. Sur la base des caractéristiques cliniques, des signes biologiques et du score JAAM (JAAM>4), dix patients ont été diagnostiqués avec une CIVD dans les 24 premières heures. Les caractéristiques cliniques des patients sont présentées dans le **Tableau 9**. Le plus mauvais score JAAM était de 5,00 [4,75-6,00] chez les patients en CIVD contre 2,00 [1,75-3,00] chez les patients sans CIVD, $P < 0,001$. Les numérations plaquettaires sont plus faibles chez les patients avec une CIVD (157 G/L dans le groupe CIVD+ contre 188 G/L pour les patients sans CIVD), tandis que les numérations leucocytaires et neutrophiliques étaient similaires. Les patients avec une CIVD du choc septique ont des D-dimères significativement augmentés par rapport aux patients sans CIVD (2.9 contre 9.5, $p < 0.05$). Aucune différence démographique ou dans le type d'infections n'a été observée entre les deux groupes.

II.D.2 Les patients avec une CIVD du choc septique présentent une signature protéique spécifique

L'analyse protéomique a révélé des différences entre les trois groupes, principalement à l'admission. En effet, l'analyse combinée a permis l'identification et la quantification de 1813 protéines dans au moins 70% des échantillons a permis de séparer les échantillons en trois groupes correspondants dans l'ensemble aux trois groupes de notre étude : choc septique sans CIVD, choc septique avec CIVD et témoins (**Figure 35A**). Cette analyse sans supervision, confirme que les neutrophiles présentent différentes signatures protéiques en fonction du diagnostic.

A l'admission, 225 protéines présentaient une expression différentielle chez les patients atteints de CIVD par rapport aux patients en choc septique sans CIVD (**Figure 35B**). Parmi ces protéines 115 étaient plus abondantes (points en haut à droite du *volcano plot*) et 110 étaient moins abondantes (points en haut à gauche du *volcano plot*) dans les neutrophiles des patients avec une CIVD du choc septique.

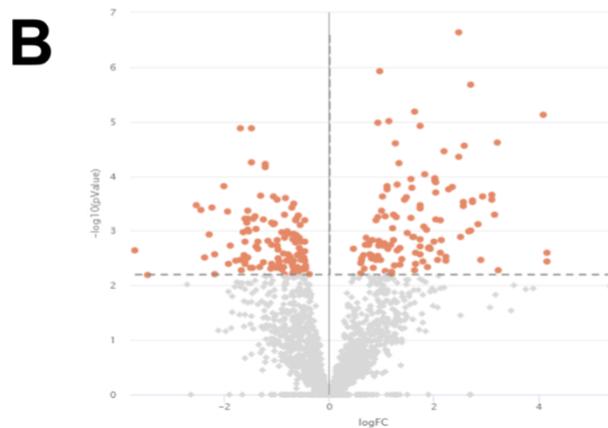


Figure 35: Analyse bio-informatique des protéines différemment exprimées chez les patients en choc septique avec ou sans CIVD.

(A) Analyse hiérarchique non supervisée sur les 1813 protéines présentes dans 70% des échantillons. En haut de la figure, les rectangles gris, orange et vert représentent les trois groupes initiaux : donneurs sains, chocs septiques et CIVD. Les profils de signature des protéines sont représentés par des lignes noires sur l'axe vertical. L'échelle de saturation des Z-score va de -4 en bleu à un z-score de +4 en rouge. (B) *Volcano plot* représentant l'expression des protéines différentielles entre les patients DIC et les patients en choc septique, FDR = 5,01%, p-value = 0,00631.

L'identification de ces 1813 protéines uniques dans les neutrophiles de patients en choc septique est en accord avec les données de la littérature concernant le protéome des neutrophiles (C. Liu et al., 2019; Tak et al., 2017). Notre analyse en spectrométrie de masse a révélé que 225 protéines avaient une expression différentielle entre les patients avec ou sans CIVD. De manière similaire, Wang *et al.* ont montré que les neutrophiles humains stimulés par

le PMA expriment 347 protéines par rapport aux neutrophiles non stimulés (X. Wang et al., 2018).

a. Analyse de la diminution sélective de l'abondance protéique dans les neutrophiles lors de la CIVD induite par le choc septique

Nos résultats mettent en évidence que 110 protéines sont moins abondantes dans les neutrophiles des patients en CIVD. L'analyse des voies KEGG des protéines du neutrophiles moins abondantes dans la CIVD révèle un enrichissement des protéines impliquées dans la migration transendothéliale des leucocytes (False Discovery Rate (FDR) = $5,59 \times 10^{-11}$), la régulation du cytosquelette d'actine (FDR = $4,53 \times 10^{-9}$) et la voie de signalisation des chimiokines (FDR = $1,27 \times 10^{-05}$). Les fonctions principales de ces 110 protéines sont la dégranulation des leucocytes (GO :0043299, FDR = $2,06 \times 10^{-35}$), l'exocytose (GO :00687, FDR = $2,68 \times 10^{-35}$), l'activation des neutrophiles (GO :004211, FDR = $4,63 \times 10^{-35}$), l'activation des leucocytes impliqués dans la réponse immunitaire (GO :0002366, FDR = $4,80 \times 10^{-35}$). Ces fonctions participent à plusieurs processus biologiques des neutrophiles comme la dégranulation ou les modifications cytosoliques (**Figure 36**).

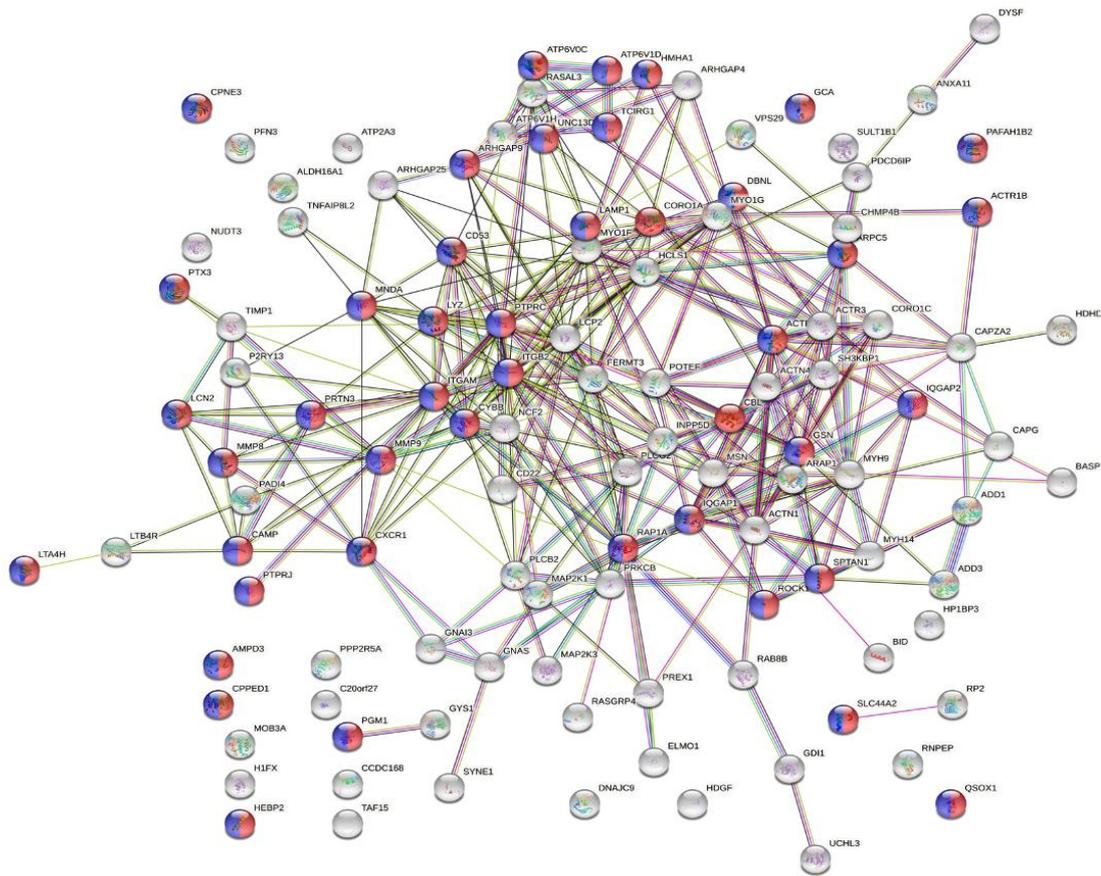


Figure 36 : Représentation des réseaux fonctionnels des protéines moins abondantes dans les neutrophiles des patients avec une CIVD du choc septique par rapport aux patients sans CIVD à l'admission.

Les couleurs bleues et rouges mettent en évidence les fonctions de dégranulation des neutrophiles et des leucocytes. L'analyse a été réalisée avec le logiciel STRING avec le plus haut niveau de confiance de score d'interaction 0.900.

Parmi ces 110 protéines moins abondantes, nous avons choisi quatre protéines spécifiques : PTX3, PAD4, MMP9 et LCN2, dont l'expression a été étudiée également par western-blot sur les échantillons de neutrophiles des patients de la même cohorte. Cette sélection a été guidée par les propriétés pertinentes des protéines et leur association avec le choc septique, l'activation des neutrophiles, l'inflammation ou la NETose. L'analyse de ces western blot a confirmé que ces quatre protéines étaient moins exprimées chez les patients avec une CIVD du choc septique comparé aux patients sans CIVD ($p < 0.05$, **Figure 37**).

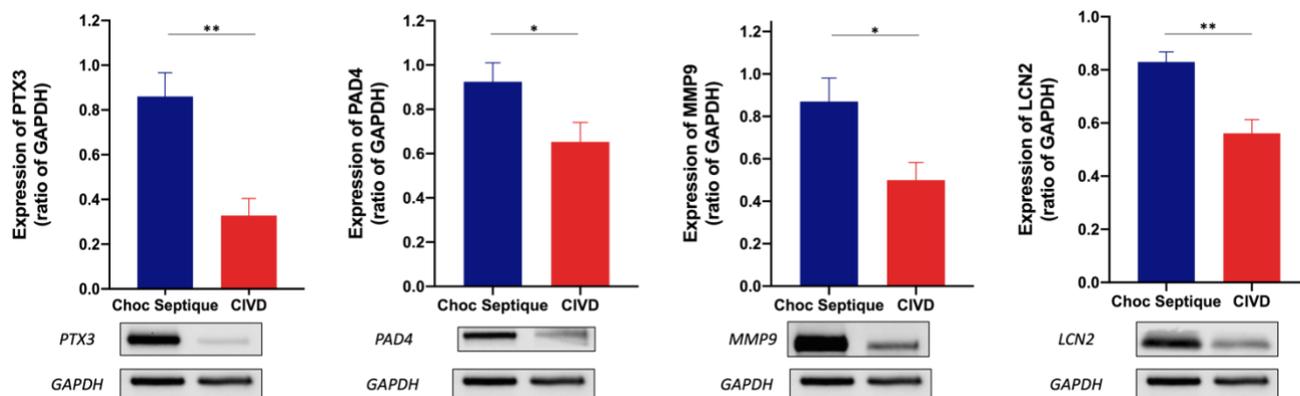


Figure 37: Les neutrophiles des patients atteints de CIVD avec choc septique ont une expression réduite ($p < 0.05$) des protéines PTX3 (A), PAD4 (B), MMP9 (C) et LCN2 (D) par rapport aux patients en choc septique à l'admission.

Les données sont exprimées en moyenne et en écart-type. Test de Mann-Whitney, choc septique sans ($n=11$) et avec CIVD ($n=9$).

b. Les neutrophiles des patients en CIVD surexpriment un groupe de protéines impliquées dans la réplication de l'ADN

L'analyse en spectrométrie de masse a permis de mettre en évidence une surabondance de 115 protéines dans les neutrophiles des patients avec une CIVD du choc septique comparés aux patients sans CIVD.

Ces protéines sont impliquées dans les fonctions ribosomales ($FDR = 8,77 \times 10^{-26}$), du métabolisme ($FDR = 6,17 \times 10^{-06}$) et, le plus significativement de la réplication de l'ADN ($FDR = 4,80 \times 10^{-35}$) d'après l'analyse des voies KEGG. Ces protéines ont principalement des fonctions de liaison à l'ARN (GO : 003723, $FDR = 4,56 \times 10^{-26}$), de liaison aux acides nucléiques (GO : 003676, $FDR = 3,99 \times 10^{-15}$), d'activité hélicase (GO : 0004386, $FDR = 5,49 \times 10^{-07}$) et de liaison à l'origine de la réplication de l'ADN (GO : 003688, $FDR = 3,68 \times 10^{-06}$) (**Figure 38A**).

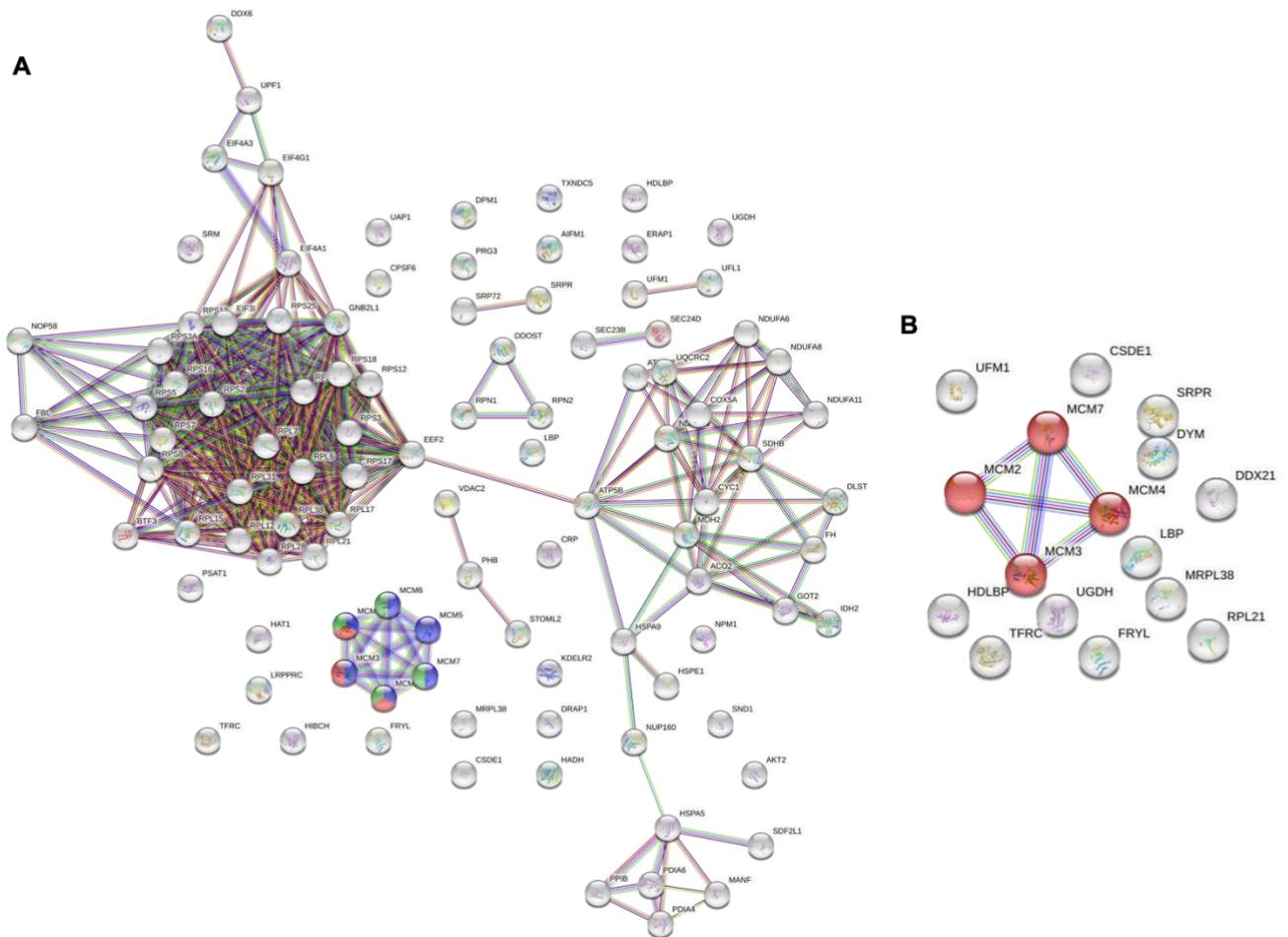


Figure 38: Représentation des réseaux fonctionnels des protéines plus abondantes dans les neutrophiles des patients avec une CIVD du choc septique.

(A) à l'admission comparé aux patients sans CIVD (B) à l'admission comparé au troisième jour. L'analyse a été réalisée avec le logiciel STRING avec le plus haut niveau de confiance de score d'interaction 0.900. En effet, le réseau fonctionnel le plus statistiquement significatif chez les patients avec une CIVD (J1) concerne l'augmentation du complexe protéique Mini Chromosome Maintenance (MCM). Ces six protéines du complexe hélicase sont connues pour leur rôle crucial dans la réplication de l'ADN ainsi que dans le remodelage de la chromatine.

De manière intéressante, parmi ces six protéines du complexe MCM, nous avons observé qu'à J3, quatre protéines MCM2, MCM3, MCM4 et MCM7 sont surexprimées au premier jour par rapport au troisième jour chez les patients atteints de CIVD (**Figure 38B**) et donc une augmentation persistante à J3 pour MCM5 et MCM6. Ces résultats suggèrent une activation du complexe MCM dès les premiers stades de la CIVD.

II.D.3 L'inhibition de l'activité du complexe MCM bloque la NETose dans un modèle in vitro de stimulation bactérienne et non bactérienne

Les patients présentant une CIVD associée au choc septique sont caractérisés par une NETose plus importante que les patients sans CIVD et nous observons que les protéines du complexe MCM sont plus exprimées dans les neutrophiles des patients avec une CIVD (**Figure 38A**). Le complexe MCM joue un rôle essentiel dans la réplication de l'ADN des cellules des eucaryotes. Cependant, le neutrophile est une cellule hématopoïétique au stade final de différenciation, et qui ne se divise pas. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'expression du complexe MCM dans les neutrophiles des patients en CIVD reflétaient l'induction de la NETose chez ces patients.

Après 4 heures de stimulation par *Escherichia coli*, les polynucléaires neutrophiles sains ont libéré des NETs qui ont été visualisés en microscopie fluorescence. Les NETs ont été identifiés par leurs structures de chromatine d'ADN associées aux granules antimicrobiens de myéloperoxydase (**Figure 39B**), ces structures étaient similaires à celles observées après la stimulation avec la PMA (**Figure 39C**).

La protéine MCM2 (en rouge) est présente dans le cytoplasme des neutrophiles non stimulés (**Figure 39A**). Une fois les NETs formés pour donner suite à la stimulation par *Escherichia coli* (**Figure 39B**), la protéine MCM2 était toujours exprimée de façon homogène dans le cytoplasme des neutrophiles activés et est présente sur les filaments d'ADN. Lors de la stimulation par la PMA, MCM2 est localisée à proximité de la membrane plasmique des PNN, et sur les NETs (**Figure 39C**).

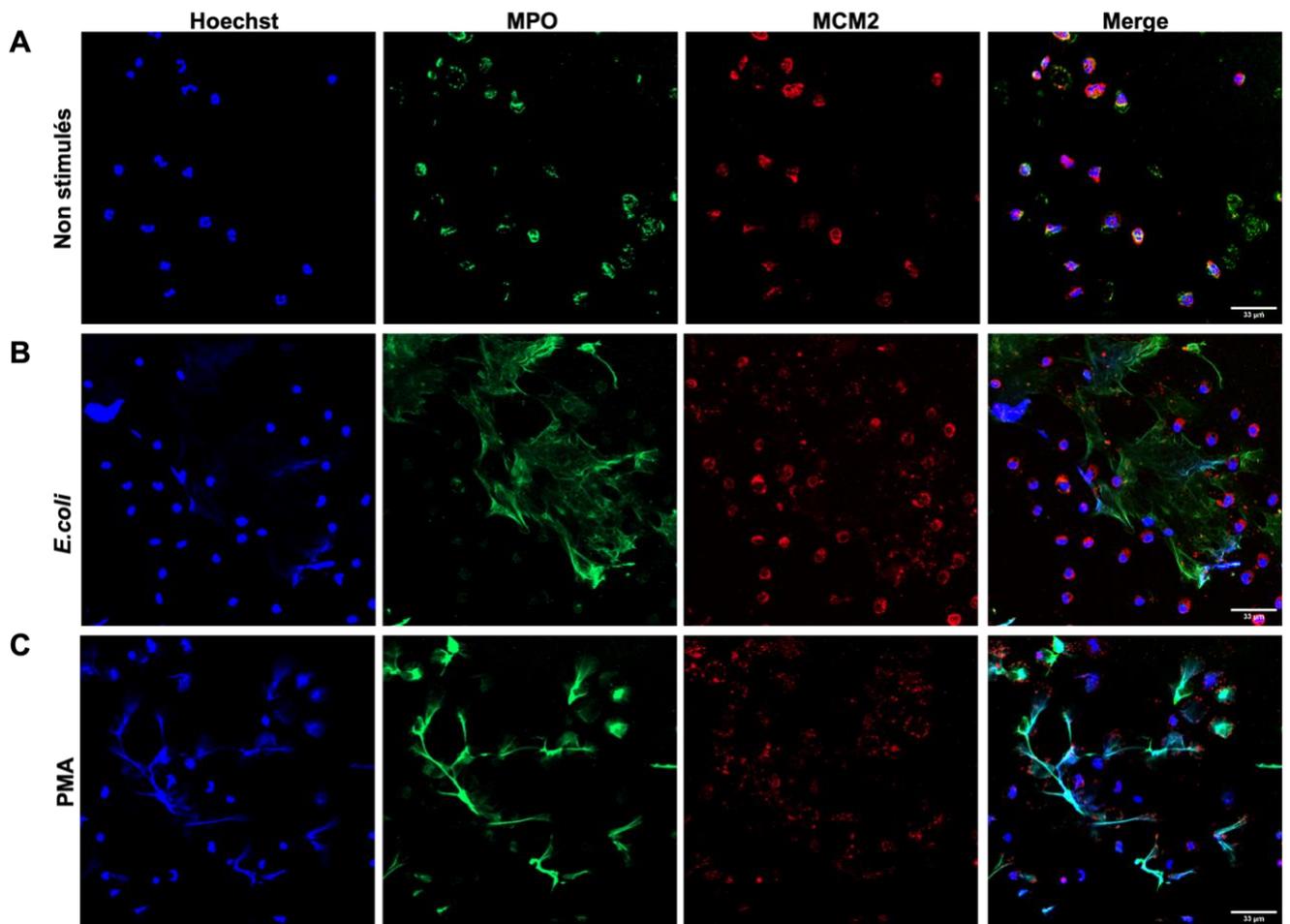


Figure 39 : Images représentatives d'immunofluorescence de polynucléaires neutrophiles non stimulés (A), stimulés avec *Escherichia coli* (B) ou avec de la PMA (C).

Les PNN ont été marquées avec un anticorps anti-myéloperoxydase (vert) et un anticorps anti-MCM2 (rouge) et contre-marquées avec du Hoechst (bleu) marquant l'ADN, grossissement original x63. Les NETs ont été identifiées comme des fibres d'ADN allongées (bleu), associées à la myéloperoxydase (vert).

Pour confirmer notre hypothèse sur le rôle du complexe MCM dans la NETose, nous avons évalué l'impact de l'inhibition du complexe MCM par un des inhibiteurs connus du complexe MCM 2-7, la ciprofloxacine. Ainsi, après une stimulation de 4 heures avec de la PMA, nos résultats montrent que la NETose est inhibé par la ciprofloxacine, et cette réponse semble dose dépendante (**Figure 40**).

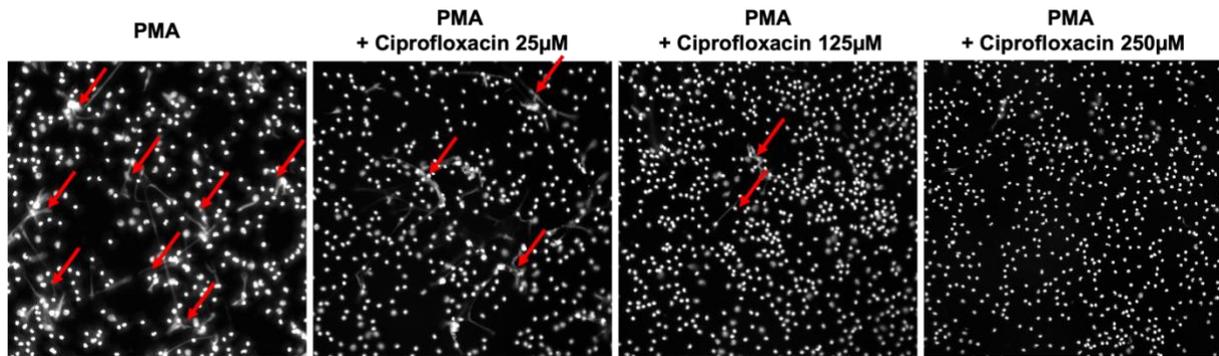


Figure 40 : Inhibition de la NETose dose dépendante de la ciprofloxacine in vitro.

Images d'immunofluorescence en lumière blanche après marquage avec du Hoechst, grossissement initial x20.

De plus, la NETose liée à la stimulation par une souche d'*Escherichia coli* résistante aux fluoroquinolones (dont la ciprofloxacine fait partie) est également inhibée par la ciprofloxacine à 250µM (**Figure 41A**). Ces résultats sont similaires à ceux observés avec la PMA (**Figure 41B**). Ces neutrophiles présentent des noyaux plurilobés avec la présence de MPO dans le cytoplasme. La répartition de la protéine MCM2 est également homogène dans le cytoplasme.

Nos résultats indiquent que l'inhibition du complexe MCM avec la ciprofloxacine peut bloquer la NETose induite par des stimuli bactériens ou non bactériens. Cette inhibition ouvre une voie prometteuse pour moduler ou/et inhiber la NETose et par conséquent l'immunothrombose.

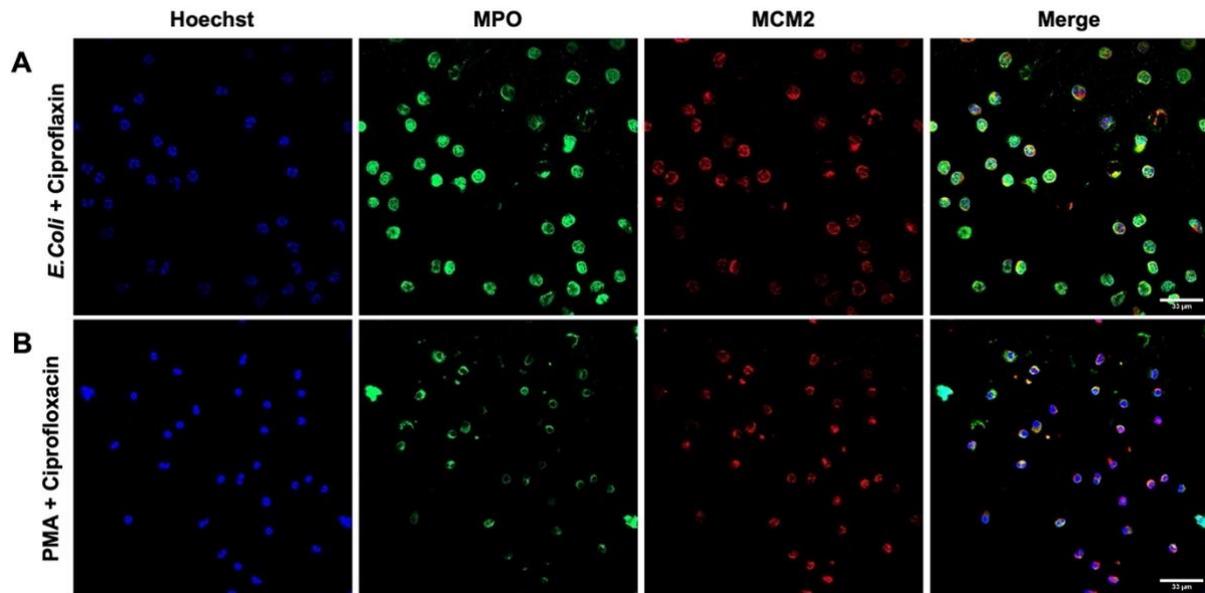


Figure 41: Images représentatives d'immunofluorescence de polynucléaires neutrophiles stimulés avec *Escherichia coli* (A) ou avec de la PMA (B) et traités avec de la ciprofloxacine.

Les PNN ont été marquées avec un anticorps anti-myéloperoxydase (vert) et un anticorps anti-MCM2 (rouge) et contre-marquées avec du Hoechst (bleu) marquant l'ADN, grossissement original x63.

II.D.4 L'inhibition du complexe MCM préserve la fonctionnalité des neutrophiles

Lors de la CIVD, la fonctionnalité des neutrophiles est altérée. Nous avons étudié les capacités de phagocytose et de fibrinolyse dans des polynucléaires stimulés avec et sans inhibiteur du complexe MCM.

a. La capacité de phagocytose est intacte après l'inhibition du complexe MCM sur des neutrophiles stimulés

Le neutrophile joue un rôle essentiel dans la phagocytose des microorganismes pathogènes. Afin de déterminer si cette fonction est préservée chez les neutrophiles activés mais dont le complexe MCM est inhibé par la ciprofloxacine nous avons évalué leur capacité phagocytaire. Ainsi, des neutrophiles sains stimulés avec de la PMA et traités avec de la ciprofloxacine pendant 4 heures ont été exposés à des bactéries *E. coli* couplées au fluorochrome FITC. Après une incubation de 30 minutes à 37°C, l'intensité de fluorescence en FITC a été mesurée en cytométrie, qui reflète le nombre de bactéries phagocytées par les neutrophiles. Pour évaluer la capacité phagocytaire des polynucléaires neutrophiles, un tube témoin soumis aux mêmes conditions expérimentales mais incubé dans la glace a été utilisé.

Les neutrophiles non stimulés ont présenté une augmentation significative de leur activité phagocytaire pour les bactéries couplées au FITC dans les tubes tests (incubé avec la bactérie à 37°C) comparé au tubes contrôles (incubé avec la bactérie sur glace) (**Figure 42A**, $p < 0,05$). Après une stimulation avec de la PMA, un inducteur de NETose, aucune modification de fluorescence des neutrophiles n'a été observé dans l'intensité de fluorescence, confirmant ainsi que les neutrophiles perdent leur capacité de phagocyter à la suite à cette stimulation (**Figure 42B**). Cependant, une activité de phagocytose a été observée témoins pour les neutrophiles activés par la PMA en présence de ciprofloxacine (**Figure 42C**, $p < 0,01$). Ces résultats montrent ainsi que l'inhibition du complexe MCM par la ciprofloxacine a rétabli la capacité phagocytaire des neutrophiles après leur stimulation par la PMA.

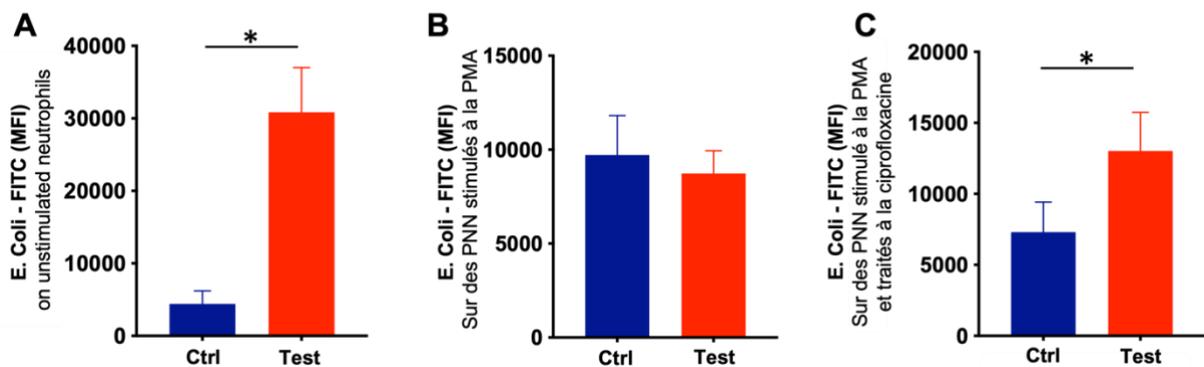


Figure 42: Mesure de l'intensité de fluorescence de bactéries Escherichia coli marquée au FITC sur des neutrophiles non stimulés (A), stimulés avec du PMA (B), stimulés avec du PMA et traités avec de la ciprofloxacine (C).

Les tubes contrôles (bleu) ont été incubés sur glace, tandis que les tubes tests (rouge) à 37°C pendant 30 minutes.

b. La production de plasmine des PNN est conservée après inhibition du complexe MCM

Les patients en un choc septique avec une CIVD présentent une diminution de la capacité à générer de la plasmine. Cette réduction peut être associée au phénomène de NETose, en raison de la présence d'élastase dans les filaments d'ADN des NETs, qui clive le plasminogène en fragments, altérant leur capacité à générer de la plasmine (Cruz *et al.*, 2019; Delabranche *et al.*, 2017). Ce mécanisme contribue à l'hypofibrinolyse et à la formation de *microthrombi* observées lors de la CIVD.

La génération de plasmine peut être évaluée par une étude in-vitro consistant à déposer du plasminogène et un substrat chromogénique, le pNA, sur des neutrophiles préalablement incubés avec des doses croissantes d'urokinase. Lorsque le plasminogène est exposé à l'uPA il est converti en plasmine, qui à son tour catalyse la transformation du paranitroanilide en paranitroaniline émettant une coloration jaune détectable au spectrophotomètre (**Figure 34**). La génération de plasmine a été suivi pendant deux heures avec ce test.

Les neutrophiles non stimulés produisent de la plasmine proportionnellement à la concentration d'urokinase (ligne noire, **Figure 43 A et B**). En revanche, lorsque les neutrophiles ont été stimulés par *Escherichia coli* ou par la PMA, la production en plasmine a été moins importante (**Figure 43A** *E. coli* (ligne rouge) versus non stimulés, $p < 0,01$; **Figure 43B** PMA (ligne bleue) versus non stimulés, $p < 0,0001$). De manière intéressante, la présence de ciprofloxacine restaure une production de plasmine (**Figure 43A** *E. coli* + ciprofloxacine versus *E. coli*, $p < 0,0001$; **Figure 43B** PMA + ciprofloxacine versus PMA, $p < 0,001$).

Ainsi, ces résultats suggèrent que l'inhibition du complexe MCM par la ciprofloxacine permettrait de préserver l'implication des neutrophiles dans la génération de plasmine, contribuant ainsi potentiellement à améliorer l'hypofibrinolyse et à moduler positivement l'immuno-thrombose.

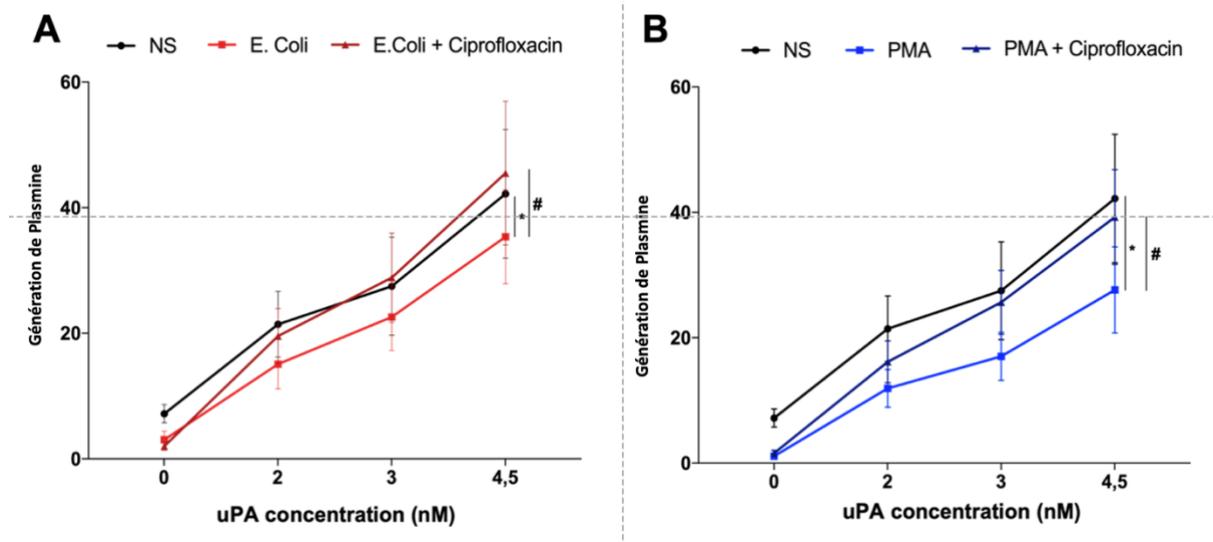


Figure 43: Génération de plasmine à des doses croissantes d'urokinase (uPA) sur des polynucléaires neutrophiles non stimulés (ligne noire), stimulés par *Escherichia coli* (A, ligne rouge vif), stimulés par la PMA (B, ligne bleu vif) et stimulés et traités avec de la ciprofloxacine (A, ligne rouge sombre ou B, ligne bleu sombre).

La formation de plasmine à partir de 0,5nM de plasminogène a été suivie en mesurant la libération de pNA, substrat chromogénique sélectif de la plasmine à une concentration de 0,75nM pendant deux heures à 405nm. Les mesures ont été effectuées 5 fois. Les données sont représentées sous forme de moyenne et écart type et ont été analysées par une analyse de la variance à deux facteurs (ANOVA).

Grâce à une étude fonctionnelle sur le neutrophile, nos travaux ont montré que l'inhibition du complexe MCM permet de conserver les fonctions de phagocytose et n'entrave pas la génération de plasmine des neutrophiles stimulés par un agent inducteur de NETose. Les neutrophiles participent ainsi à l'élimination des microorganismes et à la destruction des *microthrombi* en dégradant les caillots de fibrine.

II.E Conclusion

Notre étude a révélé une signature protéique spécifique des neutrophiles des patients en choc septique avec une CIVD, les différenciant ainsi des patients sans CIVD. Cette signature implique des protéines liées à l'inflammation telles que PTX3, ainsi qu'à la NETose, notamment PAD4 mais surtout le complexe MCM (*Mini Chromosome Maintenance*). En inhibant spécifiquement le complexe hélicase MCM2-7 par la ciprofloxacine, nous avons pu montrer de façon originale, non rapportée à ce jour à notre connaissance, le rôle majeur dans les phénomènes de NETose.

Cependant, les mécanismes qui conduisent à l'activation du complexe MCM dans les neutrophiles n'est pas connue. Les mécanismes moléculaires survenant après l'activation du complexe MCM et qui conduisent à l'extrusion des fibres d'ADN plutôt qu'à leur réplication sont encore moins connus.

En résumé, la compréhension des mécanismes d'activation du complexe MCM ouvrent des perspectives pour la régulation de l'immuno-thrombose via la NETose et pourrait ouvrir la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques pour améliorer la prise en charge des patients avec une coagulation intravasculaire disséminée associée à un choc septique.

DISCUSSION

Les polynucléaires neutrophiles (PNN) sont les premières cellules de l'immunité innée à être activées lors de l'infection (Borregaard, 2010). Leur activation entraîne la mise en place de plusieurs mécanismes destinés à lutter contre les microorganismes pathogènes. Parmi ces mécanismes, la formation des *Neutrophils Extracellular Traps* (NET) est un processus majeur de la réponse inflammatoire (Brinkmann et al., 2004). En effet, les NETs ont été identifiés comme des pièges extracellulaires capables de capturer et de détruire les pathogènes. Les NETs participent également à la modulation de l'activation de la coagulation, ainsi qu'au recrutement d'autres cellules du système immunitaire (Iba et al., 2014). Ainsi par ces différentes fonctions, les NETs participent activement au processus d'immuno-thrombose.

Ces propriétés complexes des NETs soulignent à la fois leur importance dans la réponse immunitaire et le risque de dérégulation de l'immuno-thrombose, entraînant ainsi des dommages tissulaires en cas d'accumulation excessive, comme c'est le cas lors de la Coagulation Intravasculaire Disséminée (CIVD) associée au choc septique.

La CIVD du choc septique est une complication sévère et fréquente chez les patients en choc septique, étroitement liée à une augmentation de la mortalité. Afin d'améliorer le diagnostic et la prévention de cette complication, notre équipe s'est intéressée à l'étude des microvésicules cellulaires comme nouveaux potentiels biomarqueurs. L'augmentation des microvésicules (MV) circulantes CD11a est associée à la CIVD du choc septique, reflétant ainsi l'activation cellulaire précoce et persistante (Delabranche *et al.*, 2013, 2016). Notamment, les MV CD66b se révèlent être un marqueur spécifique de l'activation des neutrophiles chez les patients atteints de CIVD du choc septique, contrairement aux patients sans CIVD (Stiel *et al.*, 2016). Cette recherche de biomarqueur s'est donc ensuite concentrée sur l'étude de l'activation du polynucléaire neutrophile.

L'évaluation des modifications morphologiques des neutrophiles s'est par ailleurs avérée pertinente dans le diagnostic, le pronostic et le suivi des patients en sepsis (Zonneveld et al., 2016). La mesure de la fluorescence des neutrophiles (NEUT-SFL) est non seulement associée au choc septique (S. H. Park et al., 2015) mais également à la CIVD. Ce paramètre, couramment accessible dans les laboratoires hospitaliers, présente une augmentation significative chez les patients en CIVD, et est corrélé à des modifications cytologiques observées en microscopie, ainsi qu'à l'émission des MVs CD66b (Stiel *et al.*, 2016).

Le NEUT-SFL reflète le degré de condensation de l'ADN et pourrait témoigner du processus de NETose. Ainsi, notre équipe a montré que la CIVD du choc septique est associée à des concentrations augmentées en nucléosomes circulants et d'ADN-MPO (Delabranche *et al.*, 2017), et que les NETs peuvent être visualisés dans la circulation des patients en CIVD (Stiel *et al.*, 2019b). Ces résultats mettent ainsi en évidence la NETose au cours de la CIVD associée au choc septique.

L'objectif de ce travail de thèse a donc été d'étudier les mécanismes d'activation des polynucléaires neutrophiles au cours de la CIVD, en se concentrant notamment sur la formation des NETs. Notre recherche vise à approfondir notre compréhension des processus conduisant à l'émission des NETs, afin d'identifier des cibles thérapeutiques pour la prévention ou la modulation de l'immuno-thrombose.

L'activation des cellules immunitaires innées, dont les PNNs, débute par la reconnaissance des motifs associés aux pathogènes (PAMPs) grâce aux récepteurs de reconnaissance des pathogènes (PRR) parmi lesquels figurent les récepteurs Toll-like. Dans cette perspective, **la première partie de notre travail** a consisté en une analyse exhaustive de l'expression protéique des récepteurs Toll-likes (TLRs) à la surface des leucocytes chez des patients avec une infection bactérienne ou virale sévère.

Les TLRs, en raison de leur implication dans de nombreux phénomènes physiopathologiques, figurent parmi les récepteurs les plus étudiés. Cependant, l'analyse de l'expression des TLRs représente un défi majeur pour la recherche en immunologie. Leur fonctionnalité peut varier d'un individu à l'autre en raison de polymorphismes génétiques, et leur activation est finement régulée pour éviter une réponse inflammatoire excessive. L'analyse de l'expression des TLRs est également fortement influencée par les conditions environnementales des échantillons. L'isolement des cellules sanguines avant l'analyse des TLRs, la température de l'échantillon ainsi que l'utilisation de solution de fixation peuvent entraîner des variations d'expression. C'est pourquoi, les études précliniques sur le rôle des TLRs se sont principalement concentrées sur l'expression des gènes codant pour les TLRs.

Dans le cadre du sepsis et du choc septique, aucune étude antérieure, à notre connaissance, n'avait examiné l'expression protéique des 10 TLRs. C'est pourquoi, nous avons évalué l'expression des TLRs dans des conditions similaires aux tests de cytométrie en flux de routine,

en utilisant des tubes EDTA standards prélevés soit à l'admission du patient, soit dans les 12 heures suivant le diagnostic, et conservés à température ambiante, dans la perspective de trouver des biomarqueurs de diagnostic ou de gravité, enjeu majeur pour les cliniciens. Grâce à cette méthodologie rigoureuse, nous avons obtenu des résultats que nous pensions fiables concernant l'expression précoce des TLRs au début d'une infection bactérienne ou virale sur les leucocytes.

Les résultats de cette étude ont ainsi confirmé la potentielle place importante du TLR4 dans le choc septique et la COVID-19. En effet, nous avons observé une diminution significative de l'expression du TLR4 sur les neutrophiles de patients avec un sepsis, un choc septique ou une forme sévère de COVID-19 comparés aux témoins. Dans une moindre mesure, le CD14 était également diminué à la surface des neutrophiles des patients en choc septique. Les résultats sur le TLR4 dans le sepsis et le choc septique diffèrent d'études antérieures, certaines montrant une augmentation de son expression (Härter et al., 2004; Tansho-Nagakawa et al., 2012), tandis que d'autres n'ont mesuré aucune modification (Lenz et al., 2019; Silva et al., 2014). Nos résultats viennent renforcer l'hypothèse formulée au cours de l'étude clinique ACCESS qui corrobore que l'expression du TLR4 est dépendante de la gravité de l'infection (Tidswell et al., 2010). Dans le contexte du choc septique, la diminution du TLR4 et du CD14 peut être appuyée par des études montrant que le TLR4 est internalisé grâce au CD14 après exposition au LPS (Roy *et al.*, 2014). Cette internalisation met fin à la phase initiale où le TLR4 recrute la molécule adaptatrice MyD88 et active la voie de l'interféron de type 1 après le recrutement de la molécule TRIF (Roy *et al.*, 2014). De plus, le TLR4 endosomal interagit avec TRIF, soutenant la stimulation de NF- κ B (Brubaker et al., 2015) et initiant la dégradation lysosomal du TLR4, régulant ainsi la voie de signalisation TRIF (Ciesielska *et al.*, 2021; Husebye *et al.*, 2006; Watts, 2008). Cette régulation est également observée dans des modèles *in vivo*, où l'exposition de leucocytes humains au LPS induit une tolérance croisée à plusieurs ligands, dont le TLR4 (de Vos *et al.*, 2009). De plus, les bactéries pathogènes et commensales peuvent également utiliser ce mécanisme pour éviter l'endocytose inflammatoire en tant que stratégie d'évasion immunitaire (Tan et al., 2015).

Par les mécanismes ci-dessus décrits, le TLR4 participe à l'activation de l'inflammation. Mais il participe également à l'activation de la coagulation. En effet, l'activation du TLR4 est potentialisée par la plasmine dans les macrophages (Ward *et al.*, 2006), tandis que le TLR4

150

plaquettaire reconnaît spécifiquement le fibrinogène. Cette reconnaissance du fibrinogène par le TLR4 permet d'amplifier la réponse inflammatoire et de faciliter l'interaction entre les plaquettes et les neutrophiles (Niklaus *et al.*, 2022). Le TLR4 semble jouer un rôle essentiel dans l'immuno-thrombose associée aux infections sévères.

Comprendre les mécanismes d'activation et de régulation du TLR4 dans le contexte d'immuno-thrombose ouvre de nouvelles perspectives pour le développement de thérapies ciblées visant à moduler cette réponse excessive.

La deuxième partie de notre travail s'est focalisée sur la compréhension approfondie des mécanismes conduisant à la NETose. Pour ce faire, nous avons réalisé une analyse protéomique des PNN isolés chez des patients avec une CIVD du choc septique. Au cours de cette étude, nous avons identifié des signatures protéiques spécifiques au sein des PNN des patients présentant une CIVD, qui n'avaient pas été observées chez les patients en choc septique sans CIVD.

Parmi les 110 protéines moins abondantes dans les neutrophiles des patients en CIVD, nous en avons sélectionné quatre spécifiques (PTX3, PAD4, MMP9, LCN2), dont l'expression est significativement réduite chez les patients atteints de CIVD du choc septique par rapport à ceux sans CIVD.

La pentraxine 3 (PTX3) est une longue pentraxine exprimée par de nombreux types cellulaires en réponse à des signaux inflammatoires tels que l'IL-1 β , le TNF- α ou des agents pathogènes (Deban *et al.*, 2011). Cette protéine présente des fonctions variées, dépendant du type de tissu, de cellules et de la quantité excrétée, incluant des rôles bénéfiques tels que la défense contre les pathogènes et la régulation de l'inflammation, mais aussi des effets délétères comme l'amplification de l'inflammation et de la dysfonction endothéliale (Magrini *et al.*, 2016). La présence de PTX3 dans les granules des neutrophiles, son implication dans la dégranulation et sa possible expression sur les NETs suggèrent que une implication dans les réponses immunitaires et les processus physiopathologiques (Daigo *et al.*, 2016a; Jaillon *et al.*, 2007). Les concentrations plasmatiques de PTX3 sont associées à la gravité de la maladie, à la survie et à la réponse aux traitements chez les patients en choc septique, où une surexpression

précoce en fait un marqueur prédictif des défaillances d'organes (Caironi et al., 2017; Porte et al., 2019). De plus, PTX3 est augmentée chez les femmes à risques de prééclampsie et chez les patients atteints d'une infection aiguë à *hantavirus puumala*, où cette augmentation semble liée à la formation de thrombine et à la consommation de fibrinogène (Boij et al., 2012; Laine et al., 2014). Chez les patients atteints de CIVD, nous avons observé une diminution de la quantité protéique de PTX3 présente dans les neutrophiles, probablement en raison de sa libération dans le milieu extracellulaire. Une étude menée par Daigo *et al.* a démontré que PTX3 protège les cellules endothéliales contre la cytotoxicité induite par les histones en s'agréant avec ces derniers (Daigo et al., 2016b). D'autres études antérieures ont également montré que PTX3 augmente l'expression du facteur tissulaire, participant ainsi à la thrombogénèse (Napoleone et al., 2002). Les patients avec une CIVD associée au choc septique présentent une dysfonction endothéliale et une activation de la coagulation significativement plus importante que les patients sans CIVD (Delabranche *et al.*, 2016; Meziani *et al.*, 2010). De plus, l'expression de PTX3 est présente dans les cellules myéloïdes du sang et des poumons, ainsi que dans les cellules endothéliales pulmonaires chez des patients en COVID-19 (Brunetta et al., 2021). PTX3 s'avère être un marqueur pronostique indépendant de la mortalité à 28 jours chez les patients hospitalisés, résultant probablement d'une activation coordonnée entre les cellules myéloïdes et les cellules endothéliales microvasculaires (Mantovani & Garlanda, 2023). Par conséquent, la diminution que nous avons observée de l'expression protéique de PTX3 dans les PNNs pourrait contribuer de manière significative à la dysfonction endothéliale et à l'activation de la coagulation constatées lors de la CIVD associée au choc septique. Il resterait à mesurer l'expression de PTX3 circulant et dans les PNNs des patients en choc septique avec ou sans CIVD.

Notre étude a révélé une diminution de la concentration de la protéine arginine déiminase de type 4 (PAD4) dans les neutrophiles des patients avec une CIVD du choc septique comparé aux patients sans CIVD. PAD4 est une enzyme impliquée dans les modifications post-traductionnelles qui convertissent les résidus d'arginine en citrulline. Cette activité enzymatique de PAD4 affaiblit l'interaction entre les histones chargées positivement et l'ADN chargé négativement, entraînant ainsi un relâchement de la chromatique ainsi qu'une rupture de la membrane nucléaire. Les données cliniques concernant l'expression de PAD4 sont actuellement limitées, malgré de nombreuses données précliniques. Cependant, des études

ont montré que la concentration plasmatique en PAD4 est associée à la mortalité des patients en choc septique (Costa et al., 2018). De plus, une concentration élevée de l'histone H3 citrullinée, corrélée positivement avec la concentration de PAD4 et le score SOFA, a été observée chez les patients atteints de choc septique (Tian et al., 2021). Le rôle de la citrullination des histones médiée par PAD4 dans la libération des NETs lors d'une infection demeure encore incertain (Reis et al., 2023). L'implication de PAD4 dans les deux voies d'induction de la NETose (dépendante et indépendante de NADPH oxydase) reste encore à élucider (Guiducci et al., 2018; Schoen et al., 2022). Certaines études ont révélé que les NETs pouvaient se former en l'absence de PAD4 (Claushuis et al., 2018). McDonald *et al.* ont montré l'absence d'association entre les taux d'histones circulants, la production de NETs et les interactions NETs-plaquettes, suggérant ainsi que la coagulopathie septique pourrait être médiée par un mécanisme indépendant de PAD4 (McDonald et al., 2017). Ces résultats ont récemment été confirmés par une étude supplémentaire démontrant que certains microorganismes pathogènes induisant la formation de NETs ne nécessitent pas la protéine PAD4 (Poli & Zanoni, 2023). Au cours du choc septique associé à une CIVD, la formation de NETs est augmentée (Delabranche et al., 2017; Stiel et al., 2019b) et l'expression de PAD4 est diminuée dans les PNN, suggérant que la NETose de ces patients pourrait être indépendante de PAD4. Ces résultats soulèvent des questions intéressantes concernant le mécanisme sous-jacent de la NETose dans le contexte de la CIVD du choc septique, nécessitant d'être investigués.

PAD4 participe directement ou indirectement à la pathogénèse de nombreuses pathologies telles que le choc septique, la leucémie (G. Song et al., 2015), les maladies auto-immunes (Barnado et al., 2016), les métastases tumorales (Chang & Han, 2006) et certaines maladies cardiovasculaires (Van Avondt et al., 2019). Bien que ces pathologies ont des physiopathologies très différentes, elles partagent toutes une caractéristique commune : l'implication de la NETose (Papayannopoulos, 2018). C'est pourquoi, les inhibiteurs de PAD4 pourraient représenter des stratégies thérapeutiques intéressantes (C. Yang et al., 2021). Parmi ces inhibiteurs, la Cl-Amidine se révèle prometteur par sa capacité à inhiber la citrullination des histones et ainsi empêcher la formation des NETs (Y. Luo et al., 2006). Par exemple, la Cl-Amidine bloque la formation des NETs in-vitro sur des neutrophiles sains infectées par le SARS-CoV-2 ou sur des neutrophiles isolés de patients atteints de COVID-19

(Elliott et al., 2021). Ainsi, l'inhibition de PAD4 est un mécanisme intéressant pour la régulation de l'immuno-thrombose (Janiuk et al., 2021; Zhu et al., 2022). Cependant, malgré leur potentiel, aucun inhibiteur de PAD4 n'a encore été validé pour son utilisation clinique à ce jour.

Les résultats de notre étude ont démontré une diminution significative des protéines MMP9 et NGAL dans les neutrophiles des patients avec une CIVD induite par un choc septique. La métalloprotéinase matricielle 9 (MMP9) joue un rôle essentiel dans la protéolyse de la matrice extracellulaire et la migration des leucocytes, ce qui contribue activement aux réponses pro-inflammatoires et à la dysfonction endothéliale (Florence et al., 2017). Dans des modèles *in vivo* de choc septique, des concentrations élevées de MMP9 ont été observées dans les poumons, le foie, les reins et l'endothélium (Maitra *et al.*, 2010; Merdji *et al.*, 2021; Teng *et al.*, 2012). De plus, MMP9 est impliquée dans le recrutement des neutrophiles et sa libération est déclenchée par l'augmentation de l'expression de l'activateur du plasminogène tissulaire (tPa) (Cuadrado *et al.*, 2008; J. Song *et al.*, 2013). Quant à la protéine lipocaline LCN2/ NGAL, elle participe au transport du fer, à l'apoptose, à l'immunité innée et au développement rénal. Des concentrations élevées de NGAL ont été associées à la mortalité et aux dysfonctions d'organes chez les patients atteints en choc septique, et elles ont été corrélées à des marqueurs inflammatoires et à des molécules d'adhérence (Macdonald et al., 2017; B. Wang et al., 2017). NGAL a un effet protecteur en prévenant la dégradation protéolytique de la protéine MMP9 et en améliorant ses activités enzymatiques en formant le complexe MMP9/NGAL (DI CARLO, 2013). Cependant, la concentration plasmatique de ce complexe reste inchangée chez les patients avec une CIVD, alors que la concentration en NGAL est augmentée (In et al., 2014). En considérant la diminution d'expression de NGAL et MMP9 dans les neutrophiles des patients avec une CIVD induite par le choc septique, des questions essentielles émergent quant à leur impact sur la réponse inflammatoire et la dysfonction endothéliale caractéristiques de cette pathologie. Pour éclaircir davantage leur rôle potentiel dans le développement de la CIVD, des investigations supplémentaires, notamment l'évaluation de l'expression plasmatique par exemple en cytométrie de ces protéines sont nécessaires.

Outre ces protéines impliquées dans l'activation des neutrophiles, notre analyse protéomique a également révélé, pour la première fois à notre connaissance, une expression significativement plus importante des six protéines MCM 2 à 7 du complexe protéique appelé

le complexe *Mini Chromosome Maintenance* (MCM) ou boîte MCM dans les neutrophiles des patients en choc septique avec CIVD, par rapport aux patients sans CIVD, dès leur admission en réanimation. De plus, les protéines MCM2, MCM3, MCM4 et MCM7 ont montré une abondance plus élevée également au premier jour chez les patients en CIVD, par rapport au troisième jour. Ces résultats mettent en évidence le potentiel rôle du complexe MCM dans l'activation du neutrophile au stade précoce de la CIVD.

Le complexe MCM est une structure protéique hexamérique en forme d'anneau composée de six protéines (MCM2 à MCM7) dotées d'un domaine ATPase dans leurs séquences d'acides aminés, ainsi que d'un domaine N-terminal de liaison à l'ADN (Fletcher et al., 2003). Ces protéines jouent un rôle essentiel dans l'initiation et la régulation de la phase S de la réplication de l'ADN (Maine et al., 1984). Le complexe MCM est également impliqué dans l'élongation et le remodelage de la chromatine, permettant ainsi le déroulement adéquat de l'ADN grâce à son activité hélicase (Bochman & Schwacha, 2009). Hautement conservé chez les eucaryotes, le complexe MCM est indispensable pour la stabilité du génome. Grâce à ses fonctions essentielles, le complexe MCM a suscité un intérêt important dans la recherche, notamment dans le domaine du cancer. Les protéines MCM ont été identifiées comme des biomarqueurs dans plusieurs types de cancer (Gonzalez et al., 2005), étant associées à une prolifération cellulaire rapide et à un mauvais taux de survie dans certains cancers (Söling et al., 2005; Sun et al., 2022). Par ailleurs, nos résultats ont mis en évidence que le complexe MCM revêt une importance cruciale dans l'activation des neutrophiles. Ces cellules, issues de progéniteurs myéloïdes mûrissent dans la moelle osseuse, puis sont libérées dans la circulation sans jamais se répliquer (Borregaard, 2010). L'augmentation du complexe MCM dans les neutrophiles de patients avec une CIVD suscite un intérêt particulier.

Étant donné que le complexe MCM2-7 est impliqué dans le déroulement de la chromatine, ce complexe pourrait exercer cette même fonction pour dérouler l'ADN du polynucléaire neutrophile au cours de la NETose. L'inhibition du complexe MCM dans un modèle in-vitro de NETose a permis de vérifier cette hypothèse. Plusieurs inhibiteurs des protéines MCM sont recensés dans la littérature comme la trichostatine ou encore la ciprofloxacine (Seo & Kang, 2018) permettant notamment de bloquer l'activité hélicase de ces protéines. Néanmoins, la trichostatine ne permet qu'une réduction de la NETose et non une inhibition totale (Données non publiées) et ne participe qu'à la diminution de l'expression de la protéine MCM2. La

ciprofloxacine quand elle permet d'inhiber intégralement le complexe MCM 2-7. En effet, les travaux de Simon *et al.* ont révélé que la ciprofloxacine cible spécifiquement le complexe MCM, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives pour son utilisation à des fins expérimentales et thérapeutiques (N. Simon *et al.*, 2013). La ciprofloxacine est un antibiotique approuvé pour le traitement de certaines infections bactériennes, agit en inhibant la réplication de l'ADN bactérien en ciblant la gyrase et la topoisomérase de l'ADN bactérien. La ciprofloxacine a montré son efficacité dans l'inhibition de complexe MCM dans la recherche contre le cancer. Cette inhibition a permis une réduction de la prolifération des cellules cancéreuses des cancers du côlon, du poumon et de la prostate chez l'homme (Aranha *et al.*, 2003; Herold *et al.*, 2002; Hsu *et al.*, 2021; Kloskowski *et al.*, 2012).

Nos résultats mettent en évidence que l'inhibition du complexe MCM 2-7 par la ciprofloxacine bloque la NETose, que ce soit en réponse à des stimulations infectieuses par des bactérie *Escherichia coli* résistantes aux fluoroquinolones résistantes ou à des stimulations non-infectieuses induites par la PMA. Ces observations suggèrent que le complexe MCM est impliqué dans le phénomène de NETose indépendamment de la voie d'activation, faisant ainsi des protéines MCM des acteurs potentiellement essentiels dans l'immuno-thrombose. Par conséquent le criblage du complexe MCM pourrait se révéler intéressant pour prévenir ou traiter la CIVD induite par le choc septique, ainsi que lors de CIVD non septique ou dans des maladies associées à la NETose ou à l'immuno-thrombose, telles que les maladies auto-immunes, auto-inflammatoires ou les événements thrombotiques (Papayannopoulos, 2018).

L'immuno-thrombose et la NETose sont des mécanismes intriqués qui exercent une double fonction en renforçant à la fois la réponse immunitaire et l'activation de la coagulation, conférant ainsi des avantages pour la défense de l'hôte. Cependant, lorsque les mécanismes de régulation sont dépassés, l'immuno-thrombose et la NETose peuvent devenir néfastes, par exemple en participant la diminution de la fibrinolyse. L'élastase de l'ADN présente dans les NETs clive le plasminogène en fragments qui perdent leur capacité à générer de la plasmine, contribuant ainsi à l'hypofibrinolyse, un facteur clé dans le développement des *microthrombi* disséminés responsables d'une défaillance multiviscérale dans la CIVD induite par le choc septique (Cruz *et al.*, 2019). Nous avons montré que l'inhibition du complexe MCM 2-7 rétablit à la fois l'activité de phagocytose sans interférer avec la génération de plasmine par l'inhibition de la NETose, suggérant un effet limitant la dérégulation de l'immuno-thrombose.

En résumé, nos résultats ont mis en évidence une signature protéique spécifique des polynucléaires neutrophiles des patients atteints de choc septique avec CIVD, par rapport aux patients sans CIVD. Cette signature implique des protéines associées à la NETose, et l'inhibition du complexe hélicase MCM 2-7 bloque la NETose, confirmant ainsi l'importance de la NETose au cours de la CIVD du choc septique. Le complexe MCM permet le déroulement de l'ADN, son expression est hautement régulée. Les mécanismes sous-jacents à l'activation de l'expression de ce complexe dans les neutrophiles doivent être approfondis, tout comme les mécanismes conduisant à l'extrusion des filets d'ADN plutôt qu'à la réplication. Comprendre le mécanisme d'activation du complexe MCM pourrait être bénéfique pour la régulation de l'immuno-thrombose. Des investigations sont nécessaires pour approfondir notre compréhension de ces mécanismes afin d'explorer les possibilités de régulation de l'immuno-thrombose par le complexe MCM.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le choc septique représente la forme la plus sévère de la réponse immunitaire de l'hôte à une infection à la suite de l'invasion d'un microorganisme pathogène. La physiopathologie du choc septique se caractérise par une réaction inflammatoire systémique, amplifiée et dérégulée, orchestrée par les cellules immunitaires activées en réponse à l'infection. Cette réaction est étroitement corrélée à une activation de la coagulation. Lorsque les mécanismes régulateurs de ces réponses sont dépassés, les patients peuvent développer une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD), augmentant ainsi leur risque de mortalité.

L'immuno-thrombose, processus clé de la CIVD induite par un choc septique, associe une intense activation des cellules du système vasculaire, notamment les polynucléaires neutrophiles, à une activation systémique anormale de la coagulation. L'immuno-thrombose est un mécanisme de défense bénéfique pour l'hôte permettant de lutter contre l'infection et sa propagation. Toutefois, lors de la CIVD induite par le choc septique, ce processus peut devenir délétère pour l'organisme lorsqu'il est dérégulé.

Les polynucléaires neutrophiles sont des acteurs indispensables de la réponse immunitaire innée, ils participent à la lutte contre le pathogène notamment par l'émission de *Neutrophils Extracellular Traps* (NET) et participent au recrutement d'autres cellules immunitaires ainsi qu'à l'activation de la coagulation. L'activation du neutrophile dans le contexte de la CIVD du choc septique a été démontrée récemment par notre équipe. La libération excessive des NETs et la persistance de l'activation des polynucléaires neutrophiles participent à la dérégulation de l'immuno-thrombose.

Ainsi, mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent l'activation des polynucléaires neutrophiles, et plus particulièrement l'émission des NETs, est indispensable pour mieux comprendre l'immuno-thrombose et donc la physiopathologie de la CIVD.

Une compréhension approfondie du mécanisme d'activation des neutrophiles dans le contexte d'infections sévères débute par une meilleure connaissance de son déclenchement dès les premières étapes de l'infection. Ces cellules jouent un rôle essentiel dans la lutte contre les microorganismes pathogène et leur activation repose sur la reconnaissance des motifs associés à ces pathogènes par les récepteurs Toll-like. Notre analyse exhaustive des TLR a permis de mettre en évidence une modulation spécifique de ces récepteurs, dépendante des formes d'infections et de leur gravité. Notamment, au cours du choc septique, nous avons

observé une diminution significative de l'expression membranaire du TLR4 et de son corécepteur CD14 par rapport aux témoins.

Cette réduction de l'expression membranaire pourrait refléter un mécanisme d'endocytose, tel qu'observé *in vitro* après stimulation au LPS. L'endocytose du TLR4 permet ensuite l'activation de la voie de l'interféron 1, un mécanisme crucial dans la réponse immunitaire antibactérienne et antivirale. Cependant, pour confirmer cette endocytose chez les patients, il serait pertinent d'étudier l'expression intracytoplasmique de ces récepteurs.

Cette approche d'analyse protéique des récepteurs TLR dans le choc septique ouvre des perspectives prometteuses pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant spécifiquement les TLRs des polynucléaires neutrophiles et ainsi moduler l'activation du neutrophile dans le processus d'immunothrombose.

Pour approfondir notre compréhension de l'immunothrombose dérégulée dans le contexte du choc septique, nous avons analysé les réseaux associés aux protéines exprimées dans des neutrophiles chez des patients. Notre étude a ainsi révélé une signature protéique spécifique des neutrophiles des patients avec une CIVD induite par le choc septique contrairement aux patients sans CIVD. Les neutrophiles de ces patients ont ainsi une surabondance des protéines du complexe hélicase MCM 2-7 dès l'admission en réanimation.

De manière novatrice, nous avons ainsi mis en évidence que le complexe MCM, essentiel dans le déroulement de l'ADN lors de la réplication des cellules eucaryotes, joue un rôle inattendu dans la formation des NETs. L'inhibition du complexe MCM avec la ciprofloxacine permet de bloquer la formation des NETs *in vitro* après stimulation des neutrophiles, suggérant ainsi un lien direct entre ce complexe et le processus de NETose.

L'identification de cette interconnexion entre le complexe MCM et la NETose ouvre des perspectives prometteuses pour réguler l'immunothrombose. Plutôt que d'envisager une inhibition totale de la NETose, nous explorons la possibilité d'utiliser des inhibiteurs spécifiques du complexe MCM qui cibleraient sélectivement certaines protéines du complexe ou permettraient une diminution sélective de leur expression, sans restreindre totalement leurs fonctions. De plus, nous prévoyons d'évaluer l'association de ces inhibiteurs en synergie avec d'autres molécules afin de mettre en évidence d'autres voies impliquées dans la NETose.

En outre, le complexe MCM est étroitement régulé pour garantir le bon déroulement du cycle cellulaire. En phase S, le complexe MCM est activé pour permettre la réplication de l'ADN, alors qu'en phase F1, il est désactivé pour une réplication prématurée. La phosphorylation des sous-unités du complexe MCM joue un rôle clé dans son activation et sa désactivation. Explorer ces mécanismes de régulations pourrait permettre de mieux comprendre l'activation du complexe MCM dans les neutrophiles et son implication dans la NETose.

Pour évaluer l'impact de ces approches thérapeutiques potentielles, notre équipe maîtrise un modèle animal de choc septique ainsi qu'un modèle de souris pro-thrombotiques. Ces modèles in vivo nous permettront de tester les molécules ciblant le complexe MCM et d'observer leur effet sur la NETose.

De plus, il serait intéressant d'accompagner ce travail d'une analyse transcriptomique des polynucléaires neutrophiles. Une analyse conjointe des profils génomiques et protéomiques serait innovante et permettrait de mettre en évidence des signatures spécifiques associées aux formes les plus sévères de choc septique. Par ailleurs, une analyse cinétique des profils d'expression à J3 et à J7 serait pertinente pour mieux comprendre les mécanismes activés lors de la CIVD du choc septique.

En conclusion, cette étude apporte de nouvelles perspectives sur la persistance de la formation des NETs lors du processus d'immuno-thrombose conduisant à une coagulopathie lors du sepsis, notamment lors du choc septique. Les découvertes mettent en évidence l'implication du complexe MCM dans la NETose et ouvrent de nouvelles perspectives pour cibler ce mécanisme. En tant que nouvelle cible potentielle dans la formation des NETs, la régulation du complexe MCM pourrait permettre de moduler l'immuno-thrombose dans le contexte de la CIVD du choc septique, ainsi que dans d'autres pathologies où l'immuno-thrombose a un rôle central.

REFERENCES

- Abi Abdallah, D. S., Lin, C., Ball, C. J., King, M. R., Duhamel, G. E., & Denkers, E. Y. (2012). Toxoplasma gondii triggers release of human and mouse neutrophil extracellular traps. *Infection and Immunity*, 80(2), 768–777. <https://doi.org/10.1128/IAI.05730-11>
- Aboudounya, M. M., & Heads, R. J. (2021). COVID-19 and Toll-Like Receptor 4 (TLR4): SARS-CoV-2 May Bind and Activate TLR4 to Increase ACE2 Expression, Facilitating Entry and Causing Hyperinflammation. *Mediators of Inflammation*, 2021, 8874339. <https://doi.org/10.1155/2021/8874339>
- Abrams, S. T., Zhang, N., Manson, J., Liu, T., Dart, C., Baluwa, F., Wang, S. S., Brohi, K., Kipar, A., Yu, W., Wang, G., & Toh, C.-H. (2013). Circulating histones are mediators of trauma-associated lung injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 187(2), 160–169. <https://doi.org/10.1164/rccm.201206-1037OC>
- Alessi, M. C. (n.d.). *Le système fibrinolytique: Activation et inhibition. Ses modifications en cas de CIVD.*
- Allingstrup, M., Wetterslev, J., Ravn, F. B., Møller, A. M., & Afshari, A. (2016). Antithrombin III for critically ill patients: A systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis. *Intensive Care Medicine*, 42(4), 505–520. <https://doi.org/10.1007/s00134-016-4225-7>
- Al-Samkari, H., Karp Leaf, R. S., Dzik, W. H., Carlson, J. C. T., Fogerty, A. E., Waheed, A., Goodarzi, K., Bendapudi, P. K., Bornikova, L., Gupta, S., Leaf, D. E., Kuter, D. J., & Rosovsky, R. P. (2020). COVID-19 and coagulation: Bleeding and thrombotic manifestations of SARS-CoV-2 infection. *Blood*, 136(4), 489–500. <https://doi.org/10.1182/blood.2020006520>
- Alves-Filho, J. C., Freitas, A., Spiller, F., Souto, F. O., & Cunha, F. Q. (2008). The role of neutrophils in severe sepsis. *Shock Augusta Ga*, 30 Suppl 1, 3–9. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e3181818466>
- Ammollo, C. T., Semeraro, F., Xu, J., Esmon, N. L., & Esmon, C. T. (2011). Extracellular histones increase plasma thrombin generation by impairing thrombomodulin-dependent protein

C activation. *J. Thromb. Haemost. JTH*, 9, 1795–1803. <https://doi.org/10.1111/j.1538->

Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G. L., Metzler, K. D., & Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil function: From mechanisms to disease. *Annual Review of Immunology*, 30, 459–489. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074942>

Anglés-Cano, E. (1994). Overview on fibrinolysis: Plasminogen activation pathways on fibrin and cell surfaces. *Chemistry and Physics of Lipids*, 67–68, 353–362. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(94\)90157-0](https://doi.org/10.1016/0009-3084(94)90157-0)

Angus, D. C., & Poll, T. (2013). Severe sepsis and septic shock. *N. Engl. J. Med*, 369. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1312359>

Apellániz, D., Pereira-Prado, V., Tapia-Repetto, G., Bologna-Molina, R., Apellániz, D., Pereira-Prado, V., Tapia-Repetto, G., & Bologna-Molina, R. (2018). MCM2-7 complex: A review. *Odontoestomatología*, 20(32), 4–11. <https://doi.org/10.22592/ode2018n32a2>

Aranha, O., Grignon, R., Fernandes, N., McDonnell, T. J., Wood, D. P., & Sarkar, F. H. (2003). Suppression of human prostate cancer cell growth by ciprofloxacin is associated with cell cycle arrest and apoptosis. *International Journal of Oncology*, 22(4), 787–794.

Araújo, C. V., Campbell, C., Gonçalves-de-Albuquerque, C. F., Molinaro, R., Cody, M. J., Yost, C. C., Bozza, P. T., Zimmerman, G. A., Weyrich, A. S., Castro-Faria-Neto, H. C., & Silva, A. R. (2016). A PPAR γ AGONIST ENHANCES BACTERIAL CLEARANCE THROUGH NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAP FORMATION AND IMPROVES SURVIVAL IN SEPSIS. *Shock*, 45(4), 393–403. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000520>

Astiz, M. E., DeGent, G. E., Lin, R. Y., & Rackow, E. C. (1995). Microvascular function and rheologic changes in hyperdynamic sepsis. *Crit. Care Med*, 23, 265–271.

Barnado, A., Crofford, L. J., & Oates, J. C. (2016). At the Bedside: Neutrophil extracellular traps (NETs) as targets for biomarkers and therapies in autoimmune diseases. *Journal of Leukocyte Biology*, 99(2), 265–278. <https://doi.org/10.1189/jlb.5BT0615-234R>

Barranco-Medina, S., Pozzi, N., Vogt, A. D., & Di Cera, E. (2013). Histone H4 promotes prothrombin autoactivation. *J. Biol. Chem*, 288, 35749–35757.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.509786>

Bawadekar, M., Shim, D., Johnson, C. J., Warner, T. F., Rebernick, R., Damgaard, D., Nielsen, C. H., Pruijn, G. J. M., Nett, J. E., & Shelef, M. A. (2017). Peptidylarginine deiminase 2 is required for tumor necrosis factor alpha-induced citrullination and arthritis, but not neutrophil extracellular trap formation. *Journal of Autoimmunity*, *80*, 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.01.006>

Bedard, K., & Krause, K.-H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev*, *87*, 245–313. <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2005>

Bell, S. P., & Dutta, A. (2002). DNA Replication in Eukaryotic Cells. *Annual Review of Biochemistry*, *71*(1), 333–374. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135425>

Bjerknes, R., Vindenes, H., Pitkänen, J., Ninnemann, J., Laerum, O. D., & Abyholm, F. (1989). Altered polymorphonuclear neutrophilic granulocyte functions in patients with large burns. *J. Trauma*, *29*, 847–855.

Blanco-Melo, D., Nilsson-Payant, B. E., Liu, W.-C., Uhl, S., Hoagland, D., Møller, R., Jordan, T. X., Oishi, K., Panis, M., Sachs, D., Wang, T. T., Schwartz, R. E., Lim, J. K., Albrecht, R. A., & tenOever, B. R. (2020). Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell*, *181*(5), 1036-1045.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.026>

Blum, J. S., Wearsch, P. A., & Cresswell, P. (2013). Pathways of Antigen Processing. *Annual Review of Immunology*, *31*(1), 443–473. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095910>

Bochman, M. L., & Schwacha, A. (2009). The Mcm Complex: Unwinding the Mechanism of a Replicative Helicase. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *73*(4), 652–683. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-09>

Boij, R., Svensson, J., Nilsson-Ekdahl, K., Sandholm, K., Lindahl, T. L., Palonek, E., Garle, M., Berg, G., Ernerudh, J., Jenmalm, M., & Matthiesen, L. (2012). Biomarkers of Coagulation, Inflammation, and Angiogenesis are Independently Associated with Preeclampsia. *American Journal of Reproductive Immunology*, *68*(3), 258–270. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2012.01158.x>

Boilard, E., Nigrovic, P. A., Larabee, K., Watts, G. F. M., Coblyn, J. S., Weinblatt, M. E., Massarotti, E. M., Remold-O'Donnell, E., Farndale, R. W., Ware, J., & Lee, D. M. (2010). Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science (New York, N.Y.)*, *327*(5965), 580–583. <https://doi.org/10.1126/science.1181928>

Boisramé-Helms, J., Delabranche, X., Toti, F., & Meziani, F. (2013). Nature et signification des microparticules dans le sepsis. *Réanimation*, *22*(S2), 343–351. <https://doi.org/10.1007/s13546-012-0537-y>

Boisramé-Helms, J., Kremer, H., Schini-Kerth, V., & Meziani, F. (2013). Endothelial dysfunction in sepsis. *Current Vascular Pharmacology*, *11*(2), 150–160.

Bonaventura, A., Vecchié, A., Dagna, L., Martinod, K., Dixon, D. L., Van Tassell, B. W., Dentali, F., Montecucco, F., Massberg, S., Levi, M., & Abbate, A. (2021). Endothelial dysfunction and immunothrombosis as key pathogenic mechanisms in COVID-19. *Nature Reviews Immunology*, *21*(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00536-9>

Borgel, D., & Vieillard-Baron, A. (2011). Activated protein C, a protein at the crossroads between coagulation and inflammation. *Med. Sci. MS*, *27*, 501–507. <https://doi.org/10.1051/medsci/2011275015>

Borregaard, N. (2010). Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity*, *33*, 657–670. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.11.011>

Bortolotti, D., Gentili, V., Rizzo, S., Schiuma, G., Beltrami, S., Strazzabosco, G., Fernandez, M., Caccuri, F., Caruso, A., & Rizzo, R. (2021). TLR3 and TLR7 RNA Sensor Activation during SARS-CoV-2 Infection. *Microorganisms*, *9*(9), 1820. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091820>

Bosmann, M., & Ward, P. A. (2013). The inflammatory response in sepsis. *Trends in Immunology*, *34*(3), 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.09.004>

Boson, B., Legros, V., Zhou, B., Siret, E., Mathieu, C., Cosset, F.-L., Lavillette, D., & Denolly, S. (2021). The SARS-CoV-2 envelope and membrane proteins modulate maturation and retention of the spike protein, allowing assembly of virus-like particles. *The Journal of Biological Chemistry*, *296*, 100111. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.016175>

Branzk, N., Lubojemska, A., Hardison, S. E., Wang, Q., Gutierrez, M. G., Brown, G. D., & Papayannopoulos, V. (2014). Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nature Immunology*, *15*(11), Article 11. <https://doi.org/10.1038/ni.2987>

Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y., & Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, *303*, 1532–1535. <https://doi.org/10.1126/science.1092385>

Brinkmann, V., Zychlinsky, A., Bronkhorst, A. J., Aucamp, J., & Pretorius, P. J. (2012). Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin? *J. Cell Biol*, *198*, 773–783. <https://doi.org/10.1083/jcb.201203170>

Brown, K. A., Brain, S. D., Pearson, J. D., Edgeworth, J. D., Lewis, S. M., & Treacher, D. F. (2006). Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet Lond. Engl*, *368*, 157–169. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69005-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69005-3)

Brubaker, S. W., Bonham, K. S., Zanoni, I., & Kagan, J. C. (2015). Innate immune pattern recognition: A cell biological perspective. *Annual Review of Immunology*, *33*, 257–290. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112240>

Brunetta, E., Folci, M., Bottazzi, B., De Santis, M., Gritti, G., Protti, A., Mapelli, S. N., Bonovas, S., Piovani, D., Leone, R., My, I., Zanon, V., Spata, G., Bacci, M., Supino, D., Carnevale, S., Sironi, M., Davoudian, S., Peano, C., ... Mantovani, A. (2021). Macrophage expression and prognostic significance of the long pentraxin PTX3 in COVID-19. *Nature Immunology*, *22*(1), 19–24. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-00832-x>

Burgener, S. S., & Schroder, K. (2020). Neutrophil Extracellular Traps in Host Defense. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *12*(7), a037028. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a037028>

Cabrera-Garcia, D., Bekdash, R., Abbott, G. W., Yazawa, M., & Harrison, N. L. (2021). The envelope protein of SARS-CoV-2 increases intra-Golgi pH and forms a cation channel that is regulated by pH. *The Journal of Physiology*, *599*(11), 2851–2868. <https://doi.org/10.1113/JP281037>

Caironi, P., Masson, S., Mauri, T., Bottazzi, B., Leone, R., Magnoli, M., Barlera, S., Mamprin,

- F., Fedele, A., Mantovani, A., Tognoni, G., Pesenti, A., Gattinoni, L., & Latini, R. (2017). Pentraxin-3 in patients with severe sepsis or shock: The ALBIOS trial. *European Journal of Clinical Investigation*, 47(1), 73–83. <https://doi.org/10.1111/eci.12704>
- Cauwels, A. (2007). Nitric oxide in shock. *Kidney Int*, 72, 557–565. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002340>
- Chang, X., & Han, J. (2006). Expression of peptidylarginine deiminase type 4 (PAD4) in various tumors. *Molecular Carcinogenesis*, 45(3), 183–196. <https://doi.org/10.1002/mc.20169>
- Chen, F., Zou, L., Williams, B., & Chao, W. (2021). Targeting Toll-Like Receptors in Sepsis—From Bench to Clinical Trials. *Antioxidants & Redox Signaling*. <https://doi.org/10.1089/ars.2021.0005>
- Chen, G., Wu, D., Guo, W., Cao, Y., Huang, D., Wang, H., Wang, T., Zhang, X., Chen, H., Yu, H., Zhang, X., Zhang, M., Wu, S., Song, J., Chen, T., Han, M., Li, S., Luo, X., Zhao, J., & Ning, Q. (2020). Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *The Journal of Clinical Investigation*, 130(5), 2620–2629. <https://doi.org/10.1172/JCI137244>
- Chen, K. W., Monteleone, M., Boucher, D., Sollberger, G., Ramnath, D., Condon, N. D., von Pein, J. B., Broz, P., Sweet, M. J., & Schroder, K. (2018). Noncanonical inflammasome signaling elicits gasdermin D-dependent neutrophil extracellular traps. *Science Immunology*, 3(26), eaar6676. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aar6676>
- Chishti, A. D., Shenton, B. K., Kirby, J. A., & Baudouin, S. V. (2004). Neutrophil chemotaxis and receptor expression in clinical septic shock. *Intensive Care Med*, 30, 605–611. <https://doi.org/10.1007/s00134-004-2175-y>
- Chiswick, E. L., Mella, J. R., Bernardo, J., & Remick, D. G. (2015). *Acute-Phase Deaths from Murine Polymicrobial Sepsis Are Characterized by Innate Immune Suppression Rather Than*.
- Choudhury, A., & Mukherjee, S. (2020). In silico studies on the comparative characterization of the interactions of SARS-CoV-2 spike glycoprotein with ACE-2 receptor homologs and human TLRs. *Journal of Medical Virology*, 92(10), 2105–2113. <https://doi.org/10.1002/jmv.25987>

Chousterman, B. G., Swirski, F. K., & Weber, G. F. (2017). Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Seminars in Immunopathology*, *39*(5), 517–528. <https://doi.org/10.1007/s00281-017-0639-8>

Ciesielska, A., Matyjek, M., & Kwiatkowska, K. (2021). TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *78*(4), 1233–1261. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03656-y>

Clark, S. R., Ma, A. C., Tavener, S. A., McDonald, B., Goodarzi, Z., Kelly, M. M., Patel, K. D., Chakrabarti, S., McAvoy, E., Sinclair, G. D., Keys, E. M., Allen-Vercoe, E., Devinney, R., Doig, C. J., Green, F. H. Y., & Kubes, P. (2007). Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat. Med*, *13*, 463–469. <https://doi.org/10.1038/nm1565>

Claushuis, T. A. M., Donk, L. E. H. van der, Luitse, A. L., Veen, H. A. van, Wel, N. N. van der, Vught, L. A. van, Roelofs, J. J. T. H., Boer, O. J. de, Lankelma, J. M., Boon, L., Vos, A. F. de, Veer, C. van 't, & Poll, T. van der. (2018). Role of Peptidylarginine Deiminase 4 in Neutrophil Extracellular Trap Formation and Host Defense during *Klebsiella pneumoniae*–Induced Pneumonia-Derived Sepsis. *The Journal of Immunology*, *201*(4), 1241–1252. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800314>

Clinical Spectrum. (n.d.). COVID-19 Treatment Guidelines. Retrieved July 27, 2023, from <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/overview/clinical-spectrum/>

Cohen, J. (2002). The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, *420*(6917), 885–891. <https://doi.org/10.1038/nature01326>

Costa, N. A., Gut, A. L., Azevedo, P. S., Polegato, B. F., Magalhães, E. S., Ishikawa, L. L. W., Bruder, R. de C. S., Silva, E. A. da, Gonçalves, R. B., Tanni, S. E., Rogero, M. M., Norde, M. M., Cunha, N. B., Zornoff, L. A. M., de Paiva, S. A. R., & Minicucci, M. F. (2018). Peptidylarginine deiminase 4 concentration, but not PADI4 polymorphisms, is associated with ICU mortality in septic shock patients. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *22*(10), 4732–4737. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13717>

Cowland, J. B., & Borregaard, N. (2016). Granulopoiesis and granules of human neutrophils. *Immunological Reviews*, *273*(1), 11–28. <https://doi.org/10.1111/imr.12440>

Cox, J., Hein, M. Y., Lubner, C. A., Paron, I., Nagaraj, N., & Mann, M. (2014). Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, *13*(9), 2513–2526. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.031591>

Cruz, D. B. da, Helms, J., Aquino, L. R., Stiel, L., Cougourdan, L., Broussard, C., Chafey, P., Riès-Kautt, M., Meziani, F., Toti, F., Gaussem, P., & Anglés-Cano, E. (2019). DNA-bound elastase of neutrophil extracellular traps degrades plasminogen, reduces plasmin formation, and decreases fibrinolysis: Proof of concept in septic shock plasma. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *33*(12), 14270–14280. <https://doi.org/10.1096/fj.201901363RRR>

Cuadrado, E., Ortega, L., Hernández-Guillamon, M., Penalba, A., Fernández-Cadenas, I., Rosell, A., & Montaner, J. (2008). Tissue plasminogen activator (t-PA) promotes neutrophil degranulation and MMP-9 release. *Journal of Leukocyte Biology*, *84*(1), 207–214. <https://doi.org/10.1189/jlb.0907606>

Cubuk, J., Alston, J. J., Incicco, J. J., Singh, S., Stuchell-Breton, M. D., Ward, M. D., Zimmerman, M. I., Vithani, N., Griffith, D., Wagoner, J. A., Bowman, G. R., Hall, K. B., Soranno, A., & Holehouse, A. S. (2021). The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein is dynamic, disordered, and phase separates with RNA. *Nature Communications*, *12*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21953-3>

Daigo, K., Takamatsu, Y., & Hamakubo, T. (2016a). The Protective Effect against Extracellular Histones Afforded by Long-Pentraxin PTX3 as a Regulator of NETs. *Frontiers in Immunology*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00344>

Daigo, K., Takamatsu, Y., & Hamakubo, T. (2016b). The Protective Effect against Extracellular Histones Afforded by Long-Pentraxin PTX3 as a Regulator of NETs. *Frontiers in Immunology*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00344>

Daix, T., Guerin, E., Tavernier, E., Mercier, E., Gissot, V., Hérault, O., Mira, J.-P., Dumas, F., Chapuis, N., Guitton, C., Béné, M. C., Quenot, J.-P., Tissier, C., Guy, J., Piton, G., Roggy, A., Muller, G., Legac, É., de Prost, N., ... Ouattara, A. (2018). Multicentric Standardized Flow Cytometry Routine Assessment of Patients With Sepsis to Predict Clinical Worsening. *Chest*, *154*(3), 617–627. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2018.03.058>

Dalli, J., Norling, L. V., Renshaw, D., Cooper, D., Leung, K.-Y., & Perretti, M. (2008). Annexin 1 mediates the rapid anti-inflammatory effects of neutrophil-derived microparticles. *Blood*, *112*, 2512–2519. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-140533>

Danese, S., de la Motte, C., Reyes, B. M. R., Sans, M., Levine, A. D., & Fiocchi, C. (2004). Cutting edge: T cells trigger CD40-dependent platelet activation and granular RANTES release: a novel pathway for immune response amplification. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *172*(4), 2011–2015. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.4.2011>

Das, M., Prasad, S. B., Yadav, S. S., Govardhan, H. B., Pandey, L. K., Singh, S., Pradhan, S., & Narayan, G. (2013). Over Expression of Minichromosome Maintenance Genes is Clinically Correlated to Cervical Carcinogenesis. *PLOS ONE*, *8*(7), e69607. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069607>

de Vasconcelos, N. M., Van Opdenbosch, N., Van Gorp, H., Parthoens, E., & Lamkanfi, M. (2019). Single-cell analysis of pyroptosis dynamics reveals conserved GSDMD-mediated subcellular events that precede plasma membrane rupture. *Cell Death & Differentiation*, *26*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0106-7>

de Vos, A. F., Pater, J. M., van den Pangaart, P. S., de Kruif, M. D., van 't Veer, C., & van der Poll, T. (2009). In Vivo Lipopolysaccharide Exposure of Human Blood Leukocytes Induces Cross-Tolerance to Multiple TLR Ligands. *The Journal of Immunology*, *183*(1), 533–542. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802189>

Deban, L., Jaillon, S., Garlanda, C., Bottazzi, B., & Mantovani, A. (2011). Pentraxins in innate immunity: Lessons from PTX3. *Cell and Tissue Research*, *343*(1), 237–249. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1018-0>

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. (2013). Microparticles are new biomarkers of septic shock-induced disseminated intravascular coagulopathy. *Intensive Care Medicine*, *39*(10), 1695–1703. <https://doi.org/10.1007/s00134-013-2993-x>

Delabranche, X., Quenot, J.-P., Lavigne, T., Mercier, E., François, B., Severac, F., Grunebaum, L., Mehdi, M., Zobairi, F., Toti, F., Meziani, F., Boisramé-Helms, J., & Network, on behalf to the C. R. in I. C. and S. (2016). Early Detection of Disseminated Intravascular Coagulation
172

During Septic Shock: A Multicenter Prospective Study. *Critical Care Medicine*, 44(10), e930. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000001836>

Delabranche, X., Stiel, L., Severac, F., Galoisy, A.-C., Mauvieux, L., Zobairi, F., Lavigne, T., Toti, F., Anglès-Cano, E., Meziani, F., & Boisramé-Helms, J. (2017). Evidence of Netosis in Septic Shock-Induced Disseminated Intravascular Coagulation. *Shock (Augusta, Ga.)*, 47(3), 313–317. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000719>

Delano, M. J., & Ward, P. A. (2016). Sepsis-induced immune dysfunction: Can immune therapies reduce mortality? *Journal of Clinical Investigation*, 126(1), 23–31. <https://doi.org/10.1172/JCI82224>

Demaret, J., Monneret, G., & Venet, F. (2014). Altérations phénotypiques et fonctionnelles des polynucléaires neutrophiles au cours des états septiques sévères. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2014(462), 65–71. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(14\)72480-3](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(14)72480-3)

Demaret, J., Venet, F., Friggeri, A., Cazalis, M.-A., Plassais, J., Jallades, L., Malcus, C., Poitevin-Later, F., Textoris, J., Lepape, A., & Monneret, G. (2015). Marked alterations of neutrophil functions during sepsis-induced immunosuppression. *Journal of Leukocyte Biology*, 98(6), 1081–1090. <https://doi.org/10.1189/jlb.4A0415-168RR>

Demers, M., Krause, D. S., Schatzberg, D., Martinod, K., Voorhees, J. R., Fuchs, T. A., Scadden, D. T., & Wagner, D. D. (2012). Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(32), 13076–13081. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200419109>

Dhainaut, J.-F., Laterre, P.-F., Janes, J. M., Bernard, G. R., Artigas, A., Bakker, J., Riess, H., Basson, B. R., Charpentier, J., Utterback, B. G., Vincent, J.-L., & Recombinant Human Activated Protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis (PROWESS) Study Group. (2003). Drotrecogin alfa (activated) in the treatment of severe sepsis patients with multiple-organ dysfunction: Data from the PROWESS trial. *Intensive Care Medicine*, 29(6), 894–903. <https://doi.org/10.1007/s00134-003-1731-1>

DI CARLO, A. (2013). Evaluation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and their complex MMP-9/NGAL in sera and urine of patients with kidney tumors. *Oncology Letters*, 5(5), 1677–1681. 173

<https://doi.org/10.3892/ol.2013.1252>

Ding, A. H., Nathan, C. F., & Stuehr, D. J. (1988). Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol. Baltim. Md*, *141*, 2407–2412.

Ding, J., Wang, K., Liu, W., She, Y., Sun, Q., Shi, J., Sun, H., Wang, D.-C., & Shao, F. (2016). Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. *Nature*, *535*(7610), 111–116. <https://doi.org/10.1038/nature18590>

Drifte, G., Dunn-Siegrist, I., Tissières, P., & Pugin, J. (2013). Innate Immune Functions of Immature Neutrophils in Patients With Sepsis and Severe Systemic Inflammatory Response Syndrome*: *Critical Care Medicine*, *41*(3), 820–832. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318274647d>

Duan, L., & Mukherjee, E. (2016). Janeway’s Immunobiology, Ninth Edition. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, *89*(3), 424–425.

Dupuis, C., Bouadma, L., Ruckly, S., Perozziello, A., Van-Gysel, D., Mageau, A., Mourvillier, B., de Montmollin, E., Bailly, S., Papin, G., Sinnah, F., Vinclair, C., Abid, S., Sonnevile, R., & Timsit, J.-F. (2020). Sepsis and septic shock in France: Incidences, outcomes and costs of care. *Annals of Intensive Care*, *10*(1), 145. <https://doi.org/10.1186/s13613-020-00760-x>

Ehrentraut, S., Lohner, R., Schwederski, M., Ehrentraut, H., Boehm, O., Noga, S., Langhoff, P., Baumgarten, G., Meyer, R., & Knuefermann, P. (2011). In vivo Toll-like receptor 4 antagonism restores cardiac function during endotoxemia. *Shock (Augusta, Ga.)*, *36*(6), 613–620. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e318235805f>

Elliott, W., Guda, M. R., Asuthkar, S., Teluguakula, N., Prasad, D. V. R., Tsung, A. J., & Velpula, K. K. (2021). PAD Inhibitors as a Potential Treatment for SARS-CoV-2 Immunothrombosis. *Biomedicines*, *9*(12), 1867. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9121867>

El-Nawawy, A. A., Elshinawy, M. I., Khater, D. M., Moustafa, A. A., Hassanein, N. M., Wali, Y. A., & Nazir, H. F. (2021). Outcome of Early Hemostatic Intervention in Children With Sepsis and Nonovert Disseminated Intravascular Coagulation Admitted to PICU: A Randomized Controlled Trial. *Pediatric Critical Care Medicine*, *22*(3), e168.

<https://doi.org/10.1097/PCC.0000000000002578>

Engelmann, B., & Massberg, S. (2013a). Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, *13*(1), 34–45. <https://doi.org/10.1038/nri3345>

Engelmann, B., & Massberg, S. (2013b). Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, *13*, 34–45. <https://doi.org/10.1038/nri3345>

Evans, L., Rhodes, A., Alhazzani, W., Antonelli, M., Coopersmith, C. M., French, C., Machado, F. R., McIntyre, L., Ostermann, M., Prescott, H. C., Schorr, C., Simpson, S., Wiersinga, W. J., Alshamsi, F., Angus, D. C., Arabi, Y., Azevedo, L., Beale, R., Beilman, G., ... Levy, M. (2021). Surviving sepsis campaign: International guidelines for management of sepsis and septic shock 2021. *Intensive Care Medicine*, *47*(11), 1181–1247. <https://doi.org/10.1007/s00134-021-06506-y>

Faix, J. D. (2013). Biomarkers of sepsis. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci*, *50*, 23–36. <https://doi.org/10.3109/10408363.2013.764490>

Farkas, J. D. (2020). The complete blood count to diagnose septic shock. *Journal of Thoracic Disease*, *12*(Suppl 1). <https://doi.org/10.21037/jtd.2019.12.63>

Farley, K., Stolley, J. M., Zhao, P., Cooley, J., & Remold-O'Donnell, E. (2012). A serpinB1 regulatory mechanism is essential for restricting neutrophil extracellular trap generation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *189*(9), 4574–4581. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201167>

Feng, Y., Zou, L., Zhang, M., Li, Y., Chen, C., & Chao, W. (2011). MyD88 and Trif signaling play distinct roles in cardiac dysfunction and mortality during endotoxin shock and polymicrobial sepsis. *Anesthesiology*, *115*(3), 555–567. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e31822a22f7>

Fialkow, L., Fochesatto Filho, L., Bozzetti, M. C., Milani, A. R., Rodrigues Filho, E. M., Ladniuk, R. M., Pierozan, P., de Moura, R. M., Prolla, J. C., Vachon, E., & Downey, G. P. (2006). Neutrophil apoptosis: A marker of disease severity in sepsis and sepsis-induced acute respiratory distress syndrome. *Critical Care*, *10*(6), R155. <https://doi.org/10.1186/cc5090>

Fletcher, R. J., Bishop, B. E., Leon, R. P., Sclafani, R. A., Ogata, C. M., & Chen, X. S. (2003).

The structure and function of MCM from archaeal *M. Thermoautotrophicum*. *Nature Structural & Molecular Biology*, 10(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/nsb893>

Florence, J. M., Krupa, A., Booshehri, L. M., Allen, T. C., & Kurdowska, A. K. (2017). Metalloproteinase-9 contributes to endothelial dysfunction in atherosclerosis via protease activated receptor-1. *PloS One*, 12(2), e0171427. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171427>

Fourrier, F., Jourdain, M., Tournois, A., Caron, C., Goudemand, J., & Chopin, C. (1995). Coagulation inhibitor substitution during sepsis. *Intensive Care Medicine*, 21 Suppl 2, S264-268. <https://doi.org/10.1007/BF01740765>

Fox, E. D., Heffernan, D. S., Cioffi, W. G., & Reichner, J. S. (2013). Neutrophils from critically ill septic patients mediate profound loss of endothelial barrier integrity. *Crit. Care Lond. Engl*, 17, 226. <https://doi.org/10.1186/cc13049>

François, B., Fiancette, M., Helms, J., Mercier, E., Lascarrou, J.-B., Kayanoki, T., Tanaka, K., Fineberg, D., Vincent, J.-L., & Wittebole, X. (2021). Efficacy and safety of human soluble thrombomodulin (ART-123) for treatment of patients in France with sepsis-associated coagulopathy: Post hoc analysis of SCARLET. *Annals of Intensive Care*, 11(1), 53. <https://doi.org/10.1186/s13613-021-00842-4>

Frick, I.-M., Björck, L., & Herwald, H. (2007). The dual role of the contact system in bacterial infectious disease. *Thromb. Haemost.*, 98, 497–502.

Fuchs, T. A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V., & Zychlinsky, A. (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of Cell Biology*, 176(2), 231–241. <https://doi.org/10.1083/jcb.200606027>

Fuchs, T. A., Brill, A., Duerschmied, D., Schatzberg, D., Monestier, M., Myers, D. D., Wroblewski, S. K., Wakefield, T. W., Hartwig, J. H., & Wagner, D. D. (2010). Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 107, 15880–15885. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005743107>

Futosi, K., Fodor, S., & Mócsai, A. (2013). Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *International Immunopharmacology*, 17(3), 638–650. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2013.06.034>

- Gando, S., Levi, M., & Toh, C.-H. (2016). Disseminated intravascular coagulation. *Nat. Rev. Dis. Primer*, 2, 16037. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.37>
- Gay, N. J., Gangloff, M., & Weber, A. N. R. (2006). Toll-like receptors as molecular switches. *Nature Reviews Immunology*, 6(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/nri1916>
- Giaginis, C., Vgenopoulou, S., Vielh, P., & Theocharis, S. (2010). MCM proteins as diagnostic and prognostic tumor markers in the clinical setting. *Histology and Histopathology*, 25(3), 351–370. <https://doi.org/10.14670/HH-25.351>
- Giebler, R., Schmidt, U., Koch, S., Peters, J., & Scherer, R. (1999). Combined antithrombin III and C1-esterase inhibitor treatment decreases intravascular fibrin deposition and attenuates cardiorespiratory impairment in rabbits exposed to Escherichia coli endotoxin. *Critical Care Medicine*, 27(3), 597–604. <https://doi.org/10.1097/00003246-199903000-00042>
- Goldmann, O., & Medina, E. (2012). The expanding world of extracellular traps: Not only neutrophils but much more. *Frontiers in Immunology*, 3, 420. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00420>
- Gonzalez, M. A., Tachibana, K. K., Laskey, R. A., & Coleman, N. (2005). Control of DNA replication and its potential clinical exploitation. *Nature Reviews. Cancer*, 5(2), 135–141. <https://doi.org/10.1038/nrc1548>
- González-Amaro, R., & Sánchez-Madrid, F. (1999). Cell adhesion molecules: Selectins and integrins. *Crit. Rev. Immunol*, 19, 389–429.
- Gößwein, S., Lindemann, A., Mahajan, A., Maueröder, C., Martini, E., Patankar, J., Schett, G., Becker, C., Wirtz, S., Naumann-Bartsch, N., Bianchi, M. E., Greer, P. A., Lochnit, G., Herrmann, M., Neurath, M. F., & Leppkes, M. (2019). Citrullination Licenses Calpain to Decondense Nuclei in Neutrophil Extracellular Trap Formation. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.02481>
- Gould, T. J., Lysov, Z., & Liaw, P. C. (2015). Extracellular DNA and histones: Double-edged swords in immunothrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, 13 Suppl 1, S82–91. <https://doi.org/10.1111/jth.12977>
- Gould, T. J., Vu, T. T., Swystun, L. L., Dwivedi, D. J., Mai, S. H. C., Weitz, J. I., & Liaw, P.

C. (2014). Neutrophil extracellular traps promote thrombin generation through platelet-dependent and platelet-independent mechanisms. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 34(9), 1977–1984. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304114>

Grieshaber-Bouyer, R., & Nigrovic, P. A. (2019). Neutrophil Heterogeneity as Therapeutic Opportunity in Immune-Mediated Disease. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.00346>

Grimaldi, D., & Pène, F. (2012). Immunodépression induite par le sepsis: Réalité clinique et données expérimentales. *Réanimation*, 21(3), 325–333. <https://doi.org/10.1007/s13546-012-0462-4>

Guha, M., & Mackman, N. (2001). LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell. Signal*, 13, 85–94.

Guiducci, E., Lemberg, C., Küng, N., Schraner, E., Theocharides, A. P. A., & LeibundGut-Landmann, S. (2018). Candida albicans-Induced NETosis Is Independent of Peptidylarginine Deiminase 4. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.01573>

Gupta, S., & Kaplan, M. J. (2016). The role of neutrophils and NETosis in autoimmune and renal diseases. *Nature Reviews. Nephrology*, 12(7), 402–413. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2016.71>

Hagiwara, A., Tanaka, N., Uemura, T., Matsuda, W., & Kimura, A. (2016). Can recombinant human thrombomodulin increase survival among patients with severe septic-induced disseminated intravascular coagulation: A single-centre, open-label, randomised controlled trial. *BMJ Open*, 6(12), e012850. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2016-012850>

Hampson, P., Dinsdale, R. J., Wearn, C. M., Bamford, A. L., Bishop, J. R. B., Hazeldine, J., Moiemien, N. S., Harrison, P., & Lord, J. M. (2017). Neutrophil Dysfunction, Immature Granulocytes, and Cell-free DNA are Early Biomarkers of Sepsis in Burn-injured Patients: A Prospective Observational Cohort Study. *Annals of Surgery*, 265(6), 1241. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000001807>

Hartemink, K. J., Hack, C. E., & Groeneveld, A. B. J. (2010). Relation between coagulation/fibrinolysis and lactate in the course of human septic shock. *J. Clin. Pathol*, 63,

1021–1026. <https://doi.org/10.1136/jcp.2010.079707>

Härter, L., Mica, L., Stocker, R., Trentz, O., & Keel, M. (2004). Increased expression of toll-like receptor-2 and -4 on leukocytes from patients with sepsis. *Shock (Augusta, Ga.)*, 22(5), 403–409. <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000142256.23382.5d>

Hayakawa, M., Katabami, K., Wada, T., Sugano, M., Hoshino, H., Sawamura, A., & Gando, S. (2010). SIVELESTAT (SELECTIVE NEUTROPHIL ELASTASE INHIBITOR) IMPROVES THE MORTALITY RATE OF SEPSIS ASSOCIATED WITH BOTH ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME AND DISSEMINATED INTRAVASCULAR COAGULATION PATIENTS. *Shock*, 33(1), 14. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e3181aa95c4>

Helms, J., Clere-Jehl, R., Bianchini, E., Le Borgne, P., Burban, M., Zobairi, F., Diehl, J.-L., Grunebaum, L., Toti, F., Meziani, F., Borgel, D., Hidalgo, A., Chang, J., Jang, J.-E., Peired, A. J., Chiang, E. Y., Frenette, P. S., Hirose, T., Hamaguchi, S., ... Shimazu, T. (2017). Thrombomodulin favors leukocyte microvesicle fibrinolytic activity, reduces NETosis and prevents septic shock-induced coagulopathy in rats. *Ann. Intensive Care*, 7, 118. <https://doi.org/10.1186/s13613-017-0340-z>

Helms, J., Iba, T., Connors, J. M., Gando, S., Levi, M., Meziani, F., & Levy, J. H. (2023). How to manage coagulopathies in critically ill patients. *Intensive Care Medicine*, 49(3), 273–290. <https://doi.org/10.1007/s00134-023-06980-6>

Helms, J., Poissy, J., Dequin, P.-F., & Timsit, J.-F. (2023). Treatment of immunothrombosis dysregulation: High-dose corticosteroids is not the good option. *Annals of Intensive Care*, 13, 58. <https://doi.org/10.1186/s13613-023-01158-1>

Helms, J., Severac, F., Merdji, H., Clere-Jehl, R., François, B., Mercier, E., Quenot, J.-P., Meziani, F., & for the CRICS TRIGGERSEP Group (Clinical Research in Intensive Care and Sepsis Trial Group for Global Evaluation and Research in Sepsis). (2020). Performances of disseminated intravascular coagulation scoring systems in septic shock patients. *Annals of Intensive Care*, 10(1), 92. <https://doi.org/10.1186/s13613-020-00704-5>

Helms, J., Severac, F., Merdji, H., Schenck, M., Clere-Jehl, R., Baldacini, M., Ohana, M., Grunebaum, L., Castelain, V., Anglés-Cano, E., Sattler, L., & Meziani, F. (2021). Higher anticoagulation targets and risk of thrombotic events in severe COVID-19 patients: Bi-center

cohort study. *Annals of Intensive Care*, 11, 14. <https://doi.org/10.1186/s13613-021-00809-5>

Helms, J., Tschirhart, M., Curtiaud, A., & Sattler, L. (2022). Coagulopathie et sepsis. *Médecine Intensive Réanimation*, 31(4), Article 4. <https://doi.org/10.37051/mir-00122>

Herold, C., Ocker, M., Ganslmayer, M., Gerauer, H., Hahn, E. G., & Schuppan, D. (2002). Ciprofloxacin induces apoptosis and inhibits proliferation of human colorectal carcinoma cells. *British Journal of Cancer*, 86(3), 443–448. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600079>

Hidalgo, P., Valdés, M., & González, R. A. (2021). Molecular biology of coronaviruses: An overview of virus-host interactions and pathogenesis. *Boletín Médico Del Hospital Infantil de México*, 78(1), 4924. <https://doi.org/10.24875/BMHIM.20000249>

Hinsbergh, V. W. M., & Venugopal, A. (2012). Endothelium—Role in regulation of coagulation and inflammation. *Semin. Immunopathol*, 34, 93–106. <https://doi.org/10.1007/s00281-011-0285-5>

Hirsch, J. G. (1958). Bactericidal action of histone. *The Journal of Experimental Medicine*, 108(6), 925–944. <https://doi.org/10.1084/jem.108.6.925>

Hoppenbrouwers, T., Autar, A. S. A., Sultan, A. R., Abraham, T. E., Cappellen, W. A. van, Houtsmuller, A. B., Wamel, W. J. B. van, Beusekom, H. M. M. van, Neck, J. W. van, & Maat, M. P. M. de. (2017). In vitro induction of NETosis: Comprehensive live imaging comparison and systematic review. *PLOS ONE*, 12, 0176472. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176472>

Horowitz, A., Menice, C. B., Laporte, R., & Morgan, K. G. (1996). Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol. Rev*, 76, 967–1003.

Hotchkiss, R. S., Moldawer, L. L., Opal, S. M., Reinhart, K., Turnbull, I. R., & Vincent, J.-L. (2016). Sepsis and septic shock. *Nature Reviews. Disease Primers*, 2, 16045. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.45>

Hotchkiss, R. S., Monneret, G., & Payen, D. (2013). Sepsis-induced immunosuppression: From cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nature Reviews. Immunology*, 13(12), 862–874. <https://doi.org/10.1038/nri3552>

Hsu, E.-C., Shen, M., Aslan, M., Liu, S., Kumar, M., Garcia-Marques, F., Nguyen, H. M.,
180

- Nolley, R., Pitteri, S. J., Corey, E., Brooks, J. D., & Stoyanova, T. (2021). MCM2-7 complex is a novel druggable target for neuroendocrine prostate cancer. *Scientific Reports*, *11*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92552-x>
- Hu, B., Huang, S., & Yin, L. (2021). The cytokine storm and COVID-19. *Journal of Medical Virology*, *93*(1), 250–256. <https://doi.org/10.1002/jmv.26232>
- Husebye, H., Halaas, Ø., Stenmark, H., Tunheim, G., Sandanger, Ø., Bogen, B., Brech, A., Latz, E., & Espevik, T. (2006). Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. *The EMBO Journal*, *25*(4), 683–692. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600991>
- Iba, T., Di Nisio, M., Thachil, J., Wada, H., Asakura, H., Sato, K., Kitamura, N., & Saitoh, D. (2016). Revision of the Japanese Association for Acute Medicine (JAAM) disseminated intravascular coagulation (DIC) diagnostic criteria using antithrombin activity. *Crit. Care Lond. Engl*, *20*, 287. <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1468-1>
- Iba, T., Helms, J., Connors, J. M., & Levy, J. H. (2023). The pathophysiology, diagnosis, and management of sepsis-associated disseminated intravascular coagulation. *Journal of Intensive Care*, *11*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1186/s40560-023-00672-5>
- Iba, T., Levy, J. H., Yamakawa, K., Thachil, J., Warkentin, T. E., Levi, M., & The Scientific and Standardization Committee on DIC of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. (2019). Proposal of a two-step process for the diagnosis of sepsis-induced disseminated intravascular coagulation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, *17*(8), 1265–1268. <https://doi.org/10.1111/jth.14482>
- Iba, T., Miki, T., Hashiguchi, N., Tabe, Y., & Nagaoka, I. (2014). Is the neutrophil a “prima donna” in the procoagulant process during sepsis? *Crit. Care Lond. Engl*, *18*, 230. <https://doi.org/10.1186/cc13983>
- Imai, Y., Kuba, K., Neely, G. G., Yaghubian-Malhami, R., Perkmann, T., van Loo, G., Ermolaeva, M., Veldhuizen, R., Leung, Y. H. C., Wang, H., Liu, H., Sun, Y., Pasparakis, M., Kopf, M., Mech, C., Bavari, S., Peiris, J. S. M., Slutsky, A. S., Akira, S., ... Penninger, J. M. (2008). Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury. *Cell*, *133*(2), 235–249. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.043>

In, J. W., Kim, J.-E., Jeong, J. S., Song, S. H., & Kim, H. K. (2014). Diagnostic and prognostic significance of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in disseminated intravascular coagulation. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, *430*, 145–149. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.01.022>

Inwald, D. P., McDowall, A., Peters, M. J., Callard, R. E., & Klein, N. J. (2003). CD40 is constitutively expressed on platelets and provides a novel mechanism for platelet activation. *Circulation Research*, *92*(9), 1041–1048. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000070111.98158.6C>

Ito, T., & Maruyama, I. (2011). Thrombomodulin: Protectorate God of the vasculature in thrombosis and inflammation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, *9*, 168–173. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04319.x>

Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature Immunology*, *16*(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/ni.3123>

Jaillon, S., Peri, G., Delneste, Y., Frémaux, I., Doni, A., Moalli, F., Garlanda, C., Romani, L., Gascan, H., Bellocchio, S., Bozza, S., Cassatella, M. A., Jeannin, P., & Mantovani, A. (2007). The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps. *The Journal of Experimental Medicine*, *204*(4), 793–804. <https://doi.org/10.1084/jem.20061301>

Janiuk, K., Jabłońska, E., & Garley, M. (2021). Significance of NETs Formation in COVID-19. *Cells*, *10*(1), 151. <https://doi.org/10.3390/cells10010151>

Jarczak, D., Kluge, S., & Nierhaus, A. (2021). Sepsis—Pathophysiology and Therapeutic Concepts. *Frontiers in Medicine*, *8*, 628302. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.628302>

Jung, H. E., & Lee, H. K. (2021). Current Understanding of the Innate Control of Toll-like Receptors in Response to SARS-CoV-2 Infection. *Viruses*, *13*(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/v13112132>

Kadri, S. S., Rhee, C., Strich, J. R., Morales, M. K., Hohmann, S., Menchaca, J., Suffredini, A. F., Danner, R. L., & Klompas, M. (2017). Estimating Ten-Year Trends in Septic Shock Incidence and Mortality in United States Academic Medical Centers Using Clinical Data. *Chest*, *151*(2), 278–285. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2016.07.010>

Karlsson, S., Varpula, M., Ruokonen, E., Pettilä, V., Parviainen, I., Ala-Kokko, T. I., Kolho, E., & Rintala, E. M. (2007). Incidence, treatment, and outcome of severe sepsis in ICU-treated adults in Finland: The Finnsepsis study. *Intensive Care Medicine*, *33*(3), 435–443. <https://doi.org/10.1007/s00134-006-0504-z>

Kaufmann, I., Hoelzl, A., Schliephake, F., Hummel, T., Chouker, A., Peter, K., & Thiel, M. (2006). POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTE DYSFUNCTION SYNDROME IN PATIENTS WITH INCREASING SEPSIS SEVERITY. *Shock*, *26*(3), 254. <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000223131.64512.7a>

Kawasaki, T., & Kawai, T. (2014). Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Frontiers in Immunology*, *5*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2014.00461>

Kenny, E. F., Herzig, A., Krüger, R., Muth, A., Mondal, S., Thompson, P. R., Brinkmann, V., Bernuth, H. von, & Zychlinsky, A. (2017). Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. *ELife*, *6*, e24437. <https://doi.org/10.7554/eLife.24437>

Kloskowski, T., Gurtowska, N., Olkowska, J., Nowak, J. M., Adamowicz, J., Tworkiewicz, J., Dębski, R., Grzanka, A., & Drewa, T. (2012). Ciprofloxacin is a potential topoisomerase II inhibitor for the treatment of NSCLC. *International Journal of Oncology*, *41*(6), 1943–1949. <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1653>

Kolaczowska, E., Jenne, C. N., Surewaard, B. G. J., Thanabalasuriar, A., Lee, W.-Y., Sanz, M.-J., Mowen, K., Opdenakker, G., & Kubes, P. (2015). Molecular mechanisms of NET formation and degradation revealed by intravital imaging in the liver vasculature. *Nat. Commun*, *6*, 6673. <https://doi.org/10.1038/ncomms7673>

Komissarov, A. A., Florova, G., & Idell, S. (2011). Effects of Extracellular DNA on Plasminogen Activation and Fibrinolysis. *J. Biol. Chem*, *286*, 41949. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.301218>

Kruger, P., Saffarzadeh, M., Weber, A. N. R., Rieber, N., Radsak, M., von Bernuth, H., Benarafa, C., Roos, D., Skokowa, J., & Hartl, D. (2015). Neutrophils: Between Host Defence, Immune Modulation, and Tissue Injury. *PLoS Pathogens*, *11*(3), e1004651. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004651>

Krüger-Genge, A., Blocki, A., Franke, R.-P., & Jung, F. (2019). Vascular Endothelial Cell

Biology: An Update. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4411. <https://doi.org/10.3390/ijms20184411>

Kyriazopoulou, E., Poulakou, G., & Giamarellos-Bourboulis, E. J. (2021). Biomarkers in sepsis: Can they help improve patient outcome? *Current Opinion in Infectious Diseases*, 34(2), 126. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000707>

Laine, O. K., Koskela, S. M., Outinen, T. K., Joutsu-Korhonen, L., Huhtala, H., Vaheri, A., Hurme, M. A., Jylhävä, J., Mäkelä, S. M., & Mustonen, J. T. (2014). Plasma pentraxin-3 and coagulation and fibrinolysis variables during acute Puumala hantavirus infection and associated thrombocytopenia. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 25(6), 612. <https://doi.org/10.1097/MBC.0000000000000117>

Lamers, M. M., & Haagmans, B. L. (2022). SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 20(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00713-0>

Lane, D. A., Philippou, H., & Huntington, J. A. (2005). Directing thrombin. *Blood*, 106, 2605–2612. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-04-1710>

Lenz, M., Draxler, D. F., Zhang, C., Kassem, M., Kastl, S. P., Niessner, A., Huber, K., Wojta, J., Heinz, G., Speidl, W. S., & Krychtiuk, K. A. (2019). Toll like receptor 2 and 9 expression on circulating neutrophils is associated with increased mortality in critically ill patients. *Shock (Augusta, Ga.)*. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001467>

Leshner, M., Wang, S., Lewis, C., Zheng, H., Chen, X. A., Santy, L., & Wang, Y. (2012). PAD4 mediated histone hypercitrullination induces heterochromatin decondensation and chromatin unfolding to form neutrophil extracellular trap-like structures. *Front. Immunol*, 3, 307. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00307>

Levi, M. (2010). The coagulant response in sepsis and inflammation. *Hämostaseologie*, 30, 10–12, 14–16.

Levi, M., & van der Poll, T. (2013). Endothelial injury in sepsis. *Intensive Care Medicine*, 39(10), 1839–1842. <https://doi.org/10.1007/s00134-013-3054-1>

Ley, K., Hoffman, H. M., Kubes, P., Cassatella, M. A., Zychlinsky, A., Hedrick, C. C., & Catz, S. D. (2018). Neutrophils: New insights and open questions. *Science Immunology*, 3(30),

eaat4579. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aat4579>

Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I., & Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: The leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology*, 7(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/nri2156>

Li, H., Liu, L., Zhang, D., Xu, J., Dai, H., Tang, N., Su, X., & Cao, B. (2020). SARS-CoV-2 and viral sepsis: Observations and hypotheses. *Lancet (London, England)*, 395(10235), 1517–1520. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30920-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30920-X)

Li, P., Li, M., Lindberg, M. R., Kennett, M. J., Xiong, N., & Wang, Y. (2010). PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(9), 1853–1862. <https://doi.org/10.1084/jem.20100239>

Li, R. H. L., & Tablin, F. (2018). A Comparative Review of Neutrophil Extracellular Traps in Sepsis. *Frontiers in Veterinary Science*, 5. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2018.00291>

Li, Y.-H., Kuo, C.-H., Shi, G.-Y., & Wu, H.-L. (2012). The role of thrombomodulin lectin-like domain in inflammation. *Journal of Biomedical Science*, 19(1), 34. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-19-34>

Lippi, G., & Plebani, M. (2020). Laboratory abnormalities in patients with COVID-2019 infection. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 58(7), 1131–1134. <https://doi.org/10.1515/cclm-2020-0198>

Lippi, G., Plebani, M., & Henry, B. M. (2020). Thrombocytopenia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infections: A meta-analysis. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 506, 145–148. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.03.022>

Liu, C., Oveissi, S., Downs, R., Kirby, J., Nedeva, C., Puthalakath, H., Faou, P., Duan, M., & Chen, W. (2019). Semiquantitative Proteomics Enables Mapping of Murine Neutrophil Dynamics following Lethal Influenza Virus Infection. *J. Immunol. Baltim. Md.* <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900337>

Liu, X., Zhang, Z., Ruan, J., Pan, Y., Magupalli, V. G., Wu, H., & Lieberman, J. (2016).

Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature*, 535(7610), 153–158. <https://doi.org/10.1038/nature18629>

Lorente, L., Martín, M. M., Varo, N., Borreguero-León, J. M., Solé-Violán, J., Blanquer, J., Labarta, L., Díaz, C., Jiménez, A., Pastor, E., Belmonte, F., Orbe, J., Rodríguez, J. A., Gómez-Melini, E., Ferrer-Agüero, J. M., Ferreres, J., Llimiñana, M. C., & Páramo, J. A. (2011). Association between serum soluble CD40 ligand levels and mortality in patients with severe sepsis. *Crit. Care Lond. Engl*, 15, 97. <https://doi.org/10.1186/cc10104>

Lorenz, E., Mira, J. P., Frees, K. L., & Schwartz, D. A. (2002). Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch. Intern. Med*, 162, 1028–1032.

Lu, T., Kobayashi, S., Quinn, M., & DeLeo, F. (2012). A NET Outcome. *Frontiers in Immunology*, 3. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2012.00365>

Luo, D., Szaba, F. M., Kummer, L. W., Plow, E. F., Mackman, N., Gailani, D., & Smiley, S. T. (2011). Protective roles for fibrin, tissue factor, plasminogen activator inhibitor-1, and thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, but not factor XI, during defense against the gram-negative bacterium *Yersinia enterocolitica*. *J. Immunol. Baltim. Md*, 187, 1866–1876. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101094>

Luo, Y., Arita, K., Bhatia, M., Knuckley, B., Lee, Y.-H., Stallcup, M. R., Sato, M., & Thompson, P. R. (2006). Inhibitors and Inactivators of Protein Arginine Deiminase 4: Functional and Structural Characterization,. *Biochemistry*, 45(39), 11727–11736. <https://doi.org/10.1021/bi061180d>

Lynn, M., Rossignol, D. P., Wheeler, J. L., Kao, R. J., Perdomo, C. A., Noveck, R., Vargas, R., D'Angelo, T., Gotzkowsky, S., & McMahon, F. G. (2003). Blocking of responses to endotoxin by E5564 in healthy volunteers with experimental endotoxemia. *The Journal of Infectious Diseases*, 187(4), 631–639. <https://doi.org/10.1086/367990>

Macdonald, S. P. J., Bosio, E., Neil, C., Arendts, G., Burrows, S., Smart, L., Brown, S. G. A., & Fatovich, D. M. (2017). Resistin and NGAL are associated with inflammatory response, endothelial activation and clinical outcomes in sepsis. *Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et Al.]*, 66(7), 611–619. <https://doi.org/10.1007/s00011-017-1043-5>

Magrini, E., Mantovani, A., & Garlanda, C. (2016). The Dual Complexity of PTX3 in Health and Disease: A Balancing Act? *Trends in Molecular Medicine*, 22(6), 497–510. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.04.007>

Mai, S. H. C., Khan, M., Dwivedi, D. J., Ross, C. A., Zhou, J., Gould, T. J., Gross, P. L., Weitz, J. I., Fox-Robichaud, A. E., & Liaw, P. C. (2015). Delayed but not Early Treatment with DNase Reduces Organ Damage and Improves Outcome in a Murine Model of Sepsis. *Canadian Critical Care Translational Biology Group*, 44, 166–172. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000396>

Maine, G. T., Sinha, P., & Tye, B. K. (1984). Mutants of *S. cerevisiae* defective in the maintenance of minichromosomes. *Genetics*, 106(3), 365–385. <https://doi.org/10.1093/genetics/106.3.365>

Maitra, S. R., Jacob, A., Zhou, M., & Wang, P. (2010). Modulation of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in sepsis. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 3(3), 180–185.

Malone, R. W., Tisdall, P., Fremont-Smith, P., Liu, Y., Huang, X.-P., White, K. M., Miorin, L., Moreno, E., Alon, A., Delaforge, E., Hennecker, C. D., Wang, G., Pottel, J., Blair, R. V., Roy, C. J., Smith, N., Hall, J. M., Tomera, K. M., Shapiro, G., ... Ricke, D. O. (2021). COVID-19: Famotidine, Histamine, Mast Cells, and Mechanisms. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 633680. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.633680>

Mantovani, A., & Garlanda, C. (2023). Humoral Innate Immunity and Acute-Phase Proteins. *New England Journal of Medicine*, 388(5), 439–452. <https://doi.org/10.1056/NEJMra2206346>

Manz, M. G., & Boettcher, S. (2014). Emergency granulopoiesis. *Nature Reviews. Immunology*, 14(5), 302–314. <https://doi.org/10.1038/nri3660>

Mare, T. A., Treacher, D. F., Shankar-Hari, M., Beale, R., Lewis, S. M., Chambers, D. J., & Brown, K. A. (2015). The diagnostic and prognostic significance of monitoring blood levels of immature neutrophils in patients with systemic inflammation. *Crit. Care Lond. Engl*, 19, 57. <https://doi.org/10.1186/s13054-015-0778-z>

Marin-Esteban, V., Turbica, I., Dufour, G., Semiramoth, N., Gleizes, A., Gorges, R., Beau, I., Servin, A. L., Lievin-Le Moal, V., Sandré, C., & Chollet-Martin, S. (2012). Afa/Dr Diffusely

Adhering *Escherichia coli* Strain C1845 Induces Neutrophil Extracellular Traps That Kill Bacteria and Damage Human Enterocyte-Like Cells. *Infection and Immunity*, 80(5), 1891–1899. <https://doi.org/10.1128/IAI.00050-12>

Martinod, K., Demers, M., Fuchs, T. A., Wong, S. L., Brill, A., Gallant, M., Hu, J., Wang, Y., & Wagner, D. D. (2013). Neutrophil histone modification by peptidylarginine deiminase 4 is critical for deep vein thrombosis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(21), 8674–8679. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301059110>

Martinod, K., Witsch, T., Farley, K., Gallant, M., Remold-O'Donnell, E., & Wagner, D. D. (2016). Neutrophil elastase-deficient mice form neutrophil extracellular traps in an experimental model of deep vein thrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, 14(3), 551–558. <https://doi.org/10.1111/jth.13239>

Martins, P. S., Brunialti, M. K. C., Martos, L. S. W., Machado, F. R., Assunção, M. S., Blecher, S., & Salomao, R. (2008). Expression of cell surface receptors and oxidative metabolism modulation in the clinical continuum of sepsis. *Critical Care (London, England)*, 12(1), R25. <https://doi.org/10.1186/cc6801>

Martins, P. S., Kallas, E. G., Neto, M. C., Dalboni, M. A., Blecher, S., & Salomão, R. (2003). Upregulation of reactive oxygen species generation and phagocytosis, and increased apoptosis in human neutrophils during severe sepsis and septic shock. *Shock Augusta Ga*, 20, 208–212. <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000079425.52617.db>

Massberg, S., Grahl, L., Bruehl, M.-L., Manukyan, D., Pfeiler, S., Goosmann, C., Brinkmann, V., Lorenz, M., Bidzhekov, K., Khandagale, A. B., Konrad, I., Kennerknecht, E., Reges, K., Holdenrieder, S., Braun, S., Reinhardt, C., Spannagl, M., Preissner, K. T., & Engelmann, B. (2010). Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat. Med.*, 16, 887–896. <https://doi.org/10.1038/nm.2184>

Matheson, N. J., & Lehner, P. J. (2020). How does SARS-CoV-2 cause COVID-19? *Science*, 369(6503), 510–511. <https://doi.org/10.1126/science.abc6156>

Maugeri, N., Brambilla, M., Camera, M., Carbone, A., Tremoli, E., Donati, M. B., Gaetano, G., & Cerletti, C. (2006). Human polymorphonuclear leukocytes produce and express functional tissue factor upon stimulation. *J. Thromb. Haemost. JTH*, 4, 1323–1330. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.01968.x>

Mause, S. F., Hundelshausen, P., Zerneck, A., Koenen, R. R., & Weber, C. (2005). Platelet microparticles: A transcellular delivery system for RANTES promoting monocyte recruitment on endothelium. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*, 25, 1512–1518. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000170133.43608.37>

McDonald, B., Davis, R. P., Kim, S.-J., Tse, M., Esmon, C. T., Kolaczkowska, E., & Jenne, C. N. (2017). Platelets and neutrophil extracellular traps collaborate to promote intravascular coagulation during sepsis in mice. *Blood*, 129(10), 1357–1367. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-09-741298>

McDonald, B., Urrutia, R., Yipp, B. G., Jenne, C. N., & Kubes, P. (2012). Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. *Cell Host & Microbe*, 12(3), 324–333. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.06.011>

Merdji, H., Schini-Kerth, V., Meziani, F., & Toti, F. (2021). Long-term cardiovascular complications following sepsis: Is senescence the missing link? *Annals of Intensive Care*, 11(1), 166. <https://doi.org/10.1186/s13613-021-00937-y>

Metzler, K. D., Fuchs, T. A., Nauseef, W. M., Reumaux, D., Roesler, J., Schulze, I., Wahn, V., Papayannopoulos, V., & Zychlinsky, A. (2011). Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: Implications for innate immunity. *Blood*, 117(3), 953–959. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-06-290171>

Metzler, K. D., Goosmann, C., Lubojemska, A., Zychlinsky, A., Papayannopoulos, V., Meziani, F., Delabranche, X., Asfar, P., & Toti, F. (2014). A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis. *Cell Rep*, 8, 883–896. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.06.044>

Meyers, S., Crescente, M., Verhamme, P., & Martinod, K. (2022). *Staphylococcus aureus* and Neutrophil Extracellular Traps: The Master Manipulator Meets Its Match in Immunothrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 42(3), 261–276. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.121.316930>

Meziani, F., Delabranche, X., Asfar, P., & Toti, F. (2010). Bench-to-bedside review: Circulating microparticles - a new player in sepsis? *Critical Care*, 14(5), 236. <https://doi.org/10.1186/cc9231>

Meziani, F., Gando, S., & Vincent, J.-L. (2017a). Should all patients with sepsis receive anticoagulation? Yes. *Intensive Care Med*, *43*, 452–454. <https://doi.org/10.1007/s00134-016->

Meziani, F., Gando, S., & Vincent, J.-L. (2017b). Should all patients with sepsis receive anticoagulation? Yes. *Intensive Care Medicine*, *43*(3), 452–454. <https://doi.org/10.1007/s00134-016-4621-z>

Mishra, H. K., Ma, J., & Walcheck, B. (2017). Ectodomain Shedding by ADAM17: Its Role in Neutrophil Recruitment and the Impairment of This Process during Sepsis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *7*, 138. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00138>

Miyoshi, S., Ito, R., Katayama, H., Dote, K., Aibiki, M., Hamada, H., Okura, T., & Higaki, J. (2014). Combination therapy with sivelestat and recombinant human soluble thrombomodulin for ARDS and DIC patients. *Drug Design, Development and Therapy*, 1211. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S68030>

Mogensen, T. H. (2009). Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. *Clinical Microbiology Reviews*, *22*(2), 240–273. <https://doi.org/10.1128/CMR.00046-08>

Monteleone, M., Stanley, A. C., Chen, K. W., Brown, D. L., Bezbradica, J. S., von Pein, J. B., Holley, C. L., Boucher, D., Shakespear, M. R., Kapetanovic, R., Rolfes, V., Sweet, M. J., Stow, J. L., & Schroder, K. (2018). Interleukin-1 β Maturation Triggers Its Relocation to the Plasma Membrane for Gasdermin-D-Dependent and -Independent Secretion. *Cell Reports*, *24*(6), 1425–1433. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.07.027>

Morris, A. C., Brittan, M., Wilkinson, T. S., McAuley, D. F., Antonelli, J., McCulloch, C., Barr, L. C., McDonald, N. A., Dhaliwal, K., Jones, R. O., Mackellar, A., Haslett, C., Hay, A. W., Swann, D. G., Anderson, N., Laurenson, I. F., Davidson, D. J., Rossi, A. G., Walsh, T. S., & Simpson, A. J. (2011). C5a-mediated neutrophil dysfunction is RhoA-dependent and predicts infection in critically ill patients. *Blood*, *117*, 5178–5188. <https://doi.org/10.1182/blood-2010->

Mortaza, S., Martinez, M. C., Baron-Menguy, C., Burbán, M., Bourdonnaye, M., Fizanne, L., Pierrot, M., Calès, 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. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181a00629>

Moyer, S. E., Lewis, P. W., & Botchan, M. R. (2006). Isolation of the Cdc45/Mcm2-7/GINS (CMG) complex, a candidate for the eukaryotic DNA replication fork helicase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(27), 10236–10241. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602400103>

Mukherjee, R., Bhattacharya, A., Bojkova, D., Mehdipour, A. R., Shin, D., Khan, K. S., Hei-Yin Cheung, H., Wong, K.-B., Ng, W.-L., Cinatl, J., Geurink, P. P., van der Heden van Noort, G. J., Rajalingam, K., Ciesek, S., Hummer, G., & Dikic, I. (2021). Famotidine inhibits toll-like receptor 3-mediated inflammatory signaling in SARS-CoV-2 infection. *The Journal of Biological Chemistry*, *297*(2), 100925. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100925>

Mukherjee, R., Kanti Barman, P., Kumar Thatoi, P., Tripathy, R., Kumar Das, B., & Ravindran, B. (2015). Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus. *Scientific Reports*, *5*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/srep13886>

Muller Kobold, A. C., Tulleken, J. E., Zijlstra, J. G., Sluiter, W., Hermans, J., Kallenberg, C. G., & Tervaert, J. W. (2000). Leukocyte activation in sepsis; correlations with disease state and mortality. *Intensive Care Medicine*, *26*(7), 883–892. <https://doi.org/10.1007/s001340051277>

Napoleone, E., Di Santo, A., Bastone, A., Peri, G., Mantovani, A., de Gaetano, G., Donati, M. B., & Lorenzet, R. (2002). Long Pentraxin PTX3 Upregulates Tissue Factor Expression in Human Endothelial Cells: A Novel Link Between Vascular Inflammation and Clotting Activation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *22*(5), 782–787. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000012282.39306.64>

Nauseef, W. M. (2007). How human neutrophils kill and degrade microbes: An integrated view. *Immunol. Rev*, *219*, 88–102. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2007.00550.x>

Navarini, A. A., Lang, K. S., Verschoor, A., Recher, M., Zinkernagel, A. S., Nizet, V., Odermatt, B., Hengartner, H., & Zinkernagel, R. M. (2009). Innate immune-induced depletion of bone marrow neutrophils aggravates systemic bacterial infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, *106*, 7107–7112. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901162106>

Nedeva, C. (2021). Inflammation and Cell Death of the Innate and Adaptive Immune System during Sepsis. *Biomolecules*, *11*(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/biom11071011>

Nedeva, C., Menassa, J., & Puthalakath, H. (2019). Sepsis: Inflammation Is a Necessary Evil. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2019.00108>

Neeli, I., & Radic, M. (2013). Opposition between PKC isoforms regulates histone deimination and neutrophil extracellular chromatin release. *Frontiers in Immunology*, 4, 38. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00038>

Nemati, S., Holder, A., Razmi, F., Stanley, M. D., Clifford, G. D., & Buchman, T. G. (2018). An Interpretable Machine Learning Model for Accurate Prediction of Sepsis in the ICU. *Critical Care Medicine*, 46(4), 547–553. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000002936>

Németh, T., Sperandio, M., & Mócsai, A. (2020). Neutrophils as emerging therapeutic targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, 19(4), 253–275. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0054-z>

Neubert, E., Meyer, D., Rocca, F., Günay, G., Kwaczala-Tessmann, A., Grandke, J., Senger-Sander, S., Geisler, C., Egner, A., Schön, M. P., Erpenbeck, L., & Kruss, S. (2018). Chromatin swelling drives neutrophil extracellular trap release. *Nature Communications*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06263-5>

Neuman, B. W., Kiss, G., Kunding, A. H., Bhella, D., Baksh, M. F., Connelly, S., Droese, B., Klaus, J. P., Makino, S., Sawicki, S. G., Siddell, S. G., Stamou, D. G., Wilson, I. A., Kuhn, P., & Buchmeier, M. J. (2011). A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. *Journal of Structural Biology*, 174(1), 11–22. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.11.021>

Ng, L. G., Ostuni, R., & Hidalgo, A. (2019). Heterogeneity of neutrophils. *Nature Reviews Immunology*, 19(4), 255–265. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0141-8>

Niklaus, M., Klingler, P., Weber, K., Koessler, A., Kuhn, S., Boeck, M., Kobsar, A., & Koessler, J. (2022). Platelet Toll-Like-Receptor-2 and -4 Mediate Different Immune-Related Responses to Bacterial Ligands. *TH Open: Companion Journal to Thrombosis and Haemostasis*, 6(3), e156–e167. <https://doi.org/10.1055/a-1827-7365>

Nolan, S., Dixon, R., Norman, K., Hellewell, P., & Ridger, V. (2008). Nitric oxide regulates neutrophil migration through microparticle formation. *Am. J. Pathol*, 172, 265–273. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070069>

Opal, S. M., Laterre, P.-F., Francois, B., LaRosa, S. P., Angus, D. C., Mira, J.-P., Wittebole, X., Dugernier, T., Perrotin, D., Tidswell, M., Jauregui, L., Krell, K., Pachel, J., Takahashi, T., Peckelsen, C., Cordasco, E., Chang, C.-S., Oeyen, S., Aikawa, N., ... ACCESS Study Group, for the. (2013). Effect of Eritoran, an Antagonist of MD2-TLR4, on Mortality in Patients With Severe Sepsis: The ACCESS Randomized Trial. *JAMA*, 309(11), 1154. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.2194>

Paludan, S. R., Pradeu, T., Masters, S. L., & Mogensen, T. H. (2021). Constitutive immune mechanisms: Mediators of host defence and immune regulation. *Nature Reviews Immunology*, 21(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0391-5>

Pandey, S., Kawai, T., & Akira, S. (2014). Microbial sensing by Toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(1), a016246. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016246>

Papayannopoulos, V. (2018). Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nature Reviews Immunology*, 18(2), 134–147. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.105>

Papayannopoulos, V., Metzler, K. D., Hakkim, A., & Zychlinsky, A. (2010). Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *The Journal of Cell Biology*, 191(3), 677–691. <https://doi.org/10.1083/jcb.201006052>

Park, B. S., Song, D. H., Kim, H. M., Choi, B.-S., Lee, H., & Lee, J.-O. (2009). The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature*, 458, 1191–1195. <https://doi.org/10.1038/nature07830>

Park, S. H., Park, C.-J., Lee, B.-R., Nam, K.-S., Kim, M.-J., Han, M.-Y., Kim, Y. J., Cho, Y.-U., & Jang, S. (2015). Sepsis affects most routine and cell population data (CPD) obtained using the Sysmex XN-2000 blood cell analyzer: Neutrophil-related CPD NE-SFL and NE-WY provide useful information for detecting sepsis. *Int. J. Lab. Hematol*, 37, 190–198. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12261>

Parker, H., Dragunow, M., Hampton, M. B., Kettle, A. J., & Winterbourn, C. C. (2012). Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus. *Journal of Leukocyte Biology*, 92(4), 841–849. <https://doi.org/10.1189/jlb.1211601>

Pawlinski, R., & Mackman, N. (2010). Cellular Sources of Tissue Factor in Endotoxemia and Sepsis. *Thrombosis Research*, *125S1*, S70–S73. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2010.01.042>

Perico, L., Benigni, A., Casiraghi, F., Ng, L. F. P., Renia, L., & Remuzzi, G. (2021). Immunity, endothelial injury and complement-induced coagulopathy in COVID-19. *Nature Reviews Nephrology*, *17*(1), 46–64. <https://doi.org/10.1038/s41581-020-00357-4>

Peters, C. E., Woodside, S. M., & Eaves, A. C. (2005). Isolation of subsets of immune cells. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *302*, 95–116. <https://doi.org/10.1385/1-59259-903-6:095>

Pfeiler, S., Massberg, S., & Engelmann, B. (2014). Biological basis and pathological relevance of microvascular thrombosis. *Thromb. Res*, *133 Suppl 1*, 35–37. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2014.03.016>

Phua, J., Ngerng, W. J., See, K. C., Tay, C. K., Kiong, T., Lim, H. F., Chew, M. Y., Yip, H. S., Tan, A., Khalizah, H. J., Capistrano, R., Lee, K. H., & Mukhopadhyay, A. (2013). Characteristics and outcomes of culture-negative versus culture-positive severe sepsis. *Critical Care*, *17*(5), Article 5. <https://doi.org/10.1186/cc12896>

Physiologie de l'hémostase. (n.d.). MHEMO. Retrieved July 7, 2023, from <https://mhemofr/les-pathologies/physiologie-de-lhemostase/>

Pillay, J., Ramakers, B. P., Kamp, V. M., Loi, A. L. T., Lam, S. W., Hietbrink, F., Leenen, L. P., Tool, A. T., Pickkers, P., & Koenderman, L. (2010). Functional heterogeneity and differential priming of circulating neutrophils in human experimental endotoxemia. *J. Leukoc. Biol*, *88*, 211–220. <https://doi.org/10.1189/jlb.1209793>

Plawinski, L., Cras, A., Hernández Lopez, J. R., de la Peña, A., Van der Heyden, A., Belle, C., Toti, F., & Anglés-Cano, E. (2023). Distinguishing Plasmin-Generating Microvesicles: Tiny Messengers Involved in Fibrinolysis and Proteolysis. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/ijms24021571>

Poli, V., & Zanoni, I. (2023). Neutrophil intrinsic and extrinsic regulation of NETosis in health and disease. *Trends in Microbiology*, *31*(3), 280–293. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.10.002>

Pons, S., Arnaud, M., Loïsele, M., Arrii, E., Azoulay, E., & Zafrani, L. (2020). Immune Consequences of Endothelial Cells' Activation and Dysfunction During Sepsis. *Critical Care Clinics*, 36(2), 401–413. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2019.12.001>

Popescu, N. I., Lupu, C., & Lupu, F. (2022). Disseminated intravascular coagulation and its immune mechanisms. *Blood*, 139(13), 1973–1986. <https://doi.org/10.1182/blood.2020007208>

Porte, R., Davoudian, S., Asgari, F., Parente, R., Mantovani, A., Garlanda, C., & Bottazzi, B. (2019). The Long Pentraxin PTX3 as a Humoral Innate Immunity Functional Player and Biomarker of Infections and Sepsis. *Frontiers in Immunology*, 10, 794. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00794>

Prasad, K. S. S., Andre, P., He, M., Bao, M., Manganello, J., & Phillips, D. R. (2003). Soluble CD40 ligand induces $\beta 3$ integrin tyrosine phosphorylation and triggers platelet activation by outside-in signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(21), 12367–12371. <https://doi.org/10.1073/pnas.2032886100>

Pugin, J. (2012). How tissue injury alarms the immune system and causes a systemic inflammatory response syndrome. *Annals of Intensive Care*, 2(1), 27. <https://doi.org/10.1186/2110-5820-2-27>

Quenot, J.-P., Binquet, C., Kara, F., Martinet, O., Ganster, F., Navellou, J.-C., Castelain, V., Barraud, D., Cousson, J., Louis, G., Perez, P., Kuteifan, K., Noirot, A., Badie, J., Mezher, C., Lessire, H., & Pavon, A. (2013). The epidemiology of septic shock in French intensive care units: The prospective multicenter cohort EPISS study. *Crit. Care Lond. Engl*, 17, 65. <https://doi.org/10.1186/cc12598>

Reddy, R. C., & Standiford, T. J. (2010). Effects of sepsis on neutrophil chemotaxis. *Curr. Opin. Hematol*, 17, 18–24. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e32833338f3>

Reid, V. L., & Webster, N. R. (2012). Role of microparticles in sepsis. *Br. J. Anaesth*, 109, 503–513. <https://doi.org/10.1093/bja/aes321>

Reis, L. R., Souza Junior, D. R., Tomasin, R., Bruni-Cardoso, A., Di Mascio, P., & Ronsein, G. E. (2023). Citrullination of actin-ligand and nuclear structural proteins, cytoskeleton reorganization and protein redistribution across cellular fractions are early events in ionomycin-induced NETosis. *Redox Biology*, 64, 102784. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102784>

Rentsch, C. T., Beckman, J. A., Tomlinson, L., Gellad, W. F., Alcorn, C., Kidwai-Khan, F., Skanderson, M., Brittain, E., King, J. T., Ho, Y.-L., Eden, S., Kundu, S., Lann, M. F., Greevy, R. A., Ho, P. M., Heidenreich, P. A., Jacobson, D. A., Douglas, I. J., Tate, J. P., ... Freiberg, M. S. (2021). Early initiation of prophylactic anticoagulation for prevention of coronavirus disease 2019 mortality in patients admitted to hospital in the United States: Cohort study. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 372, n311. <https://doi.org/10.1136/bmj.n311>

Rhodes, A., Wort, S. J., Thomas, H., Collinson, P., & Bennett, E. D. (Eds.). (2006). Plasma DNA concentration as a predictor of mortality and sepsis in critically ill patients. *Crit. Care Lond. Engl.*, 10, 60. <https://doi.org/10.1186/cc4894>

Rock, F. L., Hardiman, G., Timans, J. C., Kastelein, R. A., & Bazan, J. F. (1998). A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(2), 588–593. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.2.588>

Roger, T., Froidevaux, C., Le Roy, D., Reymond, M. K., Chanson, A.-L., Mauri, D., Burns, K., Riederer, B. M., Akira, S., & Calandra, T. (2009). Protection from lethal gram-negative bacterial sepsis by targeting Toll-like receptor 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(7), 2348–2352. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808146106>

Rosales, C. (2018). Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? *Frontiers in Physiology*, 9, 113. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00113>

Rosas-Ballina, M., Olofsson, P. S., Ochani, M., Valdés-Ferrer, S. I., Levine, Y. A., Reardon, C., Tusche, M. W., Pavlov, V. A., Andersson, U., Chavan, S., Mak, T. W., & Tracey, K. J. (2011). Acetylcholine-Synthesizing T Cells Relay Neural Signals in a Vagus Nerve Circuit. *Science*, 334(6052), 98–101. <https://doi.org/10.1126/science.1209985>

Roy, S., Karmakar, M., & Pearlman, E. (2014). CD14 mediates Toll-like receptor 4 (TLR4) endocytosis and spleen tyrosine kinase (Syk) and interferon regulatory transcription factor 3 (IRF3) activation in epithelial cells and impairs neutrophil infiltration and *Pseudomonas aeruginosa* killing in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(2), 1174–1182. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.523167>

Rudd, K. E., Johnson, S. C., Agesa, K. M., Shackelford, K. A., Tsoi, D., Kievlan, D. R., 196

Colombara, D. V., Ikuta, K. S., Kisson, N., Finfer, S., Fleischmann-Struzek, C., Machado, F. R., Reinhart, K. K., Rowan, K., Seymour, C. W., Watson, R. S., West, T. E., Marinho, F., Hay, S. I., ... Naghavi, M. (2020). Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: Analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet (London, England)*, 395(10219), 200–211. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32989-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32989-7)

Sahebnasagh, A., Saghafi, F., Safdari, M., Khataminia, M., Sadremomtaz, A., Talaei, Z., Rezaei Ghaleno, H., Bagheri, M., Habtemariam, S., & Avan, R. (2020). Neutrophil elastase inhibitor (sivelestat) may be a promising therapeutic option for management of acute lung injury/acute respiratory distress syndrome or disseminated intravascular coagulation in COVID-19. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 45(6), 1515–1519. <https://doi.org/10.1111/jcpt.13251>

Saitoh, T., Komano, J., Saitoh, Y., Misawa, T., Takahama, M., Kozaki, T., Uehata, T., Iwasaki, H., Omori, H., Yamaoka, S., Yamamoto, N., & Akira, S. (2012). Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host & Microbe*, 12(1), 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.05.015>

Sakuragawa, N., Hasegawa, H., Maki, M., Nakagawa, M., & Nakashima, M. (1993). Clinical evaluation of low-molecular-weight heparin (FR-860) on disseminated intravascular coagulation (DIC)—A multicenter co-operative double-blind trial in comparison with heparin -. *Thrombosis Research*, 72(6), 475–500. [https://doi.org/10.1016/0049-3848\(93\)90109-2](https://doi.org/10.1016/0049-3848(93)90109-2)

Salvi, V., Nguyen, H. O., Sozio, F., Schioppa, T., Gaudenzi, C., Laffranchi, M., Scapini, P., Passari, M., Barbazza, I., Tiberio, L., Tamassia, N., Garlanda, C., Prete, A. D., Cassatella, M. A., Mantovani, A., Sozzani, S., & Bosisio, D. (2021). SARS-CoV-2-associated ssRNAs activate inflammation and immunity via TLR7/8. *JCI Insight*, 6(18). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.150542>

Samimagham, H. R., Hassani Azad, M., Haddad, M., Arabi, M., Hooshyar, D., & KazemiJahromi, M. (2020). The Efficacy of Famotidine in improvement of outcomes in Hospitalized COVID-19 Patients: A structured summary of a study protocol for a randomised controlled trial. *Trials*, 21(1), 848. <https://doi.org/10.1186/s13063-020-04773-6>

Santos, S. S., Brunialti, M. K. C., Rigato, O., Machado, F. R., Silva, E., & Salomao, R. (2012). Generation of nitric oxide and reactive oxygen species by neutrophils and monocytes from septic patients and association with outcomes. *Shock Augusta Ga*, 38, 18–23.

<https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e318257114e>

Sariol, A., & Perlman, S. (2021). SARS-CoV-2 takes its Toll. *Nature Immunology*, 22(7), 801–802. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-00962-w>

Schijns, V., & Lavelle, E. C. (2020). Prevention and treatment of COVID-19 disease by controlled modulation of innate immunity. *European Journal of Immunology*, 50(7), 932–938. <https://doi.org/10.1002/eji.202048693>

Schinkel, M., Paranjape, K., Nannan Panday, R. S., Skyttberg, N., & Nanayakkara, P. W. B. (2019). Clinical applications of artificial intelligence in sepsis: A narrative review. *Computers in Biology and Medicine*, 115, 103488. <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2019.103488>

Schoen, J., Euler, M., Schauer, C., Schett, G., Herrmann, M., Knopf, J., & Yaykasli, K. O. (2022). Neutrophils' Extracellular Trap Mechanisms: From Physiology to Pathology. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21), 12855. <https://doi.org/10.3390/ijms232112855>

Schouten, M., Wiersinga, W. J., Levi, M., Poll, T., Schuster, S., Hurrell, B., & Tacchini-Cottier, F. (2008). Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J. Leukoc. Biol*, 83, 536–545. <https://doi.org/10.1189/jlb.0607373>

Segal, A. W. (2005). How Neutrophils Kill Microbes. *Annual Review of Immunology*, 23, 197–223. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115653>

Semeraro, F., Ammollo, C. T., Morrissey, J. H., Dale, G. L., Friese, P., Esmon, N. L., & Esmon, C. T. (2011). Extracellular histones promote thrombin generation through platelet-dependent mechanisms: Involvement of platelet TLR2 and TLR4. *Blood*, 118, 1952–1961. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-03-343061>

Semple, J. W., Italiano, J. E., & Freedman, J. (2011). Platelets and the immune continuum. *Nat. Rev. Immunol*, 11, 264–274. <https://doi.org/10.1038/nri2956>

Seo, Y.-S., & Kang, Y.-H. (2018). The Human Replicative Helicase, the CMG Complex, as a Target for Anti-cancer Therapy. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 5. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2018.00026>

Seymour, C. W., Liu, V. X., Iwashyna, T. J., Brunkhorst, F. M., Rea, T. D., Scherag, A.,
198

Rubinfeld, G., Kahn, J. M., Shankar-Hari, M., Singer, M., Deutschman, C. S., Escobar, G. J., & Angus, D. C. (2016). Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, *315*, 762–774. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0288>

Shen, X.-F., Cao, K., Jiang, J., Guan, W.-X., & Du, J.-F. (2017). Neutrophil dysregulation during sepsis: An overview and update. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *21*(9), 1687–1697. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13112>

Sheshachalam, A., Srivastava, N., Mitchell, T., Lacy, P., & Eitzen, G. (2014). Granule Protein Processing and Regulated Secretion in Neutrophils. *Frontiers in Immunology*, *5*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2014.00448>

Sheu, Y.-J., & Stillman, B. (2006). Cdc7-Dbf4 phosphorylates MCM proteins via a docking site-mediated mechanism to promote S phase progression. *Molecular Cell*, *24*(1), 101–113. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.07.033>

Shirato, K., & Kizaki, T. (2021). SARS-CoV-2 spike protein S1 subunit induces pro-inflammatory responses via toll-like receptor 4 signaling in murine and human macrophages. *Heliyon*, *7*(2), e06187. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06187>

Silva, S. C., Baggio-Zappia, G. L., Brunialti, M. K. C., Assunção, M. S. C., Azevedo, L. C. P., Machado, F. R., & Salomao, R. (2014). Evaluation of Toll-like, chemokine, and integrin receptors on monocytes and neutrophils from peripheral blood of septic patients and their correlation with clinical outcomes. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *47*(5), 384–393. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20143190>

Simon, H.-U. (2003). Neutrophil apoptosis pathways and their modifications in inflammation. *Immunological Reviews*, *193*, 101–110. <https://doi.org/10.1034/j.1600-065x.2003.00038.x>

Simon, N., Bochman, M. L., Seguin, S., Brodsky, J. L., Seibel, W. L., & Schwacha, A. (2013). Ciprofloxacin is an inhibitor of the Mcm2-7 replicative helicase. *Bioscience Reports*, *33*(5), e00072. <https://doi.org/10.1042/BSR20130083>

Simon, N. E., & Schwacha, A. (2014). The Mcm2-7 Replicative Helicase: A Promising Chemotherapeutic Target. *BioMed Research International*, *2014*, e549719. <https://doi.org/10.1155/2014/549719>

Simon, S. I., & Kim, M.-H. (2010). A day (or 5) in a neutrophil's life. *Blood*, *116*, 511–512. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-05-283184>

Singer, M., Deutschman, C. S., Seymour, C. W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G. R., Chiche, J.-D., Coopersmith, C. M., Hotchkiss, R. S., Levy, M. M., Marshall, J. C., Martin, G. S., Opal, S. M., Rubenfeld, G. D., van der Poll, T., Vincent, J.-L., & Angus, D. C. (2016). The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, *315*(8), 801–810. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287>

Skoutelis, A. T., Kaleridis, V., Athanassiou, G. M., Kokkinis, K. I., Missirlis, Y. F., & Bassaris, H. P. (2000). Neutrophil deformability in patients with sepsis, septic shock, and adult respiratory distress syndrome. *Crit. Care Med*, *28*, 2355–2359.

Sohn, K. M., Lee, S. G., Kim, H. J., Cheon, S., Jeong, H., Lee, J., Kim, I. S., Silwal, P., Kim, Y. J., Paik, S., Chung, C., Park, C., Kim, Y. S., & Jo, E. K. (2020). COVID-19 Patients Upregulate Toll-like Receptor 4-mediated Inflammatory Signaling That Mimics Bacterial Sepsis. *Journal of Korean Medical Science*, *35*(38), e343. <https://doi.org/10.3346/jkms.2020.35.e343>

Söling, A., Sackewitz, M., Volkmar, M., Schaarschmidt, D., Jacob, R., Holzhausen, H.-J., & Rainov, N. G. (2005). Minichromosome maintenance protein 3 elicits a cancer-restricted immune response in patients with brain malignancies and is a strong independent predictor of survival in patients with anaplastic astrocytoma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *11*(1), 249–258.

Sônego, F., Castanheira, F. V. E. S., Ferreira, R. G., Kanashiro, A., Leite, C. A. V. G., Nascimento, D. C., Colón, D. F., Borges, V. de F., Alves-Filho, J. C., & Cunha, F. Q. (2016). Paradoxical Roles of the Neutrophil in Sepsis: Protective and Deleterious. *Front. Immunol*, *7*, 155. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00155>

Song, G., Shi, L., Guo, Y., Yu, L., Wang, L., Zhang, X., Li, L., Han, Y., Ren, X., Guo, Q., Bi, K., & Jiang, G. (2015). A novel PAD4/SOX4/PU.1 signaling pathway is involved in the committed differentiation of acute promyelocytic leukemia cells into granulocytic cells. *Oncotarget*, *7*(3), 3144–3157. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6551>

Song, J., Hu, D., He, C., Wang, T., Liu, X., Ma, L., Lin, Z., & Chen, Z. (2013). Novel biomarkers for early prediction of sepsis-induced disseminated intravascular coagulation in a
200

mouse cecal ligation and puncture model. *Journal of Inflammation*, 10(1), 7. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-10-7>

Souto, F. O., Alves-Filho, J. C., Turato, W. M., Auxiliadora-Martins, M., Basile-Filho, A., & Cunha, F. Q. (2011). Essential role of CCR2 in neutrophil tissue infiltration and multiple organ dysfunction in sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*, 183, 234–242. <https://doi.org/10.1164/rccm.201003-0416OC>

Sreeramkumar, V., Adrover, J. M., Ballesteros, I., Cuartero, M. I., Rossaint, J., Bilbao, I., Náchér, M., Pitaval, C., Radovanovic, I., Fukui, Y., McEver, R. P., Filippi, M.-D., Lizasoain, I., Ruiz-Cabello, J., Zarbock, A., Moro, M. A., & Hidalgo, A. (2014). Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. *Science*, 346, 1234–1238. <https://doi.org/10.1126/science.1256478>

Stahl, K., Schmidt, J. J., Seeliger, B., Schmidt, B. M. W., Welte, T., Haller, H., Hoeper, M. M., Budde, U., Bode, C., & David, S. (2020). Effect of therapeutic plasma exchange on endothelial activation and coagulation-related parameters in septic shock. *Critical Care*, 24(1), Article 1. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-2799-5>

Stiel, L., Delabranche, X., Galois, A.-C., Severac, F., Toti, F., Mauvieux, L., Meziani, F., & Boisramé-Helms, J. (2016). Neutrophil Fluorescence: A New Indicator of Cell Activation During Septic Shock-Induced Disseminated Intravascular Coagulation. *Critical Care Medicine*, 44(11), e1132–e1136. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000001851>

Stiel, L., Mayeur-Rousse, C., Helms, J., Meziani, F., & Mauvieux, L. (2019a). First visualization of circulating neutrophil extracellular traps using cell fluorescence during human septic shock-induced disseminated intravascular coagulation. *Thrombosis Research*, 183, 153–158. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2019.09.036>

Stiel, L., Mayeur-Rousse, C., Helms, J., Meziani, F., & Mauvieux, L. (2019b). First visualization of circulating neutrophil extracellular traps using cell fluorescence during human septic shock-induced disseminated intravascular coagulation. *Thrombosis Research*, 183, 153–158. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2019.09.036>

Stiel, L., Meziani, F., & Helms, J. (2018a). Neutrophil Activation During Septic Shock. *Shock*, 49(4), 371–384. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000980>

Stiel, L., Meziani, F., & Helms, J. (2018b). Neutrophil Activation During Septic Shock. *Shock (Augusta, Ga.)*, 49(4), 371–384. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000980>

Stojkov, D., Claus, M. J., Kozlowski, E., Oberson, K., Schären, O. P., Benarafa, C., Yousefi, S., & Simon, H.-U. (2023). NET formation is independent of gasdermin D and pyroptotic cell death. *Science Signaling*, 16(769), eabm0517. <https://doi.org/10.1126/scisignal.abm0517>

Sun, Y., Cheng, Z., & Liu, S. (2022). MCM2 in human cancer: Functions, mechanisms, and clinical significance. *Molecular Medicine*, 28(1), Article 1. <https://doi.org/10.1186/s10020-022-00555-9>

Szklarczyk, D., Kirsch, R., Koutrouli, M., Nastou, K., Mehryary, F., Hachilif, R., Gable, A. L., Fang, T., Doncheva, N. T., Pyysalo, S., Bork, P., Jensen, L. J., & von Mering, C. (2023). The STRING database in 2023: Protein–protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D638–D646. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1000>

Tak, T., Wijten, P., Heeres, M., Pickkers, P., Scholten, A., Heck, A. J. R., Vrisekoop, N., Leenen, L. P., Borghans, J. A. M., Tesselaar, K., & Koenderman, L. (2017). Human CD62Ldim neutrophils identified as a separate subset by proteome profiling and in vivo pulse-chase labeling. *Blood*, 129(26), 3476–3485. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-07-727669>

Tamayo, E., Gómez, E., Bustamante, J., Gómez-Herreras, J. I., Fonteriz, R., Bobillo, F., Bermejo-Martín, J. F., Castrodeza, J., Heredia, M., Fierro, I., & Álvarez, F. J. (2012). Evolution of neutrophil apoptosis in septic shock survivors and nonsurvivors. *Journal of Critical Care*, 27(4), 415.e1-415.e11. <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2011.09.001>

Tan, Y., Zanoni, I., Cullen, T. W., Goodman, A. L., & Kagan, J. C. (2015). Mechanisms of Toll-like Receptor 4 Endocytosis Reveal a Common Immune-Evasion Strategy Used by Pathogenic and Commensal Bacteria. *Immunity*, 43(5), 909–922. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.10.008>

Taneja, R., Sharma, A. P., Hallett, M. B., Findlay, G. P., & Morris, M. R. (2008). Immature circulating neutrophils in sepsis have impaired phagocytosis and calcium signaling. *Shock Augusta Ga*, 30, 618–622. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e318173ef9c>

Tansho-Nagakawa, S., Ubagai, T., Kikuchi-Ueda, T., Koshio, O., Koshibu, Y., Kikuchi, H., &

Ono, Y. (2012). Analysis of membrane antigens on neutrophils from patients with sepsis. *Journal of Infection and Chemotherapy*, *18*(5), 646–651. <https://doi.org/10.1007/s10156-012-0386-7>

Tauszig, S., Jouanguy, E., Hoffmann, J. A., & Imler, J.-L. (2000). Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(19), 10520–10525.

Taylor, F., Toh, C.-H., Hoots, K., Wada, H., & Levi, M. (2001). Towards Definition, Clinical and Laboratory Criteria, and a Scoring System for Disseminated Intravascular Coagulation: On behalf of the Scientific Subcommittee on Disseminated Intravascular Coagulation (DIC) of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH). *Thrombosis and Haemostasis*, *86*(11), 1327–1330. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1616068>

Tecchio, C., Micheletti, A., & Cassatella, M. A. (2014). Neutrophil-derived cytokines: Facts beyond expression. *Frontiers in Immunology*, *5*, 508. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00508>

Teng, L., Yu, M., Li, J., Tang, H., Yu, J., Mo, L., Jin, J., & Liu, X. (2012). Matrix metalloproteinase-9 as new biomarkers of severity in multiple organ dysfunction syndrome caused by trauma and infection. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *360*(1), 271–277. <https://doi.org/10.1007/s11010-011-1066-0>

Thiam, H. R., Wong, S. L., Wagner, D. D., & Waterman, C. M. (2020). Cellular Mechanisms of NETosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *36*(1), 191–218. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-020520-111016>

Thierry, A. R., & Roch, B. (2020). Neutrophil Extracellular Traps and By-Products Play a Key Role in COVID-19: Pathogenesis, Risk Factors, and Therapy. *Journal of Clinical Medicine*, *9*(9). <https://doi.org/10.3390/jcm9092942>

Thorndike, J., & Kollef, M. H. (2020). Culture-negative sepsis. *Current Opinion in Critical Care*, *26*(5), 473. <https://doi.org/10.1097/MCC.0000000000000751>

Tian, Y., Russo, R. M., Li, Y., Karmakar, M., Liu, B., Puskarich, M. A., Jones, A. E., Stringer, K. A., Standiford, T. J., & Alam, H. B. (2021). Serum citrullinated histone H3 concentrations differentiate patients with septic versus non-septic shock and correlate with disease severity.

Infection, 49(1), 83–93. <https://doi.org/10.1007/s15010-020-01528-y>

Tidswell, M., Tillis, W., Larosa, S. P., Lynn, M., Wittek, A. E., Kao, R., Wheeler, J., Gogate, J., Opal, S. M., & Eritoran Sepsis Study Group. (2010). Phase 2 trial of eritoran tetrasodium (E5564), a toll-like receptor 4 antagonist, in patients with severe sepsis. *Critical Care Medicine*, 38(1), 72–83. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181b07b78>

Trevelin, S. C., Alves-Filho, J. C., Sônego, F., Turato, W., Nascimento, D. C., Souto, F. O., Cunha, T. M., Gazzinelli, R. T., & Cunha, F. Q. (2012). Toll-like receptor 9 activation in neutrophils impairs chemotaxis and reduces sepsis outcome. *Crit. Care Med*, 40, 2631–2637. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318258fb70>

Trzeciak, S., Cinel, I., Phillip Dellinger, R., Shapiro, N. I., Arnold, R. C., Parrillo, J. E., Hollenberg, S. M., Resuscitation, M. A., & Investigators, S. (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. Off. J. Soc. Acad. Emerg. Med*, 15, 399–413. <https://doi.org/10.1111/j.1553->

Turvey, S. E., & Broide, D. H. (2010). Innate immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2, Supplement 2), S24–S32. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.016>

Uhl, B., Vadlau, Y., Zuchtriegel, G., Nekolla, K., Sharaf, K., Gaertner, F., Massberg, S., Krombach, F., Reichel, C. A., Urban, C. F., Reichard, U., Brinkmann, V., & Zychlinsky, A. (2016). Aged neutrophils contribute to the first line of defense in the acute inflammatory response. *Blood*, 8, 668–676. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-05-718999>

Urban, C. F., Ermert, D., Schmid, M., Abu-Abed, U., Goosmann, C., Nacken, W., Brinkmann, V., Jungblut, P. R., & Zychlinsky, A. (2009). Neutrophil Extracellular Traps Contain Calprotectin, a Cytosolic Protein Complex Involved in Host Defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathogens*, 5(10), e1000639. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000639>

Urban, C. F., Reichard, U., Brinkmann, V., & Zychlinsky, A. (2006). Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cellular Microbiology*, 8(4), 668–676. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00659.x>

Vallet, B. (2003). Bench-to-bedside review: Endothelial cell dysfunction in severe sepsis: a role in organ dysfunction? *Critical Care*, 7(2), Article 2. <https://doi.org/10.1186/cc1864>

Van Avondt, K., Maegdefessel, L., & Soehnlein, O. (2019). Therapeutic Targeting of Neutrophil Extracellular Traps in Atherogenic Inflammation. *Thrombosis and Haemostasis*, *119*(4), 542–552. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1678664>

Van Der Meijden, P. E. J., Van Schilfgaarde, M., Van Oerle, R., Renné, T., Cate, H., & Spronk, H. M. H. (2012). Platelet- and erythrocyte-derived microparticles trigger thrombin generation via factor XIIa. *J. Thromb. Haemost. JTH*, *10*, 1355–1362. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2012.04758.x>

van der Poll, T., & Herwald, H. (2014). The coagulation system and its function in early immune defense. *Thrombosis and Haemostasis*, *112*(4), 640–648. <https://doi.org/10.1160/TH14-01-0053>

van Hinsbergh, V. W. M. (2012). Endothelium—Role in regulation of coagulation and inflammation. *Seminars in Immunopathology*, *34*(1), 93–106. <https://doi.org/10.1007/s00281-011-0285-5>

van Kessel, K. P. M., Bestebroer, J., & van Strijp, J. A. G. (2014). Neutrophil-Mediated Phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Immunology*, *5*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2014.00467>

Vardon-Bounes, F., Ruiz, S., Gratacap, M.-P., Garcia, C., Payrastre, B., & Minville, V. (2019). Platelets Are Critical Key Players in Sepsis. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(14), 3494. <https://doi.org/10.3390/ijms20143494>

Varghese, F. S., van Woudenberg, E., Overheul, G. J., Eleveld, M. J., Kurver, L., van Heerbeek, N., van Laarhoven, A., Miesen, P., den Hartog, G., de Jonge, M. I., & van Rij, R. P. (2021). Berberine and Obatoclox Inhibit SARS-Cov-2 Replication in Primary Human Nasal Epithelial Cells In Vitro. *Viruses*, *13*(2), 282. <https://doi.org/10.3390/v13020282>

Venet, F., & Monneret, G. (2018). Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression. *Nature Reviews. Nephrology*, *14*(2), 121–137. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2017.165>

Verbist, K. C., Wang, R., & Green, D. R. (2012). T cell metabolism and the immune response. *Semin. Immunol*, *24*, 399–404. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2012.12.006>

Vincent, J. L., Moreno, R., Takala, J., Willatts, S., De Mendonça, A., Bruining, H., Reinhart, C. K., Suter, P. M., & Thijs, L. G. (1996). The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis- Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med*, 22, 707–710.

Vincent, J.-L., Francois, B., Zabolotskikh, I., Daga, M. K., Lascarrou, J.-B., Kirov, M. Y., Pettilä, V., Wittebole, X., Meziani, F., Mercier, E., Lobo, S. M., Barie, P. S., Crowther, M., Esmon, C. T., Fareed, J., Gando, S., Gorelick, K. J., Levi, M., Mira, J.-P., ... Group, S. C. A. R. L. E. T. T. (2019). Effect of a Recombinant Human Soluble Thrombomodulin on Mortality in Patients With Sepsis-Associated Coagulopathy: The SCARLET Randomized Clinical Trial. *JAMA*, 321, 1993–2002. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.5358>

Vincent, J.-L., Jones, G., David, S., Olariu, E., & Cadwell, K. K. (2019). Frequency and mortality of septic shock in Europe and North America: A systematic review and meta-analysis. *Critical Care*, 23(1), Article 1. <https://doi.org/10.1186/s13054-019-2478-6>

Vincent, J.-L., Rello, J., Marshall, J., Silva, E., Anzueto, A., Martin, C. D., Moreno, R., Lipman, J., Gomersall, C., Sakr, Y., Reinhart, K., & EPIC II Group of Investigators, for the. (2009). International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units. *JAMA*, 302(21), 2323–2329. <https://doi.org/10.1001/jama.2009.1754>

Vincent, J.-L., Sakr, Y., Sprung, C. L., Ranieri, V. M., Reinhart, K., Gerlach, H., Moreno, R., Carlet, J., Le Gall, J.-R., Payen, D., & Investigators, on behalf of the S. O. in A. I. P. (2006). Sepsis in European intensive care units: Results of the SOAP study*. *Critical Care Medicine*, 34(2), 344. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000194725.48928.3A>

Walenta, K. L. H., Link, A., Friedrich, E. B., & Böhm, M. (2009). Circulating microparticles in septic shock. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*, 180, 100, 100–101. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.180.1.100>

Walford, G., & Loscalzo, J. (2003). Nitric oxide in vascular biology. *J. Thromb. Haemost. JTH*, 1, 2112–2118.

Wang, B., Chen, G., Li, J., Zeng, Y., Wu, Y., & Yan, X. (2017). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin predicts myocardial dysfunction and mortality in severe sepsis and septic shock. *International Journal of Cardiology*, 227, 589–594. 206

<https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.10.096>

Wang, C., Chi, C., Guo, L., Wang, X., Guo, L., Sun, J., Sun, B., Liu, S., Chang, X., & Li, E. (2014). Heparin therapy reduces 28-day mortality in adult severe sepsis patients: A systematic review and meta-analysis. *Critical Care*, *18*(5), Article 5. <https://doi.org/10.1186/s13054-014-0563-4>

Wang, X., Zhang, Y., Peng, Y., Hutchinson, M. R., Rice, K. C., Yin, H., & Watkins, L. R. (2016). Pharmacological characterization of the opioid inactive isomers (+)-naltrexone and (+)-naloxone as antagonists of toll-like receptor 4. *British Journal of Pharmacology*, *173*(5), 856–869. <https://doi.org/10.1111/bph.13394>

Wang, X., Zhao, J., Cai, C., Tang, X., Fu, L., Zhang, A., & Han, L. (2018). A Label-Free Quantitative Proteomic Analysis of Mouse Neutrophil Extracellular Trap Formation Induced by *Streptococcus suis* or Phorbol Myristate Acetate (PMA). *Frontiers in Immunology*, *9*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.02615>

Wang, Y., Li, M., Stadler, S., Correll, S., Li, P., Wang, D., Hayama, R., Leonelli, L., Han, H., Grigoryev, S. A., Allis, C. D., & Coonrod, S. A. (2009). Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *The Journal of Cell Biology*, *184*(2), 205–213. <https://doi.org/10.1083/jcb.200806072>

Ward, J. R., Dower, S. K., Whyte, M. K. B., Buttle, D. J., & Sabroe, I. (2006). Potentiation of TLR4 signalling by plasmin activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *341*(2), 299–303. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.12.188>

Warnatsch, A., Tsourouktsoglou, T.-D., Branzk, N., Wang, Q., Reincke, S., Herbst, S., Gutierrez, M., & Papayannopoulos, V. (2017). Reactive Oxygen Species Localization Programs Inflammation to Clear Microbes of Different Size. *Immunity*, *46*(3), 421–432. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.02.013>

Warren, B. L., Eid, A., Singer, P., Pillay, S. S., Carl, P., Novak, I., Chalupa, P., Atherstone, A., Péntzes, I., Kübler, A., Knaub, S., Keinecke, H. O., Heinrichs, H., Schindel, F., Juers, M., Bone, R. C., Opal, S. M., & Group, K. T. S. (2001). Caring for the critically ill patient. High-dose antithrombin III in severe sepsis: A randomized controlled trial. *JAMA*, *286*, 1869–1878. <https://doi.org/10.1001/jama.286.15.1869>

- Watanabe, Y., Allen, J. D., Wrapp, D., McLellan, J. S., & Crispin, M. (2020). Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. *Science (New York, N.Y.)*, *369*(6501), 330–333. <https://doi.org/10.1126/science.abb9983>
- Watts, C. (2008). Location, location, location: Identifying the neighborhoods of LPS signaling. *Nature Immunology*, *9*(4), 343–345. <https://doi.org/10.1038/ni0408-343>
- Weiler, H., & Isermann, B. H. (2003). Thrombomodulin. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, *1*(7), 1515–1524. <https://doi.org/10.1046/j.1538-7836.2003.00306.x>
- Weng, J., Chen, M., Fang, D., Liu, D., Guo, R., & Yang, S. (2021). Therapeutic Plasma Exchange Protects Patients with Sepsis-Associated Disseminated Intravascular Coagulation by Improving Endothelial Function. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, *27*, 10760296211053312. <https://doi.org/10.1177/10760296211053313>
- Wieczorek, S., Combes, F., Lazar, C., Giai Gianetto, Q., Gatto, L., Dorffer, A., Hesse, A.-M., Couté, Y., Ferro, M., Bruley, C., & Burger, T. (2017). DAPAR & ProStaR: Software to perform statistical analyses in quantitative discovery proteomics. *Bioinformatics*, *33*(1), 135–136. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw580>
- Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P., & Halbwachs-Mecarelli, L. (2000). Neutrophils: Molecules, functions and pathophysiological aspects. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, *80*(5), 617–653. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3780067>
- Wong, K., Yeap, W., Tai, J., Ong, S.-M., Dang, M., & Wong, S.-C. (2012). The three human monocyte subsets: Implications for health and disease. *Immunologic Research*, *53*, 41–57. <https://doi.org/10.1007/s12026-012-8297-3>
- Wong, S. L., Demers, M., Martinod, K., Gallant, M., Wang, Y., Goldfine, A. B., Kahn, C. R., & Wagner, D. D. (2015). Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing. *Nature Medicine*, *21*(7), 815–819. <https://doi.org/10.1038/nm.3887>
- World Health Assembly, 70. (2017). *Improving the prevention, diagnosis and clinical management of sepsis (WHA70.7)*. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/275646>

- Xu, J., Zhang, X., Pelayo, R., Monestier, M., Ammollo, C. T., Semeraro, F., Taylor, F. B., Esmon, N. L., Lupu, F., & Esmon, C. T. (2009). Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nature Medicine*, *15*(11), Article 11. <https://doi.org/10.1038/nm.2053>
- Xu, Z., Huang, Y., Mao, P., Zhang, J., & Li, Y. (2015). Sepsis and ARDS: The Dark Side of Histones. *Mediators of Inflammation*, *2015*, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2015/205054>
- Yaguchi, A., Lobo, F. L. M., Vincent, J.-L., Pradier, O., Yamakawa, K., Umemura, Y., Murao, S., Hayakawa, M., & Fujimi, S. (2004). Platelet function in sepsis. *J. Thromb. Haemost. JTH*, *2*, 2096–2102. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2004.01009.x>
- Yang, C., Dong, Z.-Z., Zhang, J., Teng, D., Luo, X., Li, D., & Zhou, Y. (2021). Peptidylarginine deiminases 4 as a promising target in drug discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *226*, 113840. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113840>
- Yang, S., Qi, H., Kan, K., Quan, C., Xie, H., Guo, X., & Zhang, L. (2016). *Neutrophil Extracellular Traps Promote Hypercoagulability in Patients with Sepsis*. Shock Augusta Ga. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000741>
- Yipp, B. G., Petri, B., Salina, D., Jenne, C. N., Scott, B. N. V., Zbytnuik, L. D., Pittman, K., Asaduzzaman, M., Wu, K., Meijndert, H. C., Malawista, S. E., de Boisfleury Chevance, A., Zhang, K., Conly, J., & Kubes, P. (2012). Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nature Medicine*, *18*(9), 1386–1393. <https://doi.org/10.1038/nm.2847>
- Youn, H. S., Saitoh, S. I., Miyake, K., & Hwang, D. H. (2006). Inhibition of homodimerization of Toll-like receptor 4 by curcumin. *Biochemical Pharmacology*, *72*(1), 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.03.022>
- Yu, K., & Proost, P. (2022). Insights into peptidylarginine deiminase expression and citrullination pathways. *Trends in Cell Biology*, *32*(9), 746–761. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2022.01.014>
- Zeerleder, S., Schroeder, V., Hack, C. E., Kohler, H. P., & Wuillemin, W. A. (2006). TAFI and PAI-1 levels in human sepsis. *Thrombosis Research*, *118*(2), 205–212. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2005.06.007>

Zhang, Q., Xiang, R., Huo, S., Zhou, Y., Jiang, S., Wang, Q., & Yu, F. (2021). Molecular mechanism of interaction between SARS-CoV-2 and host cells and interventional therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00653-w>

Zhao, G., Li, D., Zhao, Q., Song, J., Chen, X., Hong, G., Li, M., Wu, B., & Lu, Z. (2016). Incidence, risk factors and impact on outcomes of secondary infection in patients with septic shock: An 8-year retrospective study. *Scientific Reports*, 6(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/srep38361>

Zhao, Y., Kuang, M., Li, J., Zhu, L., Jia, Z., Guo, X., Hu, Y., Kong, J., Yin, H., Wang, X., & You, F. (2021). SARS-CoV-2 spike protein interacts with and activates TLR41. *Cell Research*, 31(7), 818–820. <https://doi.org/10.1038/s41422-021-00495-9>

Zheng, M., Karki, R., Williams, E. P., Yang, D., Fitzpatrick, E., Vogel, P., Jonsson, C. B., & Kanneganti, T.-D. (2021). TLR2 senses the SARS-CoV-2 envelope protein to produce inflammatory cytokines. *Nature Immunology*, 22(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-00937-x>

Zhou, P., Yang, X.-L., Wang, X.-G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H.-R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C.-L., Chen, H.-D., Chen, J., Luo, Y., Guo, H., Jiang, R.-D., Liu, M.-Q., Chen, Y., Shen, X.-R., Wang, X., ... Shi, Z.-L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 579(7798), 270–273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>

Zhu, Y., Chen, X., & Liu, X. (2022). NETosis and Neutrophil Extracellular Traps in COVID-19: Immunothrombosis and Beyond. *Frontiers in Immunology*, 13, 838011. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.838011>

Zigmond, S. H. (1974). Mechanisms of sensing chemical gradients by polymorphonuclear leukocytes. *Nature*, 249, 450–452.

Zonneveld, R., Molema, G., & Plötz, F. B. (2016). Analyzing Neutrophil Morphology, Mechanics, and Motility in Sepsis: Options and Challenges for Novel Bedside Technologies. *Critical Care Medicine*, 44(1), 218–228. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000001266>

ANNEXES

I ANNEXE 1 : Précisions méthodologiques sur l'analyse protéomique des polynucléaires neutrophiles des patients en choc septique avec ou sans CIVD

I.A Digestion en gel et préparation des échantillons pour la spectrométrie de masse

Les culots des neutrophiles ont été resuspendus dans un tampon de type Laemmli (10mM Tris pH 6.8, 1mM EDTA, 5% de β -mercaptoéthanol, 5% de SDS, 10% de glycérol). Après agitation et sonication, la concentration en protéines a été déterminée en utilisant le kit de dosage protéiques RC-DC (Biorad®). Pour chaque échantillon, 7.5 μ g de lysat protéique ont été concentrés sur un gel de concentration par électrophorèse. Les bandes de protéines ont été visualisées par coloration au bleu de Coomassie, puis excisées et lavées quatre fois avec 25nM de bicarbonate d'ammonium et d'acétonitrile. Les cystéines des protéines ont été réduites par 10mM de dithiothréitol pendant 30 minutes à 60°C, puis alkylées par 55mM d'iodoacétamide pendant 20 minutes à 37°C. Les peptides ont été extraits avec de l'acétonitrile à 60% dans de l'acide formique à 0.1%, suivie d'une deuxième extraction avec de l'acétonitrile à 100%. L'acétonitrile a été évaporé sous vide et les peptides ont été resuspendus dans de l'acide formique à 0.1% avant l'analyse en nano LC-MS/MS.

I.B Analyse LC-MS/MS

Les analyses LC-MS/MS ont été réalisées sur un système nanoACQUITY Ultra-Performance LC couplé à un spectromètre de masse Q-Exactive Plus Orbitrap équipé d'une source d'ionisation nanoelectrospray. La séparation des peptides a été effectuée sur une colonne ACQUITY UPLC BEH130 C18 (200mmx75 μ m avec des particules de 1.7 μ m de diamètre) et une pré-colonne Symmetry C18 (20mm x180 μ m avec des particules de 5 μ m de diamètre). Le système de solvant était composé de 0.1% d'acide formique dans de l'eau (solvant A) et de 0.1% d'acide formique dans de l'acétonitrile (solvant B). Chaque échantillon (l'équivalent de 1 μ g de protéine initiale) a été chargé dans la colonne d'enrichissement pendant 3minutes à un débit de 5 μ L/min avec 99% de solvant A et 1% de solvant B. Les peptides ont été élués à un débit de 450nL/min avec le gradient suivant de solvant B : de 1 à 35% sur 120 minutes. Les échantillons ont été injectés dans un ordre aléatoire. Le spectromètre de masse a été utilisé

en mode d'acquisition de données dépendantes (DDA) avec une communication automatique entre le mode MS (plage de masse 300 -1800 m/z, R=70 000 et contrôle automatique du gain réglé sur 3.106 ions et un temps d'injection maximal réglé sur 50ms) et le mode MS/MS (premier m/z réglé sur 100, R = 17 5500 et contrôle automatique du gain fixé à 1.105 ions et un temps d'injection maximal réglé sur 100ms). Les dix ions les plus abondants avec un état de charge ≥ 2 ont été sélectionnés sur chaque spectre MS, pour une isolation ultérieure et une fragmentation par dissociation à haute énergie en excluant les ions non attribués et monochargés. Le temps d'exclusion a été réglé à 60s.

Pour éviter la contamination entre deux échantillons successifs, un échantillon sans peptide a été injecté entre chaque échantillon. Un contrôle de qualité (QC) a été effectué par injection régulière d'échantillons de peptides regroupés à partir de 14 échantillons et a démontré la stabilité du système, car les protéines quantifiées dans les 4 QC (1138/1182) présentent des coefficients de variation inférieurs à 20%.

I.C Analyse bio-informatique

Les données brutes de spectrométrie de masse ont été traitées à l'aide de l'algorithme de recherche Andromeda du logiciel MaxQuant (v.1.6.0.16, Institut Max Planck de biochimie, Martinsried, Allemagne). La base de données utilisées pour les recherches contenait toutes les entrées humaines extraites de SwissPort (juillet 2019 ; 20 241 séquences). Les paramètres MaxQuant ont été définis comme suit. La longueur minimale du peptide requise était de sept acides aminés. Un maximum de deux coupures marquées était autorisé. La tolérance de masse du précurseur a été définie à 20 parties par million (ppm) pour la première recherche et 5 ppm pour la recherche principale. La tolérance de masse des fragments des ions a été définie à 40 ppm. La carbométhylation des cystéines a été définie comme une modification fixe, tandis que l'acétylation des acides aminés N-terminaux et l'oxydation des méthionines ont été définies comme des modifications variables. Le taux de découverte d'erreurs maximal (FDR) était de 1% au niveau des peptides et des protéines avec l'utilisation d'une stratégie de leurre. Aucune correspondance entre les échantillons n'était autorisée et les quantifications relatives des protéines ont été effectuées à l'aide des intensités. L'analyse différentielle des données a été réalisée à l'aide du logiciel Prostar (v1.26.4 (Wieczorek et al., 2017)) ; après une transformation log₂ des protéines quantifiées par MaxQuant dans 70% des échantillons d'au

moins un groupe. Une normalisation par quantile a été appliquée. Les valeurs manquantes ont été imputées séparément en fonction de leur caractère partiellement ou complètement manquant dans un groupe d'échantillons par un quantile de la distribution de chaque échantillon (méthode DetQuantile). Les analyses différentielles ont été complétées après l'ajustement de la valeur p avec la méthode de Benjamini-Hochberg. Les résultats étaient significatifs avec une valeur p égale ou inférieure à 0.01 et un FDR inférieur à 5%. L'analyse de regroupement hiérarchique a été réalisée sur la base des distances euclidiennes avec une analyse de liaison basée sur les moyennes. Les analyses d'enrichissement des termes de l'ontologie génique (GO) et des voies KEGG (Encyclopédie de Kyoto des Gènes et des Génomes ont été réalisées à l'aide de STRING (analyse d'enrichissement fonctionnel du réseau de protéines-protéines, version11.5, (Szklarczyk et al., 2023)) avec un score d'interaction d'au moins 0.700.

II ANNEXE 2: Septic Shock as a trigger of arterial stress-induced premature senescence: a new pathway involved in the post sepsis long term cardiovascular complications



Contents lists available at ScienceDirect

Vascular Pharmacology

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

Septic shock as a trigger of arterial stress-induced premature senescence: A new pathway involved in the post sepsis long-term cardiovascular complications

Hamid Merdji^{a,b}, Mohamad Kassem^a, Louise Chomel^a, Raphaël Clere-Jehl^b, Julie Helms^{a,b}, Kei Kurihara^{a,c}, Ahmed Bey Chaker^a, Cyril Auger^a, Valérie Schini-Kerth^a, Florence Toti^a, Ferhat Meziani^{a,b,*}

^a INSERM (French National Institute of Health and Medical Research), UMR 1260, Regenerative Nanomedicine (RNM), CRBS (Centre de Recherche en Biomédecine de Strasbourg), FMTS (Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg), University of Strasbourg, Strasbourg, France

^b Department of Intensive Care (Service de Médecine Intensive - Réanimation), Nouvel Hôpital Civil, Hôpital Universitaire de Strasbourg, Strasbourg, France

^c Aichi Medical University, Department of Transplantation and Regenerative Medicine, Fujita Health University, School of Medicine, Aichi, Japan

ARTICLE INFO

Keywords:

Septic shock
sepsis
Stress-induced premature senescence
Atherosclerosis

ABSTRACT

Background: Major adverse cardiovascular events among sepsis survivors is an emerging health issue. Because endothelial senescence leads to vascular dysfunction and atherothrombosis, sepsis could be associated to vascular stress-induced premature senescence and thus with long-term cardiovascular events.

Materials & methods: Adult Wistar male rats were submitted to cecal ligation and puncture, or a SHAM operation. Markers of inflammation, oxidative stress and endothelial senescence were assessed at 3, 7 and 90 days (D), and vascular reactivity was assessed in conductance and resistance vessels at D90. Expression of proteins involved in senescence and inflammation was assessed by Western blot analysis and confocal microscopy, oxidative stress by dihydroethidium probing.

Results: Pro-inflammatory endothelial ICAM-1 and VCAM-1 were up-regulated by three-fold in CLP vs. SHAM at D7 and remained elevated at D90. Oxidative stress followed a similar pattern but was detected in the whole vascular wall. Sepsis accelerated premature senescence in aorta vascular tissue as shown by the significant up-regulation of p53 and down-stream p21 and p16 senescent markers at D7, values peaking at D90 whereas the absence of significant variation in activated caspase-3 confirmed p53 as a prime inducer of senescence. In addition, p53 was mainly expressed in the endothelium. Sepsis-induced long-term vascular dysfunction was confirmed in aorta and main mesenteric artery, with a major alteration of the endothelial-dependent nitric oxide pathway.

Conclusions: Septic shock-induced long-term vascular dysfunction is associated with endothelial and vascular senescence. Our model could prove useful for investigating senotherapies aiming at reducing long-term cardiovascular consequences of septic shock.

Nonstandard abbreviations

SIRS	systemic inflammatory response syndrome
ICU	intensive care unit
EC	endothelial cell
MACEs	major adverse cardiac events
SIPS	stress-induced premature senescence
TF	transcription factor
SASP	senescence-associated secretory phenotype

(continued on next column)

(continued)

CLP	cecal ligation and puncture
PE	phenylephrine
Ach	acetylcholine
PBS	phosphate buffer saline
ROS	reactive oxygen species
NO	nitric oxide
WB	western blot

* Corresponding author at: Service de Médecine Intensive- Réanimation – Nouvel Hôpital Civil, 1, place de l'Hôpital, F-67091 Strasbourg, Cedex, France.
E-mail address: ferhat.meziani@chru-strasbourg.fr (F. Meziani).

<https://doi.org/10.1016/j.vph.2021.106922>

Received 26 May 2021; Received in revised form 16 September 2021; Accepted 23 September 2021

Available online 27 September 2021

1537-1891/© 2021 Published by Elsevier Inc.

Please cite this article as: Hamid Merdji, *Vascular Pharmacology*, <https://doi.org/10.1016/j.vph.2021.106922>

1. Introduction

Sepsis is a life-threatening multiple organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection characterized by a systemic inflammatory response syndrome (SIRS), altering cardiovascular function (1) and is recognized as global health priorities by the World Health Organization (2). Although a precise estimate of the global epidemiological burden of sepsis is difficult to ascertain, sepsis was recently reported to affect worldwide 49 million people and cause 11 million deaths every year (3). In intensive care unit (ICU), sepsis is also the leading cause of mortality (4). However, long-term survival has improved, with approximately 14 million sepsis survivors each year (5) but generating a significant healthcare burden with adverse outcomes (6).

Sepsis is characterized by an endothelial cell (EC) dysfunction, affecting vascular tone and barrier's role (7), favoring systemic inflammation and coagulation activation (8) and multiple organ dysfunction. Vascular endothelium is critically involved in vascular homeostasis, including angiogenesis, blood pressure regulation, coagulation (9). Sepsis has been associated with acute and/or higher rates of cardiovascular complications linked to endothelial dysfunction, including atherothrombosis, ischemic stroke, hypertension and thrombotic events (10). The incidence of long-term cardiovascular diseases in post sepsis survivors is an emerging health issue, as indicated by recent propensity matched studies underlying an increased risk of major adverse cardiac events (MACEs) such as myocardial infarction and stroke (11). Indeed, an increased risk of mild- to long-term mortality among sepsis survivors is possibly related to an elevated rate of post-sepsis cardiovascular events as atherosclerosis (12,13) with yet not elucidated mechanisms.

During ageing, replicative senescence occurs as a result of telomere shortening. However, senescence can also be induced in young cells exposed to exogenous stressors, phenomenon identified as Stress-Induced Premature Senescence (SIPS) (14). In senescent cells, the transcription factor (TF) p53 is an upstream initiator (15), whereas downstream other TF as p21 and p16 inhibit the progression of the cell cycle (16). Thus, endothelial cell senescence is characterized by an irreversible cell cycle arrest and a characteristic secretion profile termed senescence-associated secretory phenotype (SASP), including growth factors, proteases, and cytokines acting as potent autocrine and paracrine effectors affecting neighbor cells (17,18). Senescent ECs lining the vulnerable atherosclerotic plaques have been observed in human coronary arteries and aortic arches of elderly patients (19). However, to date and to the best of our knowledge, the premature or accelerated

endothelial senescence are not assessed *in vivo* during septic shock.

We therefore hypothesized that septic shock syndrome may favor premature and sustained EC senescence, which in turn promotes long-term atherothrombosis. For this purpose, we established an original three months sepsis rat model to investigate vascular markers of inflammation and senescence as well as endothelial dysfunction.

2. Material and methods

2.1. Study overview

We assessed long-term effects of sepsis on clinical parameters, systemic inflammation and atherothrombosis in young male Wistar rats without preexisting cardiovascular disease. Rats were submitted to cecal ligation and puncture (CLP), the "gold standard" model of sepsis in animals (20). Rats were randomly assigned to the CLP or SHAM subset and kept in the animal facility up to 3 months. Rats were sacrificed at selected time points (3, 7, 90 days) to assess lactate plasma concentration, glycemia, blood pressure, body weight, the degree of endothelial senescence, the aorta vascular tone and vascular markers of oxidative stress (Fig. 1).

2.2. Ethics statement

Male Wistar rats (Janvier-Labs, Le Genest-St-Isle, France) were housed in a temperature controlled (22 °C) room and maintained on a standard 12-h light/dark cycle (lights on at 07:00 am), with free access to food and water. All aspects of this study complied with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the National Institutes of Health (NIH Publication 85-23 (revised 1996)) and were approved by the French Ministry of Higher Education and Research and by a local Ethic Committee (Comite d'éthique en Matière d'expérimentation animale de Strasbourg, authorization number 15498). All animal experiments were done in a registered animal yard within Faculty of Pharmacy (Authorization number E 67-218-26).

2.3. Sepsis induction

Sepsis was induced by cecal ligation and puncture (CLP), a polymicrobial model of sepsis, previously described by Rittirsch et al. (21). Rats (mean weight 332 ± 30 g) were randomly assigned to either a SHAM group or CLP group and operated as described below. During surgical procedures, rats were anesthetized with isoflurane 1–2% (Piramal Critical Care, Pennsylvania, USA) and analgesia was performed

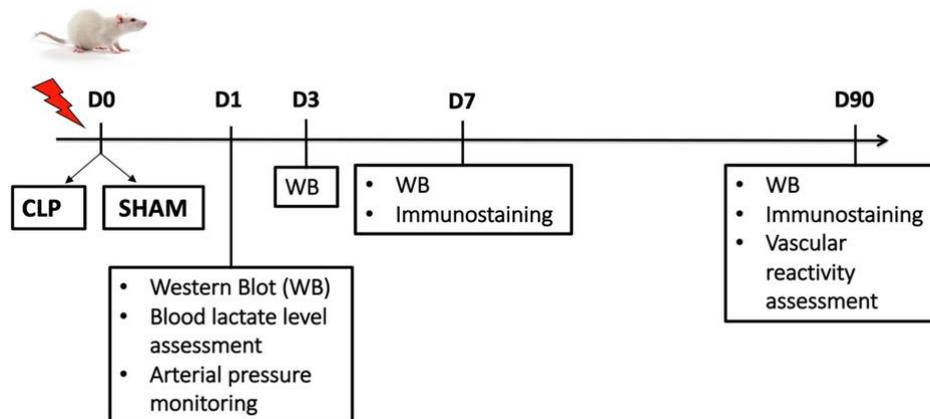


Fig. 1. Time scale of the experimental protocol.

with subcutaneous buprenorphine 0.01 mg/kg of body weight (CEVA, Libourne, France). A subcutaneous injection of 2 mg/kg lidocaine 1% (MSD Santé Animale, New-Jersey, USA) was performed before skin incision. Under aseptic conditions, a 1.5 cm midline laparotomy was performed to allow exposure, ligation and puncture of the caecum with a 21-gauge needle. A small amount of feces was extruded, the caecum returned into the peritoneal cavity and the incision was closed using two layers of sutures. SHAM rats underwent a midline laparotomy and cecal exposure without further manipulation. All rats received a subcutaneous injection of 0.9% NaCl (5–10 ml/kg of body weight) for fluid loss immediately after the surgery. In addition, a subcutaneous injection of buprenorphine 0.01 mg/kg was done each 6 h during 2 days. Rats had free access to standard chow and water after induction of sepsis. Three days (D3), seven days (D7) or three months (D90) after surgery, rats were sacrificed after being anesthetized with isoflurane, and whole blood collected through cardiac puncture. All rats that reached D90 were weighted (mean weight 497 ± 23 g).

2.4. Characterization of the sepsis degree of severity

Blood lactate levels were measured as a surrogate marker of severity 1 h and 24 h after the experimental procedure (H1, H24). Blood pressure was measured 24 h after the end of the procedure using a femoral intra-arterial line performed under anesthesia by isoflurane.

2.5. Isolation of rat aortic tissue

Aortas (3–5 cm) were harvested at day 90 (D90). Briefly, rats were anesthetized with isoflurane. A median sternotomy was performed, and aorta were carefully excised and cut into 0.5 cm segments for histological and biochemical analysis. Segments from the aortic cross, the thoracic and abdominal aorta were either included into OCT (frozen section compound) or directly flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C for later use.

2.6. Assessment of inflammation and senescence markers by Western blot

Proteins were extracted from the aortic tissue after grinding using liquid nitrogen by RIPA lysis buffer (20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM sodium pyrophosphate, 0.01 M okadaic acid, 20 mM, a tablet of protease inhibitor (Roche, Basel, Switzerland), and 1% Triton X-100 (Euromedex, Souffelweyershem, France). Proteins (20 µg) were separated by 10% or 12% SDS-PAGE at 100 V for 2 h and further electrophoretically transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (GE Healthcare, VWR, Fontenay-sous-Bois, France) at 100 V for 2 h. Membrane non-specific binding sites were blocked in Tris-buffered saline (TBS) solution containing 5% BSA (Bovine Serum Albumin) and 0.1% Tween-20 (Euromedex) for 1 h at room temperature. Proteins of interest were probed with specific primary antibodies in blocking solution, rabbit monoclonal anti-VCAM-1 (ab215380, 1:1000, Abcam, UK), mouse monoclonal anti-ICAM-1 (ab171123, 1:1000, Abcam), rabbit polyclonal anti-COX-2 (ab15191, 1:1000, Abcam), rabbit polyclonal anti-Cleaved Caspase 3 (9661 L, 1:1000, Cell signaling, USA), mouse monoclonal anti-p21 (sc-817, 1:1000; Santa Cruz Biotechnology, USA) and rabbit polyclonal anti-p53 (sc-6243, 1:1000; Santa Cruz Biotechnology), rabbit polyclonal anti-p16 (250,804, 1:500, Abbiotec, USA) at 4 °C overnight.

Membranes were washed three times with TBS-T (TBS-Tween, Euromedex) and incubated with peroxidase-labeled secondary antibodies; anti-rabbit (7074 s, 3:10000, Cell signaling technology, USA) or anti-mouse (7076 s, 1:10000, Cell signaling technology, USA) for 60 min, at room temperature. Immunostaining was revealed by chemiluminescence solution (ECL, Bio-Rad laboratories, USA). The chemiluminescence signal was recorded with ImageQuant LAS 4000 system (GE Healthcare Europe GmbH, Velizy-Villacoublay, France) and analyzed using ImageQuant TL software (version 8.1, GE Healthcare).

Quantitative normalization with respect to β -tubulin as the house-keeping protein was performed for each protein of interest using a specific antibody (mouse monoclonal anti- β -tubulin I T7816, Sigma-Aldrich, Missouri, USA).

2.7. Vascular reactivity

ex vivo vascular reactivity of aorta and main mesenteric artery rings was assessed as previously described (22). Briefly, the aorta or the main mesenteric artery were cleaned of connective tissue, cut into rings (2–3 mm in length) and suspended in organ baths containing oxygenated (95% O₂, 5% CO₂) Krebs bicarbonate solution (NaCl 119 mM, KCl 4.7 mM, KH₂PO₄ 1.18 mM, MgSO₄ 1.18 mM, CaCl₂ 1.25 mM, NaHCO₃ 25 mM, D-glucose 11 mM, pH 7.4, at 37 °C) for the determination of changes in isometric tension. After equilibration and functional tests, rings were pre-contracted with phenylephrine (PE, 1 µM) before construction of concentration-relaxation curves to acetylcholine (ACh). In some experiments, rings were exposed to an inhibitor for 30 min before contraction with PE. Relaxations were expressed as percentage of the contraction induced by PE (23).

2.8. Immunofluorescence staining and confocal microscopy

Freshly dissected aorta abdominal segments were frozen with frozen section compound, cut to 14 µm section and fixed in paraformaldehyde 4% (or with Acetone: Alcohol, 50:50 mixture for anti-p53 antibody) during 30 min at room temperature before three washes in Phosphate buffer saline (PBS). Blocking of nonspecific binding sites was done in PBS containing 1% PFA and 0.1% Triton for 30 min before overnight incubation at 4 °C with either a mouse monoclonal antibody to p53 (sc-6243, 1:50; Santa Cruz Biotechnology, Germany), eNOS (610,297, 1:100; BD Bioscience, USA), iNOS (610,329, 1:200; BD Bioscience, USA) or a polyclonal rabbit antibody to MMP-9, (ab38898, 1:200; Abcam, UK). After three washes, tissue sections were incubated in the dark for 1 h at room temperature with the respective secondary antibodies: Alexa fluor-633-labeled anti-mouse IgG (A21052, 1:400, Life Technologies, USA) or Alexa fluor-633-labeled anti-rabbit IgG (A21071, 1:400, Life Technologies, USA). After three washes, slides were counterstained with DAPI before being mounted under coverslip using fluorescence mounting medium (DAKO, USA), dried in the dark and analyzed.

2.9. Determination of the vascular level of reactive oxygen species

The level of oxidative stress in tissues was determined using Dihydroethidium (DHE), a redox-sensitive fluorescent probe. After incubation of the tissues with a pharmacological inhibitor for 30 min, reactive oxygen species (ROS) sources were identified using 2.5 µM DHE, a redox-sensitive fluorescent probe incubated for 30 min, at 37 °C in a light protected humidified chamber. The nuclei were counterstained by DAPI labelling. After washings three time with PBS, slides were mounted under coverslip using fluorescence mounting medium (DAKO, USA), dried in dark and analyzed by confocal microscopy (Leica SP2 UV DM IRBE; Leica, Heidelberg, Germany). Fluorescence signal were quantified by Image J software after elimination of the autofluorescence signal.

2.10. Statistical analysis

Data, expressed as mean \pm standard deviation (S.D.), were analyzed using GraphPad Prism8® (GraphPad Software, Inc., CA, US). “n” represents the number of animals. Mean values were compared using unpaired Student’s *t*-test for the comparisons of two groups for quantitative confocal microscopy results and western blot analysis. Statistical variance between different groups was determined by applying Two-way analysis of variance (ANOVA) test for vascular reactivity studies. Survival curves were analyzed by the log-rank (Mantel-Cox) and Gehan-Breslow-Wilcoxon tests. A *p* value < 0.05 was considered statistically

significant. All measurements were from at least three separate individuals.

3. Results

3.1. Septic shock induced arterial inflammation: A long-lasting effect

Twenty-four hours after CLP, a significant drop in the mean arterial pressure (MAP) was observed (CLP: 77.3 ± 6.8 vs. SHAM: 99.9 ± 2.3 mmHg, $p < 0.01$). Blood lactate concentration was accordingly significantly higher in CLP compared to SHAM (3.2 ± 0.1 vs. 1.8 ± 0.06 mM; $p < 0.01$) indicating tissue hypoperfusion and cellular hypoxia (24). Mortality only occurred in the CLP group and only during the first few days after surgery (Supplementary Data, Table A and Fig. A). Altogether, data confirmed a 24 h induced septic shock as previously described (25). Because ROS production was reported to promote senescence (26), we assessed ROS in the thoracic aorta wall. At D7, a 2-fold ROS increase was measured (CLP: 1759 ± 175.2 A.U., vs. SHAM: 844.3 ± 49.9 A.U.) the elevation being only 54% after 3 months (Fig. 2A). The ROS source was mainly the cell nucleus as confirmed by counterstaining with DAPI.

Similar data were found in the abdominal aorta.

Nevertheless, the expression of MMP-9, a matrix metalloproteinase associated with inflammation and senescence (27), was barely detectable in abdominal aorta from both CLP and SHAM animals at D7 by immunostaining but was drastically increased by 5 times in CLP at D90, as demonstrated by confocal microscopy (16.6 ± 2.7 vs. 91.1 ± 17.2 , $p < 0.05$) (Fig. 2B). Furthermore, the MMP-9 expression was mainly detected in the endothelium. While the expression of VCAM-1 and ICAM-1 was similar between CLP and SHAM at D3 in the abdominal or cross aorta (Supplementary data, Fig. B.1 and B2), sepsis induced a respective three-fold and two-fold significant up-regulation of VCAM-1 and ICAM-1 in the CLP subset compared to SHAM at D7 ($p < 0.05$) (Fig. 2C and D), values remaining elevated at D90 at least in the investigated thoracic aorta.

3.2. Sepsis induced premature senescence

While no marker of senescence could be detected in the abdominal aortic wall at D3 post peritonitis (Supplementary data, Fig. B.3, B.4 and B.5), the expression of p53, the upstream protein of the senescence

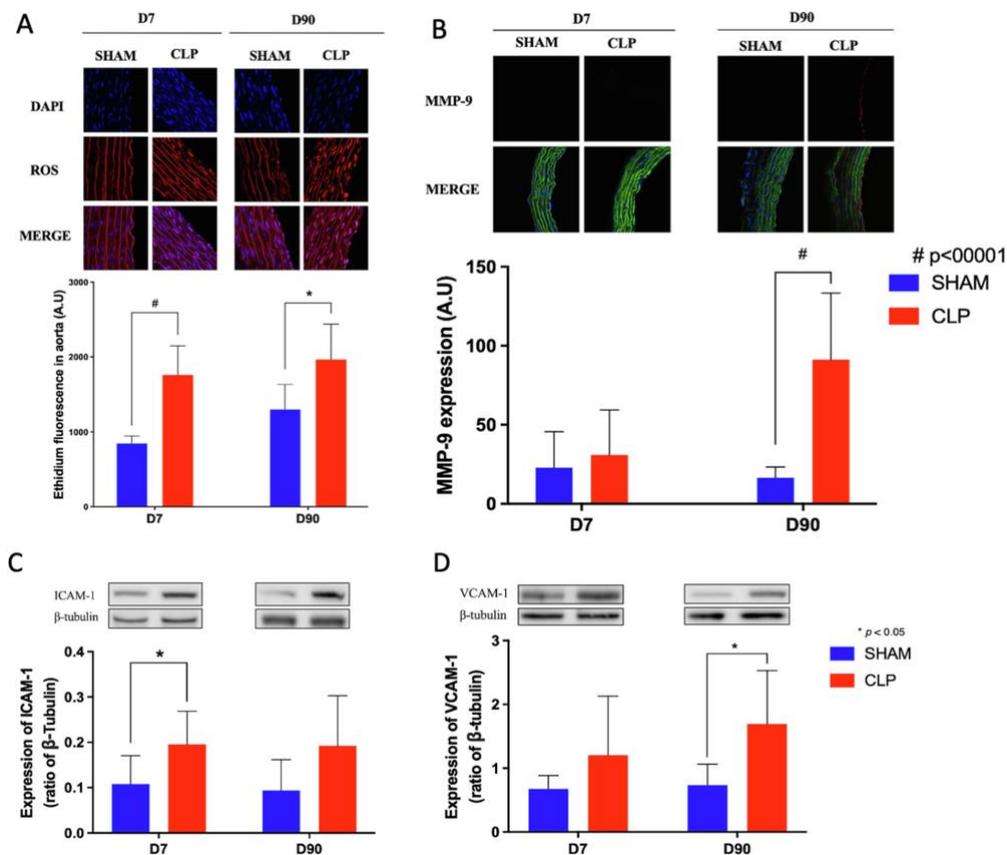


Fig. 2. 2A: Sepsis induces a persistent vascular up-regulation of ROS in aorta rings at D7 and D90. ROS were labeled in aorta rings by DHE probing (red) at D7 ($p = 0.02$) and D90 ($p = 0.03$). Sections were counterstained with DAPI to identify the nucleus. Endothelium is facing the right part of each quadrant. 2B: Sepsis induces a persistent endothelial up-regulation of MMP-9 in abdominal aorta rings at D7 ($p = 0.22$) and D90 ($p = 0.01$). Endothelium is facing the right part of each quadrant. 2C: Sepsis induces a persistent up-regulation of ICAM-1 expression in aorta extracts at D7 ($p = 0.04$) and D90 ($p = 0.06$). 2D: Sepsis induces a persistent up-regulation of VCAM-1 expression in aorta extracts at D7 ($p = 0.19$) and D90 ($p = 0.01$). Data are expressed as mean and standard deviation (SD). D7: SHAM $n = 6$; CLP $n = 7$ and D90: SHAM $n = 11$; CLP $n = 8$. Unpaired Student's t -test was applied. * $p < 0.05$. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

pathway also associated with apoptosis, and of downstream p21 and p16 was enhanced by respectively 3 folds, 10 folds and 4 folds measured by western blot analysis at D7 ($p < 0.05$; Fig. 3A-B-D). Up-regulation of all senescence markers persisted after 3 months (Fig. 3A-C-D). The 3-fold elevation in p53, remained stable between D7 and D90, in accordance with the absence of any caspase-3 activation in SHAM or CLP group, thereby excluding apoptosis (Fig. 3E). Interestingly, at D90, p21 was only elevated by 5 folds, and the downstream p16 by 3.6 folds, pointing at a senescence-driven pathway, still operating after 3 months, although at a lower range. Moreover, the 3-fold increase in p53 expression was also measured by fluorescence microscopy in the endothelium of the aorta of CLP rats compared to SHAM at D7, a 2.5 enhancement being still observed after 3 months (Fig. 3F).

3.3. Septic shock is associated to long-term impairment of vascular reactivity

In the thoracic aorta, three months after peritonitis induction, a 50% reduction of the maximal contractile response to PE (Fig. 4A) and a 30% reduction in ACh-induced relaxation was observed in CLP group (Fig. 4B) with a maximal relaxation at 85% (vs. SHAM 55%, $p < 0.05$) (Fig. 4B). After indomethacin or L-NA adjunction, the contractile response of CLP aorta was similar compared to untreated SHAM rings (Supplementary data, Figure C.1 and C.2). In the thoracic aorta rings,

indomethacin adjunction, a non-selective inhibitor of cyclooxygenases, did not significantly alter the difference between CLP and SHAM ACh-induced relaxation (Supplementary data, Figure D.1). The eNOS inhibitor L-NA abolished the relaxation to ACh, thereby confirming a major role of nitric oxide (NO) (Supplementary data, Figure D.2).

Altogether, the endothelial dysfunction of the aorta rings 3 months after septic shock was mainly characterized by a blunted NO-component relaxation. In accordance, the aorta protein extracts showed a 40% reduction of eNOS expression occurring in CLP rats as early as D7 and persisting at D90, that was found restricted to the endothelial lining by fluorescence microscopy (Fig. 5). No significant difference was found, however, when comparing iNOS expression in both group at D7 and at D90 (Fig. 6).

In the main mesenteric artery, three months after peritonitis induction, a 50% reduction of the maximal contractile response to PE (Fig. 4C) was observed, however ACh-induced endothelial relaxation remained similar between CLP and SHAM with a maximal relaxation of 80% (Fig. 4D). Inhibition of COX by indomethacin and of the endothelium-derived hyperpolarization (EDH)-mediated relaxation in the presence of UCL-1684 plus TRAM-34 (10 μ M each) revealed a reduction in ACh-induced relaxation down-to 45% maximal relaxation, that was only evidenced in CLP (Supplementary data, Fig. E.1), thereby confirming a blunted NO pathway 90 days after peritonitis. However, adjunction of indomethacin plus L-NA combination indicated a slightly lower (EDH)-

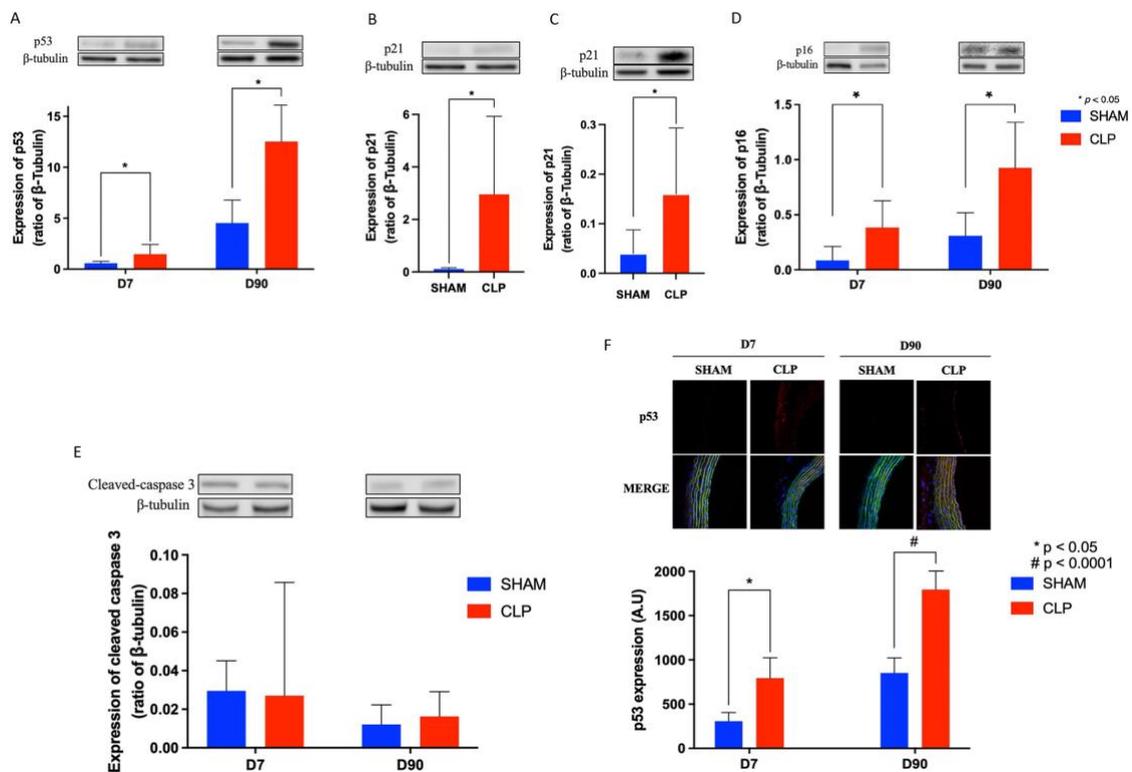


Fig. 3. 3A: Sepsis induces a persistent vascular up-regulation of p53 in aorta extracts at D7 ($p = 0.01$) and D90 ($p = 0.04$). 3B and 3C: Sepsis induces a persistent vascular up-regulation of p21 in aorta extracts at D7 (3B) ($p = 0.03$) and D90 (3C) ($p = 0.04$). 3D: Sepsis induces a persistent vascular up-regulation of p16 in aorta extracts at D7 ($p = 0.01$) and D90 ($p = 0.004$). 3E: Caspase 3 expression in aorta extracts was measured at D7 ($p = 0.09$) and D90 ($p = 0.1$). 3F: Sepsis induces a persistent endothelial up-regulation of p53 in abdominal aorta rings at D7 ($p = 0.02$) and D90 ($p = 0.001$). Data are expressed as mean and standard deviation (SD). D7: SHAM $n = 6$; CLP $n = 7$ and D90: SHAM $n = 11$; CLP $n = 8$. Unpaired Student's t-test was applied. * $p < 0.05$. Endothelium is facing the right part of each quadrant.

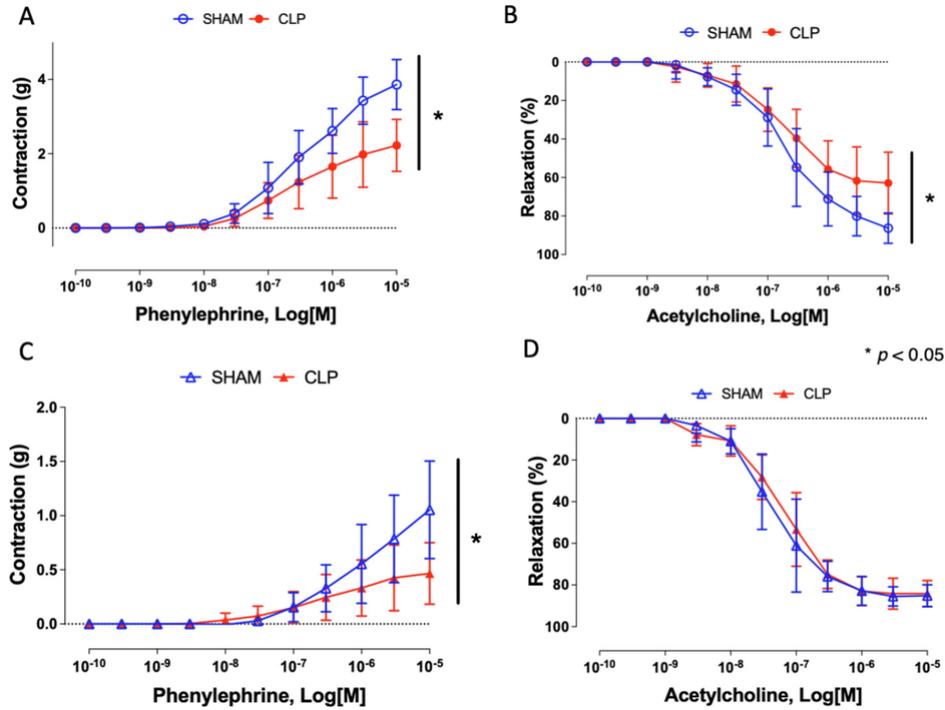


Fig. 4. Effect of sepsis on the endothelium-dependent contractile response to phenylephrine (4A) ($p < 0.0001$) and the endothelium-dependent relaxation to acetylcholine (4B) on aorta rings at D90 ($p = 0.01$). Effect of sepsis on the endothelium-dependent contractile response to phenylephrine (4C) ($p = 0.0001$) and the endothelium-dependent relaxation to acetylcholine (4D) on main mesenteric artery rings at D90 ($p > 0.9$). Values are shown as mean and standard deviation (SD). SHAM $n = 5$; CLP $n = 7$. Two-way ANOVA test was applied. * $p < 0.05$.

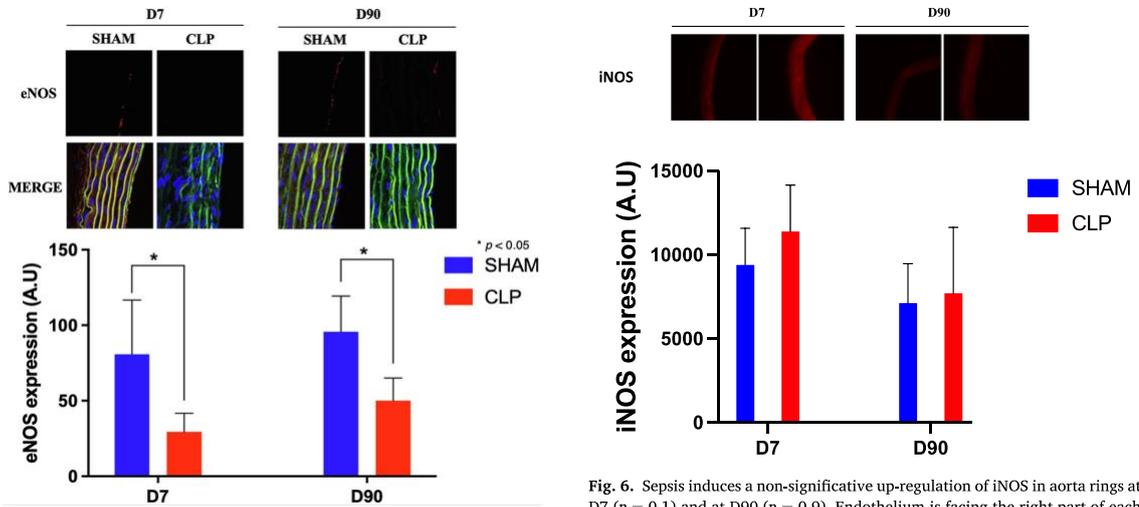


Fig. 5. Sepsis induces a persistent endothelial down-regulation of eNOS in aorta rings at D7 ($p = 0.04$) and at D90 ($p = 0.006$). Endothelium is facing the right part of each quadrant. Data are expressed as mean and standard deviation (SD). SHAM $n = 6$; CLP $n = 6$. Unpaired Student's t-test was applied. * $p < 0.05$.

Fig. 6. Sepsis induces a non-significant up-regulation of iNOS in aorta rings at D7 ($p = 0.1$) and at D90 ($p = 0.9$). Endothelium is facing the right part of each quadrant. Data are expressed as mean and standard deviation (SD). SHAM $n = 6$; CLP $n = 6$. Unpaired Student's t-test was applied. * $p < 0.05$.

component relaxation in CLP as compared to SHAM, although

significant was not reached (Supplementary data, Fig. E.2). The endothelial dysfunction in mesenteric arteries relaxation was altogether characterized by blunted endothelium-dependent relaxation mainly due

to the alteration of the NO pathway and possibly compensated by the prostanoids and EDH (Supplementary data, Fig. E.3). Indeed, endothelium-dependent contractile responses was observed in CLP rats compared to SHAM.

A 60% decrease in main mesenteric artery contraction was observed in CLP rats in response to 10–5 M PE and indomethacin adjunction indicated limited involvement of COX-mediated prostanoid pathway (Supplementary data, Fig. F.1). *In-vitro* inhibition of both COX by indomethacin and of the endothelium-derived hyperpolarization (EDH) pathways in the presence of TRAM-34 plus UCL-1684 (10 μ M each) indicated a significant dependence on the NO pathway in SHAM rats (50% loss) that was barely significant in CLP rats most likely owing to the downregulation of the eNOS probably reducing availability of NO (Supplementary data, Fig. F.2). However, after indomethacin and L-NA adjunction, the contractile response of CLP mesenteric arteries was similar compared to untreated SHAM rings, indicating a dual contribution of prostanoids and NO pathways 3 months after the induction of peritonitis (Supplementary data, Fig. F.3). L-NA adjunction alone almost had the same effect (Supplementary data, Fig. F.4).

As changes in vascular reactivity are usually associated with wall remodeling, we compared the wall thickness in aorta after 3 months. No differences were found between the SHAM and the CLP group (Supplementary data, Fig. G).

4. Discussion

The present study was designed to assess the long-term impact of sepsis on vascular function. We focused on endothelial senescence as possible mechanism. The main finding was that sepsis induced arterial dysfunction with a time dependent *in situ* acquisition of inflammation and senescence phenotype in both conductance and resistance arteries, therefore pointing at a systemic long-lasting effect.

Our present data confirmed sepsis-induced arterial inflammatory and oxidative stress in the acute phase (28,29), and highlighted an ongoing pro-inflammatory vascular activation until 3 months. Indeed, inflammation and oxidative stress over-expression were maximal at D7 and persisted in the arterial wall at 3 months, confirming their potential impact on sepsis-induced arterial inflammation and atherosclerosis (30–32). Because ROS are known as mediators of both premature and replicative endothelial cell senescence (26,33,34), we also investigated SIPS. Furthermore, endothelial senescence is an early indicator of atheroprone vascular sites, suggesting its potential implication in atherogenesis initiation and progression (35). Furthermore, p53 and p21 have been identified as markers of ageing-related senescence in arteries of elderly patients (36). Our present data support the hypothesis that sepsis triggers the premature expression of key transcription factors involved in senescence: p53, p21 and p16 were overexpressed as early as D7 in the abdominal and cross segments of the aorta of septic rats. Overexpression of p53 and downstream p16 was even higher at D90 suggesting amplification over-time. Interestingly, the p53 up-regulation was located in the endothelial layer as demonstrated by confocal microscopy, thereby pointing at endothelial senescence involvement during septic shock. Interestingly, as reported by others (37,38), apoptosis remained minor.

Because, ageing ECs progressively acquire a dysfunctional phenotype, characterized by pro-oxidant, pro-inflammatory, pro-coagulant alterations, and a drastic loss in nitric oxide associated to cardiovascular diseases (39), one could potentially advance that septic shock-induced endothelial senescence is a mechanism leading to long-term cardiovascular complications. Indeed, in addition to data confirming that septic shock is associated to systemic arterial dysfunction during the acute phase mainly *via* altered NO pathway (9,40), we report herein the first long-term persistent vascular dysfunction: our data suggest remote endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries that was characterized by long-term blunted endothelium-dependent relaxation and contraction at D90. Interestingly, the selective over-expression of

endothelial p53 in rats' aortic rings infected by a p53-expressing adenovirus, reduced endothelium-dependent relaxations and NO formation (41). In line with these observations, our data strongly suggest that p53-induced senescence is pivotal in the initiation and maintenance of endothelial dysfunction. Our data provide new insight on the long-term impairment of NO production and vasoprotection possibly prompted by accelerated senescence after septic shock. Several studies support our observation with a link between sepsis and premature senescence. In a murine endotoxemia model, telomere shortening was observed after 48 h in kidney, spleen and blood cells, pointing at a systemic effect (42). *In-vitro* studies also reported premature senescence after lipopolysaccharides treatment of adipocytes (43), pulmonary epithelial cells (44), microglia cells (45), and dental pulp stem cells (46). In atherosclerosis-prone mice, undeciphered plaque formation occurs along the whole aorta culminating at 5 months after peritonitis indicating accelerated atherogenesis prompted by septic shock (47). Our present data highlight arterial senescence and MMP-9 as potential new mechanistic players, specifically up-regulated in the endothelium after 3 months. This matrix metalloproteinase is involved in pro-inflammatory responses, endothelial dysfunction, atherosclerosis (48) and cardiac senescence by promoting an inflammaging profile (27).

While the Canakinumab Anti-Inflammatory Thrombosis Outcomes Study trial (CANTOS) has proven the feasibility of targeting pro-inflammatory responses to reduce the risk of cardiovascular events in patients with anti-interleukin-1 β therapy, the majority of clinical trials that aimed at controlling the inflammation-mediated vascular responses have failed (49). Interestingly, in critically ill children, inflammation was associated to leukocyte telomere shortening suggesting inflammation-driven senescence (50). Of note, few *in vitro* and *ex vivo* studies describe a link between sustained inflammation and endothelial senescence while endotoxemia was reported to shorten telomeres in rat kidney, spleen and blood tissues with no investigation of endothelial damage (42). Nevertheless, senescent cell displays a pro-inflammatory phenotype termed SASP (senescence-associated secretory phenotype) (51), that may also contribute to accelerated atherothrombosis (52). Therefore, endothelial senescence appears as a promising pharmacological target to limit plaque formation and senotherapy by contributing to the reversal of the senescent phenotype (53–55) should also be considered as a next-generation therapy for septic patients at cardiovascular risk (56,57). In a trial combining two senolytic drugs, dasatinib, a pan inhibitor of tyrosine kinases, and quercetin, an antioxidant and anti-inflammatory drugs mainly targeting PI3-Kinase and serpins, promising preliminary data were described in patients with cardiovascular risk factors (58,59). Similarly, in hypercholesterolemic mice chronic treatment by dasatinib and quercetin reduced aortic calcification and consecutive loss of cardiovascular function (60). In a myocardial infarction model of aged mice, administration of ABT263 another senolytic drug improved myocardial remodeling, diastolic function, and overall survival (61).

Study limitations: Endothelial senescence is probably not the only mechanism by which sepsis promotes atheroma. Although standardized, peritonitis-induced sepsis probably leads to several pathogens load from one animal to another, resulting in a complex host response. Thus, the number of molecular and cellular pathways that could potentially underlie the effects of sepsis is huge and will require exploring other paths.

We report a new model of long-term septic shock-induced vascular dysfunction that was associated with persisting endothelium senescence and pro-inflammatory responses. Our data highlight the crucial needs for a long-term evaluation in sepsis since pro-inflammatory and pro-senescent vascular effectors, that are barely detectable, may drastically accumulate over time and alter the endothelial response

5. Conclusion

The present findings indicate that sepsis accelerates endothelial senescence and induces persistent vascular dysfunction. Timely

acquisition of a senescence-induced endothelial and vascular dysfunction may partly explain atherosclerosis in sepsis survivors. Targeting pro-senescent endothelial cells with senolytics in sepsis may be of interest to delay endothelial senescence and improve vascular health and long-term outcome of sepsis.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.vph.2021.106922>.

Funding

Association d'Aide aux Insuffisants Respiratoires d'Alsace-Lorraine (ADIRAL, Strasbourg, France).

Data availability

All available data are published in the current manuscript.

Authors' contribution

All authors whose names appear on the submission contributed substantially to the conception and design of the study, the acquisition of data or the analysis and interpretation of the data.

- HM, FT and FM participated in designing the research
- HM, MK, JH, VSK, FT and FM participated in the writing and editing of the manuscript.
- HM, MK and KK performed the surgery on rat and the measurement of intra-femoral blood pressure.
- HM, MK, LC and KK performed the analyses on rat organs.
- HM, MK and KK performed the vascular reactivity.

Ethical approval

- Comité d'éthique en Matière d'expérimentation animale de Strasbourg (authorization number 15498).
- All animal experiments were done in a registered animal yard within Faculty of Pharmacy (Authorization number E 67–218-26).

Consent for publication

Not applicable.

At a glance

This work provides new insights into the role of septic shock leading to stress-induced premature senescence in vascular tissue. This senescent phenotype causes endothelial and vascular dysfunction involved in atherogenesis and may partly explain the increased risk of major adverse cardiovascular events in sepsis survivors.

Declaration of Competing Interest

No conflict of interest regarding the present manuscript has to be disclosed.

Acknowledgements

This project received financial support from the « Association d'Aide aux Insuffisants Respiratoires d'Alsace-Lorraine (ADIRAL, Strasbourg, France) ».

References

- [1] M. Singer, C.S. Deutschman, C.W. Seymour, M. Shankar-Hari, D. Annane, M. Bauer, et al., The third international consensus definitions for Sepsis and septic shock (Sepsis-3), *JAMA*. 315 (8) (2016) 801–810.

- [2] K. Reinhart, R. Daniels, N. Kissoon, F.R. Machado, R.D. Schachter, S. Finfer, Recognizing Sepsis as a Global Health priority - a WHO resolution, *N. Engl. J. Med.* 377 (5) (2017) 414–417.
- [3] K.E. Rudd, S.C. Johnson, K.M. Agesa, K.A. Shackelford, D. Tsoi, D.R. Kievan, et al., Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the global burden of disease study, *Lancet*. 395 (10219) (2020) 200–211.
- [4] J.L. Vincent, J. Rello, J. Marshall, E. Silva, A. Anzueto, C.D. Martin, et al., International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units, *JAMA*. 302 (21) (2009) 2323–2329.
- [5] C. Fleischmann, A. Scherag, N.K. Adhikari, C.S. Hartog, T. Tsaganos, P. Schlattmann, et al., Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated Sepsis. Current estimates and limitations, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 193 (3) (2016) 259–272.
- [6] M. Shankar-Hari, G.D. Rubenfeld, Understanding long-term outcomes following Sepsis: implications and challenges, *Curr. Infect. Dis. Rep.* 18 (11) (2016) 37.
- [7] A.N. Rizzo, P. Belvith, R. Demeritte, J.G.N. Garcia, E. Letsiou, S.M. Dudek, Arg mediates LPS-induced disruption of the pulmonary endothelial barrier, *Vascul. Pharmacol.* 128–129 (2020) 106677.
- [8] E.V. Dolmatova, K. Wang, R. Mandavilli, K.K. Griendling, The effects of sepsis on endothelium and clinical implications, *Cardiovasc. Res.* 117 (1) (2021) 60–73.
- [9] J. Boisrame-Helms, H. Kremer, V. Schini-Kerth, F. Meziani, Endothelial dysfunction in sepsis, *Curr. Vasc. Pharmacol.* 11 (2) (2013) 150–160.
- [10] K.H. Park, W.J. Park, Endothelial dysfunction: clinical implications in cardiovascular disease and therapeutic approaches, *J. Korean Med. Sci.* 30 (9) (2015) 1213–1225.
- [11] H.C. Prescott, J.J. Osterholzer, K.M. Langa, D.C. Angus, T.J. Iwashyna, Late mortality after sepsis: propensity matched cohort study, *BMJ* 353 (2016) i2375.
- [12] M.H. Wu, P.Y. Tsou, Y.H. Wang, M.G. Lee, C.C.T. Chao, W.C. Lee, et al., Impact of post-sepsis cardiovascular complications on mortality in sepsis survivors: a population-based study, *Crit. Care* 23 (1) (2019) 293.
- [13] R.T. Mankowski, S. Yende, D.C. Angus, Long-term impact of sepsis on cardiovascular health, *Intensive Care Med.* 45 (1) (2019) 78–81.
- [14] O. Toussaint, E.E. Medrano, T. von Zglinicki, Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes, *Exp. Gerontol.* 35 (8) (2000) 927–945.
- [15] A. Rufini, P. Tucci, I. Celardo, G. Melino, Senescence and aging: the critical roles of p53, *Oncogene*. 32 (43) (2013) 5129–5143.
- [16] N. Herranz, J. Gil, Mechanisms and functions of cellular senescence, *J. Clin. Invest.* 128 (4) (2018) 1238–1246.
- [17] G. Jia, A.R. Arora, C. Jia, J.R. Sowers, Endothelial cell senescence in aging-related vascular dysfunction, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 1865 (7) (2019) 1802–1809.
- [18] G. Katsuami, I. Shimizu, Y. Yoshida, T. Minamoto, Vascular senescence in cardiovascular and metabolic diseases, *Front. Cardiovasc. Med.* 5 (2018) 18.
- [19] E. Vasile, Y. Tomita, L.F. Brown, O. Kocher, H.F. Dvorak, Differential expression of thymosin beta-10 by early passage and senescent vascular endothelium is modulated by VPF/VEGF: evidence for senescent endothelial cells in vivo at sites of atherosclerosis, *FASEB J.* 15 (2) (2001) 458–466.
- [20] J.A. Buras, B. Holzmann, M. Sitkovsky, Animal models of sepsis: setting the stage, *Nat. Rev. Drug Discov.* 4 (10) (2005) 854–865.
- [21] D. Rittirsch, M.S. Huber-Lang, M.A. Flierl, P.A. Ward, Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture, *Nat. Protoc.* 4 (1) (2009) 31–36.
- [22] J.G. Abalde, Y. Iwakiri, M. Loureiro-Silva, O. Haq, W.C. Sessa, R.J. Grossmann, Mild increases in portal pressure upregulate vascular endothelial growth factor and endothelial nitric oxide synthase in the intestinal microcirculatory bed, leading to a hyperdynamic state, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 290 (5) (2006) G980–G987.
- [23] N. Idris Khodja, T. Chataigneau, C. Auger, V.B. Schini-Kerth, Grape-derived polyphenols improve aging-related endothelial dysfunction in rat mesenteric artery: role of oxidative stress and the angiotensin system, *PLoS One* 7 (2) (2012), e32039.
- [24] X. Zhai, Z. Yang, G. Zheng, T. Yu, P. Wang, X. Liu, et al., Lactate as a potential biomarker of Sepsis in a rat Cecal ligation and puncture model, *Mediat. Inflamm.* 2018 (2018) 8352727.
- [25] J. Boisrame-Helms, X. Delabranche, S.E. Degirmenci, F. Zobairi, A. Berger, G. Meyer, et al., Pharmacological modulation of procoagulant microparticles improves haemodynamic dysfunction during septic shock in rats, *Thromb. Haemost.* 111 (1) (2014) 154–164.
- [26] M. Abbas, L. Jesel, C. Auger, L. Amoura, N. Messas, G. Manin, et al., Endothelial microparticles from acute coronary syndrome patients induce premature coronary artery endothelial cell aging and Thrombogenicity: role of the Ang II/AT1 receptor/NADPH oxidase-mediated activation of MAPKs and PI3-kinase pathways, *Circulation*. 135 (3) (2017) 280–296.
- [27] Y. Ma, Y.A. Chiao, R. Clark, E.R. Flynn, A. Yabluchanskiy, O. Ghasemi, et al., Deriving a cardiac ageing signature to reveal MMP-9-dependent inflammatory signalling in senescence, *Cardiovasc. Res.* 106 (3) (2015) 421–431.
- [28] H. Kremer, C. Baron-Menguy, A. Tesse, Y. Gallois, A. Mercat, D. Henrion, et al., Human serum albumin improves endothelial dysfunction and survival during experimental endotoxemia: concentration-dependent properties, *Crit. Care Med.* 39 (6) (2011) 1414–1422.
- [29] J. Joffre, J. Hellman, C. Ince, H. Ait-Oufella, Endothelial responses in Sepsis, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 202 (3) (2020) 361–370.
- [30] M. Back, A. Yurdagul Jr., I. Tabas, K. Oorni, P.T. Kovanen, Inflammation and its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities, *Nat. Rev. Cardiol.* 16 (7) (2019) 389–406.

- [31] D. Wolf, K. Ley, Immunity and inflammation in atherosclerosis, *Circ. Res.* 124 (2) (2019) 315–327.
- [32] G.M. Gager, B. Biesinger, F. Hofer, M.P. Winter, C. Hengstenberg, B. Jilma, et al., Interleukin-6 level is a powerful predictor of long-term cardiovascular mortality in patients with acute coronary syndrome, *Vasc. Pharmacol.* 135 (2020) 106806.
- [33] D. Burger, D.G. Kwart, A.C. Montezano, N.C. Read, C.R. Kennedy, C.S. Thompson, et al., Microparticles induce cell cycle arrest through redox-sensitive processes in endothelial cells: implications in vascular senescence, *J. Am. Heart Assoc.* 1 (3) (2012), e001842.
- [34] S. Khemais-Benkhat, N. Idris-Khodja, T.P. Ribeiro, G.C. Silva, M. Abbas, M. Kheloufi, et al., The redox-sensitive induction of the local angiotensin system promotes both premature and replicative endothelial senescence: preventive effect of a standardized Crataegus extract, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 71 (12) (2016) 1581–1590.
- [35] C.M. Warboys, A. de Luca, N. Amini, L. Luong, H. Duckles, S. Hsiao, et al., Disturbed flow promotes endothelial senescence via a p53-dependent pathway, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34 (5) (2014) 985–995.
- [36] R.G. Morgan, S.J. Ives, L.A. Lesniewski, R.M. Cawthon, R.H. Andtbacka, R. D. Noyes, et al., Age-related telomere uncapping is associated with cellular senescence and inflammation independent of telomere shortening in human arteries, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 305 (2) (2013) H251–H258.
- [37] R.S. Hotchkiss, K.W. Tinsley, P.E. Swanson, I.E. Karl, Endothelial cell apoptosis in sepsis, *Crit. Care Med.* 30 (5 Suppl) (2002) S225–S228.
- [38] B.G. Childs, D.J. Baker, J.L. Kirkland, J. Campisi, J.M. van Deursen, Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep.* 15 (11) (2014) 1139–1153.
- [39] G. Machado-Oliveira, C. Ramos, A.R.A. Marques, O.V. Vieira, Cell senescence, multiple organelle dysfunction and atherosclerosis, *Cells* 9 (10) (2020).
- [40] C. Ince, P.R. Mayeux, T. Nguyen, H. Gomez, J.A. Kellum, G.A. Ospina-Tascon, et al., The endothelium in Sepsis, *Shock* 45 (3) (2016) 259–270.
- [41] A. Kumar, C.S. Kim, T.A. Hoffman, A. Naqvi, J. Dericco, S.B. Jung, et al., p53 impairs endothelial function by transcriptionally repressing Kruppel-like factor 2, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31 (1) (2011) 133–141.
- [42] N.M. Oliveira, E.C.S. Rios, T.M. de Lima, V.J. Victorino, H. Barbeiro, F. Pinheiro da Silva, et al., Sepsis induces telomere shortening: a potential mechanism responsible for delayed pathophysiological events in sepsis survivors? *Mol Med.* 22 (2017) 886–891.
- [43] M. Zhao, X. Chen, Effect of lipopolysaccharides on adipogenic potential and premature senescence of adipocyte progenitors, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 309 (4) (2015) E334–E344.
- [44] C.O. Kim, A.J. Huh, S.H. Han, J.M. Kim, Analysis of cellular senescence induced by lipopolysaccharide in pulmonary alveolar epithelial cells, *Arch. Gerontol. Geriatr.* 54 (2) (2012) e35–e41.
- [45] H.M. Yu, Y.M. Zhao, X.G. Luo, Y. Feng, Y. Ren, H. Shang, et al., Repeated lipopolysaccharide stimulation induces cellular senescence in BV2 cells, *Neuroimmunomodulation.* 19 (2) (2012) 131–136.
- [46] X. Feng, G. Feng, J. Xing, B. Shen, W. Tan, D. Huang, et al., Repeated lipopolysaccharide stimulation promotes cellular senescence in human dental pulp stem cells (DPSCs), *Cell Tissue Res.* 356 (2) (2014) 369–380.
- [47] A.M. Kaynar, S. Yende, L. Zhu, D.R. Frederick, R. Chambers, C.L. Burton, et al., Effects of intra-abdominal sepsis on atherosclerosis in mice, *Crit. Care* 18 (5) (2014) 469.
- [48] J.M. Florence, A. Krupa, L.M. Booshehri, T.C. Allen, A.K. Kurdowska, Metalloproteinase-9 contributes to endothelial dysfunction in atherosclerosis via protease activated receptor-1, *PLoS One* 12 (2) (2017), e0171427.
- [49] P.M. Ridker, B.M. Everett, T. Thuren, J.G. MacFadyen, W.H. Chang, C. Ballantyne, et al., Antiinflammatory therapy with Canakinumab for atherosclerotic disease, *N. Engl. J. Med.* 377 (12) (2017) 1119–1131.
- [50] S. Verstraete, I. Vanhorebeek, E. van Puffelen, I. Derese, C. Ingels, S.C. Verbruggen, et al., Leukocyte telomere length in paediatric critical illness: effect of early parenteral nutrition, *Crit. Care* 22 (1) (2018) 38.
- [51] B.G. Childs, M. Gluscevic, D.J. Baker, R.M. Laberge, D. Marquess, J. Dananberg, et al., Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing, *Nat. Rev. Drug Discov.* 16 (10) (2017) 718–735.
- [52] N. Ruparelia, R. Choudhury, Inflammation and atherosclerosis: what is on the horizon? *Heart.* 106 (1) (2020) 80–85.
- [53] D.J. Baker, T. Wijshake, T. Tchkonja, N.K. LeBrasseur, B.G. Childs, B. van de Sluis, et al., Clearance of p16lnk4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders, *Nature.* 479 (7372) (2011) 232–236.
- [54] M. Xu, T. Pirtskhalava, J.N. Farr, B.M. Weigand, A.K. Palmer, M.M. Weivoda, et al., Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age, *Nat. Med.* 24 (8) (2018) 1246–1256.
- [55] S. Misuth, M. Uhrinova, J. Klimas, D. Vavrincova-Yaghi, P. Vavrinec, Vildagliptin improves vascular smooth muscle relaxation and decreases cellular senescence in the aorta of doxorubicin-treated rats, *Vasc. Pharmacol.* 138 (2021) 106855.
- [56] B.G. Childs, D.J. Baker, T. Wijshake, C.A. Conover, J. Campisi, J.M. van Deursen, Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis, *Science.* 354 (6311) (2016) 472–477.
- [57] E. Dookun, J.F. Passos, H.M. Arthur, G.D. Richardson, Therapeutic potential of senolytics in cardiovascular disease, *Cardiovasc Drugs Ther.* (2020), <https://doi.org/10.1007/s10557-020-07075-w>.
- [58] L.J. Hickson, L.G.P. Langhi Prata, S.A. Bobart, T.K. Evans, N. Giorgadze, S. K. Hashmi, et al., Senolytics decrease senescent cells in humans: preliminary report from a clinical trial of Dasatinib plus Quercetin in individuals with diabetic kidney disease, *EBioMedicine.* 47 (2019) 446–456.
- [59] J. Chang, Y. Wang, L. Shao, R.M. Laberge, M. Demaria, J. Campisi, et al., Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice, *Nat. Med.* 22 (1) (2016) 78–83.
- [60] C.M. Roos, B. Zhang, A.K. Palmer, M.B. Ogrodnik, T. Pirtskhalava, N.M. Thalji, et al., Chronic senolytic treatment alleviates established vasomotor dysfunction in aged or atherosclerotic mice, *Aging Cell* 15 (5) (2016) 973–977.
- [61] A. Walaszczyk, E. Dookun, R. Redgrave, S. Tual-Chalot, S. Victorelli, I. Spyridopoulos, et al., Pharmacological clearance of senescent cells improves survival and recovery in aged mice following acute myocardial infarction, *Aging Cell* 18 (3) (2019), e12945.

Louise CHOMEL

**Étude des mécanismes d'activation des polynucléaires neutrophiles
au cours du choc septique associée à une coagulation
intravasculaire disséminée**

RESUME

La coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) est une complication sévère du choc septique. Sa physiopathologie est notamment caractérisée par une activation cellulaire, notamment des polynucléaires neutrophiles (PNN) via les Neutrophils Extracellular Traps (NET) qui capturent les pathogènes, jouant un rôle essentiel dans l'activation de la coagulation et le recrutement de cellules immunitaires. Dans ce travail, nous avons étudié dans les PNN de 80 patients l'expression des TLR (qui reconnaissent les pathogènes) et mis en évidence des différences d'expression dans les formes sévères d'infection. D'autre part, nous avons étudié les protéines associées à l'activation du PNN dans la CIVD du choc septique identifiées par analyse protéomique, révélant le rôle majeur du complexe Mini Chromosome Maintenance dans la survenue de la NETose. Ce résultat confirme le rôle des PNN dans les phénomènes de thrombose et permet d'envisager de nouvelles cibles thérapeutiques dans la CIVD du choc septique.

Mots clés : Neutrophiles – NETose – Choc Septique – Coagulation Intravasculaire Disséminée – Récepteurs Toll-like – Complexe MCM – Biomarqueur – Protéomique

ABSTRACT

Disseminated intravascular coagulation (DIC) is a severe complication of septic shock. Its pathophysiology is notably characterized by cellular activation, particularly of polymorphonuclear neutrophils (PMNs) through Neutrophil Extracellular Traps (NETs), which capture pathogens and play a crucial role in coagulation activation and immune cell recruitment. In this study, we investigated the expression of Toll-Like Receptors (TLRs), which recognize pathogens, in PMNs from 80 patients, highlighted differences in expression in severe forms of infection. Furthermore, we investigated proteins associated with PMN activation in DIC of septic shock identified through proteomic analysis, highlighting the significant role of the Mini Chromosome Maintenance complex in NETosis. This finding confirms the role of PMNs in thrombotic events and suggests new therapeutic targets for DIC in septic shock.

Key words: Neutrophils – NETosis – Septic shock – Disseminated intravascular coagulation – Toll-like receptors – MCM complex – Biomarker – Proteomics