

Nouvelles approches physiopathologiques du sepsis

Novel pathophysiological approaches to sepsis

© SRLF et Springer-Verlag France 2011

SOE001

Approche transcriptomique de l'expression de gènes à la phase précoce du choc septique chez l'homme

P. Bilbault¹, T. Lavaux², W. Raffelsberger³, A. Launoy⁴, M. Schenck Dhif¹, A. Geiger¹, M. Czekala¹, M. Gaub², P. Oudet², F. Schneider¹

¹Service de réanimation médicale, CHU de Strasbourg, hôpital de Hautepierre, Strasbourg, France

²Laboratoire de biologie moléculaire, CHU de Strasbourg, hôpital de Hautepierre, Strasbourg, France

³Département de biostatistiques, institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire, Strasbourg, France

⁴Service de réanimation chirurgicale, CHU de Strasbourg, hôpital de Hautepierre, Strasbourg, France

Introduction : Le choc septique (CS) active de multiples systèmes biologiques ; l'analyse de marqueurs biologiques pris isolément, bien qu'utile, devient insuffisante pour progresser dans la compréhension de cette maladie. Une approche plus globale et synthétique apparaît alors nécessaire. Aussi avons-nous réalisé une analyse d'expression de gènes (ou transcriptome) de patients à la phase initiale du choc septique.

Patients et méthodes : Vingt patients en CS par pneumopathie infectieuse ont été inclus prospectivement. Dans les 12 heures suivant le diagnostic de CS, un tube de sang total (PAXgene) est prélevé pour analyse des transcrits sur puces Affymetrix U133 Plus (54 675 sondes). L'analyse bio-informatique a utilisé l'algorithme GCRMA (avec un seuil de variation > 2). Les résultats ont été comparés à ceux d'un groupe témoin de 48 personnes saines issues de la base de données GEO (Gene Expression Omnibus) du National Center for Biotechnology Information (NCBI). Les variations significatives d'expressions de gènes ont été interprétées dans deux banques de données du transcriptome : BioCarta database et David Bioinformatics database du NCBI.

Résultats : Les principales caractéristiques des patients étaient les suivantes : âge (ans) : $68,7 \pm 13,4$; IGSII : $62,1 \pm 3,5$; LOD score : $8,7 \pm 0,8$; ventilation mécanique (100 %) ; micro-organismes : bacilles Gram- (55 %), cocci Gram+ (40 %), levures (5 %) et mortalité (j28) : 50 %. Avec notre technique d'analyse, 1 378 gènes furent considérés comme statistiquement surexprimés et 1 857 sous exprimés. Dans la base BioCarta, les trois premiers clusters (sur 30) surexprimés étaient ceux des activités des organelles, des facteurs de la coagulation et des protéines de réparation ; les trois premiers clusters (sur 29) sous-exprimés étaient ceux correspondant aux facteurs nucléaires, aux facteurs de différenciation lymphocytaire et aux expressions des ARN. Dans la base David, les 20 premiers gènes surexprimés étaient des enzymes (kinases), et les 20 premiers sous exprimés étaient des facteurs nucléolaires et ribosomiques.

Discussion : L'analyse du transcriptome confirme la complexité du CS avec de multiples voies biologiques impliquées dès la phase précoce. Nous observons une activation de la réponse inflammatoire, de la coagulation et du métabolisme cellulaire au niveau des organelles

(en particulier du réticulum endoplasmique) et une répression de la réponse immunitaire innée et acquise avec diminution d'expression des facteurs de différenciation des lymphocytes T. L'observation de la sous-expression des facteurs ribosomiques (ARN de transfert) est nouvelle et nécessite confirmation. Néanmoins, vu le nombre important de transcrits modifiés (sous réserve de vérification protéique), il faudrait plus raisonner en termes de voies de signalisation.

Conclusion : L'analyse des variations du transcriptome de patients à la phase aiguë du CS objective d'importantes variations des systèmes biologiques, en particulier ceux intéressant le système immunitaire : ils sont caractérisés par une dérégulation précoce de la différenciation des lymphocytes T.

SOE002

La dysfonction endothéliale mésentérique dans le choc endotoxinique : impact bénéfique de la déficience génétique en protéine tyrosine phosphatase 1B (PTP1B)

D. Coquerel¹, E. Gomez², S. Renet², V. Richard², B. Dautreaux², C. Thuillez², F. Tamion³

¹Inserm U644, faculté de médecine et de pharmacie de Rouen, Rouen, France

²Inserm U644, université de Rouen, faculté de médecine, Rouen, France

³Inserm U644, service de réanimation médicale, CHU Charles-Nicolle, Rouen, France

Introduction : La dysfonction endothéliale joue un rôle majeur dans la pathogenèse du choc septique et participe activement à l'apparition des défaillances multiviscérales. Une réduction de la phosphorylation de la NO-synthase endothéliale (NOS_e) a été décrite et corrélée avec la mortalité du sepsis. Les protéines tyrosine phosphatase (PTP), notamment l'isoforme protéine tyrosine phosphatase 1B (PTP1B), sont impliquées dans la régulation des taux de phosphorylation de la NOS_e et de son activité. Une nouvelle approche de la dysfonction endothéliale par l'inhibition de cette phosphatase devrait permettre de majorer le taux de phosphorylation de la NOS_e et de restaurer son implication au niveau de l'endothélium.

Le but de ce travail a été d'évaluer l'impact potentiel bénéfique d'une déficience génétique pour la PTP1B dans un modèle expérimental de choc endotoxinique chez la souris.

Matériels et méthodes : Nous avons réalisé un modèle de choc endotoxinique par l'administration intrapéritonéale de LPS 15 mg/kg à des souris de type WT et avec déficience génétique pour la PTP1B (PTP1B^{-/-}). Quatre groupes d'animaux ont été définis (WT, WT + LPS, PTP1B^{-/-}, PTP1B^{-/-} + LPS) à h4 et h8. Nous avons étudié : la mortalité, la dysfonction endothéliale mésentérique sur un artériographe d'Halpern, l'expression protéique au niveau mésentérique de iNOS,

Akt/pAkt (protéine kinase B), NOSe par *western blot* et la production plasmatique de NO par résonance paramagnétique électronique.

Résultats : Nous avons mis en évidence pour la première fois une réduction significative de la mortalité des animaux (PTP1B^{-/-}) comparativement aux animaux WT. Ce résultat est associé à une amélioration significative de la fonction endothéliale mésentérique, caractérisée par le maintien des réponses à l'insuline et à la phényléphrine. Nous avons montré parallèlement une suractivation de la voie PI3K/Akt/NOS avec une restauration significative de la phosphorylation d'Akt comparée aux souris WT ($p = 0,045$). Il existe une activation de la voie phosphodépendante Akt/pAkt chez les animaux PTP1B^{-/-} comparativement aux animaux WT ($p < 0,001$). Le taux circulant de NO est significativement inférieur chez les animaux PTP1B^{-/-}. Nous avons montré une élévation myocardique significative de l'expression de l'ARNm de la PTP1B chez les souris WT ($p < 0,001$).

Discussion : Nous avons démontré pour la première fois l'impact bénéfique d'une déficience génétique pour la PTP1B dans un modèle de choc endotoxique avec une réduction significative de la mortalité des animaux. Cet impact bénéfique est associé à une diminution significative de la dysfonction endothéliale dépendante de l'activation de la voie PI3K/Akt/NOS.

Conclusion : L'endothélium doit être considéré dans les réflexions physiopathologiques et thérapeutiques de l'infection grave. Dans ce travail, nous avons démontré pour la première fois l'impact bénéfique d'une inhibition de la voie de la PTP1B dans un modèle de choc endotoxique permettant une activation de la voie NOS. Il pourrait s'agir là d'un nouveau challenge thérapeutique nécessitant d'autres travaux complémentaires.

SOE003

TLT-1 est un inhibiteur naturel de TREM-1 et favorise la survie au cours du sepsis expérimental

M. Derive¹, Y. Bouazza¹, F. Massin², C. Alauzet³, B. Levy⁴, P.-E. Bollaert⁵, S. Gibot⁵

¹Groupe choc, faculté de médecine, Nancy, France

²Laboratoire d'immunologie, CHU de Brabois, Nancy, France

³Laboratoire de bactériologie, faculté de médecine, Nancy, France

⁴Service de réanimation médicale, CHU de Nancy, hôpital de Brabois adultes, Vandœuvre-lès-Nancy, France

⁵Service de réanimation médicale, CHU de Nancy, hôpital central, Nancy, France

Introduction : TREM-1 (*triggering receptor expressed on myeloid cells 1*) et TLT-1 (*TREM-like transcript 1*) appartiennent à la superfamille TREM. TREM-1 est exprimé à la surface des monocytes/macrophages et des neutrophiles et joue un rôle majeur au cours du sepsis en amplifiant la réponse immunitaire de l'hôte par synergie avec les TLRs. TLT-1 est exprimé exclusivement sur les mégacaryocytes et les plaquettes activées. Il facilite l'agrégation plaquettaire en liant le fibrinogène. Au cours du sepsis expérimental, les souris TLT-1^{-/-} étaient plus susceptibles aux hémorragies et, de façon plus surprenante, aux infections, avec des concentrations de cytokines et une mortalité plus importantes que les souris sauvages. Cette étude vise ici à mieux comprendre le rôle de TLT-1 au cours du sepsis et, plus particulièrement, dans le processus inflammatoire, à travers l'étude d'un peptide dérivé de sa portion extracellulaire, appelé ici LR17.

Matériels et méthodes : Nous avons stimulé des neutrophiles humains avec du LPS et un agoniste spécifique de TREM-1 (α TREM-1), avec ou sans LR17 vs un peptide témoin LR17-*scrambled*. Afin de mesurer l'état d'activation cellulaire, nous avons quantifié la phosphorylation

de p38-MAPK et d'ERK1/2 (WB), l'activation de NF- κ B et la libération de cytokines (Elisa), l'expression génique de différents gènes d'intérêt (qRT-PCR) et la production de ROS (cytométrie). La spécificité de LR17 a été vérifiée sur des monocytes KD TREM-1 (*knockdown*, ARNi). Nous avons également étudié l'effet de l'administration de LR17 au cours d'un modèle murin expérimental de sepsis induit par CLP (ligature et perforation cœcale) et évalué l'état inflammatoire local (qRT-PCR) et systémique (Elisa) puis le taux de survie.

Résultats : In vitro, la production de cytokines induite par les neutrophiles et les monocytes était diminuée de façon dose-dépendante en présence de la forme recombinante de TLT-1 ou de LR17, au niveau génique (ARNm) et protéique (Elisa). Un grand nombre de cytokines et de chimiokines étaient concernées : TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-16, GRO- α , MCP-1, MIP-1 β et RANTES. L'exploration des voies de signalisation intracellulaires associait systématiquement LR17 à une diminution de la phosphorylation de p38 et d'ERK1/2 ainsi que de nombreuses autres phosphoprotéines (mTOR, Lyn, AKT, MSK1/2, MEK1/2, GSK 3 α/β , RSK, et p53), une diminution de la translocation de NF- κ B et de la production de ROS. Ces effets disparaissaient sur les monocytes KD TREM-1. L'administration précoce (h + 1 heure) ou tardive (h + 24 heures) de LR17 au cours du sepsis expérimental était associée à une amélioration de l'état inflammatoire global, caractérisée par une diminution des cytokines plasmatiques, bronchoalvéolaires et péritonéales ainsi que de leur expression tissulaire dans le poumon et le foie (IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-10, C8a, C5a, MIF, TGF- β ...). Les défaillances d'organes ainsi que l'activation de la coagulation (TATc, numération plaquettaire) induites au cours du choc étaient également prévenues par LR17. Finalement, le taux de survie était augmenté de plus de 60 % par rapport aux souris témoins.

Conclusion : TLT-1 joue un rôle important au cours du sepsis, à la croisée des chemins entre l'hémostase et l'inflammation. C'est un inhibiteur spécifique de TREM-1 et constitue donc un outil thérapeutique potentiel.

SOE004

Évaluation par la méthode des puces à ADN de l'effet des β 1 bloquants sur le myocarde au cours de deux modèles de choc septique murin

E. de Montmollin¹, A. Mansart¹, D. Annane²

¹EA 4342, étude de la réponse neuroendocrine au sepsis, CHU Raymond-Poincaré, Garches, France

²Service de réanimation médicale, CHU Raymond-Poincaré, Garches, France

Introduction : La dysfonction myocardique est fréquente au cours du choc septique et participe au pronostic catastrophique de cette pathologie. Les mécanismes de cette dysfonction semblent multiples et encore mal compris.

Les β 1 bloquants ont prouvé leur potentiel en tant que protecteurs cardiaques au cours du choc septique murin, mais les effets exacts d'un blocage β 1 ne sont pas connus. Nous avons donc cherché à identifier au sein du myocarde, par la technique des puces à ADN, les modifications d'expression génique induites par les β 1 bloquants dans deux modèles de souris septiques.

Matériels et méthodes : Deux modèles septiques, par ligation cœcale et perforation (CLP) ou injection intrapéritonéale de lipopolysaccharides (LPS), sont réalisés chez des souris C57BL/6. Le β 1 bloquant sélectif utilisé est l'esmolol, administré à la dose de 20 mg/kg par heure permettant une réduction de fréquence cardiaque de 10 %.

Les cœurs sont prélevés 22 heures après l'initiation du choc par extraction des ARN messagers et hybridation sur une puce à ADN. Pour chaque groupe (LPS, CLP, témoin), la différence d'expression

de chacun des 41 000 gènes de la puce est mesurée en fonction de la présence ou non d'esmolol. Une analyse globale de la modulation d'expression de groupes de gènes corégulés a été réalisée, permettant d'identifier de grandes fonctions biologiques ou de voies de signalisation. Au sein des groupes identifiés par cette méthode, une analyse de la fonction de chaque gène a été réalisée.

Résultats : Sous esmolol, l'analyse d'enrichissement de groupes de gènes corégulés a montré à la fois dans le modèle LPS et CLP une sous-expression des gènes impliqués dans la réponse aiguë inflammatoire locale, le chimiotactisme et l'activation des monocytes et des polynucléaires neutrophiles. Par ailleurs, une sous-expression des gènes impliqués dans la voie du complément a été identifiée dans le modèle CLP, et une sous-expression des gènes impliqués dans l'apoptose dans le groupe LPS. L'analyse spécifique au sein de ces groupes de gènes corégulés a confirmé une sous-expression significative des gènes du TNF- α , de l'IL-1 β et de l'IL-6, ainsi qu'une sous-expression

de nombreuses chémokines parmi lesquelles MCP-1, MIP-2 et MIP-1 α . Concernant le contrôle de la diapédèse leucocytaire, les gènes des sélectines E et P ainsi que de ICAM-1 et de VCAM-1 ont été fortement sous-exprimés par l'esmolol dans les deux modèles septiques. Les gènes du complément sous exprimés par le β 1 bloquant sont ceux des composants B, D et C3 du complément, contrôlant spécifiquement la voie d'activation alterne.

La sous-expression de gènes proapoptotiques concerne les gènes des caspases 4, 7 et 12, ainsi que celui du TNF *related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) et de son récepteur (TRAIL-R).

Conclusion : Notre étude a permis d'identifier grâce à la technique des puces à ADN les mécanismes potentiels de l'effet cardioprotecteur des β 1 bloquants au cours du sepsis : une action anti-inflammatoire au niveau local avec réduction du chimiotactisme et de la diapédèse leucocytaire, ainsi qu'une réduction de l'activation du complément et de l'apoptose des cardiomyocytes.