



Disponible en ligne sur [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



journal homepage: <http://france.elsevier.com/direct/REAURG/>



MISE AU POINT

## L'endothélium : un nouvel organe

## The endothelium: A new organ

H. Ait-Oufella<sup>a,b,\*</sup>, E. Maury<sup>b,c,d</sup>, B. Guidet<sup>b,c,d</sup>, G. Offenstadt<sup>b,c,d</sup>

<sup>a</sup> U689, Inserm, centre de recherche cardiovasculaire Lariboisière, 41, boulevard de la chapelle, 75010 Paris, France

<sup>b</sup> Service de réanimation médicale, hôpital Saint-Antoine, AP-HP, 184, rue du Faubourg-Saint-Antoine, 75571 Paris cedex 12, France

<sup>c</sup> UMR S707, faculté de médecine Saint-Antoine, université Pierre-et-Marie-Curie, Paris-6, 27, rue de Chaligny, 75012 Paris, France

<sup>d</sup> U707, Inserm, faculté de médecine Saint-Antoine, université Pierre-et-Marie-Curie, Paris-6, 27, rue de Chaligny, 75012 Paris, France

Disponible sur Internet le 3 janvier 2008

### MOTS CLÉS

Endothélium ;  
Coagulation ;  
Fibrinolyse ;  
Choc septique ;  
Monoxyde d'azote

### KEYWORDS

Endothelium;  
Coagulation;  
Fibrinolysis;  
Septic shock;  
Nitric oxide

**Résumé** L'endothélium est une monocouche cellulaire qui tapisse l'ensemble des vaisseaux de l'organisme. C'est un organe à part entière qui joue un rôle fondamental dans le contrôle du tonus vasomoteur, dans le trafic cellulaire et macromoléculaire, dans le maintien de la fluidité sanguine et dans les processus d'angiogénèse. Au cours du sepsis sévère, il y a d'importantes modifications du phénotype endothélial, en grande partie responsable des défaillances d'organes. Les cellules endothéliales deviennent proadhésives, procoagulantes, antifibrinolytiques. La libération endothéliale du NO est aussi fortement perturbée. La plupart des progrès dans ce domaine proviennent d'études expérimentales, les outils d'exploration d'endothéliale étant peu performants chez l'homme.

© 2007 Société de réanimation de langue française. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

**Summary** The endothelium is a highly dynamic cell layer that is involved in a multitude of physiologic functions, including the control of vasomotor tone, the movement of cells and nutrients, the maintenance of blood fluidity and the growth of new blood vessels. During severe sepsis, the endothelium becomes proadhesive, procoagulant, antifibrinolytic and is characterized by alterations in vasomotor regulation. Most of these functions have been discovered using in vitro studies and animals models.

© 2007 Société de réanimation de langue française. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

L'endothélium est une fine couche cellulaire qui tapisse les vaisseaux depuis leur origine, à la sortie de la pompe car-

diaque, jusqu'à leurs plus fines ramifications, les capillaires. Malgré ses dimensions impressionnantes, cette structure monocellulaire dont les fonctions sont à la fois nombreuses et complexes, a souffert d'un manque de considération pendant de nombreuses années. Tout d'abord, à cause de son histoire, puisque depuis la description de Harvey au

\* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : [aitoufella@larib.inserm.fr](mailto:aitoufella@larib.inserm.fr) (H. Ait-Oufella).

xvi<sup>e</sup> siècle, complétée par celle de Malpighi, le système vasculaire reste, avant tout, une pompe montée en série sur des vaisseaux, assimilés à de simples tuyaux, dont la principale fonction est de conduire les nutriments et l'oxygène vers les tissus périphériques. Ensuite, la pratique clinique a eu certaines difficultés à lui attribuer un cadre sémiologique. La séquence classique palpation–auscultation–percussion n'a jamais apporté d'informations sur l'état de l'endothélium, comme un ictère orienterait vers une maladie hépatique ou des râles crépitants vers une insuffisance cardiaque gauche. Enfin, parce que les outils permettant d'explorer la fonction endothéliale sont apparus tardivement, ils sont confinés à la recherche et que leur utilisation en pratique clinique reste difficile. Malgré toutes ces difficultés, l'intérêt porté à l'endothélium ne cesse de grandir, son statut d'organe à part entière s'impose progressivement. On recense aujourd'hui plus de 80 000 articles publiés sur le sujet dans la base de données PubMed.

Nous allons dans cette revue détailler les principales fonctions de l'endothélium vasculaire et tenter de montrer son importance et sa complexité. Nous décrivons à la fois ses propriétés physiologiques et les anomalies observées dans différentes pathologies. Nous nous intéresserons plus particulièrement au sepsis, parce que c'est un exemple caricatural d'altérations multiples du fonctionnement endothélial et parce que c'est une préoccupation quotidienne pour les réanimateurs.

## Description histologique

L'endothélium est constitué d'une fine couche monocellulaire qui tapisse la face interne de tous les vaisseaux de l'organisme. Les différents modèles estiment le nombre total de cellules endothéliales (CE) chez l'homme à  $10^{13}$ , soit un poids de 1,5 kg et une surface de 4000 à 7000 m<sup>2</sup> [1,2], équivalente à six terrains de football.

Les CE sont à l'interface entre les éléments du sang circulant et la paroi vasculaire. Ce sont des cellules aplaties d'environ 0,5 µm d'épaisseur, 100 µm de longueur et 10 µm de largeur. Elles sont de forme losangique et leur juxtaposition forme un tapis arrangé en mosaïque, leur grand axe est orienté dans le sens de l'écoulement du sang. Elles reposent sur une membrane basale riche en collagène et en glycoprotéines. D'emblée, on entrevoit le rôle complexe de ces cellules qui, d'un côté doivent favoriser la circulation du sang et de l'autre, reposent sur un feuillage de collagène, puissant activateur des plaquettes et de la coagulation.

Les jonctions entre les cellules se présentent sous différents aspects : juxtaposition, chevauchement ou imbrication, de telle sorte que l'étendue de la frontière entre deux cellules est très variable et permet, au mieux, de s'adapter au passage régulé des protéines du plasma. En un ou plusieurs points de l'espace intercellulaire, les membranes plasmiques se rapprochent pour former des jonctions serrées (*tight junctions*) et des nexuses, ou jonctions communicantes (*gap junctions*). Les jonctions serrées sont des fusions membranaires plurifocales parfaitement étanches alors que les jonctions communicantes sont un simple accollement des deux membranes cellulaires voisines, entourant un canal central. La fonction essentielle des nexuses est d'assurer la communication entre deux cellules voisines

et de permettre l'échange d'ions, de métabolites divers et de facteurs de régulation.

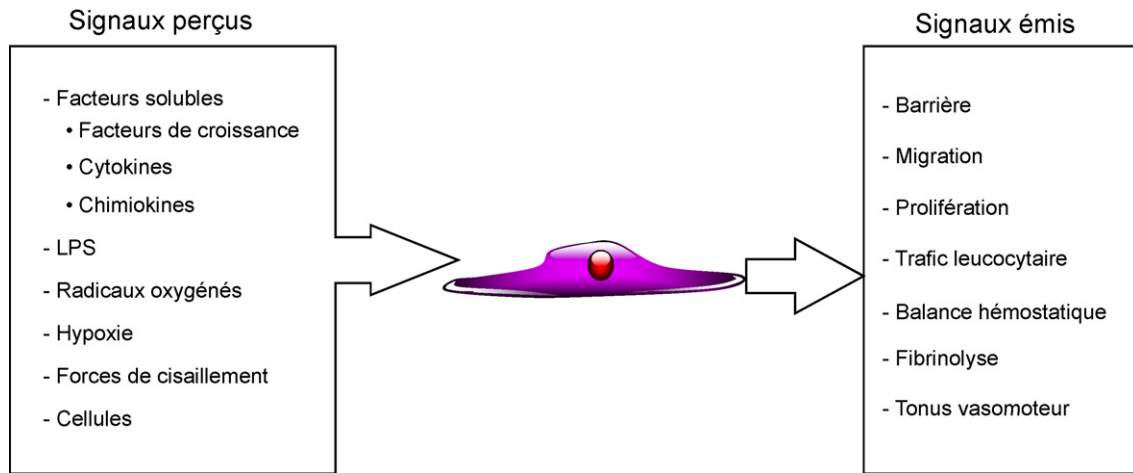
La surface luminale des CE est recouverte d'un manteau très fin et fragile, appelé le glycocalyx. Identifié au cours des années 1960 avec l'apparition de la microscopie électronique [3], il est constitué de glycoprotéines, de glycosaminoglycans et de protéoglycans [4]. Il y a cinq types de glycosaminoglycans, parmi lesquels l'héparane sulfate, le dermatane sulfate [5]. L'héparane sulfate est le cofacteur de l'antithrombine III, c'est-à-dire qu'il amplifie ses propriétés anticoagulantes et le dermatane sulfate interagit avec le cofacteur II de l'héparine. Le manteau glycalique a un rôle plus global dans la coagulation puisque grâce à sa charge électrique négative il repousse les plaquettes circulantes et interagit avec les facteurs de la coagulation vitamine K-dépendants dont il catalyse les actions.

Le glycocalyx, en formant un réseau enchevêtré et dense est une première barrière devant l'endothélium et participe à la régulation du trafic cellulaire et macromoléculaire [6]. Plusieurs travaux chez l'animal ont montré que la dégradation du glycocalyx, de façon enzymatique entre autres, s'accompagne d'une augmentation de la perméabilité capillaire [7,8]. Il régule aussi l'interaction entre l'endothélium et les leucocytes circulants. Chez la souris, au niveau des veinules du muscle crémaster, l'injection d'héparitinase dégrade le manteau riche en glycosaminoglycans et s'accompagne d'une forte adhésion des leucocytes à l'endothélium intact, mais « dénudé » [9].

La microscopie électronique a mis en évidence, au niveau cytoplasmique, deux éléments caractéristique du phénotype endothélial, les vésicules de pinocytose et les corps de Weibel-Palade. Les vésicules de pinocytose correspondent soit au transport transcellulaire de vésicules depuis le pôle luminal vers le pôle basal soit à des sections répétées d'un même canal tortueux qui traverse la cellule de part en part. Les corps de Weibel-Palade qui apparaissent denses et multiples, sont des vésicules de stockage de protéines comme le facteur von Willebrand et la P-sélectine. Ces deux protéines sont impliquées, dans l'hémostase primaire.

## Plasticité endothéliale

Les CE situées en contact étroit avec une phase liquide, le plasma, et une structure solide, la matrice extracellulaire de la membrane basale, entretiennent des relations importantes avec leur environnement. Elles sont capables de moduler leur structure et leurs fonctions rapidement, en réponse à un stimulus physique comme une modification du flux sanguin ou à un stimulus chimique (cf. Fig. 1). In vitro, lorsque les CE prolifèrent dans un milieu de culture statique, jusqu'à confluence, elles ont une forme cubique. En revanche, dès qu'elles sont exposées à des contraintes de cisaillement (frottement du sang sur l'endothélium), comme dans une chambre de perfusion qui mime le flux sanguin, elles prennent en quelques heures une forme allongée dans le sens du flux avec un remaniement important de leur cytosquelette [10,11]. In vivo, on retrouve l'organisation allongée des CE dans le sens du flux, surtout dans les artères où les forces de cisaillement sont 30 à 50 fois plus élevées que dans les veines. D'ailleurs, pour illustrer l'influence des contraintes mécaniques sur le comportement endothé-



**Figure 1** L'endothélium, situé à l'interface entre le sang et les tissus, reçoit un certain nombre de signaux physiques et mécaniques, puis adapte son comportement et ses différentes fonctions.

lial, on peut citer l'exemple des pontages aortocoronaires. Chez l'homme, les CE des greffons saphènes, une fois en connexion avec le flux artériel, changent de forme, elles s'allongent avec leur grand axe parallèle à l'écoulement du sang [12]. Les récepteurs sensibles à ces modifications de contraintes de cisaillement, appelés mécanosenseurs, sont assez bien identifiés : les récepteurs à activité tyrosine kinase, les intégrines, les canaux potassiques, les protéines G hétérotrimériques et la NADPH oxydase [13,14].

Du côté pariétal, l'endothélium interagit en permanence avec la matrice extracellulaire de la membrane basale sur laquelle il repose et modifie son phénotype en fonction de celle-ci [15]. In vitro, ces interactions ont été mises en évidence par Jallali et al. qui ont mis en culture des CE sur une matrice soit de fibronectine soit de vitronectine, puis les ont soumises à un flux laminaire dans une chambre de perfusion. L'expression membranaire des intégrines apparaissait différente, en quantité et en répartition, selon le type de matrice [16]. L'adaptation des CE aux modifications environnementales est très rapide. Chez l'homme, il a été montré par RT-PCR, sur des pièces postopératoires d'amygdalectomie, qu'en quelques minutes, après que les CE aient été isolées de leur environnement natif, elles remanient de façon importante leur programme génétique. Ces éléments doivent nous inciter à la prudence lors de l'interprétation d'études portant sur l'endothélium, qu'elles soient réalisées in vitro ou sur des vaisseaux isolés.

## Fonctions physiologiques de l'endothélium

### Modulation de l'hémostase primaire

L'hémostase primaire regroupe l'ensemble des phénomènes survenant à la suite d'une lésion vasculaire et aboutissant à la formation d'un caillot plaquettaire stable ou clou plaquettaire. L'activation des protéines de la coagulation vise ensuite à former le caillot définitif, avant que les mécanismes de réparation tissulaire se mettent en place en parallèle de la fibrinolyse [17]. Les CE ont un rôle à chaque étape de ce processus puisqu'elles participent à l'activation

plaquettaire et qu'elles produisent des facteurs de la cascade de la coagulation et du système fibrinolytique.

En cas de lésion vasculaire, le premier temps est appelé temps vasculaire, c'est une vasoconstriction réflexe qui permet une diminution focale du débit sanguin et une concentration de la réparation. Ensuite, vient le temps plaquettaire avec adhésion des plaquettes à la paroi [18]. L'endothélium, localement détruit, laisse apparaître une matrice riche en collagène et sur laquelle se dépose le facteur von Willebrand, sécrété par les CE avoisinantes. Les plaquettes adhèrent à la paroi vasculaire via plusieurs glycoprotéines membranaires. Les glycoprotéines GPIa et VI se lie au collagène, cette interaction est rapide et facilement réversible, la glycoprotéine GPIb-IX-V se lie au facteur von Willebrand [19]. Au niveau des veines, où les forces de cisaillement sont beaucoup plus faibles, les plaquettes adhèrent assez facilement à l'endothélium par le biais de l'intégrine  $\alpha 2\beta 3$  [19]. Les plaquettes adhérentes s'activent en quelques secondes. Elles passent d'une forme oblongue à une structure étoilée (émission de pseudopodes), expriment des récepteurs à leur surface (P-sélectine, intégrines) et libèrent le contenu de leurs granules dans l'espace extracellulaire (ADP, sérotonine). Tout cela aboutit à l'attraction et à l'activation des plaquettes circulantes pour former un amas plaquettaire solide qui sera renforcé par un réseau de fibrine. Les CE limitent aussi l'hémostase primaire en libérant des substances vasodilatatrices (prostacycline) et des ADPases, qui catabolisent l'ADP, un des plus puissants activateurs plaquettaires.

Le déficit en molécules impliquées dans l'adhésion plaquettaire comme dans la maladie de Bernard-Soulier (dysfonction/déficit en GPIb-IX-V) ou la thrombasthénie de Glanzmann (dysfonction/déficit en  $\alpha 2\beta 3$ ) s'accompagne de saignements spontanés ou déclenchés par des traumatismes minimes.

### Rôle dans la coagulation

Une des fonctions essentielles de l'endothélium est de maintenir la fluidité sanguine et donc de présenter une surface qui inhibe l'activation plaquettaire et l'activation de la

cascade de la coagulation. Cependant, sous l'effet de différents facteurs physiques ou chimiques, les CE peuvent aussi orienter leur programme génétique vers un phénotype procoagulant afin de limiter les dommages créés par une infection, un traumatisme ou une inflammation. Il y a donc en permanence dans l'organisme un équilibre subtil entre un état anticoagulant et un phénotype procoagulant. Au cours du sepsis, comme nous le verrons plus loin, la balance penche de façon exagérée vers un état procoagulant, qui s'auto-amplifie, pour aboutir à l'extrême à une coagulation intravasculaire disséminée.

### Propriétés anticoagulantes

L'activité anticoagulante de l'endothélium veille à limiter la génération permanente de thrombine. Pour se faire, plusieurs acteurs interviennent.

L'héparane sulfate et le dermatane sulfate, deux glycosaminoglycans du glycocalyx potentialisent l'activité de deux enzymes anticoagulantes, respectivement l'antithrombin III (par un facteur de 100) [20,21] et le cofacteur II de l'héparine [22].

L'endothélium produit du *tissue factor pathway inhibitor* (TFPI) qui se lie au facteur X activé et inhibe ensuite le complexe tissulaire—facteur VII activé [23].

Les CE produisent la thrombomoduline (TM) qui est soit fixée à la membrane soit libérée dans la circulation. Il y a des taux plasmatiques élevés dans un certain nombre de pathologies où l'endothélium est lésé (cf. sepsis). La TM fixe la protéine C en surface et augmente son activité anticoagulante en s'associant avec son cofacteur spécifique, la protéine S [24,25]. Enfin, l'endothélium accélère l'activation de la protéine C en exprimant à sa surface un autre récepteur, *endothelial protein C receptor*, (EPCR) [26]. La protéine C, une fois activée par l'ensemble de ses cofacteurs, inhibe les facteurs V et VIII. Enfin, la TM possède une activité anticoagulante propre puisque plusieurs travaux ont montré qu'elle est capable de se lier et d'inhiber directement le facteur X activé [27].

### Propriétés procoagulantes

L'étape majeure d'acquisition pour l'endothélium d'un phénotype procoagulant passe par l'expression du facteur tissulaire (FT). In vitro, le FT est induit par de nombreux médiateurs comme la thrombine, l'endotoxine, les cytokines, les forces de cisaillements, l'hypoxie ou encore les lipides oxydés [28,29]. Son activité procoagulante est accélérée en présence de phospholipides anioniques qui sont exposés par les cellules apoptotiques [30,31]. En présence d'agonistes, les taux de protéines et d'ARN messager du FT diminuent rapidement, probablement pour éviter une extension trop rapide de la fibrine. Malgré tous ces résultats in vitro, il est encore difficile de mettre en évidence l'expression endothéliale de FT.

Une fois exprimée, le FT rencontre le facteur VII et l'active. Le complexe FT—VIIa active à son tour les facteurs IX et X. Ces facteurs sont ancrés par leurs résidus gammacarboxiques aux phospholipides membranaires des plaquettes et des cellules endothéliales. Cette dernière précision permet de rappeler que les réactions de la cascade de la coagulation ont lieu, non pas en phase liquide dans le plasma, mais en phase solide, généralement sur les mem-

branes cellulaires et les caillots en formation. Par sa position et sa superficie, l'endothélium est la principale surface sur laquelle a lieu la réaction de coagulation qu'elle implique la voie extrinsèque comme précédemment décrit ou la voie intrinsèque.

Le contact entre les facteurs de la coagulation et la paroi vasculaire a lieu soit de façon non-spécifique via des interactions physiques soit par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques qui synthétisent les CE. La thrombine se lie en surface à un récepteur appelé *protéase-activating factor* (PAR) et exerce son action sur la formation de fibrine et l'amplification de la cascade de la coagulation. Le récepteur de son côté (PAR-1) induit l'expression de différents gènes (*FT*, *NO*, *PAF*, endothéline [*ET*]) [32], illustrant l'intrication complexe des différentes fonctions des CE, à savoir coagulation, régulation du tonus vasomoteur et adhésion leucocytaire. D'autres récepteurs de la thrombine comme PAR-2 [33] et PAR-3 [34] ont été décrits, ils sont aussi exprimés par d'autres types cellulaires (plaquettes, précurseurs médullaires).

### Rôle dans la fibrinolyse

L'endothélium a aussi physiologiquement des effets profibrinolytiques. L'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA), principal activateur intravasculaire de la fibrinolyse, est une protéase libérée par les CE qui transforme le plasminogène en plasmine. Cette réaction a lieu sur une surface soit cellulaire (endothélium) soit sur un caillot plaquettaire. La plasmine dégrade la fibrine et libère dans la circulation les produits de dégradations de la fibrine (PDF) ou D-dimères. Les travaux in vitro ont mis en évidence ces propriétés sur différents types de CE et ont donc attribué la faculté d'exprimer le t-PA à l'ensemble de l'endothélium. Cependant, in vivo les choses sont moins simples. Les travaux utilisant l'immunohistochimie et l'hybridation in situ n'ont mis en évidence le t-PA qu'au niveau de la microcirculation et uniquement dans certains territoires [35]. Un autre activateur du plasminogène l'u-PA est localisé exclusivement au niveau rénal [36]. Il est exprimé uniquement lors des processus de réparation tissulaire et d'angiogénèse, suggérant qu'il a un rôle important dans la migration cellulaire et le remodelage tissulaire. L'u-PA a un rôle déterminant dans l'homéostasie vasculaire et la lutte contre les infections puisque la souris invalidée pour ce gène exprime une réponse exagérée après injection de lipopolysaccharide (LPS) avec une inflammation pariétale très importante [37] et des thromboses étendues [38].

Le système fibrinolytique est contrôlé par deux inhibiteurs : l' $\alpha_2$  antiplasmine (inhibiteur de la plasmine) et l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1, PAI-2 et PAI-3). PAI-1, produit par le foie et l'endothélium activé, est le plus étudié des inhibiteurs, il semble avoir l'affinité la plus importante pour l'activateur du plasminogène.

### Régulation du tonus vasomoteur

L'endothélium participe grandement à la régulation du tonus vasomoteur, sous l'influence de facteurs physiques et chimiques qui proviennent soit de la lumière vasculaire, soit des tissus environnants. Il libère des substances vasodilatatrices comme le monoxyde d'azote (NO), la prostacycline (PGI<sub>2</sub>) et



des médiateurs vasoconstricteurs comme l'endothéline (ET) et le *platelet activating factor* (PAF). La production de NO par l'endothélium est constitutive et modulée par différents stimuli alors que la synthèse des autres médiateurs (PGI<sub>2</sub>, ET et PAF) est inductible.

Le NO est le principal agent vasorelaxant d'origine endothéliale [39]. Il est produit à partir de la L-arginine par la NO synthase endothéliale constitutive (eNOS), sensible au calcium et aux phosphorylations [40]. Les agents capables de stimuler la eNOS via un récepteur spécifique comptent l'ADP, la bradykinine, la substance P et les agonistes muscariniques auxquels s'ajoutent les agents physiques (forces de cisaillement et contraintes radiales pulsatiles). L'augmentation de l'activité de la eNOS par les forces de cisaillement permet la vasodilatation induite par une augmentation du débit, lors de l'exercice physique [41]. Il y a deux autres formes de NOS. La forme neuronale calcium-dépendante et la NOS inductible (iNOS) ou NOS calcium-indépendante, induite principalement par les cytokines pro-inflammatoires. Concernant la vasodilatation endothélium-dépendante, il convient de rendre hommage à cette découverte publiée par Furchgott et Zawadzki en 1980 dans la revue *Nature*. En présence d'endothélium, l'acétylcholine était vasodilatatrice sur un vaisseau précontracté, en revanche, après désendothéliation l'acétylcholine n'avait plus d'effet. La voie commune finale de ce processus est la production de NO qui diffuse en profondeur et active la guanylate cyclase soluble des cellules musculaires lisses de la média, responsable de la formation de GMP cyclique, qui à son tour active la protéine G-kinase i. Cette dernière enzyme diminue le stock de calcium libre cytosolique et inhibe la contraction de la cellule musculaire lisse (CML) en déphosphorylant la myosine [42]. Enfin, le NO a d'autres fonctions. Il inhibe l'activation et l'adhésion des plaquettes à l'endothélium, il favorise la désagrégation plaquettaire lors de la formation du clou hémostatique [43].

L'endothéline (ET) est produite par l'endothélium uniquement en réponse à un stimulus comme l'hypoxie, les forces de cisaillements [44]. Comme le NO, l'ET diffuse en profondeur et se fixe à son récepteur spécifique présent à la surface des CML. Ce récepteur couplé à une protéine G, favorise la libération de calcium depuis le réticulum endoplasmique et induit la vasodilatation. Cet effet persiste longtemps après la dissociation d'ET et de son récepteur, par le maintien d'une concentration intracytoplasmique élevée de calcium.

La prostacycline PGI<sub>2</sub> est un eicosanoïde, dérivé de l'acide arachidonique, qui agit de façon paracrine. Elle provoque une vasodilatation et inhibe l'agrégation plaquettaire.

La PAF est un phospholipide qui provient aussi du métabolisme de l'acide arachidonique. Il provoque une vasoconstriction et stimule l'adhésion des leucocytes à l'endothélium [45,46].

### Interactions leucocytaires

Pour éliminer au plus vite un agent pathogène ou nettoyer une zone nécrosée, les CE expriment, selon les situations, des molécules d'adhérence qui régulent le trafic des leu-

cocytes circulants depuis le compartiment sanguin vers le compartiment tissulaire. L'interaction entre les globules blancs et les CE obéit à un scénario qui comporte des contacts fugaces, des contacts plus prolongés, puis le roulement des leucocytes et enfin leur adhésion ferme avant la migration transendothéliale. À chaque étape de ce processus, interviennent différentes molécules d'adhérence membranaire. Les sélectines (E- et L-sélectine) permettent les premières interactions, puisqu'elles résistent aux forces de cisaillements élevées et qu'elles se lient (et se délient) très rapidement [47]. Les intégrines  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 et  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 sont plutôt impliquées dans l'adhésion des monocytes et des polynucléaires. Ensuite, le roulement et l'adhérence ferme font intervenir les molécules de la superfamille des immunoglobulines (ICAM-1, ICAM-2 et VCAM) [48,49], auxquelles s'ajoute PECAM au moment de la diapédèse [50]. C'est un phénomène complexe dans lequel intervient la séparation des ponts unissant les cadhérines, au niveau des jonctions serrées [51].

En plus de son implication dans la réponse immunitaire innée, l'endothélium participe à la réponse adaptative mettant en jeu les lymphocytes T [52]. In vitro, les CE en culture expriment le CMH de classe I et peuvent présenter l'antigène aux lymphocytes T cytotoxiques CD8<sup>+</sup>. De plus, après stimulation par l'interféron gamma, elles expriment le CMH de classe II et peuvent alors interagir avec les lymphocytes CD4<sup>+</sup> [53]. Les CE expriment à leur surface LFA-3 (CD58) ou B7.2 (CD86), des molécules de costimulation communes aux autres cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques [54], macrophages, lymphocytes B). D'ailleurs, il est actuellement admis que les CE sont impliquées dans la physiopathologie des rejets de greffe [55].

### Hétérogénéité endothéliale

Les CE de l'organisme ont des propriétés communes, mais aussi des caractéristiques propres, à la fois au cours de situations physiologiques et au cours d'une agression. Cette complexité, appelée hétérogénéité endothéliale, est tellement importante qu'il faudrait parler d'endothéliums au pluriel (cf. [Tableau 1](#)). Cette notion a été évoquée en premier par les histologistes qui ont différencié, par exemple, l'endothélium jointif imperméable du cerveau et l'endothélium fenêtré des glandes endocrines. Les cliniciens, ensuite, ont montré que l'atteinte endothéliale était différente selon les pathologies. Le diabète affecte surtout la microcirculation rétinienne et rénale [56], la maladie veinoocclusive du foie se limite aux vaisseaux des sinusoides hépatiques [57], les microangiopathies thrombotiques peuvent affecter l'ensemble de la microcirculation à l'exception du foie et des poumons [58]. La recherche expérimentale a confirmé les différences structurelles des cellules endothéliales en fonction des organes. La microscopie électronique a mis en évidence des différences quant à la localisation du noyau dans la cellule ou la composition du cytoplasme selon le site. Ainsi, chez la grenouille, le volume intracellulaire occupé par les corps de Weibel-Palade diminue depuis la racine aortique jusqu'à la microcirculation (8% du cytoplasme dans l'aorte thoracique contre 0,3% au niveau des capillaires) [59].

**Tableau 1** Quelques exemples de marqueurs endothéliaux différemment répartis selon leur localisation.

Marqueurs	Territoires vasculaires
Facteur von Willebrand	Veines > artères, absent dans les sinusoides hépatiques
t-PA	Abondant dans le cerveau, présent dans la circulation bronchique, mais pas dans la circulation pulmonaire
TFPI	Endothélium microvasculaire
Récepteur de la protéine C	Vaisseaux de gros diamètres
Thrombomoduline	Absente au niveau du cerveau
NOS endothéliale	Artères > veines
VCAM-1	Abondant au niveau du cœur, présent au niveau cerveau et de l'intestin grêle
P-sélectine	Abondant dans le poumon, peu exprimé au niveau musculaire et cérébral
CD36	Peu exprimé au niveau cérébral

Cette hétérogénéité existe pour toutes les fonctions endothéliales. La méconnaissance expose aux erreurs d'interprétations. Par exemple, il a été montré sur des biopsies de lésions purpuriques, chez des enfants atteints de méningococcie, une diminution de l'expression endothéliale de TM [60]. Au niveau cérébral, les cellules endothé-

liales n'expriment pas de TM. Cela signifie-t-il pour autant que l'endothélium cérébral est dans un état d'activation continu? La réponse est bien évidemment non. L'explication la plus vraisemblable est que la TM ne participe pas à la balance hémostatique dans le cerveau.

L'hétérogénéité concerne aussi l'intensité de la réponse endothéliale. En réponse à une même stimulation physiologique ou pathologique, les cellules endothéliales de deux territoires distincts peuvent activer une séquence de gènes identiques, mais en quantités différentes. La cellule endothéliale n'est pas un simple interrupteur On/Off, mais plutôt un variateur de luminosité où l'expression d'une protéine varie entre deux valeurs extrêmes [61]. Le plus difficile est de déterminer ces valeurs et d'en déduire le statut endothélial : inactivé, activé ou anormalement activé (dysfonctionnant). Ces distinctions sont subtiles et hélas limitées actuellement par le manque d'outils performants pour évaluer le fonctionnement endothélial (cf. **Tableau 2**).

### Dysfonction endothéliale au cours du sepsis

L'endothélium participe activement à la défense de l'organisme contre les agents pathogènes en recrutant les leucocytes vers les sites infectés, en libérant des médiateurs inflammatoires et en favorisant localement la coagulation, évitant ainsi la diffusion hémotogène de l'infection. Cependant, cette réponse focale et adaptée peut se généraliser, s'amplifier lors d'un sepsis et provoquer des dommages tissulaires. On parle alors de dysfonction endothéliale.

**Tableau 2** Exemples d'outils d'explorations de la fonction endothéliale chez l'homme.

<i>Méthodes biologiques : dosage des molécules solubles à partir d'échantillons plasmatiques (Elisa, chromatographie...)</i>		
Facteurs vasoactifs	NO (nitrites, nitrates)	Kelm et al. Cardiovasc Res 1999
	Endothéline	Lerman et al. Circulation 1995
Facteurs d'activation	ICAM-1	Sessler et al. Am J Respir Crit Care Med 1995
	VCAM-1	
	P- et E-sélectine	Hwang et al. Circulation 1997
Marqueurs de l'hémostase	t-PA, PAI-1	Jansson et al. Circulation 1993
	Facteur von Willebrand	Jansson et al. Br Heart J 1991
<i>Méthodes cellulaires : identification de cellules ou fragments de cellules endothéliales par cytométrie en flux</i>		
Cellules endothéliales circulantes		Mutunga et al. Am J Respir Crit Care Med 2001
		Piccin et al. Blood Rev 2007
<i>Méthodes pharmacologiques : étudient le fonctionnement de l'endothélium en mesurant les effets vasomoteurs qui accompagnent l'administration locale de substances qui agissent par son intermédiaire (échodoppler, échotracking)</i>		
Artères de résistance périphériques	Effets de l'injection d'acétylcholine au niveau du membre supérieur	Benjamin et al. Hypertension 1995
Artères de conductance	Effets de l'injection d'acétylcholine sur le diamètre de l'artère radiale	Ludmer et al. New Engl J Med 1986
<i>Méthodes physiques : étudient le phénomène de dilatation artérielle débit-dépendant. L'augmentation du débit local est obtenue par un stimulus physique</i>		
Hyperhémie postischémique		Laurent et al. Am J Physiol 1990
Chauffage cutané distal		Joannides et al. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2002

## Dénudation endothéliale

Le sepsis s'accompagne de modifications morphologiques de l'endothélium. L'injection de LPS chez l'animal induit un détachement des cellules de la membrane basale et un œdème sous-endothélial [62,63]. Les lésions cellulaires comportent une vacuolisation nucléaire, une protrusion et une fragmentation cytoplasmique. Le délai d'apparition varie de quelques minutes, en cas d'injection de LPS [64], à plusieurs heures sur le modèle de ligature/perforation cœcale [65]. Ce phénomène a été retrouvé chez l'homme [66]. En utilisant un double marquage cellulaire (facteur von Willebrand et récepteur de l'EGF), Mutunga et al. ont montré que le nombre de CE circulantes était plus élevé chez les patients septiques que chez les sujets contrôlés et qu'il était encore plus élevé en cas de choc septique. Les médiateurs inflammatoires libérés par les leucocytes (TNF $\alpha$ , IL1, interféron, les radicaux libres de l'oxygène et l'hypoxie) augmentent le passage en apoptose des CE [67–69]. Celles-ci expriment alors des molécules d'adhérence (ICAM-1, VCAM-1), libèrent des radicaux libres de l'oxygène et, par conséquent, amplifient à leur tour le recrutement des globules blancs. Les CE apoptotiques extériorisent la phosphatidylsérine (chargée négativement) vers le feuillet externe de la membrane cellulaire et présentent au sang circulant une surface procoagulante [30]. L'asymétrie de charge membranaire couplée à l'activité de certaines enzymes (floppase, scramblase...) permet le bourgeonnement et la libération de microparticules dans la circulation [70]. Ces microparticules, associant fragments membranaires phospholipidiques et protéines de surface (FT), sont impliquées dans la dissémination de la dysfonction endothéliale [71] et participent à la coagulation intravasculaire disséminée [72].

L'altération de la barrière endothéliale favorise le passage des cellules, des médiateurs inflammatoires et du plasma vers le secteur interstitiel. L'augmentation de la perméabilité vasculaire à l'albumine qui intervient environ six heures après l'agression, touche la circulation pulmonaire et systémique de façon hétérogène [73]. Au niveau de la peau et des muscles, l'injection d'endotoxine induit aussi une augmentation de la perméabilité vasculaire, indépendamment des pressions oncotique et hydrostatique, témoignant alors d'anomalies directes de la membrane cellulaire [74].

## Propriétés proadhésives

Les différents modèles de sepsis s'accompagnent d'une augmentation de l'expression endothéliale de molécules d'adhérence que ce soit au niveau membranaire ou plasmatic. Cela permet le recrutement des leucocytes circulants et des plaquettes, qui amplifient le phénomène en produisant des molécules pro-inflammatoires, procoagulantes. Il y a une relation entre le taux plasmatique d'ICAM-1 et les conséquences du sepsis chez l'homme [75]. Chez l'homme septique, une étude a montré que plus le taux plasmatique d'ICAM-1 était élevé plus la mortalité et le nombre d'organes atteints étaient importants. Chez l'animal, le blocage génétique ou pharmacologique de certaines molécules d'adhérence a montré des résultats intéressants. Après injection de LPS, 90% des animaux déficients pour ICAM-

1 survivent au quatrième jour alors que 80% des animaux contrôlés meurent dans les 48 premières heures [76]. Des résultats similaires ont été publiés avec les souris déficientes en E- et P-sélectine [77].

## Propriétés procoagulantes et antifibrinolytiques

Au cours des états infectieux graves, la balance de régulation penche lourdement vers un état procoagulant [78]. D'un côté, l'expression du FT augmente au niveau des monocytes circulants [79] et des CE et de l'autre, les taux des facteurs anticoagulants diminuent [80]. La TM est internalisée par les CE et aussi relarguée dans la circulation sous forme inactive sous l'effet de protéases (élastase des polynucléaires). Le travail de Faust et al. est un bon exemple des troubles de l'hémostase au cours du sepsis. Il a été réalisé chez des enfants atteints de purpura fulminans à partir d'échantillons tissulaires (biopsies cutanées) et plasmatices. Ils ont montré chez les jeunes patients une diminution de l'expression endothéliale de TM et de EPCR, une diminution des taux plasmatique de protéine C, protéine S et antithrombine III [60].

La production de NO et de PGI<sub>2</sub> par les CE est aussi altérée. Étant donné que ces molécules contrôlent non seulement le tonus vasculaire, mais aussi la production de t-PA et l'adhésion leucoplaquettaire, l'absence de leur libération va favoriser l'adhésion, l'agrégation leucoplaquettaire et donc l'activation de la coagulation. La conséquence finale est le dépôt de fibrine dans différents organes, dépôt qui aggrave l'ischémie locale [81]. Par exemple, chez la souris, l'injection de LPS induit des dépôts de fibrine dans le rein, le foie et le cœur, mais pas dans le poumon. Chez le babouin, l'injection de doses létales de *Escherichia coli* induit des dépôts de fibrine dans la rate, les sinusoides hépatiques, les glomérules rénaux, mais très peu au niveau du cerveau, du cœur et de l'aorte.

Concernant le système fibrinolytique, les premières études in vitro ont montré que la stimulation de CE en culture, par de l'IL1 et du TNF $\alpha$ , s'accompagnait de l'expression de t-PA [82] et d'une diminution de l'expression de PAI-1. Cette orientation vers un phénotype antifibrinolytique a été difficile à confirmer chez l'homme. Quelques études ont mis en évidence une augmentation du taux plasmatique de PAI-1 dans le sang de patients septiques (adultes et enfants) sans preuve formelle de l'origine endothéliale de ce médiateur [83,84].

## Altération de la régulation du tonus vasomoteur

Au cours des états infectieux graves, les réanimateurs sont sollicités avant tout pour une instabilité hémodynamique, qui est la conséquence d'un déséquilibre du tonus vasomoteur et d'une fuite plasmatic interstitielle. La dysfonction endothéliale et plus particulièrement les perturbations de la production de NO sont les principales responsables de l'insuffisance circulaire.

Les perturbations concernant la production de NO au cours du sepsis sont complexes et évoluent au cours du temps. La première étape, dite de « nitrosopénie », est caractérisée par une diminution de la production de NO par la eNOS [85]. Les mécanismes sont multiples : modifi-

cation des récepteurs de surface, défaut de transduction du signal, altération quantitative ou qualitative de la eNOS. In vitro, la stimulation de CE par le TNF $\alpha$  ou le LPS induit une *down-regulation* de l'ARN messager de la eNOS [86,87]. Chez le rat, l'induction d'un choc septique s'accompagne de la diminution de la densité endothéliale en eNOS [88]. Chez le lapin, l'injection d'une dose non-létale de LPS, altère la relaxation endothélium-dépendant et cela pendant cinq à 20 jours [63]. Chez le volontaire sain, une brève exposition à l'endotoxine diminue la relaxation dépendante de l'endothélium pendant plusieurs jours [89,90]. Pendant cette première période de nitrosopénie, la balance de l'homéostasie endothéliale penche vers une vasoconstriction qui touche les artéioles proximales de premier et deuxième ordre, surtout dans certains organes comme le tube digestif.

La seconde étape, plus tardive, consiste en une augmentation de la production de NO par la iNOS. Cette enzyme inductible va produire en concentrations nanomolaires (1000 fois plus que la eNOS) le NO et provoquer une vasodilatation plus diffuse de la microcirculation et donc une chute de la pression artérielle. D'autres effets délétères de la surproduction de NO ont été évoqués dans la physiopathologie du choc septique. Le NO peut interagir avec le radical anion superoxyde et fabriquer le peroxy-nitrite, puissant agent oxydant.

Cette surproduction tardive de NO dans le sepsis a motivé la réalisation d'études thérapeutiques visant à bloquer les NOS. Chez l'animal, les études ont été contradictoires. Il était alors difficile de conclure puisque les modèles de sepsis utilisés, les animaux traités ou encore les inhibiteurs injectés étaient différents d'une étude à l'autre [91–93]. Chez l'homme, les premiers essais semblaient encourageants avec une amélioration des paramètres hémodynamiques (sans effet sur la mortalité) lors du blocage des NOS [94,95]. Finalement, une grande étude multicentrique internationale a été réalisée en 2004 [96]. Sept cent quatre-vingt-dix-sept patients souffrant de sepsis grave ont été traités soit avec un placebo soit un bloqueur non sélectif des NOS, le L-NAME. L'étude de phase III a été arrêtée prématurément car, malgré une amélioration des paramètres circulatoires, l'administration de L-NAME s'est accompagnée d'une surmortalité. Après l'échec de cette approche visant à bloquer à tout prix le monoxyde d'azote, plusieurs travaux récents semblent lui créditer des propriétés bénéfiques. Ce n'est plus le NO qui serait responsable de l'insuffisance circulatoire, c'est plutôt sa surproduction par la iNOS. Les nouvelles pistes visent aujourd'hui à empêcher l'activation de la iNOS [86].

Pour terminer, il est important de rappeler que les essais thérapeutiques en réanimation se sont appuyés sur des études expérimentales animales. Le transfert direct des conclusions, depuis les modèles animaux vers les patients, s'est affranchi d'importantes différences physiopathologiques qui existent entre les espèces et qui, d'ailleurs, sont en partie responsables des résultats décevants des essais publiés. Malheureusement, comment faire autrement lorsque l'on connaît le peu de performance des outils d'exploration endothéliale chez l'homme? Certes, ils sont nombreux, mais ils restent peu rentables et difficiles à utiliser au lit du malade (cf. [Tableau 2](#)). Les avancées dans la prise en charge du sepsis grave passeront donc néces-

sairement par le développement de nouvelles techniques d'analyse du fonctionnement endothélial.

## Conclusion

Après une longue période d'ignorance, l'endothélium suscite enfin un intérêt chez les cliniciens. Véritable organe, imposant tant par ses dimensions que par ses fonctions, il n'en demeure pas moins complexe par sa plasticité et son hétérogénéité. Il joue un rôle dans l'hémostase primaire, la coagulation, la fibrinolyse et la régulation du tonus vasomoteur. Plus récemment, son rôle dans l'immunité adaptative a été démontré. Au cours du sepsis, la plupart des fonctions endothéliales sont perturbées, aboutissant à un état procoagulant, antifibrinolytique et proadhésif. La production de NO diminue dans un premier temps, puis augmente de façon excessive en raison de l'induction de iNOS. Aux difficultés liées au comportement variable des cellules endothéliales s'ajoute aujourd'hui un réel problème pratique. Nous ne disposons pas, au lit du malade, d'outils suffisamment performants pour explorer correctement les fonctions endothéliales. Les avancées dans la compréhension et le traitement des pathologies impliquant l'endothélium passeront nécessairement par le développement d'outils plus fins.

## Références

- [1] Augustin HG, Kozian DH, Johnson RC. Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *Bioessays* 1994;16(12):901–6.
- [2] Wolinsky H, Katz D, Markle R, Mills J, Brem S, Wassertheil-Smoller S. Hydrolase activities in the rat aorta. IV. Relation between clearance rates of circulating 125I-labeled low-density lipoproteins and levels of tissue hydrolase activity. *Circ Res* 1980;47(3):433–42.
- [3] Luft JH. Fine structures of capillary and endocapillary layer as revealed by ruthenium red. *Fed Proc* 1966;25(6):1773–83.
- [4] Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MA, oude Egbrink MG. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch* 2007;454(3):345–59.
- [5] Sugahara K, Mikami T, Uyama T, Mizuguchi S, Nomura K, Kitagawa H. Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. *Curr Opin Struct Biol* 2003;13(5):612–20.
- [6] Henry CB, Duling BR. Permeation of the luminal capillary glycocalyx is determined by hyaluronan. *Am J Physiol* 1999;277(2):H508–14.
- [7] Jacob M, Bruegger D, Rehm M, Welsch U, Conzen P, Becker BF. Contrasting effects of colloid and crystalloid resuscitation fluids on cardiac vascular permeability. *Anesthesiology* 2006;104(6):1223–31.
- [8] Rehm M, Zahler S, Lotsch M, Welsch U, Conzen P, Jacob M, et al. Endothelial glycocalyx as an additional barrier determining extravasation of 6% hydroxyethyl starch or 5% albumin solutions in the coronary vascular bed. *Anesthesiology* 2004;100(5):1211–23.
- [9] Constantinescu AA, Vink H, Spaan JA. Endothelial cell glycocalyx modulates immobilization of leukocytes at the endothelial surface. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(9):1541–7.
- [10] Malek AM, Izumo S. Control of endothelial cell gene expression by flow. *J Biomech* 1995;28(12):1515–28.



- [11] Davies PF. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev* 1995;75(3):519–60.
- [12] Allaire E, Clowes AW. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: the intimal hyperplastic response. *Ann Thorac Surg* 1997;63(2):582–91.
- [13] Korshunov VA, Schwartz SM, Berk BC. Vascular remodeling: hemodynamic and biochemical mechanisms underlying Glagov's phenomenon. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27(8):1722–8.
- [14] Berk BC, Fujiwara K, Lehoux S. ECM remodeling in hypertensive heart disease. *J Clin Invest* 2007;117(3):568–75.
- [15] Aird WC, Edelberg JM, Weiler-Guettler H, Simmons WW, Smith TW, Rosenberg RD. Vascular bed-specific expression of an endothelial cell gene is programmed by the tissue microenvironment. *J Cell Biol* 1997;138(5):1117–24.
- [16] Jalali S, del Pozo MA, Chen K, Miao H, Li Y, Schwartz MA, et al. Integrin-mediated mechanotransduction requires its dynamic interaction with specific extracellular matrix (ECM) ligands. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(3):1042–6.
- [17] Jackson SP, Mistry N, Yuan Y. Platelets and the injured vessel wall "rolling into action": focus on glycoprotein Ib/V/IX and the platelet cytoskeleton. *Trends Cardiovasc Med* 2000;10(5):192–7.
- [18] Roth GJ. Platelets and blood vessels: the adhesion event. *Immunol Today* 1992;13(3):100–5.
- [19] Savage B, Saldivar E, Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* 1996;84(2):289–97.
- [20] Rosenberg RD. Biochemistry of heparin antithrombin interactions, and the physiologic role of this natural anticoagulant mechanism. *Am J Med* 1989;87(3B):25–9S.
- [21] Rosenberg RD, Rosenberg JS. Natural anticoagulant mechanisms. *J Clin Invest* 1984;74(1):1–6.
- [22] Tollefsen DM, Pestka CA. Heparin cofactor II activity in patients with disseminated intravascular coagulation and hepatic failure. *Blood* 1985;66(4):769–74.
- [23] Broze Jr GJ. Tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost* 1995;74(1):90–3.
- [24] Fukudome K, Esmo CT. Molecular cloning and expression of murine and bovine endothelial cell protein C/activated protein C receptor (EPCR). The structural and functional conservation in human, bovine, and murine EPCR. *J Biol Chem* 1995;270(10):5571–7.
- [25] Esmo CT. Protein C anticoagulant pathway and its role in controlling microvascular thrombosis and inflammation. *Crit Care Med* 2001;29(7 Suppl):S48–51, discussion 2.
- [26] Fukudome K, Kurosawa S, Stearns-Kurosawa DJ, He X, Rezaie AR, Esmo CT. The endothelial cell protein C receptor. Cell surface expression and direct ligand binding by the soluble receptor. *J Biol Chem* 1996;271(29):17491–8.
- [27] Thompson EA, Salem HH. Inhibition by human thrombomodulin of factor Xa-mediated cleavage of prothrombin. *J Clin Invest* 1986;78(1):13–7.
- [28] Moore KL, Andreoli SP, Esmo NL, Esmo CT, Bang NU. Endotoxin enhances tissue factor and suppresses thrombomodulin expression of human vascular endothelium in vitro. *J Clin Invest* 1987;79(1):124–30.
- [29] Bevilacqua MP, Pober JS, Majeau GR, Fiers W, Cotran RS, Gimbrone Jr MA. Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: characterization and comparison with the actions of interleukin-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83(12):4533–7.
- [30] Bombeli T, Karsan A, Tait JF, Harlan JM. Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant. *Blood* 1997;89(7):2429–42.
- [31] Combes V, Simon AC, Grau GE, Arnoux D, Camoin L, Sabatier F, et al. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest* 1999;104(1):93–102.
- [32] Woolkalis MJ, DeMelfi Jr TM, Blanchard N, Hoxie JA, Brass LF. Regulation of thrombin receptors on human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem* 1995;270(17):9868–75.
- [33] Mirza H, Yatsula V, Bahou WF. The proteinase activated receptor-2 (PAR-2) mediates mitogenic responses in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1996;97(7):1705–14.
- [34] Ishihara H, Connolly AJ, Zeng D, Kahn ML, Zheng YW, Timmons C, et al. Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature* 1997;386(6624):502–6.
- [35] Todd AS. The histological localisation of fibrinolysin activator. *J Pathol Bacteriol* 1959;78:281–3.
- [36] Barnathan ES, Kuo A, Kariko K, Rosenfeld L, Murray SC, Behrendt N, et al. Characterization of human endothelial cell urokinase-type plasminogen activator receptor protein and messenger RNA. *Blood* 1990;76(9):1795–806.
- [37] Carmeliet P, Schoonjans L, Kieckens L, Ream B, Degen J, Bronson R, et al. Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. *Nature* 1994;368(6470):419–24.
- [38] Yamamoto K, Loskutoff DJ. Fibrin deposition in tissues from endotoxin-treated mice correlates with decreases in the expression of urokinase-type but not tissue-type plasminogen activator. *J Clin Invest* 1996;97(11):2440–51.
- [39] Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288(5789):373–6.
- [40] Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 1992;258(5090):1898–902.
- [41] Loscalzo J, Vita JA. Ischemia, hyperemia, exercise, and nitric oxide. Complex physiology and complex molecular adaptations. *Circulation* 1994;90(5):2556–9.
- [42] Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43(2):109–42.
- [43] Mendelsohn ME, O'Neill S, George D, Loscalzo J. Inhibition of fibrinogen binding to human platelets by S-nitroso-N-acetylcysteine. *J Biol Chem* 1990;265(31):19028–34.
- [44] Levin ER. Endothelins. *N Engl J Med* 1995;333(6):356–63.
- [45] Imaizumi TA, Stafforini DM, Yamada Y, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Platelet-activating factor: a mediator for clinicians. *J Intern Med* 1995;238(1):5–20.
- [46] Lorant DE, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Platelet-activating factor mediates procoagulant activity on the surface of endothelial cells by promoting leukocyte adhesion. *Semin Cell Biol* 1995;6(5):295–303.
- [47] McEver RP, Moore KL, Cummings RD. Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J Biol Chem* 1995;270(19):11025–8.
- [48] Springer TA. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol* 1995;57:827–72.
- [49] Languino LR, Plescia J, Duperray A, Brian AA, Plow EF, Geltosky JE, et al. Fibrinogen mediates leukocyte adhesion to vascular endothelium through an ICAM-1-dependent pathway. *Cell* 1993;73(7):1423–34.
- [50] Muller WA, Weigl SA. Monocyte-selective transendothelial migration: dissection of the binding and transmigration phases by an in vitro assay. *J Exp Med* 1992;176(3):819–28.
- [51] Dejana E, Corada M, Lampugnani MG. Endothelial cell-to-cell junctions. *Faseb J* 1995;9(10):910–8.
- [52] Pober JS, Orosz CG, Rose ML, Savage CO. Can graft endothelial cells initiate a host anti-graft immune response? *Transplantation* 1996;61(3):343–9.
- [53] Marelli-Berg FM, Hargreaves RE, Carmichael P, Dorling A, Lombardi G, Lechler RI. Major histocompatibility complex

- class II-expressing endothelial cells induce allospecific non-responsiveness in naive T cells. *J Exp Med* 1996;183(4):1603–12.
- [54] Ait-Oufella H, Salomon BL, Potteaux S, Robertson AK, Gourdy P, Zoll J, et al. Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nat Med* 2006;12(2):178–80.
- [55] Murray AG, Khodadoust MM, Pober JS, Bothwell AL. Porcine aortic endothelial cells activate human T cells: direct presentation of MHC antigens and costimulation by ligands for human CD2 and CD28. *Immunity* 1994;1(1):57–63.
- [56] Cooper ME, Bonnet F, Oldfield M, Jandeleit-Dahm K. Mechanisms of diabetic vasculopathy: an overview. *Am J Hypertens* 2001;14(5 Pt 1):475–86.
- [57] Bearman SI. Venous-occlusive disease of the liver. *Curr Opin Oncol* 2000;12(2):103–9.
- [58] Asada Y, Sumiyoshi A, Hayashi T, Suzumiya J, Kaketani K. Immunohistochemistry of vascular lesion in thrombotic thrombocytopenic purpura, with special reference to factor VIII related antigen. *Thromb Res* 1985;38(5):469–79.
- [59] Steinsiepe KF, Weibel ER. Electron microscopic studies on specific organelles of endothelial cells in the frog (*Rana temporaria*). *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 1970;108(1):105–26.
- [60] Faust SN, Levin M, Harrison OB, Goldin RD, Lockhart MS, Kondaveeti S, et al. Dysfunction of endothelial protein C activation in severe meningococcal sepsis. *N Engl J Med* 2001;345(6):408–16.
- [61] Aird WC. Endothelial cell heterogeneity. *Crit Care Med* 2003;31(4 Suppl):S221–30.
- [62] Reidy MA, Schwartz SM. Endothelial injury and regeneration. IV. Endotoxin: a non-denuding injury to aortic endothelium. *Lab Invest* 1983;48(1):25–34.
- [63] Leclerc J, Pu Q, Corseaux D, Haddad E, Decoene C, Bordet R, et al. A single endotoxin injection in the rabbit causes prolonged blood vessel dysfunction and a procoagulant state. *Crit Care Med* 2000;28(11):3672–8.
- [64] Lee MM, Schuessler GB, Chien S. Time-dependent effects of endotoxin on the ultrastructure of aortic endothelium. *Artery* 1988;15(2):71–89.
- [65] Wang P, Wood TJ, Zhou M, Ba ZF, Chaudry IH. Inhibition of the biologic activity of tumor necrosis factor maintains vascular endothelial cell function during hyperdynamic sepsis. *J Trauma* 1996;40(5):694–700, discussion 1-1.
- [66] Mutunga M, Fulton B, Bullock R, Batchelor A, Gascoigne A, Gillespie JI, et al. Circulating endothelial cells in patients with septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163(1):195–200.
- [67] Polunovsky VA, Wendt CH, Ingbar DH, Peterson MS, Bitterman PB. Induction of endothelial cell apoptosis by TNF alpha: modulation by inhibitors of protein synthesis. *Exp Cell Res* 1994;214(2):584–94.
- [68] Messmer UK, Briner VA, Pfeilschifter J. Tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide induce apoptotic cell death in bovine glomerular endothelial cells. *Kidney Int* 1999;55(6):2322–37.
- [69] Stefanec T. Endothelial apoptosis: could it have a role in the pathogenesis and treatment of disease? *Chest* 2000;117(3):841–54.
- [70] Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev* 2007;21(3):157–71.
- [71] Soriano AO, Jy W, Chirinos JA, Valdivia MA, Velasquez HS, Jimenez JJ, et al. Levels of endothelial and platelet microparticles and their interactions with leukocytes negatively correlate with organ dysfunction and predict mortality in severe sepsis. *Crit Care Med* 2005;33(11):2540–6.
- [72] Levi M, Ten Cate H. Disseminated intravascular coagulation. *N Engl J Med* 1999;341(8):586–92.
- [73] Dormehl IC, Hugo N, Pretorius JP, Redelingshuys IF. In vivo assessment of regional microvascular albumin leakage during *E. coli* septic shock in the baboon model. *Circ Shock* 1992;38(1):9–13.
- [74] Parrillo JE. Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N Engl J Med* 1993;328(20):1471–7.
- [75] Sessler CN, Windsor AC, Schwartz M, Watson L, Fisher BJ, Sugerman HJ, et al. Circulating ICAM-1 is increased in septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151(5):1420–7.
- [76] Xu H, Gonzalo JA, St Pierre Y, Williams IR, Kupper TS, Cotran RS, et al. Leukocytosis and resistance to septic shock in intercellular adhesion molecule 1-deficient mice. *J Exp Med* 1994;180(1):95–109.
- [77] Matsukawa A, Lukacs NW, Hogaboam CM, Knibbs RN, Bullard DC, Kunkel SL, et al. Mice genetically lacking endothelial selectins are resistant to the lethality in septic peritonitis. *Exp Mol Pathol* 2002;72(1):68–76.
- [78] Aird WC. Vascular bed-specific hemostasis: role of endothelium in sepsis pathogenesis. *Crit Care Med* 2001;29(7 Suppl):S28–34, discussion S-5.
- [79] Collins PW, Noble KE, Reittie JR, Hoffbrand AV, Pasi KJ, Yong KL. Induction of tissue factor expression in human monocyte/endothelium cocultures. *Br J Haematol* 1995;91(4):963–70.
- [80] Rapaport SI, Rao LV. Initiation and regulation of tissue factor-dependent blood coagulation. *Arterioscler Thromb* 1992;12(10):1111–21.
- [81] Regoeczi E, Brain MC. Organ distribution of fibrin in disseminated intravascular coagulation. *Br J Haematol* 1969;17(1):73–81.
- [82] Levin EG, Marotti KR, Santell L. Protein kinase C and the stimulation of tissue plasminogen activator release from human endothelial cells. Dependence on the elevation of messenger RNA. *J Biol Chem* 1989;264(27):16030–6.
- [83] Green J, Doughty L, Kaplan SS, Sasser H, Carcillo JA. The tissue factor and plasminogen activator inhibitor type-1 response in pediatric sepsis-induced multiple organ failure. *Thromb Haemost* 2002;87(2):218–23.
- [84] Mavrommatis AC, Theodoridis T, Economou M, Kotanidou A, El Ali M, Christopoulou-Kokkinou V, et al. Activation of the fibrinolytic system and utilization of the coagulation inhibitors in sepsis: comparison with severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med* 2001;27(12):1853–9.
- [85] Salzman AL, Wang H, Wollert PS, Vandermeer TJ, Compton CC, Denenberg AG, et al. Endotoxin-induced ileal mucosal hyperpermeability in pigs: role of tissue acidosis. *Am J Physiol* 1994;266(4 Pt 1):G633–46.
- [86] Wiel E, Pu Q, Corseaux D, Robin E, Bordet R, Lund N, et al. Effect of L-arginine on endothelial injury and hemostasis in rabbit endotoxin shock. *J Appl Physiol* 2000;89(5):1811–8.
- [87] Wiel E, Pu Q, Leclerc J, Corseaux D, Bordet R, Lund N, et al. Effects of the angiotensin-converting enzyme inhibitor perindopril on endothelial injury and hemostasis in rabbit endotoxin shock. *Intensive Care Med* 2004;30(8):1652–9.
- [88] Zhou M, Wang P, Chaudry IH. Endothelial nitric oxide synthase is downregulated during hyperdynamic sepsis. *Biochim Biophys Acta* 1997;1335(1–2):182–90.
- [89] Bhagat K, Collier J, Vallance P. Local venous responses to endotoxin in humans. *Circulation* 1996;94(3):490–7.
- [90] Bhagat K, Moss R, Collier J, Vallance P. Endothelial "stunning" following a brief exposure to endotoxin: a mechanism to link infection and infarction? *Cardiovasc Res* 1996;32(5):822–9.
- [91] Cobb JP, Natanson C, Quezado ZM, Hoffman WD, Koev CA, Banks S, et al. Differential hemodynamic effects of L-NMMA in endotoxemic and normal dogs. *Am J Physiol* 1995;268(4 Pt 2):H1634–42.

- [92] Jourdain M, Tournoys A, Leroy X, Mangalaboyi J, Fourrier F, Goudemand J, et al. Effects of N omega-nitro-L-arginine methyl ester on the endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation in porcine septic shock. *Crit Care Med* 1997;25(3):452–9.
- [93] Walker TA, Curtis SE, King-VanVlack CE, Chapler CK, Vallet B, Cain SM. Effects of nitric oxide synthase inhibition on regional hemodynamics and oxygen transport in endotoxic dogs. *Shock* 1995;4(6):415–20.
- [94] Grover R, Zaccardelli D, Colice G, Guntupalli K, Watson D, Vincent JL. An open-label dose escalation study of the nitric oxide synthase inhibitor, N(G)-methyl-L-arginine hydrochloride (546C88), in patients with septic shock. Glaxo Wellcome International Septic Shock Study Group. *Crit Care Med* 1999;27(5):913–22.
- [95] Vincent JL, Zhang H, Szabo C, Preiser JC. Effects of nitric oxide in septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161(6):1781–5.
- [96] Lopez A, Lorente JA, Steingrub J, Bakker J, McLuckie A, Willatts S, et al. Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock. *Crit Care Med* 2004;32(1):21–30.