

Sepsis : études expérimentales

Sepsis: experimental studies

© SRLF et Springer-Verlag France 2013

SO127

PTP1B gene deletion or pharmacological inhibition improves glucose metabolism and limits cardiovascular dysfunction in experimental septic shock

E. Delile¹, D. Coquerel¹, R. Nevière², V. Richard¹, F. Tamion³

¹Inserm U1096, Rouen, France

²Ea 4484, département de physiologie, Ea 4484, Lille, France

³Service de réanimation médicale, CHU de Rouen, Rouen, France

Introduction: Hyperglycemia is a common feature of septic patient and has been associated with aggravated outcome and increased mortality. In contrast insulin has been shown to decrease mortality and to prevent the incidence of multi-organ failure but is often associated with deleterious hypoglycemia. Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) is a negative regulator of insulin signaling. Recently we showed that PTP1B gene deletion improves cardiovascular dysfunction during endotoxemia. However, the effect of PTP1B inhibition on glucose metabolism and cardiovascular insulin resistance during sepsis is unknown.

Results: To assess the potential effects of PTP1B inhibition, we developed a Cecal Ligation and Puncture (CLP) model of sepsis which is known to reproduce metabolic disorders of clinical sepsis. CLP impaired glucose metabolism at 16 hours as shown by the intravenous Glucose Tolerance Test (IGTT), and this impairment was significantly reduced in PTP1B^{-/-} mice. Moreover the mesenteric arterial dilatation to insulin and flow was abolished during CLP and was improved by *ex-vivo* PTP1B inhibition (Ins 10⁻⁵M; CLP 7 ± 2; CLP+PTP1Bi 18 ± 4%, p < 0.01; dilatation to 200µl/min flow; CLP 1 ± 1; CLP + PTP1Bi 13 ± 3%, p < 0.01). We also found that PTP1B^{-/-} mice subjected to CLP had a higher survival rate compare to WT (duration of 50% survival; WT 28 h; PTP1B^{-/-} 42 h, p < 0.05) and that mesenteric arteries isolated from PTP1B^{-/-} mice were protected against TNF-α induced impairment of dilation to insulin (Ins 10⁻⁵M; WT + TNF-α 7 ± 1; PTP1B^{-/-} + TNF-α 20 ± 2%).

Conclusion: To conclude PTP1B gene deletion or inhibition limits the cardiovascular glucose perturbations induced by sepsis, and this is associated with reduced vascular dysfunction and increased survival. PTP1B inhibition appears to be an alternative solution to insulin-therapy in the treatment of septic shock.

SO128

Les microparticules procoagulantes comme bioeffecteurs au cours du choc septique : y a-t-il une place pour leur modulation pharmacologique ?

J. Boisramé-Helms¹, X. Delabranche¹, S. Degirmenci², F. Zobairi³, A. Boivin¹, M. Burban⁴, B. Levy⁵, F. Toti⁴, F. Meziani¹

¹Service de réanimation médicale, CHU de Strasbourg-hôpital Civil, Strasbourg, France

²Département d'anesthésie et réanimation,

CHU de Strasbourg-hôpital Civil, Strasbourg, France

³Ea 7293, stress vasculaire et tissulaire en transplantation, faculté de médecine, université de Strasbourg, Strasbourg, France

⁴Laboratoire de biophotonique et pharmacologie, UMR 7213, faculté de pharmacie, Illkirch-Graffenstaden, France

⁵Service de réanimation médicale, CHU de Nancy-hôpital Brabois Adultes, Vandœuvre-lès-Nancy, France

Introduction : Le choc septique est caractérisé par un intense processus inflammatoire et une activation cellulaire, à l'origine d'un remodelage des membranes cellulaires aboutissant à la libération de microparticules (MPs). Ces MPs constituent un pool de bio-effecteurs qui module de nombreuses fonctions biologiques fondamentales. Au cours du choc septique, certaines MPs pourraient promouvoir l'importante vasoplégie observée, participer à la modulation du statut oxydant ou à la génération d'un état procoagulant. Dans un modèle de choc septique chez le rat, nous avons évalué les effets d'une modulation pharmacologique des MPs circulantes par la protéine C activée (PcA) sur la dysfonction hémodynamique.

Matériels et méthodes : Des MPs issues de rats en choc septique (après ligature caecale et perforation, LCP) ou sham, traités ou non par PcA et réanimés par noradrénaline et remplissage vasculaire (NaCl 0,9 %), sont inoculées à des rats sains afin de déterminer le rôle de ces MPs dans la réponse hémodynamique (pression artérielle, débit carotidien), le stress oxydant cardiaque et vasculaire (aorte et artère mésentérique) mesuré en résonance paramagnétique électronique et la génération de MPs chez les rats receveurs (capture sur annexine V, quantification par test prothrombinase et phénotypage).

Résultats : (a) La concentration et le phénotype des MPs circulantes sont modifiés chez les rats septiques (LCP), avec une augmentation significative des taux de MPs leucocytaires, plaquettaires et endothéliales (respectivement multipliés par 9, 4 et 3). (b) Le traitement par PcA réduit significativement la génération de MPs leucocytaires et la dose de noradrénaline nécessaire pour atteindre les objectifs de pression artérielle moyenne (PAM) fixés chez les rats septiques. (c) Les MPs de rats septiques non traités (LCP-NaCl), mais pas celles des rats septiques traités par PcA (LCP-PcA), réduisent significativement la PAM des rats receveurs sains (PAM 83 ± 9 vs 120 ± mmHg, 4 heures après l'inoculation des MPs, p < 0,05). (d) Le contenu en thromboxane A₂ (TXA₂) et l'activité PcA des MPs générées par les rats septiques traités par PcA (LCP-PcA) sont significativement augmentés (TXA₂ : MPs de rats LCP-PcA 77,1 ± 11,4 pg/mL vs MPs de rats sham-NaCl 39,8 ± 4,5 pg/mL, p < 0,05 ; activité PcA normalisée aux MPs totales : LCP-PcA 15,3 ± 1,6 vs LCP-NaCl 4,4 ± 0,5 mOD/h par 0,1 pmole de MP, p < 0,05). L'inoculation de telles MPs (MPs de rats LCP-PcA) à des receveurs sains est responsable d'une diminution significative de l'activation des NF-κB, pIκB et COX-2 cardiaques et artériels et d'une diminution de la génération de iNOS pro-inflammatoire. (e) L'inoculation de MPs de rats septiques traités par PcA modifie le phénotype des MPs générées par les rats receveurs, avec

une augmentation du taux de MPs plaquettaires et endothéliales (MPs plaquettaires $4,5 \pm 1,3$ vs $3,0 \pm 0,9$ nM et MPs endothéliales $2,7 \pm 1,5$ vs $1,2 \pm 1,3$ nM chez les rats receveurs de MPs LCP-PCa et de MPs LCP-NaCl respectivement, $p < 0,05$).

Conclusion : Dans un modèle animal de choc septique, l'augmentation du taux de MPs procoagulantes circulantes est responsable d'effets hémodynamiques délétères. Le traitement par PCa modifie l'origine cellulaire et les taux de MPs circulantes, qui en acquièrent et transmettent les propriétés cytoprotectrices.

Ce travail a été réalisé grâce à la bourse SRLF Master 2 et/ou Mobilité 2011.

Bibliographie

1. Perez-Casal M, Thompson V, Downey C, et al (2011) The clinical and functional relevance of microparticles induced by activated protein C treatment in sepsis. *Crit Care* 15:R195
2. Sennoun N, Meziani F, Dessebe O, et al (2009) Activated protein C improves lipopolysaccharide-induced cardiovascular dysfunction by decreasing tissular inflammation and oxidative stress. *Crit Care Med* 37:246–55

SO129

Attenuation of responses to endotoxin by the TREM-1 inhibitor LR12 in non-human primate

M. Derive¹, A. Boufenzar¹, J. Lemarié², S. Gibot²

¹Équipe TREM, Inserm U1116, Nancy, France

²Service de réanimation médicale, CHU de Nancy, hôpital Central, Nancy, France

Introduction: TREM-1 (*Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1*) is an immunoreceptor that amplifies the inflammatory response mediated by TLRs (*Toll-Like Receptors*) engagement. LR12 is a short peptide able to specifically inhibit TREM-1 activation. Administration of such peptide during preclinical models of peritonitis in mice, rats and mini-pigs modulates in vivo the inflammatory cascade triggered by infection, thus inhibiting hyper-responsiveness, organ damage and death with a strong protective effect on cardiovascular system. Xiao et al. recently characterized the circulating leukocyte transcriptome after severe trauma, burns, or during endotoxemia in healthy volunteers. They observed that as early as 4 hours after injury, more than 80% of leukocyte transcriptome was altered. This phenomenon coined “genomic storm”, consisted on an increased expression of genes involved in innate immunity, systemic inflammatory and anti-inflammatory responses, concomitant with a decreased expression of genes regulating adaptive immunity. They postulated that complications under nosocomial infections were under the dependence of the magnitude and the duration of the initial leukocyte reprogramming. This new paradigm thus clearly suggests that a targeted therapy aimed at limiting this initial leukocyte ‘genomic storm’ may be a valuable approach to improve patients’ outcome. In order to assess the effect of LR12 on this genomic storm and to accumulate data on precise mechanism of action of LR12, we investigated the effects of LR12 administration during endotoxemia in non-human primates.

Matériels and methods: Twelve adult male *Cynomolgus* (*macaca fascicularis*) monkeys exposed to an intravenous bolus of endotoxin (10 µg/kg) were randomized to receive LR12 or placebo (n = 6 per group) as an initial intravenous bolus followed by a 8-hour continuous intravenous infusion. An additional group of 4 only received LPS and vehicle infusion. Vital signs were monitored for 8 hours. Blood was regularly sampled for pharmacokinetics and at H0, 1, 2, 4, and 8 for analysis of clinical chemistries, leukocytes count, coagulation parameters, cytokines plasma concentration, and transcriptomic study.

Results: LR12 was administered as a 5 mg/kg bolus over 15 min followed by a continuous 1 mg/kg/h infusion. A peak concentration at 159.3 ± 22.8 ng/mL was achieved after the bolus, then the LR12 concentration decreased to a steady state at 91.4 ± 5.1 ng/mL and the inter-individual variability was very small. LR12 half-life was 2.25 minutes in vivo. LR12 showed no effect on heart rate and body temperature. By contrast to the placebo group, which experienced a 25-40% blood pressure decrease after endotoxin administration, LR12 treated monkeys remained normotensive. Endotoxin induced leukopenia at 2 h (mean leukocytes count, 7.62 G/L vs. 21.1 at H0). This leukopenia was the result of neutropenia, lymphopenia and monocytopenia. While LR12 had no effect on lymphocytes counts, its administration totally blunted neutropenia during most of the observation period. Of note platelet count remained unchanged between groups. LR12 also attenuated IL-6, IL-8, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, and TNF-α plasma concentrations by 20 to 50%. Our transcriptomic results were very close to the ones obtained in humans by Xiao et al. Expectedly, endotoxin induced early changes in circulating leukocyte gene expression. Among the most regulated canonical pathways, those involved in immune response dominated (IL-6, IL-10, TLR, nuclear factor-κB signaling), with the TREM-1 signaling pathway ranking in 5th position, highlighting the important role of TREM-1 in acute inflammation. When we specifically looked at the ‘inflammatory response’ biological function, all its components, from cell activation to cell recruitment and infiltration, were largely regulated upon LPS administration with -log₁₀ (p-values) ranging from 11 to 15. LR12 treatment was associated with a reduction of all these gene alterations, with, for example, a down-modulation of all ‘inflammatory response’-associated pathways signaling, explaining the reduction of cytokines plasma concentrations and the reduction of early leukopenia. Importantly, the ‘TREM-1 signalling pathway’ was the most altered by LR12 with a 60% decrease of associated log (p-values) and z-score.

Conclusion: The TREM-1 inhibitor LR12 is able to mitigate endotoxin-associated clinical, biological, and genomic alterations, with no obvious side effects. It is important to notice that LR12 did not only reduce pro-inflammatory pathways activation but also targeted anti-inflammatory genes activation. LR12 may thus no be viewed as an ‘anti-inflammatory’ agent but as a modulator of both sides of the immune response during sepsis. Although endotoxin does not mimic the complex physiopathology of sepsis, this work adds important data to those previously accumulated with LR12 in polymicrobial sepsis models in rodents and mini-pigs and paves the way for future phases Ia and Ib trials in humans.

Bibliographie

1. Xiao W, Mindrinos MN, Seok J, et al (2011) A genomic storm in critically injured humans. *J Exp Med* 208:2581–90

SO130

Endothelial-specific invalidation of protein tyrosine phosphatase 1B limits cardiovascular dysfunction and mortality during endotoxemic shock

D. Coquerel¹, E. Delile¹, J. Maupoint¹, R. Nevière², V. Richard¹, F. Tamion³

¹Inserm 1096, institut de recherche innovation biomédecine, faculté de médecine, université de Rouen, Rouen, France

²Ea 4484, département de physiologie, université de Lille-II, Lille, France

³Inserm 1096, service de réanimation médicale, CHU de Rouen—université de Rouen, faculté de médecine, Rouen, France

Introduction: Endothelial dysfunction (ED) and especially impaired NO production by endothelial NO synthase (eNOS) plays a crucial role

in the pathogenesis of sepsis. Several studies showed that increased endothelial NO production improves survival in sepsis. Our laboratory has shown that the protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) negatively modulates NO production and its inhibition may improve endothelial dysfunction. We had recently shown that genetic deletion of PTP1B confers cardiovascular protection through the vascular PI3K/Akt/eNOS pathway and improves survival during experimental sepsis. The purpose of the present study was to assess the potential therapeutic effect of endothelial-specific PTP1B inactivation in cardiovascular dysfunction during endotoxemic shock.

Material and methods: PTP1B endothelial inactivation was obtained with classical Cre-loxP system. We crossed Tie2-Cre (endothelial-specific promoter) with PTP1B-floxed (fl/fl) to obtain EndoPTP1B^{-/-}. Endotoxemic shock was induced by lipopolysaccharide (LPS: 15 mg/kg) intraperitoneal injection, followed by a subcutaneous fluid resuscitation. Endothelial-dependent dilatation was assessed by flow-mediated dilatation (FMD) and curves-response to Acetylcholin on isolated-perfused mesenteric arteries. LV function was evaluated in vivo by echocardiography and pressure-volume curves. The plasmatic assessment of inflammatory process (TNF, IL1, IL6) was evaluated.

Results: Endothelium-dependent dilatation were impaired in fl/fl mice 8 hours after LPS injection and improved by endothelial PTP1B inactivation assessed by FMD (fl/fl 30 ± 9% vs fl/fl LPS H8 5 ± 3 5%, p < 0.05; EndoPTP1B^{-/-} LPS H-8 mice 24 ± 2%, p < 0.05) and curves-response to Ach (fl/fl 98 ± 2% vs fl/fl LPS H8 48 ± 12%, p < 0.05; EndoPTP1B^{-/-} mice 77 ± 10%, p < 0.05). EndoPTP1B^{-/-} improved left ventricular function assessed by echocardiography as shown by the limited-decreased of cardiac index (CI: fl/fl 1.41 ± 0.03 vs fl/fl LPS H8 0.75 ± 0.04 ml/min/g, p < 0,05 ; EndoPTP1B^{-/-} mice 0.86 ± 0.04 ml/min/g, p < 0.05). Moreover EndoPTP1B^{-/-} have an increased survival after LPS injection compared to fl/fl mice (fl/fl 50% vs EndoPTP1B^{-/-} 85%, p<0.05). However, these functional improvements occurred without modulation of the systemic cytokine levels such as TNF, IL1, IL6.

Conclusion: We show a significant decrease of mortality associated with an improvement of both mesenteric vascular function and myocardial contractility in endothelial-specific PTP1B inhibition. PTP1B inhibition appears to be a promising target for the treatment of cardiovascular dysfunction during endotoxemia. Its protective effect could mainly be due to an endothelial protection.

SO131

Obesity impairs organs dysfunction in a porcine model of endotoxic shock

T. Duburcq¹, T. Hubert¹, J. Mangalaboyi², P. Saint-Léger², V. Gmyr¹, L. Quintane¹, A. Tournoys³, A. Tailleux⁴, F. Pattou¹, M. Jourdain²

¹Inserm U859, université de Lille-II, CHRU de Lille, Lille, France

²Service de réanimation médicale, CHRU de Lille,

hôpital Roger-Salengro, Lille, France

³Hémostase, CHRU de Lille, centre de biologie pathologie, Lille, France

⁴Inserm U1011, université de Lille-II, CHRU de Lille, Lille, France

Introduction : Malgré l'augmentation du nombre de patients obèses admis dans les services de réanimation, les données concernant l'impact de l'obésité sur le choc septique restent limitées et contradictoires. Le but de notre étude était d'évaluer le retentissement de l'obésité sur les défaillances d'organe dans un modèle de choc endotoxique porcine.

Matériels et méthodes : Il s'agissait d'une étude expérimentale, prospective et comparative ayant reçu l'accord du comité d'éthique en

expérimentation animale. Quatre groupes de porcs miniatures « Yucatan » étaient étudiés : le groupe 1, non obèse contrôle (n = 5) ; le groupe 2, obèse contrôle (n = 5) ; le groupe 3, non obèse LPS (n = 5) ayant reçu l'endotoxine d'*Escherichia coli* O55 : B5 ; le groupe 4, obèse LPS (n = 5) ayant reçu la même dose d'endotoxine. Des paramètres hémodynamiques et d'oxygénation, des marqueurs du statut glucidique et lipidique, des marqueurs usuels de la coagulation et les taux plasmatiques de complexes thrombine-antithrombine, du facteur de nécrose tumorale- α , de l'interleukine 6 étaient mesurés à l'état de base puis à 30, 60, 90, 150 et 300 minutes. L'évaluation de la perfusion cutanée, de base et au cours d'hyperhémie réactive, était obtenue par technique de fluxmétrie laser Doppler. La signification statistique était évaluée par l'analyse des mesures répétées de la variance, un p < 0,05 était considéré comme significatif.

Résultats : Les groupes 1 et 2 restaient stables durant la période étudiée. Les groupes 3 et 4 développaient un état de choc hypokinétique avec hypertension artérielle pulmonaire, coagulation intravasculaire disséminée et dysfonction microcirculatoire. La comparaison des groupes 3 et 4 retrouvait une altération significativement plus marquée de l'index cardiaque (1,24 ± 0,09 vs 1,75 ± 0,09 L/min/m²) et de la pression partielle en oxygène (220 ± 23 vs 345 ± 53 mmHg) dans le groupe 4 à 300 minutes. Au même temps, la pression artérielle pulmonaire moyenne (43 ± 2 vs 31 ± 2 mmHg), la pression artérielle pulmonaire d'occlusion (11 ± 1 vs 5 ± 0,5 mmHg) et le taux de lactate (5,6 ± 0,7 vs 4,1 ± 1,1 mmol/L) étaient significativement plus élevés dans le groupe 4. Le flux maximal d'hyperhémie réactive était significativement diminué à 30 minutes dans le groupe 4 (21 ± 1 vs 40 ± 9 unités de perfusion). Une coagulation intravasculaire disséminée significativement plus sévère avec notamment un taux plus élevé de complexes thrombine-antithrombine à 150 minutes (644 ± 173 vs 247 ± 55 ng/mL ; p < 0,0001) était constatée dans le groupe 4. Une élévation significativement plus importante du facteur de nécrose tumorale- α à 60 minutes (276 ± 81 vs 139 ± 21 ng/mL) et de l'interleukine 6 à 300 minutes (101 ± 18 vs 51 ± 7 ng/mL) était observée dans le groupe 4. Les glycémies à jeun réalisées avant le protocole étaient comparables (NS) entre l'ensemble des porcs obèses (0,91 ± 0,03 g/L) et l'ensemble des porcs non obèses (0,88 ± 0,02 g/L). L'obésité n'était pas associée à un diabète de type 2.

Discussion : Malgré les limites inhérentes à l'utilisation d'un modèle de choc endotoxique, les résultats de notre étude sembleraient illustrer les conséquences potentiellement néfastes des fonctions endocrines et immunomodulatrices du tissu adipeux au cours d'une agression inflammatoire aiguë.

Conclusion : Dans notre modèle de choc endotoxique porcine, l'obésité était responsable d'une exacerbation des défaillances d'organe et de la réaction pro-inflammatoire.

SO132

Le sepsis polymicrobien favorise la croissance tumorale

F. Pène¹, C. El Hachem², D. Grimaldi², C. Rousseau², A. Durand², L. Kerdjane², N. Belaidouni², A.-L. Rossi², J.-P. Mira¹, J.-D. Chiche¹

¹Service de réanimation médicale,

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

²Département 31, institut Cochin, Inserm U1016, CNRS UMR8104, Paris, France

Introduction : Le sepsis est caractérisé par une dysrégulation de la réaction inflammatoire suivie d'une immunodépression complexe associant des anomalies de l'immunité innée et adaptative. Ce dysfonctionnement immunitaire est notamment associé à une susceptibilité accrue aux infections secondaires aussi bien en clinique que dans

les modèles expérimentaux, mais pourrait également favoriser des complications non-infectieuses. Au décours d'une agression septique, la réaction inflammatoire systémique aiguë et l'altération profonde des réponses immunitaires pourraient créer un environnement favorisant la croissance tumorale. L'objectif de ce travail vise à évaluer l'impact d'un sepsis bactérien sur l'évolution d'une maladie maligne dans un modèle animal.

Matériels et méthodes : Nous avons utilisé des souris C57BL/6J. Les animaux ont d'abord été soumis à un sepsis polymicrobien par ligation et ponction caecale ou à une intervention contrôle par laparotomie simple. Huit jours après la chirurgie, les souris septiques survivantes et les souris contrôles ont été soumises à une inoculation tumorale sous-cutanée de cellules de fibrosarcome murin MCA205. Le volume tumoral a été évalué par le calcul de volume d'une ellipsoïde pendant 21 jours suivant l'injection. Les caractéristiques de la réponse immunitaire anti-tumorale ont été comparées entre les souris septiques et les souris contrôles. La répartition des cellules immunitaires au sein de la tumeur a été étudiée par cytométrie en flux multi-couleurs. L'expression de cytokines au sein du tissu tumoral a été évaluée d'une part par RT-PCR quantitative, et d'autre part par quantification protéique par microbilles en cytométrie de flux (CBA Flex set, Becton-Dickinson) ou par ELISA (R&D Systems). La concentration des cytokines a été exprimée par rapport au taux de protéides dans l'échantillon correspondant.

Résultats : Les souris ont été soumises à une péritonite polymicrobienne ou à une opération contrôle, puis à une inoculation tumorale huit jours plus tard. La mortalité globale des souris septiques était de

44 %, tous les décès étant constatés avant inoculation tumorale. Par rapport aux animaux contrôles, le volume tumoral était très significativement augmenté chez les souris en phase post-septique à 14 et 21 jours suivant l'inoculation tumorale. Les pourcentages de cellules hématopoïétiques CD45⁺ infiltrant la tumeur étaient similaires entre les deux conditions, de même que les proportions des lymphocytes T, lymphocytes B, lymphocytes T régulateurs, cellules dendritiques et polynucléaires neutrophiles. En revanche, la proportion des cellules NK étaient significativement plus élevée et les proportions de monocytes pro- et anti-inflammatoires étaient plus basses chez les souris septiques par rapport aux souris contrôles. Le défaut de contrôle tumoral observé chez les animaux septiques était associé à une diminution de la production d'IFN-gamma, et à un moindre degré à une diminution de la production de TNF-alpha au sein du tissu tumoral.

Discussion : Ces résultats préliminaires suggèrent une corrélation fonctionnelle entre diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires et croissance tumorale accélérée au décours du sepsis. L'analyse fonctionnelle individuelle des cellules immunitaires, et notamment leurs capacités de production de cytokines pro- et anti-inflammatoires, devrait nous permettre d'avancer significativement dans la compréhension de ces phénomènes.

Conclusion : Les résultats obtenus dans ce modèle expérimental de double agression séquentielle suggèrent que le sepsis polymicrobien induit une susceptibilité accrue au développement tumoral. Les mécanismes cellulaires et moléculaires qui régulent ce phénomène demandent à être éclaircis.