

## Sepsis : aspects fondamentaux

### Sepsis: basic principles

© SRLF et Springer-Verlag France 2011

#### SO043

##### À la concentration sérique observée au cours du choc septique humain, la morphine endogène des polynucléaires inhibe la libération de l'interleukine-8

Y. Goumon<sup>1</sup>, T. Lavaux<sup>2</sup>, E. Glattard<sup>3</sup>, A.-H. Muller<sup>4</sup>, D. Aunis<sup>5</sup>, M.-H. Metz-Boutigue<sup>6</sup>, F. Schneider<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Centre de neurochimie, INCI-CNRS UPR 3212, Strasbourg, France

<sup>2</sup>Laboratoire de biochimie et de biologie cellulaire, hôpital de Hautepierre, Inserm U595, Strasbourg, France

<sup>3</sup>Inserm U575, Strasbourg, France, INCI-CNRS UPR 3212, Strasbourg, France

<sup>4</sup>Inserm U595, INCI-CNRS UPR 3212, Strasbourg, France

<sup>5</sup>Inserm U595, centre de neurochimie, Strasbourg, France

<sup>6</sup>Inserm U595, centre de neurochimie, Strasbourg, France

<sup>7</sup>Service de réanimation médicale, hôpitaux universitaires de Strasbourg et université de Strasbourg, Strasbourg, France

**Introduction :** Les cellules des mammifères synthétisent la morphine selon une voie biochimique bien établie. Ainsi, *in vitro*, les polynucléaires humains synthétisent et sécrètent cet alcaloïde dans le milieu de culture après exposition à des précurseurs de morphine. Toutefois, le rôle de la morphine endogène (ME) dans les processus inflammatoires *in vivo* reste incertain. Nous avons fait l'hypothèse que de la ME pouvait être sécrétée à partir de cellules du système de défense pendant l'infection grave humaine et pouvait donc être quantifiée dans le sérum de malades en choc septique.

**Patients et méthodes :** La localisation subcellulaire de la ME a été explorée par Elisa, spectrométrie de masse et microscopie confocale sur des polynucléaires humains. Ceux-ci ont été stimulés par du LPS en présence ou non d'interleukine-8 (IL-8). La sécrétion de ME a été déterminée par Elisa. Nous avons analysé l'expression des récepteurs opioïdes  $\mu$  par cytométrie de flux. Les concentrations sériques de ME de malades en choc septique ont été déterminées par Elisa. Nous avons comparé l'identité moléculaire de la morphine provenant des neutrophiles et celle des malades septiques par spectrométrie de masse. Les effets de concentrations de morphine trouvés *in vivo* chez les malades en choc septique sur la libération d'IL-8 par des neutrophiles stimulés par du LPS ont finalement été analysés.

**Résultats :** Nous avons confirmé la présence de ME dans les polynucléaires où elle est colocalisée avec la lactoferrine. *In vitro*, le LPS et l'IL-8 libèrent de la ME d'une manière  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante. Le LPS augmente l'expression du récepteur  $\mu$  des neutrophiles. La concentration plasmatique de ME est significativement augmentée dans le sérum de malades en choc septique (8 nM versus 0 chez les sujets sains). À cette concentration, la ME inhibe de façon significative la libération d'IL-8 par les neutrophiles co-incubés avec du LPS, effet reversé par la naloxone.

**Conclusion :** Les concentrations plasmatiques de ME sont significativement élevées dans le sérum de malades en choc septique. Cet alcaloïde

est au moins en partie originaire de la sécrétion des neutrophiles. Aux concentrations trouvées *in vivo*, la ME inhibe la sécrétion d'IL-8 par les neutrophiles stimulés par le LPS. La ME pourrait donc participer à des phénomènes anti-inflammatoires *in vivo* lors du choc septique.

#### SO044

##### IMPDHII contrôle l'activité de NF- $\kappa$ B après stimulation de TLR2 en régulant l'activité de la phosphatase SHP1 et de PI3-kinase

J. Toubiana<sup>1</sup>, A.-L. Rossi<sup>1</sup>, D. Grimaldi<sup>2</sup>, N. Belaidouni<sup>1</sup>, P. Chaffey<sup>3</sup>, G. Clary<sup>3</sup>, E. Courtine<sup>1</sup>, Y.-E. Claessens<sup>1</sup>, F. Pene<sup>2</sup>, J.-P. Mira<sup>2</sup>, J.-D. Chiche<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Biocihp, institut Cochin, Paris, France

<sup>2</sup>Service de réanimation médicale, CHU Cochin,

Saint-Vincent-de-Paul, site Cochin, Paris, France

<sup>3</sup>Plateforme protéomique, institut Cochin, Paris, France

**Introduction :** Parmi les récepteurs intervenant dans la réponse immune innée, TLR2 est caractérisé par son large répertoire de reconnaissance et sa capacité d'hétérodimérisation avec TLR1 ou TLR6 [1]. L'activation de TLR2 engage MyD88 en amont d'une cascade de signalisation permettant l'activation des MAP-kinases et de NF- $\kappa$ B par la translocation membranaire de ses sous-unités p50/p65. L'activation de NF- $\kappa$ B nécessite aussi la transactivation de p65 par une voie impliquant Rac1, PI3-kinase (PI3-k) et Akt. Si un certain nombre de protéines régulant négativement la voie d'activation canonique de NF- $\kappa$ B ont été découvertes, les mécanismes de régulation de la voie de transactivation de p65 après engagement de TLR2 sont moins bien étudiés [1]. Afin de chercher l'existence de protéines régulatrices agissant sur cette voie, nous avons utilisé une approche protéomique systématique pour caractériser le protéome des radeaux lipidiques (RL).

**Matériels et méthodes :** Les RL de cellules monocytaires THP1 stimulées ou non par les agonistes Pam2 et Pam3 ont été isolés par centrifugation sur gradient de sucrose pour caractériser leur protéome par les techniques DIGE et iTRAQ avant spectrométrie de masse. Des cellules THP1 et des HEK 293 transfectées stablement pour exprimer TLR2 ont été stimulées par Pam3 ou Pam2 en présence/absence 1) d'acide mycophénolique (MPA), forme active du mycophénolate mofetil (Cellcept®) et inhibiteur d'IMPDHII ; 2) ou d'un siRNA IMPDHII interfèrent. Nous avons étudié l'effet de l'inhibition d'IMPDHII sur les voies d'activation de NF- $\kappa$ B en utilisant les techniques de gène rapporteur, de Western blot, d'immunoprécipitation et de Rac pull-down, de détermination d'activité phosphatase ainsi que des techniques de vidéo-imagerie et de dosages de cytokines (Elisa).

**Résultats :** Parmi les 18 protéines sélectivement recrutées dans les RL après engagement de TLR2, nous avons identifié la protéine inosine

monophosphate dehydrogenase II (IMPDHII). Alors que l'engagement de TLR2 par Pam2 ou Pam3 augmente l'activité NF- $\kappa$ B, l'inhibition d'IMPDHII par le MPA ou par un siRNA ciblant spécifiquement IMPDHII potentialise l'activité NF- $\kappa$ B. L'addition de guanosine, produit de l'activité de IMPDHII, où la surexpression d'IMPDHII empêche l'effet du MPA sur l'activité NF- $\kappa$ B et la synthèse de cytokines. En utilisant les mêmes stratégies d'inhibition, nous montrons qu'un des rôles physiologiques d'IMPDHII est d'intervenir dans la régulation négative de NF- $\kappa$ B en inhibant l'activité de PI3-k par déphosphorylation de sa sous-unité p85 $\alpha$ . IMPDHII intervient dans les mécanismes d'activation de la phosphatase SHP1, enzyme directement responsable de la déphosphorylation de PI3-k. L'inhibition d'IMPDHII ne modifie pas l'activation des MAP-kinase suggérant que IMPDHII n'intervient pas dans la régulation de cette voie.

**Conclusion :** IMPDHII est recruté dans les RL au sein d'un complexe multimoléculaire après engagement de TLR2. IMPDHII diminue l'activation de NF- $\kappa$ B en augmentant l'activité de SHP1 et la déphosphorylation de la sous-unité p85 $\alpha$  de PI3-k, suggérant pour la première fois qu'IMPDHII est un régulateur négatif de la voie PI3-k/Akt-dépendante de transactivation de NF- $\kappa$ B. Ces données pourraient expliquer les cas d'hyperactivation monocyttaire observés en dehors d'infection chez des patients traités par Cellcept®.

#### Référence

1. Kawai T, Akira S (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11:373–84

#### SO045

##### Rôle de TREM-1 dans la dysfonction endothéliale au cours du sepsis expérimental

A. Boufenzler<sup>1</sup>, N. Sennoun<sup>1</sup>, Y. Bouazza<sup>1</sup>, M. Derive<sup>1</sup>, P.-E. Bollaert<sup>2</sup>, B. Levy<sup>3</sup>, S. Gibot<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Groupe Choc, Avenir Inserm, faculté de médecine, Nancy, France

<sup>2</sup>Service de réanimation médicale, CHU de Nancy, hôpital central, Nancy, France

<sup>3</sup>Service de réanimation médicale, CHU Nancy, hôpital Brabois-Adultes, Vandœuvre-les-Nancy, France

**Introduction :** TREM-1 (*triggering receptor expressed on myeloid cells-1*) est un récepteur de la superfamille des immunoglobulines exprimé à la surface des neutrophiles et des monocytes/macrophages. Il joue un rôle important au cours du sepsis en amplifiant la réponse inflammatoire. La modulation de TREM-1 améliore la survie au cours du sepsis expérimental avec en parallèle une amélioration de certains paramètres hémodynamiques tels que la pression artérielle moyenne (PAM). Cette étude vise ici à mieux comprendre 1) l'effet de la modulation de TREM-1 dans cette amélioration observée au cours du sepsis polymicrobien ; 2) les mécanismes mis en jeu.

**Matériels et méthodes :** Nous avons étudié l'effet de la modulation de TREM-1 par un peptide synthétique LP17 (3 mg/kg) sur la PAM et les lactates sanguins au cours du sepsis expérimental (CLP+18 heures). Les vaisseaux de ces animaux ont ensuite été prélevés pour étude de la vasoréactivité à la phényléphrine (Phe) et à l'acétylcholine (Ach) ex vivo (myographe). Alternativement, des vaisseaux d'animaux sains ont été prélevés et stimulés par du LPS (20 heures, 10  $\mu$ g/ml) ou à l'aide d'un agoniste spécifique de TREM-1 ( $\alpha$ TREM-1, 10  $\mu$ g/ml), avec ou sans LP17 (20  $\mu$ g/ml). L'impact de la modulation de TREM-1 sur les voies de signalisation intracellulaires constitutives (eNOS, Akt, COX1) et inductibles (iNOS, COX2) a également été étudié (WB). L'expression de TREM-1 par les cellules endothéliales microvasculaires CD146+ isolées de poumon et de foie d'animaux sains et septiques (trimagnétique) a été mise en évidence par cytométrie de flux (marquages VEGFR2 et TREM-1).

**Résultats :** In vivo, la diminution de la PAM et l'augmentation de la lactatémie étaient atténuées par l'administration de LP17. Les vaisseaux prélevés sur les animaux septiques traités par LP17 présentaient une meilleure réponse à la Phe et à l'Ach par rapport aux témoins. La réactivité des vaisseaux aortiques et mésentériques (contraction et relaxation) stimulés in vitro par LPS, mais aussi par Atrem-1, était altérée, phénomène reversé par LP17. LP17 restaurait la phosphorylation d'Akt et d'eNOS et s'opposait à l'activation des voies inductibles. L'analyse par FACS montre que TREM-1 est exprimé de façon constitutive par les cellules endothéliales microvasculaires (CD146+/VEGFR2+) isolées de poumon et de foie. Cette expression est augmentée in vivo chez les animaux septiques et est inductible par stimulation in vitro (LPS).

**Conclusion :** TREM-1 pourrait être directement impliqué dans la dysfonction endothéliale au cours du sepsis expérimental.

#### SO046

##### Étude du syndrome inflammatoire et de la fonction endothéliale mésentérique, dans un modèle expérimental de circulation extracorporelle chez le rat diabétique

V. Leguillou<sup>1</sup>, F. Doguet<sup>1</sup>, I. Jouet<sup>2</sup>, S. Renet<sup>2</sup>, V. Richard<sup>2</sup>, J.-P. Bessou<sup>3</sup>, F. Tamion<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Service de chirurgie cardiaque-Inserm U644, CHU Charles-Nicolle, université de Rouen, faculté de médecine, Rouen, France

<sup>2</sup>Inserm U644, université de Rouen, faculté de médecine, Rouen, France

<sup>3</sup>Service de chirurgie cardiaque, CHU Charles-Nicolle, Rouen

<sup>4</sup>Service de réanimation médicale-Inserm U644, CHU Charles-Nicolle, Rouen, France

**Objectif :** Le diabète est un facteur de risque indépendant de complications périopératoires et de mortalité après chirurgie cardiaque. Nous avons montré l'impact délétère de la CEC sur la dysfonction endothéliale mésentérique et le processus inflammatoire. De nombreuses données de la littérature démontrent le rôle négatif du diabète sur l'endothélium. Nous avons fait l'hypothèse que la présence du diabète pouvait majorer la dysfonction endothéliale notamment mésentérique au cours de la CEC. Le but de notre travail était d'évaluer l'impact du diabète sur la vasoréactivité mésentérique, l'expression vasculaire mésentérique des NOS (*nitric oxide synthase*) la production de nitrites et la réponse inflammatoire dans un modèle expérimental de CEC chez le rat.

**Matériels et méthodes :** Quarante rats Wistar adultes mâles étaient répartis selon une double stratification : diabète et CEC ; formant quatre groupes de dix rats : groupe témoin (D-CEC-), groupe diabétique (D+CEC-), groupe CEC (D-CEC+) et le groupe de rats diabétiques + CEC (D+CEC+). Nous avons réalisé une CEC de 90 minutes, fémorofémorales à un débit de 100 ml/kg par minute. Le diabète était induit par une injection intrapéritonéale de streptozotocine à la dose de 60 mg/kg, huit semaines avant l'expérimentation. L'étude de la réactivité vasculaire de segments d'artères mésentériques a été réalisée à l'aide d'un myographe de Mulvany à des concentrations croissantes de phényléphrine, d'acétylcholine et de nitroprussiate de sodium après précontraction à la phényléphrine et de phényléphrine après blocage au LNA. L'expression protéique des NOS inductible et endothéliale a été évaluée par Western Blot sur des segments d'artères mésentériques. Le métabolisme du NO a été évalué par le dosage sérique des nitrites à la canulation (T0), après 90 minutes (T1) et après 180 minutes (T2). La réponse inflammatoire a été évaluée par le dosage systémique du *tumor necrosis factor- $\alpha$*  à T0 et T2.

**Résultats :** Les animaux diabétiques exposés à la CEC (D+CEC+) présentaient une majoration de la dysfonction endothéliale mésentérique évaluée par un renforcement de la réponse contractile aux agonistes  $\alpha$ -adrénergiques et une altération majeure de la vasorelaxation mésentérique. Cette dysfonction était significativement plus élevée comparativement aux autres groupes ( $p < 0,001$ ). La dysfonction endothéliale était associée à une augmentation significative de la production de nitrite ( $p < 0,001$ ) et de l'expression mésentérique de la NOSi et de la NOSe. Le dosage de TNF- $\alpha$  était significativement plus élevé dans le groupe D+CEC+ ( $p < 0,001$ ).

**Discussion :** Notre travail montre des effets délétères cumulés de la circulation extracorporelle et du diabète sur le processus inflammatoire et sur la réactivité vasculaire mésentérique. Les anomalies sur la réactivité vasculaire sont associées à des modifications du métabolisme du NO avec une surexpression de la NOS.

**Conclusion :** Ce travail expérimental démontre l'impact délétère du diabète sur le syndrome inflammatoire et l'endothélium notamment dans le territoire mésentérique au cours de la circulation extracorporelle. Nos résultats devraient permettre une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la morbidité accrue des patients diabétiques au cours de la CEC.

## SO047

### Cinétiques différentes de la *E-selectine* et de l'endocan, deux marqueurs d'agression endothéliale, au cours d'un choc endotoxinique chez la souris 129Sv : rôle des sérine-protéases des neutrophiles

J. Pastré<sup>1</sup>, N. de Freitas Caires<sup>2</sup>, M. Delehedde<sup>2</sup>, A. Scherpereel<sup>3</sup>, E. Parmentier-Decrucq<sup>4</sup>, D. Mathieu<sup>4</sup>, P. Lasalle<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unité Inserm U1019, Institut Pasteur de Lille, Lille, France

<sup>2</sup>Lunginnov, Institut Pasteur de Lille, Lille, France

<sup>3</sup>Service de pneumologie, CHRU de Lille, hôpital Calmette, Lille, France

<sup>4</sup>Service de réanimation médicale et de médecine hyperbare, CHRU de Lille, hôpital Calmette, Lille, France

**Introduction :** Le choc septique est une cause fréquente de décès en réanimation. De nombreuses études ont montré l'importance de l'atteinte endothéliale dans sa physiopathologie. Endocan ou *endothelial cell-specific molecule-1* (ESM-1) est un protéoglycane de 50 kDa produit par les cellules endothéliales surtout au niveau des vaisseaux pulmonaires. Dans une étude préliminaire, nous avons montré que le taux sanguin d'endocan/ESM-1 était associé à la sévérité et à l'évolution de l'état septique chez les patients. Nous avons également montré in vivo chez l'animal qu'un traitement par antiprotéase était associé à une diminution du *rolling* des leucocytes et de leur adhésion à l'endothélium vasculaire dans le sepsis. Cette diminution du contact entre leucocytes et cellules endothéliales est associée à une augmentation du taux sanguin d'endocan, suggérant un lien entre protéase leucocytaire, endocan et induction de la réaction inflammatoire durant le sepsis.

**Matériels et méthodes :** Pour caractériser ce lien, nous avons utilisé un modèle non léthal de choc induit par LPS chez des souris génétiquement déficientes en cathepsine G (CG<sup>-/-</sup>) et chez des souris génétiquement déficientes en cathepsine G et en élastase (CGEL<sup>-/-</sup>). La sévérité de l'agression septique était appréciée sur un score clinique. L'activation des neutrophiles et de l'endothélium était étudiée par la cinétique de la myéloperoxydase, la *sE-selectine*, et l'endocan qui ont été dosés par Elisa dans le sérum des souris. En complément, des tests sur la protéolyse d'endocan par les diverses protéases leucocytaires ont été réalisés in vitro.

**Résultats :** Chez les animaux témoins (WT), les scores cliniques et le taux de *E-selectine* étaient maximaux à 24 heures après l'injection

de LPS, puis diminuaient progressivement jusqu'à un retour à la normale. La myéloperoxydase circulante augmentait rapidement à 24 heures mais restait élevée jusque 72 heures. À l'inverse endocan diminuait rapidement à j1 jusqu'à être indétectable à j2 et à j3 puis son taux se normalisait à j5. Une corrélation inverse était observée entre les niveaux d'endocan et de myéloperoxydase. Les mêmes résultats ont été observés chez les souris CG<sup>-/-</sup>. Cependant, les souris CGEL<sup>-/-</sup> se rétablissaient un jour plus tôt, et présentaient une plus importante réduction de leurs taux d'endocan. L'incubation de l'endocan murin avec le supernatant de polynucléaires neutrophiles (PNN) provenant de souris WT, CG<sup>-/-</sup>, ou CGEL<sup>-/-</sup> génère un fragment protéolytique de 14 kDa. Cette activité protéolytique est inhibée par l' $\alpha_1$ -antichémotrypsine.

**Conclusion :** Dans un modèle de choc endotoxinique murin non léthal, il existe une activation des cellules endothéliales et des PNN dont témoigne l'évolution de la myéloperoxydase, de la *E-selectine* et de l'endocan. La décroissance d'endocan survient de façon concomitante à l'activation des PNN. In vitro, les sérine-protéases leucocytaires induisent un clivage de l'endocan, ce qui pourrait expliquer la diminution de son taux circulant dans le modèle in vivo. L'implication des sérine-protéases des PNN pourrait également expliquer certaines différences observées entre la souris et l'homme.

## SO048

### Effet d'un traitement par alpha1-antitrypsine dans un modèle expérimental porcin de choc endotoxinique

P. Saint-Léger<sup>1</sup>, J. Mangalaboyi<sup>1</sup>, A. Tournoy<sup>2</sup>, M. Balduyck<sup>3</sup>, M. Jourdain<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Service de réanimation polyvalente, CHRU de Lille, hôpital Roger-Salengro, Lille, France

<sup>2</sup>Laboratoire d'hématologie, CHRU de Lille, Lille, France

<sup>3</sup>Laboratoire de biochimie, CHRU de Lille, Lille, France

<sup>4</sup>Inserm U859, université de Lille 2, CHRU de Lille, hôpital Roger-Salengro, Lille, France

**Introduction :** Lors des états septiques graves, l'activation leucocytaire provoque la libération de nombreuses protéases, notamment l'élastase leucocytaire. Cela pourrait participer à l'apparition de lésions tissulaires sévères. Il en résulterait l'apparition d'un syndrome de défaillance multiviscérale. Par ailleurs, l'activation protéolytique semble participer au développement du syndrome de coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) qui aggrave le pronostic des patients. Le but de ce travail était d'évaluer la place de l'alpha-1-antitrypsine ( $\alpha_1$ -AT), inhibiteur spécifique de l'élastase leucocytaire, dans un modèle porcin de choc endotoxinique avec CIVD associée.

**Matériels et méthodes :** Quatre groupes ont été étudiés : le groupe LPS qui recevait une injection de 5  $\mu$ g/kg par minute de LPS d'*Escherichia Coli* (sérotype O55 : B5, Sigma, France) sur 30 minutes ( $n = 4$ ), le groupe AAT qui recevait, après l'administration du LPS, 60 mg/kg par 30 minutes puis 60 mg/kg sur quatre heures d' $\alpha_1$ -AT ( $n = 4$ ), le groupe PC recevait 150 UI/kg par 30 minutes de protéine C ( $n = 4$ ) en même temps que l' $\alpha_1$ -AT. Le groupe témoin ne recevait que de l' $\alpha_1$ -AT à la même dose que les groupes AAT et PC ( $n = 4$ ). Les animaux étaient étudiés pendant une période de cinq heures avec recueil des paramètres hémodynamiques et dosages biologiques à l'état de base puis à 30, à 60, à 90, à 150 et à 300 minutes.

**Résultats :** Le groupe témoin restait stable sur tous les plans au cours de la période d'étude. Tous les animaux recevant du LPS développaient un état de choc hypodynamique (diminution du débit cardiaque de 25 % en moyenne à T300) et vasoplégique associé à une

hypertension artérielle pulmonaire (PAPM+100 % à T30). Seuls les animaux recevant de la PC ont amélioré leur situation hémodynamique avec normalisation tensionnelle à la fin de l'expérimentation. Une CIVD objectivée par l'apparition d'une thrombopénie (-35 % à T300), d'une diminution du TP (-20 % à T300), d'une élévation des D-dimères (+500 % dès T90) et des monomères de fibrine (+500 % dès T90) était mise en évidence dans les trois groupes recevant du LPS. Seul le groupe recevant de la PC améliorait les marqueurs d'activation fibrinolytique.

**Conclusion :** L'apport d' $\alpha$  1-AT, afin de limiter les phénomènes protéolytiques observés au cours des états septiques graves, n'a pas

démontré de bénéfice clinicobiologique dans notre modèle. En revanche, l'administration de protéine C a permis de confirmer son intérêt potentiel dans ce type d'indication.

#### Références

1. Breslow MJ, Miller CF, Parker SD, et al (1987) Effect of vasopressors on organ blood flow during endotoxin shock in pigs. *Am J Physiol* 252:291-300
2. Jourdain M, Carrette O, Tournoy A, et al (1997) Effects of inter-alpha-inhibitor in experimental endotoxic shock and disseminated intravascular coagulation. *Am J Respir Crit Care Med* 156:1825-33