



HAL
open science

Impact de la délétion totale et endothéliale de PTP1B sur la dysfonction cardiovasculaire et l'insulino-résistance dans un modèle de sepsis sévère expérimental

Eugénie Delile

► **To cite this version:**

Eugénie Delile. Impact de la délétion totale et endothéliale de PTP1B sur la dysfonction cardiovasculaire et l'insulino-résistance dans un modèle de sepsis sévère expérimental. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2017. Français. NNT : 2017NORMR011 . tel-01541315

HAL Id: tel-01541315

<https://theses.hal.science/tel-01541315>

Submitted on 19 Jun 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Sciences de la Vie et de la Santé

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Impact de la délétion totale et endothéliale de la Protéine Tyrosine Phosphatase 1B sur la dysfonction cardiovasculaire et l'insulino-résistance dans un modèle de sepsis expérimental.

**Présentée et soutenue par
Eugénie DELILE**

**Thèse soutenue publiquement le 09 mai 2017
devant le jury composé de**

M. le Pr. Hafid AIT-OUFELLA	PU-PH / Université Paris-Descartes	Rapporteur
M. le Dr. Daniel HENRION	DR / Université d'Angers	Rapporteur
M. le Pr. Éric FONTAINE	PU-PH/ Université de Grenoble Alpes	Examineur
M. le Pr. Benoît VEBER	PU-PH / Université de Rouen Normandie	Examineur
M. le Pr. Vincent RICHARD	PU-PH / Université de Rouen Normandie	Examineur
Mme le Pr. Fabienne TAMION	PU-PH / Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse

**Thèse dirigée par le Pr. Fabienne TAMION, laboratoire INSERM U1096
Endothélium, Valvulopathies & Insuffisance Cardiaque.**

SOMMAIRE

SOMMAIRE.....	- 1 -
REMERCIEMENTS.....	- 7 -
TABLE DES FIGURES.....	- 8 -
LISTE DES ABRÉVIATIONS	- 10 -
RÉSUMÉ.....	- 14 -
ABSTRACT.....	- 15 -
PARTIE INTRODUCTIVE.....	- 16 -
I – SEPSIS.....	- 17 -
1. Histoire.....	- 17 -
2. Épidémiologie.....	- 17 -
3. Evolution de la définition du sepsis.....	- 18 -
a. Consensus de 1991 : première définition du sepsis.....	- 18 -
b. Consensus de 2001 : autre définition du sepsis.....	- 20 -
c. Consensus de 2016 : le sepsis 3.0.....	- 21 -
4. Physiopathologie de la réponse inflammatoire au cours du sepsis.....	- 23 -
a. Initiation de la réponse immune.....	- 24 -
b. Activation et adhésion leucocytaires.....	- 25 -
c. Pérennisation du processus inflammatoire.....	- 26 -
5. Mécanismes de la dysfonction vasculaire au cours du sepsis.....	- 27 -
a. Données cliniques.....	- 27 -
b. Dénudation endothéliale, apoptose et microparticules.....	- 27 -
c. Propriétés pro-adhésive, pro-coagulante, anti-fibrinolytique.....	- 28 -
d. Vasoplégie et hyporéactivité vasculaire.....	- 29 -
i. Monoxyde d’azote.....	- 29 -
ii. Peroxynitrite.....	- 30 -
iii. Facteurs relaxants dérivés de l’endothélium.....	- 30 -
iv. Les canaux potassiques.....	- 30 -
v. Vasopressine.....	- 30 -
vi. Récepteurs alpha-adrénergiques.....	- 31 -
e. Perméabilité vasculaire et glycocalyx.....	- 31 -
6. Mécanismes de la dysfonction cardiaque au cours du sepsis.....	- 32 -
a. Données cliniques.....	- 32 -
b. Circulation coronarienne.....	- 32 -
c. Troubles de la contractilité et de la compliance cardiaques.....	- 33 -
d. Altération de l’autonomie cardiaque.....	- 34 -
e. Perturbations métaboliques, dysfonction mitochondriale et apoptose cardiaques.....	- 35 -
7. Stress du réticulum endoplasmique dans la dysfonction cardiovasculaire.....	- 36 -
a. Mécanisme du stress du réticulum endoplasmique.....	- 36 -
b. Implication du SRE dans la dysfonction cardiovasculaire septique.....	- 37 -
8. La dysfonction d’organe au cours du sepsis.....	- 38 -
a. Dysfonction respiratoire.....	- 38 -

b.	Dysfonction hépatique	- 38 -
c.	Dysfonction intestinale	- 39 -
d.	Dysfonction rénale	- 39 -
e.	Atteinte encéphalique	- 39 -

II – REPONSE METABOLIQUE AU SEPSIS : METABOLISME GLUCIDIQUE ET INSULINIQUE ET ROLE DE LA GLUCOTOXICITE DANS LE SEPSIS

1.	La voie de signalisation de l'insuline	- 41 -
a.	L'insuline	- 41 -
b.	Récepteur à l'insuline et tissus cibles	- 41 -
c.	Initiation et transmission du signal insulinaire	- 42 -
i.	Voie PI3k/Akt	- 43 -
ii.	Voie MAPK	- 44 -
d.	Transporteur du glucose 4 (GLUT-4) et autres transporteurs du glucose (GLUTs)	- 45 -
i.	Famille des GLUTs : structure, fonction et localisation	- 45 -
ii.	Exocytose du Transporteur du glucose 4	- 46 -
iii.	Régulation par l'insuline et mode d'action des GLUTs-4	- 47 -
2.	La voie de signalisation de l'AMP-activated protein kinase (AMPK)	- 48 -
a.	Structure, activation et régulation	- 48 -
i.	Structure	- 48 -
ii.	Activation et régulation	- 49 -
b.	Rôles physiologiques de l'AMPK	- 50 -
i.	Effets de l'AMPK sur la transcription et la traduction	- 50 -
ii.	Rôles d'AMPK sur le métabolisme énergétique	- 51 -
iii.	Effets de l'AMPK sur le métabolisme énergétique myocardique : cycle de Randle	- 52 -
3.	Physiopathologie de l'insulino-résistance et de l'hyperglycémie dans le sepsis	- 54 -
a.	Hormones de contre-régulation	- 54 -
b.	Inflammation	- 55 -
c.	Monoxyde d'azote	- 56 -
d.	Stress oxydant	- 57 -
e.	Stress du réticulum endoplasmique	- 57 -
4.	Hyperglycémie et glucotoxicité	- 58 -
a.	Implication de la mitochondrie, dysfonction mitochondriale et stress oxydant	- 58 -
b.	Voies métaboliques impliquées dans la glucotoxicité	- 60 -
i.	Voie des protéines kinase C (PKC)	- 60 -
ii.	Voie des polyols	- 61 -
iii.	Voie des hexosamines	- 61 -
iv.	Voies des produits avancés de glycation (AGEs)	- 62 -
5.	Conséquences de l'altération du métabolisme glucidique sur le système cardio-vasculaire	- 63 -
a.	Insulino-résistance et dysfonction vasculaire	- 63 -
b.	Insulino-résistance et dysfonction cardiaque	- 63 -
6.	Traitements du sepsis : passé, présent, futur	- 64 -
a.	Traitements symptomatiques : recommandations actuelles	- 64 -
b.	Traitements étiologiques : de l'expérimentation animale aux essais cliniques	- 65 -
i.	Nombreux essais cliniques	- 65 -
ii.	Echec des essais cliniques	- 67 -
7.	Impact du contrôle de la glycémie dans le sepsis : études cliniques, recommandations et thérapeutiques passées et actuelles	- 67 -
a.	Etudes cliniques	- 68 -

b.	Recommandations et thérapeutiques	- 69 -
III –	LA PROTEINE TYROSINE PHOSPHATASE 1B COMME CIBLE THERAPEUTIQUE.....	- 70 -
1.	Généralités	- 70 -
2.	Protéines tyrosine phosphatases	- 70 -
a.	Super-famille des protéines tyrosine phosphatases	- 70 -
b.	Rôles des protéines tyrosine phosphatases.....	- 72 -
i.	Rôles physiologiques	- 72 -
ii.	Rôles pathologiques	- 72 -
3.	La Protéine Tyrosine Phosphatase 1B	- 73 -
a.	Découverte, structure et localisation.....	- 73 -
b.	Régulation de l'expression génique de la PTP1B	- 75 -
i.	Régulation par les facteurs de transcription	- 75 -
ii.	Régulation par le glucose et l'insuline	- 76 -
c.	Régulation de l'activité de la PTP1B.....	- 77 -
i.	Oxydation	- 77 -
ii.	Phosphorylation	- 77 -
iii.	Sumoylation.....	- 78 -
iv.	Protéolyse.....	- 78 -
d.	Cibles de PTP1B.....	- 79 -
i.	Insuline, EGFR et JAK comme substrats.....	- 79 -
ii.	La réponse UPR comme cible de PTP1B	- 79 -
4.	Rôle de PTP1B sur le métabolisme en physiologie et en pathologie	- 80 -
a.	Sur la voie de la leptine	- 80 -
b.	Sur la voie de l'insuline	- 81 -
c.	Diabète et autres troubles métaboliques	- 82 -
5.	Rôle de la PTP1B en pathologie.....	- 83 -
a.	Insuffisance cardiaque chronique	- 83 -
b.	Cancer	- 84 -
i.	PTP1B comme oncosuppresseur	- 84 -
ii.	PTP1B comme oncogène	- 85 -
c.	Vieillessement.....	- 85 -
d.	Sepsis	- 85 -
6.	L'inhibition de la PTP1B	- 87 -
a.	Délétion génétique totale et spécifique	- 87 -
i.	Délétion génétique totale.....	- 87 -
ii.	Délétion génétique spécifique.....	- 88 -
b.	Inhibition pharmacologique.....	- 89 -
i.	Challenge du développement et difficultés biochimiques	- 89 -
ii.	Evolution des inhibiteurs pharmacologiques de la PTP1B.....	- 89 -
	JUSTIFICATIF DE L'ÉTUDE	- 92 -
	PARTIE EXPÉRIMENTALE	- 93 -
I.	MODELES ANIMAUX ET TECHNIQUES DE GENOTYPAGE.....	- 94 -
1.	Animaux utilisés	- 94 -
a.	Animaux sauvages.....	- 94 -
b.	Souris transgéniques : déficience génétique totale en PTP1B.....	- 94 -
c.	Souris transgéniques : déficience génétique spécifique en PTP1B au niveau de l'endothélium	- 94 -

2. Technique d'irradiation	- 95 -
a. Irradiation et greffe de moelle	- 95 -
b. Vérification du chimérisme hématopoïétique	- 96 -
3. Génotypage	- 97 -
a. Extraction d'ADN génomique	- 97 -
b. Polymerase Chain Reaction (PCR)	- 97 -
c. Migration et Révélation	- 98 -
II. MODELES PATHOLOGIQUES	- 99 -
1. Modèle de Ligature et Perforation Caecale	- 99 -
2. Modèle de choc endotoxinique	- 99 -
III. EVALUATION DE LA SURVIE	- 101 -
IV. ETUDE DU PHENOTYPE METABOLIQUE	- 101 -
1. Système de calorimétrie indirecte	- 101 -
2. Métabolisme glucidique et insulino-résistance	- 102 -
a. Tests de tolérance au glucose et à l'insuline	- 102 -
b. Indices HOMA et HOMA- β	- 103 -
3. Phénotype insulinique	- 103 -
a. Mesure de l'insulinémie	- 103 -
b. Dosage plasmatique de l'insuline par technique ELISA	- 104 -
c. Etude de la signalisation de l'insuline dans les tissus	- 104 -
i. Prélèvements des organes	- 104 -
ii. Quantification des protéines d'intérêt par Western Blot	- 104 -
4. Analyse de l'expression du Transporteur du Glucose 4 (GLUT-4)	- 105 -
a. Méthode de séparation des membranes par technique d'ultracentrifugation	- 105 -
b. Mesure de l'expression protéique du transporteur du glucose 4 par Western-Blot	- 106 -
V. FONCTION VASCULAIRE	- 107 -
1. Procédure de montage	- 107 -
2. Evaluation de la fonction endothéliale in vitro	- 108 -
VI. FONCTION CARDIAQUE VENTRICULAIRE GAUCHE PAR ECHOCARDIOGRAPHIE	- 109 -
1. Fonction cardiaque ventriculaire gauche par échocardiographie	- 109 -
a. Temps-mouvement	- 109 -
b. Doppler pulsé	- 109 -
2. Cœur isolé perfusé par la technique de Langendorff	- 110 -
VII. BIOLOGIE MOLECULAIRE	- 110 -
1. Prélèvements des organes	- 110 -
2. Quantification protéique par Western-Blot	- 111 -
a. Mesure de l'expression protéique	- 111 -
3. Q RT PCR	- 111 -
a. Extraction	- 111 -
b. Traitement DNase	- 112 -
c. Réaction de transcription inverse	- 112 -
d. PCR quantitative	- 112 -

VIII. STATISTIQUES	- 114 -
PARTIE RÉSULTATS & DISCUSSION	- 115 -
ETUDE 1 : IMPACT DE LA DELETION TOTALE DE PTP1B DANS LE MECANISME D'INSULINO-RESISTANCE ET SES CONSEQUENCES INFLAMMATOIRES ET CARDIOVASCULAIRES DANS LE SEPSIS.....	- 116 -
Résultats complémentaires	- 126 -
1. Evaluation de la survie	- 126 -
2. Evaluation du métabolisme énergétique.....	- 127 -
a. Evaluation des paramètres métaboliques	- 127 -
b. Evaluation des consommations alimentaire et hydrique	- 128 -
c. Evaluation de l'utilisation des substrats	- 128 -
3. Evaluation de la fonction cardiaque par échocardiographie	- 129 -
DISCUSSION DE L'ETUDE 1	- 130 -
Métabolisme énergétique dans le modèle de Ligature et Perforation Caecale	- 130 -
Métabolisme glucidique : impact de la délétion génétique totale de PTP1B	- 131 -
Métabolisme et fonction myocardique : impact de la délétion génétique totale de PTP1B.....	- 133 -
Fonction endothéliale : impact de la délétion génétique totale de PTP1B	- 134 -
Survie : impact de la délétion génétique totale de PTP1B	- 135 -
Conclusion.....	- 135 -
ETUDE 2 : PROTECTION ENDOTHELIALE ET SEPSIS : IMPACT DE LA DELETION ENDOTHELIALE DE PTP1B SUR LA DYSFONCTION CARDIOVASCULAIRE	- 136 -
Résultats	- 137 -
1. Evaluation de la fonction endothéliale	- 137 -
2. Evaluation de la fonction cardiaque	- 139 -
3. Evaluation du processus inflammatoire.....	- 140 -
a. Etude de l'expression de gènes myocardiques.....	- 140 -
b. Etudes des expressions protéiques myocardique et vasculaire	- 141 -
4. Evaluation du métabolisme glucidique.....	- 144 -
5. Evaluation de la survie	- 145 -
6. Rôle de la délétion endothéliale spécifique de PTP1B après irradiation	- 146 -
DISCUSSION DE L'ETUDE 2	- 147 -
Fonction endothéliale : impact de la délétion génétique endothéliale de PTP1B	- 148 -
Fonction myocardique : impact de la délétion génétique endothéliale de PTP1B.....	- 148 -
Evaluation du processus inflammatoire et du stress du réticulum endoplasmique : impact de la délétion génétique endothéliale de PTP1B.....	- 149 -
Métabolisme glucidique et insulino-résistance : impact de la délétion génétique endothéliale de PTP1B	- 150 -
Survie : impact de la délétion génétique endothéliale de PTP1B	- 151 -
Rôle de la délétion endothéliale spécifique de PTP1B après irradiation	- 151 -
Conclusion.....	- 152 -
CONCLUSION	- 153 -
PERSPECTIVES	- 156 -
ANNEXE	- 158 -

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES.....	- 163 -
PUBLICATIONS.....	- 163 -
CHAPITRES.....	- 163 -
COMMUNICATIONS ORALES.....	- 164 -
COMMUNICATIONS AFFICHEES.....	- 165 -
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	- 167 -

REMERCIEMENTS

TABLE DES FIGURES

- Figure 1 : Inter-relations entre le syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS), l'infection et le sepsis.
- Figure 2 : Liste des signes cliniques possibles du SIRS.
- Figure 3 : *Multiple Organ Dysfunction Score (MODS)* et *Sequential Organ Failure Assessment score (SOFA)*.
- Figure 4 : Inter-relations entre la dysfonction d'organes, l'infection, le sepsis et le choc septique.
- Figure 5 : Proposition de prise en charge d'un patient avec infection suspectée.
- Figure 6 : Initiation de la réponse immune par la voie du TLR4.
- Figure 7 : Réaction de synthèse du NO.
- Figure 8 : Signalisation adrénergique et conséquences cardiaques dans le sepsis.
- Figure 9 : Trafic calcique et conséquences cardiaques dans le sepsis.
- Figure 10 : Activation de l'UPR (Unfolded Protein Response) lors du stress du réticulum endoplasmique.
- Figure 11 : Structure détaillée du récepteur à l'insuline (RI) dans ses différentes configurations.
- Figure 12 : Voie de signalisation PI3K/Akt dépendante de l'insuline.
- Figure 13 : Voie de signalisation MAPK dépendante de l'insuline.
- Figure 14 : Exocytose du Transporteur du Glucose 4 (GLUT-4) via l'activation de la voie IR/PI3K/Akt : migration, ciblage et fusion à la membrane.
- Figure 15 : Activation et régulation de l'AMPK.
- Figure 16 : Vue générale de l'ensemble des effets et rôles de l'AMPK.
- Figure 17 : Représentation schématique du Cycle de Randle.
- Figure 18 : Régulation d'IRS-1 par les cytokines pro-inflammatoires.
- Figure 19 : Voies de la glucotoxicité.
- Figure 20 : Réaction enzymatique de phosphorylation et de déphosphorylation.
- Figure 21 : Classification et spécificité de substrats des Protéines Tyrosine Phosphatases (PTPs).
- Figure 22 : Structure et régulation de la PTP1B
- Figure 23 : Structure tridimensionnelle de la PTP1B.
- Figure 24 : Mécanisme de la réaction catalytique de PTP1B
- Figure 25 : Localisation chromosomique de PTP1B et régulation par les facteurs de transcription
- Figure 26 : Voie de signalisation de la leptine et rôle de PTP1B en physiologie.
- Figure 27 : Voie de signalisation de l'insuline et rôle de PTP1B en physiologie.

- Figure 28 : Rôle de PTP1B en pathologie.
- Figure 29 : Double rôle complexe de PTP1B dans les cancers.
- Figure 30 : Voies de signalisation physiologiques et pathologiques régulées par la PTP1B dans le système cardiovasculaire.
- Figure 31 : MSI-1436, nouvel inhibiteur de PTP1B.
- Figure 32 : Schéma de croisement pour l'obtention de souris « spécifiquement » invalidées pour la PTP1B endothéliale.
- Figure 33 : Protocole d'irradiation et de greffe de moelle osseuse.
- Figure 34 : Tableau indiquant les séquences et programmes des amorces nécessaires au génotypage des souris WT, PTP1B^{-/-} et Tie2PTP1^{-/-}.
- Figure 35 : Tableau indiquant les conditions de programmation des PCR pour les lignées PTP1B^{-/-} et Tie2PTP1B^{-/-}.
- Figure 36 : Photographies de la chirurgie de Ligature et Perforation Caecale.
- Figure 37 : Plate-forme du Service Commun d'Analyse Comportementale.
- Figure 38 : Représentation schématique de la technique de séparation des membranes par ultracentrifugation.
- Figure 39 : Procédure de montage et de visualisation de l'artère mésentérique sur l'artériographe d'Halpern.
- Figure 40 : Séquences sens et anti-sens des amorces utilisées en qPCR.
- Figure 41 : Courbe de survie.
- Figure 42 : Evaluation des paramètres métaboliques en pré- et post-opératoires.
- Figure 43 : Evaluation des consommations alimentaire et hydrique.
- Figure 44 : Evaluation de l'utilisation des substrats.
- Figure 45 : Evaluation échocardiographique.
- Figure 46 : Evaluation de la fonction vasculaire par artériographie.
- Figure 47 : Evaluation de la fonction cardiaque par échocardiographie.
- Figure 48 : Expression d'ARN messagers au niveau myocardique dans un modèle de LPS.
- Figure 49 : Expressions protéiques myocardiques après injection de LPS.
- Figure 50 : Expressions protéiques vasculaires après injection de LPS.
- Figure 51 : Etudes de la survie.
- Figure 52 : Tests de tolérance au glucose et à l'insuline.
- Figure 53 : Etudes de la fonction vasculaire, de la survie et de la tolérance au glucose chez les souris irradiées.
- Figure 54 : Vue d'ensemble du rôle de PTP1B.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

4-PBA	acide 4-phenylbutyrique
AA	Acide Aminé
ACC	acétyl-coA carboxylase
ACCP/SCCM	American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine
AG	acides gras
AGEs	produits avancés de glycation (advanced glycation end-product)
AGL	acides gras libres
AICAR	5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranosyl
Akt	Protéine Kinase B
AMP	Adénosine MonoPhosphate
AMPK	AMP-activated protein kinase
AMPKK	AMPK kinase
ADN	acide désoxyribonucléique
Ang-2	angiopoïétine 2
AP-1	Activator protein 1
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
ATF6	activated transcription factor 6
ATP	Adénosine TriPhosphate
Bak	bcl-2 homologous antagonist-killer
Bip/GRP78	Binding immunoglobulin protein/glucose-regulated protein-78
BK_{Ca}	canaux potassiques de grande conductance calcium-dépendant
BNP	brain natriuretic peptide
Boîte GC	Boîte Guanine Cytosine
BPI	bactericidal/permeability increasing protein
BPM	battements par minute
C3a – C5a	protéine du complément 3a ou 5a
CaMKKB	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase kinase-b
Canaux K_{ATP}	canaux potassiques adénosine-triphosphate-dépendant
CAP/Cbl	c-Cbl associated protein/Cbl
CD (-14, -45, -163)	Cluster de différenciation 14
CE	cellules endothéliales
CHOP	C/EBP HOmologous Protein
CLP	cecal ligation and puncture
CMLV	cellule musculaire lisse vasculaire
COX-2	cyclooxygénase 2
CTGF	connective tissue growth factor
DAG	diacylglycérol
DT2	diabète de type 2
EDRF	facteurs relaxants dérivés de l'endothélium
EDTA	acide éthylène diamine tetra-acétique

EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ERAD	ER-associated degradation
ERO	espèces réactives de l'oxygène
F6P	fructose-6-phosphate
FKHR	facteur de transcription Forkhead
FMD	flow-mediated dilatation
G6P	glucose-6-phosphate
GADPH	glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GC	guanylate cyclase
GCS	score de Glasgow
GH	hormone de croissance
GLUT-4	Transporteur du glucose 4
GMPC	Guanosine monophosphate cyclique
Gram -	Gram négatif
Gram +	Gram positif
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
GSK3	glycogène synthase 3 kinase
H₂O₂	peroxyde d'hydrogène
HER2	Human Epidermal growth factor Receptor 2
HIF-1α	Hypoxia Inducible Factors 1 α
HMIT1	H ⁺ /myo-inositol co-transporter
HOMA	Homeostasis Model Assessment
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IFN-γ	Interferon gamma
IGF-1	Insulin like Growth Factor 1
IGF-1R	Insulin like Growth Factor 1 receptor
IGF-2	Insulin like Growth Factor 2
IKKβ	I-kappa-B kinase beta
IL-10	Interleukine-10
IL-1β	Interleukine-1 β
IL-6	Interleukine-6
IL-8	Interleukine 8
IR	insulino-résistance
IRAK	Interleukin-1 receptor-associated kinase
IRE-1	Inositol-requiring enzyme-1
IRR	Insulin Receptor Related
IRS	Insulin Receptor Substrate
JAK	Janus Kinase
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
kDa	kilo Dalton
LBP	Lipopolysaccharide Binding Protein
LKB1	Liver Tumor Suppressor kinase
L-NAME	N-nitro-L-arginine méthylester
LNNA	N ω -Nitro-L-arginine
LPS	lipopolysaccharide

LTA	acide lipotéchoïque
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
miR	micro-acide ribonucléique
MODS	syndrome de dysfonction d'organes multiples
MP	microparticules
MPC-1	mitochondrial pyruvate carrier 1
MyD88	Myeloid differentiation protein 88
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NF-κB	Nuclear Factor-kappa B
NLR	NOD-like receptor
NO	monoxyde d'azote
NOS_e	NO Synthase endothéliale
NOS_i	NO Synthase inductible
NOS_{mt}	NOS mitochondriale
NRPTP	Non-Receptor Protein Tyrosine Phosphatase
O₂⁻	anion superoxyde
ONOO⁻	peroxynitrite
p70^{rsk}	p70 ribosomal S6 kinases
PACAP	Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
PAI-1	plasminogen activator inhibitor-1
PAMPs	Pathogen Associated Molecular Patterns
PARP	poly (ADP-ribose) polymerase
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDK	phosphoinositide-dependent protein kinase
PERK	PKR-like eukaryotic initiation factor α2 kinase
PEZ	Phosphatase with Erzin domain
PFK2	6-phosphofructo-2-kinase
PGI₂	prostacycline
PGN	peptidoglycanes
PI3k	Phosphatidyl-Inositol 3 kinase
PIP2 – PIP3	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ou triphosphate
PKA	protéine kinase A
PKB	protéine Kinase B ou Akt
PKC β, δ, θ	protéines kinase C β, δ, θ
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PRR	Pattern Recognition Receptor
PRS	p210 Bcr-Abl-responsive sequence
p-SDS	polyacrylamide-sodium dodecyl sulfate
PTK	Protéine Tyrosine Kinase
PTP	Protéine Tyrosine Phosphatase
PTP1B	Protéine Tyrosine Phosphatase 1B
Ptpn1	gène codant pour la Protéine Tyrosine Phosphatase 1B
Ptpn14	gène codant pour la Phosphatase avec domaine Erzin
Ptpn2	gène codant pour la T-cell Protein Tyrosine Phosphatase
PTPome	partie du génome regroupant l'ensemble des Protéines Tyrosines Phosphatases
q-SOFA	quick-SOFA

Rac1	actin cytoskeleton–regulating GTPase 1
RAGE	récepteur aux produits de glycation avancés
RE	réticulum endoplasmique
RFP175	Ring Finger Protein
RI	Récepteur à l'insuline
RI-A	Isoforme A du récepteur à l'insuline
RI-B	Isoforme B du récepteur à l'insuline
RLR	RIG-1-like receptor
RPTP	Protéine Tyrosine Phosphatase récepteurs transmembranaires
RS	réticulum sarcoplasmique
RyR	récepteurs à la ryanodine
SCID	severe combined immunodeficiency
SDRA	syndrome de détresse respiratoire aigue
SERCA	sarco(endo)plasmic reticulum calcium ATPase
SH3	src homology region 3
SHC	src homologous and collagen protein
SIRS	syndrome de réponse inflammatoire systémique
SNPs	single nucleotide polymorphisms
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment
SOS	Son of Sevenless
SRE	Stress du Réticulum Endoplasmique
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
SUMO	Small Ubiquitin-related Modifier
TCPTP	T-cell Protein Tyrosine Phosphatase
TF	facteur tissulaire
TFPI	tissue factor pathway inhibitor
TGF-β	Transforming Growth Factor beta
TLR (TLR2, TLR4, TLR6)	Toll Like Receptor
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-α
t-PA	tissue plasminogen activator
TRAF6	TNF receptor associated factor 6
UDPGlcNAc	Uridine di-phosphate N-acetyl glucosamine
UPR	Unfolded Protein Response
VAMP2	vesicle associated membrane protein
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VEGF	vascular endothelial growth factor
VIP	vasoactive intestinal polypeptide
v-snare/t-snare	vesicle ou target soluble NSF attachment protein
XBP-1	X-box binding protein 1
YB-1	Y box-binding protein-1

RÉSUMÉ

L'hyperglycémie et l'insulino-résistance constituent les altérations métaboliques des patients septiques associées à un pronostic défavorable, à une augmentation des dysfonctions cardiovasculaires et à une augmentation de la mortalité. Si plusieurs études démontrent que l'insulinothérapie à forte dose diminue la mortalité et prévient la dysfonction multi-organes, elle est souvent controversée car responsable d'hypoglycémies délétères. La Protéine Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) est un régulateur négatif de la voie de signalisation dépendante de l'insuline et de la voie de production du NO.

L'idée développée dans le laboratoire est que l'inhibition de la PTP1B pourrait constituer une cible thérapeutique potentielle dans le sepsis en améliorant la sensibilité à l'insuline et ainsi les conséquences sur la fonction endothéliale et cardiaque. Bien qu'il ait été montré que la délétion génétique en PTP1B diminue la dysfonction cardiovasculaire lors du sepsis, les effets de cette délétion sur le métabolisme glucidique dans l'amélioration de la dysfonction cardiovasculaire restent méconnus et constituent l'objectif de notre travail.

Dans un modèle de sepsis induit par Ligature et Perforation Caecale, nous avons pu mettre en évidence que la délétion génétique totale de PTP1B limite l'insulino-résistance induite par le sepsis, améliore la voie de signalisation dépendante de l'AMPK et la translocation des GLUT-4 et diminue l'inflammation. Ces effets s'accompagnent d'une diminution de la dysfonction endothéliale induite par le sepsis et améliore la production de NO. La délétion génétique endothéliale de PTP1B permet quant à elle une amélioration significative de la fonction endothéliale et de la sensibilité à l'insuline et au glucose.

Ces travaux ont donc permis de mettre en évidence l'effet bénéfique de la délétion génétique en PTP1B dans le sepsis par amélioration de la sensibilité à l'insuline et des conséquences sur la fonction endothéliale et cardiaque.

Mots clés : glucose, hyperglycémie, insulino-résistance, PTP1B, sepsis sévère, dysfonction vasculaire

ABSTRACT

Hyperglycemia and insulin resistance are septic metabolic alterations associated with poor prognosis, increased cardiovascular dysfunction and mortality. Several studies have demonstrated that high-dose insulin therapy reduces mortality and prevents multi-organ dysfunction but is controversial because it is often associated with deleterious hypoglycemia. Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) is a negative regulator of both insulin signaling and NO production.

The concept developed in our laboratory is that PTP1B inhibition could be a potential therapeutic target in sepsis by improving both insulin sensitivity and these consequences on endothelial and cardiac function. PTP1B genetic deletion has been shown to decrease cardiovascular dysfunction in sepsis but the effects of this deletion on carbohydrate metabolism in the improvement of cardiovascular dysfunction remain unknown and constitute the objective of our work.

In a sepsis model induced by Ligature and Caecal Perforation, we have demonstrated that the total PTP1B genetic deletion limits insulin resistance induced by sepsis, improves the AMPK signaling pathway, the GLUT-4 translocation and reduces inflammation. These effects are followed by decreased endothelial dysfunction induced by sepsis and improves NO production. The endothelial PTP1B genetic deletion, significantly improves endothelial function, insulin and glucose sensitivity.

This work demonstrate the beneficial effect of the PTP1B genetic deletion in the sepsis by improvement of the insulin sensibility and these consequences on endothelial and cardiac function.

Keywords : Glucose, hyperglycemia, insulin resistance, PTP1B, severe sepsis, vascular dysfunction

PARTIE INTRODUCTIVE

I – Sepsis

1. Histoire

La première utilisation du mot « sepsis » dans le contexte médical remonte à l'Antiquité, quand le poète Homère (VIII^{ème} siècle avant J-C) emploie pour la première fois ce terme dérivé direct du grec « sepo » signifiant « je pourris »¹. Plus tard, en 400 avant J-C, dans son *Corpus Hippocraticum*, le philosophe Hippocrate reprend ce terme pour décrire la dérégulation des humeurs corporelles comme étant la cause de toutes les maladies. Il qualifie alors le sepsis de « dégradation biologique dangereuse et odorante du corps »². À son tour, Galien (129-199), considéré comme une autorité dans le monde de la médecine, décrit le sepsis comme le résultat de « la production de créatures invisibles émettant des fumées putrides, les miasmes »³. Bien que les termes employés à l'époque nous semblent éloignés de la médecine moderne, ces découvertes sont belles et bien le fondement des pensées actuelles. L'époque des Temps Modernes (XV^{ème} – XVIII^{ème} siècles), marquée par les pandémies de peste, de choléra ou de tuberculose, voit se développer les connaissances autour de la transmission des maladies infectieuses. A cette période, Anthony van Leeuwenhoek décrit pour la première fois les « animacules » connus aujourd'hui sous le terme de bactéries⁴. Le XIX^{ème} siècle représente une ère où le savoir médical est en plein essor. Grâce aux connaissances de nombreux hommes comme Joseph Lister, Ignaz Semmelweiss, Louis Pasteur et Robert Koch, l'origine et le mode de transmission des infections sont maintenant acquis et décrits. La découverte de la pénicilline par Sir Alexander Fleming permet en parallèle de débiter les traitements des infections diverses. Enfin, les recherches de Richard Pfeiffer (1858-1955) sur le choléra, le mène à découvrir « la substance stable dans les bactéries responsables des effets toxiques du choléra », substance qu'il nomme, de par sa localisation à l'intérieur des bactéries, « endotoxine »⁵. Malgré les avancées de la médecine moderne, l'avènement de l'antibiothérapie et le séquençage du génome humain, le sepsis n'a été clairement décrit que depuis une vingtaine d'année, lors du consensus de 1991⁶.

2. Epidémiologie

Le sepsis est la principale cause d'admission dans les services de réanimation médicale avec une incidence du sepsis sévère représentant 10% des hospitalisations⁷ et un accroissement relatif de l'incidence au cours des deux dernières décennies^{8,9}. En France, le nombre de sepsis sévères et de chocs septiques est estimé à 70 000 cas par an représentant ainsi 8 à 15 cas pour 100 admissions en réanimation⁸. Malgré l'évolution des thérapeutiques et l'avancée de la médecine moderne, la mortalité du sepsis sévère reste élevée, de 30% à 40% à 28 jours et proche de 50-60% globalement^{9,10},

soit plus de 30 000 décès par an. L'ensemble de ces données en font un problème de santé publique majeur.

Les infections en cause sont à 50% d'origine respiratoire, à 25% d'origine intra-abdominale, à 5% d'origine urinaire et les autres sources d'infection (neuro-méningées, ostéo-articulaires...) représentent à peine 3% des cas^{9,11}. Il existe aussi de nombreux co-facteurs augmentant le risque de sepsis. En effet, l'étude EPISEPSIS menée dans les services de réanimation français et portant sur différentes cohortes de patients, démontre que les pathologies sous-jacentes telles que l'insuffisance cardiaque, la cirrhose hépatique ou l'immunodépression augmentent à la fois le risque de développer un sepsis mais aussi le taux de mortalité associé¹². Aussi, les patients porteurs d'une immunosuppression par la présence d'une néoplasie présentent un risque plus important de sepsis et de mortalité indépendamment de l'âge¹³. De nombreuses études ont montré l'implication de facteurs génétiques dans l'augmentation du risque infectieux. Le polymorphisme concernant des gènes codant pour les protéines du système immunitaire inné telles que le *bactericidal/permeability increasing protein* (BPI)¹⁴, *Lipopolysaccharide Binding Protein* (LBP)¹⁵, *Ring Finger Protein* (RFP175)¹⁶ et le polymorphisme concernant des gènes codant pour des cytokines telles que *Tumor Necrosis Factor α* (TNF-α), Interleukine-1β (IL-1β), Interleukine-6 (IL-6) ou encore Interferon gamma (IFN-γ) sont fortement impliqués. Enfin, d'autres facteurs de prédisposition rentrent en jeu tels que l'âge, avec une nette majoration du nombre de cas à partir de 65 ans ; le genre, avec une plus forte incidence et une plus forte mortalité chez les hommes¹⁷ ; l'ethnie, avec une plus forte incidence en Asie du Sud et de l'Est ainsi que dans le Pacifique¹⁸ et une plus forte incidence chez les personnes à la peau de couleur noire ceci pouvant s'expliquer par certaines co-morbidités associées telles que le VIH ou le diabète^{19,20}.

À ce jour, la prise en charge des patients septiques dans les services de réanimation français représente une préoccupation majeure en raison de l'augmentation des admissions à l'hôpital, du pronostic sévère avec un taux de mortalité élevé en cas de facteurs associés et des difficultés d'une identification précoce.

3. Evolution de la définition du sepsis

a. Consensus de 1991 : première définition du sepsis

La difficulté d'établir un diagnostic a poussé les professionnels de santé à se réunir en 1991, lors du consensus *American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine* (ACCP-SCCM) afin de standardiser et de simplifier la terminologie autour du sepsis mais aussi de faciliter la communication entre cliniciens et chercheurs et de limiter les confusions entre ces professionnels de

santé. Lors de ce consensus, le syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS) est défini comme un processus inflammatoire systémique non infectieux survenant suite à une agression telle qu'un traumatisme, une brûlure, une ischémie, une pancréatite ou autre. Le SIRS inclut une ou plusieurs des manifestations cliniques suivantes référencées dans les *Guidelines* : une température corporelle supérieure à 38°C ou inférieure à 36°C, une tachycardie (fréquence cardiaque supérieure à 90 battements par minute (BPM)), une tachypnée (fréquence respiratoire supérieure à 20 cycles respiratoires/min ou une PaCO₂ inférieure à 32mmHg) et un taux de leucocytes supérieur à 12 000/mm³ ou inférieur à 4 000/mm³. L'une des complications fréquentes du SIRS est le développement d'un syndrome de dysfonction d'organes multiples (*Multiple Organ Dysfunction Score*, MODS). Le sepsis est quant à lui décrit comme un SIRS associé à une infection confirmée et comprenant au moins deux des symptômes décrits précédemment (figure 1).

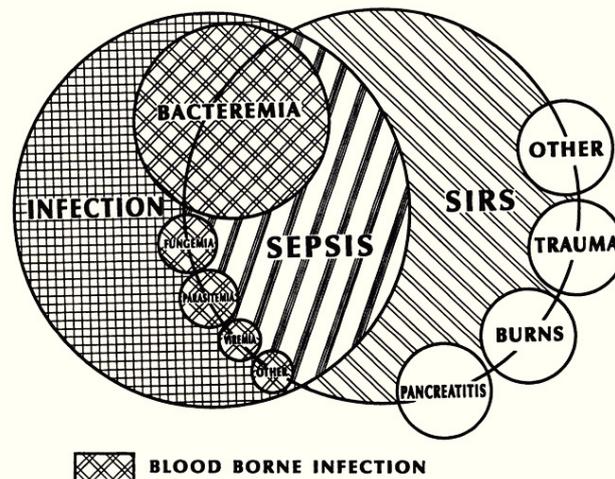


Figure 1 : Inter-relations entre le syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS), l'infection et le sepsis.

Le SIRS est un processus inflammatoire systémique non infectieux survenant suite à une agression telle qu'un traumatisme, une brûlure, une ischémie, une pancréatite ou autre.

Le sepsis est décrit comme un SIRS associé à une infection confirmée. Figure issue de l'article de ACCP/SCCM Consensus Conference, *Chest*, 1992 ⁶.

Le sepsis est qualifié de « sévère » quand il existe au moins une défaillance d'organes associée telle que la thrombopénie, l'oligurie, un trouble de la conscience, l'augmentation des lactates ou l'apparition de marbrures. Le choc septique est quant à lui défini comme un sepsis sévère associé à une hypotension tissulaire persistante malgré une ressuscitation adéquate par remplissage vasculaire ⁶. Bien que ces définitions aient le mérite d'initier une prise de conscience sur la pathologie septique, les conclusions sur la prise en charge des patients restent floues. Les auteurs témoignent eux-mêmes de leurs difficultés à reconnaître et à identifier les différentes variables des états inflammatoires entraînant une réponse des professionnels de santé pas toujours appropriée.

b. Consensus de 2001 : autre définition du sepsis

En 2001, un nouveau consensus est réuni pour modifier les définitions du sepsis et ajouter des précisions quant aux critères diagnostics établis lors du consensus de 1991. Dès lors, le syndrome de réponse inflammatoire systémique comprend des paramètres généraux (température corporelle, fréquence cardiaque) inflammatoires (nombre de leucocytes, dosage de protéine C réactive), hémodynamiques (index cardiaque, tension artérielle) et de perfusion tissulaire (lactatémie) (figure 2).

Table 1 Diagnostic criteria for sepsis	
	Infection ^a Documented or suspected <i>and</i> some of the following ^b :
	General parameters Fever (core temperature >38.3°C) Hypothermia (core temperature <36°C) Heart rate >90 bpm or >2 SD above the normal value for age Tachypnea: >30 bpm Altered mental status Significant edema or positive fluid balance (>20 ml/kg over 24 h) Hyperglycemia (plasma glucose >110 mg/dl or 7.7 mM/l) in the absence of diabetes
	Inflammatory parameters Leukocytosis (white blood cell count >12,000/μl) Leukopenia (white blood cell count <4,000/μl) Normal white blood cell count with >10% immature forms Plasma C reactive protein >2 SD above the normal value Plasma procalcitonin >2 SD above the normal value
	Hemodynamic parameters Arterial hypotension ^b (systolic blood pressure <90 mmHg, mean arterial pressure <70, or a systolic blood pressure decrease >40 mmHg in adults or <2 SD below normal for age) Mixed venous oxygen saturation >70% ^b Cardiac index >3.5 l min ⁻¹ m ^{-2c,d}
	Organ dysfunction parameters Arterial hypoxemia (PaO ₂ /FIO ₂ <300) Acute oliguria (urine output <0.5 ml kg ⁻¹ h ⁻¹ or 45 mM/l for at least 2 h) Creatinine increase ≥0.5 mg/dl Coagulation abnormalities (international normalized ratio >1.5 or activated partial thromboplastin time >60 s) Ileus (absent bowel sounds) Thrombocytopenia (platelet count <100,000/μl) Hyperbilirubinemia (plasma total bilirubin >4 mg/dl or 70 μmol/l)
	Tissue perfusion parameters Hyperlactatemia (>3 mmol/l) Decreased capillary refill or mottling
^a Defined as a pathological process induced by a micro-organism	
^b Values above 70% are normal in children (normally 75–80%) and should therefore not be used as a sign of sepsis in newborns or children	
^c Values of 3.5–5.5 are normal in children and should therefore not be used as a sign of sepsis in newborns or children	
^d Diagnostic criteria for sepsis in the pediatric population is signs and symptoms of inflammation plus infection with hyper- or hypothermia (rectal temperature >38.5°C or <35°C), tachycardia (may be absent in hypothermic patients) and at least one of the following indications of altered organ function: altered mental status, hypoxemia, elevated serum lactate level, and bounding pulses	

Figure 2 : Liste des signes cliniques possibles du SIRS.

Au vu des limites de la définition du SIRS établie lors du consensus de 1991, les auteurs constituent une liste de signes cliniques permettant de mieux diagnostiquer un SIRS. Cette liste comprend des paramètres généraux, inflammatoires, hémodynamiques et de perfusion tissulaire. Figure issue de l'article de SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference, *Int Care Med*, 2003 ²¹.

Lors de ce consensus, la définition du sepsis sévère reste inchangée et il est établi que la dysfonction d'organes peut être définie par le score *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA) ou le *Multiple Organ Dysfunction Score* (MODS) permettant de prédire la mortalité des patients en service de réanimation. Ces scores sont basés sur des critères évaluatifs des dysfonctions d'organes : en fonction du système (respiratoire, cardiovasculaire, rénal...), des indicateurs de dysfonction où des variables sont analysées (ratio PaO₂/FIO₂, pression artérielle, taux de créatinine) et un degré de dysfonction est établi, de 0 (dysfonction nulle) à 4 (dysfonction sévère) en fonction du résultat des analyses des variables ^{22,23} (figure 3). À nouveau, bien que ces définitions renforcent la compréhension

de la pathologie septique et que les signes, les variables et les symptômes analysés reflètent la réalité clinique, ils restent néanmoins non spécifiques et peu prédictifs du devenir des patients.

Organ System	Indicator of Dysfunction	Degree of Dysfunction				
		None (0)	Minimal (1)	Mild (2)	Moderate (3)	Severe (4)
Respiratory	P _a O ₂ /F _i O ₂ ratio	> 300	226–300	151–225	76–150	≤ 75
Renal	Serum creatinine level	≤ 100 μmol/L	101–200 μmol/L	201–350 μmol/L	351–500 μmol/L	> 500 μmol/L
Hepatic	Serum bilirubin level	≤ 20 μmol/L	21–60 μmol/L	61–120 μmol/L	121–240 μmol/L	> 240 μmol/L
Cardiovascular	Pressure-adjusted HR*	< 10.0	10.1–15.0	15.1–20.0	20.1–30.0	> 30.0
Hematologic	Platelet count	> 120,000/mm ³	81,000–120,000/mm ³	51,000–80,000/mm ³	21,000–50,000/mm ³	≤ 20,000/mm ³
Neurologic	Glasgow Coma Scale score	15	13–14	10–12	7–9	≤ 6

*Calculated as the product of HR and central venous pressure (CVP), divided by mean arterial pressure (MAP): (HR · CVP)/MAP.

Variables	SOFA Score				
	0	1	2	3	4
Respiratory P _a O ₂ /F _i O ₂ , mm Hg	>400	≤400	≤300	≤200†	≤100†
Coagulation Platelets × 10 ⁹ /μL‡	>150	≤150	≤100	≤50	≤20
Liver Bilirubin, mg/dL‡	<1.2	1.2–1.9	2.0–5.9	6.0–11.9	>12.0
Cardiovascular Hypotension	No hypotension	Mean arterial pressure <70 mm Hg	Dop ≤5 or dob (any dose)§	Dop >5, epi ≤0.1, or norepi ≤0.1§	Dop >15, epi >0.1, or norepi >0.1§
Central nervous system Glasgow Coma Scale	15	13–14	10–12	6–9	<6
Renal Creatinine, mg/dL or urine output, mL/d	<1.2	1.2–1.9	2.0–3.4	3.5–4.9 or <500	>5.0 or <200

*Norepi indicates norepinephrine; Dob, dobutamine; Dop, dopamine; Epi, epinephrine; and F_iO₂, fraction of inspired oxygen.

†Values are with respiratory support.

‡To convert bilirubin from mg/dL to μmol/L, multiply by 17.1.

§Adrenergic agents administered for at least 1 hour (doses given are in μg/kg per minute).

||To convert creatinine from mg/dL to μmol/L, multiply by 88.4.

Figure 3 : Multiple Organ Dysfunction Score (MODS) et Sequential Organ Failure Assessment score (SOFA).

Tableaux regroupant les scores de dysfonction d'organes en fonction de l'organe touché, des indicateurs de dysfonction et du degré de dysfonction.

Tableau issu de l'article de Marshall, *Crit Care Med*, 1995 ²³.

c. Consensus de 2016 : le sepsis 3.0

En 2016, de nouvelles définitions sont mises en place ²⁴. Les définitions précédentes segmentaient cette pathologie en SIRS, sepsis, sepsis sévère et choc septique. Aujourd'hui, les SIRS et sepsis sévère ne sont plus considérés. En effet, les critères du SIRS (température, fréquence cardiaque, fréquence respiratoire) ne sont pas jugés assez performants pour déterminer l'état de sepsis chez un patient. Le sepsis est donc aujourd'hui défini comme une dysfonction d'organes causée par une réponse inappropriée de l'hôte face à l'infection. Le choc septique est quant à lui défini comme un sepsis associant des anomalies circulatoires et métaboliques profondes entraînant une augmentation substantielle de la mortalité (figure 4).

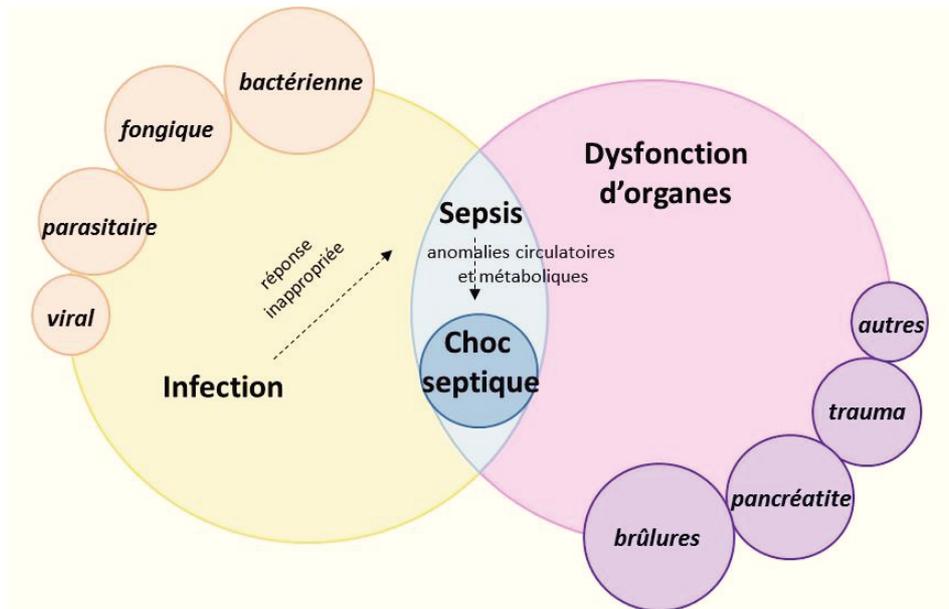


Figure 4 : Inter-relations entre la dysfonction d'organes, l'infection, le sepsis et le choc septique.

Le sepsis est aujourd'hui défini comme une dysfonction d'organes causée par une réponse inappropriée de l'hôte face à l'infection. Le choc septique est défini comme un sepsis associant des anomalies circulatoires et métaboliques profondes entraînant une augmentation substantielle de la mortalité. Figure inspirée et adaptée de l'article de ACCP/SCCM Consensus Conference, *Chest*, 1992 ⁶.

Comme nous l'avons évoqué précédemment, le score SOFA consiste à évaluer les critères de la dysfonction d'organes survenant lors du sepsis. Ces critères sont une diminution de la PaO_2/FiO_2 , une hypotension, une thrombopénie, une diminution du score de Glasgow (GCS ; reflétant l'état de conscience du patient), une augmentation de la bilirubine, une augmentation de la créatinine et de l'oligurie (figure 3). Un patient est considéré en état de sepsis lorsqu'il a une infection soupçonnée ou documentée associant au moins deux des points de score SOFA. Bien que l'ensemble de ces critères semble précis, il nécessite des prélèvements multiples (prélèvements de sang, gaz du sang, ionogramme sanguin, bilan hépatique) et des analyses approfondies parfois longues et compromettantes pour le devenir du patient. Au vu de l'importance d'identifier le plus précocement possible les patients à risque de sepsis, les experts réunis lors du consensus de 2016 ont mis en place un nouveau critère dont l'évaluation peut être réalisée au lit du patient ; il s'agit du *quick-SOFA* (q-SOFA). Le q-SOFA regroupe les critères suivants : une fréquence respiratoire supérieure à 22 cycles respiratoires/min, une altération de l'état neurologique ($GCS \leq 13$) et une pression artérielle systolique inférieure ou égale à 100mmHg. Un patient est donc considéré septique s'il possède au moins deux de ces critères du q-SOFA. Le choc septique est quant à lui défini par un sepsis nécessitant l'utilisation de vasopresseurs pour maintenir une pression artérielle moyenne égale ou supérieure à 65mmHg, une lactatémie égale ou supérieure à 18mg/dL avec une hypovolémie corrigée (figure 5).

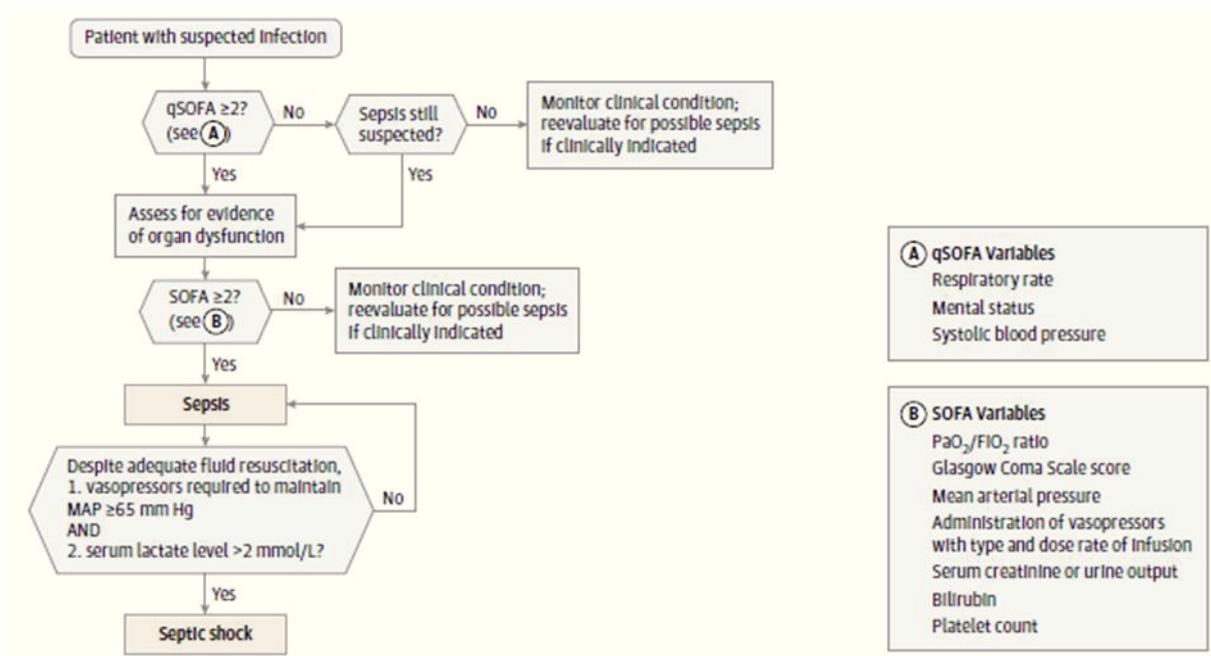


Figure 5 : Proposition de prise en charge d'un patient avec infection suspectée.

Un patient est considéré en état de sepsis lorsqu'il a une infection soupçonnée. Un patient est considéré septique s'il possède au moins deux des critères de q-SOFA. Il peut ensuite être prélevé en vue d'analyser le score SOFA reflétant la dysfonction d'organes. Le choc septique est défini par un sepsis nécessitant l'utilisation de vasopresseurs pour maintenir une pression artérielle moyenne égale ou supérieure à 65mmHg, une lactatémie égale ou supérieure à 18mg/dL et ce malgré une hypovolémie corrigée.

Figure issue de l'article The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3), *JAMA*, 2016 ²⁴.

Cependant, ces systèmes SOFA et q-SOFA sont des scores de prédiction de mortalité et non de diagnostic et il est important de confronter ces définitions théoriques à la réalité clinique et à la physiopathologie complexe du sepsis.

4. Physiopathologie de la réponse inflammatoire au cours du sepsis

Le sepsis est une pathologie complexe considérée comme une succession d'événements biologiques et métaboliques secondaires à l'introduction dans l'organisme d'un agent infectieux étranger (endo- ou exotoxine, protéine virale, élément constitutif d'un parasite ou d'un champignon) ²⁵. La physiopathologie du sepsis se décline en trois mécanismes étroitement liés : l'initiation de la réponse immune, l'activation et l'adhésion leucocytaires à l'endothélium modifiant le phénotype endothélial et la production de médiateurs inflammatoires ²⁶. L'ensemble de ces mécanismes sera détaillé dans ce paragraphe.

a. Initiation de la réponse immune

L'infection résulte d'une interaction spécifique entre un *Pattern Recognition Receptor* (PRR), récepteur du soi, et un *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMPs), molécules du non-soi présents sur les micro-organismes. Il existe trois types de PRR classés selon leur localisation : membranaire tel que les *Toll Like Receptor* (TLR), soluble tel que le *LPS-Binding Protein* (LBP) et cytoplasmique tels que les *NOD-like receptor* (NLR) et *RIG-1-like receptor* (RLR). Chaque PRR possède ses fonctionnalités propres de localisation, de reconnaissance et d'activation de voies en amont. Les PAMPs, quant à eux, sont des motifs structuraux conservés qui diffèrent selon le micro-organisme infestant : des glycoprotéines pour les virus, des peptidoglycanes pour les bactéries à Gram positif (Gram +) et des lipopolysaccharides (LPS) ou des flagellines pour les bactéries à Gram négatif (Gram -). Lorsque l'interaction spécifique PRR-PAMPs a lieu, l'agent infectieux est phagocyté et un signal danger est émis, marquant le déclenchement du processus inflammatoire^{27,28}. L'initiation de la réponse immune est dépendante du type de bactéries infectant l'hôte. Lorsqu'il s'agit de bactéries à Gram -, telles que l'endotoxine, le LPS est généralement reconnu par la protéine de liaison LBP. Le complexe LPS-LBP ainsi formé est reconnu par le cluster de différenciation CD-14, protéine transmembranaire ou soluble, qui permet l'acheminement du LPS-LBP vers un PRR : les récepteurs de type TLR4^{29,30}. Une fois la liaison réalisée, la voie de signalisation du TLR4 est mise en place, provoquant l'activation de protéines intracellulaires comme la *Myeloid differentiation protein 88* (MyD88) responsable de l'activation de nombreuses voies de signalisation. Premièrement, MyD88 active la Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate Oxydase (NADPH oxydase), elle-même responsable de la production d'Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) activant la voie *Mitogen-activated protein kinases* (MAPK) ou la voie *Nuclear Factor-kappa B* (NF-κB)³¹. Dans un second temps, MyD88 active *via Interleukin-1 receptor-associated kinase* (IRAK) et *TNF receptor-associated factor 6* (TRAF6), la voie *I-kappa-B kinase beta* (IKK-β) responsable de l'activation et de la translocation du facteur NF-κB. Enfin, MyD88 active *via* IRAK et TRAF6, la voie MAPK responsable de l'activation et de la translocation d'AP-1. NF-κB et *Activator protein-1* (AP-1) ainsi transloqués dans le noyau, permettent l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires, pour la NO Synthase Inductible (NOSi) ou pour la cyclooxygénase (COX-2)^{27,28,32,33} (figure 6). Il est aussi clairement établi que NF-κB est responsable de la sécrétion de E-sélectine impliquée dans l'activation et l'adhésion leucocytaire, sujet que nous détaillerons dans la partie suivante³⁴.

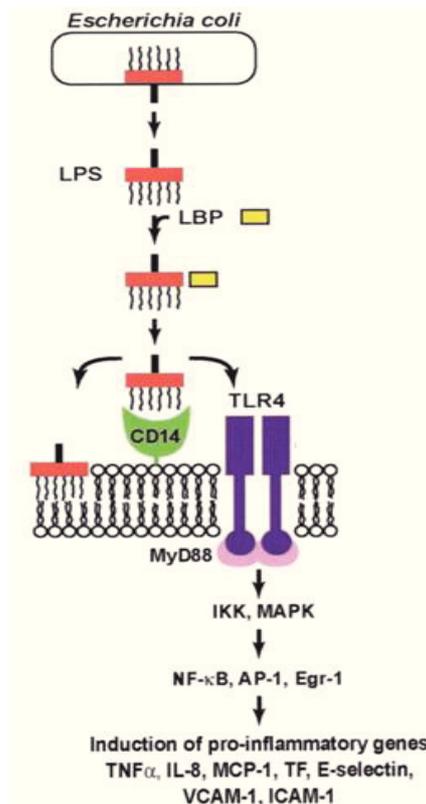


Figure 6 : Initiation de la réponse immune par la voie du TLR4.

L'initiation de la réponse immune se fait par liaison du lipopolysaccharide (LPS) au *LPS-Binding Protein* (LBP). Le complexe LPS-LBP est reconnu par le Cluster de différenciation CD-14 permettant l'acheminement du complexe vers un *Pattern Recognition Receptor*, ici le *Toll-like Receptor 4* (TLR4). Figure issue de Mackmann, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2003 ³⁵

Dans d'autres cas, le LPS se lie au cluster de différenciation CD-163 entraînant l'endocytose du LPS sans activation ni transcription de facteurs inflammatoires ³⁶. Lorsqu'il s'agit d'une infection par des bactéries à Gram + (staphylocoque ou streptocoque), la reconnaissance des bactéries se fait *via* la partie peptidoglycanes (PGN) et *via* la partie acide lipotéchoïque (LTA) reconnues toutes deux par le CD-14 et entraînant l'activation de la voie TLR2, TLR4 et TLR6 permettant la transcription des facteurs impliqués dans la réponse inflammatoire (TNF- α et IL-6) ^{37,38}.

b. Activation et adhésion leucocytaires

L'endothélium joue un rôle primordial dans l'activation des leucocytes observée dans le sepsis permettant la migration des leucocytes activés au site inflammatoire par sécrétion de molécules d'adhérence. Ce phénomène est à l'origine de l'adhésion leucocytaire qui se déroule en trois phases : le *rolling*, l'adhérence et la migration. La première étape de l'adhésion leucocytaire appelée *rolling* est responsable d'un ralentissement des leucocytes par des interactions de faible intensité avec la cellule endothéliale (CE). Les sélectines (E-sélectine ou L-sélectine), résistantes aux forces de cisaillement élevées, représentent les premières molécules d'adhérence capables de ralentir les leucocytes ³⁹. L'adhérence constitue la deuxième étape de l'adhésion leucocytaire. Elle consiste en un attachement solide des leucocytes à la CE grâce à la sécrétion de molécules d'adhérence telles que *intercellular*

adhesion molecule (ICAM) et *vascular adhesion molecule* (VCAM) ⁴⁰. Cette étape d'adhérence est lente car dépendante de l'expression des molécules ICAM et VCAM non exprimées physiologiquement, nécessitant donc une synthèse protéique. La dernière étape de l'adhésion leucocytaire est la migration. Cette étape met en jeu la production de facteurs chimiotactiques tels que l'IL-8, le C3a, le C5a, le *mitochondrial pyruvate carrier 1* (MPC-1) ainsi que le gradient chimio-attractant permettant la migration des leucocytes à travers la barrière endothéliale en direction des tissus de la zone inflammatoire.

c. Pérennisation du processus inflammatoire

L'infiltration leucocytaire entraîne une réponse inflammatoire *via* l'expression et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les leucocytes participant ainsi à l'entretien du processus inflammatoire ²⁵. Une transcription de facteurs anti-inflammatoires comme l'IL-10 est aussi réalisée après l'activation de la voie LPS jouant également un rôle majeur dans le maintien de l'activation des monocytes et autres cellules activées par le LPS ^{41,42}. Cette inflammation lors du sepsis va être détectée et intégrée par le système nerveux central et permettre l'activation des voies sympathique et parasympathique. Ce réflexe neuro-inflammatoire entraîne la sécrétion de substances neuromédiatrices stimulant (substance P, noradrénaline) ou inhibant (acétylcholine, adrénaline, PACAP et VIP) la réponse inflammatoire. En effet, des études montrent une connexion spécifique et physiologique entre le système nerveux et le système immunitaire inné permettant la production de cytokines pro-inflammatoires durant le sepsis ^{43,44}.

Le processus inflammatoire mis en place lors du sepsis est à la fois pro- et anti-inflammatoire. À ce profil d'hyper-inflammation se caractérisant par la production de cytokines pro-inflammatoires, s'ajoute la production de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 ou l'IL-4 ^{45,46}. Dans une étude clinique réalisée sur 65 patients admis en service de réanimation pour un sepsis, les auteurs observent une augmentation significative des taux de cytokines pro- et anti-inflammatoires. Les résultats montrent que l'apparition d'un profil pro-inflammatoire précoce et soutenu défini par une augmentation significative du ratio IL-10/TNF- α est un indicateur de mauvais pronostic chez ces patients ⁴⁷.

La présence de cette boucle d'entretien du processus inflammatoire, comprenant des réponses anti- et pro-inflammatoires, rend l'inflammation excessive et non contrôlée conduisant à l'apparition de dysfonction d'organes.

5. Mécanismes de la dysfonction vasculaire au cours du sepsis

L'endothélium est une monocouche cellulaire recouvrant la totalité des systèmes vasculaires. Il représente une interface entre les tissus et les cellules inflammatoires circulantes responsable entre autres, de la régulation de l'homéostasie, du contrôle de la vasomotricité et des fonctions immunologiques. Il représente un des éléments clé de la physiopathologie du sepsis. Comme nous l'avons vu, la CE est activée par l'endotoxine ou les cytokines pro-inflammatoires et permet le recrutement des leucocytes eux-mêmes responsables de l'auto-entretien de l'inflammation. L'endothélium acquiert alors un phénotype pathologique responsable de la dysfonction endothéliale impliquée dans la dysfonction d'organe.

a. Données cliniques

Cliniquement, la dysfonction vasculaire est définie par une diminution des pressions artérielles systolique et moyenne permettant de mettre en évidence une hypotension éventuelle (score SOFA – paragraphe 1.3.b). Aussi, de nombreux biomarqueurs permettent d'identifier la dysfonction endothéliale lors du sepsis. Plus de 11 études cliniques ont déterminé l'angiopoïétine 2 (Ang-2) comme biomarqueur du sepsis humain avec une élévation significative de l'expression d'Ang-2 chez les patients en sepsis en comparaison aux sujets sains. D'autres biomarqueurs tels que le VCAM soluble, l'ICAM soluble, le facteur tissulaire (TF), le *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1), le facteur von Willebrand, l'ADAMTS 13 ou le *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) soluble ont aussi été identifiés. Les sélectines et les intégrines sont utilisées comme biomarqueurs de l'activation endothéliale et sont corrélées au devenir des patients ^{48,49}.

b. Dénudation endothéliale, apoptose et microparticules

La dénudation endothéliale se caractérise par un détachement de CE de la membrane basale. L'injection intraveineuse d'endotoxine chez des rats montre un élargissement de l'espace sous-endothélial et une augmentation de la déformation de la lame élastique interne suivis d'une modification de la morphologie des CE. L'endotoxine provoque des altérations ultra-structurales de l'ensemble de l'endothélium ⁵⁰. De même, sur des échantillons de sang de patients atteints de sepsis ou de choc septique, une augmentation du nombre de CE circulantes est observée témoignant de la survenue de dommages endothéliaux dans le sepsis ⁵¹.

Cette dénudation de l'endothélium s'accompagne d'une apoptose des CE. En effet, l'exposition de CE artérielles ou de CE glomérulaires en culture avec du LPS ou TNF- α augmente significativement

l'expression de la protéine pro-apoptotique *bcl-2 homologous antagonist-killer* (Bak) et l'activité de la caspase-3 et diminue significativement l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-x_L favorisant ainsi l'apoptose de ces cellules ^{52,53}.

L'un des médiateurs de la physiopathologie de la dysfonction endothéliale rencontrée lors du sepsis est la présence de microparticules (MP). Les MP sont des petites vésicules circulantes de 0.1 à 1.0 µm provenant de la membrane des cellules (lymphocytes, cellules myéloïdes, plaquettes ou CE) durant l'activation ou l'apoptose cellulaires. Elles jouent un rôle dans la thrombose, l'inflammation et la réactivité endothéliale ⁵⁴. Dans un modèle murin de sepsis induit par ligature et perforation caecale (CLP), la présence de MP est significativement augmentée par rapport aux souris contrôles et celle-ci stimule l'inflammation et augmente la mortalité ⁵⁵. De même, sur des collections de sang de patients, l'augmentation du nombre de MP TF+/CD13+ est corrélée avec la sévérité du sepsis par augmentation du score SOFA ⁵⁶.

L'ensemble de ces mécanismes à l'origine des modifications ultra-structurales de l'endothélium augmente le phénomène de perméabilité endothéliale favorisant entre autres la survenue d'œdème interstitiel dans le sepsis ⁵⁷.

c. Propriétés pro-adhésive, pro-coagulante, anti-fibrinolytique

Lors d'un sepsis, l'endothélium devient pro-adhésif, pro-coagulant, pro-thrombotique et anti-fibrinolytique. Concernant l'état pro-adhésif de l'endothélium, l'augmentation plasmatique des molécules d'adhésion lors du sepsis favorise l'étape de *rolling* et d'adhérence des leucocytes qui s'accumulent alors au niveau de la zone inflammatoire ⁵⁸. Dans des études sur cellules isolées ou dans différents modèles de sepsis, une augmentation des taux d'ICAM-1 et de E-sélectine est observée témoignant de l'état pro-adhésif de l'endothélium.

De même, une altération de la balance pro-coagulant/anti-coagulant est décrite. L'expression des facteurs pro-coagulant est augmentée alors que l'expression des facteurs anti-coagulant est diminuée ⁵⁹. En effet, le LPS mais aussi le TNF-α et l'IL-1β, libérés lors de l'initiation de la réponse immune, entraîne une augmentation de l'expression du TF à la surface des CE impliquées dans la première étape de la cascade de coagulation ⁵⁹. De plus, le LPS et le TNF-α entraînent une diminution des taux de production de protéine C, de protéine S, d'antithrombine III et de l'inhibiteur de la voie du TF (*tissue factor pathway inhibitor*, TFPI) par la CE. Ces facteurs anti-coagulants alors sous-exprimés favorisent le caractère pro-coagulant de l'endothélium dans le sepsis ⁶⁰.

Concernant les propriétés anti-fibrinolytiques de l'endothélium lors du sepsis, de nombreuses études sur cellules isolées et dans des modèles de sepsis animaux ont montré l'augmentation significative des taux de PAI-1 et *tissue plasminogen activator* (t-PA) après stimulation avec du TNF- α ou de l'IL-1 β . Sur du sang de patients, cette augmentation aussi observée est corrélée à un pronostic défavorable ^{61,62}.

d. Vasoplégie et hyporéactivité vasculaire

La vasoplégie se caractérise par une relaxation vasculaire très importante liée à la perte du tonus vasomoteur des CE. De multiples mécanismes sont à l'origine de cette vasoplégie entraînant une réduction du calcium cytosolique dans les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) et une vasorelaxation. En effet, les neutrophiles et les leucocytes activés par l'endothélium en conditions inflammatoires favorisent la sécrétion de médiateurs par les CE tels que le monoxyde d'azote (NO), la prostacycline (PGI₂), les leucotriènes et les ERO. De même, une désensibilisation des récepteurs de type alpha-adrénergiques est retrouvée suite à la production excessive de catécholamines.

i. Monoxyde d'azote

Le NO est un radical gazeux produit à partir de la L-arginine et de l'oxygène *via* les enzymes NOS (figure 7). Physiologiquement, le NO est produit par la NOS endothéliale (NOS_e) en petites quantités et son caractère labile lui permet de diffuser à travers les CMLV pour activer la guanylate cyclase (GC) et augmenter le Guanosine monophosphate cyclique (GMPc) entraînant ainsi une relaxation vasculaire.

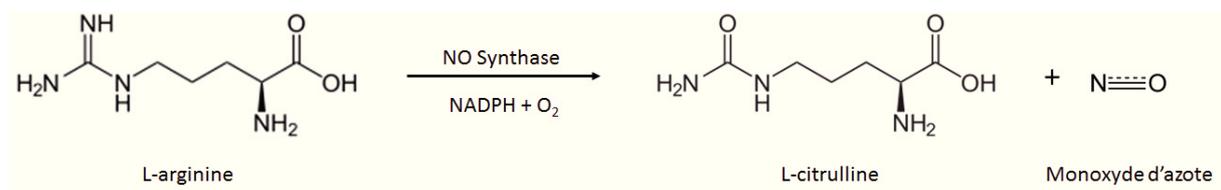


Figure 7 : Réaction de synthèse du NO.

La L-arginine est transformée en L-citrulline et en monoxyde d'azote sous l'action de la NO Synthase et en présence de NADPH et d'oxygène.

Les cytokines pro-inflammatoires libérées lors de l'initiation de la réponse immune entraînent une production de NOS_i favorisant la libération de NO en grande quantité par la CE ⁶³. La production excessive de NO a pour conséquence une vasoplégie responsable de l'hypotension consécutive ⁵⁹. L'injection de LPS chez des souris déficientes en NOS_i déclenche une hypotension moins sévère chez ces souris ⁶⁴. Dans une autre étude réalisée dans notre laboratoire, l'administration de LPS ou de TNF-

α chez des souris diminue significativement la réactivité vasculaire induite par le flux témoignant de l'hyporéactivité vasculaire *via* l'endotoxine ou l'inflammation ⁶⁵.

ii. Peroxynitrite

La formation de peroxynitrite (ONOO⁻), puissant agent oxydant formé par la réaction spontanée du NO avec l'anion superoxyde O₂⁻, participe largement à la vasoplégie septique. Dans un modèle de rats septiques induits par CLP, les auteurs montrent une élévation des taux de peroxynitrite responsable d'une dysfonction vasculaire. Par ailleurs, le peroxynitrite peut altérer le signal catécholaminergique car il dégrade les catécholamines par oxydation en dérivés adrénochromes, les rendant inactives ; ce phénomène accentue la vasoplégie septique ⁶⁶.

iii. Facteurs relaxants dérivés de l'endothélium

La PGI₂ et les leucotriènes sont des facteurs relaxants dérivés de l'endothélium (EDRF), métabolites de l'acide arachidonique. Une surexpression de ces facteurs entraîne une vasorelaxation à l'origine de l'œdème et de l'hypoperfusion rencontrés lors du sepsis ²⁵. Une autre étude montre que la PGI₂, produite *via* l'action de COX-2, est un médiateur clé de la vasoplégie induite par l'acétylcholine sur les aortes de rats septiques induits par CLP ⁶⁷. De même, elle facilite la libération endothéliale de NO qui, en retour, potentialise l'action de la PGI₂ au niveau des CMLV par inhibition de la phosphodiesterase majorant ainsi le processus de dysfonction endothéliale du sepsis⁶⁸.

iv. Les canaux potassiques

Les canaux potassiques adénosine-triphosphate-dépendant (K_{ATP}) et les canaux potassiques de grande conductance calcium-dépendant (BK_{Ca}) entraînent une sortie d'ions K⁺ responsables d'une hyperpolarisation de la CMLV, conduisant à une diminution de la probabilité d'ouverture des canaux calciques dépendant du potentiel donc une baisse du Ca²⁺ cytosolique. Lors du sepsis, les canaux K_{ATP} et BK_{Ca} peuvent s'ouvrir sous l'effet de la déplétion en ATP, de l'hypoxie ou du peroxynitrite entraînant une relaxation vasculaire excessive ⁶⁹.

v. Vasopressine

La vasopressine est une hormone anti-diurétique produite par l'hypothalamus et libérée par l'hypophyse. Physiologiquement, elle joue un rôle mineur dans la régulation de la pression artérielle permettant une vasoconstriction *via* sa capacité à inhiber les canaux K_{ATP} et la production de NO.

Cependant, en réponse à l'hypotension lors du sepsis, les stocks hypophysaires et donc la concentration plasmatique de vasopressine sont diminués participant à la vasoplégie septique ^{70,71}.

vi. Récepteurs alpha-adrénergiques

Lors du sepsis, une augmentation des taux circulants de catécholamines (adrénaline, noradrénaline, prostaglandines, angiotensine...) est observée. Cette augmentation massive entraîne une exposition continue et répétée du récepteur à son agoniste participant à la désensibilisation des récepteurs adrénergiques responsable d'une résistance aux catécholamines. On observe alors une down-régulation des récepteurs adrénergiques avec une internalisation prolongée et une dégradation. Dans un modèle de rats septiques, une diminution du nombre de récepteurs alpha 1-adrénergiques est observée conduisant à une résistance aux catécholamines ⁷².

e. Perméabilité vasculaire et glycocalyx

Les modifications ultra-structurales de l'endothélium survenant lors du sepsis et contribuant à la dysfonction endothéliale sont nombreuses. La dénudation endothéliale et l'apoptose des CE dont nous avons discuté dans le paragraphe 5.a.ii. s'accompagnent également d'autres dommages cellulaires favorisant l'augmentation de la perméabilité vasculaire à l'origine d'œdème interstitiel. Il a été montré qu'une surexpression de PGI2 et de leucotriènes provoque une modification des jonctions serrées de la CE entraînant une altération endothéliale associée à une augmentation de la perméabilité endothéliale.

Concernant les ERO, il a été montré que l'O₂⁻ à faible concentration augmente la synthèse des PGI2 et a donc un effet vasodilatateur. Dans le sepsis, à forte concentration, l'O₂⁻ se lie aisément au NO formant ainsi l'ONOO⁻. Ce peroxy-nitrite ainsi que l'H₂O₂ sont toxiques pour les protéines endothéliales et l'ADN et entraînent des dommages cellulaires de l'endothélium.

Le glycocalyx est un complexe membranaire protéique recouvrant la surface intra-luminale des CE. Il possède un rôle déterminant dans la perméabilité vasculaire et confère ses propriétés anti-coagulantes à l'endothélium. La destruction du glycocalyx intervient en présence d'un stress oxydant, d'une hyperglycémie, de cytokines pro-inflammatoires et d'endotoxine et constitue donc un mécanisme majeur de la dysfonction endothéliale rencontrée de l'état septique ⁷³. En effet, l'administration de LPS chez des rats entraîne une dysfonction vasculaire décrite par une augmentation du stress oxydant et une perte du glycocalyx endothélial visible par microscopie intravitale ⁷⁴. De même, dans un modèle murin, l'hyperglycémie, induite par injections uniques ou chroniques,

augmente la perméabilité de l'endothélium sans pour autant affecter son volume montrant que le glycocalyx représente une cible précoce de l'hyperglycémie septique ⁷⁵.

L'ensemble des troubles de la coagulation, de la régulation du tonus vasomoteur et de la perméabilité endothéliale est responsable à la fois d'une hypoperfusion tissulaire et d'une hyperperméabilité vasculaire. Cette dysfonction vasculaire est responsable des dommages tissulaires et ainsi de l'ensemble des dysfonctions d'organes observées.

6. Mécanismes de la dysfonction cardiaque au cours du sepsis

a. Données cliniques

La dysfonction cardiaque touche près de 50% des patients diagnostiqués en sepsis. En effet, une étude de 2004 montre que la dysfonction cardiaque systolique est présente chez 44% des patients présentant un sepsis ou un choc septique. La cardiomyopathie septique se caractérise par une diminution du débit cardiaque dépendante d'une atteinte de la contractilité intrinsèque du myocarde avec réduction de la fraction d'éjection ventriculaire gauche ^{76,77}. Différents marqueurs biologiques permettent d'identifier la dysfonction cardiaque chez les patients en sepsis. Un lien de corrélation entre une concentration plasmatique élevée de *brain natriuretic peptide* (BNP), marqueur de la dysfonction cardiaque, et une augmentation de la mortalité des patients est ainsi mis en évidence ⁷⁸. De même, une élévation des taux de troponine T et I est mise en évidence chez les patients septiques présentant une dysfonction ventriculaire gauche ⁷⁹. Si la mise en évidence de la dysfonction cardiaque chez les patients est possible *via* des biomarqueurs, il est nécessaire de comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la mise en place de cette cardiomyopathie septique dont les différents aspects seront discutés dans les parties suivantes.

b. Circulation coronarienne

La diminution du flux sanguin coronarien représente l'un des premiers mécanismes proposés comme contributeurs majeurs de l'apparition de la dysfonction cardiaque dans le sepsis ⁸⁰. Dans l'une des premières études cliniques réalisée en 1986, les auteurs montrent que le flux coronarien est similaire ou augmenté sur des patients en sepsis en comparaison à des sujets sains avançant ainsi l'idée que la circulation coronarienne n'est pas altérée dans la pathologie septique ⁸¹. Dans des études plus récentes, il est montré que l'endotoxémie chez le rat entraîne une diminution significative de la pression de perfusion coronarienne démontrant l'implication d'une hypoperfusion coronarienne dans le développement du sepsis ^{82,83}.

c. Troubles de la contractilité et de la compliance cardiaques

La diminution de la contractilité cardiaque ainsi que l'altération de la compliance cardiaque ont été clairement établies comme éléments favorisant la dysfonction cardiaque dans le sepsis. Des études réalisées sur modèles animaux⁸⁴, des cœurs isolés⁸⁵, des cellules en culture⁸⁶ ou en clinique⁸⁷ viennent confirmer cette hypothèse. Plusieurs mécanismes sont à l'origine des troubles de la contractilité et de la compliance cardiaque durant le sepsis.

La signalisation adrénergique joue un rôle important. En effet, la sécrétion de catécholamines stimule les récepteurs β -adrénergiques présents sur les cardiomyocytes activant les voies de signalisation des petites protéines G puis de la protéine kinase A (PKA). L'activation de ces voies stimule la contraction et la relaxation des cardiomyocytes et influence la fréquence cardiaque⁸⁸. Des études montrent que l'élévation des taux circulants de catécholamines favorise une augmentation des taux protéiques de G α i-2 et G α i-3 entraînant une diminution de l'activation de l'adénylate cyclase. Cet effet est à l'origine d'une dysfonction cardiaque avec troubles de la contractilité, de la relaxation et de la fréquence cardiaque chez des rats et chez des patients septiques (figure 8)^{89,90}.

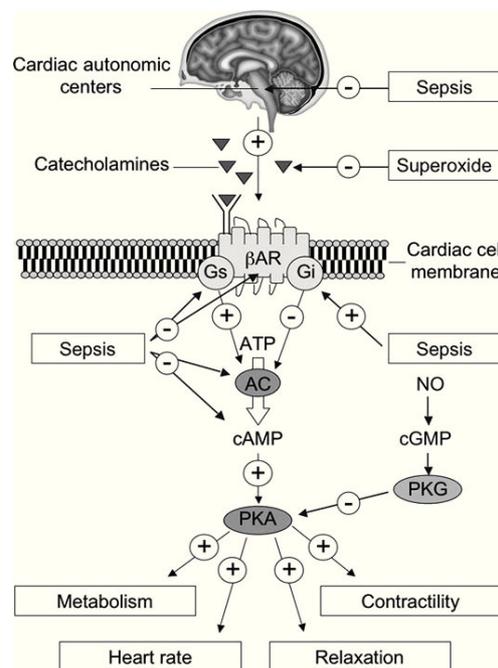


Figure 8 : Signalisation adrénergique et conséquences cardiaques dans le sepsis.

Lors du sepsis, la libération de catécholamines stimule le récepteur β -adrénergique. Les petites protéines G inhibitrices sont alors activées entraînant une inhibition de l'adénylate cyclase (AC) et limitant l'activité de la PKA. En résulte une dysfonction cardiaque avec modulation de la fréquence cardiaque, de la relaxation et de la contractilité. Figure issue de Rudiger, *Crit. Care Med.*, 2007⁸⁸.

Le trafic calcique joue également un rôle important dans l'apparition de dysfonction cardiaque. Il a été montré que l'endotoxine et les cytokines suppriment les courants calciques de type L sur les sarcolemmes des cardiomyocytes de rats isolés entraînant une réduction de la contractilité

myocardique ⁹¹. Aussi, le sepsis induit une diminution de la densité des récepteurs à la ryanodine (RyR) placés sur la membrane du réticulum sarcoplasmique (RS) limitant ainsi la sortie de Ca^{2+} . La diminution de l'entrée de Ca^{2+} par les canaux de type L associée à la diminution de la sortie de Ca^{2+} *via* les RyR montre que le phénomène de *Calcium-induced Calcium release* est nettement diminué dans le sepsis conduisant ainsi à des troubles de contractilité cardiaque ⁹². A ces mécanismes s'ajoutent une inhibition de la pompe *sarco(endo)plasmic reticulum calcium ATPase* (SERCA) durant le sepsis empêchant la recapture du Ca^{2+} dans le RS et favorisant ainsi la dysfonction mitochondriale (discutée dans le paragraphe 5. b. vi) (figure 9) ⁹³.

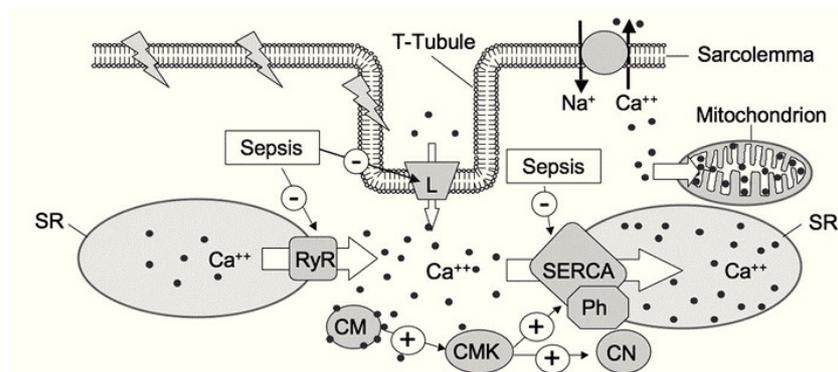


Figure 9 : Trafic calcique et conséquences cardiaques dans le sepsis.

Le sepsis supprime les courants calciques de type L sur les sarcolemmes des cardiomyocytes, induit une diminution de la densité des RyR placés sur la membrane du RS limitant ainsi la sortie de Ca^{2+} et inhibe de la pompe SERCA entraînant une réduction de la contractilité myocardique et favorisant ainsi la dysfonction mitochondriale. Figure issue et adaptée de Rudiger, *Crit. Care Med.*, 2007 ⁸⁸.

Enfin, l'altération des myofibrilles lors du sepsis a été mise en évidence. Dans un modèle de rats dont le sepsis est induit par CLP, les auteurs décrivent une altération de la sensibilité au Ca^{2+} *via* la voie de signalisation du récepteur β -adrénergique dans les myofibrilles cardiaques contribuant à l'apparition d'une dysfonction cardiaque par modification de la contractilité ⁹⁴.

d. Altération de l'autonomie cardiaque

L'altération de l'autonomie cardiaque se caractérise par des troubles de la variabilité de la fréquence cardiaque. Ainsi, la mesure au lit du patient des variabilités de la fréquence cardiaque constitue une méthode utile, peu onéreuse et non invasive permettant de diagnostiquer les patients avec une altération de l'autonomie cardiaque ⁹⁵. Cette altération est aujourd'hui clairement démontrée dans le sepsis et celle-ci s'accompagne d'un pronostic défavorable des patients ⁹⁶. Elle se caractérise généralement par une tachycardie en réponse à une stimulation β -adrénergique et à l'hyperthermie ⁸⁸. Une étude publiée par Annane *et al.* montre que l'élévation des catécholamines circulantes dans le sepsis altère le système nerveux sympathique entraînant une modulation de l'autonomie cardiaque avec des variabilités de la fréquence cardiaque contribuant à la

cardiomyopathie ⁹⁷. Enfin, une étude de Sharshar *et al.* montre une augmentation de l'apoptose, de l'inflammation et de la production de NOSi au niveau des neurones des centres autonomes des cardiomyocytes chez des patients en choc septique présentant une dysfonction cardiaque. Dans ce contexte, des travaux sur l'intérêt et la place des bêta-bloquants ont été réalisés pour le contrôle de la fréquence cardiaque chez les patients en sepsis montrant un réel impact bénéfique pour certains patients sélectionnés ⁹⁸.

e. Perturbations métaboliques, dysfonction mitochondriale et apoptose cardiaques

Dans le sepsis, de profonds changements métaboliques sont observés. En effet, physiologiquement, le cœur a pour substrat préférentiel les acides gras libres (AGL). Chez les patients septiques, il a été mis en évidence une diminution de l'utilisation des AGL comme substrat métabolique au profit quasi exclusif du substrat glucose. Ce shift de l'utilisation des substrats métaboliques est associé à une diminution de l'absorption de glucose par les cellules myocardiques conduisant à un phénomène de dysfonction cardiaque ⁹⁹. L'ensemble de ces perturbations métaboliques rencontrées lors du sepsis à l'échelle de l'organisme entier sera approfondi dans la partie II de ce manuscrit.

Le sepsis se caractérise également par une altération de la fonction mitochondriale incluant des anomalies structurelles, une augmentation de la perméabilité du pore de transition mitochondrial, des dommages de l'ADN mitochondrial et une diminution de l'activité des cytochromes oxydase ⁸⁰. Il est démontré que l'administration de LPS entraîne un stress oxydant *via* la production d'ERO. À cette production, s'ajoute une diminution significative de l'expression protéique des complexes mitochondriaux I, IV et V confirmant la dysfonction mitochondriale par la présence de dommages mitochondriaux dans le cœur ¹⁰⁰.

Cette dysfonction mitochondriale rencontrée lors du sepsis est à l'origine d'une dysoxie, perturbation de l'oxygénation tissulaire, responsable d'une déplétion en ATP et d'une apoptose cellulaire ¹⁰¹. Dans un modèle de rats endotoxiques, les auteurs observent une augmentation de l'activité *caspase-like* 3, 8 et 9 dans les cardiomyocytes du ventricule gauche associée à une dysfonction contractile du ventricule gauche ¹⁰². Cette étude établit clairement le lien entre les phénomènes apoptotiques et la dysfonction cardiaque observés lors du sepsis.

Dans une étude réalisée sur un modèle de CLP chez le rat, les auteurs décrivent une modification du métabolisme cardiaque ainsi qu'une diminution de l'activité mitochondriale associée à une augmentation de l'activité de la caspase-3 entraînant une diminution de la contractilité des cœurs isolés ¹⁰¹. Cette étude permet donc de mettre en évidence les liens étroits qui unissent les différents mécanismes à l'origine de la physiopathologie de la dysfonction cardiaque.

7. Stress du réticulum endoplasmique dans la dysfonction cardiovasculaire

Le stress du réticulum endoplasmique (SRE) est un mécanisme mis en jeu dans de nombreuses pathologies. Il existe un équilibre complexe entre le SRE adaptatif qualifié de mécanisme protecteur et le SRE chronique souvent délétère ; ainsi un SRE insuffisant ou au contraire une exacerbation du SRE sont associés à des états pathologiques. Il est donc important de comprendre le mécanisme du SRE et son rôle dans les pathologies notamment dans l'atteinte cardio-vasculaire septique.

a. Mécanisme du stress du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est un organite intracellulaire des eucaryotes impliqué dans la synthèse et le métabolisme de nombreuses protéines. Cet organite est un senseur des altérations de l'homéostasie cellulaire capable d'entraîner une réponse cellulaire adaptée. Ce mécanisme est connu sous le nom de stress du réticulum endoplasmique. Un stress tel que l'accumulation de protéines mal-repliées dans la lumière du RE, va permettre l'activation de l'*Unfolded Protein Response* (UPR) dont le but est de restaurer l'homéostasie cellulaire. Cette réponse cellulaire complexe est initiée par trois molécules principales que sont *PKR-like ER kinase* (PERK), *activated transcription factor 6* (ATF6) et *Inositol-requiring enzyme-1* (IRE-1) qui interagissent avec la protéine chaperonne Bip/GRP78. Lors d'un SRE, *Binding immunoglobulin protein/glucose-regulated protein-78* (Bip/GRP78) se dissocie des trois protéines transmembranaires. La protéine ATF6 est alors transloquée dans l'appareil de Golgi et les voies de signalisation *C/EBP Homologous Protein* (CHOP), ATF4 et *X-box binding protein 1* (XBP-1) sont activées. Ces réponses ont pour but de diminuer la biosynthèse des protéines afin de réduire l'accumulation de ces protéines dans la lumière du RE, d'augmenter la biosynthèse des protéines chaperonnes, d'augmenter la biosynthèse des protéines impliquées dans la machinerie de dégradation des protéines associées au RE ("ER-associated degradation" - ERAD) et d'aider le RE à retrouver son homéostasie (calcique en particulier) (figure 10) ¹⁰³⁻¹⁰⁵.

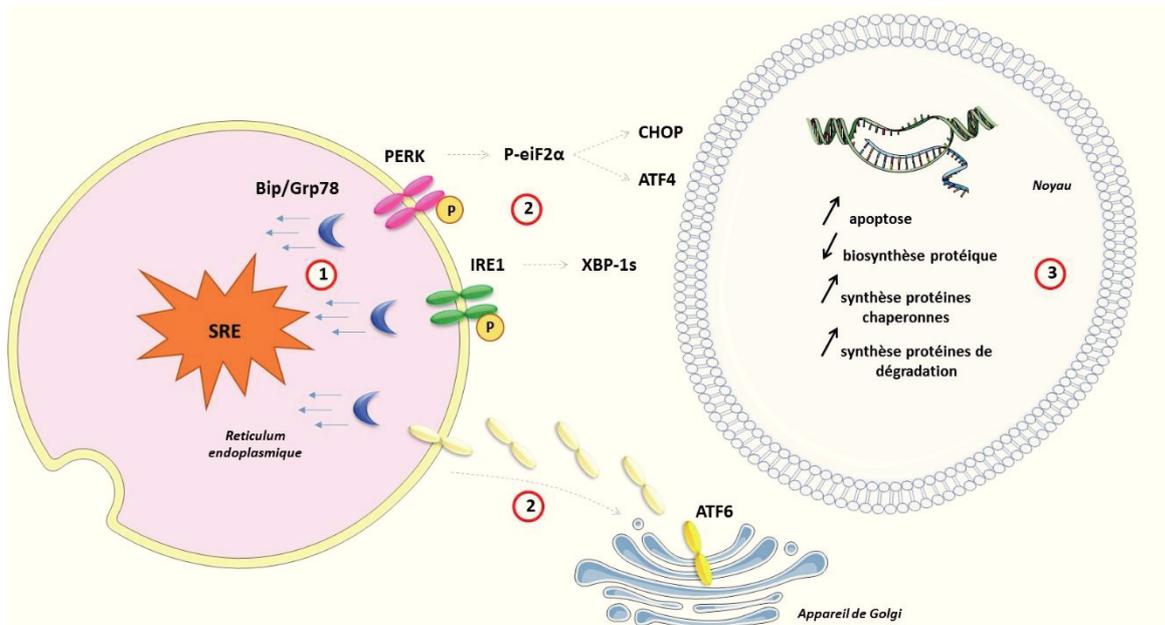


Figure 10 : Activation de l'UPR (Unfolded Protein Response) lors du stress du réticulum endoplasmique.

Physiologiquement, les trois protéines transmembranaires PERK, IRE-1 et ATF6 sont maintenues inactives par la protéine chaperonne Bip/GRP78. Lors d'un SRE, il y a activation de l'UPR, la protéine chaperonne Bip/GRP78 est alors dissociée des protéines transmembranaires (étape 1). La protéine ATF6 est alors transloquée dans l'appareil de Golgi (étape 2) et les voies de signalisation CHOP, ATF4 et XBP-1 sont activées (étape 2). Ces réponses ont pour but de rétablir l'homéostasie cellulaire.

b. Implication du SRE dans la dysfonction cardiovasculaire septique

L'implication du SRE dans la dysfonction cardiovasculaire septique a été mise en évidence récemment. Une surexpression des marqueurs du SRE associée à une augmentation de l'apoptose des cardiomyocytes est observée dans un modèle de rats avec sepsis induit par CLP. Dans ce même modèle, les auteurs montrent que l'inhibition du SRE protège le myocarde des phénomènes apoptotiques induits par le SRE¹⁰⁶. De même, l'expression de CHOP, médiateur du SRE, est augmentée dans de nombreux organes après CLP. Ce médiateur est directement impliqué dans l'amplification de la réponse inflammatoire de la pathogenèse du sepsis. Les auteurs montrent qu'une délétion génétique de CHOP ou l'utilisation de sulfure d'hydrogène, inhibiteur de CHOP, permet une amélioration de la survie durant le sepsis¹⁰⁷. En réponse au SRE, les voies de signalisation mises en place stimulent l'inflammation et l'apoptose *via* différents mécanismes tels que la production d'ERO, l'activation des caspases ou de la voie NF-κB. En effet, l'étude de Toltl *et al.* montre que le SRE induit par l'injection de LPS active la voie NF-κB et la voie *Hypoxia Inducible Factors 1α* (HIF-1α), responsables de la majoration du processus inflammatoire. L'administration de 4-phenylbutyrate (4-PBA), chaperonne chimique diminuant l'activation de la réponse UPR, diminue significativement l'inflammation par modulation des voies NF-κB et HIF-1α¹⁰⁸. Dans notre laboratoire, les travaux du Dr. Pierre-Alain Thiébaud ont mis en évidence le rôle du SRE dans la dysfonction cardiovasculaire induite lors du sepsis. L'injection de LPS induit une dysfonction cardiaque observée notamment par diminution

de la fraction d'éjection. La dysfonction endothéliale est quant à elle reflétée par une altération majeure de la dilatation dépendant du flux (*flow-mediated dilatation*, FMD) associée à une augmentation significative des taux de P-eiF2 α et de GRP78 dans les artères mésentériques. Le traitement *per os* des souris par le 4-PBA permet d'améliorer significativement la fraction d'éjection, de prévenir l'altération de la FMD et de limiter l'expression protéique des facteurs du SRE dans les artères mésentériques témoignant de l'implication du SRE dans la dysfonction cardiovasculaire septique (en cours de publication).

8. La dysfonction d'organe au cours du sepsis

a. Dysfonction respiratoire

Les atteintes pulmonaires sont la conséquence directe de la dysfonction cardiovasculaire. Elles sont décrites par des dommages alvéolaires diffus responsables de l'hypoxie, un infiltrat pulmonaire bilatéral associé à un œdème pulmonaire et une anomalie des rapports de ventilation et perfusion ¹⁰⁹. Dans les formes les plus sévères, un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) apparaît avec une mortalité hospitalière atteignant les 40% rendant nécessaire la compréhension des mécanismes impliqués et la mise en place de thérapeutique ¹¹⁰. Dans une étude expérimentale, les auteurs montrent que l'administration intratrachéale de LPS chez des souris induit une altération pulmonaire se manifestant par une élévation des taux de neutrophiles, de macrophages et de lymphocytes et par une augmentation du score de lésions tissulaires pulmonaires ¹¹¹.

b. Dysfonction hépatique

Le foie joue un rôle central dans la pathogenèse du sepsis. Il intervient dans la clairance bactérienne, la production de protéines ou de cytokines et dans l'adaptation métabolique à l'inflammation. La dysfonction hépatique se traduit par une hypoxie hépatique, une cholestase hépatique conséquence d'un métabolisme biliaire altéré et une défaillance hépatocellulaire conséquence de l'inflammation excessive ¹¹². Les cellules de Kupffer, macrophages résidents localisés au contact des cellules endothéliales et des hépatocytes, sont fortement impliquées dans la dysfonction hépatique septique. Ces cellules produisent en présence de LPS des cytokines pro-inflammatoires, des ERO et du NO impliqués dans la dysfonction endothéliale et hépatique ^{113,114}. La dysfonction hépatique se révèle un excellent marqueur pronostic dans l'évolution du sepsis et sur la mortalité. Dans une étude clinique, la bilirubine, marqueur de la dysfonction hépatique est significativement augmentée chez les patients ne survivant pas au sepsis ¹¹⁵. Dans une autre étude, l'augmentation de la rigidité hépatique témoignant des dommages hépatiques (cholestase, marqueurs de fibrose) apparaît comme un facteur prédictif de mortalité chez les patients en sepsis ¹¹⁶.

c. Dysfonction intestinale

La dysfonction intestinale lors du sepsis se caractérise par une diminution de la fonction de barrière et une augmentation de la translocation bactérienne. La translocation bactérienne et endotoxinique est effectuée *via* le système porte et le transport de cytokines pro-inflammatoire par le système lymphatique mésentérique. Ces voies de transport intestinales majorent l'infection et l'état inflammatoire systémique ¹¹⁷. Une étude réalisée au sein de notre laboratoire montre que l'injection de LPS stimule la production de cytokines pro-inflammatoires, de molécules d'adhésion, de lactates et d'ERO dans l'intestin et les poumons. Un pré-conditionnement ischémique induit par ischémie/reperfusion de l'artère mésentérique des animaux permet de limiter l'inflammation systémique, la production de lactate et l'atteinte intestinale et pulmonaire ¹¹⁸. Une autre étude de notre laboratoire montre qu'un pré-traitement avec des acides gras ω 3 poly-insaturés permet de limiter la dysfonction cardiaque grâce au maintien de la fonction de barrière intestinale par préservation des occludines, protéines des jonctions serrées intestinales, dans un modèle endotoxinique murin ¹¹⁹. Ces résultats démontrent en partie le rôle central de l'intestin dans la régulation de la réponse inflammatoire et l'apparition de défaillances multi-viscérales. Le développement de traitements susceptibles d'améliorer la circulation splanchnique et de prévenir la souffrance intestinale est un objectif majeur de prise en charge.

d. Dysfonction rénale

La dysfonction endothéliale caractérisée par une vasoplégie majeure est responsable de la diminution du flux sanguin rénal et de la filtration glomérulaire. La production de cytokines pro-inflammatoires, de caspases ou d'ERO sont responsables des lésions histologiques cellulaires et tissulaires à l'origine de l'obstruction tubulaire. L'ensemble de ces mécanismes va conduire à une insuffisance rénale aiguë ^{120,121}. L'atteinte rénale aiguë amplifie l'atteinte pulmonaire par augmentation de l'infiltration neutrophilaire, augmentation de la perméabilité vasculaire, dérégulation du transport hydrique et expression de cytokines ¹²⁰. De même, la dysfonction rénale majore l'atteinte cardiaque par augmentation de la production des cytokines pro-inflammatoires cardiaques et d'ERO à l'origine d'une atteinte systolique majeure ¹²².

e. Atteinte encéphalique

La physiopathologie de l'atteinte encéphalique est complexe et met en jeu plusieurs mécanismes : une diminution de la perfusion cérébrale, une augmentation du processus neuro-inflammatoire avec une activation de l'endothélium cérébral et une altération de la fonction de

barrière hémato-encéphalique¹²³. Les troubles métaboliques et notamment l'hyperglycémie septique sont fortement impliqués dans la pathogenèse de l'atteinte encéphalique. En effet, dans une étude clinique, il a été montré une apoptose neuronale liée à l'augmentation de l'expression de NOSi et à l'hyperglycémie par une altération des Transporteurs du Glucose 5 (GLUT-5)¹²⁴.

II – Réponse métabolique au sepsis : métabolisme glucidique et insulinique et rôle de la glucotoxicité dans le sepsis

1. La voie de signalisation de l'insuline

a. L'insuline

Le pancréas est un organe jouant un rôle essentiel dans l'homéostasie insulinique et glucidique. Cet organe est composé des îlots de Langerhans constituant la glande endocrine du pancréas et contenant les cellules α et les cellules β qui synthétisent deux hormones essentielles : l'insuline et le glucagon. L'insuline est une hormone peptidique produite par les cellules β des îlots de Langerhans et codée par un gène séquencé en 1980 ¹²⁵. Elle est synthétisée sous la forme d'un précurseur appelé pré-pro-insuline, ensuite exportée vers le réticulum endoplasmique pour être clivée en pro-insuline, elle-même transportée vers l'appareil de Golgi où se poursuit le clivage en insuline. Les cellules β constituent donc des réserves contenant l'insuline et dont la sécrétion est directement régulée par les modifications de concentration de glucose sanguin. L'insuline a pour rôle de diminuer la glycémie *via* différents mécanismes : entrée du glucose dans les cellules, transformation du glucose en glycogène (glycogénogenèse), activation de la glycolyse et transformation du glucose en lipides et en protéines. L'absence ou l'excès d'insuline sont à l'origine de nombreuses pathologies. Le glucagon est sécrété par les cellules α des îlots de Langerhans et augmente la glycémie par transformation du glycogène en glucose (glycogénolyse), ainsi que la production du glucose *via* les protéines.

b. Récepteur à l'insuline et tissus cibles

Après sécrétion par les cellules β pancréatiques, l'insuline se fixe sur son récepteur à l'insuline (RI). Ce récepteur appartient à la super-famille des récepteurs à activité tyrosine kinase transmembranaires ¹²⁶. Le RI est une glycoprotéine de 400 kDa composée de deux paires de sous-unités. Les deux sous-unités α extracellulaires (de 120 kDa chacune) sont à la surface membranaire et permettent la fixation de l'insuline *via* un site de liaison présent sur chaque sous-unité. Les deux sous-unités β transmembranaires (de 80 kDa chacune) ont une activité enzymatique de protéine kinase. L'ensemble de ces 4 sous-unités est relié par des ponts disulfures et forme un hétérotétramère $\alpha_2\beta_2$ ¹²⁷⁻¹²⁹ (figure 11). Le RI est présent à la membrane des tissus insulino-sensibles tels que le muscle, le tissu adipeux et le foie ¹³⁰. Le RI est présent dans l'organisme sous deux isoformes distincts : le RI-A et le RI-B. Ces deux types sont issus d'un phénomène d'épissage de l'exon 11 du gène codant pour le RI. Les RI-A et RI-B présentent des affinités différentes pour leurs substrats que sont l'insuline et l'*Insulin-like Growth Factor-1* et 2 (IGF-1 et IGF-2) ¹³¹. L'équipe de Frasca *et al.* a montré que l'isoforme du RI-A présente une haute affinité pour lier l'IGF-2 ¹³². Il existe deux autres récepteurs identifiés

présentant 80% d'homologie avec le RI : l'*Insulin-like Growth Factor-1 receptor* (IGF-1 R) et l'*Insulin-receptor related* (IRR) ¹³³. Ces structures représentent des récepteurs potentiels pour l'insuline, de même que le RI est un récepteur potentiel de l'IGF-1. Ainsi, l'IGF-1 présente une affinité de 100 à 1000 fois plus faible que la liaison de l'insuline ¹³⁴.

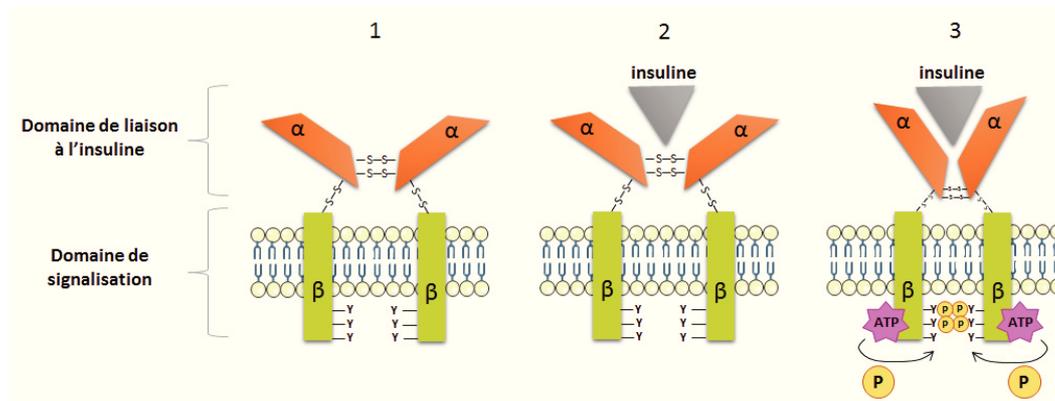


Figure 11 : Structure détaillée du récepteur à l'insuline (RI) dans ses différentes configurations.

- (1) Le RI non activé est composé de deux sous-unités α reliées entre elles par deux ponts disulfures et deux sous-unités β reliées aux sous-unités α par un pont disulfure.
- (2) Le domaine de liaison à l'insuline constituée par les sous-unités α reçoit son substrat : l'hormone peptidique insuline.
- (3) La fixation de l'insuline sur son RI entraîne un changement de conformation de l'ensemble du RI. Le domaine de signalisation formé par les sous-unités β recrute alors des molécules d'ATP permettant l'auto-phosphorylation des résidus tyrosine des sous-unités β .

c. Initiation et transmission du signal insulinique

Physiologiquement, le signal insulinique est initié par la liaison de l'insuline aux sous-unités α extra-cellulaires du RI entraînant un changement de conformation des sous-unités α et β . Ce changement de conformation permet la liaison de l'ATP aux sous-unités β transmembranaires et l'activation de l'auto-phosphorylation des résidus tyrosine présents dans les sous-unités β (figure 11). Trois principaux groupes de résidus tyrosine sont mis en jeu, essentiels pour promouvoir l'activité du RI ^{135,136}. En effet, des études ont montré que la mutation de la tyrosine 1162 entraîne une diminution significative de l'activité kinase¹³⁷ induite par l'insuline pouvant être à l'origine de l'apparition de désordres métaboliques tels qu'un diabète de type 2 (DT2) ^{137,138}, de cancers ou de maladies cardiovasculaires ¹³⁹. Lorsque l'auto-phosphorylation des résidus tyrosine est réalisée, le RI est activé et les mécanismes de phosphorylation ont alors lieu sur les tyrosines de protéines substrats. Neuf substrats intracellulaires communs au RI et au IGF-1-R sont identifiés dont 4, IRS-1 à 4 (*Insulin Receptor Substrate* 1 à 4) appartiennent à la famille des IRS ¹⁴⁰⁻¹⁴². Les principaux représentants sont IRS-1 et IRS-2 jouant un rôle essentiel dans la signalisation de l'insuline. Ces IRS ont pour but, après activation du RI et phosphorylation, de stimuler les voies de signalisation en aval. L'une des principales voies de signalisation insulinique est la voie *Phosphatidyl-Inositol 3 kinase/Protéine kinase B* (PI3k/Akt) mais il existe également d'autres voies de signalisation stimulées par la fixation de l'insuline sur le RI et

mettant en jeu d'autres substrats intracellulaires que les IRS, telles que la voie des MAPK. L'ensemble de ces deux voies sera détaillé dans les parties suivantes.

i. Voie PI3k/Akt

La voie PI3k/Akt est la voie principale de signalisation insulínique. Lorsque le résidu IRS-1 est phosphorylé, la sous-unité régulatrice p85 de PI3K se lie à l'IRS et se trouve à son tour phosphorylée. De nombreuses études ont montré que la PI3K est une molécule clé de la voie de signalisation insulínique. En effet, l'inhibition de cette molécule par la wortmannine entraîne une abolition des réponses cellulaires mises en place par la liaison de l'insuline sur le RI^{143,144}. La sous-unité catalytique p110 de PI3K joue alors le rôle de substrat pour le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate membranaire (PIP2) entraînant sa conversion en phosphatidylinositol-3,4,5-phosphate (PIP3)¹⁴⁵. Le PIP3 recrute alors le *phosphoinositide-dependent protein kinase-1* (PDK1) qui phosphoryle à son tour Akt. Il existe également une phosphoinositide-dependent protein kinase-2 (PDK2) capable elle aussi de phosphoryler Akt¹⁴⁵. Une fois l'Akt phosphorylée et donc activée, de nombreuses réponses cellulaires sont mises en place par phosphorylation de molécules intracellulaires. Concernant les réponses cellulaires impliquées dans l'expression génique ou la transcription, on peut citer le rôle bloquant de Akt sur le facteur de transcription Forkhead (FKHR) qui, par phosphorylation, entraîne le maintien de FKHR dans le cytosol afin d'empêcher la transcription de gènes impliqués dans la néoglucogénèse¹⁴⁶. À côté de ces effets, s'ajoutent les réponses cellulaires impliquées dans le métabolisme. Ainsi, nous pouvons citer le rôle d'Akt sur la synthèse protéique *via* l'activation de la p70 ribosomal S6 kinases (p70^{rsk})¹⁴⁷ ou sur la synthèse du glycogène *via* l'activation de la glycogène synthase 3 kinase (GSK3)¹⁴⁸. Il est à noter qu'Akt possède d'autres effets notamment anti-lipolytiques ou anti-apoptotiques non détaillés dans ce paragraphe (figure 12).

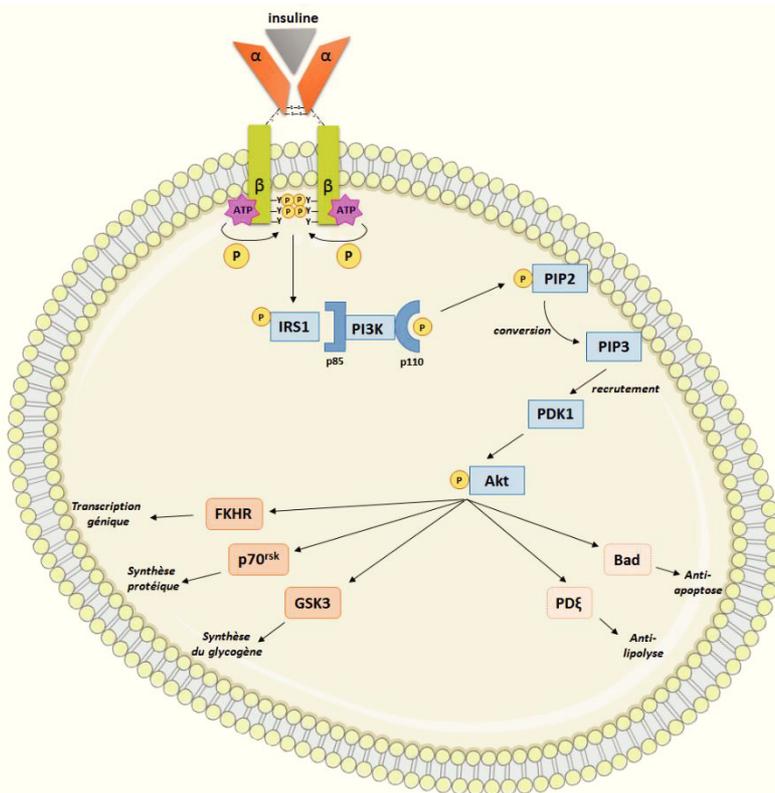


Figure 12 : Voie de signalisation PI3K/Akt dépendante de l'insuline.

Suite à l'auto-phosphorylation des résidus tyrosine des sous-unités β , le résidu intracellulaire IRS-1 est phosphorylé entraînant sa fixation à la sous-unité régulatrice p85 de PI3K phosphorylée. À son tour, la sous-unité p110 de PI3k va phosphoryler son substrat membranaire PIP2 entraînant sa conversion en PIP3. Le PIP3 recrute alors la PDK1 qui phosphoryle à son tour la protéine kinase B (Akt). Akt active par phosphorylation de nombreuses réponses cellulaires : sur le facteur de transcription FKHR qui possède un rôle dans la transcription génique, sur p70^{rsk} jouant un rôle dans la synthèse protéique ou sur GSK3 impliquée dans la synthèse du glycogène.

ii. Voie MAPK

La voie MAPK est une voie de signalisation insulínique secondaire mettant en jeu des protéines différentes de la voie PI3K/Akt. Lorsque l'auto-phosphorylation des résidus tyrosine est réalisée sur les sous-unités β , le RI est activé et recrute les protéines adaptatrices *src homologous and collagen protein* (SHC). Les protéines SHC ont pour substrat la *Growth factor receptor-bound protein 2* (Grb2) qui lorsqu'elle est reconnue, active à son tour le facteur d'échange nucléotidique *Son of Sevenless* (SOS). SOS active la petite protéine G Ras qui active elle-même Raf qui va phosphoryler la MAP kinase kinase MKK responsable de la phosphorylation donc de l'activation de MAPK¹⁴⁹. La voie MAPK peut aussi être activée *via* la phosphorylation des IRS qui de la même manière, vont recruter Grb2 et aboutir à la même finalité. La MAPK une fois phosphorylée et activée peut stimuler la kinase p90^{rsk} impliquée dans la synthèse de protéines mises en jeu dans les phénomènes de prolifération et de différenciation cellulaires (figure 13). Des études ont montré l'importance et la nécessité de chacun des acteurs protéiques de la voie MAPK dans la finalité du signal insulínique¹⁵⁰.

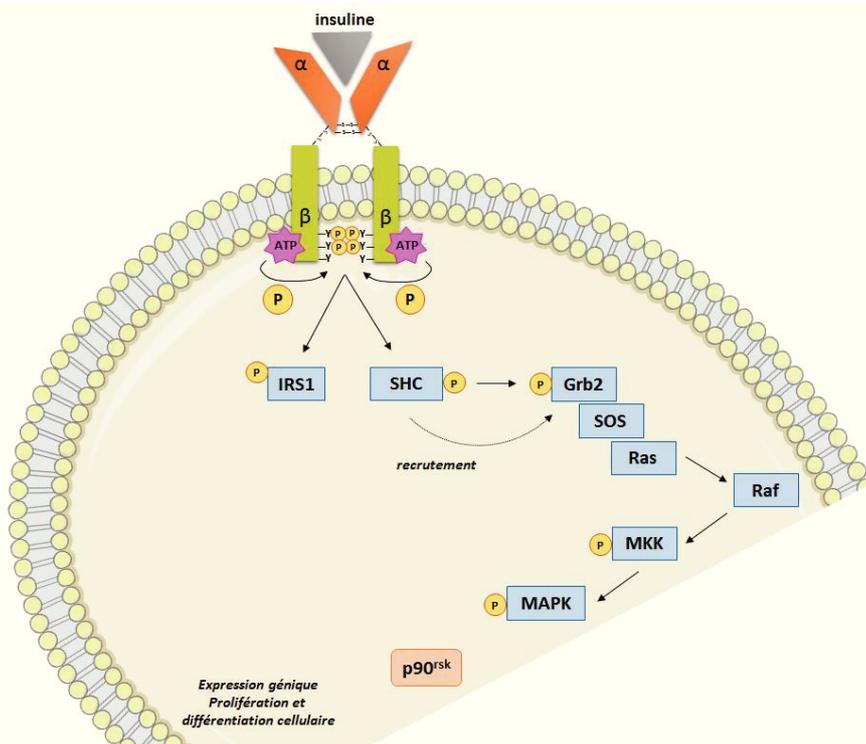


Figure 13 : Voie de signalisation MAPK dépendante de l'insuline.

Suite à l'auto-phosphorylation des résidus tyrosine des sous-unités β , IRS-1 ou les protéines adaptatrices SHC sont recrutées et phosphorylées. Leur substrat Grb2 active SOS. SOS active la petite protéine G Ras qui stimule elle-même Raf qui va phosphoryler la MAP kinase MKK responsable de la phosphorylation de MAPK. Une fois activée, MAPK peut stimuler la kinase p90^{rsk} impliquée dans la synthèse de protéines.

d. Transporteur du glucose 4 (GLUT-4) et autres transporteurs du glucose (GLUTs)
 i. Famille des GLUTs : structure, fonction et localisation

Les transporteurs du sucre ou des polyols ont pour but de faciliter le transport de ces molécules à travers les membranes cellulaires. Il s'agit d'un transport facilité dépendant du gradient de concentration entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule et ne nécessitant pas d'apport énergétique sous forme d'ATP ou d'ions H^+ ¹⁵¹. Les GLUTs possèdent une structure similaire entre eux composée de 12 segments transmembranaires et d'un domaine intracellulaire constitué de 4 hélices ¹⁵². À ce jour, onze protéines facilitatrices de l'entrée de glucides et deux protéines facilitatrices de l'entrée d'autres sucres ou polyols sont recensées. Ces GLUTs peuvent être répartis en trois classes distinctes :

- Classe I : regroupe les GLUTs permettant le transport du glucose au travers des membranes plasmiques. Cette classe comprend les GLUT-1 à 4.
- Classe II : regroupe le GLUT-5 permettant le transport du fructose au travers des membranes cellulaires et les protéines associées, GLUT-7, GLUT-9 et GLUT-11.
- Classe III : regroupe les GLUTs présentant une absence du site de glycosylation dans le premier domaine extracellulaire remplacé par la présence d'un site semblable sur la boucle 9. Les GLUT-6 et 8 présentent une activité de transporteur de glucose. Le H^+ /myo-inositol co-transporter (HMIT1) est quant à lui transporteur du myo-inositol. On trouve aussi dans cette classe les GLUTs-10 et 12 ¹⁵³.

Les GLUTs présentent des spécificités d'organes variées ¹⁵³. Les GLUT-1 sont exprimés dans le placenta, dans les érythrocytes et au niveau des micro-vaisseaux sanguins cérébraux. Les GLUT-2 se trouvent au niveau du foie et des îlots de Langerhans du pancréas. Les GLUT-3 s'expriment au niveau du cerveau et les GLUT-4 sont quant à eux exprimés dans le foie, le muscle squelettique et cardiaque et le tissu adipeux. De même, comme nous l'avons évoqué précédemment, les GLUTs possèdent une spécificité de substrat. Cependant, des études ont montré que les GLUTs pouvaient transporter une autre molécule que le substrat spécifique. Ainsi, les GLUT-1 et 3 sont capables de transporter du galactose et le GLUT-2 peut transporter du fructose ¹⁵⁴.

Le transport, la régulation et le mode d'action du GLUT-4 seront discutés dans les paragraphes suivants.

ii. Exocytose du Transporteur du glucose 4

Comme nous l'avons vu précédemment, le GLUT-4 constitue le transporteur majoritaire du glucose dans les tissus insulino-sensibles et la voie PI3k/Akt joue un rôle essentiel dans les effets métaboliques de l'insuline. L'exocytose de la vésicule de GLUT-4 se déroule en trois parties que sont la migration, le ciblage et la fusion ¹⁵⁵. La protéine Akt peut phosphoryler et activer des protéines kinase C (PKC) atypiques telles que PKC λ et PKC ζ capables de lever le signal de rétention des vésicules situées dans l'appareil de Golgi contenant les transporteurs du glucose 4 (GLUT-4). Ces vésicules vont se déplacer dans la cellule grâce au réseau de filaments d'actine préalablement polymérisés par la voie de signalisation annexe *c-Cbl associated protein/Cbl* (CAP/Cbl) dépendante de l'insuline ¹⁵⁶. Le déplacement des vésicules met en jeu la protéine motrice Myo1c ¹⁵⁷. Afin que les vésicules soient correctement ciblées à la membrane, un système de reconnaissance vésicule/membrane *v-snare/t-snare* (*vesicule* ou *target soluble NSF attachment protein*) est mis en place. La vésicule porte le *v-snare vesicule associated membrane protein-2* (VAMP-2) qui reconnaît les *t-snare* syntaxine 4 et SNAP23 situés à la membrane permettant ainsi le phénomène d'exocytose des vésicules associant la fusion de la vésicule à la membrane et la disposition des transporteurs GLUT-4 à la membrane. La présence de protéines régulatrices telles que Munc18 et Sec1 sont nécessaires aux événements d'ancrage et de fusion des vésicules de GLUT-4 à la membrane ^{158,159} (figure 14).

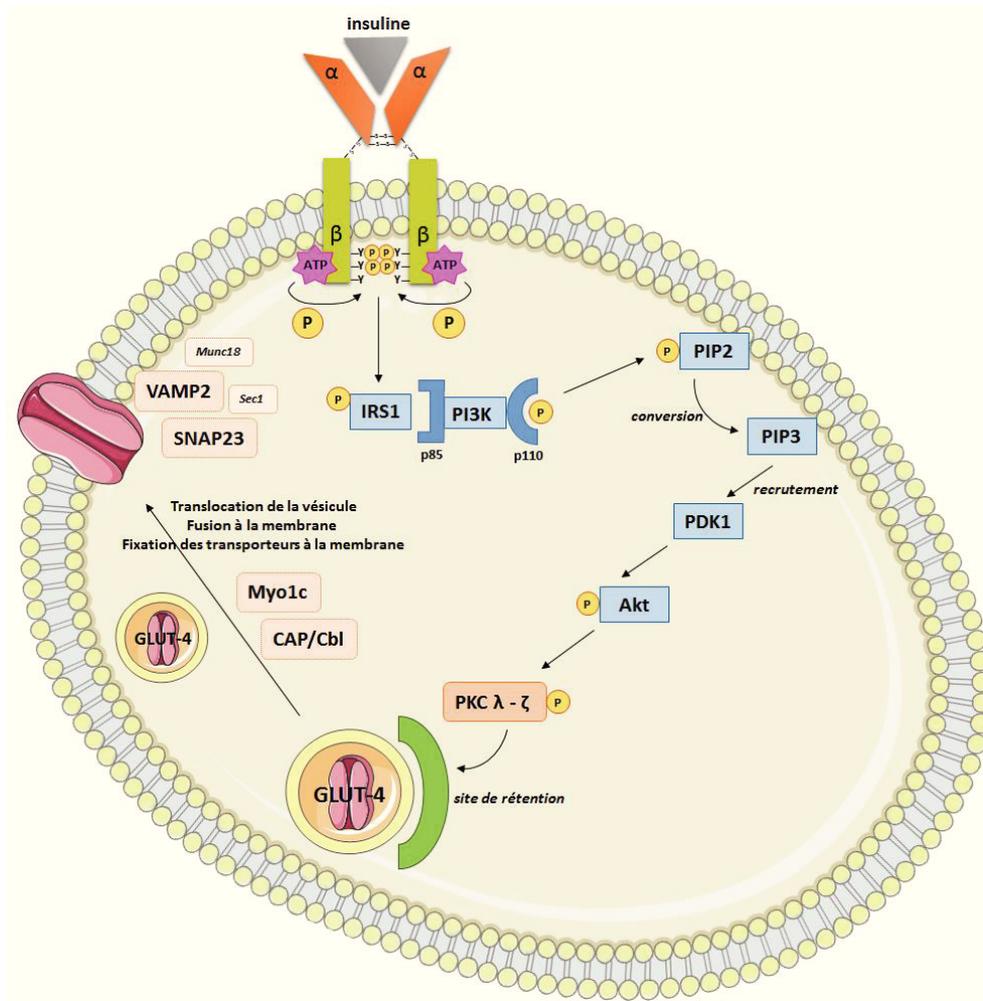


Figure 14 : Exocytose du Transporteur du Glucose 4 (GLUT-4) via l'activation de la voie IR/PI3K/Akt : migration, ciblage et fusion à la membrane.

Migration : La protéine Akt active les PKC λ et ζ capables de lever le signal de rétention des vésicules situées dans l'appareil de Golgi contenant les GLUT-4. Les vésicules se déplacent dans la cellule avec l'aide de la protéine motrice Myo1c et grâce au réseau de filaments d'actine préalablement polymérisés par la voie de signalisation CAP/Cbl dépendante de l'insuline.

Ciblage : Un système de reconnaissance *v-snare/t-snare* est mis en place. La vésicule porte le *v-snare* VAMP-2 qui reconnaît les *t-snare* syntaxine 4 et SNAP23 situés à la membrane.

Fusion : La reconnaissance permet l'exocytose des vésicules à la membrane. Les protéines régulatrices telles que Munc18 et Sec1 jouent un rôle essentiel dans la fusion des vésicules de GLUT-4 à la membrane.

iii. Régulation par l'insuline et mode d'action des GLUTs-4

Comme nous l'avons vu précédemment, l'insuline joue un rôle essentiel dans le métabolisme énergétique notamment *via* la voie PI3k/Akt/GLUT-4. En effet, cette voie de signalisation permet un recrutement efficace des GLUTs-4 à la membrane nécessaire à l'absorption de glucose.

Le système de reconnaissance vésicule/membrane *v-snare/t-snare* possède un rôle fonctionnel essentiel à l'absorption du glucose stimulée par l'insuline. En effet, le traitement d'adipocytes à la toxine botulique D ou au glutathion S transférase entraîne un clivage de VAMP-2 empêchant l'insuline de stimuler la translocation de GLUT-4 à la membrane. Cette *v-snare* est

nécessaire à la fusion de la vésicule de GLUT-4 à la membrane ¹⁶⁰. Dans une autre étude, les auteurs montrent le rôle essentiel de la protéine *actin cytoskeleton-regulating GTPase 1* (Rac1) dans la régulation de l'absorption de glucose par les GLUTs-4 induite par l'insuline *via* un effet sur le cytosquelette d'actine permettant le déplacement de la vésicule de GLUT-4 à la membrane. Les auteurs montrent de la même manière que l'expression de la protéine Rac1 est significativement diminuée chez des souris ou des patients présentant une insulino-résistance ¹⁶¹. L'étude de Bakke *et al.* met en évidence le rôle de la protéine tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) dans la régulation de l'exocytose des GLUT-4. En effet, ces travaux présentent la protéine régulatrice Munc18c comme un nouveau substrat de PTP1B avec un rôle de PTP1B sur la fonction de Munc18c par phosphorylation des tyrosine ¹⁶². Cette étude montre que la phosphorylation par PTP1B de Munc18c sur les résidus tyrosines est essentielle pour l'absorption du glucose stimulée par l'insuline.

Il est important de considérer que l'exocytose des GLUTs-4 est aussi régie par un mécanisme indépendant de la voie de signalisation de l'insuline. En effet, l'exercice physique entraîne une modification de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} et une modification du ratio AMP/ATP activant de nombreuses cascades de signalisation. Citons la protéine calmoduline et la voie de l'*AMP-activated protein kinase* (AMPK) impliquées dans la translocation des GLUTs-4 à la membrane lors de l'exercice physique. L'ensemble de ce mécanisme, bien que considéré, ne sera pas détaillé dans cet état de l'art ¹⁶³.

2. La voie de signalisation de l'AMP-activated protein kinase (AMPK)

L'AMPK, tout comme l'insuline, est un régulateur central de l'homéostasie énergétique. Cette protéine, jouant un rôle physiologique essentiel dans la balance métabolique et possédant une structure particulière, est finement régulée dans l'organisme. L'ensemble de ces différents points sera discuté dans la partie suivante.

a. Structure, activation et régulation

i. Structure

L'AMPK est une protéine sérine/thréonine hétérotrimérique composée d'une sous-unité α catalytique et de deux sous-unités β et γ régulatrices, toutes présentant plusieurs isoformes différentes permettant la formation théorique de 12 hétérotrimères $\alpha\beta\gamma$ différents ¹⁶³⁻¹⁶⁶. L'AMPK est une protéine extrêmement conservée dont la séquence est présente chez tous les eucaryotes dont le génome est séquencé à ce jour ¹⁶⁷. La complexité de cette protéine associant des combinaisons

différentes d'hétérotrimères et son ubiquité témoignent du rôle essentiel de cette protéine dans la balance homéostatique.

ii. *Activation et régulation*

L'AMPK, sensible aux taux d'ATP intracellulaire, est activée en réponse à une diminution de ce taux donc à l'augmentation du ratio AMP/ATP faisant intervenir l'enzyme adénylate cyclase¹⁶⁸. Ainsi, l'AMP va stimuler allostériquement l'AMPK alors que l'ATP va l'inhiber de manière compétitive. Ces nucléotides intracellulaires représentent donc des régulateurs de l'AMPK. L'AMP se fixe alors sur le domaine *cystathionine beta synthase* (CBS) de la sous-unité γ entraînant l'activation de l'AMPK par deux *AMPK kinase* (AMPKK), la protéine *Liver Tumor Suppressor kinase* (LKB1) et la protéine *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-b* (CaMKK β), qui phosphorylent le résidu Thréonine 172 de la sous-unité α de l'AMPK^{169,170}. Le mécanisme d'action de ces deux AMPKK est cependant différent puisque LKB1 est constitutivement active et phosphoryle AMPK lors d'une modification du ratio AMP/ATP, alors que CaMKK β active AMPK suite à une élévation intracellulaire de Ca²⁺¹⁷¹⁻¹⁷³. L'AMPK peut aussi être activée en réponse à l'exercice physique mais aussi à d'autres agents, tels que le stress hyperosmotique ou la metformine (anti-diabétique) n'entraînant pas de modification du ratio AMP/ATP¹⁷⁴ (figure 15). Une fois activée, l'AMPK phosphoryle de nombreux substrats permettant une régulation fine de nombreuses voies de signalisation.

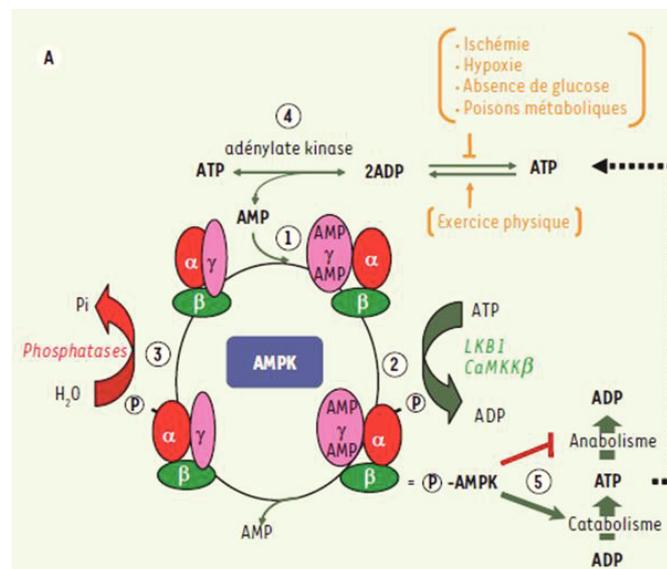


Figure 15 : Activation et régulation de l'AMPK.

(1) L'AMP stimule allostériquement l'AMPK et se fixe sur le domaine CBS de la sous-unité γ d'AMPK.

(2) Cette liaison entraîne l'activation de l'AMPK par deux AMPKK, LKB1 et CaMKK β , qui phosphorylent le résidu thréonine 172 de la sous-unité α de l'AMPK.

(5) Une fois activée, l'AMPK produit de l'ATP afin de restaurer l'homéostasie énergétique de la cellule. Ainsi, l'AMPK va d'une part, bloquer l'anabolisme et d'autre part, stimuler le catabolisme.

Figure issue de Foretz, *Med Sci*, 2006¹⁶⁶.

b. Rôles physiologiques de l'AMPK

Une fois activée, l'AMPK a pour finalité la production de l'ATP afin de restaurer l'homéostasie énergétique de la cellule. Ainsi, l'AMPK va d'une part, bloquer l'anabolisme, soit les voies de biosynthèse entraînant une consommation d'ATP et d'autre part, stimuler le catabolisme, soit les voies de signalisation permettant une synthèse d'ATP ¹⁷⁵ (figure 15). L'ensemble du paragraphe suivant décrira les différents effets et rôles de l'AMPK.

i. Effets de l'AMPK sur la transcription et la traduction

Les effets de l'AMPK sur le métabolisme énergétique ont des répercussions à long terme avec des modifications de l'expression génique et de l'expression protéique (figure 16). En effet, il a été montré que sur des hépatocytes de rats en culture, le glucose entraîne la transcription de gènes de la synthèse des acides gras (AG). Après incubation avec le 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranosyl (AICAR), activateur de l'AMPK, les auteurs observent une réduction de l'expression de ces mêmes gènes. Ces études démontrent l'implication de l'AMPK dans la régulation transcriptionnelle des gènes impliqués dans le métabolisme énergétique ^{176,177}. Aussi, d'autres études ont montré que l'administration *in vivo* d'AICAR chez des rats entraîne une augmentation des enzymes mitochondriales, d'autres enzymes impliquées dans le métabolisme glucidique et lipidique, de certaines protéines spécifiques et de GLUT-4 dans différents muscles squelettiques. Ces résultats démontrent le rôle d'AMPK dans l'expression des protéines impliquées dans l'absorption du glucose et dans la contraction musculaire ^{178,179}.

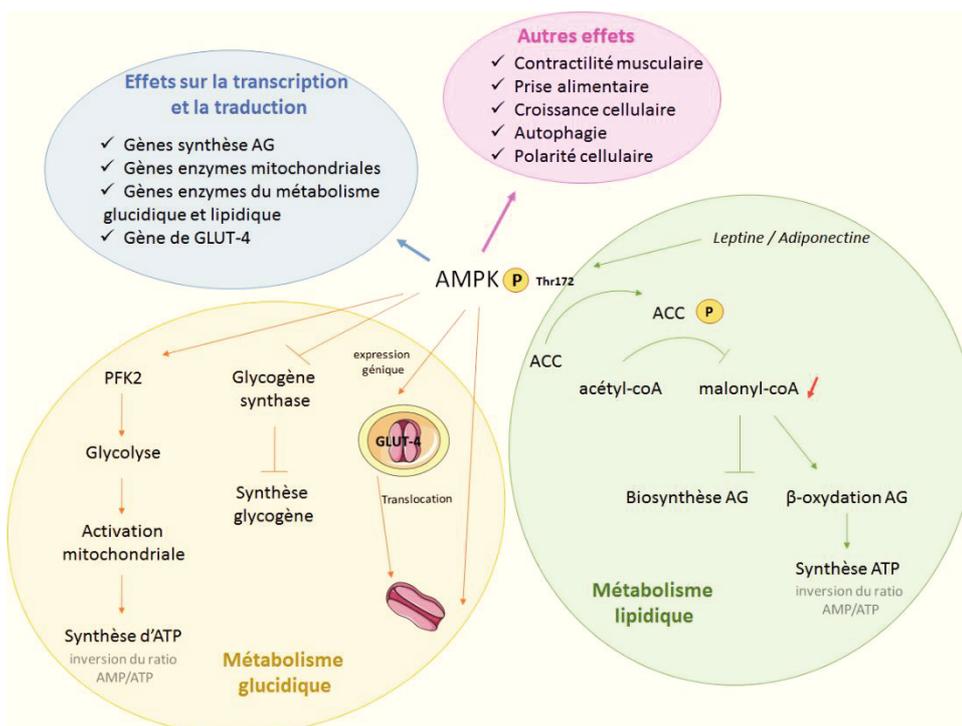


Figure 16 : Vue générale de l'ensemble des effets et rôles de l'AMPK.

L'activation de l'AMPK entraîne des effets à long terme avec des modifications de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme glucidique. L'AMPK est également impliqué dans le contrôle du métabolisme glucidique et lipidique. Enfin, il existe d'autres effets de l'AMPK sur la contractilité musculaire, dans la régulation de la prise alimentaire, dans la croissance cellulaire, la polarité cellulaire ou l'autophagie.

ii. Rôles d'AMPK sur le métabolisme énergétique

L'AMPK est impliquée dans le contrôle du métabolisme du glucose et des lipides ^{166,180}. Concernant le métabolisme lipidique, l'AMPK inactive par phosphorylation l'acétyl-coA carboxylase (ACC), enzyme responsable de la transformation de l'acétyl-coA en malonyl-coA, première réaction de synthèse des AG dans le foie et le tissu adipeux ¹⁸¹. Ainsi, l'AMPK inhibe la biosynthèse des AG ¹⁸². Suite à l'action de l'AMPK, la diminution de la concentration cytosolique en malonyl-coA entraîne une absorption des AG par la mitochondrie facilitant ainsi leur dégradation par la β -oxydation et la production d'ATP. À ce mécanisme s'ajoute l'action des deux hormones leptine et adiponectine, connues pour leurs rôles dans la prise alimentaire et dans la dépense énergétique et pour leurs fonctions neuro-endocrines. Ces hormones, sécrétées par les adipocytes, ont pour rôle d'activer l'AMPK dans le muscle squelettique et le foie stimulant ainsi la β -oxydation et l'absorption de glucose au niveau du muscle squelettique ^{183,184}. De nombreux auteurs ont étudié le rôle d'AMPK dans différentes pathologies. Ainsi l'étude de Kudo *et al.* montre que l'activation de l'AMPK durant l'ischémie cardiaque, entraîne une inactivation par phosphorylation de l'ACC avec diminution des concentrations de malonyl-coA favorisant la β -oxydation durant la reperfusion des cœurs ischémiques ¹⁸⁵. Dans un autre contexte, l'activation de l'AMPK par AICAR induit une amélioration de l'action de l'insuline, associée à une diminution de la concentration de malonyl-coA et à une augmentation de la β -oxydation, dans le foie et le muscle squelettique chez des rats soumis à un régime gras. Cette étude suggère le rôle d'AMPK dans la lipotoxicité ainsi que dans la physiopathologie de l'insulino-résistance (IR) et du DT2 ¹⁸⁶ (figure 16).

Concernant le métabolisme glucidique, l'AMPK possède plusieurs rôles essentiels dont le but est, comme nous l'avons évoqué, de restaurer le niveau d'ATP intracellulaire ¹⁸⁰. Cette enzyme phosphoryle et active la 6-phosphofructo-2-kinase (PFK2) entraînant une stimulation de la glycolyse puis une activation mitochondriale aboutissant à la production d'ATP et à la diminution du ratio AMP/ATP ¹⁸⁷. Aussi, plusieurs études ont montré l'action simultanée de l'AMPK permettant à la fois la translocation des GLUTs-4 permettant l'absorption du glucose dans la cellule et l'inhibition par phosphorylation de la glycogène synthase entraînant une diminution de la synthèse de glycogène ^{188,189}. Ces actions combinées suggèrent dans les différentes études l'intérêt de cibler l'AMPK dans les troubles diabétiques ou d'IR. Concernant le lien entre AMPK et insuline, l'étude de Gamble et Lopaschuk a montré que l'administration de doses croissantes d'insuline sur des cœurs isolés perfusés de rats permet une diminution des taux d'oxydation des AG, une diminution de l'activité d'AMPK et une augmentation de l'activité de l'ACC. L'insuline est donc capable d'inhiber la β -oxydation dans le cœur en inhibant l'AMPK et en stimulant l'ACC ¹⁹⁰. D'autres études sur des cœurs isolés perfusés de rats ont montré le lien direct entre les voies de signalisation de l'AMPK et d'Akt. En effet, l'activation

de la voie Akt par l'insuline entraîne une diminution de l'activité de l'AMPK par diminution du taux de phosphorylation sur la Thr172. L'ajout de metformine, antidiabétique agissant sur l'AMPK, permet de restaurer l'activité de l'AMPK, suggérant la capacité de l'insuline à inhiber l'AMPK *via* un mécanisme Akt-dépendant^{191,192}. Si l'insuline est capable d'agir sur l'AMPK, l'AMPK peut elle aussi agir sur l'insuline et notamment dans les cellules β -pancréatiques jouant un rôle dans la régulation de la synthèse et la sécrétion de l'insuline¹⁹³. Aussi, des études portant sur des animaux transgéniques avec délétion de la sous-unité $\alpha 2$ de l'AMPK (AMPK $\alpha 2^{-/-}$) montrent que les souris AMPK $\alpha 2^{-/-}$ présentent une augmentation significative de la glycémie à jeun et lors d'une épreuve de tolérance au glucose associée à une insulïnémie diminuée. De plus, l'absorption du glucose est significativement réduite lors d'une stimulation à l'insuline. Ces données démontrent la régulation de l'insuline par la sous-unité $\alpha 2$ de l'AMPK et montrent que l'absence de cette sous-unité contribue à l'apparition d'un DT2^{194,195} (figure 16).

iii. Effets de l'AMPK sur le métabolisme énergétique myocardique : cycle de Randle

En 1963, Randle *et al.* décrivent pour la première fois, à partir d'expériences réalisées sur le cœur isolé perfusé de rats, le cycle glucose acide-gras aujourd'hui appelé Cycle de Randle¹⁹⁶. Le Cycle de Randle, dans son postulat initial, montre que la présence d'AGL en excès entraîne une diminution de l'absorption et de l'utilisation du glucose. En effet, l'augmentation de la production d'AGL est associée à une accumulation de citrate entraînant une augmentation de la concentration de glucose-6-phosphate (G6P) par inhibition de l'enzyme phosphofructokinase. À son tour, le G6P inhibe l'hexokinase, entraînant une accumulation du glucose intracellulaire et ainsi, par une augmentation du gradient de concentration, une inhibition du transport du glucose par le GLUT-4 (figure 17)^{196,197}. Des études plus récentes ont en réalité montré que l'excès d'AGL perturbe également les mécanismes de transmission du signal insulinique¹⁹⁸. Ainsi, une nouvelle interprétation du Cycle de Randle est proposée. L'excès d'AGL entraîne l'accumulation d'intermédiaires métaboliques tels que l'acyl-coA ou le diacylglycérol (DAG)¹⁹⁹. Ces métabolites activent la PKC θ responsable de l'augmentation de la phosphorylation inhibitrice d'IRS sur ses résidus sérine et thréonine et de la diminution de la phosphorylation activatrice d'IRS sur ses résidus tyrosine. En résulte une diminution de l'activation de la voie PI3K entraînant un effondrement de la translocation des GLUTs-4 à la membrane et donc une baisse de l'absorption du glucose^{200,201} (figure 17). L'ensemble de ces théories témoigne du lien entre métabolisme glucidique et métabolisme lipidique en physiopathologie.

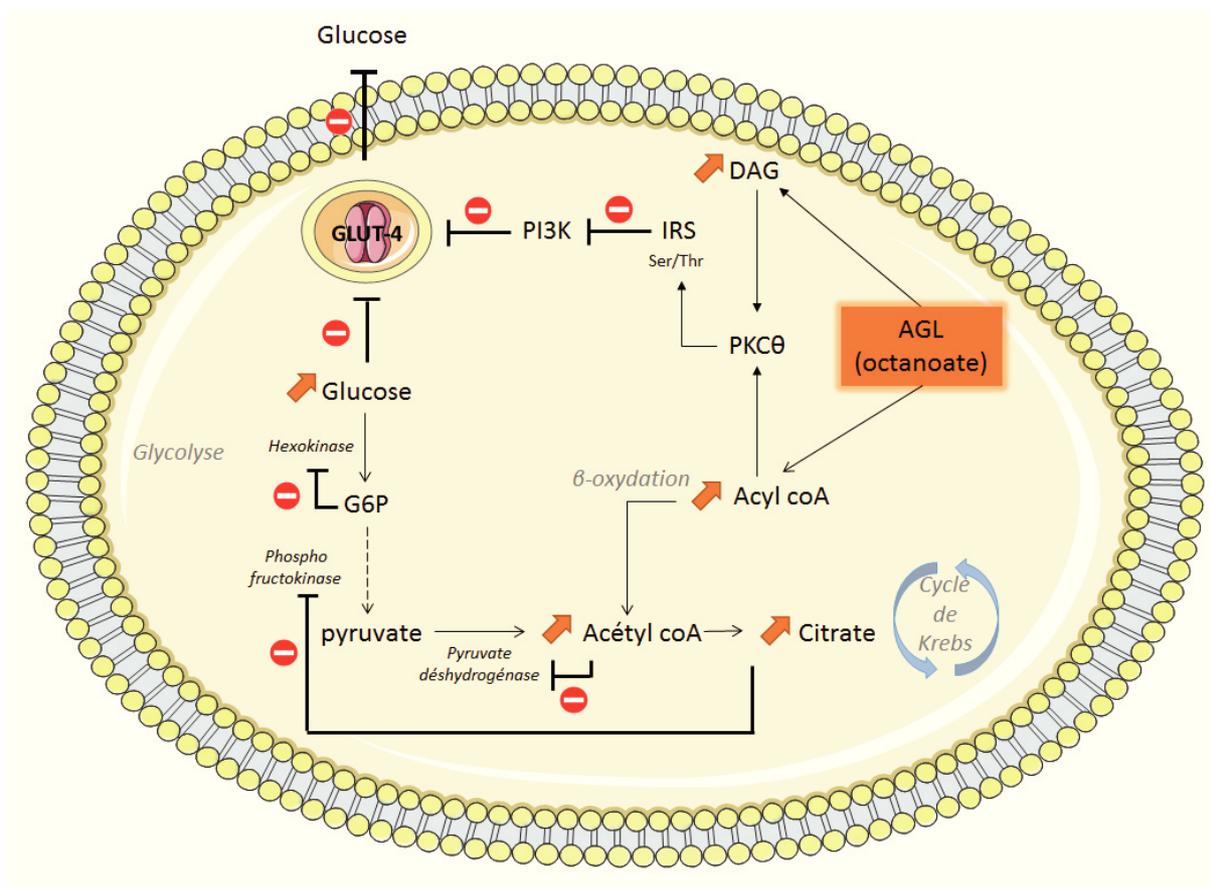


Figure 17 : Représentation schématique du Cycle de Randle.

Les AGL en excès entraînent une accumulation de citrate (via la β -oxydation) entraînant une augmentation de la concentration de G6P par inhibition de l'enzyme phosphofructokinase (intermédiaires de la glycolyse). Le G6P inhibe l'hexokinase, entraînant une accumulation du glucose intracellulaire et ainsi, par une augmentation du gradient de concentration, une inhibition du transport du glucose par le GLUT-4. De même, l'excès d'AGL entraîne l'accumulation d'intermédiaires métaboliques tels que l'acetyl-coA ou le diacylglycérol (DAG) qui activent la PKC θ responsable de l'inhibition d'IRS. En résulte une diminution de l'activation de la voie PI3K entraînant un effondrement de la translocation des GLUTs-4 à la membrane et donc une baisse de l'absorption du glucose.

Concernant le métabolisme myocardique, le cœur doit, pour assurer ses fonctions de contractilité, produire de l'ATP en grande quantité²⁰². Physiologiquement, on observe une oxydation des AG, substrats préférentiels du cœur à 70% (contre 30% pour le glucose), permettant la production d'ATP et l'inhibition de la glycolyse et de l'absorption du glucose comme le démontre le Cycle de Randle. Dans le cas d'une ischémie cardiaque, le cœur utilise le glucose comme substrat majoritaire. La glycolyse devient la seule voie métabolique de production d'ATP. L'AMPK stimule alors la translocation des GLUTs-4 et active la PFK2 afin d'augmenter la glycolyse et de faciliter l'absorption de glucose dans la cellule²⁰³. Lors de la reperfusion cardiaque, les AG deviennent à nouveau le substrat majoritaire du cœur. L'AMPK inactive alors l'enzyme ACC par phosphorylation aboutissant à l'oxydation des AG²⁰⁴. Lors d'un DT2, le cœur utilise les AG comme substrat majoritaire à 90% (contre 10% pour le glucose et le lactate)^{205,206}. L'étude de Sohn *et al.* montre que les souris déficientes en GLUT-4 au niveau myocardique présentent une altération de la séquence de propagation des potentiels d'action associée à une prolongation du temps d'activation de ces mêmes potentiels. Ainsi, les auteurs démontrent que la diminution de la biodisponibilité du glucose associée à une IR et une

diminution du transport par GLUT-4 entraînent une modification de l'activité électrique cardiaque avec la présence d'arythmies chez les sujets diabétiques ²⁰⁷.

Il est à noter que d'autres effets de l'AMPK existent, non discutés dans cet état de l'art, notamment sur la contractilité musculaire, dans la régulation de la prise alimentaire ainsi que dans la croissance cellulaire, la polarité cellulaire ou l'autophagie (figure 16).

3. Physiopathologie de l'insulino-résistance et de l'hyperglycémie dans le sepsis

L'insulino-résistance et l'hyperglycémie sont décrites comme des anomalies métaboliques majeures en réponse au processus inflammatoire et apparaissent comme des facteurs indépendants de morbi-mortalité au cours du sepsis. Les mécanismes responsables de l'apparition de ces troubles métaboliques sont nombreux et leurs conséquences sont délétères. Le paragraphe suivant discutera de l'ensemble des mécanismes à l'origine des troubles métaboliques et des conséquences de ces dysfonctions sur l'organisme.

a. Hormones de contre-régulation

La phase aiguë de réponse au sepsis se caractérise par la production en excès d'hormones de stress tels que les glucocorticoïdes, les catécholamines, le glucagon, la vasopressine et l'hormone de croissance (GH) impliqués dans la diminution de la sensibilité à l'insuline rencontrée lors du sepsis ^{208,209}. Cette production d'hormones de contre-régulation est responsable de l'augmentation de l'oxygénation tissulaire, de la stimulation de la néoglucogenèse hépatique, de l'augmentation de la synthèse et de la libération de substrats énergétiques tels que le glucose, les AGL, les acides aminés (AA) et l'ATP conduisant au phénomène d'IR ^{210,211}. Cette production en excès s'explique notamment par l'augmentation du tonus sympathique entraînant une augmentation des taux de catécholamines circulantes. Ainsi, les catécholamines stimulent directement la glycogénolyse, la néoglucogenèse et *via* un mécanisme β -adrénergique, favorisent la sécrétion de glucagon entraînant l'augmentation des taux circulants d'AGL qui diminuent la capture du glucose (*via* le cycle de Randle) ¹⁹⁶. Les glucocorticoïdes activent aussi des enzymes clés de la néoglucogenèse, participent à la libération d'AA formant du glucose par néoglucogenèse et diminuent le nombre de récepteurs à l'insuline présents à la surface membranaire ²¹².

Plusieurs études portant sur des patients admis en service de réanimation démontrent une corrélation positive entre taux de cortisol élevé et mortalité ^{213,214}. De même, l'étude de Agwunobi *et al.* montrent que lors d'un clamp euglycémique-hyperinsulinémique, l'administration de LPS à des volontaires sains entraîne une élévation des taux d'insuline plasmatique s'accompagnant d'une augmentation significative du cortisol, du glucagon, de la GH plasmatique, ainsi qu'une augmentation des taux de TNF- α et d'IL-6 ²¹⁵. Concernant le rôle des hormones de contre-régulation sur l'inflammation, il est décrit pour la première fois en 1904 que l'augmentation des catécholamines permet une modulation immunitaire avec augmentation des lymphocytes, puis augmentation des neutrophiles. Puis d'autres études mettent en avant l'augmentation des *Natural Killer* et des lymphocytes CD8+ avec un changement modéré des cellules B et des lymphocytes CD4+ ^{216,217}. Ainsi, l'on comprend que le système immunitaire et l'inflammation jouent aussi un rôle essentiel dans l'apparition de troubles métaboliques lors du sepsis.

b. Inflammation

La réponse inflammatoire possède un rôle primordial dans l'apparition des anomalies métaboliques lors du sepsis avec la contribution des cytokines pro-inflammatoires et chimiokines démontrée dans de nombreuses études. Les cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α , IL-6 et IL-1 β entraînent des modifications dans la voie de signalisation dépendante de l'insuline. Ces cytokines sont à l'origine d'une diminution de l'activité des récepteurs insuliques, une inhibition de l'autophosphorylation de l'IRS-1 et une augmentation des phosphorylations inhibitrices sur le résidu sérine d'IRS-1 limitant la fixation de l'insuline sur son récepteur. La conséquence de l'ensemble de ces modifications est une modulation de l'interaction entre IRS-1 et PI3K induisant une réduction de la phosphorylation d'Akt ²¹⁸. Il en résulte un défaut d'absorption du glucose dans les territoires dits insulino-dépendants (cœur, muscles, foie) par une diminution de la translocation membranaire des GLUT-4, principal transporteur du glucose dans ces territoires, majorant le phénomène de l'IR.

Parallèlement à l'action propre des cytokines pro-inflammatoires sur la voie de signalisation de l'insuline, les cytokines peuvent entraîner l'augmentation de l'activité des voies de signalisation dépendantes de *c-jun NH2-terminal kinases* (JNK), de IKK β /NF- κ B et des MAPK (p42^{MAPK} et p44^{MAPK}) ^{219–222}. En résulte une activation de la phosphorylation sérine inhibitrice de IRS-1 et une inhibition de la phosphorylation tyrosine d'IRS-1, réduisant ainsi l'activité de PI3K/Akt et majorant le phénomène d'IR ²²³ (figure 18).

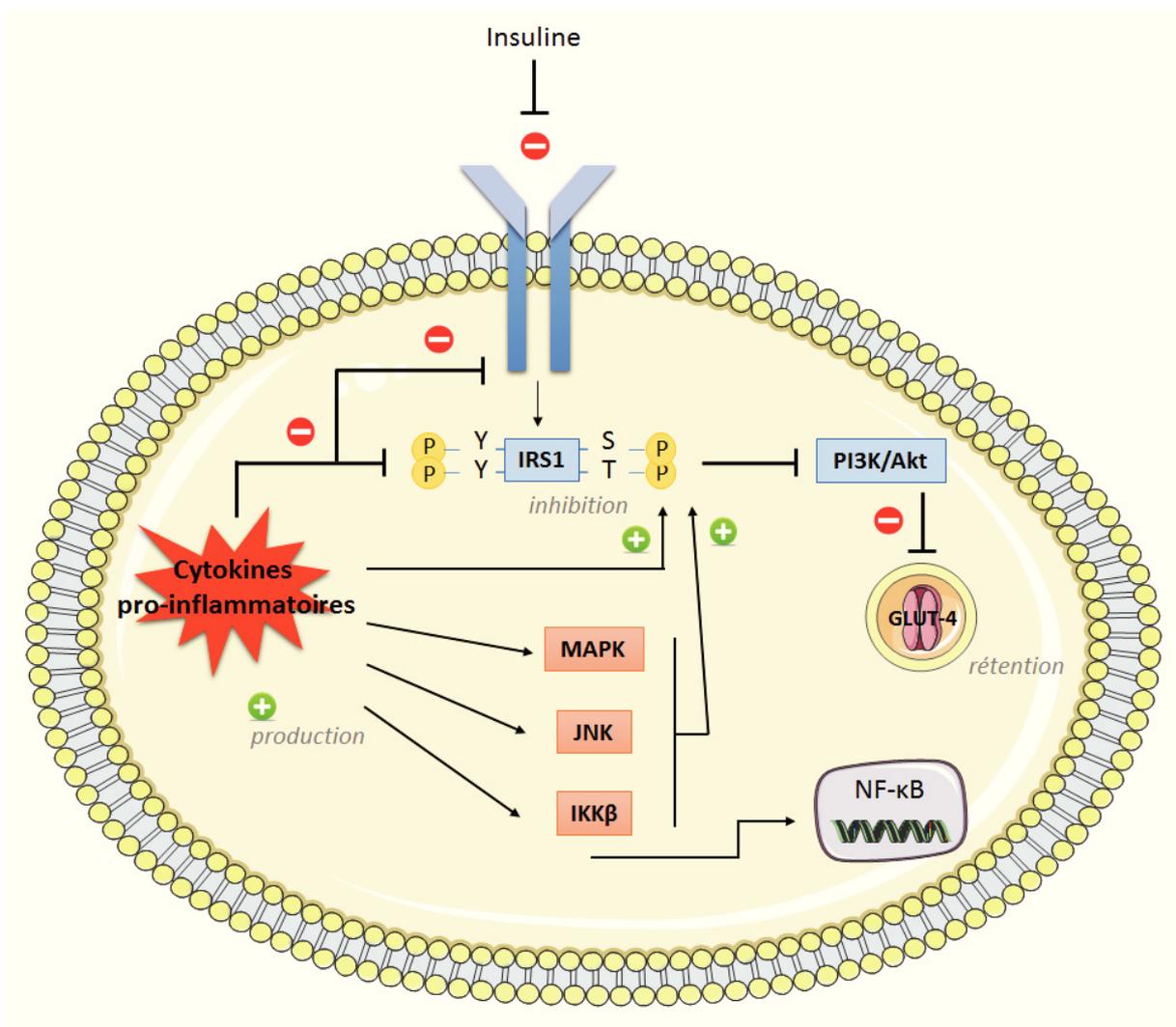


Figure 18 : Régulation d'IRS-1 par les cytokines pro-inflammatoires.

Les cytokines elles-mêmes ainsi que les voies JNK, IKK β /NF- κ B et MAPK en aval entraînent une diminution de l'activité des récepteurs insuliniques, une inhibition de l'autophosphorylation de l'IRS-1 et une augmentation des phosphorylations inhibitrices sur le résidu sérine d'IRS-1 limitant la fixation de l'insuline sur son récepteur et réduisant l'activité de PI3K/Akt avec défaut d'absorption du glucose par diminution de la translocation membranaire des GLUTs-4.

Enfin, l'étude de Deutschman *et al.* montre que la production d'AGL en excès *via* les hormones de contre-régulation, permet l'activation des cytokines pro-inflammatoires responsable d'une diminution de l'AMPK aboutissant, comme nous l'avons vu précédemment, à une inhibition de la glycolyse et de l'exocytose des GLUTs-4 ²²⁴.

c. Monoxyde d'azote

L'implication de la voie de synthèse du NO dans le sepsis et sur ses conséquences métaboliques que sont l'hyperglycémie et l'IR est clairement démontrée. Le rôle de NOSi dans l'induction d'une IR par injection de LPS chez des rats est établi ²¹⁸. De même, l'inhibition de la sécrétion de l'insuline par l'IL-1 β met en jeu la formation du NO sur des cellules β -pancréatiques en culture ²²⁵. De plus, l'étude de Bédard *et al.* montre que l'incubation de LPS et de cytokines (TNF- α et IFN- γ) sur des cellules musculaires squelettiques L6 en culture entraînent une augmentation de la production de NO *via* la

NOSi associée à une diminution de la sensibilité à l'insuline et à une diminution de l'expression de GLUT-4. L'IR et la production de NO sont corrigées en présence de *N-nitro-L-arginine méthylester* (L-NAME), inhibiteur des NOS ²²⁶.

Les mécanismes physiopathologiques à l'origine de l'hyperglycémie et l'IR dans le sepsis étant liés de manière étroite, nous pouvons noter que l'injection de LPS induit une production de NADPH oxydase et de NOSi à l'origine de la production d'ERO responsables du stress oxydant et qu'inversement, les ERO régulent l'expression de NOSi par activation de la voie NF- κ B ²²⁷.

d. Stress oxydant

Il est clairement établi que les ERO activent les voies JNK, IKK β /NF- κ B et MAPK impliquées dans la survenue du phénomène d'IR, d'une part en activant les phosphorylations inhibitrices sur le résidu sérine d'IRS-1 et en inhibant les phosphorylations activatrices sur le résidu tyrosine et d'autre part en stimulant la production de cytokines pro-inflammatoires ²²⁸. Il a été montré que la présence d'H₂O₂ *in vitro* sur des cellules musculaires stimule l'activité de la voie JNK et p38^{MAPK} entraînant une inhibition du transport du glucose induit par la voie de l'insuline. La présence d'un inhibiteur de p38^{MAPK} reverse ce défaut de signalisation insulinaire ²²⁹. Il est nécessaire de souligner que si les ERO favorisent l'apparition d'une IR, l'hyperglycémie et l'IR peuvent à leur tour favoriser la production d'ERO rendant le phénomène complexe. En effet, sur des adipocytes exposés à une hyperglycémie *in vitro* et *in vivo*, des changements transcriptionnels sont mis en place avec une sur-expression des protéines mitochondriales, une induction de la production d'ERO et une production de cytokines pro-inflammatoires ²³⁰. De même, des souris diabétiques hyperglycémiques *db/db* présentent des taux d'ERO significativement plus élevés que les souris contrôles *littermate* avec une majoration de l'activité de la voie JNK ²³¹. Enfin, une étude clinique a montré qu'un déséquilibre de la balance superoxyde dismutase/catalase entraîne une élévation du stress oxydant associée à une augmentation de la morbidité et de la mortalité dans le sepsis ²³².

e. Stress du réticulum endoplasmique

Comme nous l'avons discuté dans le chapitre I, l'augmentation du SRE et l'activation de l'UPR sont présentes dans de nombreuses pathologies humaines notamment le sepsis, les troubles métaboliques et le diabète ²³³. En effet, de nombreuses études *in vivo* montrent que les souris avec une délétion génétique ou un régime aboutissant à une obésité présentent une élévation considérable du SRE avec une élévation de la phosphorylation de PERK et IRE1 α ²³⁴. L'activation de l'UPR chez les souris obèses contribue à la diminution de la sensibilité à l'insuline avec augmentation de l'activité de

JNK *via* la voie IRE1 α entraînant une augmentation de la phosphorylation inhibitrice sur le résidu sérine de IRS-1^{235,236}. Les souris avec une délétion de la sous-unité p85 α de PI3K dans le foie présentent une réponse UPR atténuée après l'administration de tunicamycine (inducteur du SRE), entraînant une augmentation de la réponse inflammatoire. Ainsi p85 forme un lien entre la voie PI3K, centrale dans la réponse à l'insuline, et la régulation du SRE, état qui conduit à l'IR lorsqu'il n'est pas résolu²³⁵. Les souris traitées avec des molécules chimiques permettant de surexprimer les protéines chaperonnes (et ainsi limiter le SRE) présentent une amélioration de la résistance à l'insuline induite par l'obésité ainsi que du métabolisme glucidique dans un modèle de DT2^{237,238}.

Ainsi, l'on comprend que le SRE est impliqué dans la voie de signalisation de l'insuline et dans le métabolisme glucidique en général témoignant de la complexité de la pathologie septique associant augmentation du SRE et troubles IR.

Après revue des mécanismes responsables de l'apparition de ces troubles métaboliques dans la pathologie septique, il est important d'insister sur le phénomène d'auto-entretien de ces systèmes délétères dans le sepsis. En effet, pour exemple, la sécrétion d'hormones de contre-régulation comme les catécholamines participant à l'apparition de l'IR favorise également la production de cytokines pro-inflammatoires ; le stress oxydant, comme nous l'avons vu, active les voies de signalisation JNK et IKK β mais l'hyperglycémie entraîne elle-même la production de stress oxydant ; le SRE favorise l'IR mais l'IR entretient également le SRE. Ainsi, un véritable cercle vicieux est mis en place et bien que le RI ne soit plus capable de transmettre le signal insulinique *via* les mécanismes détaillés dans cette partie, le glucose est tout de même produit en excès et va donc emprunter d'autres voies métaboliques parallèles à la glycolyse responsables de la glucotoxicité.

4. Hyperglycémie et glucotoxicité

Dans ce paragraphe, nous discuterons des mécanismes mis en jeu lors du phénomène de glucotoxicité en expliquant le rôle fondamental de la mitochondrie et en détaillant l'ensemble des voies métaboliques impliquées permettant de comprendre l'importance du phénomène d'hyperglycémie dans le cadre de la pathologie septique²³⁹.

a. Implication de la mitochondrie, dysfonction mitochondriale et stress oxydant

La mitochondrie joue un rôle essentiel dans le métabolisme glucidique permettant comme nous l'avons discuté précédemment, de produire l'ATP nécessaire au fonctionnement de l'organisme. Aussi, plusieurs équipes démontrent que la mitochondrie est capable de produire du NO de manière

autonome *via* la NOS mitochondriale (NOSmt) ; la production de NO est Ca^{2+} -dépendante, a lieu principalement dans le cœur et le foie et possède peu d'effets dans les conditions physiologiques mais peut s'avérer délétère dans les conditions d'un sepsis conduisant à une dysfonction mitochondriale ²⁴⁰⁻²⁴⁴. Dans une étude sur des patients admis en service de réanimation pour un sepsis, des biopsies de muscles squelettiques sont réalisées. Les analyses montrent une diminution significative de la concentration en ATP dans le muscle squelettique chez les patients avec un pronostic défavorable associée à une augmentation de la production de NO et à une diminution de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette étude démontre un lien de corrélation entre la dysfonction mitochondriale, associée à une déplétion en ATP et une production de NO accrue, et la sévérité du sepsis ²⁴⁵. Lors d'une hyperglycémie, le processus de glycolyse ainsi que la β -oxydation sont fortement mis en jeu aboutissant à la formation d'espèces réduites en excès tel que le NADH, responsable *via* l'activation du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, d'une surproduction d'électrons et d'une surproduction d'ions superoxydes O_2^- . Cette production d' O_2^- en excès est responsable de l'activation de l'enzyme poly (ADP-ribose) polymérase (PARP) physiologiquement inactive dans le noyau et dont le rôle principal est la réparation de l'ADN simple brin ²⁴⁶. Plusieurs études ont montré le rôle de PARP dans les dysfonctions cardiaque et endothéliale présentes lors du sepsis et les effets bénéfiques de son inhibition ^{247,248}. Cependant, l'activation de la PARP entraîne également une inhibition de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GADPH) responsable de l'activation des 4 voies métaboliques de la glucotoxicité ²⁴⁹ (figure 19). Ainsi, l'on comprend l'importance de PARP dans la physiopathologie du choc septique aussi bien dans son rôle délétère sur la fonction cardiovasculaire mais aussi son impact sur les conséquences métaboliques mises en jeu.

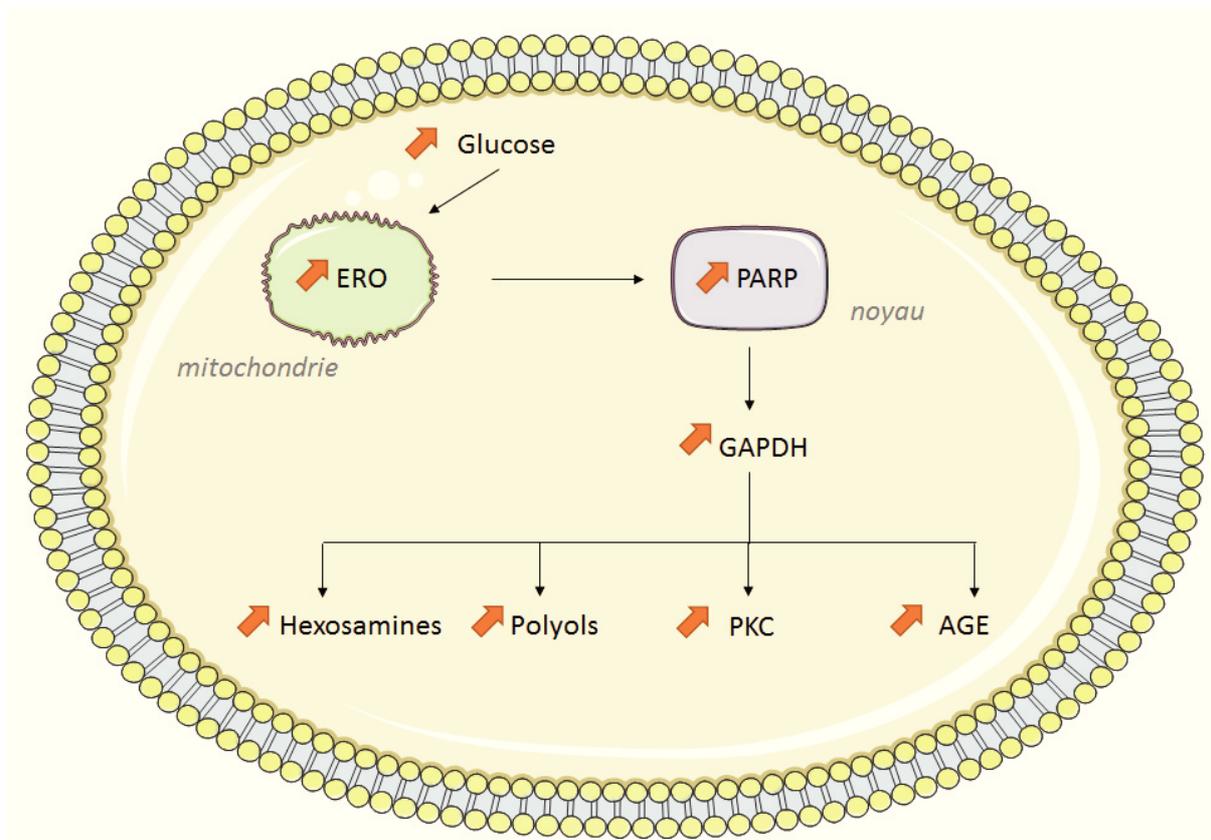


Figure 19 : Voies de la glucotoxicité.

L'hyperglycémie entraîne la formation d'ERO *via* la glycolyse et la β -oxydation. Cette production en excès d'ERO est responsable de l'activation de l'enzyme poly (ADP-ribose) polymérase (PARP). L'activation de la PARP entraîne à son tour l'inhibition de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GADPH) responsable de l'activation des 4 voies métaboliques de la glucotoxicité que sont les voies des PKC, des polyols, des hexosamines et des AGE. Figure adaptée de Brownlee, *Diabetes*, 2005 ²³⁹.

b. Voies métaboliques impliquées dans la glucotoxicité

Les voies métaboliques impliquées dans la glucotoxicité ont été largement décrites dans la littérature notamment dans le cadre du DT2. En effet, ces voies sont à l'origine des conséquences délétères bien connues du DT2 que sont les néphropathies, neuropathies, rétinopathies et maladies cardiovasculaires. Le but de ce paragraphe sera donc de détailler l'ensemble de ces voies et de comprendre leur rôle dans la pathologie du sepsis associant, comme le DT2, des troubles métaboliques.

i. Voie des protéines kinase C (PKC)

L'implication de la voie des PKC dans les phénomènes d'hyperglycémie et de glucotoxicité est discutée pour la première fois dans les années 80. Il est clairement établi que l'hyperglycémie entraîne une augmentation de la production de DAG entraînant l'activation des PKC β et δ . L'activation de cette voie est responsable de nombreux phénomènes délétères pour l'organisme, citons notamment l'augmentation de la NADPH oxydase entraînant une surproduction d'ERO, une augmentation du VEGF entraînant un accroissement de la perméabilité vasculaire, une augmentation du NF- κ B entraînant une expression des gènes pro-inflammatoires et une diminution de la NOSe responsable d'une dysfonction

endothéliale ²³⁹. Des études ont démontré l'implication de la voie PKC dans la pathologie septique. La voie PKC joue un rôle dans la réorganisation du cytosquelette des cellules endothéliales entraînant une perte de l'intégrité de la barrière endothéliale aboutissant à une dysfonction endothéliale notamment dans le cadre du sepsis ²⁵⁰. La voie PKC favorise les troubles d'agrégation plaquettaire induits par l'injection de LPS chez le rat ²⁵¹. Enfin, il est clairement établi que l'activation de la voie PKC favorise, *via* la voie NF- κ B, l'expression de gènes pro-inflammatoires tels que TNF- α aboutissant à une IR par les mécanismes détaillés dans le paragraphe 3.b. ²⁵².

ii. Voie des polyols

La voie des polyols implique l'enzyme aldose réductase responsable physiologiquement de la réduction des aldéhydes toxiques en composés alcools inactifs. Lors de l'hyperglycémie, le glucose est réduit par cette enzyme en sorbitol, lui-même oxydé en fructose par le NADPH. Le NADPH, cofacteur essentiel à la production de glutathion réduit, antioxydant intracellulaire, est fortement consommé et un stress oxydant se met en place. Dans la pathologie diabétique, plusieurs études montrent le rôle bénéfique des inhibiteurs d'aldose réductase sur les complications majeures du diabète. Plus récemment, le rôle de ces inhibiteurs d'aldose réductase est discuté pour les complications de la pathologie septique et apparaît comme une stratégie thérapeutique potentielle ^{253,254}. En effet, des études montrent l'implication de l'aldose réductase dans la dysfonction endothéliale induite par le stress oxydant, dans la production de cytokines et dans la signalisation inflammatoire. L'administration de LPS *in vitro* ou *in vivo* provoque une activation de la voie NF- κ B, une augmentation des cytokines sériques et cardiaques, une dysfonction cardiaque par diminution de la pression dans le ventricule gauche et une dysfonction vasculaire. L'ensemble de ces paramètres est significativement modifié en présence d'un inhibiteur d'aldose réductase ²⁵⁵⁻²⁵⁷.

iii. Voie des hexosamines

Dans les conditions physiologiques, le glucose *via* la glycolyse est transformé en fructose-6-phosphate (F6P). Lors d'une hyperglycémie, le F6P est détourné vers une autre voie, la voie des hexosamines. Le F6P est ainsi transformé en Uridine di-phosphate N-acétyl glucosamine (UDPGlcNAc) capable d'agir directement sur les facteurs de transcription et d'entraîner l'expression génique de facteurs pro-inflammatoires tels que le *Transforming Growth Factor* beta (TGF- β) responsable de l'épaississement des capillaires. D'autres effets sont connus comme l'inhibition de la NOSe ou l'augmentation de la synthèse de leptine ²³⁹. Une étude portant sur les effets de la O-glycosylation (induite par l'hyperglycémie) sur la signalisation insulinique dans les cellules endothéliales d'artères humaines montre que l'hyperglycémie, par la voie de l'hexosamine, empêche l'activation de

IR/IRS/PI3K/Akt, entraînant la dérégulation de l'activité NOSe ²⁵⁸. Cependant à ce jour, il n'existe pas d'étude portant sur la voie des hexosamines et ses conséquences dans le sepsis.

iv. Voies des produits avancés de glycation (AGEs)

La glycation représente une réaction biochimique importante et irréversible permettant la fixation d'un sucre à une protéine ou à un peptide, formant ou non une liaison glycosidique. Physiologiquement, la glycation est un processus enzymatique permettant la production de glycoprotéines. Cette réaction concerne notamment les intermédiaires métaboliques de la glycolyse ou de la voie des polyols. Lors d'une hyperglycémie ou plus généralement dans un contexte pathologique, la glycation devient une réaction non enzymatique permettant la production de protéines glyquées. La production intracellulaire des produits avancés de glycation (AGE) se fait donc par transformation successive du glucose en Base de Schiff, Produits d'Amadori et produits intermédiaires de glycation dont l'ensemble des mécanismes est à l'origine de l'apparition d'un stress oxydant important ²³⁹. Les AGE sont responsables de nombreux dommages cellulaires : altération des interactions cellule-matrice entraînant la dysfonction endothéliale et modifications des protéines intracellulaires entraînant une altération de la transcription génique. Les récepteurs aux produits avancés de glycation (RAGE) ont été récemment décrits comme des PRR, jouant un rôle primordial dans l'initiation de la réponse inflammatoire innée mise en place dans la pathogenèse du sepsis ²⁵⁹. En effet, l'activation du RAGE initie l'activation de la voie NF- κ B et de la voie MAPK ^{260,261}. Dans une étude expérimentale, Lutterloh *et al.* montrent que des souris septiques après ligature et perforation caecale portant une délétion génétique du récepteur aux AGE (RAGE^{-/-}) présentent un taux de survie à 7 jours de 80% contre 37% pour les souris RAGE^{+/+}. Dans cette même étude, les auteurs montrent que l'administration d'anticorps anti-RAGE entraîne une amélioration significative dose-dépendante de la survie chez les souris septiques ²⁶². Enfin, dans des études cliniques, il est montré que le taux d'AGE tissulaires est corrélé positivement à la mortalité en cas de sepsis et que la concentration du RAGE soluble (sRAGE) est significativement plus élevée dans le plasma des patients atteints de sepsis comparativement aux témoins et que cette concentration est d'autant plus élevée chez les non-survivants. Cette étude montre que la présence de sRAGE est liée à la sévérité du sepsis ²⁶³⁻²⁶⁵.

Les dommages cellulaires et tissulaires induits par l'IR et l'hyperglycémie ont fait l'objet de nombreuses études notamment dans le cadre du diabète. Le cercle vicieux mis en place lors du sepsis avec l'apparition d'une IR *via* de nombreux mécanismes (inflammation, hormones de contre-régulation, NO...) responsables d'une hyperglycémie et de la glucotoxicité, est à l'origine de nombreuses dysfonctions d'organes observées.

5. Conséquences de l'altération du métabolisme glucidique sur le système cardiovasculaire

L'IR se répercute sur l'ensemble des organes principalement insulino-dépendants tels que le foie, le tissu adipeux, le muscle squelettique et le myocarde. Au niveau hépatique, on observe une diminution de la synthèse et du stockage du glycogène avec une augmentation de la glyco-génolyse et de la production de glucose. L'absorption de glucose induite par l'insuline et la translocation des GLUT-4 sont limitées au niveau musculaire. Pour le tissu adipeux, la translocation des GLUT-4 ainsi que la réponse insulinique sont diminuées contribuant à la production d'AGL^{266,267}. Les conséquences délétères sur le système cardiovasculaire ont aussi été mises en évidence et seront discutées dans les parties suivantes.

a. Insulino-résistance et dysfonction vasculaire

L'insuline stimule la transduction du signal dans les cellules endothéliales et augmente la fonction vasodilatatrice de l'endothélium *via* le NO^{268,269}. De nombreuses études ont montré que l'insulino-résistance est associée à une altération de la signalisation insulinique dans les vaisseaux²⁷⁰. L'action de l'insuline directement sur les cellules endothéliales joue un rôle dans la fonction endothéliale par régulation du flux sanguin et du recrutement capillaire²⁷¹. Des souris présentant une délétion génétique du RI spécifiquement dans les cellules endothéliales ont une majoration de l'athérosclérose sans modification de la tolérance au glucose, de l'insulino-sensibilité ou de la pression artérielle mais une augmentation du *rolling* et de l'adhérence leucocytaire rapportée à une augmentation de l'expression de VCAM1²⁷². Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'activation de la voie PKC, conséquence de l'hyperglycémie présente dans le sepsis, entraîne une dysfonction endothéliale par la perte de l'intégrité de la barrière endothéliale et des troubles de l'agrégation plaquettaire^{250,251}.

b. Insulino-résistance et dysfonction cardiaque

L'IR est responsable dans le cœur de nombreuses altérations à la fois métaboliques et fonctionnelles aboutissant à une dysfonction cardiaque majeure. L'IR limite l'absorption de glucose dans le cœur, favorise le métabolisme des AGL et diminue la fonction cardiaque²⁶⁶. Dans le cas de souris diabétiques *ob/ob*, le métabolisme cardiaque se caractérise par une diminution de l'utilisation du glucose et une augmentation de l'utilisation des AGL. Ainsi la fonction cardiaque, bien que réduite, est maintenue mais l'efficacité cardiaque est diminuée²⁷³. Des études portant sur des souris obèses montrent qu'une surexpression de *Peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR) dans le cœur en

réponse à l'augmentation des AGL circulants, entraîne des troubles du métabolisme glucidique et lipidique aboutissant à une hypertrophie et une fonction cardiaque altérée ^{274,275}. Il a également été mis en évidence que la sur-activation de la voie PKC chez des rongeurs diabétiques entraîne une augmentation des taux de *connective tissue growth factor* (CTGF), de TGF- β et de cytokines pro-inflammatoires conduisant à une fibrose et une dysfonction cardiaques ²⁷⁶.

La pathogenèse des dysfonctions d'organes et l'ensemble des conséquences délétères des troubles métaboliques rencontrés lors du sepsis sur le système cardiovasculaire témoignent des difficultés d'établir l'identification de nouvelles cibles. Nous allons pour cela discuter des différents essais et traitements mis en place de l'expérimental à la clinique chez les patients septiques au cours du temps.

6. Traitements du sepsis : passé, présent, futur

a. Traitements symptomatiques : recommandations actuelles

Les recommandations internationales actuelles pour la prise en charge du sepsis sont définies dans le *Surviving Sepsis Campaign* publié récemment en 2017. La première recommandation consiste à conforter le diagnostic de sepsis par identification microbienne avant de débiter une antibiothérapie chez le patient. Lorsque l'infection bactérienne est confirmée une antibiothérapie adaptée doit être débutée le plus rapidement possible. Un remplissage vasculaire doit également être établi pour stabiliser l'état hémodynamique du patient. Lorsqu'un support par substances vasoactives doit être mis en place, la noradrénaline est recommandée en première intention. Au début des années 2000, de nombreuses études cliniques ont montré l'intérêt d'utiliser une thérapie symptomatique précoce avec un monitoring précis dans les 6 premières heures d'hospitalisation pour un sepsis. ^{277,278}. Cependant, très récemment, d'autres essais cliniques portant sur ces mêmes thérapies précoces dites symptomatiques ont montré l'absence d'effets bénéfiques en termes de co-morbidités et de mortalité ²⁷⁹⁻²⁸¹. Ces résultats renforcent la difficulté de prise en charge des patients septiques et motivent la communauté scientifique dans la découverte d'axes thérapeutiques nouveaux voire de thérapie dite personnalisée.

Ainsi, malgré la mise en place de nombreux traitements symptomatiques, la mise au point de thérapie axée sur la physiopathologie constitue un axe de recherche expérimental et clinique majeur. Un état de l'art des traitements étiologiques établis en expérimentation animale et en essais cliniques sera discuté dans le paragraphe suivant.

b. Traitements étiologiques : de l'expérimentation animale aux essais cliniques

i. Nombreux essais cliniques

De nombreux essais cliniques ont vu le jour dans les années 90 après plusieurs études expérimentales réussies. Nous détaillerons dans ce paragraphe certains de ces essais ainsi que les limites de leur réussite.

Dans une étude de 1984, Kirkland *et al.* démontrent que l'utilisation du HA-1A, anticorps monoclonal humain dirigé contre le domaine lipidique de l'endotoxine, présente une efficacité par diminution de la mortalité chez des animaux atteints d'endotoxémie ²⁸². Une étude clinique randomisée publiée en 1991 et utilisant le même anticorps HA-1A montre à son tour une amélioration de la survie chez des patients avec une infection bactérienne à Gram - ²⁸³. Cependant, les études cliniques randomisées suivantes, menées cette fois en double aveugle et avec le même anticorps, ne démontrent aucun bénéfice en terme de mortalité chez les patients atteints d'une infection à Gram - ou d'un choc septique ²⁸⁴ rendant impossible la commercialisation de l'anticorps HA-1A par l'*US Food and Drug Administration*. Dans les années 90, à la suite de ces études infructueuses portant sur les anticorps anti-endotoxine, des essais cliniques randomisés ont été menés concernant des molécules anti-cytokines. De nombreux essais cliniques randomisés ont porté sur l'étude des anti-TNF- α . Les deux approches mises en place, l'utilisation d'une protéine de fusion recombinante capable de se lier et de neutraliser le TNF- α et l'utilisation d'un anticorps monoclonal dirigé contre le TNF- α ne montrent pas de diminution significative de la mortalité chez les patients en choc septique en comparaison aux patients traités avec un placebo ^{285,286}. En parallèle, des études portant sur les anti-IL-1 ont montré des résultats tout aussi décevants, avec une survie non améliorée chez les patients en choc septique traités à l'Anakinra, antagoniste du récepteur à l'IL-1 humaine recombinante (rhIL-1ra) ²⁸⁷.

Les causes d'échecs des essais cliniques basés sur l'utilisation de molécules dirigées contre les cytokines sont nombreuses. On peut notamment mettre en avant le fait que les anticorps bloquant les cytokines circulantes sont souvent administrés tardivement par rapport au pic de cytokines plasmatiques. On peut aussi souligner que le blocage d'une cytokine ne peut pas contrôler l'ensemble de la cascade cytokinique. Enfin, le processus inflammatoire se compose de phases anti- et pro-inflammatoires évolutives rendant le principe de cette prise en charge très complexe en l'absence de moyens simples d'identification du processus inflammatoire au lit du patient et prédisposant les patients septiques au développement d'infections nosocomiales ²⁸⁸.

Dans les années 2000, des essais cliniques portant sur d'autres voies moléculaires que l'inflammation ont été mis en place ²⁸⁹. Les antagonistes du récepteur du facteur activateur des

plaquettes ont montré soit de faibles effets sur la survie ne permettant pas de conclure sur le bénéfice de ces traitements (pour l'antagoniste BN 52021)²⁹⁰, soit aucun avantage sur la survie, le statut hémodynamique, la fonction respiratoire ou le score de dysfonction d'organes (pour l'antagoniste BB-882)²⁹¹. L'Eritoran, antagoniste du TLR4, utilisé dans l'essai clinique ACCESS de phase III n'a montré aucune amélioration de la survie à 28 jours et à 1 an chez les patients en sepsis sévère ou choc septique²⁹². Le Tifacogin, inhibiteur de la voie du TF humain utilisé dans l'essai clinique OPTIMIST sur des patients en sepsis sévère ou atteints de pneumonie sévère, n'a montré aucun effet bénéfique sur la survie étant même associé à une augmentation des risques d'hémorragies^{293,294}. Nous pouvons aussi citer les essais cliniques portant sur l'antithrombine III²⁹⁵, le 546C88 isoforme non sélectif inhibiteur de NOS²⁹⁶, l'héparine non fractionnée²⁹⁷, tous n'ayant montré aucun effet bénéfique, sans amélioration significative de la survie chez les patients traités.

Plus récemment, les essais cliniques ont porté sur le XIGRIS®, drotrécogine alpha activée, un analogue recombinant de la protéine C activée. Commercialisé en 2002 et utilisé en milieu hospitalier uniquement, il est retiré du marché quelques années plus tard pour cause d'inefficacité démontrée dans d'autres essais (PROWESS-SHOCK)²⁹⁸.

Deux cibles thérapeutiques prometteuses que sont l'endothélium et les médiateurs moléculaires tardifs de l'inflammation seront mises à l'étude en clinique²⁹⁹. Concernant la cible endothéliale, les molécules telles que l'angiopoïétine 1 et le Stabilizes VE-cadherin at tight junctions (Slit2N) sont responsables toutes deux de l'altération de la perméabilité endothéliale par destruction des jonctions serrées dans les modèles murins de sepsis³⁰⁰. De même, une autre cible envisagée est le glycocalyx, qui comme nous l'avons vu, joue un rôle essentiel dans la perméabilité endothéliale. De nombreuses études expérimentales très récentes montrent que le glycocalyx présente de nombreuses altérations et que ceci contribue à l'augmentation de la mortalité chez les animaux septiques. L'administration de traitements pharmacologiques permet de restaurer l'intégrité du glycocalyx et ainsi de réduire la perméabilité vasculaire améliorant le pronostic vital des animaux^{301,302}. Concernant les médiateurs moléculaires tardifs de l'inflammation, les histones permettant la condensation de l'ADN dans le noyau eucaryote, ont été décrites comme étant impliquées dans la dysfonction cardiovasculaire. En effet, Esmon *et al.* montrent que les histones H3 et H4 constituent des médiateurs tardifs de la dysfonction endothéliale induite par le sepsis en majorant l'altération cellulaire, l'inflammation et l'apoptose. L'administration d'un anticorps monoclonal dirigé contre ces histones favorise l'amélioration de la survie dans des modèles de sepsis expérimentaux³⁰³. Une autre protéine, la HMGB1, chaperonne de l'ADN participe également à l'altération de la fonction de barrière endothéliale dans le sepsis en majorant le processus inflammatoire. Un anticorps monoclonal dirigé

contre cette protéine permet une augmentation de la survie dans des modèles expérimentaux. L'ensemble de ces essais expérimentaux devrait voir le jour en pathologie humaine.

ii. *Echec des essais cliniques*

La cause des échecs des différents essais cliniques repose notamment sur le fait que les études expérimentales, réalisées au préalable sur des animaux, s'éloignent de la réalité clinique. En effet, les modèles animaux de choc septique utilisés sont dans la plupart des cas, des modèles de choc endotoxinique induit par une injection unique de LPS ou des modèles de bactériémie induite par inoculation unique d'une souche bactérienne. Ces modèles se caractérisent par un pic d'inflammation aiguë appelé orage cytokinique et survenant 4 heures après l'injection, suivi d'une atténuation du processus inflammatoire avec décroissance progressive des lymphocytes activés, des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines³⁰⁴. Au contraire, le modèle de CLP reste à ce jour le *gold-standard* en matière de sepsis puisque à l'origine d'une infection microbienne avec persistance et aggravation du processus inflammatoire dans le temps. Cependant, nous pouvons noter que la péritonite n'est pas le type d'infection le plus commun responsable du sepsis en clinique et les autres modèles expérimentaux sont nécessaires à la compréhension des mécanismes physiopathologiques. Il est aussi important de souligner que les études expérimentales ne prennent pas en compte le facteur âge ainsi que l'ensemble des co-morbidités rencontrées en clinique. Les animaux sont en règle générale utilisés à l'âge adulte et sans facteurs de risque aggravants alors que la pathologie septique implique plus généralement des patients âgés ou très jeunes présentant des co-morbidités³⁰⁵. Enfin, dans la plupart des cas, les antibiotiques, les remplissages vasculaires, les catécholamines et les assistances ventilatoires mécaniques ne sont pas utilisés et rendent la transversalité des études expérimentales vers les essais cliniques très difficile.

La revue de l'ensemble des essais cliniques par traitements pharmacologiques axés sur le contrôle du processus inflammatoire rend compte de la complexité de la pathologie et sans aucun doute de l'ensemble des co-facteurs devant être pris en compte dans une réflexion thérapeutique. C'est dans ce contexte que l'impact du contrôle métabolique notamment glucidique a été développé.

7. Impact du contrôle de la glycémie dans le sepsis : études cliniques, recommandations et thérapeutiques passées et actuelles

Le contrôle de la glycémie a préalablement été démontré dans le cadre de pathologies cardiovasculaires. En effet, dans une étude clinique portant sur des patients diabétiques avec infarctus du myocarde, l'administration de glucose et d'insuline permettant de maintenir un niveau de glycémie

stable entraîne une réduction de la mortalité de 11%³⁰⁶. Aussi, chez des patients diabétiques subissant une chirurgie cardiaque, la mise en place post-opératoire d'un protocole de maintien de la glycémie permet une diminution significative de l'incidence de survenue d'une infection post-opératoire³⁰⁷.

a. Etudes cliniques

De nombreuses équipes de recherche ont étudié l'impact de différents traitements permettant de contrôler la glycémie chez des patients de réanimation présentant un sepsis²⁶. Les travaux de l'équipe de recherche de Van den Berghe sur le contrôle de la glycémie et l'insulino-thérapie chez les patients en sepsis, sont mondialement reconnus²¹¹. En 2001, une étude prospective, randomisée, contrôlée incluant 1548 patients de réanimation chirurgicale sur la normalisation de la glycémie avec un traitement par insulino-thérapie intensive est réalisée. Les patients sont randomisés en deux groupes : l'un recevant une thérapie intensive à l'insuline consistant à maintenir la glycémie entre 80 et 110mg/dL et l'autre recevant un traitement conventionnel avec injection d'insuline uniquement quand la glycémie dépasse 215mg/dL afin de maintenir la glycémie entre 180 et 200mg/dL. À 12 mois, la thérapie intensive à l'insuline réduit la mortalité de 8% contre 4.6% pour le traitement conventionnel. Cette thérapie s'associe avec une réduction des facteurs de co-morbidité³⁰⁸. Ces travaux sont soutenus et complétés par les études de Krinsley, qui montrent une diminution significative de la mortalité, de la dysfonction d'organes et de la durée de séjour dans les services de réanimation par un contrôle de la glycémie^{309,310}.

Cependant, l'ensemble de ces travaux est hautement controversé. En effet, l'étude de Cariou *et al.* montre qu'un contrôle de la glycémie permettant de maintenir le taux de glucose inférieur à 150mg/dL est recommandé. Cette étude souligne l'importance d'utiliser un protocole de nutrition élaboré permettant de maintenir ce taux sans avoir recours à l'administration d'insuline à forte dose³¹¹. L'étude de Jeschke *et al.* montre que chez les patients atteints de brûlures sévères, l'administration d'insuline permet d'atténuer la réponse inflammatoire par diminution de la cascade pro-inflammatoire et augmentation de la cascade anti-inflammatoire dont les conséquences peuvent être néfastes sur la dysfonction d'organes et la survie³¹². Aussi, d'autres études viennent renforcer cette controverse en montrant que l'insulino-thérapie et le contrôle strict de la glycémie n'apportent aucun bénéfice aux patients en terme de survie^{313,314}. Une autre étude clinique réalisée par l'équipe de Van den Berghe sur des patients de réanimation médicale cette fois, montre que l'insulino-thérapie intensive diminue significativement la morbidité sans bénéfice en terme de survie³¹⁵. Les études d'Arabi et de Lacherade soulignent d'ailleurs les conséquences néfastes de l'insulino-thérapie intensive en raison de la survenue d'hypoglycémies délétères responsables d'effets négatifs en terme de survie^{316,317}.

D'autres études démontrent que la variabilité glycémique engendrée par le contrôle strict de la glycémie augmente significativement la mortalité chez les patients³¹⁸⁻³²⁰. Ces études permettent de comprendre l'hétérogénéité des résultats retrouvés dans les différents essais cliniques portant sur le contrôle strict de la glycémie.

b. Recommandations et thérapeutiques

Les définitions actuelles publiées lors du consensus de 2016 dans le JAMA n'évoquent que très succinctement la notion de perturbations métaboliques abordant « le choc septique comme un sepsis dans lequel les anomalies circulatoires et cellulaires/métaboliques sous-jacentes sont suffisamment profondes pour augmenter substantiellement la mortalité »²⁴. Le contrôle de la glycémie chez les patients de réanimation en sepsis est donc présenté dans les recommandations internationales publiées dans les *Surviving Sepsis Campaign*. Il doit être mis en place une procédure de suivi de la glycémie chez les patients en sepsis afin de débiter un dosage de l'insuline lorsque deux dosages successifs de glucose sont supérieurs ou égaux à 180mg/dL afin de cibler exclusivement les patients avec des hyperglycémies importantes. Aussi, la glycémie doit être monitorée toutes les 1 à 2 heures jusqu'à stabilisation complète puis toutes les 4 heures, tout en prenant avec précision les résultats obtenus sur sang capillaire et en privilégiant le sang artériel ou veineux. Ces recommandations de 2016 s'adaptant aux différentes données cliniques obtenues sur l'insulino-thérapie, les variabilités glycémiques et l'apparition d'hypoglycémie modulent largement les recommandations de 2008 qui recommandaient une insulino-thérapie intensive pour tout patient en sepsis présentant une hyperglycémie³²¹⁻³²³.

Les altérations métaboliques notamment glucidiques sont des caractéristiques majeures chez les patients septiques associées à un pronostic défavorable. Si les études cliniques portant sur l'insulino-thérapie ont eu le mérite d'initier la réflexion sur la prise en charge métabolique lors du sepsis, elles restent néanmoins controversées quant à l'apparition de variabilités glycémiques et/ou d'hypoglycémies tout aussi délétères ayant conduit à moduler l'utilisation de cette insulino-thérapie intensive. L'ensemble de ces considérations rend nécessaire la poursuite de travaux de recherche dans l'objectif d'identifier de nouveaux axes thérapeutiques dans la régulation des désordres métaboliques. Les travaux de notre équipe de recherche portant sur la Protéine Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B), connue dans la pathologie diabétique et l'obésité, viennent donc proposer une nouvelle cible thérapeutique potentielle dans les désordres métaboliques observés lors du sepsis.

III – La Protéine Tyrosine Phosphatase 1B comme cible thérapeutique

1. Généralités

La phosphorylation est l'un des mécanismes post-traductionnels les plus importants des voies de signalisation eucaryotes jouant un rôle majeur dans l'ensemble des processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation, la croissance, la migration cellulaires, mais aussi le métabolisme ou dans des processus pathologiques tels que la cancérogénèse. Ce mécanisme, permettant l'ajout ou la suppression de groupements phosphate sur les résidus tyrosine, thréonine ou sérine des protéines est réversible. Ces résidus peuvent être phosphorylés par les protéines kinases et déphosphorylés par les protéines phosphatases (figure 20).

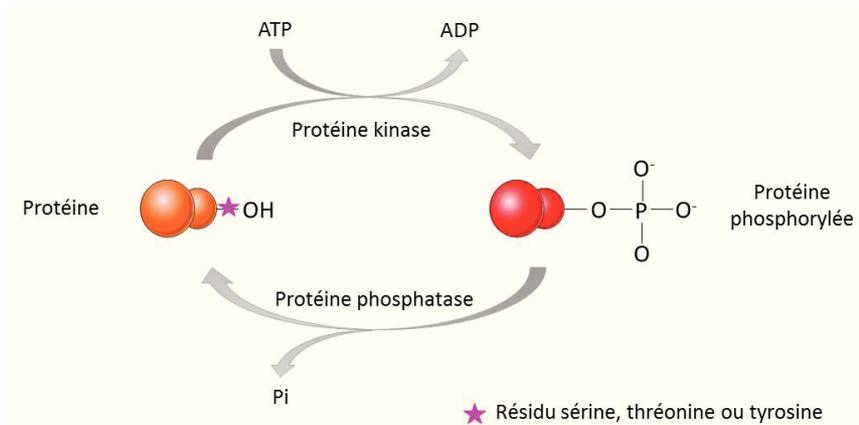


Figure 20 : Réaction enzymatique de phosphorylation et de déphosphorylation.

La protéine kinase permet l'ajout d'un groupement phosphate sur un résidu sérine, thréonine ou tyrosine d'une protéine par consommation d'un ATP. La protéine phosphatase supprime le groupement phosphate de la protéine phosphorylée.

Dans le cas où le résidu d'intérêt est une tyrosine, la phosphorylation et la déphosphorylation seront assurées successivement par une protéine tyrosine kinase (PTK) et une protéine tyrosine phosphatase (PTP). Dans cette partie, nous aborderons d'abord le sujet de la super-famille des PTP et de leurs rôles divers ; ensuite nous discuterons plus en détail de la Protéine Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) avec sa localisation, ses mécanismes d'action, sa régulation et ses rôles ; enfin nous expliquerons les différentes méthodes permettant d'inhiber la PTP1B.

2. Protéines tyrosine phosphatases

a. Super-famille des protéines tyrosine phosphatases

L'ensemble des PTPs découvertes dans le génome humain a permis de déterminer un PTPOme constitué de 107 gènes codant pour des PTPs, regroupées en quatre classes distinctes^{324,325}. Les classes I, II et III regroupent les PTPs dont le mécanisme de phosphorylation met en jeu une cystéine (Cysteine-based PTP) ; la quatrième et dernière classe appelée Aspartate-based PTP regroupe l'ensemble des PTPs dont le mécanisme de phosphorylation met en jeu un aspartate³²⁶. La classe I regroupe le plus

de PTPs contenant 38 PTPs dites « classiques » strictement spécifique d'une tyrosine et 61 PTPs dites « VH1-like » présentant une dualité de spécificité ³²⁷. Les PTPs « classiques » sont elles-mêmes divisées en sous-classes basées sur l'architecture et le degré d'homologie entre les domaines catalytiques : les PTPs récepteurs transmembranaires (RPTPs) et les PTPs intracellulaires non récepteurs (NRPTPs) (figure 21).

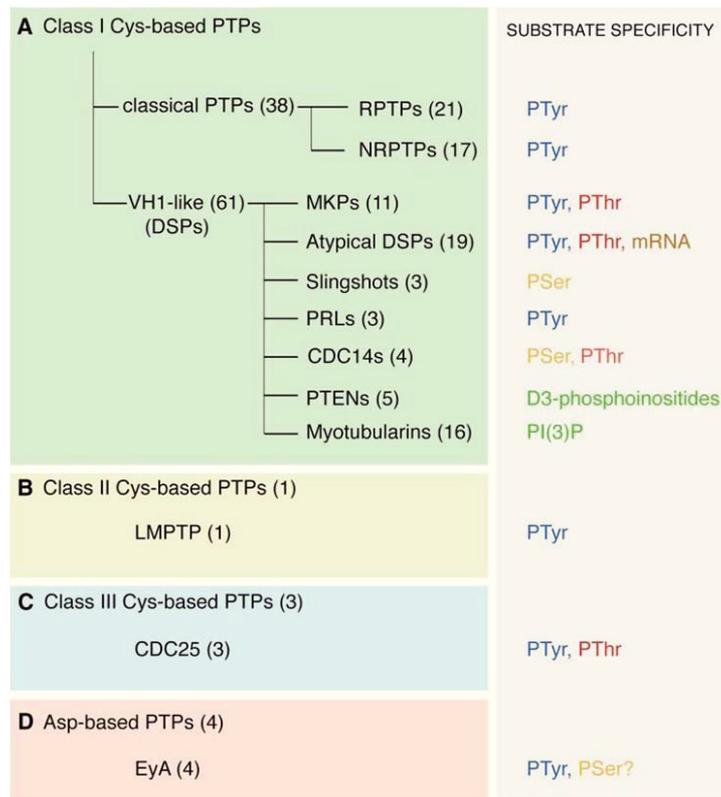


Figure 21 : Classification et spécificité de substrats des Protéines Tyrosine Phosphatases (PTPs).

Les PTPs sont regroupées en quatre classes distinctes. Les classes I, II et III mettent en jeu un résidu cystéine ; la classe IV met en jeu un résidu aspartate. Chaque classe est divisée en sous-classes telles que les PTPs classiques et les VH-1 like pour la classe I.

La Protéine Tyrosine Phosphatase 1B appartient aux PTPs non récepteur (NRPTP) des PTPs classique de la classe I. Tableau issu de l'article de Alonso *et al.*, *Cell*, 2014 ³²⁵.

Les PTPs de classe I sont toutes constituées d'un domaine catalytique très conservé (Ile/Val)His-Cys(X)₅Arg(Ser/Thr) constituant le motif signature appelé le domaine ou boucle PTP ^{328,329} situé au centre de la molécule ³³⁰ et dont le motif Cys(X)₅Arg reste constant.

En 1988, la PTP1B est la première PTP identifiée ³³¹ suivie, la même année, de l'identification du CD-45 comme une PTP transmembranaire ^{332,333}.

b. Rôles des protéines tyrosine phosphatases

i. Rôles physiologiques

Les PTPs possèdent des rôles primordiaux dans la physiologie des vertébrés dont voici quelques exemples succincts. Ces protéines sont très exprimées durant le développement cérébral notamment au niveau des neurones et des cellules gliales et sont impliquées dans la convergence et l'extension cellulaire suggérant que ces enzymes jouent un rôle primordial dans le développement neuronal et dans la mise en place de l'axe principal du corps au cours du développement précoce des vertébrés^{334,335}. Aussi, de nombreuses études ont montré le rôle des PTPs dans le métabolisme. En effet, il est reconnu aujourd'hui que les PTPs participent à la régulation de la voie de signalisation de l'insuline et de la leptine en déphosphorylant les récepteurs afin d'atténuer l'activité tyrosine kinase de ces voies métaboliques^{336,337}. Enfin, les PTPs sont aussi impliquées dans l'ensemble des mécanismes de signalisation cellulaire et dans les processus liés à l'immunité cellulaire. Cependant, si les PTPs possèdent des rôles physiologiques incontestés, elles peuvent aussi être impliquées dans la survenue de nombreuses pathologies.

ii. Rôles pathologiques

De nombreux cas de mutations dans les gènes codant pour les PTPs ont été recensés. Ces mutations entraînent des pertes ou des gains de fonctions sur les PTPs qui sont la cause de nombreuses pathologies ou contribuent à la pénétrance et à la sévérité de l'état pathologique³³⁸. La mutation du gène *ptpn2* codant pour la protéine *T-cell Protein Tyrosine Phosphatase* (TCPTP) joue un rôle crucial dans le développement de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin telles que la maladie de Crohn³³⁹. De même, la mutation du gène *ptpn14* entraîne une perte de fonction sur la protéine *Phosphatase with Erzin domain* (PEZ) impliquée dans l'apparition de lymphœdème congénital³⁴⁰. Les PTPs jouent aussi un rôle bien connu dans les voies de signalisation sous-jacentes à la tumorigenèse. Une étude réalisée en 2004 a recensé 83 mutations somatiques dans 6 PTPs différentes entraînant la production de protéines tronquées dépourvues de l'activité phosphatase ou avec une activité phosphatase réduite. Ces mutations sont à l'origine de cancers colorectaux, du poumon, du sein ou gastriques³⁴¹. L'une des PTPs jouant un rôle majeur dans de nombreux mécanismes physiopathologiques est la PTP1B. En effet, une mutation du gène *ptpn1* codant pour cette protéine, permet un gain de fonction entraînant l'apparition d'un diabète non-insulino-dépendant. Une vue d'ensemble de la littérature scientifique sera discutée dans la partie suivante sur cette protéine qui fait l'attrait de nombreuses recherches et à laquelle nous nous sommes longuement intéressés.

3. La Protéine Tyrosine Phosphatase 1B

a. Découverte, structure et localisation

La PTP1B est, comme nous l'avons évoqué précédemment, la première PTP à avoir été purifiée et séquencée en 1988 par Tonks à partir d'extrait de placenta humain ³³¹. Elle appartient aux PTPs de classe I « classiques » intracellulaires non récepteurs NRPTPs. Cette protéine est une enzyme ubiquitaire et abondamment exprimée de 50 kDa, composée de 435 AA ³⁴² et qui s'organise en une structure tridimensionnelle spécifique constituée de 8 hélices α et 12 feuillets β ³³⁰. Elle est constituée d'un domaine catalytique N-terminal des résidus 1 à 300, suivi d'une région régulatrice composée de 80 à 100 AA avec deux motifs riches en proline associés en tandem permettant l'interaction avec les protéines contenant un domaine SH3 ^{342,343} et d'un domaine C-terminal des résidus 400 à 435 permettant l'adressage de l'enzyme au RE (figure 22).

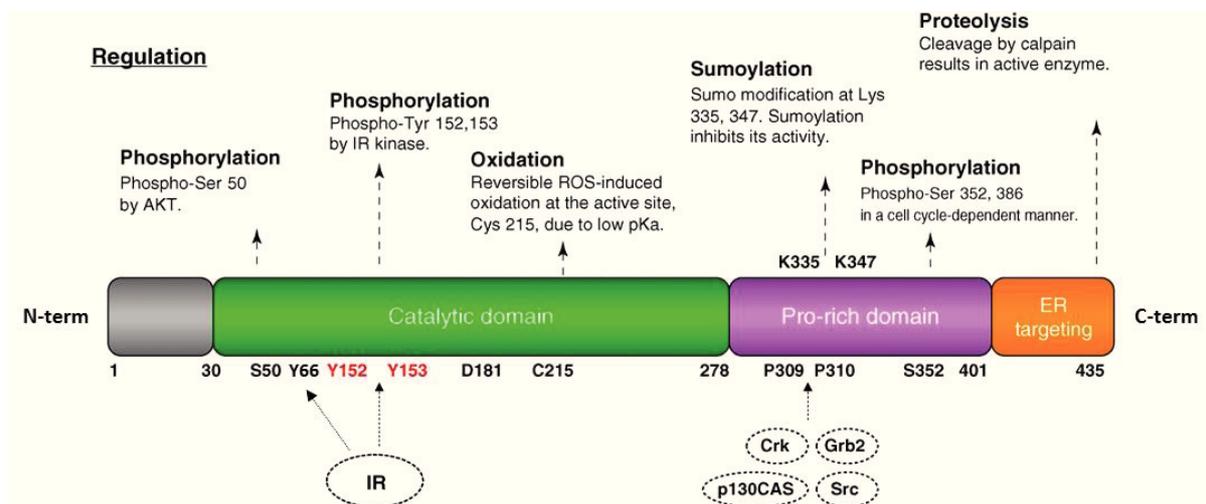


Figure 22 : Structure et régulation de la PTP1B.

Schéma représentant les différents domaines structurels de la PTP1B. Le domaine catalytique N-terminal est composé des résidus 1 à 300 (en gris et vert sur le schéma), suivi du domaine riche en proline constituant une région régulatrice (en violet) et le domaine C-terminal des résidus 400 à 435 (en orange). L'ensemble de ces domaines est soumis à des phénomènes de régulation par modifications post-traductionnelles telles que l'oxydation, la phosphorylation, la sumoylation et la protéolyse. Schéma issu et adapté de Yip *et al.*, *Trends Biochem Sci*, 2010 ³⁴⁴.

Le site catalytique en N-terminal est constitué du domaine ou boucle PTP (Ile/Val)His-Cys(X)₅Arg(Ser/Thr), motif signature des PTPs de classe I. Dans le cas de la PTP1B, la boucle PTP concerne l'histidine 214, la cystéine 215 et l'arginine 221. Autour de ce site catalytique, s'organisent 3 boucles spécifiques ³⁴⁵ illustrées dans la figure 23.

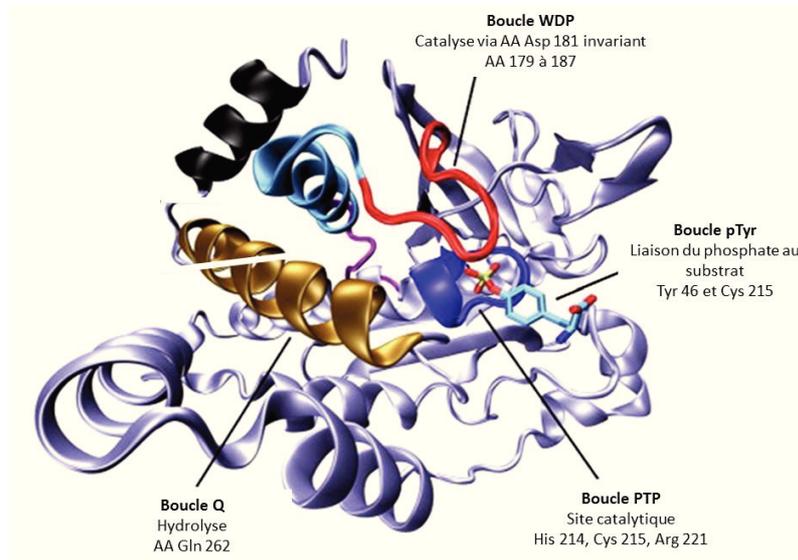


Figure 23 : Structure tridimensionnelle de la PTP1B.

La boucle PTP, site catalytique en N-terminal, est constituée de l'histidine 214, de la cystéine 215 et de l'arginine 221. Autour de ce site, s'organisent trois boucles spécifiques que sont la boucle WDP (essentielle à la réaction catalytique), la boucle Q (contenant la glutamine 262 essentielle à l'hydrolyse) et la boucle pTyr (interaction entre la tyrosine 46 et la cystéine 215 permettant la liaison du groupement phosphate au substrat).

Figure issue et adaptée de Kamerlin *et al.*, *Biochem Biophys Res Comm*, 2007 ³⁴⁶.

- La boucle WDP (Tryptophane – Aspartate – Proline) : formée des résidus 179 à 187 agissant comme un acide lors de la réaction catalytique. Cette boucle contient notamment l'aspartate 181 invariant jouant un rôle essentiel lors de la catalyse ³⁴⁷ ;
- La boucle Q : contient notamment l'AA glutamine 262 permettant l'hydrolyse de l'intermédiaire cystéinyl-phosphate lors de la réaction catalytique ;
- La boucle pTyr : formée par l'interaction entre la tyrosine 46 très conservée contribuant à la spécificité de la PTP1B et la cystéine 215 en position invariante, cette boucle permet la liaison du groupement phosphate au substrat lors de la réaction catalytique illustrée en figure 24.

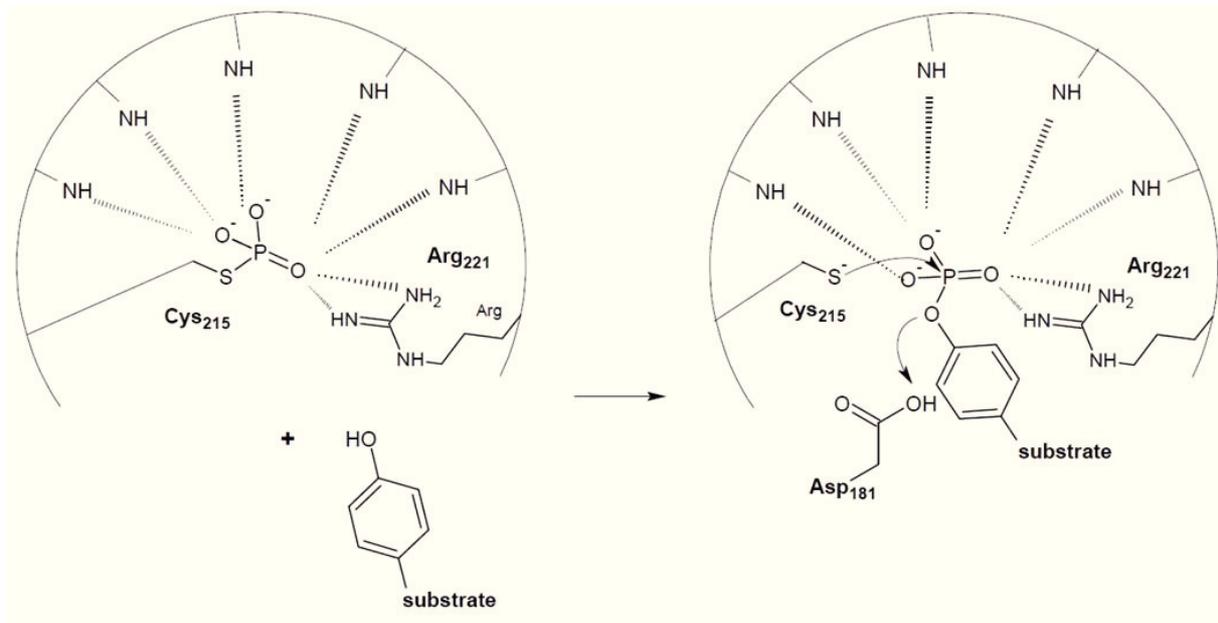


Figure 24 : Mécanisme de la réaction catalytique de PTP1B.

La boucle pTyr formée par l'interaction entre la tyrosine 46 et la cystéine 215 permet la liaison du groupement phosphate au substrat lors de la réaction catalytique.

Figure issue et adaptée de Kim *et al.*, *Review BMB Report*, 2012 ³⁴⁸.

Le site C-terminal, petit domaine hydrophobe de 35 AA, est nécessaire et suffisant à la localisation prédominante de la PTP1B à la surface du RE ³⁴⁹. Il permet également l'orientation de la PTP1B vers la face cytosolique du RE ³⁴⁴. Comme nous l'avons évoqué, cette enzyme présente une expression et une activité catalytique importante étroitement régulées par différents mécanismes détaillés ci-après.

b. Régulation de l'expression génique de la PTP1B

La PTP1B est une enzyme dont l'expression est finement régulée par différents mécanismes dont certains seront détaillés ici.

i. Régulation par les facteurs de transcription

Ptpn1 est un gène simple brin localisé sur le chromosome 20 dans la région q13.1-q13.2 ³⁵⁰. Les études de caractérisation du promoteur de la PTP1B présentent un motif avec les caractéristiques d'un élément de réponse au stress appelé *p210 Bcr-Abl-responsive sequence* (PRS) qui lie des facteurs de transcription, protéines en doigt de zinc (Sp3 et Sp1 ou Egr-1) capables de moduler l'activation du promoteur de la PTP1B en se fixant sur la boîte GC. Egr-1 et les membres de la famille Sp jouent un rôle dans le contrôle de l'activité du promoteur humain de la PTP1B. Egr-1 agit comme suppresseur de l'expression de PTP1B ³⁵¹. De même, un autre facteur de transcription *Y box-binding protein-1* (YB-1)

agit sur l'activité du promoteur de PTP1B. En effet, une surexpression de YB-1 résulte en une augmentation de l'activité du promoteur et donc en une augmentation des taux de PTP1B. YB-1 apparaît donc comme un régulateur important de l'expression de PTP1B avec un rôle particulier dans la transduction du signal induit par les cytokines et par l'insuline ³⁵² (figure 25).

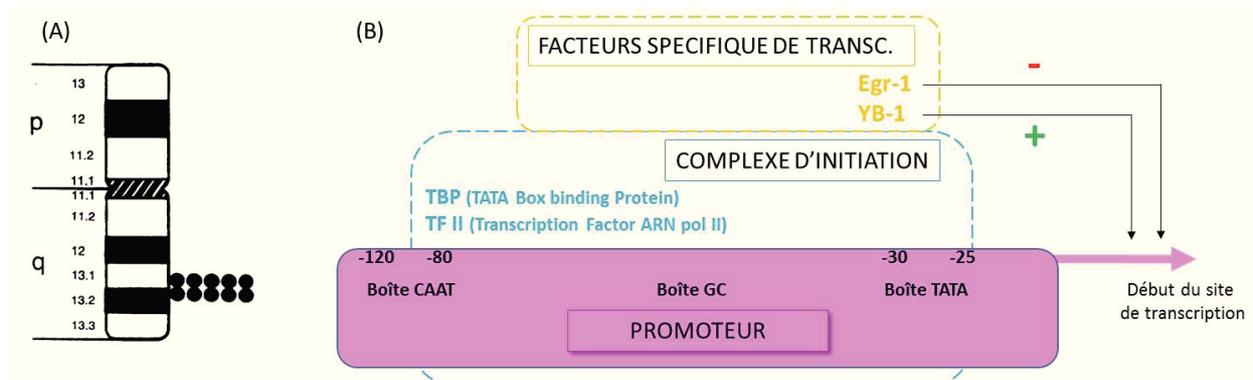


Figure 25 : Localisation chromosomique de PTP1B et régulation par les facteurs de transcription.

(A) Représentation schématique du chromosome 20 avec l'emplacement du gène *ptpn1* codant pour la PTP1B dans la région q13.1 q13.2. Figure issue de Brown-Shimer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1990 ³⁵⁰.

(B) Représentation schématique du promoteur de la PTP1B. Le promoteur, situé en amont du début de la région transcrite, est constitué de différentes boîtes reconnues par le complexe d'initiation composé de la TBP (TATA Box Binding Protein) et de la TF II (Transcription Factor ARN pol II). Dans le cas du promoteur de la PTP1B, des facteurs spécifiques de transcription modulent son activation. Par exemple, Egr-1 agit comme suppresseur de l'expression de PTP1B et YB-1 agit comme activateur de l'expression de PTP1B.

D'autre part, une étude montre que l'expression de la PTP1B est régulée par NF- κ B. Ainsi, l'inflammation du tissu adipeux et le TNF- α , cytokine pro-inflammatoire, régulent l'expression de PTP1B *in vivo* via la voie NF- κ B ³⁵³. Enfin, des études récentes démontrent le rôle des miRs, séquence d'ARN simple brin régulateur de l'expression génique, dans la régulation de l'expression de PTP1B. L'utilisation de miR-210 ciblant et inhibant ainsi l'expression du gène de la PTP1B après un infarctus du myocarde pourrait permettre l'amélioration des fonctions myocardiques ventriculaires gauches dans une telle pathologie ³⁵⁴. Dans une autre étude, les auteurs montrent que la dérégulation de miR-122 entraîne une insulino-résistance hépatique par augmentation de l'activité post-transcriptionnelle de PTP1B sur la voie JNK ³⁵⁵.

ii. Régulation par le glucose et l'insuline

D'autres études, concernant les effets du glucose et de l'insuline étroitement liés à la PTP1B, montrent que le D-glucose, de manière dose-dépendante, renforce l'activité du promoteur de la PTP1B et son expression en ARNm. Sp1, protéine spécifique agissant comme régulateur positif du promoteur de PTP1B, est activée *via* la voie PKC. Ainsi, l'expression de PTP1B est augmentée dans des hépatocytes en culture et dans le foie, *via* l'activation de la voie PKC et donc de Sp1, ce qui explique en partie la

toxicité du glucose dans le diabète ³⁵⁶. De même, la résistance du RI provoquée par de fortes concentrations en glucose est associée à une augmentation de l'expression et de l'activité de la PTP1B ³⁵⁷. Dans d'autres études, il a été mis en évidence que l'utilisation d'oligonucléotides anti-sens se liant sélectivement à l'ARNm de la PTP1B entraînait une réduction de l'expression de la PTP1B ³⁵⁸. Cette réduction d'expression s'accompagne d'une diminution de l'hyperglycémie avec une augmentation de la sensibilité à l'insuline corrélée à une augmentation de la phosphorylation de PKB chez les souris *ob/ob* ou *db/db* ³⁵⁹.

Tous ces éléments témoignent d'une relation complexe entre les différents mécanismes de régulation de l'expression de PTP1B auxquels s'ajoutent les éléments de régulation de l'activité de cette enzyme qui seront détaillés dans le paragraphe suivant.

c. Régulation de l'activité de la PTP1B

La PTP1B peut subir de nombreuses modifications post-traductionnelles telles que l'oxydation, la phosphorylation, la sumoylation et la protéolyse. Ces modifications entraînent de multiples variations dans l'activité de l'enzyme dont une partie sera présentée dans ce paragraphe ³⁶⁰.

i. Oxydation

L'activité de la PTP1B est régulée *in vivo* par un mécanisme d'oxydation impliquant le résidu cystéine 215 situé dans le motif signature du site catalytique en N-terminal (figure 22). Une étude a montré que la cystéine 215 est sensible à l'H₂O₂. En effet, une incubation d'H₂O₂ entraîne une inactivation de la PTP1B, temps et concentration dépendants ³⁶¹. Des études de cristallographie en rayons X et de spectrométrie de masse ont permis d'examiner les changements de l'enzyme en réponse à l'oxydation. Il a été montré que la cystéine pouvait passer sous forme d'acide sulfinique (Cys-SO₂H) puis d'acide sulfonique (Cys-SO₃H) et ce de manière réversible ^{362,363}. Cette oxydation du résidu cystéine 215 s'accompagne de profonds changements dans la structure tridimensionnelle du site actif de la PTP1B avec des modifications de conformation des boucles Q et pTyr entraînant l'inhibition de l'activité de la PTP1B ³⁶³.

ii. Phosphorylation

Les effets de la phosphorylation régulant l'activité de la PTP1B sont plus controversés. Il existe de nombreux sites de phosphorylation à la fois sur la partie N-terminale et aussi sur la partie C-terminale mettant en jeu des résidus sérine et tyrosine. Concernant les résidus sérine, le site de la sérine 378 est le site majeur de phosphorylation par la PKC. L'augmentation de la phosphorylation de

PTP1B sur ce site permet la transition de la phase G2 en phase M dans le cycle cellulaire, grâce à une modification de la structure des microtubules et du RE ³⁶⁴. De même, la phosphorylation de PTP1B par la protéine Akt sur le résidu sérine 50 peut moduler négativement son activité phosphatase créant un mécanisme de rétrocontrôle positif dans la régulation de la signalisation insulinaire ³⁶⁵. Concernant les résidus tyrosine, il a été montré que l'insuline stimule la phosphorylation des résidus Y66, Y152 et Y153 modulant ainsi l'activité catalytique de la PTP1B. Il semble que les résidus Y152 et Y153 jouent un rôle essentiel au maintien de l'interaction protéique et que l'altération de ces résidus entraîne notamment un défaut d'interaction de la PTP1B avec le RI ³⁶⁶.

iii. Sumoylation

Les protéines *Small Ubiquitin-related Modifier* (SUMO) représentent d'importants régulateurs des fonctions cellulaires dont le mécanisme d'action est connu sous le nom de SUMOylation. Cette modification post-traductionnelle entraîne la liaison covalente d'une ou plusieurs protéines SUMO avec une lysine d'une protéine cible. D'une manière générale, la sumoylation est à l'origine de régulations protéiques importantes ³⁶⁷. Concernant la PTP1B, la sumoylation se produit sur les résidus lysine K335 et K347 placés en C-terminal et entraîne une réduction de son activité catalytique et inhibe, entre autres, les effets négatifs de PTP1B sur la signalisation insulinaire. La sumoylation stimulée par l'insuline sur la PTP1B permet une régulation négative transitoire de cette enzyme suggérant que la sumoylation module la relation du complexe enzyme-substrat jouant un rôle dans le métabolisme ³⁶⁸.

iv. Protéolyse

Les calpaïnes sont des protéases ubiquitaires ciblant les résidus cystéine et entraînant une protéolyse. Le clivage par la calpaïne-1 du domaine C-terminal, particulièrement de la partie permettant l'adressage de la PTP1B au RE, entraîne une relocalisation cellulaire du domaine catalytique de la protéine, de la membrane du RE au cytosol ³⁶⁹. Ce mécanisme se déroule notamment dans les plaquettes activées. Plusieurs études ont montré que PTP1B est une des cibles physiologiques de calpaïne-1 au niveau plaquettaire. Ainsi, les animaux délétés génétiquement pour la calpaïne-1 au niveau plaquettaire (*Capn1^{-/-}*) présentent une accumulation de PTP1B favorisant un défaut d'agrégation plaquettaire ^{370,371}.

Les exemples de modifications post-traductionnelles et de leurs conséquences sur l'activité de la PTP1B présentés ici n'illustrent qu'une partie des variations de l'activité de PTP1B pouvant être diverses et variées suivant le stimulus et l'environnement cellulaire. Ils témoignent de la dynamique et

de la précision de cette enzyme dans la régulation des voies de signalisation cellulaire dont les substrats vont être décrits dans la section suivante.

d. Cibles de PTP1B

i. *Insuline, EGFR et JAK comme substrats*

L'identification des substrats de PTP1B a fait l'objet de nombreuses études et a permis de mettre en évidence des dizaines de familles de cibles diverses. La PTP1B interagit avec des protéines responsables de nombreux processus cellulaires. Initialement, la PTP1B a été étudiée pour son rôle primordial dans la voie de signalisation de l'insuline où elle interagit avec le RI, sujet que nous aborderons plus largement dans le paragraphe suivant. PTP1B joue aussi un rôle dans l'inhibition de la signalisation induite par l'*epidermal growth factor receptor* (EGFR) qui est reconnu dans le RE par la PTP1B³⁷². En effet, la PTP1B interagit avec l'EGFR et déphosphoryle les résidus tyrosine sur le récepteur activé. Cette interaction se produit après l'endocytose de l'EGFR régulant ainsi son activité en aval de la liaison avec le récepteur^{373,374}.

PTP1B a également été décrite comme un régulateur négatif des protéines de la famille des *Janus kinase* (JAK) par reconnaissance et déphosphorylation du motif caractéristique constitué de deux résidus tyrosine. En effet, cette protéine limite la force et la durée de la réponse cytokinique activée par la liaison des cytokines à la surface cellulaire entraînant une activation des JAK^{375,376}.

ii. *La réponse UPR comme cible de PTP1B*

Pour la première fois en 2004, un lien direct est mis en évidence entre PTP1B et le stress du réticulum endoplasmique. PTP1B régule la réponse UPR dans le RE et l'absence de PTP1B entraîne une diminution du signal IRE-1 induite par le stress du RE. Dans cette même étude, les auteurs montrent que dans les fibroblastes de souris PTP1B^{-/-}, l'activation de JNK, de p38^{MAPK} et le clivage de XBP-1 sont inhibés. Ainsi, PTP1B se présente non pas comme une enzyme passive du RE mais bien comme une protéine essentielle dans la voie de signalisation du stress du RE activée par IRE-1³⁷⁷. En effet, dans une autre étude, Agouni *et al.* montrent que les taux d'expression en ARNm et protéique de PTP1B sont augmentés en réponse à un SRE sur une lignée cellulaire de carcinome hépatique et que les animaux spécifiquement délétés pour la PTP1B au niveau du foie présentent une inhibition des voies moléculaires du SRE induite par la tunicamycine, molécule inductrice du SRE³⁷⁸. Ces mêmes animaux sont protégés contre le SRE induit par un régime gras avec diminution de la phosphorylation des voies moléculaires telles que PERK et Eif2 α ³⁷⁹. Plus récemment, la PERK, molécule essentielle des voies de signalisation du SRE, a été identifiée comme un substrat direct de PTP1B. L'enzyme va être responsable

de la déphosphorylation de la tyrosine 619 et permettre ainsi l'inactivation de PERK. Ainsi, une inactivation de PTP1B entraîne une phosphorylation de PERK et une activation des voies du SRE³⁸⁰.

Plus récemment dans notre laboratoire, les travaux de thèse du Dr. Pierre-Alain Thiébaud ont permis de mettre en évidence le rôle du SRE dans le développement du sepsis. Les résultats ont montré que les animaux PTP1B^{-/-} soumis à un SRE présentent une amélioration de la fonction cardiovasculaire accompagnée d'une modulation des voies du SRE. La PTP1B joue donc un rôle primordial dans la régulation du SRE et son inhibition pharmacologique ou sa délétion génétique apparaît comme une piste thérapeutique prometteuse avec des effets cardiovasculaires protecteurs lors de pathologies caractérisées par un SRE telles que le sepsis (Thiébaud *et al.*, en cours de publication).

4. Rôle de PTP1B sur le métabolisme en physiologie et en pathologie

a. Sur la voie de la leptine

La leptine est une hormone peptidique sécrétée par le tissu adipeux responsable, par son action au niveau central et notamment dans l'hypothalamus, de la régulation de la prise alimentaire et de l'homéostasie énergétique. La liaison de la leptine à son récepteur, exprimé dans le cerveau et les tissus périphériques, entraîne l'activation de JAK2 et la phosphorylation des résidus tyrosine permettant un recrutement de *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* (STAT3). STAT3 est ensuite phosphorylé, dimérisé puis transloqué dans le noyau pour réguler la transcription de gènes cibles^{139,381,382} (figure 26). Comme nous l'avons vu précédemment, PTP1B est capable d'agir sur son substrat JAK2 et de le déphosphoryler entraînant ainsi une atténuation de la voie de signalisation de la leptine par blocage de la translocation de STAT3 dans le noyau.

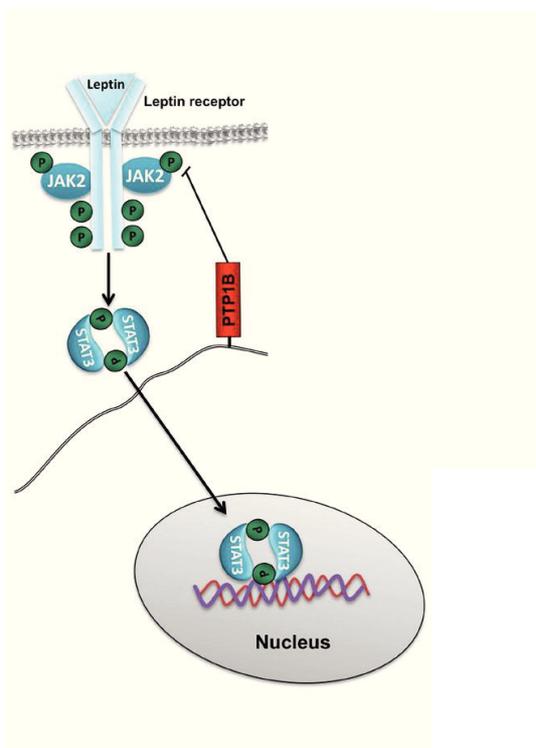


Figure 26 : Voie de signalisation de la leptine et rôle de PTP1B en physiologie.

La liaison de la leptine à son récepteur entraîne l'activation de JAK2 par phosphorylation permettant un recrutement du STAT3 qui est ensuite phosphorylé, dimérisé et transloqué dans le noyau pour réguler la transcription.

PTP1B déphosphoryle son substrat JAK2 entraînant une atténuation de la voie de signalisation de la leptine par blocage de la translocation de STAT3.

Figure issue et adaptée de Bakke *et al.*, *Semin Cell Dev Biol*, 2015¹³⁹.

Ainsi, de nombreuses études se sont intéressées au rôle de PTP1B dans la voie de la leptine, à des fins thérapeutiques. L'étude de Tsou *et al.* a montré que la déficience génétique en PTP1B au niveau de l'hypothalamus entraîne une diminution du poids corporel et de l'adiposité sans amélioration de la tolérance au glucose chez des souris après un régime riche en graisses^{383,384}. Dans une autre étude, la délétion génétique de PTP1B au niveau neuronal permet une réduction du poids corporel et de l'adiposité avec une augmentation de l'activité et de la dépense énergétique. Les animaux présentent une hypersensibilité à la leptine associée à des taux sérologiques anormalement élevés en leptine ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation de STAT3 hypothalamique induite par la leptine³⁸⁵⁻³⁸⁷. Ces études suggèrent que la PTP1B, avec son action hypothalamique, contribue au contrôle central de la balance énergétique *via* la voie de signalisation dépendante du récepteur à la leptine. Ainsi, la PTP1B apparaît comme une cible thérapeutique potentielle pour le traitement de la résistance à la leptine dans l'obésité.

b. Sur la voie de l'insuline

Comme nous l'avons vu précédemment, l'insuline est sécrétée par les cellules β -pancréatiques et représente un régulateur majeur de l'homéostasie glucidique. Tonks *et al.* mettent en évidence en 1988 et pour la première fois, le rôle de PTP1B comme régulateur négatif dans la voie de signalisation de l'insuline par déphosphorylation des résidus tyrosine du récepteur activé³³¹(figure 27).

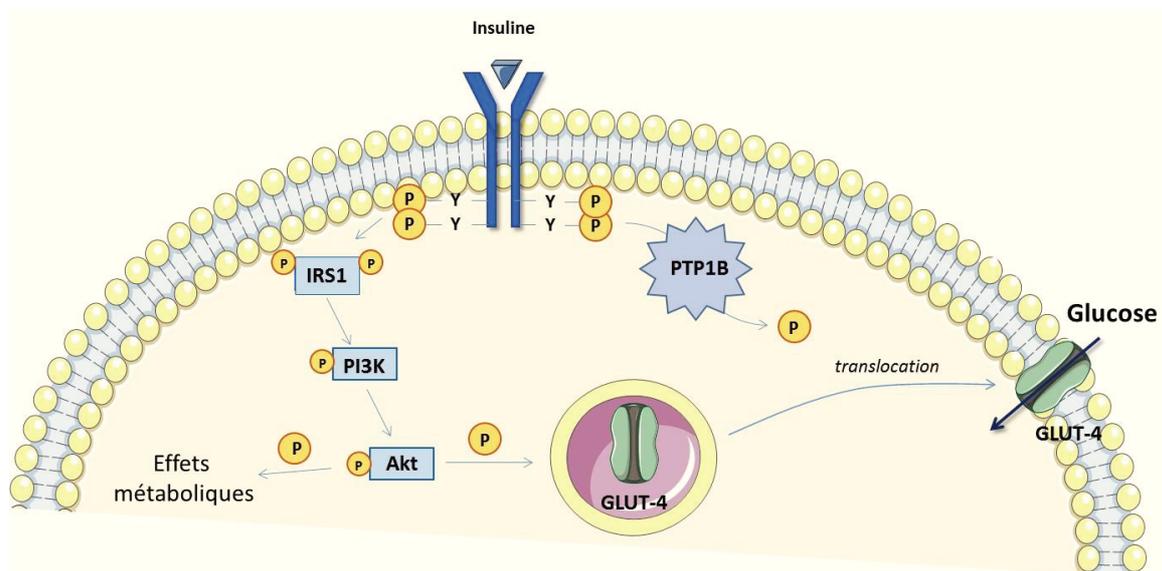


Figure 27 : Voie de signalisation de l'insuline et rôle de PTP1B en physiologie.

Le signal insulinaire est initié par la liaison de l'insuline à son récepteur spécifique (RI) entraînant, de par son auto-phosphorylation sur les résidus tyrosine, l'activation de la voie IRS-1/PI3k/Akt. L'activation de cette voie va permettre la phosphorylation de nombreuses cibles en particulier celles stimulant la translocation des GLUT-4 à la membrane, permettant une régulation de la glycémie par entrée de glucose dans les organes insulino-dépendants.

De nombreuses études *in vitro* ont clairement établi le rôle de PTP1B dans la régulation négative de la voie de signalisation à l'insuline³⁸⁸. L'équipe de Venable montre que la surexpression

de PTP1B dans des adipocytes diminue de 50 à 60% la phosphorylation des résidus tyrosine du RI, du IRS-1 et de l'activité PI3K ³⁸⁹. Une autre étude employant la surexpression dans des cellules L6 myocytaires et FaO hépatiques conclue de manière similaire en ajoutant que la synthèse du glycogène associée est elle aussi altérée par la surexpression de PTP1B ³⁹⁰. L'étude de Chen *et al.* montre que dans les cellules adipeuses surexprimant la PTP1B, le nombre de transporteurs GLUT-4 localisés à la membrane des cellules est significativement diminué par rapport aux cellules contrôles et ce indépendamment de la dose d'insuline présente dans le milieu. Cette diminution du nombre de transporteurs s'accompagne d'un défaut de translocation des GLUT-4 à la membrane ³⁹¹. Dans les cellules hépatocytaires et adipocytaires de type 3T3-L1, la présence d'ERO telles que l'H₂O₂ induite par l'insuline entraîne une oxydation réversible et inhibitrice de la PTP1B. Cet effet influence l'autophosphorylation des récepteurs stimulée par l'insuline et la phosphorylation des résidus tyrosine des protéines d'IRS-1. Cette étude témoigne donc de l'importance de la régulation dans la transduction du signal dans la voie de signalisation de l'insuline ³⁹².

Par la suite, de nombreuses études *in vivo*, via l'utilisation de souris déficientes en PTP1B, a permis de confirmer l'importance de PTP1B dans le métabolisme insulinaire. La plupart de ces résultats portant sur les études phares d'Elchebly, de Klamon *et al.* seront discutées dans le paragraphe III/ 5) a. i.

c. Diabète et autres troubles métaboliques

Comme nous l'avons évoqué précédemment, le gène *ptpn1* codant pour la PTP1B se situe sur le chromosome 20 (Partie III/ 2) b. i.). Sur ce même chromosome et à proximité du gène *ptpn1*, se situent d'autres gènes codant pour des facteurs impliqués dans le DT2 ³⁹³. De nombreuses études ont montré un lien entre la mutation du gène *ptpn1* et le DT2. En effet, une mutation du résidu proline en résidu leucine en position 387 est associée à l'apparition d'un DT2 ³⁹⁴. Une variation de la région 3' non traduite du gène de la PTP1B entraîne une surexpression de la PTP1B associée à la mise en place d'une insulino-résistance avec un indice *Homeostasis Model Assessment* (HOMA) élevé et une augmentation sérique du taux de cholestérol et des triglycérides ³⁹⁵. Dans une étude française, les auteurs mettent en évidence qu'une dizaine de *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) du gène *ptpn1* sont associés à la survenue d'un DT2 associé ou non à une obésité ou une variabilité métabolique ³⁹⁶. Des résultats similaires ont été retrouvés dans une étude comparative portant sur plus de 300 patients de type caucasien divisés en deux groupes atteints et non atteints de DT2 ³⁹⁷. Enfin, une étude réalisée au sein de notre laboratoire par le Dr. Julie Maupoint, montre que l'inactivation sélective de la PTP1B endothéliale prévient l'IR, améliore la sensibilité à l'insuline et diminue l'atteinte cardiovasculaire associée dans un modèle de DT2 induit par un régime riche en graisses et en fructose.

L'ensemble de ces études viennent pointer du doigt l'évidente corrélation entre le gène de la PTP1B, son expression et la survenue de diabète, d'obésité et d'insulino-résistance chez l'animal et chez l'Homme.

5. Rôle de la PTP1B en pathologie

Dans le paragraphe précédent, nous avons évoqué le rôle de PTP1B dans le métabolisme en physiologique et en pathologie dans les troubles associés tels que le diabète ou l'insulino-résistance. Nous avons également pu constater que l'équilibre de la balance phosphorylation/déphosphorylation maintenu par PTP1B est important pour l'homéostasie cellulaire et joue un rôle primordial dans de nombreux mécanismes cellulaires. De ce fait, une dérégulation ou une modification de l'activité de PTP1B va, sans surprise, amener à des désordres cellulaires et fonctionnels impliqués dans de nombreuses pathologies humaines (figure 28)

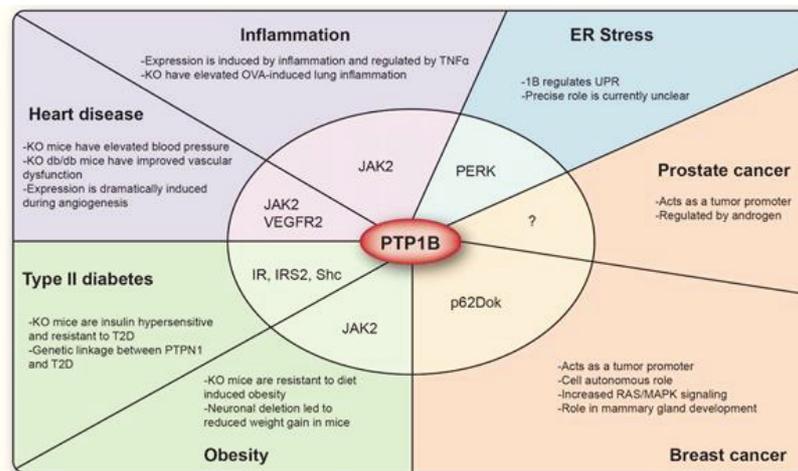


Figure 28 : Rôle de PTP1B en pathologie.

PTP1B est connu pour jouer un rôle important dans les troubles métaboliques. De nombreuses études montrent aussi son implication dans d'autres mécanismes tels que le stress du RE, l'inflammation ou dans les pathologies cardiaques et dans les cancers. Illustration issue de Feldhammer *et al.*, *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2013 ³⁹⁸.

a. Insuffisance cardiaque chronique

De nombreuses études ont observé le rôle de PTP1B dans la fonction cardiaque en pathologie et ont mis en évidence que l'inhibition ou la délétion génétique de PTP1B est bénéfique pour l'amélioration de la fonction cardiaque. Les travaux de notre laboratoire notamment ont mis en évidence que les animaux PTP1B^{-/-} présentent un remodelage ventriculaire gauche réduit, une amélioration de la fonction ventriculaire gauche et une diminution de la fibrose cardiaque accompagnés d'une amélioration de la sensibilité à l'insuline et de la fonction endothéliale dans un modèle d'insuffisance cardiaque chronique ³⁹⁹. Par la suite, d'autres travaux ont montré que la délétion

généétique de PTP1B entraîne une réduction de l'insuffisance cardiaque induite par un infarctus du myocarde en favorisant le processus d'angiogenèse, d'artériogenèse, la perfusion myocardique et la fonction diastolique *via* la régulation de la voie de signalisation VEGFR2^{400,401}. Sur la base de ces données et sur d'autres études montrant que l'insuffisance cardiaque chronique s'accompagne d'une dysfonction endothéliale profonde avec une diminution de la production du NO endothélial, les résultats précédemment obtenus ont été confirmés par le travail de thèse du Dr. Julie Maupoint démontrant que seule la déficience génétique en PTP1B au niveau de l'endothélium vasculaire est suffisante pour réduire la dysfonction cardiaque après infarctus du myocarde en prévenant l'apparition d'une dysfonction endothéliale⁴⁰²⁻⁴⁰⁴.

b. Cancer

Le rôle de PTP1B dans les cancers a fait l'objet de nombreuses études mais reste aujourd'hui très complexe. En effet, PTP1B joue un double rôle dans ces pathologies dépendant du substrat impliqué, tantôt suppresseur, tantôt activateur de tumeurs (figure 29).

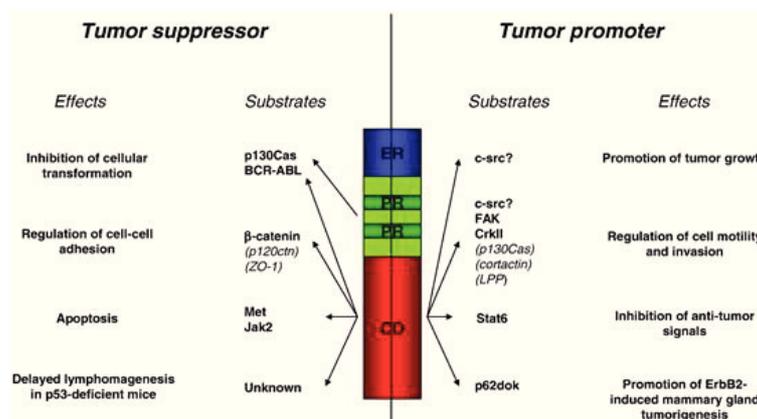


Figure 29 : Double rôle complexe de PTP1B dans les cancers.

En fonction du substrat impliqué, PTP1B va jouer un rôle tantôt oncogène, tantôt oncosuppresseur. Illustration issue de Lessard *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2010⁴⁰⁵.

i. PTP1B comme oncosuppresseur

La déphosphorylation de substrats par PTP1B suggère que sa surexpression protège contre la transformation cellulaire induite par les PTKs. Cette hypothèse a en effet été vérifiée notamment par des expérimentations en culture cellulaire décrivant que la surexpression de PTP1B diminue l'oncogenèse des cellules tumorales *v-src* et *neu*^{406,407}. Dans une étude portant sur les carcinomes hépatiques, les auteurs ont montré que PTP1B est sous-exprimée dans les tissus tumoraux des patients atteints et que cette faible expression de PTP1B témoigne d'un mauvais diagnostic avec une augmentation des caractéristiques d'agression clinico-pathologiques et une mortalité augmentée⁴⁰⁸.

ii. PTP1B comme oncogène

Dans une étude de Wiener, les auteurs rapportent que dans les biopsies tumorales mammaires humaines, la PTP1B est surexprimée dans 72.4% des cas, à des stades de développement différents, confirmant le rôle de PTP1B dans le développement des cancers du sein ⁴⁰⁹. Dans l'étude de Julien *et al.*, la délétion génétique de PTP1B ou l'inhibition pharmacologique résultent en une latence significative à l'apparition d'une tumeur mammaire. Au contraire, la surexpression de PTP1B dans les glandes mammaires entraîne le développement spontané de cancer du sein ⁴¹⁰. L'expression de PTP1B est aussi significativement augmentée dans les tumeurs de la prostate. La PTP1B majore les phénomènes de migration et d'invasion cellulaires ainsi que la croissance et la métastase des cellules tumorales ⁴¹¹.

Malgré ce rôle activateur de tumeurs, il est important de mentionner que les souris génétiquement délétées pour la PTP1B ne développent pas spontanément de tumeurs et ne présentent pas une incidence plus élevée, ceci s'expliquant par le double rôle de PTP1B dépendant du contexte cellulaire mais aussi par la mise en place de mécanismes compensatoires limitant l'hyperactivation des voies de signalisation induites par l'absence de PTP1B ^{374,412}.

c. Vieillessement

Le vieillissement s'accompagne souvent d'une réduction de la sensibilité à l'insuline et d'une dysfonction cardiaque. Fang *et al.* ont montré que les souris âgées présentent un taux d'expression de PTP1B plus élevé que les souris jeunes, accompagné d'une diminution de la phosphorylation du RI ⁴¹³. Dans une autre étude, des résultats ont mis en évidence que la déficience génétique totale en PTP1B protège contre l'accumulation de masse grasse, l'insulino-résistance, l'inflammation et l'hypoxie du tissu adipeux qui se mettent en place durant le vieillissement ⁴¹⁴. Des études de notre laboratoire ont également mis en évidence que la délétion génétique de PTP1B limite la dysfonction cardiaque systolique et diastolique par diminution de la fibrose cardiaque et de l'hypertrophie dans un modèle de souris sénescences (données non publiées).

d. Sepsis

Comme nous l'avons vu précédemment, les cibles thérapeutiques et les traitements dans le sepsis ont souvent échoué démontrant la complexité de cette pathologie combinant dysfonctions d'organes et troubles métaboliques. Peu d'équipes se sont intéressées au rôle de PTP1B dans le sepsis. Nous pouvons citer l'étude de Lyu *et al.* qui montre que le taux de PTP1B dans le cerveau augmente

après une injection de LPS chez le rat, entraînant une surexpression des ERO et une diminution du potentiel de membrane mitochondriale. Ces résultats suggèrent un rôle de PTP1B dans la dysfonction mitochondriale cérébrale induite par le LPS ⁴¹⁵. Une étude portant sur la délétion myéloïde de PTP1B montre que ces animaux présentent une diminution des dommages hépatiques associés à une diminution de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires *via* une amélioration de la voie de signalisation STAT3, dans un modèle de LPS injecté à faible dose ⁴¹⁶. À l'inverse, dans une autre étude, les auteurs montrent que l'oxydation de PTP1B contribue à l'apparition d'une dysfonction vasculaire pulmonaire *via* une perturbation des jonctions adhérentes intra-cellulaires dans un modèle *in vitro* de cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires de rat en présence de LPS ⁴¹⁷. Ainsi cette étude tend à montrer l'intérêt de l'expression de PTP1B dans la préservation de la fonction endothéliale au cours du sepsis. De même, il a été démontré que PTP1B est un régulateur négatif de TLR *via* une inhibition de la transcription des facteurs MyD88 et TRIF impliqués dans la production des cytokines pro-inflammatoires. Cette étude est donc en faveur de l'expression de PTP1B dans les mécanismes inflammatoires ⁴¹⁸.

Ainsi, notre laboratoire s'est intéressé à l'effet de la délétion génétique ou de l'inhibition pharmacologique de la PTP1B dans un contexte de choc endotoxinique induit par injection de LPS. Les travaux de thèse du Dr. David Coquerel ont montré que l'administration de LPS favorise la diminution de l'expression de NOSe *via* une baisse de l'activation d'Akt. La délétion génétique de PTP1B permet de restaurer la phosphorylation d'Akt et donc l'expression de NOSe limitant le phénomène de dysfonction endothéliale. Cette délétion génétique réduit également la mortalité et la dysfonction cardiovasculaire *via* une réduction significative de l'inflammation cardiovasculaire ⁶⁵.

Cependant, malgré les troubles métaboliques présents dans le syndrome septique et le rôle décrit de PTP1B dans le métabolisme glucidique, aucune étude de l'effet de la délétion de PTP1B dans le sepsis et précisément sur les troubles du métabolisme glucidique n'a été réalisée jusqu'alors. Au vu des travaux du Dr. David Coquerel montrant l'implication de la voie de signalisation Akt dans le modèle septique, il apparaissait donc utile et nécessaire de s'intéresser à cette voie de signalisation activée par l'insuline qui a donc fait l'objet de mon travail de thèse et dont les résultats seront discutés dans la partie suivante.

L'ensemble des voies de signalisation impliquant la PTP1B en conditions physiologiques et pathologiques est résumé dans la figure 30. Ainsi, la PTP1B étant directement impliquée dans de nombreuses pathologies, son inhibition apparaît comme une cible thérapeutique potentielle faisant l'objet de nombreuses études concernant à la fois des méthodes d'inhibition pharmacologique ou de délétion génétique.

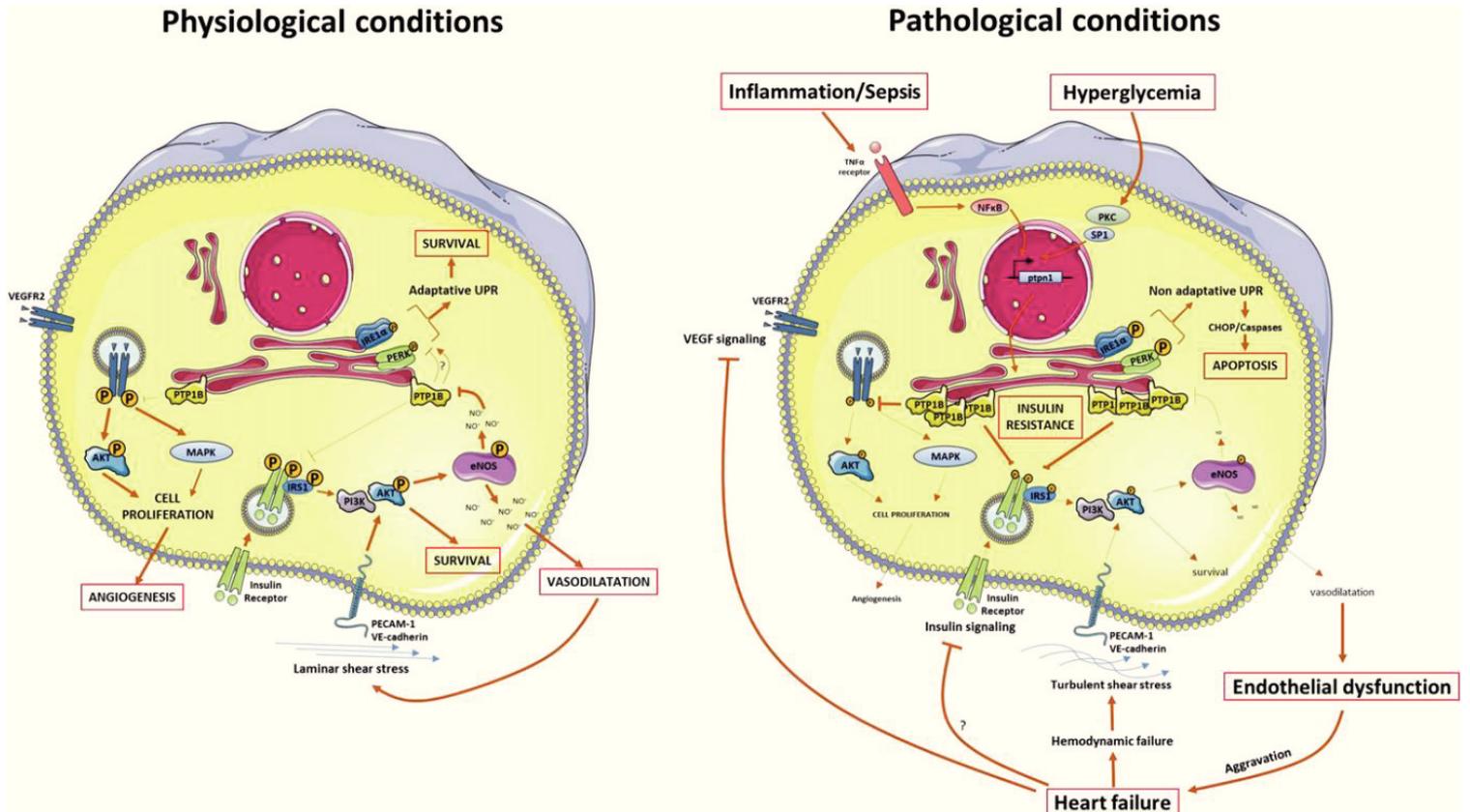


Figure 30 : Voies de signalisation physiologiques et pathologiques régulées par la PTP1B dans le système cardiovasculaire. La PTP1B est un régulateur négatif des récepteurs tyrosine kinases, notamment du RI et du VEGFR2.

(A) En conditions physiologiques, l'endocytose suivant l'activation des récepteurs tyrosine kinase suite à la liaison avec leurs ligands est responsable de l'activation de signaux de survie (Akt, MAPK) et de production de NO. Le NO exerce une régulation négative sur l'activité de la PTP1B *via* la nitrosylation transitoire du site actif permettant d'amplifier la réponse induite par l'activation des récepteurs tyrosine kinase ainsi que la vasodilatation. La localisation de PTP1B à la membrane du réticulum endoplasmique permet une régulation fine de la réponse aux protéines non repliées (UPR), connue pour être un potentialisateur du développement des maladies métaboliques et cardiovasculaires.

(B) En conditions pathologiques, comme le diabète, l'obésité, l'inflammation ou l'infarctus du myocarde, la PTP1B est surexprimée, renforçant son action négative sur les récepteurs tyrosine kinase, aggravant l'insulino-résistance, la vasodilatation NO-induite et l'insuffisance cardiaque.

Figure issue de Thiébaud *et al.*, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2016 ⁴¹⁹.

6. L'inhibition de la PTP1B

Comme nous venons d'en discuter, une dérégulation ou une modification de l'activité de PTP1B peut être à l'origine de nombreuses pathologies humaines. Ainsi, l'inhibition de PTP1B intéresse, depuis de nombreuses années, la communauté scientifique et a fait l'objet de nombreuses études.

a. Délétion génétique totale et spécifique

i. Délétion génétique totale

La déficience génétique en PTP1B s'obtient par délétion des exons 5 et 6 du gène *ptpn1* correspondant au site actif phosphatase de la PTP1B. Les animaux homozygotes ainsi obtenus sont appelés PTP1B^{-/-}. Dans la plupart des études, ces animaux sont utilisés en comparaison avec des

animaux PTP1B^{+/+} ou PTP1B^{+/-}, hétérozygotes pour le gène de la PTP1B. Il est à préciser que les animaux PTP1B^{-/-} sont viables et ne présentent ni retard de croissance, ni problème de santé ⁴²⁰.

L'utilisation d'animaux présentant une déficience génétique totale en PTP1B a permis de mettre en évidence le rôle biologique de PTP1B notamment dans la régulation de l'homéostasie glucidique et du poids corporel. Les souris PTP1B^{-/-} sont résistantes à une prise de poids corporel et restent insulino-sensibles après un régime riche en graisses alors que les souris PTP1B^{+/+} gagnent rapidement du poids et présentent une insulino-résistance ⁴²¹. Ces animaux sont protégés de l'obésité induite par un régime riche en graisses ; ils présentent une adiposité très faible marquée par une réduction de la masse des cellules adipeuses sans diminution du nombre de ces adipocytes ⁴²². Ces animaux, soumis à un diabète de type I par injection de streptozotocine présentent une protection endothéliale activée par la voie des prostaglandines ⁴²³.

Par la suite, l'utilisation de souris déficientes en PTP1B spécifiquement dans certains tissus a permis d'identifier le rôle des différents tissus dans les phénomènes observés.

ii. Délétion génétique spécifique

La délétion spécifique de PTP1B hépatique, obtenue chez les animaux Alb-Cre-PTP1B^{-/-}, a permis de mettre en évidence une amélioration de l'homéostasie glucidique et lipidique, une augmentation de la suppression de la production du glucose hépatique et une augmentation de la signalisation insulinique dans le foie après un régime riche en graisses ³⁷⁹. La mise au point de souris adip-crePTP1B^{-/-} (*adipocyte-specific-PTP1B knockout*), spécifiquement invalidées pour la PTP1B au niveau du tissu adipeux, utilisant la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur adiponectine a permis de mettre en évidence que ces animaux, soumis à un régime riche en graisses, ne présentent pas de différence de poids corporel ou de masse grasse mais ont une augmentation des taux circulants de leptine et de glucose, une plus forte leptino-sensibilité et une augmentation de la lipogenèse. Cette étude montre que la PTP1B ne joue pas son rôle de régulateur majeur du RI dans les adipocytes ⁴²⁴. Les animaux avec une délétion génétique en PTP1B au niveau du muscle squelettique ont un poids corporel et une adiposité similaires aux animaux contrôles soumis à un régime similaire. Cependant, ces animaux présentent une augmentation de la sensibilité à l'insuline et une amélioration de la tolérance au glucose. Ainsi ces résultats montrent que la PTP1B musculaire joue un rôle majeur dans la régulation de la voie de signalisation à l'insuline et de l'homéostasie glucidique indépendamment de l'adiposité ⁴²⁵. La mise au point d'animaux présentant une délétion génétique de PTP1B au niveau neuronal ou des neurones pro-opiomélanocortines a permis de mettre en évidence que ces animaux

présentent un poids corporel et une adiposité réduits avec une augmentation de l'activité et de la dépense énergétique associée à une hypersensibilité à la leptine^{385,426}.

Cependant, même si l'utilisation d'animaux transgéniques par délétion totale ou tissu-spécifique de PTP1B reste un moyen expérimental permettant de comprendre les mécanismes physiopathologiques mis en jeu, cette méthode est non applicable à la mise en place de thérapeutique transversale humaine. A l'inverse, l'étude avec des inhibiteurs pharmacologiques présente un intérêt scientifique particulier qui sera discuté dans le paragraphe suivant.

b. Inhibition pharmacologique

i. *Challenge du développement et difficultés biochimiques*

Le développement d'inhibiteurs de PTPs consiste en la mise au point de petites molécules inhibitrices combinant spécificité et biodisponibilité. Comme nous l'avons vu précédemment, le site catalytique des PTPs est hautement conservé et possède une charge positive très forte ; ainsi, obtenir des inhibiteurs sélectifs qui se lient à la boucle pTyr est très difficile et a longtemps montré des résultats peu concluants^{419,427}. Les récentes avancées dans les technologies de criblage à haut débit ont permis de mettre en évidence la complexité des structures biologiques et donc de comprendre les interactions PTP/inhibiteur spécifique. Ainsi, une approche prometteuse est le développement de ligands bivalents sélectifs interagissant à la fois avec le site actif pTyr et un site périphérique distinct³⁴⁵. Depuis son identification, plus de 250 articles ont été publiés sur le développement d'inhibiteurs de la PTP1B. Une revue des principales études portant sur la mise au point de ces inhibiteurs pharmacologiques sera discutée dans le paragraphe suivant.

ii. *Evolution des inhibiteurs pharmacologiques de la PTP1B*

Les premières études, datant d'une trentaine d'années, ont montré le rôle de nombreuses molécules dans l'inhibition de la PTP1B. Une étude de 1981 démontre qu'une faible dose de zinc (Zn^{2+}) entraîne une inhibition complète de PTP1B dans des cellules de carcinomes épidermoïdes humaines comparée à d'autres cations divalents tels que le Mg^{2+} , présentant un effet partiel, ou le Ca^{2+} qui ne présente aucun effet^{331,428,429}. Dans cette étude, les auteurs montrent que cette inhibition peut être annulée par l'EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique)⁴²⁹. Une autre étude montre que l'orthovanadate, connu pour inhiber de nombreuses réactions enzymatiques, entraîne une forte inhibition de l'activité de la PTP1B en empêchant le mécanisme de déphosphorylation notamment sur le résidu sérine, et ce toujours sur des cellules de carcinomes épidermoïdes humaines. Les auteurs de cette étude témoignent néanmoins d'une plus grande spécificité d'inhibition par l'orthovanadate que

par le zinc⁴³⁰. Tonks *et al.* se sont quant à eux intéressés aux polymères anioniques comme inhibiteurs de PTP1B. Les effets de plusieurs polymères ont été testés ; le copolymère glutamate/tyrosine (poly(Glu/Tyr)) entraîne une inhibition non-compétitive de la PTP1B et les homopolymères polyglutamate et polytyrosine favorisent également une inhibition de la PTP1B dans des concentrations plus élevées⁴³¹. Ces premières études, bien qu'ayant le mérite d'initier les travaux sur l'inhibition de la PTP1B, n'expliquent que très succinctement le mécanisme d'action des molécules inhibitrices et montrent, dans la plupart des cas, une inhibition peu spécifique. Des études plus récentes ont montré des résultats très encourageants. Les études de notre laboratoire portant sur des inhibiteurs sélectifs de PTP1B tels que l'AS279, ont montré un rôle bénéfique sur la dysfonction endothéliale consécutive à l'insuffisance cardiaque et sur les complications métaboliques et la dysfonction cardiaque consécutive à un diabète^{399,432}. En 2004, Wiesmann *et al.* publient une étude sur l'inhibition allostérique de PTP1B. Ces résultats mettent en évidence la présence d'un nouveau site allostérique et montrent que l'utilisation d'inhibiteurs allostériques à ce niveau, empêche le passage sous la forme active de PTP1B par blocage de la mobilité de la boucle catalytique WDP empêchant ainsi la réaction enzymatique. Les auteurs témoignent d'une grande efficacité des composants grâce à une forte sélectivité du site⁴³³. Très récemment, une étude menée par Krishnan et Tonks en 2014, analyse les effets d'un nouvel inhibiteur allostérique sur la partie C-terminale de la PTP1B. Cet inhibiteur, le MSI-1436 connu sous le nom de trodusquemine, est un aminostéroïde isolé du foie et de la vésicule biliaire des requins (figure 31 A). Cette molécule présente de nombreuses propriétés : allostérique, sélective, non-compétitive, réversible et avec une action dose-dépendante. La particularité de cet inhibiteur est la présence de deux sites de fixation sur la PTP1B : un site principal spécifique situé dans la partie C-terminale non catalytique (entre les AA 322 – 405 au niveau de l'hélice $\alpha 9$) et un secondaire (entre les AA 1 – 321 au niveau de l'hélice $\alpha 7$) (figure 31 B).

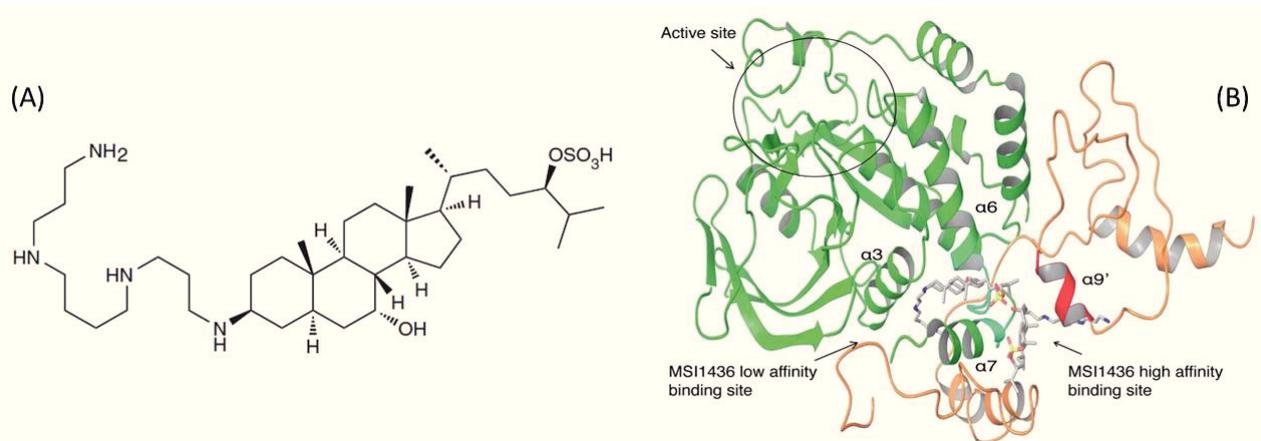


Figure 31 : MSI-1436, nouvel inhibiteur de PTP1B.

(A) Formule chimique semi-développée du MSI-1436 ou 3 β - spermine-7 α -hydroxy-5 α -cholestan-24R-yl sulfate, aminostéroïde isolé du foie et de la vésicule biliaire de requin.

(B) Représentation tridimensionnelle du MSI-1436 illustrant le site actif et les deux sites de fixation sur la PTP1B avec un site principal spécifique de haute affinité et un secondaire de plus faible affinité.

Dans cette même étude, les auteurs montrent que chez des souris SCID (Severe combined immunodeficiency) injectées avec des cellules BT474 qui surexpriment *Human Epidermal Growth Factor Receptor-2* (HER2) responsable de l'apparition d'un cancer du sein et de métastases pulmonaires, le MSI-1436 entraîne une inhibition de la croissance tumorale et de la prolifération métastatique par diminution du signal HER2 *via* l'inhibition de la PTP1B⁴³⁴. Dans une autre étude, des résultats tout aussi positifs ont été démontrés dans un modèle de souris obèses soumises à un régime riche en graisses. Dans ce cas, le MSI-1436 entraîne une diminution de l'appétit, une réduction significative du poids corporel par diminution de la masse grasse et réduit significativement les taux plasmatiques d'insuline et de leptine⁴³⁵. Enfin, des travaux préliminaires réalisés au sein de notre laboratoire et dans le cadre de la thèse du Dr. Pierre-Alain Thiébaud, ont montré que l'administration de la trodusquemine *ex vivo* sur des artères mésentériques reverse partiellement l'altération de la dilatation dépendante du flux induite par la tunicamycine. Cette amélioration fonctionnelle s'accompagne d'une diminution significative des taux des marqueurs du SRE (Thiébaud *et al.*, en cours de publication). Ainsi, la trodusquemine apparaît comme un éventuel traitement pharmacologique dans le cas de pathologies avec un SRE exacerbé. Très récemment, la claramine, autre inhibiteur de PTP1B, a été testé dans notre laboratoire dans une étude sur la fonction vasculaire de souris septiques (induit par CLP). Cette étude montre que l'administration de claramine sur des vaisseaux mésentériques isolés induit une restauration de la dilatation en réponse au flux chez les animaux CLP.

Actuellement, les inhibiteurs de PTP1B font l'objet d'essais cliniques chez les patients atteints d'obésité, de DT2 ou de cancer du sein. Des essais dans d'autres pathologies pourraient donc voir le jour dans un futur proche.

JUSTIFICATIF DE L'ÉTUDE

L'implication de la PTP1B dans de nombreux mécanismes moléculaires lui confère un rôle dans différents contextes physiopathologiques d'insuffisance cardiaque, de diabète de type 2 et également de sepsis. La délétion génétique totale ou endothéliale de la PTP1B ainsi que son inhibition pharmacologique constituent un axe de recherche novateur et une future piste prometteuse dans la thérapie de nombreuses pathologies. Les travaux de recherche précédents du laboratoire ont permis d'identifier la PTP1B comme acteur potentiel de la physiopathologie septique et de mettre en évidence que la délétion génétique totale de PTP1B limitait significativement la dysfonction cardio-vasculaire, l'inflammation tissulaire et la mortalité induite dans des modèles de sepsis (LPS et CLP) ⁶⁵. D'autres études en dehors du sepsis montrent que la délétion génétique totale de PTP1B améliore la sensibilité à l'insuline et prévient la dysfonction endothéliale dans un modèle riche en graisses ^{421,422}. Par ailleurs, des travaux réalisés au laboratoire sur un modèle de déficience sélective en PTP1B endothéliale ont montré le rôle bénéfique de la protection endothéliale dans l'amélioration de la sensibilité à l'insuline dans un modèle de diabète de type 2.

À ce jour, aucune étude concernant le rôle de PTP1B et l'impact de son invalidation sur les altérations métaboliques et leurs conséquences dans le sepsis n'a été réalisée. Afin de comprendre le rôle et l'impact de la PTP1B dans les désordres métaboliques liés au sepsis, nous avons mis au point un modèle de sepsis induit par ligature et perforation caecale connu pour présenter ces altérations métaboliques.

Ainsi l'ensemble de mes travaux de thèse présentés porte sur l'impact de la délétion totale et endothéliale de PTP1B sur la dysfonction cardiovasculaire et l'insulino-résistance dans un modèle de sepsis expérimental.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

I. Modèles animaux et techniques de génotypage

1. Animaux utilisés

a. Animaux sauvages

L'ensemble des expérimentations réalisées sur souris sauvages utilisent des animaux mâles, âgés de 8 à 12 semaines (Janvier, Le Genest-Saint-Iles, France). Des souris de fond génétique balb/c appelées souris *Wild Type* (WT) sont utilisées en comparaison des animaux PTP1B^{-/-} de même fond génétique.

b. Souris transgéniques : déficience génétique totale en PTP1B

Les souris déficientes en PTP1B sont issues d'une lignée développée par l'équipe du Dr. Tremblay (Mc Gill University, Montreal, Canada) sur un fond génétique balb/c. La déficience génétique en PTP1B s'obtient par délétion des exons 5 et 6 du gène *ptpn1* correspondant au site actif phosphatase de la PTP1B. Les animaux homozygotes ainsi obtenus sont appelés PTP1B^{-/-}. Dans nos études, ces animaux sont utilisés en comparaison avec des animaux sauvages PTP1B^{+/+} de même fond génétique appelés souris WT (paragraphe précédent). Comme évoqué précédemment, les animaux PTP1B^{-/-} sont fertiles, présentent un développement intra-utérin normal, sont viables et ne présentent ni retard de croissance, ni problème de santé ⁴²⁰.

c. Souris transgéniques : déficience génétique spécifique en PTP1B au niveau de l'endothélium

Les souris déficientes en PTP1B spécifiquement au niveau de l'endothélium vasculaire sont issues d'une lignée développée au sein de notre laboratoire et établie en collaboration avec le Dr Neel (Toronto, Canada). Ces souris sont obtenues par croisement de souris « floxées » PTP1B^{+/+} présentant deux sites LoxP de part et d'autre des exons 6 et 8 correspondant au site actif de la PTP1B avec des souris « Tie2Cre » possédant le gène de la Cre recombinase agissant sous le contrôle du promoteur endothélial Tie2, récepteur à l'angiopoïétine. Lors du croisement, les sites LoxP sont excisés par la Cre recombinase entraînant la délétion du site actif de la PTP1B « spécifiquement » au niveau de l'endothélium (figure 32). Les souris issues de ce croisement sont appelées « Tie2PTP1B^{-/-} ». Au cours des expérimentations, ces souris Tie2PTP1B^{-/-} sont comparées à leurs contrôles littermates, les souris wild-type (WT) LoxP PTP1B.

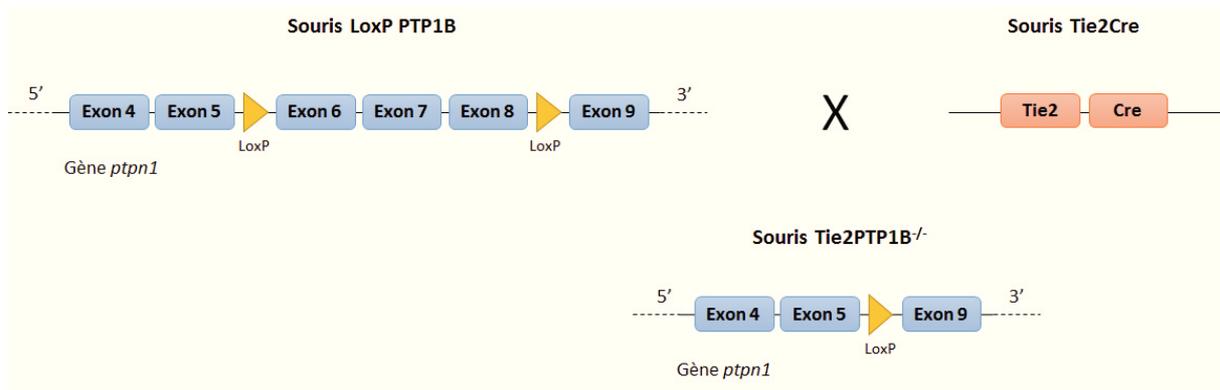


Figure 32 : Schéma de croisement pour l'obtention de souris « spécifiquement » invalidées pour la PTP1B endothéliale. Le croisement de souris LoxP PTP1B avec des souris Tie2Cre permet d'obtenir des souris Tie2PTP1B^{-/-} n'exprimant plus une partie du site actif de la PTP1B (exons 6 à 8) encadré par les sites LoxP.

Dans la littérature, l'existence d'une fuite de l'expression du récepteur à l'angiopoïétine Tie2 dans les cellules hématopoïétiques est clairement établie^{436,437}. Ainsi, nos souris Tie2PTP1B^{-/-} obtenues par la construction génétique décrite ci-dessus, présentent une invalidation de la PTP1B dans les cellules endothéliales et dans les cellules myéloïdes. Pour valider l'ensemble de nos résultats, un protocole d'irradiation et de greffe de moelle osseuse a donc été réalisé.

2. Technique d'irradiation

a. Irradiation et greffe de moelle

Le protocole d'irradiation et de greffe de moelle osseuse est réalisé en collaboration avec l'équipe du Pr. Olivier Boyer (INSERM U905, Rouen) et avec l'aide du Dr. Jérémie Martinet. L'ensemble du protocole a précédemment été utilisé et décrit dans les travaux de thèse du Dr Julie Maupoint⁴⁰⁴.

Le système de marquage CD45 est utilisé afin de déterminer l'origine des populations hématopoïétiques après transplantation de la moelle osseuse. CD45 est en effet exprimé dans les cellules hématopoïétiques sous deux formes alléliques, CD45.1 et CD45.2. Ce dernier exprimé dans les cellules des souris C57/bl6 est donc utilisé comme marqueur pour les cellules provenant des souris Tie2PTP1B^{-/-}.

Deux irradiations successives de 5 Gray (Faxitron) sont réalisées à 3 heures d'intervalle. La greffe est effectuée par injection de 20 millions de cellules provenant d'une moelle donneuse dans le sinus rétro-orbital, le jour même ou le lendemain de l'irradiation. Les animaux sont placés 6 à 8 semaines en isolement avec un traitement antibiotique *per os* (Enrofoxacine, Baytril, 2.5%, Bayer) afin de permettre la reconstitution hématopoïétique. Plusieurs groupes de souris chimères sont alors constitués (figure 33) :

- Groupe Tie2PTP1B^{-/-} (CD45.1) ou « endoPTP1B^{-/-} » : des souris irradiées Tie2PTP1B^{-/-} (marqueur CD45.2) reçoivent une moelle osseuse de souris CD45.1 afin d'obtenir des souris spécifiquement délétées pour la **PTP1B endothéliale**.
- Groupe CD45.1 (Tie2PTP1B^{-/-}) ou « myéloPTP1B^{-/-} » : des souris irradiées CD45.1 reçoivent une moelle osseuse de souris Tie2PTP1B^{-/-} (marqueur CD45.2) afin d'obtenir des souris spécifiquement délétées pour la **PTP1B myéloïde**.
- Groupe CD45.2 (CD45.1) ou « WT » : des souris irradiées CD45.2 reçoivent une moelle osseuse de souris CD45.1 afin d'obtenir des souris non invalidées pour la PTP1B.

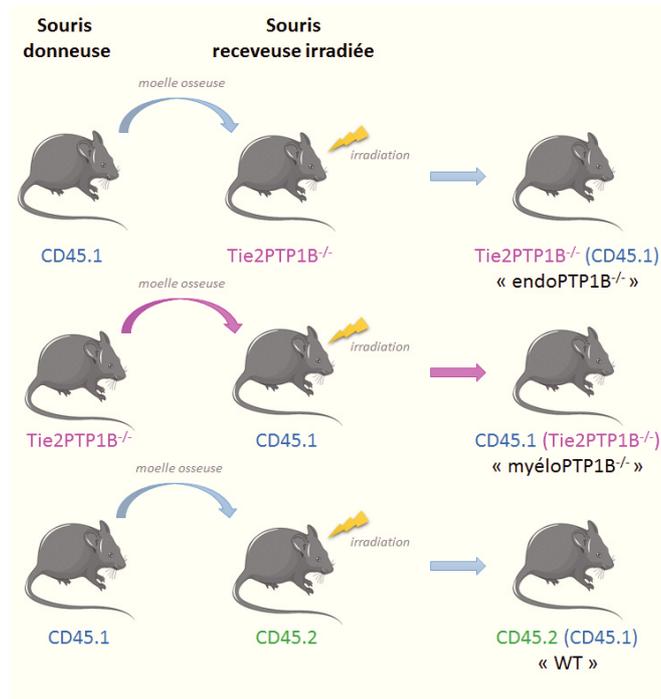


Figure 33 : Protocole d'irradiation et de greffe de moelle osseuse.

Les souris dites « donneuses » donnent leur moelle osseuse aux souris dites « receveuses » après leur irradiation. Différents groupes de souris chimères sont alors mis en place.

b. Vérification du chimérisme hématopoïétique

Lors des manipulations, le tibia des souris irradiées est prélevé et placé dans du tampon PBS. La moelle osseuse est récoltée dans un tampon FACS (PBS, Sérum de veau fœtal 2%) et centrifugée (5 minutes, 300g). Le surnageant est retiré ; les cellules sont lavées avec 1mL de tampon FACS et à nouveau centrifugées (300g, 5 minutes). Le surnageant est retiré ; 50µL de tampon FACS contenant 0.3µL de Fc Block sont ajoutés sur le culot cellulaire ensuite incubé (15 minutes, 4°C, obscurité). 50µL de tampon FACS contenant les anticorps (2.5µL anti-CD45.1 FITC + 2.5µL anti-CD45.2 APC-Cy5.5, Becton Dickinson) sont incubés (20 minutes, 4°C, obscurité) et les cellules sont lavées avec 1mL de tampon FACS puis centrifugées (5 minutes, 300g). Le surnageant est éliminé et 600µL de tampon FACS

sont ajoutés. Le pourcentage de chimérisme dans la moelle osseuse est évalué par cytométrie en flux (FACS Canto II, Becton Dickinson).

3. Génotypage

a. Extraction d'ADN génomique

Un morceau de queue de 5mm de long est prélevé sur les souriceaux âgés de 10 jours et placé dans un tube contenant 400µL de tampon de lyse (Tris 0.1M, EDTA 5mM, SDS 0.2%) et 10µL de protéinase K. L'échantillon est placé en incubation une nuit à 56°C. Après incubation, les tubes sont agités quelques minutes sur un agitateur planaire et centrifugés (15 minutes, 14000rpm, température ambiante). 200µL de surnageant sont prélevés (entre la phase lipidique et le culot), placés dans un eppendorf propre auxquels 200µL d'isopropanol sont ajoutés. Les tubes sont placés en agitation quelques minutes afin de resuspendre l'ADN. Les tubes sont de nouveau centrifugés (15 minutes, 14000rpm, température ambiante). Le surnageant est vidé par retournement, le culot est lavé par ajout de 500µL d'éthanol et centrifugation (15 minutes, 7000rpm, température ambiante) et séché à l'air libre pendant 1 heure. Le culot d'ADN est resuspendu dans 100µL d'eau RNase Free et agité au moins 2 heures sur l'agitateur planaire puis conservé à 4°C jusqu'à réalisation des PCR.

b. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Les PCR sont réalisées sur une plaque 96 puits (Thermo fast 96 low profile 0.2mL + ultraclear cap strips, Abgene) préalablement déposée sur un pain de glace (PCR cooler, Eppendorf) permettant de maintenir les puits à 4°C. 20µL d'un mix de PCR préparé de la façon suivante sont déposés par puits :

- 5µL de tampon 5X (Promega)
- 2.5µL de MgCl₂ (Promega)
- 0.5µL de dNTP à 10mM (Promega)
- 0.25µL d'amorce sens à 100µM
- 0.25µL d'amorce anti-sens à 100µM
- 0.25µL de Taq Polymerase (Promega)
- 11.25µL d'eau ultra pure RNase free

Les séquences des amorces (Sigma-Proligo – USA) sont indiquées dans la figure 34.

Lignée	Programme	Séquence 5' → 3'	Température d'hybridation
WT et PTP1B ^{-/-}	PTP1B	CGTTGACCTCTTTGCTTGGT	64
		TTGTTGTTGCTGTGGCCAAT	
	Néomycine	GCCAGAGGCCACTTGTGTAG	64
		TTGTTGTTGCTGTGGCCAAT	
WT et Tie2 PTP1B ^{-/-}	PTP1B LoxP	TGCTCACTCACCTGCTACAA	57
		GAAATGGCTCACTCCTACTGG	
	Tie2Cre	AAATGGTTTCCCGCAGAACC	55
		TAGCTGGCTGGTGGCAGATG	
	dPTP1B	GTGGTGCCTGCAAGAGAACTGAC	58
		GAAATGGCTCACTCCTACTGG	

Figure 34 : Tableau indiquant les séquences et programmes des amorces nécessaires au géotypage des souris WT, PTP1B^{-/-} et Tie2PTP1^{-/-}.

À ce mix de PCR est ajouté 5µL de l'ADN (extrait du morceau de queue de chaque animal). La PCR est alors réalisée avec un thermocycler programmable (Mastercycler family, Eppendorf) dont les conditions de programmation sont référencées dans la figure 35.

Lignée	Dénaturation	Amplification			Elongation finale	Diminution T°C
WT et PTP1B ^{-/-}	95°C, 1 min	34 cycles			72°C, 5 min	à 4°C, ∞
		Dénaturation 95°C, 30 sec	Hybridation 62°C, 30 sec	Elongation 72°C, 1min		
WT et Tie2 PTP1B ^{-/-}	95°C, 5 min	35 cycles			72°C, 5 min	à 4°C, ∞
		Dénaturation 95°C, 30 sec	Hybridation 55/58°C, 30 sec	Elongation 72°C, 45 sec		

Figure 35 : Tableau indiquant les conditions de programmation des PCR pour les lignées PTP1B^{-/-} et Tie2PTP1B^{-/-}.

c. Migration et Révélation

L'étape de migration est réalisée sur un gel d'agarose à 1.5% (Sigma) contenant 1/10000^{ème} de Safe View (Euromedex) intercalant de l'ADN, déposé dans une cuve contenant du tampon TAE 1X (TAE Buffer 50X, Biosolve). 5µL de produit de PCR sont déposés dans chacun des puits du gel d'agarose. La migration est réalisée par électrophorèse à tension constante de 150V pendant 45 minutes. Le gel est visualisé sous une lampe UV puis une photo du gel est imprimée. Les animaux sont alors triés en

fonction de leur génotype afin de constituer les différents groupes d'études. Pour la lignée PTP1B^{-/-}, les animaux sauvages WT présentent une bande à 900 pb, les animaux hétérozygotes PTP1B^{+/-} présentent deux bandes à 300 pb et à 900 pb et les animaux PTP1B^{-/-} présentent une bande à 300 pb. Pour la lignée Tie2PTP1B^{-/-}, les animaux contrôles WT LoxP PTP1B sont positifs uniquement pour la PCR PTP1B LoxP et les animaux Tie2PTP1B^{-/-} sont positifs pour la PCR PTP1B LoxP, Tie2Cre et dPTP1B.

II. Modèles pathologiques

1. Modèle de Ligature et Perforation Caecale

Différents modèles expérimentaux permettent de mimer chez l'animal les effets physiopathologiques des infections graves observées chez l'homme. Le modèle de Ligature et Perforation Caecale dit CLP (cecal ligation and puncture) est, à ce jour, la meilleure représentation expérimentale de la complexité du choc septique humain. Les avantages du modèle de CLP sont nombreux ; la procédure chirurgicale est simple à réaliser et le foyer infectieux formé par la ligature du caecum permet de créer un modèle de sepsis de type polymicrobien. De plus, ce modèle, proche d'une péritonite clinique, recrée la progression du sepsis en pathologie humaine avec des phases hémodynamiques et métaboliques similaires telles que l'insulino-résistance^{438,439}.

Les souris sont anesthésiées au gaz isoflurane. Après l'induction de l'anesthésie faite à 2% d'isoflurane, l'animal est rasé et placé sous le masque à isoflurane (maintenu entre 1 et 1.5% d'isoflurane). L'abdomen est ensuite désinfecté à la Bétadine. Une laparotomie sur la ligne médiane est pratiquée, le caecum est ensuite exposé et une partie préalablement déterminée (études préliminaires réalisées lors du Master) est ligaturée avec un fil de suture 6-0 en dessous de la valve ileocaecale localisée à la jonction entre le petit et le gros intestin. Le caecum est ensuite perforé deux fois avec une aiguille 21G. Une petite quantité de matière fécale est délicatement extrudée des zones de perforation et le caecum est replacé dans la cavité abdominale. L'abdomen est ensuite refermé en deux plans : la musculature est suturée avec du fil 7-0 et la peau avec du fil 6-0. De la même manière, les animaux soumis à une opération fantôme (animaux Sham) subissent une laparotomie, le caecum est exposé puis réintroduit dans la cavité péritonéale et l'abdomen est suturé en deux plans. Le moment de la chirurgie est défini comme le temps zéro (H0) (figure 36).

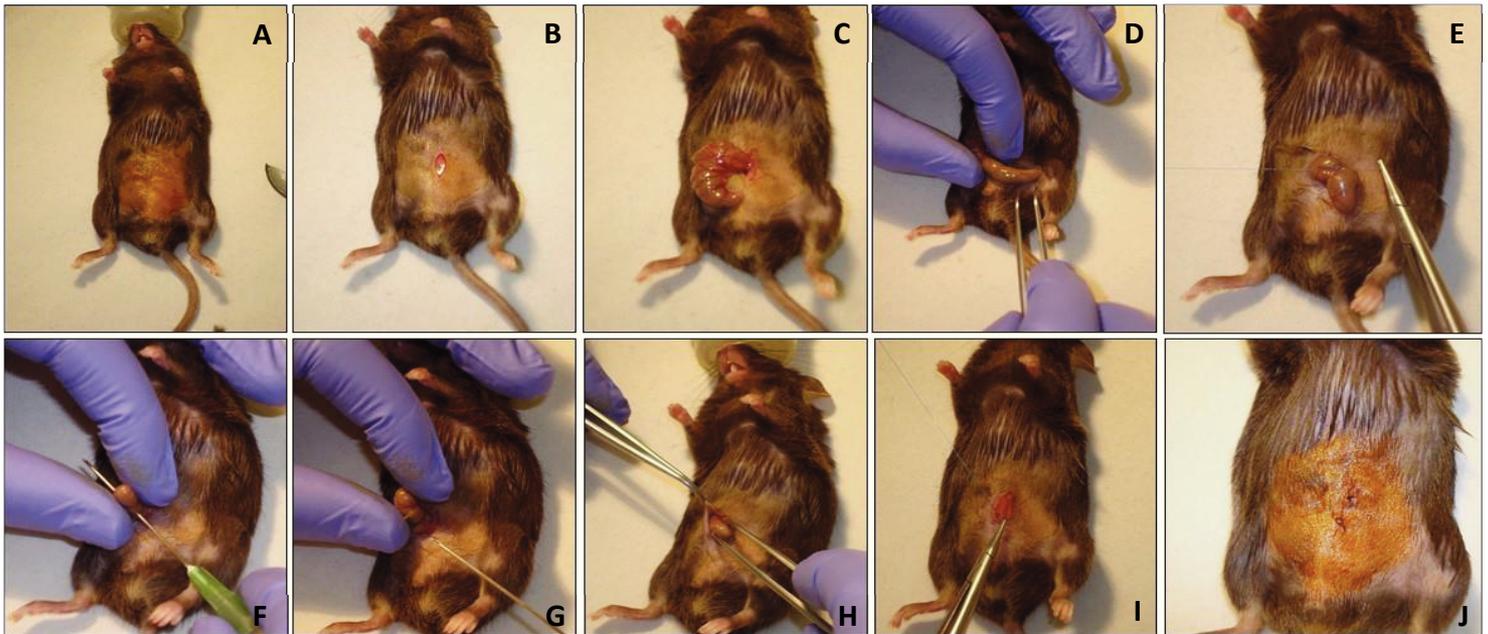


Figure 36 : Photographies de la chirurgie de Ligature et Perforation Caecale.

(A) Après l'induction de l'anesthésie à 2% d'isoflurane, l'animal est rasé et placé sous le masque à isoflurane. L'abdomen est désinfecté à la Bétadine. (B) Une laparotomie sur la ligne médiane est pratiquée. (C - D) Le caecum est ensuite exposé. (E) Une partie déterminée est ligaturée avec un fil de suture 6-0 en dessous de la valve ileocaecale localisée à la jonction entre le petit et le gros intestin. (F) Le caecum est ensuite perforé deux fois avec une aiguille 21G. (G) Une petite quantité de matière fécale est délicatement extrudée des zones de perforation. (H) Le caecum est replacé dans la cavité abdominale. (I) L'abdomen est ensuite refermé en deux plans : la musculature est suturée avec du fil 7-0 (J) et la peau avec du fil 6-0.

Un modèle dit « ressuscité » est réalisé par l'injection de NaCl 0.9% en sous-cutané, à un volume de 30mL/kg afin de s'affranchir des perturbations volémiques présentes dans ce modèle. En effet, il existe des phénomènes majeurs de fuite capillaire créant des hypovolémies intenses délétères. Les injections sont réalisées 1, 5 et 9 heures post-opératoire et chez les souris Sham une dose unique de 0,5mL est injectée directement après l'opération afin de combler la perte liquidienne ayant eu lieu pendant la laparotomie.

L'ensemble de la description de ce modèle a fait l'objet d'une étude préliminaire réalisée lors de mes stages de Master. Ainsi, chaque paramètre : taille de la partie du caecum ligaturée, nombre de perforations, taille de l'aiguille ou remplissage a été établi et jugé nécessaire pour obtenir un modèle de sepsis grave, associant mortalité, troubles cardio-vasculaires et atteintes métaboliques.

2. Modèle de choc endotoxinique

Le modèle de choc endotoxinique correspondant à une inflammation aigüe se rapprochant cliniquement d'une méningite, est induit par une injection intrapéritonéale de lipopolysaccharides (LPS) issus de la souche O55 : B5 d'*Escherichia Coli* (Sigma, USA) à une dose de 15mg/kg comme décrit précédemment⁶⁵. De la même manière, les animaux soumis à un traitement contrôle reçoivent une

injection intrapéritonéale de NaCl à dose équivalente. Un modèle dit «ressuscité» est réalisé par l'injection de NaCl 0.9% en sous-cutané, à un volume de 30mL/kg afin de s'affranchir des perturbations volémiques présentes dans ce modèle. Les injections sont réalisées 1, 5 et 9 heures post-injection.

III. Evaluation de la survie

Pour l'étude de la survie, les animaux sont répartis en 4 groupes. Pour l'étude 1 (portant sur les souris PTP1B^{-/-}), les groupes étudiés sont : WT Sham, PTP1B^{-/-} Sham, WT CLP et PTP1B^{-/-} CLP. Pour l'étude 2 (portant sur les souris Tie2PTP1B^{-/-}), les groupes étudiés sont : WT Sham, Tie2PTP1B^{-/-} Sham, WT CLP et TiePTP1B^{-/-} CLP. En parallèle, les groupes irradiés étudiés sont : CD45.2 (CD45.1) Sham, CD45.2 (CD45.1) CLP, Tie2PTP1B^{-/-} (CD45.1) CLP et CD45.1 (Tie2PTP1B^{-/-}) CLP. L'étude de survie est réalisée sur 120 heures et durant cette période, les animaux ont un accès à l'eau et à la nourriture *ad libitum*.

IV. Etude du phénotype métabolique

1. Système de calorimétrie indirecte

Le système de calorimétrie indirecte (PhenoMaster, TSE Systems GmbH, Allemagne) est un dispositif permettant d'obtenir, de manière non invasive, le phénotype métabolique des animaux par le suivi et l'enregistrement simultané de plusieurs paramètres dans la cage de l'animal considérée comme un calorimètre. La consommation d'oxygène (volume d'oxygène inspiré, VO₂, mL/h), la production de dioxyde de carbone (volume de dioxygène expiré, VCO₂, mL/h), la dépense énergétique (*energy expenditure*, kcal/h/kg), l'activité locomotrice et le redressement (mesurés à l'aide d'un actimère à infrarouge, *locomotor activity*, *number of steps*), la prise hydrique (mL) et la prise alimentaire (*food intake*, g) sont ainsi enregistrés dans chaque cage où réside un seul animal (figure 37).



Figure 37 : Plate-forme du Service Commun d'Analyse Comportementale.

Poste de chirurgie expérimentale où est réalisé l'ensemble des chirurgies de CLP pour l'étude du phénotype métabolique des animaux (photographie de gauche).

Plate-forme de calorimétrie indirecte où chaque cage individuelle représente un calorimètre permettant la mesure et l'enregistrement de différents paramètres (photographie de droite).

L'ensemble de ces paramètres permet ensuite de calculer d'autres paramètres tels que l'utilisation des substrats ou le quotient respiratoire (QR) :

$$QR = \frac{VC02}{VO2}$$

Les études se déroulent de la façon suivante : les animaux sont placés dans les cages d'habituation de la plate-forme et restent en acclimatation pendant 3 jours. A la fin de cette période, les animaux sont placés dans les cages de mesure. Les mesures pré-opératoires sont réalisées sur une période de 3 jours et demi, sur les animaux appelés WT Sham et PTP1B^{-/-} Sham. Les animaux sont ensuite opérés par la technique de CLP (décrit précédemment), gardés en observation 1 heure afin de permettre un réveil calme et replacés dans leur propre cage de mesure. Les mesures post-opératoires sont réalisées pendant les 24 heures suivant l'opération sur les animaux alors appelés WT CLP et PTP1B^{-/-} CLP.

L'étude de la calorimétrie indirecte est réalisée en collaboration avec les Dr. Jean-Claude et Jean-Luc do Rego du Service Commun d'Analyse Comportementale (SCAC, Rouen).

2. Métabolisme glucidique et insulino-résistance

a. Tests de tolérance au glucose et à l'insuline

Les tests de tolérance au glucose (TTG) et à l'insuline (TTI) sont deux approches expérimentales permettant d'observer la capacité des animaux à réguler leur glycémie dans le cadre d'un apport exogène de glucose ou d'insuline permettant ainsi de détecter une éventuelle insulino-résistance ou

hyperglycémie. La tolérance au glucose et à l'insuline sont évaluées dans les deux études et sur l'ensemble des groupes d'animaux.

Après la chirurgie de CLP, les animaux développent un caractère anorexique avec prostration et refus de l'alimentation. Afin de s'affranchir de toutes perturbations liées à la prise alimentaire, l'ensemble des animaux Sham et CLP sont donc mis à jeun après la chirurgie et jusqu'à la réalisation des tests. Une première mesure de la glycémie, considérée comme la glycémie à jeun, est réalisée par prélèvement d'une goutte de sang au niveau de la queue. La goutte de sang est déposée sur une bandelette réactive (StatStrip Xpress, Nova Biomedical, Royaume-Uni) placée dans un glucomètre (StatStrip Xpress, Nova Biomedical, Royaume-Uni). Après une injection intra-veineuse rétro-orbitale de D-glucose à une dose de 2g/kg (Sigma-Aldrich) ou d'insuline à une dose de 0,5u/kg (Actrapid, Novo Nordisk A/S), le suivi de la glycémie est réalisé pendant les deux heures suivant l'injection, à différents temps : 15, 30, 45, 60, 90 et 120 minutes. Les aires sous la courbe (AUC) sont calculées par la suite.

b. Indices HOMA et HOMA-β

Les indices HOMA (*HOMeostasis Model Accessment*) sont des index permettant d'estimer le phénotype insulinaire par différentes approches⁴⁴⁰. L'indice HOMA est un index permettant d'estimer la résistance à l'insuline. Il est obtenu par le calcul suivant :

$$HOMA = \frac{\text{insulinémie à jeun (mUI/L)} \times \text{glycémie à jeun (mmol/L)}}{22,5}$$

L'indice HOMA-β permet quant à lui d'estimer l'activité des cellules β pancréatiques et est calculé de la façon suivante :

$$HOMA \beta = \frac{20 \times \text{insulinémie à jeun (}\mu\text{UI/mL)}}{\text{glycémie à jeun (mmol/L)} - 3,5}$$

3. Phénotype insulinaire

a. Mesure de l'insulinémie

Le phénotypage métabolique des souris consiste à mesurer l'insulinémie des animaux au cours d'un TTG. Au temps T0 (à jeun), 50 à 70μL de sang sont prélevés puis le glucose est injecté, comme pour un TTG classique. Au temps T15, 50 à 70μL de sang sont à nouveau prélevés. Les prélèvements sanguins sont réalisés en rétro-orbital grâce à un capillaire hépariné puis le sang est déposé dans un tube eppendorf placé sur glace. Le TTG est ensuite réalisé dans les conditions habituelles, avec mesures de la glycémie à des temps précis, comme décrit dans le paragraphe V. 1. L'ensemble des tubes de

sang est centrifugé (10 minutes, 3000g, 4°C) et le plasma est récupéré puis congelé immédiatement dans l'azote liquide.

b. Dosage plasmatique de l'insuline par technique ELISA

Le dosage plasmatique de l'insuline est réalisé par la technique ELISA grâce à l'utilisation du kit ELISA (Ultra Sensitive mouse Insulin ELISA kit, Crystal Chem Inc, USA). Après préparation de l'ensemble des réactifs et de la gamme, la première réaction est réalisée par incubation de 5µL d'échantillons dans 95µL de *sample diluent* par puits pendant 2 heures à 4°C. Après une série de lavages avec un tampon de lavage, la deuxième réaction est réalisée par ajout de 100µL d'*anti-insulin enzyme conjugate* par puits et incubation pendant 30 minutes à température ambiante. Après une série de lavages, la troisième réaction est réalisée par ajout de 100µL par puits d'*enzyme substrate solution* et incubation à température ambiante à l'abri de la lumière. La réaction enzymatique est stoppée après 40 minutes d'incubation avec une solution d'*enzyme reaction stop*. L'absorbance à 450nm puis à 630nm est alors mesurée. L'absorbance à 450 et à 630nm des points de gamme permettent de déterminer la pente et l'ordonnée à l'origine par la fonction $y = ax + b$. L'ensemble de ces données permet de calculer la concentration d'insuline plasmatique en ng/mL présente pour chaque échantillon.

c. Etude de la signalisation de l'insuline dans les tissus

i. Prélèvements des organes

Les souris sont mises à jeun à la suite de la chirurgie. Les souris reçoivent du NaCl 0.9% ou de l'insuline à une dose de 0.5U/kg. Quinze minutes après l'injection de NaCl ou d'insuline, la souris est mise à mort par dislocation cervicale. Le cœur, un lobe du foie, le tissu adipeux épидидymal et le muscle gastrocnemius sont alors prélevés rapidement. Les tissus prélevés sont ensuite immédiatement congelés dans l'azote liquide et stockés à -80°C.

ii. Quantification des protéines d'intérêt par Western Blot

Les tissus sont homogénéisés au Precellys (Bertin Technologies). Une quantité de protéines est chargée dans chaque puits : 20µg pour l'analyse d'Akt et 50µg pour l'analyse d'AMPK. La fraction protéique est séparée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-sodium dodecyl sulfate (p-SDS) pendant 30 minutes à 200V (Criterion TGX Stainfree gels, Biorad) dans une solution de migration Tris-Glycine-SDS (Euromedex). Les protéines migrées sur gel sont ensuite transférées sur des membranes PVDF (Biorad) dans une solution de transfert Tris-Glycine supplémentée avec 20% d'éthanol (Trans-blots Turbo transfer system, BioRad). Pour éliminer les liaisons non spécifiques, les membranes sont

placées dans une solution de blocage (BSA, 5%) pendant 60 minutes à température ambiante. Les membranes sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire : anti-Akt (Cell Signaling 4691, 1/1000^{ème}), anti-phosphoAkt (Cell Signaling 4060, 1/2000^{ème}), anti-AMPK (Cell Signaling 2532, 1/1000^{ème}) et anti-phosphoAMPK (Cell Signaling 2535, 1/1000^{ème}). Les protéines sont visualisées par utilisation d'un kit de chimiluminescence (luminata classic or forte, Millipore) et révélées avec un système d'imagerie ChemiDoc XRS+ system (BioRad). Les analyses sont effectuées grâce à l'utilisation du logiciel Image Lab (Image Lab software, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA).

L'ensemble des Western Blot réalisé pour étudier les protéines spécifiques de la voie de signalisation de l'insuline a été réalisé en collaboration avec le Dr. Jennifer Rieusset, laboratoire INSERM U1060, Lyon.

4. Analyse de l'expression du Transporteur du Glucose 4 (GLUT-4)

a. Méthode de séparation des membranes par technique d'ultracentrifugation

La technique d'ultracentrifugation est une méthode permettant la séparation des macromolécules et des organites intracellulaires en fonction de leur masse et de leur densité. Cette technique est sensible à la température et aux conditions extérieures, ainsi, afin de ne pas compromettre les ultracentrifugations successives, l'ensemble des expérimentations détaillées ci-après est réalisé sur glace à 4°C. Les tubes, les solutions et le matériel utilisés sont placés sur glace avant le début des manipulations afin de garantir leur utilisation à 4°C. L'ensemble du protocole d'ultracentrifugation pour la séparation des membranes a été mis au point au laboratoire lors de ma thèse avec l'aide du Dr. Pierre-Alain Thiébaud et est adapté de deux protocoles publiés dans la littérature^{441,442}.

Les cœurs préalablement prélevés et conservés à -80°C, sont décongelés sur glace puis coupés en petits morceaux. Les morceaux de cœurs sont placés dans des tubes eppendorf propres contenant 1mL de High Salt Buffer (2M NaCl, 20mM HEPES pH 7.4, 5mM NaN₃) pendant 30 minutes permettant une lyse du tissu. Au terme des 30 minutes, les tubes sont centrifugés (5min, 1000g, 4°C). Le surnageant est jeté et le culot est resuspendu dans 1.5mL de Buffer A (20mM HEPES pH7.4, 2mM EDTA pH 8.0, 1mM MgCl₂, 250mM sucrose) puis homogénéisé au potter (une dizaine d'aller-retour à 4°C). L'homogénat obtenu est placé dans un tube à hémolyse propre et le potter est rincé avec 200µL de Buffer A ajouté à l'homogénat précédent. Le tube est centrifugé 5min, 1000g, 4°C. Le surnageant est mis de côté et le culot obtenu est homogénéisé comme précédemment dans 1mL de Buffer A. Le potter est rincé avec 300µL de Buffer A et l'ensemble du produit de rinçage et du surnageant sont ajoutés à l'homogénat. Le tube est centrifugé (10min, 1000g, 4°C). Le surnageant est mis de côté. Le culot est

resuspendu dans 300µL de Buffer A, la solution obtenue représente la fraction P1 immédiatement congelée à -80°C. Le surnageant est ultra-centrifugé (10min, 5000g, 4°C). Puis de la même manière, le surnageant est mis de côté pour ultra-centrifugation et le culot est resuspendu. La procédure est ainsi répétée plusieurs fois, par ultra-centrifugation, afin d'obtenir la fraction P2, P3, P4 et P5. L'ensemble du protocole est détaillé sur la figure 38.

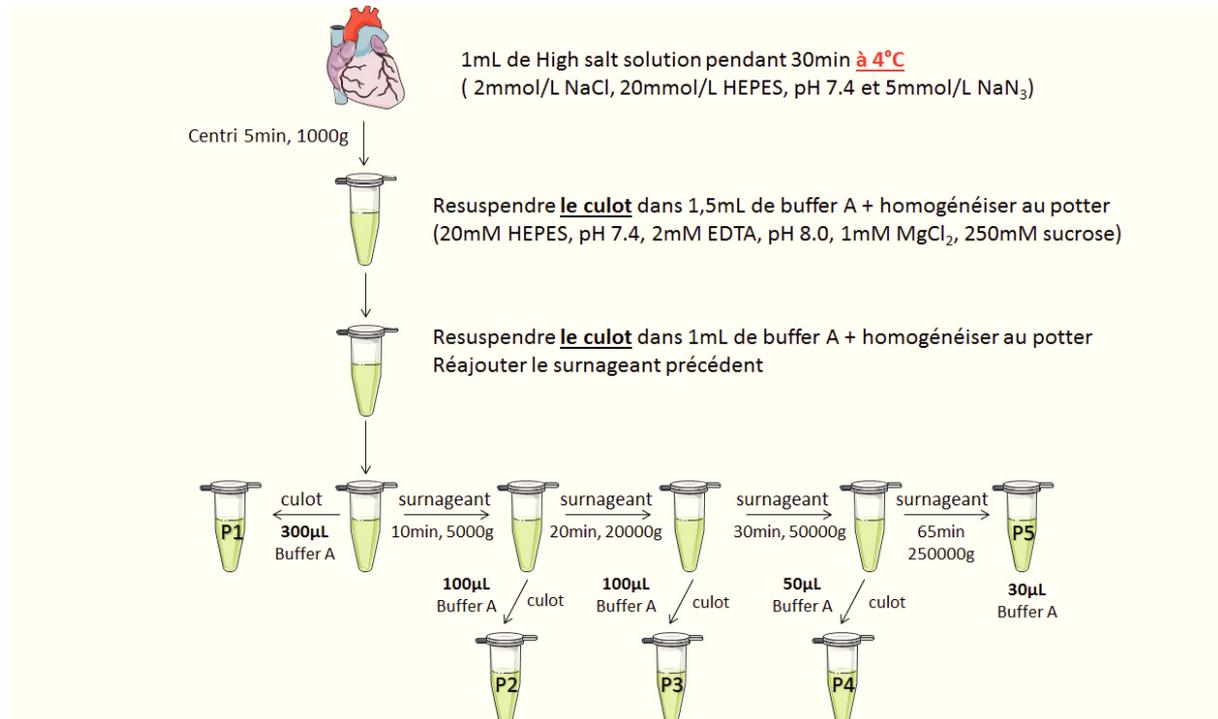


Figure 38 : Représentation schématique de la technique de séparation des membranes par ultracentrifugation. Les fractions P1 à P5 contenant chacune différentes membranes cellulaires sont obtenues par des ultracentrifugations successives.

Les fractions obtenues contiennent donc différents organites cellulaires. Les fractions P1 et P2 sont principalement constituées de la membrane plasmique cellulaire ; elles sont appelées fractions de haute densité. Les fractions P3 et P4 sont constituées principalement de membranes mitochondriales et du réticulum endoplasmique et la fraction P5 est constituée d'endosomes et de microsomes ; elle est ainsi appelée fraction de faible densité.

b. Mesure de l'expression protéique du transporteur du glucose 4 par Western-Blot

Une quantité de 30µg de protéines est chargée dans chaque puits d'un gel (Criterion TGX Stain Free Precast Gels, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). La fraction protéique est séparée par électrophorèse (30 minutes, 200V) dans une solution de migration Tris-Glycine-SDS (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Les protéines migrées sur gel sont ensuite transférées sur des membranes PVDF (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) dans une solution de transfert (Tampon Turbo

Transfert, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) supplémentée avec 20% d'éthanol. Pour éliminer les liaisons non spécifiques, les membranes sont placées dans une solution de blocage (lait, 3%) pendant 30 minutes à température ambiante. Les membranes sont ensuite incubées (une nuit, 4°C) avec l'anticorps primaire : anti-Glucose Transporter 4 (ab654, ABCAM, 1/2000^{ème}). Après lavages successifs, l'anticorps secondaire anti-rabbit (1/5000^{ème}) est placé sur les membranes (1 heure, température ambiante). Les protéines sont visualisées par utilisation d'une solution d'ECL par réaction de chimiluminescence (Clarity Western ECL Substrate, *peroxide and luminol/enhancer solutions*, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) et révélées avec un système d'imagerie ChemiDoc XRS+ system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Les analyses sont effectuées grâce à l'utilisation du logiciel Image Lab (Image Lab software, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA).

V. Fonction vasculaire

1. Procédure de montage

L'étude de la fonction vasculaire est réalisée sur un artériographe d'Halpern au niveau d'artères de résistance (diamètre < 300µm) prélevées dans l'arbre mésentérique (figure 39). Pour cela, le mésentère est prélevé après ligature au niveau le plus proximal et immédiatement placé dans une solution de Krebs froide et oxygénée (O₂ 95%, CO₂ 5%) dont la composition est la suivante (mmol/L) : NaCl 120, KCl 4.96, CaCl₂ 2.61, NaHCO₃ 24, KH₂PO₄ 1.21, MgSO₄ 1.2, glucose 5. L'artère mésentérique de premier ordre est soigneusement disséquée sous loupe binoculaire (grossissement x15). Un segment de 1,5 à 2mm de long et de diamètre interne d'environ 300µm, exempt de toutes collatérales, est canulé et perfusé entre les deux micropipettes d'un artériographe d'Halpern (Living System Instrumentation, USA). L'artère est maintenue à une pression constante de 60 mmHg grâce à une colonne en hauteur remplie de Krebs, en appliquant un flux en amont de l'artère. Le débit intra-luminal est contrôlé grâce à un débitmètre connecté en aval de l'artère. L'artère est disposée sous un microscope muni d'une caméra inversée permettant de suivre les variations de diamètre en temps réel sur un écran. Tout au long de l'expérience, l'artère est plongée dans un bain de Krebs dont la température est suivie en continu et maintenue entre 36,6 et 37,2°C. Une période d'équilibration de 20 minutes est respectée entre le montage et la réalisation des mesures de réactivité vasculaire aux différents agents pharmacologiques ou aux stimuli physiologiques.

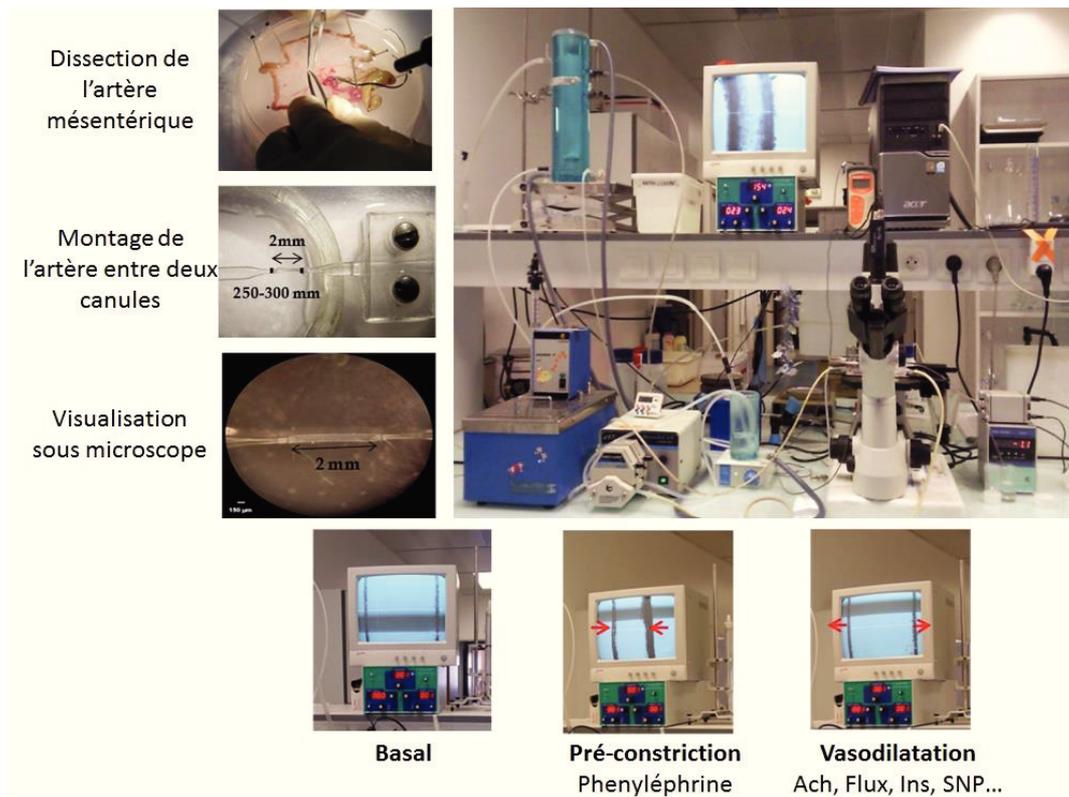


Figure 39 : Procédure de montage et de visualisation de l'artère mésentérique sur l'artériographe d'Halpern.

L'artère mésentérique de premier ordre est disséquée sous loupe binoculaire puis canulée dans une cuve contenant un bain de Krebs à 37°C. La cuve est disposée sous un microscope inversé relié à une caméra permettant de visualiser l'artère sur un écran. Le diamètre de l'artère est ensuite mesuré à l'écran en réponse à différents agents pharmacologiques ou stimuli physiologiques.

2. Evaluation de la fonction endothéliale *in vitro*

Dans cette étude, un inhibiteur sélectif de la NOSi, le 1400W (10^{-2} M ; Sigma-Aldrich, France), est utilisé tout au long des expérimentations afin d'exclure les modifications de tonus vasculaire dépendantes de l'expression de cette enzyme. Dans un premier temps, une étude de constriction vasculaire est réalisée par ajout de concentrations croissantes de phényléphrine (Phe), agoniste α_1 adrénergique, de 10^{-9} à 10^{-5} M. Les études de dilatation vasculaire sont ensuite réalisées après pré-constriction préalable des artères (minimum 50% du diamètre initial) par une dose unique de Phe (10^{-5} M) et exprimées en pourcentage de réversion de la constriction. La dilatation endothélium-dépendante calcium dépendante est ensuite évaluée par une courbe de réponse à l'acétylcholine (10^{-9} à $3 \cdot 10^{-5}$ M). Après trois rinçages du bain de Krebs à 37°C, une période d'équilibration de 20 minutes est respectée avant la réalisation d'une nouvelle épreuve de dilatation. La dilatation endothélium-dépendante calcium-indépendante est évaluée par une courbe de réponse au flux, grâce à des augmentations de débit intra-luminal (25 à 200 μ l/min) et par une courbe de réponse à l'insuline (10^{-10} à 10^{-6} M ; Invitrogen). Afin d'étudier spécifiquement le rôle du NO d'origine endothéliale dans les réponses dilatatrices, les artères sont incubées 30 minutes en présence de l'inhibiteur de NOS, le N ω -

Nitro-L-Arginine (L-NNA, $10^{-5}M$; Sigma-Aldrich) avant de répéter les réponses de dilation. Enfin, la dilatation indépendante de l'endothélium est évaluée par une courbe de réponse au nitroprussiate de sodium (SNP), donneur exogène de NO.

VI. Fonction cardiaque ventriculaire gauche par échocardiographie

1. Fonction cardiaque ventriculaire gauche par échocardiographie

Les mesures échocardiographiques sont réalisées sur un échographe Vivid7 Ultrasound (General Electric healthcare) équipé d'une sonde linéaire de 14MHz (M12L). Les analyses des acquisitions sont réalisées sur un système d'analyse (Echopac PC). L'ensemble des échocardiographies est réalisé sur des animaux anesthésiés par inhalation d'isoflurane 1% délivré sous un masque et placés sur une plaque chauffante afin de limiter l'hypothermie notamment chez les souris en sepsis.

a. Temps-mouvement

L'acquisition des images en mode temps-mouvement a été réalisée en coupe parasternale petit axe au niveau des muscles papillaires du ventricule gauche (VG) et permet la mesure des épaisseurs des parois antérieure et postérieure du VG (mm) en télé-diastole (EPAtD, EPpTd) et en télé-systole (EPAtS, EPpTs), ainsi que les diamètres VG (mm) télé-diastolique et télé-systolique (DtDVG, DtDSG). La fraction de raccourcissement (FR), paramètre de la fonction contractile du VG, est calculée selon la formule :

$$FR (\%) = \frac{DtDVG - DtSVG}{DtDVG} \times 100$$

b. Doppler pulsé

Le mode doppler pulsé permet de visualiser les flux sanguins cardiaques et vasculaires et de calculer la vitesse de déplacement de ces flux. La sonde est placée au niveau de l'aorte thoracique permettant de visualiser les flux sanguins sortant du VG. La fréquence cardiaque (FC, batt/min) et l'intégrale temps vitesse (ITV, cm) sont mesurées et permettent de calculer le volume d'éjection systolique (VES, mL), représentant la capacité du VG à éjecter le sang vers le système périphérique :

$$VES = ITV \text{ aortique} \times \pi \times (D^2_{\text{aortique}}/4)$$

et le débit cardiaque (DC, mL/min) :

$$DC = VES \times FC$$

L'index cardiaque est obtenu par le calcul du rapport débit cardiaque sur la masse corporelle de l'animal (IC, mL/min/g).

Afin de mesurer la vitesse des flux entrant et sortant au niveau de la valve mitrale présente entre l'oreillette gauche et le VG, la sonde est placée au niveau de la face inférieure de la cage thoracique pour obtenir une coupe apicale 4 cavités du cœur. La mesure du ratio E/A, indicateur de fonction diastolique peut alors être réalisée. L'onde E (*early*) représente le remplissage passif du VG par les flux entrant suite à la relaxation du VG ; l'onde A (*atrial*) représente le remplissage actif du VG par les flux entrant suite à la contraction auriculaire. Chez la souris, la fréquence cardiaque étant très élevée, les deux ondes sont rapprochées dans le temps et apparaissent presque fusionnées. Il est donc nécessaire de pratiquer cette acquisition à une fréquence d'environ 450 battements/minute.

2. Cœur isolé perfusé par la technique de Langendorff

Après exérèse, le cœur est immédiatement plongé dans une solution froide de Krebs-Henseleit (KH) et monté sur le dispositif de Langendorff. Le cœur est perfusé *via* l'aorte par une solution de KH bicarbonate (NaCl 120mM, KCl 4.8mM, KH₂PO₄ 1.2mM, MgSO₄ 1.2mM, NaHCO₃ 25mM, CaCl₂ 1.25mM, glucose 11mM ; 37°C ; pH 7.35-7.40) à un flux constant de 2mL/min. Après 30 minutes d'équilibration initiale, le cœur est perfusé pendant 30 minutes en utilisant soit une solution de KH conventionnelle décrite ci-dessus (avec le glucose comme substrat), soit une solution de KH supplémentée avec une solution de 1.2mM de palmitate dans 3% de BSA (avec le glucose et le palmitate comme substrats). La fonction contractile cardiaque a été évaluée à l'aide d'un crochet métallique inséré dans l'apex du cœur pour contrôler et enregistrer la force développée par le ventricule gauche, la fréquence cardiaque et la consommation d'O₂ myocardique (MvO₂). L'efficacité cardiaque est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Efficacité cardiaque} = \frac{\text{force développée par le ventricule gauche} \times \text{fréquence cardiaque}}{MvO_2}$$

VII. Biologie Moléculaire

1. Prélèvements des organes

Les différents organes sont prélevés sur les souris sous anesthésie profonde. Le cœur est rapidement prélevé, lavé dans une solution de NaCl 0.9% et coupé en trois parties distinctes : apex (utilisé pour la qRT-PCR), milieu du cœur et base (utilisé pour le Western-Blot). Le tissu adipeux épидidymal, un lobe du foie ainsi que le muscle gastrocnemius sont également prélevés, rincés dans

une solution de NaCl 0.9% et coupé en deux. L'artère mésentérique est quant à elle rapidement disséquée dans une solution de Krebs après prélèvement du mésentère. L'ensemble des organes est congelé dans l'azote liquide et conservé à -80°C.

2. Quantification protéique par Western-Blot

a. Mesure de l'expression protéique

Les techniques d'extraction, d'expression et de révélation permettant la mesure de l'expression des protéines de l'inflammation, du stress oxydant, du stress du réticulum endoplasmique et de l'adhésion entre autres, sur le cœur et l'artère mésentérique sont détaillées dans le paragraphe 4.b « Mesure de l'expression protéique du transporteur du glucose 4 par Western-Blot ». Les techniques utilisées sont semblables à celles décrites à l'exception de :

- l'extraction sur artères mésentériques qui est réalisée par un broyage manuel avec un potter dans 30µL de tampon RIPA ;
- la quantité de protéines chargée dans les puits est de 50µg pour le cœur et de 30µg pour l'artère mésentérique.

Les anticorps primaires (Cell Signaling) utilisés sont : anti-Akt (1/1000^{ème}), antiphospho-Akt (1/1000^{ème}), anti-catalase (1/1000^{ème}), anti-CHOP (1/1000^{ème}), anti-eNOS (1/500^{ème}), antiphospho-eNOS (1/500^{ème}), anti-GRP78 (1/1000^{ème}), anti-ICAM1 (1/1000^{ème}), antiphospho-IRE1α (1/1000^{ème}), antiphospho-eIF2α (1/500^{ème}), antiphospho-PERK (1/500^{ème}), anti-PI3Kp85 (1/1000^{ème}), anti-PI3Kp110 (1/1000^{ème}) et anti-TNF-α (1/500^{ème}).

3. Q RT PCR

a. Extraction

L'ensemble des manipulations (extraction, traitement à la DNase, réaction de transcription inverse et q PCR) est réalisé sur glace. Les morceaux de cœur, foie, muscle ou tissu adipeux sont placés dans des tubes à billes (Precellys) contenant 500µL de Trizol (Invitrogen). Les organes sont broyés mécaniquement par les microbilles dans un homogénéisateur de tissu (Precellys 24, Bertin Technologies, France) après deux cycles de broyage (2 x 10 sec, 5500 tours/min). Après broyage, les homogénats sont transférés dans des tubes eppendorf propres et 100µL de chloroforme sont ajoutés. Les tubes sont agités durant 15 secondes et incubés 2 – 3 minutes à température ambiante. Après centrifugation (12000g, 15 minutes, 4°C), la phase aqueuse est transférée dans un tube propre et 250µL d'isopropanol sont ajoutés afin de précipiter l'ARN. Les tubes sont vortexés et mis en incubation 10 minutes à température ambiante. Après centrifugation (12000g, 15 minutes, 4°C), un culot colloïdal

se forme au fond du tube. Le surnageant est jeté et le culot est lavé par ajout de 500µL d'éthanol à 75%, agitation et centrifugation (7500g, 5 minutes, 4°C) dont l'opération est répétée trois fois. Au dernier lavage, l'éthanol est jeté et le culot d'ARN est brièvement séché à l'air. Le culot est resuspendu dans 30µL d'eau RNase free puis chauffé à 65°C pendant 5 minutes. Les échantillons sont alors conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

b. Traitement DNase

Afin de débarrasser la solution d'ARN d'éventuelles contaminations à l'ADN, un traitement à la DNase est réalisé avec un kit de traitement à la DNase I (Invitrogen). La concentration d'ARN est évaluée par spectrophotométrie (Nanodrop, Thermo Scientific, USA). Une mesure est effectuée à 260nm permettant de déterminer la quantité d'ARN et une autre à 280nm correspondant à la concentration protéique de l'échantillon. Le ratio 260/280 permet d'évaluer la qualité de l'extraction. Après dosage au Nanodrop, 2µg d'ARN sont prélevés et complétés à 16µL avec de l'eau RNase free. Un mix composé de 2µL de DNase I et 2µL de tampon 10X est ajouté dans chacun des échantillons. Après incubation des tubes 15 minutes à température ambiante, 2µL d'EDTA sont ajoutés dans chacun des échantillons et la solution est chauffée 10 minutes à 65°C.

c. Réaction de transcription inverse

Après le traitement à la DNase, les ARN sont à nouveau dosés au Nanodrop. 1µg d'ARN est déposé dans un tube et complété à 16.75µL d'eau RNase free. Un mix composé de 3µL de dNTP 10mM (Invitrogen), 2.5µL de random primers (Invitrogen), 0.75µL de RNaseOUT (30U/µL, Invitrogen) et 6µL de tampon 5X est ajouté dans chacun des échantillons. Les tubes sont placés 5 minutes à 65°C puis 1 heure à 37°C après ajout de 1µL de transcriptase inverse (M-MLV Reverse Transcriptase, Invitrogen). La réaction est arrêtée par chauffage des échantillons à 95°C pendant 5 minutes permettant une dénaturation de l'enzyme. Les produits de transcription inverse sont ensuite conservés à -20°C avant utilisation.

d. PCR quantitative

La réaction de PCR quantitative permet de suivre en temps réel, le processus d'amplification par réaction de polymérisation (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) en détectant la fluorescence émise, grâce à l'utilisation de SYBR Green I agent intercalant de l'ADN double brin, par les produits de PCR néo formés. La fluorescence émise est directement proportionnelle à la quantité d'ADN amplifié.

Pour se faire, un mix composé de 0.5µL d’amorce sens, 0.5µL d’amorce anti-sens (dont les séquences sont énoncées dans la figure 40), 5µL de SYBR Green I et 1.5µL d’eau RNase free est déposé dans chacun des puits d’une plaque 96 puits préalablement déposée sur un bloc froid. 2.5µL d’échantillon sont ajoutés dans les puits, la plaque est centrifugée (500g, 1 minute, 4°C) et placée dans l’appareil de RT-PCR quantitative (Light Cycler LC480, Roche). La PCR se déroule de la façon suivante :

- Dénaturation (95°C, 10 minutes) ;
- Amplification avec dénaturation (95°C, 10 secondes), hybridation (60°C, 10 secondes) et élongation (variable en fonction de l’amorce) répétée pendant 40 cycles.

Le logiciel LightCycler 480 calcule la concentration d’ADNc cible grâce à une gamme de dilution obtenue par mélange d’ADNc de chaque échantillon. Les résultats obtenus sont rationalisés par rapport à l’amplification des gènes de ménages.

	Gène	Séquence	Taille de l’amplicon
Gènes de ménage	B2m	Sens AGAATGGGAAGCCGAACATA Anti-sens CCGTTCTTCAGCATTGGAT	82
	Eef2	Sens GCGAGGACAAAGACAAGGAG Anti-sens GGGATGGTAAGTGGATGGTG	108
Gènes d’intérêts	CD-45	Sens TCGTGCCCAAACAATTACA Anti-sens ATCCCAAATCTGTCTGCAC	96
	COX-1	Sens TAATCCCAGCACTTGGAAAGG Anti-sens TGGCTGGCCTAGAACTACT	87
	COX-2	Sens AGGTCATTGGTGGAGAGGTG Anti-sens GTTTCTCAGGGATGTGAGGA	84
	eNOS	Sens GACCCTCACCGCTACAACAT Anti-sens CACAGGGATGAGGTTGTCCT	77
	Gp91phox	Sens AAAGGTGGTCATCACCAAGG Anti-sens ACTGTCCACCTCCATCTTG	92
	ICAM1	Sens ACTGGCAGTGGTTCTCTGCT Anti-sens AAAGTAGGTGGGGAGGTGCT	60
	IL-10	Sens CCAGGGAGATCCTTTGATGA Anti-sens AACTGGCCACAGTTTTCAGG	96
	IL-1β	Sens CAGGCAGGCAGTATCACTCA Anti-sens TGTCTCATCCTGGAAGGTC	86
	IL-6	Sens CCGGAGAGGAGACTTCACAG Anti-sens TCCACGATTTCCAGAGAAC	102
	TNF-α	Sens TAGCCAGGAGGGAGAACAGA Anti-sens TTTTCTGGAGGGAGATGTGG	127
	VCAM1	Sens TCTTACCTGTGCGCTGTGAC Anti-sens ACCTCCACCTGGGTTCTCTT	71

Figure 40 : Séquences sens et anti-sens des amorces utilisées en qPCR.

Séquences sens et antisens des amorces et taille de l’amplicon des gènes de ménage et des gènes d’intérêts.

VIII. Statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism (Version 5.01). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm erreur standard de la moyenne (SEM). Le n représente le nombre d'animaux utilisés pour chaque expérience. La normalité est testée par les tests de Shapiro-Wilk et d'Agostino-Pearson. Dans le cas d'une distribution normale respectée, un test ANOVA à deux facteurs (*two-way ANOVA*) est réalisé avec post-tests de Bonferroni. Dans le cas d'une distribution normale non respectée ou avec des effectifs ne permettant pas de tester la normalité, un test statistique de Kruskal-Wallis non paramétrique est utilisé suivi d'un post-test de Dunn permettant la comparaison des groupes. L'analyse univariée de la mortalité en fonction du temps est réalisée à l'aide de courbes de survie et d'un test de Mantel-Cox. Un résultat est considéré significatif lorsque la valeur de p est < 0.05 .

PARTIE RESULTATS
& DISCUSSION

Etude 1 : Impact de la délétion totale de PTP1B dans le mécanisme d'insulino-résistance et ses conséquences inflammatoires et cardiovasculaires dans le sepsis.

L'hyperglycémie et l'insulino-résistance, désordres métaboliques fréquents au cours des états septiques, sont associés à un pronostic défavorable et à une augmentation de la mortalité ⁴⁴³. L'insulino-thérapie et le contrôle strict de la glycémie ont montré des résultats encourageants en termes de survie et de diminution des défaillances d'organes ³¹⁰. Cependant, l'administration d'insuline à forte dose est aujourd'hui controversée car s'associe à l'apparition d'hypoglycémies délétères avec un impact en termes de survie non constamment retrouvé, au point que les recommandations sur la prise en charge de ce désordre glucidique ne retiennent pas le contrôle strict par une insulinothérapie ³¹⁷. Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la réponse métabolique et l'impact du contrôle glucidique constituent donc un axe de recherche essentiel dans la mise au point de thérapies nouvelles.

La Protéine Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) est un régulateur négatif de la voie de signalisation de l'insuline et de la voie de production du monoxyde d'azote (NO). Notre laboratoire a mis en évidence l'impact bénéfique de la délétion génétique de cette enzyme dans l'amélioration de la fonction endothéliale et dans la diminution de la sévérité de la dysfonction et du remodelage cardiaques dans un modèle murin d'insuffisance cardiaque chronique ^{399,432}. De plus, des effets bénéfiques de la délétion de PTP1B ont été mis en évidence sur la fonction cardiovasculaire dans un modèle murin de choc endotoxinique ⁶⁵.

Afin de comprendre l'effet thérapeutique potentiel de la délétion de PTP1B sur le métabolisme du glucose et l'insulino-résistance dans l'amélioration de la fonction vasculaire au cours du sepsis, nous avons évalué les effets métaboliques et cardiovasculaires de l'inactivation génétique totale de la PTP1B dans un modèle de sepsis induit par ligature et perforation caecale.

Les principaux résultats de l'étude sur le rôle de la délétion de la PTP1B dans l'insulino-résistance et l'hyperglycémie et leur impact cardiovasculaire dans un modèle de sepsis expérimental induit par ligature et perforation caecale sont rassemblés dans la publication suivante ⁴⁴⁴. Nous présenterons ensuite les résultats complémentaires portant notamment sur le suivi de la survie, l'étude de la calorimétrie indirecte et l'évaluation de la fonction cardiaque par échocardiographie n'ayant pas été inclus à la publication.

Résultats complémentaires

1. Evaluation de la survie

L'étude de la survie est réalisée sur 120 heures. Le temps T0 correspond à la fin de la chirurgie de CLP. Les résultats ne montrent pas de mortalité dans les groupes WT Sham et PTP1B^{-/-} Sham. Les animaux PTP1B^{-/-} présentent une amélioration significative de la survie par rapport aux animaux WT avec un taux de survie de 25% chez les animaux PTP1B^{-/-} contre 5% chez les animaux WT 120 heures après la chirurgie de CLP (figure 41).

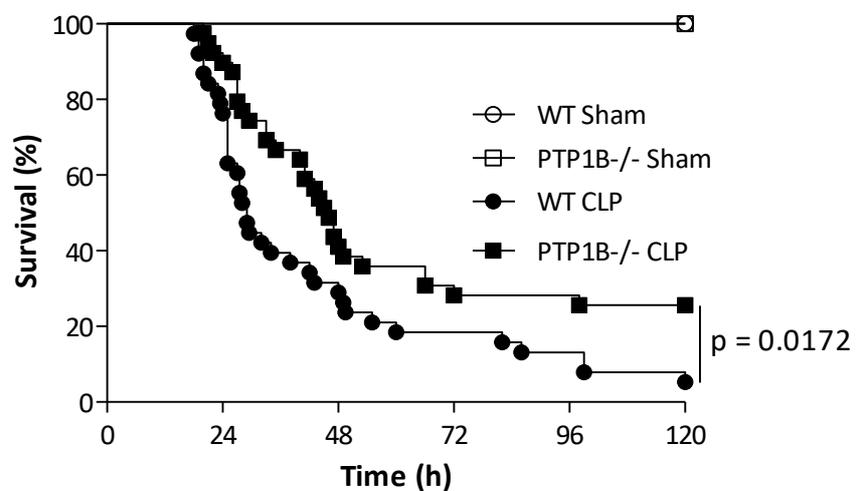


Figure 41 : Courbe de survie.

La survie est évaluée sur 120 heures (Sham : n=10 animaux/groupe ; CLP : n=40 animaux/groupe). p=0.0172 ; test statistique de Mantel-Cox.

2. Evaluation du métabolisme énergétique

L'ensemble de l'évaluation du métabolisme énergétique est réalisé grâce au système de calorimétrie indirecte. Les mesures réalisées chez les animaux WT Sham et PTP1B^{-/-} Sham représentent les valeurs pré-opératoires ; les mesures réalisées chez les animaux WT CLP et PTP1B^{-/-} CLP représentent les valeurs post-opératoires.

a. Evaluation des paramètres métaboliques

La mesure de la consommation d'oxygène (VO₂) et de la production de dioxyde de carbone (VCO₂) montre un effondrement du VO₂ et du VCO₂ en post-opératoire avec une diminution significative de ces paramètres. Les mesures ne montrent pas de différence significative entre WT et PTP1B^{-/-} (figure 42 A-B). Le quotient respiratoire (QR) est conservé mais présente cependant une abolition de la variation nyctémérale, sans différence entre WT et PTP1B^{-/-} (figure 42 C). Nous observons une augmentation significative du VCO₂ et du QR nocturne chez les animaux PTP1B^{-/-} Sham en comparaison avec la valeur diurne. La mesure de l'énergie dépensée, des déplacements horizontaux et du redressement montre une diminution significative des valeurs en post-opératoires (figure 42 D-E-F). Nous observons une augmentation significative des déplacements horizontaux et du redressement en phase nocturne chez les animaux Sham témoignant de la phase d'activité des animaux.

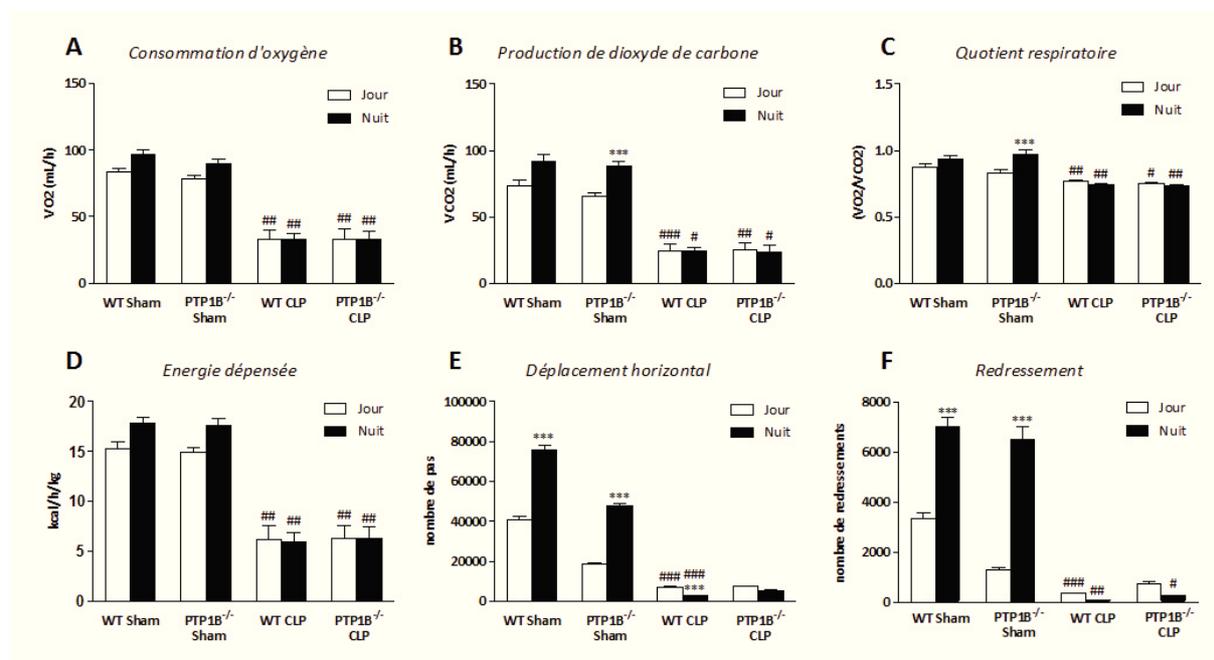


Figure 42 : Evaluation des paramètres métaboliques en pré- et post-opératoires.

Le système de calorimétrie indirecte permet de mesurer les valeurs de consommation d'oxygène (A), de production de dioxyde de carbone (B), de quotient respiratoire (C), d'énergie dépensée (D), de déplacements horizontaux (E) et de redressement (F). Ces données sont représentées en pré-opératoires et en post-opératoires avec n=8 par groupe. * vs. Sham ; # vs. jour ou nuit ; test non paramétrique de Kruskal Wallis avec post-test de Dunn.

b. Evaluation des consommations alimentaire et hydrique

L'évaluation de ces paramètres montre une augmentation significative des consommations alimentaire et hydrique en phase nocturne. Nous observons une diminution significative des consommations hydrique et alimentaire après CLP (figure 43).

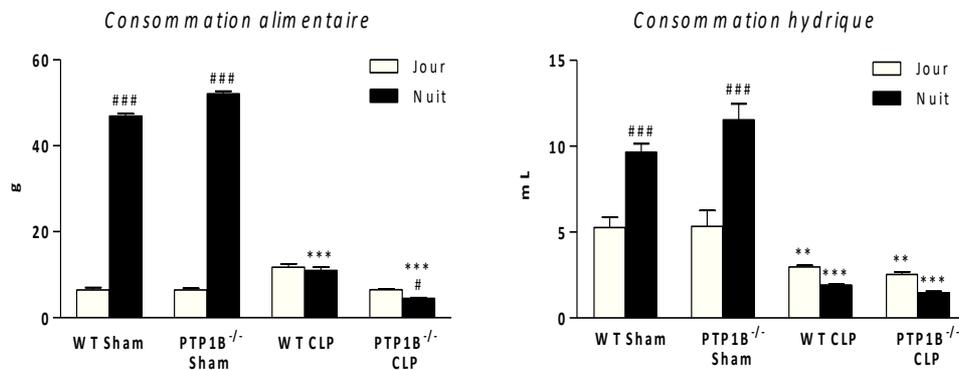


Figure 43 : Evaluation des consommations alimentaire et hydrique.

Le système de calorimétrie indirecte permet de mesurer les valeurs de consommation alimentaire et hydrique. Ces données sont représentées en pré-opératoires et en post-opératoires avec n=8 par groupe. * vs. Sham ; # vs. jour ou nuit ; test non paramétrique de Kruskal Wallis avec post-test de Dunns.

c. Evaluation de l'utilisation des substrats

Les valeurs d'utilisation de substrats sont obtenues grâce aux valeurs de quotient respiratoire permettant de déterminer le pourcentage d'utilisation des carbohydrates et le pourcentage d'utilisation des acides gras. En phase diurne, l'utilisation des substrats est mixte en pré-opératoire. En post-opératoire, nous observons une utilisation plus importante du substrat acide gras. En phase nocturne, nous observons une utilisation plus importante du substrat carbohydrate en pré-opératoire alors que nous constatons une utilisation plus importante du substrat acide gras en post-opératoire.

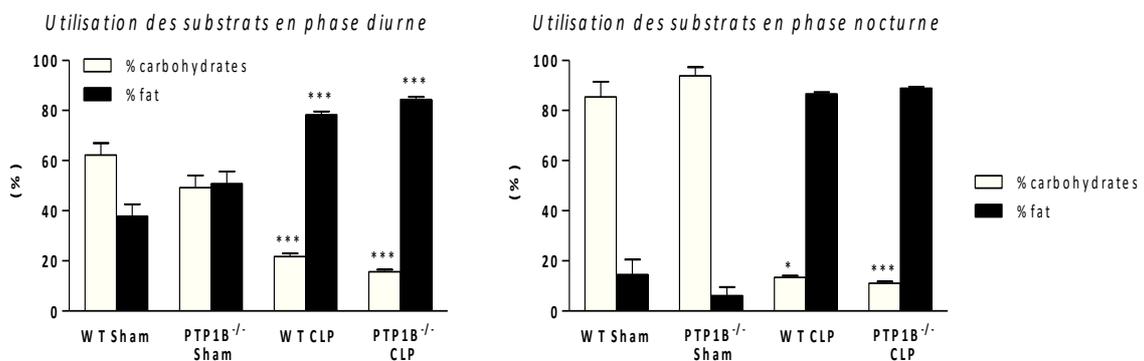


Figure 44 : Evaluation de l'utilisation des substrats.

Les valeurs de quotient respiratoire obtenues par le système de calorimétrie indirecte permettent de déterminer les valeurs d'utilisation des substrats. Ces données sont représentées en pré-opératoires et en post-opératoires avec n=8 par groupe. * vs. Sham ; test non paramétrique de Kruskal Wallis avec post-test de Dunn.

3. Evaluation de la fonction cardiaque par échocardiographie

L'évaluation de la fonction cardiaque ne montre aucune différence significative de l'index cardiaque (IC), de la fraction de raccourcissement (FR), de la fraction d'éjection (FE) et du ratio E/A entre les animaux WT Sham et PTP1B^{-/-} Sham (figure 45 A à D). L'IC et le ratio E/A sont significativement modifiés chez les animaux WT CLP et PTP1B^{-/-} CLP en comparaison aux animaux Sham (figure 45 A et D). La FR et la FE sont significativement augmentées chez les animaux PTP1B^{-/-} CLP en comparaison aux animaux WT CLP (figure 45 B et C).

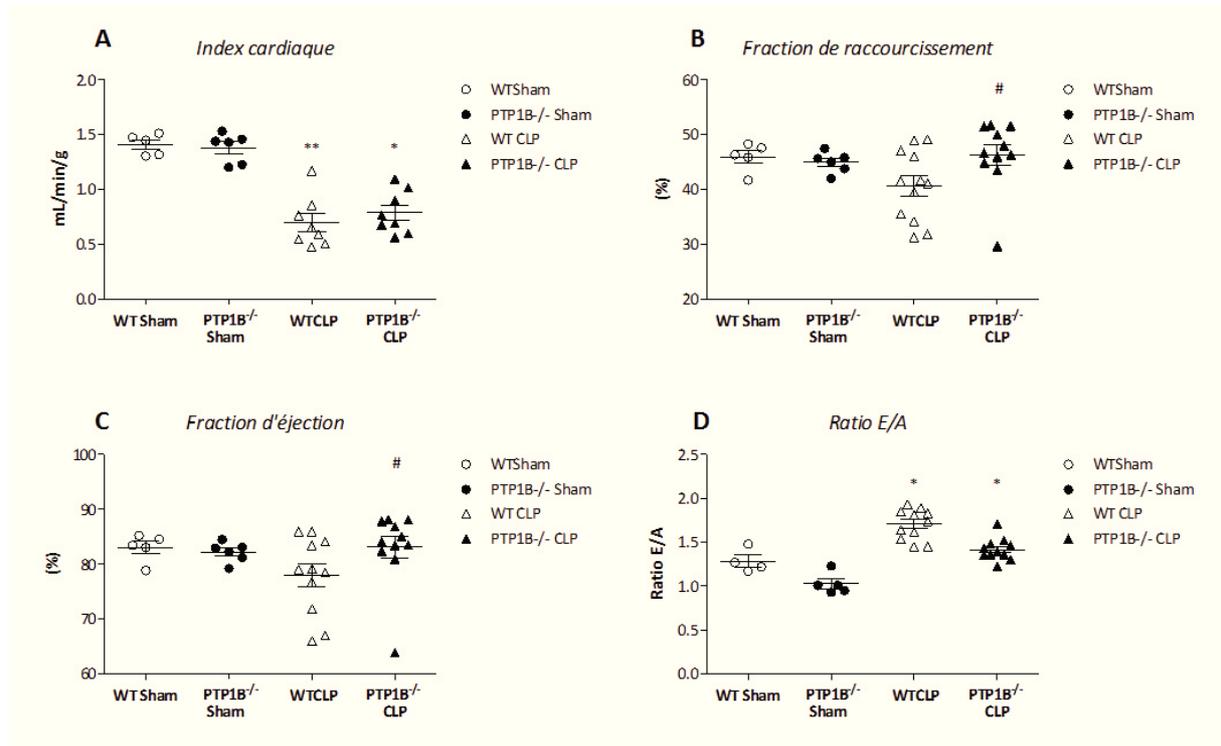


Figure 45 : Evaluation échocardiographique.

L'évaluation de la fonction cardiaque par échocardiographie permet d'évaluer l'index cardiaque (A), la fraction de raccourcissement (B), la fraction d'éjection (C) et le ratio E/A (D).

Sham n=6 par groupe ; CLP n=8 par groupe. * vs. Sham ; # vs. WT CLP ; test non paramétrique de Kruskal Wallis avec post-test de Dunn.

Discussion de l'étude 1

L'objectif de cette étude était de comprendre le rôle potentiel de la délétion génétique totale de PTP1B sur le métabolisme glucidique et son impact sur la fonction cardiovasculaire dans un modèle de sepsis induit par ligature et perforation caecale.

Les travaux réalisés précédemment au sein du laboratoire ont montré que la délétion génétique totale et l'inhibition pharmacologique de PTP1B améliorent la sensibilité à l'insuline dans un modèle murin d'insuffisance cardiaque³⁹⁹. De même, une autre étude du laboratoire montre un effet bénéfique de la délétion génétique totale de PTP1B sur la mortalité avec une amélioration de la fonction cardiovasculaire dans un modèle de choc endotoxinique *via* une diminution de l'inflammation systémique et tissulaire cardiaque et une augmentation de l'activité de la voie Akt/NOS⁶⁵. En revanche, l'impact de la délétion de PTP1B sur l'altération du métabolisme glucidique induite par le sepsis n'a pas été étudié. Nous avons donc mis au point un modèle de sepsis induit par Ligature et Perforation Caecale permettant d'étudier les troubles métaboliques associant une dysfonction cardiovasculaire et le rôle bénéfique potentiel de la délétion génétique totale de PTP1B.

Dans cette étude nous avons mis en évidence que la délétion génétique totale de PTP1B entraîne :

- une modulation de l'insulino-résistance induite par le sepsis ;
- une amélioration de la fonction endothéliale ;
- une diminution du processus inflammatoire ;
- une modulation du métabolisme cardiaque ;
- une amélioration de la survie.

Métabolisme énergétique dans le modèle de Ligature et Perforation Caecale

L'étude du métabolisme énergétique montre en pré-chirurgie une augmentation de la consommation d'oxygène (VO_2), de la production de dioxyde de carbone (VCO_2), du quotient respiratoire (QR), des déplacements horizontaux, du redressement et de l'énergie dépensée en phase nocturne témoignant du rythme nyctémérale des animaux sans différence entre WT Sham et PTP1B^{-/-} Sham. En post-chirurgie, nous observons un effondrement des valeurs de VO_2 , de VCO_2 , de l'énergie dépensée, des déplacements horizontaux et du redressement s'accompagnant d'une abolition des variations nyctémérales des valeurs du QR. Ce profil de métabolisme énergétique est similaire chez les animaux WT CLP et PTP1B^{-/-} CLP, validant le modèle de CLP mis en place comme un modèle de sepsis sévère. Dans un modèle de sepsis à *Staphylococcus aureus*, ce profil de diminution des valeurs

de VO_2 et de VCO_2 est également observé. Cependant, la diminution est observée de manière transitoire témoignant d'un modèle peu sévère ⁴⁴⁵. De même, les différences observées entre notre étude et celle de Haden *et al.* peuvent s'expliquer par l'utilisation de souches de souris différentes dont le métabolisme énergétique peut varier.

L'analyse des valeurs du QR nous a également permis d'évaluer l'utilisation des substrats chez les animaux en pré- et en post-chirurgie, soit avant et après le processus inflammatoire induit par le CLP. Durant la phase nocturne en pré-chirurgie, nous observons une utilisation de carbohydrates à 80% et d'acides gras à 20% s'expliquant par un métabolisme basal tourné vers l'utilisation du glucose en période d'activité. Durant cette même phase nocturne en post-chirurgie, nous observons un switch métabolique avec une utilisation de carbohydrates à 20% et d'acides gras à 80% témoignant d'un métabolisme basal modifié se rapprochant d'un type cétose de jeûne.

La calorimétrie indirecte, méthode de référence permettant la mesure de la dépense énergétique, présente un vif intérêt dans l'étude du métabolisme énergétique à la fois en clinique mais aussi en expérimentation ⁴⁴⁶. L'objectif de notre travail était donc d'établir *via* l'étude de la calorimétrie indirecte, le profil métabolique de nos animaux et notre hypothèse était de mettre en évidence le rôle bénéfique de la délétion génétique totale de PTP1B dans les réponses métaboliques observées. Ainsi, l'étude de la calorimétrie nous a permis de caractériser notre modèle de CLP se définissant par une sévérité importante et induisant de profonds changements métaboliques sur l'ensemble des animaux WT et PTP1B^{-/-} avec une absence d'effet de la délétion génétique totale de PTP1B sur l'ensemble des paramètres métaboliques étudiés. Nos résultats permettent de mettre en avant que le modèle de CLP induit une modification du métabolisme basal des animaux tourné vers un métabolisme de jeûne. Ces résultats peuvent être rapprochés des données de la littérature montrant la mise en place d'un métabolisme de jeûne lors d'une infection bactérienne ⁴⁴⁷.

Cependant, la fiabilité des mesures réalisées peut être remise en cause par les valeurs mesurées de VO_2 et de VCO_2 particulièrement faibles dans notre modèle. Un système de calorimétrie avec des cages plus petites, possédant un volume d'air total moins important, semblerait plus adapté à la mesure de ces paramètres et permettrait de détecter des différences potentielles dans notre modèle.

Métabolisme glucidique : impact de la délétion génétique totale de PTP1B

Le rôle de PTP1B en pathologie et notamment dans les troubles métaboliques a souvent été étudié. L'expression de PTP1B est notamment augmentée dans le cas d'une insulino-résistance et la

délétion génétique totale de PTP1B augmente l'insulino-sensibilité et prévient du développement de l'obésité ^{419,421,422}.

Le test de tolérance au glucose réalisé 16 heures après le CLP montre que les animaux WT CLP présente une altération de la réponse au glucose avec une hyperglycémie prolongée. Ce phénomène est associé à une augmentation des taux d'insuline plasmatique à jeun et 15 minutes après une injection de glucose avec une augmentation de l'index HOMA, témoin de l'insulino-résistance tissulaire périphérique et de l'HOMA beta, témoin de la fonction endocrine des cellules β pancréatiques. Ainsi, notre modèle étudié de CLP induit une insulino-résistance sans altération de la fonction pancréatique. La délétion génétique totale en PTP1B améliore l'ensemble de ces paramètres dont l'insulino-sensibilité suggérant une implication de PTP1B dans le développement de l'insulino-résistance observée.

La fixation de l'insuline sur son récepteur entraîne une activation en aval de plusieurs protéines régulatrices de l'absorption de glucose *in fine*. L'étude des mécanismes moléculaires impliquant le rôle de PTP1B dans le développement de l'insulino-résistance porte donc sur l'analyse des voies de signalisation PI3K/Akt/GLUT-4 et AMPK spécifiquement au niveau cardiaque. L'analyse de l'expression des GLUT-4 dans différentes fractions membranaires cardiaques montre une diminution significative de l'expression des GLUT-4 à la membrane plasmique et dans les membranes de faible densité chez les animaux WT CLP témoignant d'une altération, d'une part de l'expression des GLUT-4 en basal et d'autre part, de la translocation des GLUT-4 dans la cellule expliquant l'altération de l'absorption du glucose chez les animaux WT CLP dans le sepsis. La délétion génétique totale de PTP1B permet de restaurer l'absorption du glucose *via* une augmentation à la fois de l'expression basale des GLUT-4 et de la translocation des GLUT-4 à la membrane. Chez les animaux PTP1B^{-/-} Sham, l'expression membranaire de GLUT-4 est diminuée suggérant un rôle physiologique de PTP1B dans la signalisation insulinique. Une étude de Bakke et ses collaborateurs porte sur la régulation de la translocation des GLUT-4 par la PTP1B *via* la déphosphorylation de Munc18 impliquant le système de reconnaissance vésicule/membrane *v-snare/t-snare*. Les auteurs montrent que la déficience génétique en PTP1B augmente la phosphorylation de Munc18 favorisant l'interaction de GLUT-4 avec le système *v-snare/t-snare* et donc l'ancrage de GLUT-4 à la membrane plasmique dans un modèle murin de DT2 induit par un régime riche en graisses ¹⁶². Notre travail confirme ces résultats sur l'expression et la translocation de GLUT-4 à la membrane et le rôle potentiel bénéfique de la déficience de PTP1B dans un modèle de sepsis.

Nous observons une augmentation de la phosphorylation d'Akt après stimulation à l'insuline. Cette phosphorylation n'est ni affectée par le CLP ni par la délétion génétique de PTP1B suggérant que

la voie insulinique dépendante de PI3K/Akt n'est pas altérée par le sepsis ou par la délétion de PTP1B et n'est pas impliquée dans la baisse de l'expression et de la translocation de GLUT-4 à la membrane. Une voie alternative permettant la modulation de la translocation des GLUT-4 à la membrane est la voie AMPK^{448,449}. Nous démontrons que la délétion génétique totale de PTP1B entraîne une augmentation de la phosphorylation d'AMPK après stimulation à l'insuline. Ce résultat est retrouvé dans un modèle d'insulino-résistance induite par un régime riche en graisses⁴⁵⁰. Parallèlement, nous observons que la délétion génétique totale en PTP1B induit une diminution significative de l'expression des ARNm myocardiques de TNF- α , d'IL-1 β , de VCAM1 et de gp91phox. Cette diminution de l'inflammation myocardique s'explique par la restauration des niveaux de phosphorylation d'AMPK. En effet, de nombreuses études ont montré le rôle d'AMPK dans la réponse inflammatoire ; l'AMPK inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires *via* une inactivation de la voie NF- κ B⁴⁵¹.

L'ensemble de ces résultats suggère que, dans un modèle de sepsis induit par CLP, la délétion génétique totale de PTP1B active la voie AMPK et réduit l'inflammation permettant une augmentation de la translocation des GLUT-4 à la membrane et une absorption du glucose réduisant le phénomène d'insulino-résistance observé.

Métabolisme et fonction myocardique : impact de la délétion génétique totale de PTP1B

L'analyse de la fonction cardiaque systolique par échocardiographie montre une diminution significative de l'index cardiaque chez les animaux WT CLP sans amélioration chez les animaux PTP1B^{-/-} CLP. Nous observons également une diminution significative de la fraction d'éjection et de la fraction de raccourcissement chez les animaux WT CLP, paramètres restaurés à des valeurs basales chez les animaux PTP1B^{-/-} CLP. L'étude de la fonction cardiaque diastolique par analyse du ratio E/A montre une augmentation de ce ratio chez les animaux WT CLP sans amélioration chez les animaux PTP1B^{-/-} CLP. L'évaluation de la fonction cardiaque par échocardiographie est interprétée avec précaution compte tenu des modalités insuffisantes de remplissage vasculaire dans notre modèle.

L'étude réalisée sur cœur isolé perfusé est une approche permettant d'étudier le métabolisme cardiaque en s'affranchissant des perturbations volémiques. La pression développée dans le ventricule gauche est un paramètre de fonction cardiaque et notamment de contractilité. Ainsi, le CLP induit une diminution significative de la force développée par le VG témoignant d'une altération de la fonction cardiaque ni modifiée par l'apport de palmitate ni par la délétion génétique de PTP1B. Pour les WT Sham et PTP1B^{-/-} Sham, une diminution de l'efficacité cardiaque est observée lorsque les cœurs sont perfusés avec du Krebs supplémenté en palmitate. Ce résultat confirme le phénomène de Randle montrant que

les AGL (palmitate) en excès entraînent à la fois une diminution de l'absorption et de l'utilisation du glucose mais aussi une diminution de l'activité des récepteurs à l'insuline empêchant la translocation des GLUT-4 et donc l'absorption du glucose^{196,201}. Ainsi, la perfusion d'AGL dans le myocarde entraîne une altération de l'utilisation/oxydation du glucose avec diminution de la force contractile du myocarde. Chez les animaux WT CLP, une augmentation de l'efficacité cardiaque est observée lorsque les cœurs sont perfusés avec du Krebs palmitate alors que l'efficacité cardiaque est diminuée dans les mêmes conditions chez les animaux PTP1B^{-/-} CLP. Ce résultat suggère que la délétion génétique totale en PTP1B module la réponse métabolique myocardique chez les animaux PTP1B^{-/-} CLP sans changement de la performance intrinsèque cardiaque témoignant de la flexibilité d'utilisation des substrats chez les animaux PTP1B^{-/-}. L'ensemble de ces résultats est cohérent avec les effets inhibiteurs connus de la perfusion de palmitate sur l'absorption du glucose cardiaque par diminution de la translocation des GLUT-4⁴⁵². En conclusion, bien que la délétion génétique totale de PTP1B n'apporte pas d'amélioration significative de la fonction ou de l'efficacité cardiaque, elle est responsable d'une modulation de l'utilisation des substrats à l'origine d'une variation de la réponse métabolique myocardique.

Fonction endothéliale : impact de la délétion génétique totale de PTP1B

L'étude de la fonction vasculaire par artériographie nous permet d'observer une vasoconstriction à la phényléphrine plus importante chez les animaux CLP. Cette augmentation de la vasoconstriction pourrait s'expliquer par une diminution de la quantité de NO dans la circulation mésentérique chez les souris en sepsis dont la variabilité de réponse vasoconstrictrice dans les différents territoires est déjà démontrée⁴⁵³. En présence de 1400W la vasoconstriction est similaire chez les animaux Sham et CLP. La vasodilatation en réponse au flux est totalement abolie chez les animaux WT CLP et entièrement restaurée chez les animaux PTP1B^{-/-} CLP confirmant l'effet protecteur endothélial de la délétion génétique en PTP1B précédemment observé dans un modèle de LPS⁶⁵. La réponse vasodilatatrice est diminuée en présence de L-NNA impliquant un mécanisme de dilatation en réponse au flux dépendant du NO. Ainsi, la délétion génétique en PTP1B permettrait de restaurer les taux de NO améliorant la fonction endothéliale. Un résultat similaire est obtenu dans l'étude de Cauwels où la restauration de la production de NO permet l'amélioration de la relaxation vasculaire lors d'une stimulation des artères au TNF- α ⁴⁵⁴. Nous observons également une diminution significative de la réponse vasodilatatrice en réponse à l'insuline chez les animaux WT CLP et une abolition complète de cette réponse en présence de L-NNA démontrant une insulino-résistance vasculaire induite par le sepsis. Ainsi, la production de NO induite par l'insuline et permettant une dilatation vasculaire contribue aux effets métaboliques d'absorption et d'utilisation du glucose. L'altération de

la réponse endothéliale induite par le sepsis contribue au phénomène d'insulino-résistance présent^{269,455}. La délétion génétique totale de PTP1B restaure la production de NO induite par l'insuline favorisant ainsi la vasodilatation et permettant de réduire le phénomène d'insulino-résistance établi dans notre modèle de sepsis.

Survie : impact de la délétion génétique totale de PTP1B

L'étude de la survie nous permet d'établir un taux de survie de 5% chez les animaux WT CLP, 120 heures après chirurgie. La délétion génétique totale en PTP1B permet une amélioration significative de la survie avec un taux de survie de 25% à 120 heures. Cette augmentation de survie s'accompagne d'un retard de la mortalité chez les animaux PTP1B^{-/-} CLP avec un taux de mortalité de 50% à 26h pour les animaux WT CLP et à 46h pour les animaux PTP1B^{-/-} CLP. Cette amélioration significative de la survie chez les animaux PTP1B^{-/-} CLP est associée dans notre modèle à l'amélioration de l'insulino-sensibilité et de la disponibilité des GLUT-4 *via* la voie AMPK permettant une régulation de la glycémie. L'amélioration du métabolisme glucidique est associée à une diminution de la dysfonction endothéliale limitant la dysfonction d'organes.

Conclusion

Notre étude démontre pour la première fois que la délétion génique totale de PTP1B est impliquée dans le métabolisme glucidique *via* l'activation de la voie AMPK dans un modèle de sepsis induit par CLP. La conséquence est une augmentation de la translocation de GLUT-4 responsable de l'absorption de glucose et donc d'une réduction du phénomène d'insulino-résistance dans ce modèle. L'impact bénéfique observé sur la mortalité pourrait dépendre de la réduction de l'inflammation cardiovasculaire par la réduction de l'insulino-résistance et de la dysfonction endothéliale *via* la production de NO. Dans ce contexte, l'impact de la délétion endothéliale spécifique de PTP1B pourrait apporter des mécanismes supplémentaires pour mieux comprendre le rôle et la place de l'inhibition de la PTP1B dans le sepsis. Ces nouvelles données suggèrent que l'inhibition de la PTP1B pourrait être une nouvelle cible pharmacologique du sepsis.

Etude 2 : Protection endothéliale et sepsis : impact de la délétion endothéliale de PTP1B sur la dysfonction cardiovasculaire.

L'endothélium est un élément essentiel impliqué dans la physiopathologie du sepsis. La survenue d'altérations métaboliques et notamment d'une hyperglycémie présente des conséquences délétères sur l'endothélium majorant le processus de dysfonction vasculaire septique. De nombreuses études portant sur des modèles de diabète ont permis de mettre en évidence les conséquences néfastes de la résistance à l'insuline sur l'endothélium. En effet, le phénomène de résistance à l'insuline entraîne une augmentation des AGL dans la circulation provenant des adipocytes et allant vers les cellules endothéliales. La conséquence directe de cette présence en excès d'AGL est une augmentation du processus de β -oxydation favorisant la surproduction de ROS par les mitochondries des cellules endothéliales et l'activation des voies de la glucotoxicité aboutissant à la dysfonction endothéliale ²³⁹.

La Protéine Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) est un régulateur négatif à la fois de la voie de signalisation de l'insuline et aussi de la voie de production du monoxyde d'azote (NO). En effet, la PTP1B est responsable d'une diminution de la production de NO en réponse aux forces de cisaillement limitant l'activation de la voie PI3K/Akt/NOS. Notre laboratoire a mis en évidence que l'inactivation de la PTP1B endothéliale améliore la fonction cardiovasculaire et diminue la mortalité dans un modèle d'infarctus du myocarde démontrant le rôle direct de la protection endothéliale *via* l'inhibition de la PTP1B dans l'insuffisance cardiaque ⁴⁰⁴.

L'objectif de notre travail est donc d'évaluer l'impact de la délétion spécifique endothéliale de PTP1B sur la dysfonction cardiovasculaire *via* l'étude de la voie de signalisation PI3K/Akt/NOS et sur le métabolisme glucidique afin de démontrer le rôle majeur de la protection endothéliale dans le sepsis. Cette étude est réalisée sur deux modèles de sepsis, l'un induit par l'injection de lipopolysaccharides et l'autre secondaire à la ligature et perforation caecale. L'intérêt présenté par l'utilisation de deux modèles différents est de pouvoir étudier dans un premier temps, l'axe de la dysfonction cardiovasculaire *via* le modèle LPS connu pour présenter des altérations de la fonction cardiovasculaire ⁶⁵ et dans un second temps, l'altération du métabolisme énergétique *via* le modèle CLP développé dans le but d'obtenir une hyperglycémie et une insulino-résistance ⁴⁴⁴.

Les principaux résultats de l'étude sur l'impact de la délétion endothéliale de PTP1B sur la dysfonction cardiovasculaire et l'insulino-résistance font l'objet d'un article en préparation.

Résultats

Au vu des différents travaux réalisés dans notre laboratoire, l'ensemble des manipulations est réalisé à 8 heures post-injection de LPS et à 16 heures post-CLP^{65,444}.

1. Evaluation de la fonction endothéliale

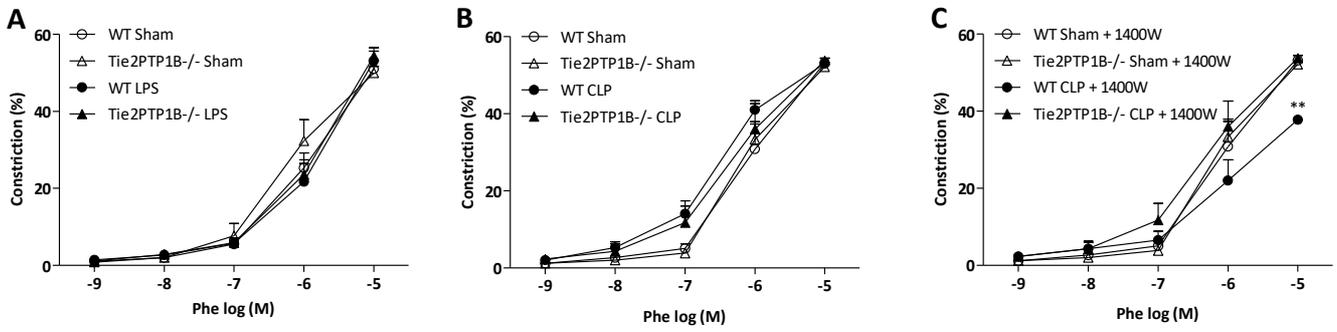
L'évaluation de la fonction vasculaire ne montre pas d'altération de la contractilité artérielle en réponse à la phényléphrine chez les animaux LPS et CLP (figure 46 A-B). L'ajout de 1400W (inhibiteur de NOSi) entraîne une diminution significative de la contractilité en réponse à la Phe 10^{-5} M (figure 46 C).

La vasodilatation dépendante du flux est significativement diminuée chez les animaux WT LPS et totalement abolie chez les animaux WT CLP (figure 46 D et 46 F). La vasodilatation induite par le flux n'est pas altérée chez les animaux Tie2PTP1B^{-/-} LPS et Tie2PTP1B^{-/-} CLP (figure 46 D et 46 F). En présence de L-NNA (inhibiteur des NOS), la dilatation dépendante du flux est diminuée impliquant un mécanisme en partie NO-dépendant.

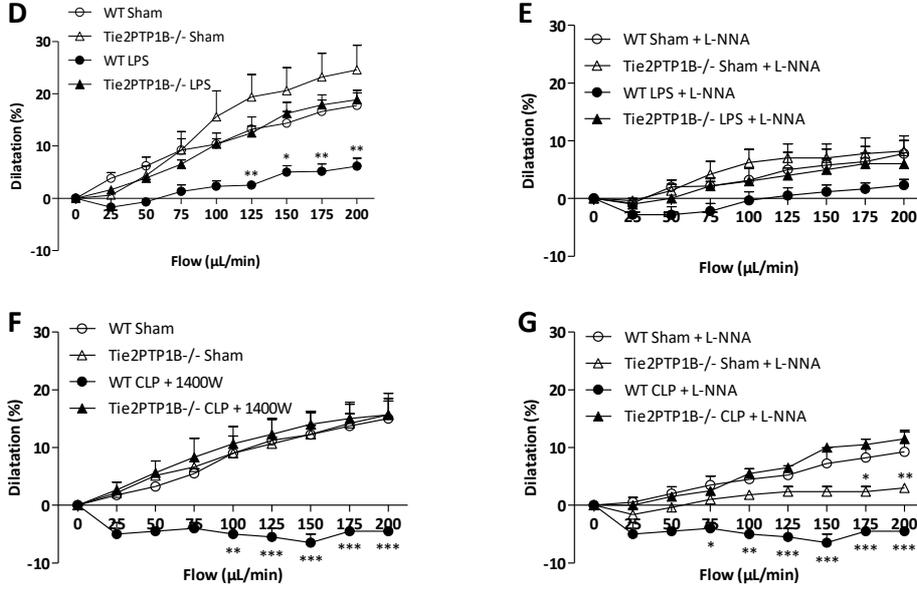
La dilatation induite par l'acétylcholine, évaluant la réactivité Ca²⁺-dépendant, est significativement diminuée chez les souris WT LPS et non altérée chez les animaux Tie2PTP1B^{-/-} LPS (figure 46 H). La dilatation induite par l'insuline est diminuée nettement chez les animaux WT CLP et non altérée chez les animaux Tie2PTP1B^{-/-} CLP (figure 46 I).

La dilatation des cellules musculaires lisses induite par le SNP n'est pas altérée chez les animaux LPS et CLP (figure 46 J-K). Les animaux WT CLP et Tie2PTP1B^{-/-} CLP sont significativement plus réactifs au SNP pour les doses 10^{-7} M et $10^{-6.5}$ M avec une dilatation similaire aux animaux Sham en point final ($10^{-4.5}$ M) (figure 46 K).

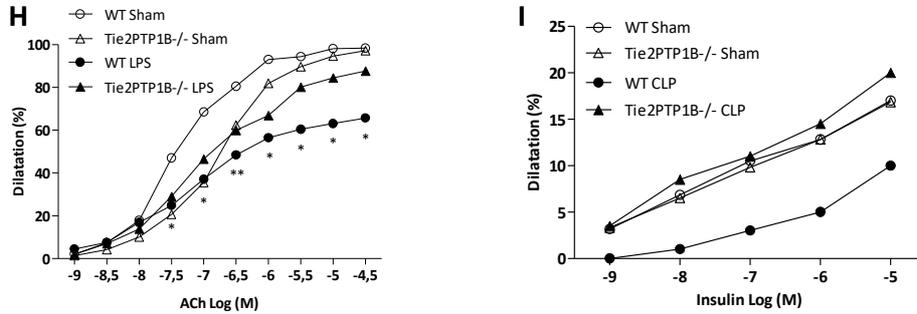
Vascular contractility



Flow-mediated dilatation



Acetylcholine & Insulin dilatation



SNP dilatation

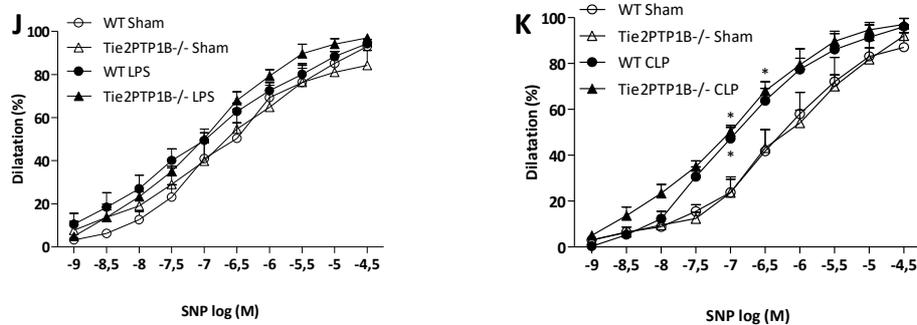


Figure 46 : Evaluation de la fonction vasculaire par artériographie.

Contractilité des artères en réponse à la phényléphrine dans le modèle de LPS (A), dans le modèle de CLP (B) et dans un modèle de CLP en présence de 1400W (C). Dilatation des artères en réponse au flux dans le modèle de LPS (D) en présence de L-NNA (E) et dans le modèle de CLP avec 1400W (F) en présence de L-NNA (G). Dilatation des artères en réponse à l'acétylcholine dans le modèle de LPS (H) et en réponse à l'insuline dans le modèle de CLP (I). Dilatation des artères en réponse au SNP dans le modèle LPS (J) et dans le modèle CLP (K). n=6 à 8 par groupe. * p<0.05 ** p<0.01, *** p<0.001 vs. Sham ; test statistique ANOVA two-way avec post-test de Bonferonni.

2. Evaluation de la fonction cardiaque

L'étude de la fonction cardiaque par échocardiographie ne montre pas de différence entre les animaux WT Sham et Tie2PTP1B^{-/-} Sham. L'administration de LPS entraîne une diminution significative de la fraction d'éjection, de la fraction de raccourcissement et de l'index cardiaque. La déficience génétique en PTP1B endothéliale ne permet pas de prévenir significativement cette altération systolique (figure 47 A à C).

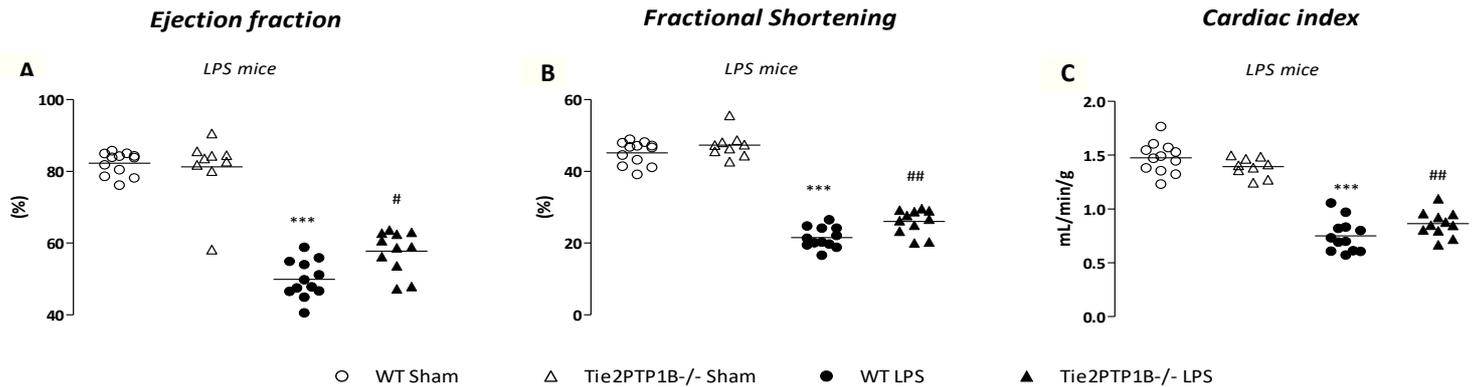


Figure 47 : Evaluation de la fonction cardiaque par échocardiographie.

Evaluation de la fraction d'éjection dans un modèle de LPS (A) et dans un modèle de CLP (B), de la fraction de raccourcissement dans un modèle de LPS (C) et dans un modèle de CLP (D), de l'index cardiaque dans un modèle de LPS (E) et dans un modèle de CLP (F) et du ratio E/A dans un modèle de LPS (G) et dans un modèle de CLP (H). A à F n=8 à 11 par groupe, G et H n=1 à 8 par groupe. ** p<0.01, *** p<0.001 vs. WT Sham # p<0.05, ## p<0.01, vs. Tie2PTP1B^{-/-} Sham ; test non paramétrique de Kruskal Wallis avec post-test de Dunn.

3. Evaluation du processus inflammatoire

a. Etude de l'expression de gènes myocardiques

L'analyse de l'expression de gènes au niveau myocardique ne montre pas de différence entre les animaux WT Sham et Tie2PTP1B^{-/-} Sham. L'injection de LPS entraîne une augmentation significative des taux d'ARN messagers myocardiques d'ICAM 1, de VCAM 1, de COX 2, d'IL-1β et de gp91phox. La déficience génétique en PTP1B endothéliale ne permet pas de prévenir l'augmentation de l'inflammation cardiaque de façon significative (figure 48 A à H).

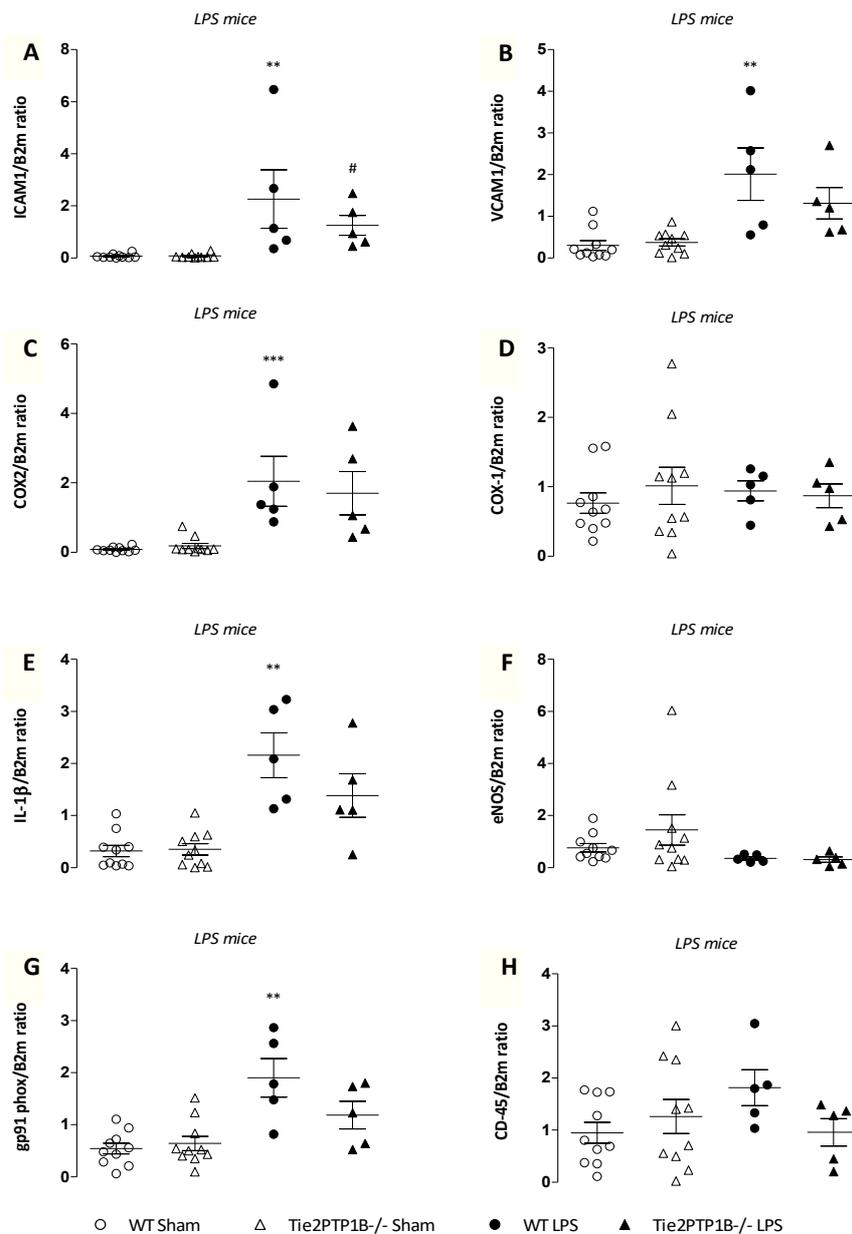


Figure 48 : Expression d'ARN messagers au niveau myocardique dans un modèle de LPS.

Expression d'ARN messagers au niveau du myocarde chez des souris WT ou Tie2PTP1B^{-/-} en présence ou non de LPS, 8 heures après injection.

Sham n=8 par groupe. LPS n=5 par groupe. * vs. Sham ; # vs. Tie2PTP1B^{-/-} Sham ; test non paramétrique de Kruskal Wallis avec post-test de Dunn.

b. Etudes des expressions protéiques myocardique et vasculaire

L'analyse des Western Blot concernant les expressions protéiques dans le myocarde et dans l'artère mésentérique ne montre pas de différence significative entre les animaux WT Sham et Tie2PTP1B^{-/-} Sham. Ni l'injection de LPS, ni la délétion génétique endothéliale de PTP1B ne modifient significativement l'expression protéique myocardique et vasculaire des différentes cibles (figure 49 et figure 50).

Myocardial expression in LPS mice

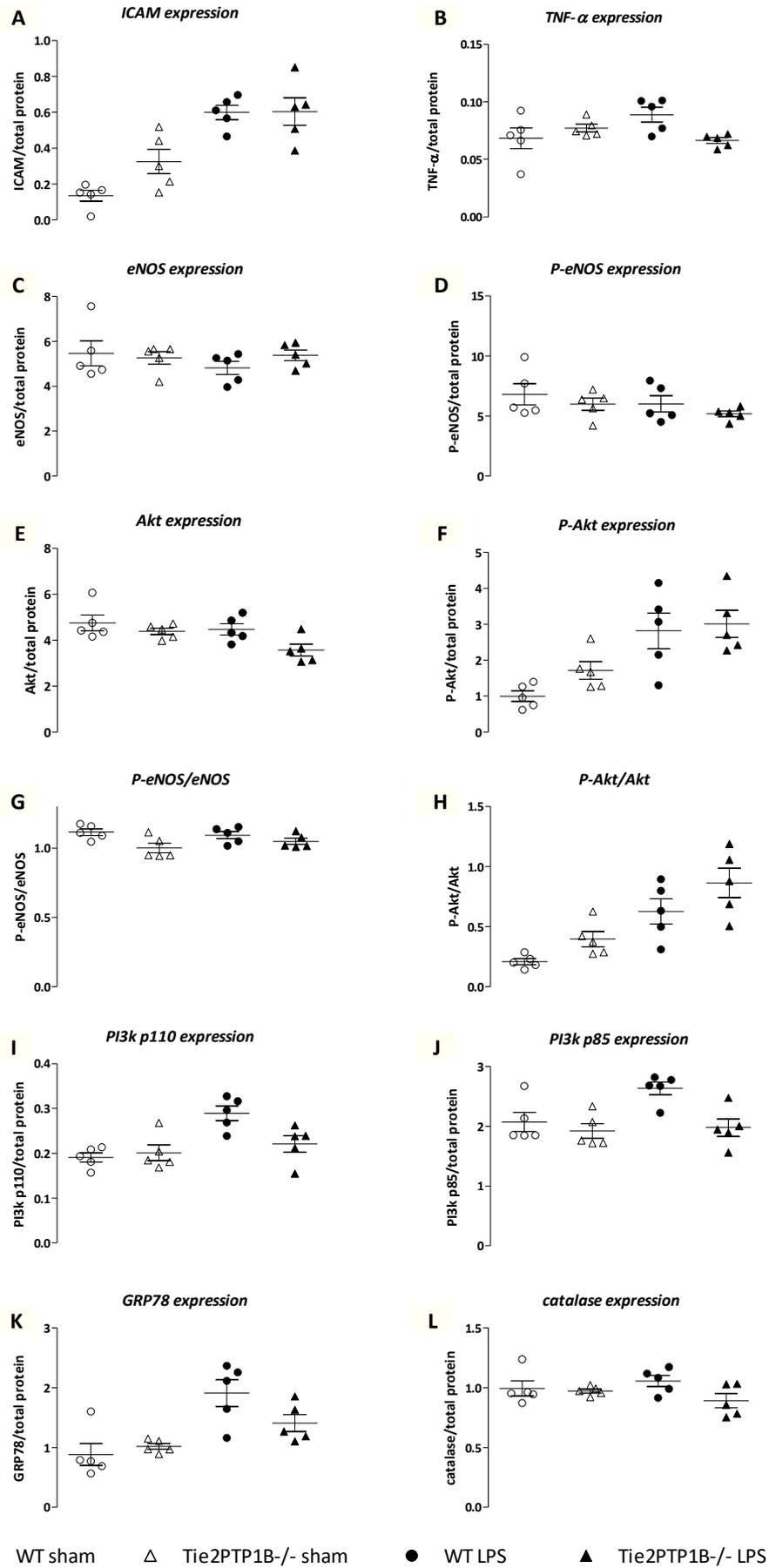


Figure 49 : Expressions protéiques myocardiques après injection de LPS.

Expression protéique dans le myocarde des souris WT ou Tie2PTP1B^{-/-} en présence ou non de LPS, 8 heures après injection. n= 5 par groupe. Test non paramétrique de Kruskal Wallis avec post-test de Dunn.

Mesenteric artery expression in LPS mice

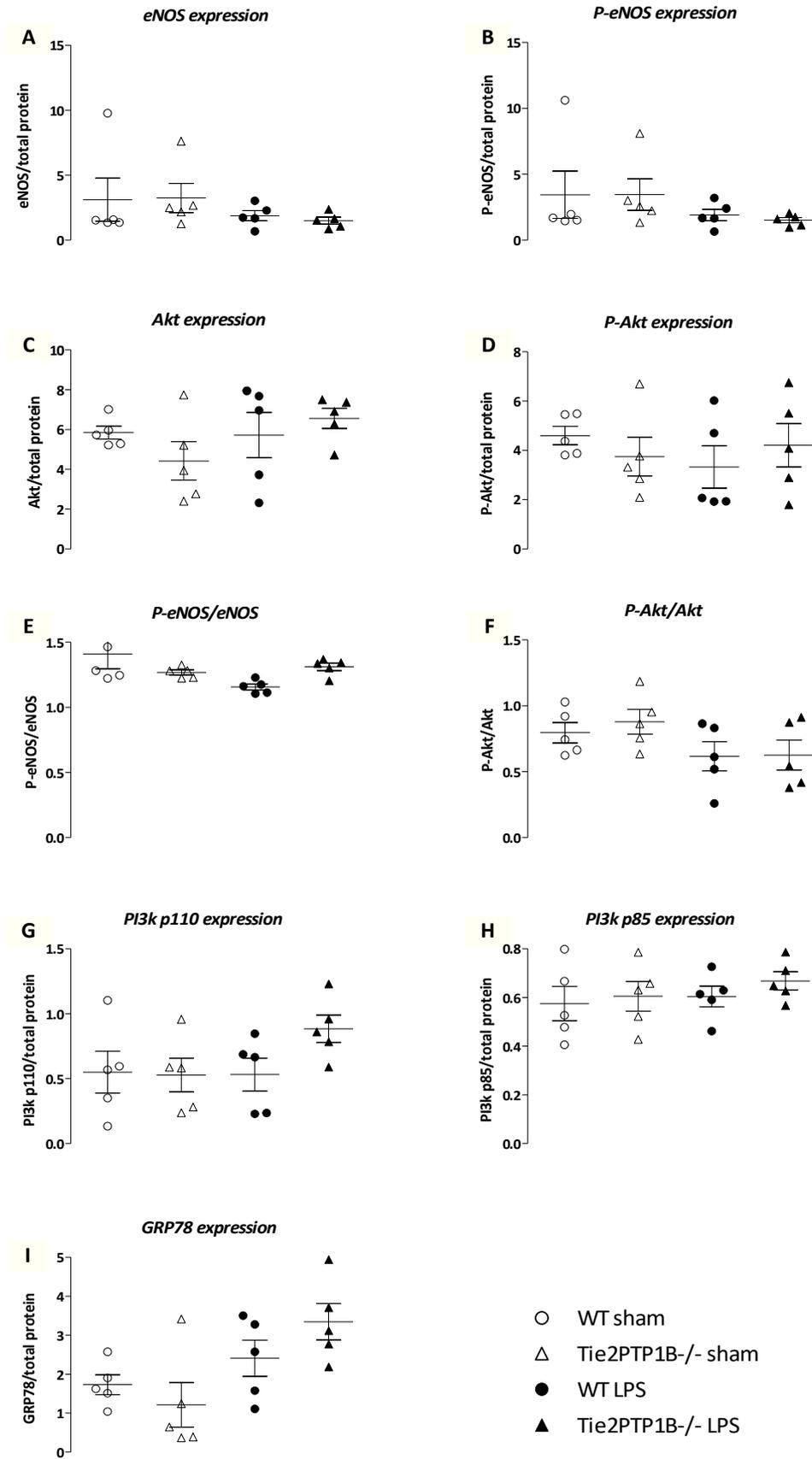


Figure 50 : Expressions protéiques vasculaires après injection de LPS.

Expression protéique dans les artères mésentériques des souris WT ou Tie2PTP1B^{-/-} en présence ou non de LPS, 8 heures après injection.

Sham n=5 par groupe. Test non paramétrique de Kruskal Wallis avec post-test de Dunn.

4. Evaluation du métabolisme glucidique

L'évaluation du métabolisme glucidique est réalisée uniquement chez les animaux dont le sepsis est induit par la chirurgie de CLP car seuls ces animaux présentent des altérations métaboliques contrairement aux animaux dont le sepsis est induit par l'injection de LPS.

L'injection de glucose entraîne une augmentation significative de la glycémie à 45 et à 60 minutes chez les animaux WT CLP. Les animaux Tie2PTP1B^{-/-} CLP présentent une évolution de la glycémie similaire aux animaux Sham (figure 52 A). L'analyse de l'aire sous la courbe montre une augmentation significative de la glycémie chez les animaux WT CLP en comparaison aux animaux WT Sham et Tie2PTP1B^{-/-} CLP (figure 52 C).

L'injection d'insuline induit une diminution de la glycémie chez l'ensemble des animaux sans retour à une valeur de glycémie basale chez les animaux WT CLP et Tie2PTP1B^{-/-} CLP en comparaison aux animaux Sham (figure 52 B). L'aire sous la courbe montre une plus forte insulino-sensibilité chez les animaux Tie2PTP1B^{-/-} CLP avec une diminution significative de la glycémie (figure 52 D).

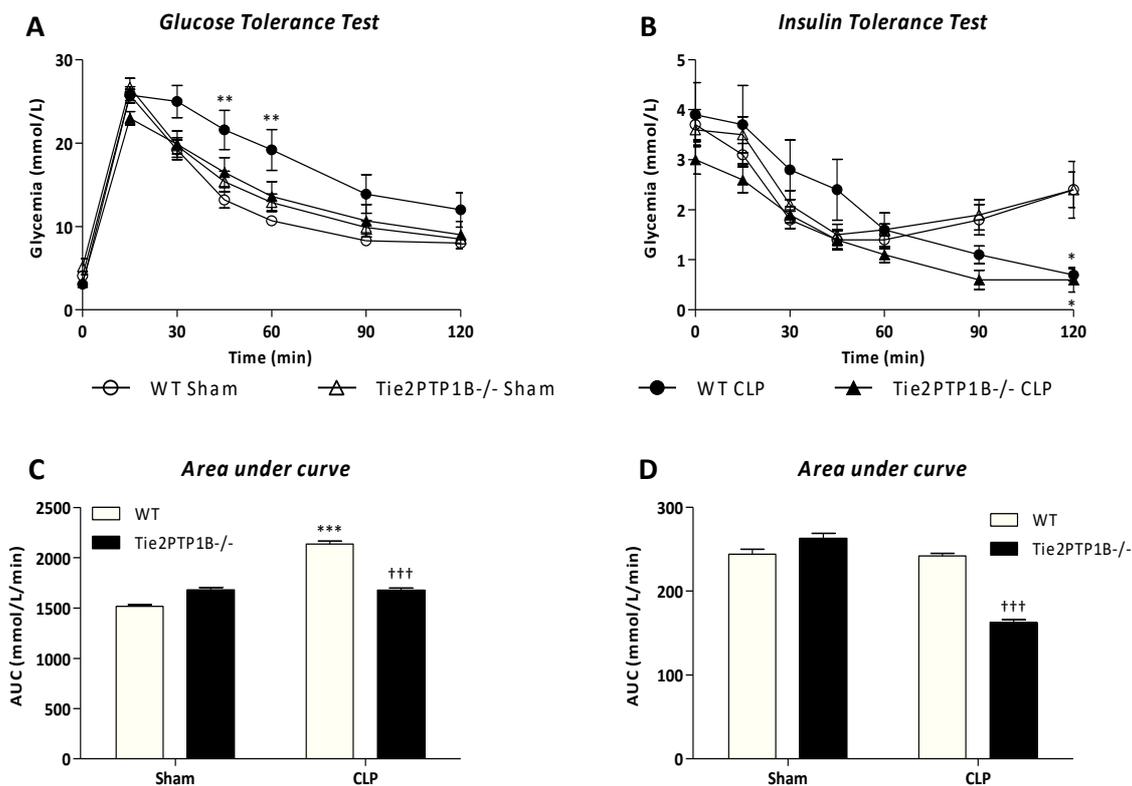


Figure 52 : Tests de tolérance au glucose et à l'insuline.

L'évolution de la glycémie pendant 2 heures est représentée suite à l'injection intra-veineuse de glucose ou d'insuline (A et B) et l'aire sous la courbe correspondante est calculée (C et D). n=6 à 13 par groupe. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 vs. WT Sham ; +++ p<0.001 vs. WT CLP, test statistique ANOVA two-way avec post-test de Bonferonni.

5. Evaluation de la survie

L'étude de la survie est réalisée sur 150 heures. Le temps T0 correspond au moment de l'injection de LPS ou à la fin de la chirurgie de CLP. Les résultats ne montrent pas de mortalité dans les groupes Sham. La délétion génétique de la PTP1B endothéliale montre une tendance à l'augmentation de la survie en sepsis après injection de LPS ou après la chirurgie de CLP (figure 51).

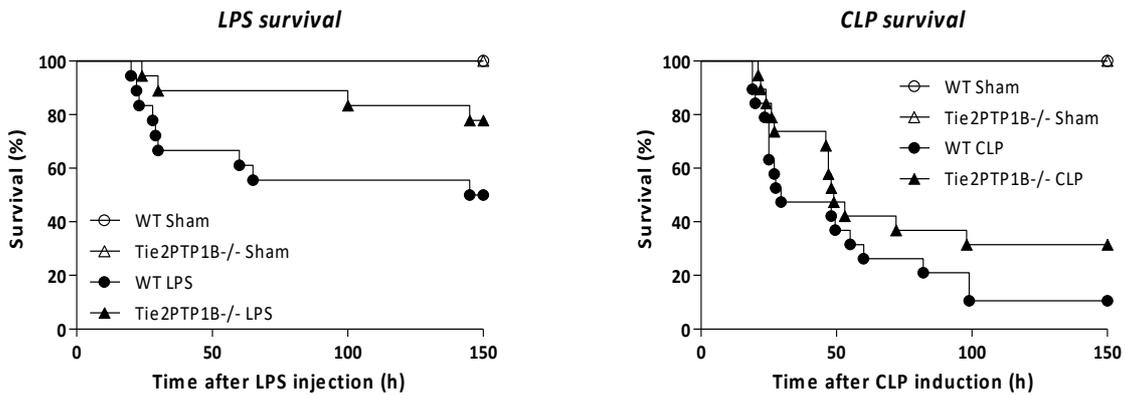


Figure 51 : Etudes de la survie.

L'étude de la survie est réalisée sur 150 heures suite à l'injection de LPS ou au CLP.

n=10 par groupe Sham, n=18 par groupe LPS, n=20 par groupe CLP. Test statistique de Mantel-Cox, non significatif.

6. Rôle de la délétion endothéliale spécifique de PTP1B après irradiation

La dilatation en réponse au flux est abolie chez les animaux CD45.2(CD45.1) CLP et CD45.1(endo) CLP. Les animaux endo(CD45.1) CLP présentent une dilatation en réponse au flux similaire aux animaux CD45.2(CD45.1) Sham (figure 53 A).

L'étude de la survie réalisée sur 100 heures ne montre pas de différence significative de la mortalité (figure 53 B).

L'injection de glucose induit une augmentation de la glycémie 15 minutes après injection et la glycémie diminue progressivement dans tous les groupes sans différence significative induite par la chirurgie ou par la délétion génétique endothéliale (figure 53 C), résultat confirmé par le calcul de l'aire sous la courbe (figure 53 D).

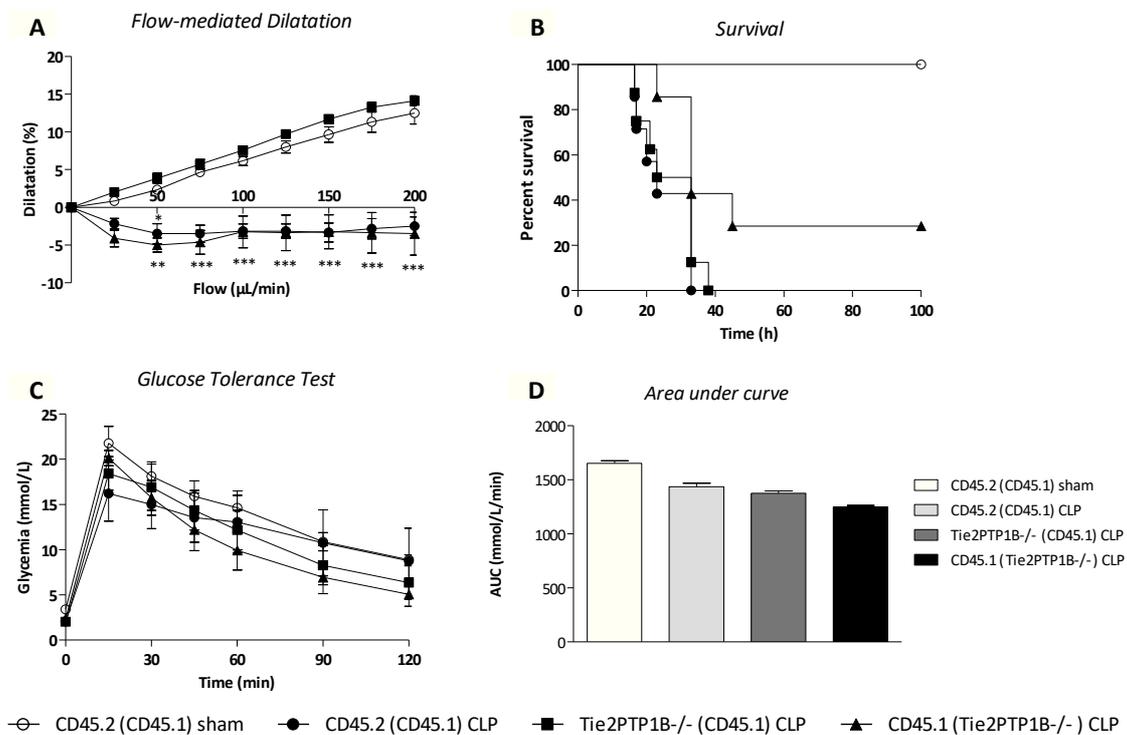


Figure 53 : Etudes de la fonction vasculaire, de la survie et de la tolérance au glucose chez les souris irradiées.

Dilatation des artères mésentériques en réponse au flux (A). Courbe de survie (B). Test de tolérance au glucose (C) et calcul de l'aire sous la courbe correspondant (D).

(A) n=6 à 8 par groupe. ** p<0.01, *** p<0.001 vs. Sham ; test statistique ANOVA two-way avec post-test de Bonferonni

(B) n=5 par groupe. Test statistique de Mantel-Cox, non significatif.

(C) n=6 à 7 par groupe. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 vs. WT Sham ; +++ p<0.001 vs. WT CLP, test statistique ANOVA two-way avec post-test de Bonferonni.

(D). n=7 à 8 par groupe.

Discussion de l'étude 2

Le sepsis se caractérise par un processus inflammatoire responsable d'une dérégulation du métabolisme glucidique à l'origine de la dysfonction endothéliale. L'objectif de cette étude était donc de comprendre l'effet bénéfique potentiel de la délétion génétique endothéliale de PTP1B sur le métabolisme glucidique et le processus inflammatoire ainsi que les conséquences sur la fonction cardiovasculaire et la survie.

Dans notre modèle de CLP, la délétion totale de PTP1B améliore la réponse métabolique glucidique en favorisant l'expression de GLUT-4 *via* la voie AMPK et cette modulation de l'insulino-résistance est associée à une amélioration de la dysfonction cardio-vasculaire et de la survie ⁴⁴⁴. La protection endothéliale *via* la délétion de PTP1B améliore la fonction endothéliale par une augmentation de la production de NO et diminue la mortalité dans un modèle de post-infarctus ⁴⁰⁴. De même, la délétion endothéliale de PTP1B améliore la fonction cardiaque par réduction, directe ou indirecte, de l'insulino-résistance (Dr. J. Maupoint – publication en cours). Ces différentes études justifient l'intérêt d'étudier l'effet de la protection endothéliale *via* une délétion de PTP1B au cours du sepsis.

Nous avons donc testé cette hypothèse sur deux modèles de sepsis :

- le modèle de choc endotoxinique induit par injection de LPS permet par activation de la voie du TLR4, de déclencher un processus inflammatoire unique responsable de l'apparition de nombreuses dysfonctions d'organes. Ce modèle permet d'étudier la dysfonction endothéliale ainsi que les mécanismes mis en jeu et ses conséquences sur la dysfonction d'organes ;
- le modèle de péritonite secondaire à la chirurgie de CLP se caractérise par un sepsis polymicrobien permettant d'associer processus inflammatoire, dysfonction endothéliale et altération métabolique. Ce modèle permet d'étudier les troubles métaboliques associant une dysfonction cardiovasculaire.

Dans cette étude, nous avons mis en évidence que la délétion génétique endothéliale de PTP1B permet :

- une amélioration de la sensibilité à l'insuline et au glucose ;
- une amélioration significative de la fonction endothéliale sans modification observée du processus inflammatoire ;
- une amélioration non significative de la survie.

Fonction endothéliale : impact de la délétion génétique endothéliale de PTP1B

En accord avec nos précédents travaux réalisés au sein du laboratoire, il existe une altération sélective de la réponse endothéliale-dépendante calcium-indépendante (réponses vasomotrices en réponse au flux ou à l'insuline) sans altération de la voie endothélium-dépendante calcium-dépendante (en réponse à l'acétylcholine) et de la voie endothélium-indépendante (en réponse au SNP)^{65,399}. Ces résultats suggèrent une altération de la voie PI3K/Akt/NOS responsable de la production du NO sans modification de l'intégrité de la voie dépendante du calcium et sans altération des cellules musculaires lisses vasculaires. La vasodilatation en réponse au flux est plus marquée dans le modèle de CLP avec une abolition complète de la réponse au flux. Cette différence d'altération s'explique par la sévérité plus importante du modèle de CLP.

La délétion endothéliale de PTP1B permet de restaurer l'ensemble des réponses vasculaires. La dysfonction endothéliale est diminuée significativement chez les animaux Tie2PTP1B^{-/-} suggérant une restauration de la production de NO comme évoquée dans une étude portant sur un modèle de post-infarctus⁴⁰⁴. Ces résultats similaires à ceux retrouvés dans nos travaux précédents portant sur la délétion génétique totale de PTP1B confortent à la fois l'implication propre de l'endothélium et le rôle spécifique de la PTP1B endothéliale dans la dysfonction vasculaire du sepsis et la survenue de dysfonction d'organes. Ces données renforcent le rôle clé de l'atteinte endothéliale dans les défaillances d'organes liées au sepsis.

Fonction myocardique : impact de la délétion génétique endothéliale de PTP1B

L'étude de la fonction cardiaque réalisée par échocardiographie montre une altération majeure de la fonction systolique chez les souris WT LPS. Nous observons chez ces animaux une diminution significative de la fraction d'éjection, de la fraction de raccourcissement et de l'index cardiaque. Les animaux Tie2PTP1B^{-/-} LPS présentent une tendance à l'augmentation de la fraction d'éjection et de la fraction de raccourcissement sans amélioration significative de la fonction cardiaque. Comme discuté précédemment, l'étude de la fonction cardiaque par échocardiographie est dépendante du remplissage vasculaire réalisé. De manière similaire à notre première étude, l'évaluation de la fonction cardiaque par échocardiographie est interprétée avec précaution compte tenu des modalités insuffisantes de remplissage vasculaire dans notre modèle et ne permet pas de conclure sur la dysfonction myocardique.

Evaluation du processus inflammatoire et du stress du réticulum endoplasmique : impact de la délétion génétique endothéliale de PTP1B

L'injection de LPS majore le processus inflammatoire, l'adhésion et le stress oxydant dans le myocarde chez les souris WT LPS. Les souris Tie2PTP1B^{-/-} LPS présentent une diminution non significative de l'inflammation, de l'adhésion et du stress oxydant.

La délétion génétique totale de PTP1B met en évidence une diminution significative de l'inflammation chez les animaux PTP1B^{-/-} CLP. Dans cette seconde étude, nous observons une modulation modérée de l'inflammation chez les animaux Tie2PTP1B^{-/-} LPS. Plusieurs hypothèses concernant le rôle de PTP1B dans l'inflammation permettent d'expliquer ces discordances. Il a été montré que PTP1B inhibe l'activation de MAPK et de NF-κB impliqués dans la production de cytokines pro-inflammatoires *via* la voie TLR. Les auteurs montrent également que l'inactivation de PTP1B conduit à un état pro-inflammatoire ⁴¹⁸. *A contrario*, une autre étude montre que l'inactivation de la PTP1B protège contre l'inflammation induite par un DT2 ⁴⁵⁶. Ainsi l'état inflammatoire et la modulation de l'inflammation induits par l'inactivation de la PTP1B dépendent de la cinétique du processus inflammatoire étudié. Cependant, l'absence ou la faible modulation de l'inflammation dans le territoire myocardique chez les animaux Tie2PTP1B^{-/-} LPS ne constituent ni un frein à la diminution de la dysfonction d'organes (amélioration de la fonction vasculaire et de la fonction cardiaque) ni à la diminution de la survie. Ce résultat peut être mis en relation avec l'étude de Xu montrant que l'inactivation endothéliale de NF-κB diminue la dysfonction d'organes et la mortalité sans modifier les taux de cytokines systémiques démontrant le rôle primordial de l'endothélium dans la physiopathologie septique ⁴⁵⁷. Enfin, l'ensemble de nos résultats ont été réalisé à un temps tardif (H16) coïncidant avec l'apparition de l'insulino-résistance pouvant également expliquer la négativité de nos résultats concernant l'inflammation.

L'étude de l'expression protéique au niveau myocardique et endothéliale (artères mésentériques) après LPS montre une augmentation des facteurs inflammatoires et du stress du réticulum endoplasmique (SRE) chez les souris WT et Tie2PTP1B^{-/-}. Dans la littérature, l'existence d'un lien entre inflammation et SRE est désormais clairement établie. L'expression des facteurs du SRE entraîne une activation du facteur NF-κB contribuant à l'expression des facteurs pro-inflammatoires ¹⁰³. D'autres études, notamment dans des modèles d'hypertension, ont également mis en évidence l'implication du SRE dans la dysfonction endothéliale. L'induction d'un SRE dans les artères mésentériques entraîne un stress oxydant et favorise l'altération de la vasodilatation ⁴⁵⁸. Des travaux réalisés au sein de notre laboratoire ont également mis en évidence que l'injection de LPS entraîne une augmentation des niveaux d'expression de différents facteurs du SRE tels que P-eiF2α et GRP78

participant à la dysfonction endothéliale sévère associée à ce modèle (*en cours de publication*). Ainsi, en accord avec ces études, nous pourrions émettre l'hypothèse que l'activation des voies du SRE dans les artères mésentériques septiques participe à l'altération de la vasodilatation rencontrée dans ce modèle de sepsis.

Métabolisme glucidique et insulino-résistance : impact de la délétion génétique endothéliale de PTP1B

L'ensemble des paramètres concernant le métabolisme glucidique et l'insulino-résistance est analysé uniquement chez les animaux dont le sepsis est induit par CLP. En effet, l'injection de LPS se caractérise par la survenue d'hypoglycémies ne permettant pas l'étude des paramètres métaboliques dans le sepsis ^{459,460}.

Le suivi de la glycémie au cours du temps après une injection de glucose met en évidence une altération de la sensibilité au glucose chez les animaux WT CLP confirmée par le calcul de l'aire sous la courbe. Nos résultats montrent que les animaux Tie2PTP1B^{-/-} CLP présentent des variations de glycémie au cours du temps similaires aux animaux WT Sham et Tie2PTP1B^{-/-} Sham démontrant une amélioration de la sensibilité au glucose par délétion endothéliale de la PTP1B. Le calcul de l'aire sous la courbe montre que les animaux Tie2PTP1B^{-/-} CLP présentent une insulino-sensibilité plus importante que les animaux WT CLP. Nos résultats peuvent être rapprochés d'autres études portant sur la délétion territoire-spécifique de PTP1B et son rôle dans le métabolisme glucidique. La délétion spécifique de PTP1B au niveau hépatique et musculaire améliore la tolérance au glucose et l'homéostasie lipidique participant à la diminution du risque cardiovasculaire dans des modèles de DT2, d'obésité consécutive à un régime riche en graisses ou d'insulino-résistance ^{379,425,461}. De plus, l'inactivation de la PTP1B est responsable d'une augmentation de l'amplitude de la réponse à l'insuline mais aussi de la durée de cette réponse. Les effets bénéfiques de l'inactivation de la PTP1B sur la fonction cardiovasculaire, pourraient dépendre de l'amplification de la signalisation insulinique dont les effets anti-inflammatoires et inotropes sont bien démontrés. L'amélioration de la sensibilité au glucose et à l'insuline constitue un élément essentiel à la restauration de la fonction endothéliale observée sur nos souris présentant une délétion endothéliale de PTP1B comme précédemment décrit dans la littérature. En effet, il a été montré que l'inhibition de PTP1B chez des rats spontanément diabétiques issus de la souche Goto Kakizaki, prévient la dysfonction endothéliale aortique par restauration de la voie de signalisation insulinique ⁴⁶².

Dans une étude réalisée sur un modèle de souris soumises à un régime riche en graisses, les auteurs mettent en avant l'implication du SRE dans l'expression de PTP1B *via* l'activation de la voie NF-

κ B. La production d'ERO induite par la voie NF- κ B entraîne une activation de l'UPR et favorise l'insulino résistance ⁴⁶³. Ce lien entre métabolisme glucidique, SRE et PTP1B pourrait être l'un des mécanismes de la dysfonction endothéliale observée.

Survie : impact de la délétion génétique endothéliale de PTP1B

L'étude de la survie montre un taux de survie de 50% chez les animaux WT LPS et de 10% chez les animaux WT CLP. L'inactivation endothéliale de PTP1B améliore la survie à un taux de 80% chez les animaux Tie2PTP1B^{-/-} LPS et à un taux de 30% chez les animaux Tie2PTP1B^{-/-} CLP. Cette amélioration de la survie chez les animaux Tie2PTP1B^{-/-} et dans le modèle LPS peut s'expliquer par une modulation de la dysfonction endothéliale et ses conséquences sur la dysfonction d'organes *via* l'impact sur la cascade SRE, PTP1B et inflammation. Nous observons que l'amélioration de la survie est plus marquée dans le cas de l'injection de LPS qu'après la chirurgie de CLP. Cette différence s'explique par la variabilité des deux modèles de sepsis mis en place. En effet, l'injection de LPS comparée cliniquement à un tableau de *purpura fulminans*, correspond à une inflammation aigue associée à un orage cytokinique survenant 4 heures après l'injection et suivi d'une décroissance des facteurs inflammatoires au cours du temps. Le CLP, cliniquement comparable à une péritonite, correspond à un sepsis polymicrobien avec la succession de phases anti- et pro-inflammatoires au cours du temps ³⁰⁴. Ainsi, comme discuté pour l'étude 1, la sévérité de notre modèle de CLP s'associe à un taux de mortalité très élevé permettant difficilement d'appréhender le rôle de la délétion génétique endothéliale de PTP1B sur la survie.

Rôle de la délétion endothéliale spécifique de PTP1B après irradiation

Dans cette étude, nous avons utilisé des souris décrites dans la littérature pour présenter une inactivation du gène cible dans l'endothélium vasculaire par un système Cre/Lox où la recombinaison Cre est sous le contrôle du promoteur Tie2. Cependant, le récepteur aux angiopoïétines Tie2 est exprimé dans les cellules myéloïdes ^{436,437}. Ainsi, afin de valider nos travaux concernant notamment l'évaluation de la fonction endothéliale, l'irradiation et la greffe de moelle ont permis d'obtenir des souris spécifiquement déficientes en PTP1B myéloïde ou en PTP1B endothéliale.

Après vérification du chimérisme par cytométrie en flux des animaux montrant une efficacité de la greffe de près de 99%, nous pouvons dire que l'irradiation et la greffe de moelle permettent une inactivation endothéliale efficace et spécifique de PTP1B. Ainsi, les études réalisées sur les souris irradiées et greffées ont permis de mettre en évidence une restauration complète de la fonction vasculaire chez les animaux Tie2PTP1B^{-/-}(CD45.1) CLP, c'est-à-dire les animaux présentant une délétion endothéliale spécifique de PTP1B. Les animaux CD45.2(CD45.1) CLP (groupe témoin) et

CD45.1(Tie2PTP1B^{-/-}) CLP (présentant une délétion myéloïde spécifique de PTP1B) présentent une dysfonction endothéliale marquée par une abolition complète de la dilatation en réponse au flux. L'amélioration de la fonction endothéliale est donc dépendante de la protection endothéliale et non myéloïde. Ces résultats sont en accord avec de précédents travaux réalisés dans notre laboratoire montrant que la déficience en PTP1B endothéliale et non myéloïde prévient de la dysfonction endothéliale dans un modèle d'insuffisance cardiaque ⁴⁰⁴.

Les études concernant la mortalité et la tolérance au glucose n'ont pas permis de mettre en évidence une amélioration significative de ces paramètres. Ainsi, ni la délétion endothéliale spécifique, ni la délétion myéloïde spécifique de PTP1B ne semblent être impliquées dans l'amélioration de la tolérance au glucose dans notre modèle de sepsis. Cette absence de résultats significatifs peut s'expliquer par un manque d'effectif dans nos groupes d'études (n = 6 à 7 / groupe). De même, dans la littérature, une étude portant sur des animaux spécifiquement invalidés pour la PTP1B dans les cellules hématopoïétiques montre une amélioration de la sensibilité à l'insuline et une augmentation de la production de cytokines anti-inflammatoires après 50 semaines de régime riche en graisses et une injection de LPS ⁴¹⁶. *A contrario*, dans une étude réalisée au sein de notre laboratoire, nos résultats montrent que la déficience myéloïde spécifique en PTP1B diminue la sensibilité à l'insuline (travaux du Dr. Julie Maupoint – en cours de rédaction). Nous pouvons donc constater l'hétérogénéité des résultats présentés dans la littérature et obtenus dans notre laboratoire et émettre l'hypothèse que la différence des modèles pathologiques utilisés ainsi que la méthode de délétion peuvent être impliquées dans la variabilité des résultats obtenus.

Conclusion

L'objectif initial de ce projet était de démontrer l'impact bénéfique de la protection endothéliale en utilisant une délétion endothéliale spécifique de PTP1B dans un modèle de sepsis (LPS et CLP) avec l'hypothèse suivante : la diminution de la dysfonction endothéliale *via* l'inhibition de la PTP1B limite le recrutement de cellules inflammatoires et le processus inflammatoire tissulaire, réduisant alors les dysfonctions d'organes notamment cardiaque et la mortalité. Dans ce travail, nous avons démontré pour la première fois qu'une délétion endothéliale de PTP1B réduit la mortalité, la dysfonction cardiovasculaire et l'insulino résistance. Néanmoins, les résultats sur la réponse inflammatoire (myocarde et vaisseaux) ne permettent pas de conforter nos hypothèses. Des analyses sont en cours sur des prélèvements tissulaires (foie, rein, tissu adipeux, poumons) et à des temps plus précoces afin d'étayer nos hypothèses.

CONCLUSION

Nos travaux mettent en évidence pour la première fois l'impact bénéfique de la délétion génétique totale en PTP1B dans l'amélioration de l'insulino-sensibilité dans un modèle de sepsis induit par CLP. Cette délétion génétique totale de PTP1B entraîne une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires et une préservation de la voie de signalisation de l'AMPK et de la translocation des GLUT-4 permettant l'absorption du glucose. Ces effets métaboliques bénéfiques sont associés à l'amélioration de la fonction cardiovasculaire et à la diminution de la mortalité. Ces résultats renforcent nos données antérieures sur l'impact de la délétion génétique de PTP1B au cours du sepsis en modulant à la fois l'axe PI3K/Akt/NO et la dysfonction endothéliale, et l'axe AMPK/GLUT-4 et l'insulino-résistance ⁶⁵.

Pour renforcer notre hypothèse sur l'impact de la dysfonction endothéliale dans la défaillance d'organes et le rôle de l'inhibition de PTP1B, nous avons étudié l'impact de l'inactivation endothéliale de PTP1B dans un modèle de sepsis. Par ces effets régulateurs sur de nombreuses voies cellulaires, l'augmentation de l'expression vasculaire de la PTP1B, observée lors du processus inflammatoire, pourrait contribuer à la dysfonction endothéliale. L'amélioration de la dilatation dépendante du flux et de l'insulino-sensibilité chez les souris Tie2PTP1B^{-/-} suggère un rôle spécifique de l'inhibition de la PTP1B sur le comportement endothélial et métabolique. La tendance positive en termes de survie des souris Tie2PTP1B^{-/-} évoque un rôle bénéfique de l'inactivation endothéliale chez ces animaux. Néanmoins, les données obtenues sur le processus inflammatoire ne permettent pas de confirmer nos hypothèses sur la modulation du processus inflammatoire par une amélioration de la fonction endothéliale ; des analyses complémentaires sont en cours sur l'étude de l'expression de marqueurs de l'inflammation, du stress oxydant et du recrutement cellulaire au niveau tissulaire et à des temps différents.

L'ensemble de nos résultats démontre pour la première fois que l'inactivation du gène de la PTP1B entraîne une amélioration du métabolisme glucidique *via* la voie AMPK/GLUT-4 dans un modèle de sepsis induit par CLP. Cet impact bénéfique sur l'insulino-sensibilité est associé à une augmentation de la protection vasculaire et de la survie. L'inhibition pharmacologique de la PTP1B pourrait être un nouvel axe thérapeutique potentiel dans la prise en charge des états septiques graves.

Une vue d'ensemble du rôle de PTP1B est résumé dans la figure 54 ci-dessous :

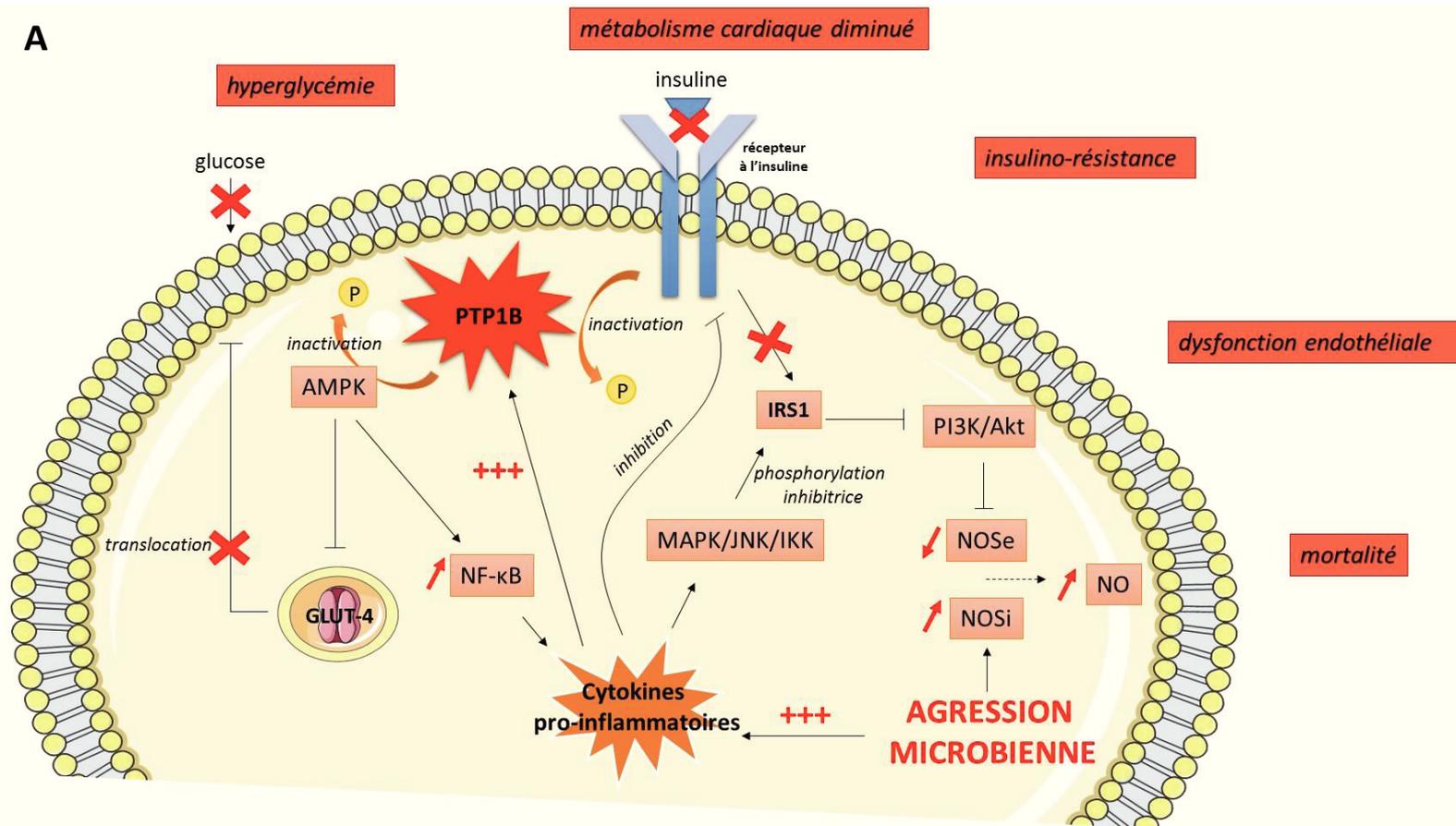


Figure 54 (A) : Vue d'ensemble du rôle de PTP1B dans les cellules myocardiques et vasculaires lors du sepsis.

La PTP1B déphosphoryle AMPK entraînant une diminution de l'expression et de la translocation des GLUT-4 à la membrane aboutissant à une altération de l'absorption du glucose responsable du phénomène d'hyperglycémie. PTP1B déphosphoryle le récepteur à l'insuline et les cytokines pro-inflammatoires libérées favorisent également son inactivation à l'origine de l'insulino-résistance. L'agression microbienne est responsable en parallèle d'une surexpression de la NOSi aboutissant à une dysfonction endothéliale. L'ensemble de ces phénomènes s'accompagne d'une modification du métabolisme cardiaque, d'une augmentation de la dysfonction d'organes et donc de la mortalité.

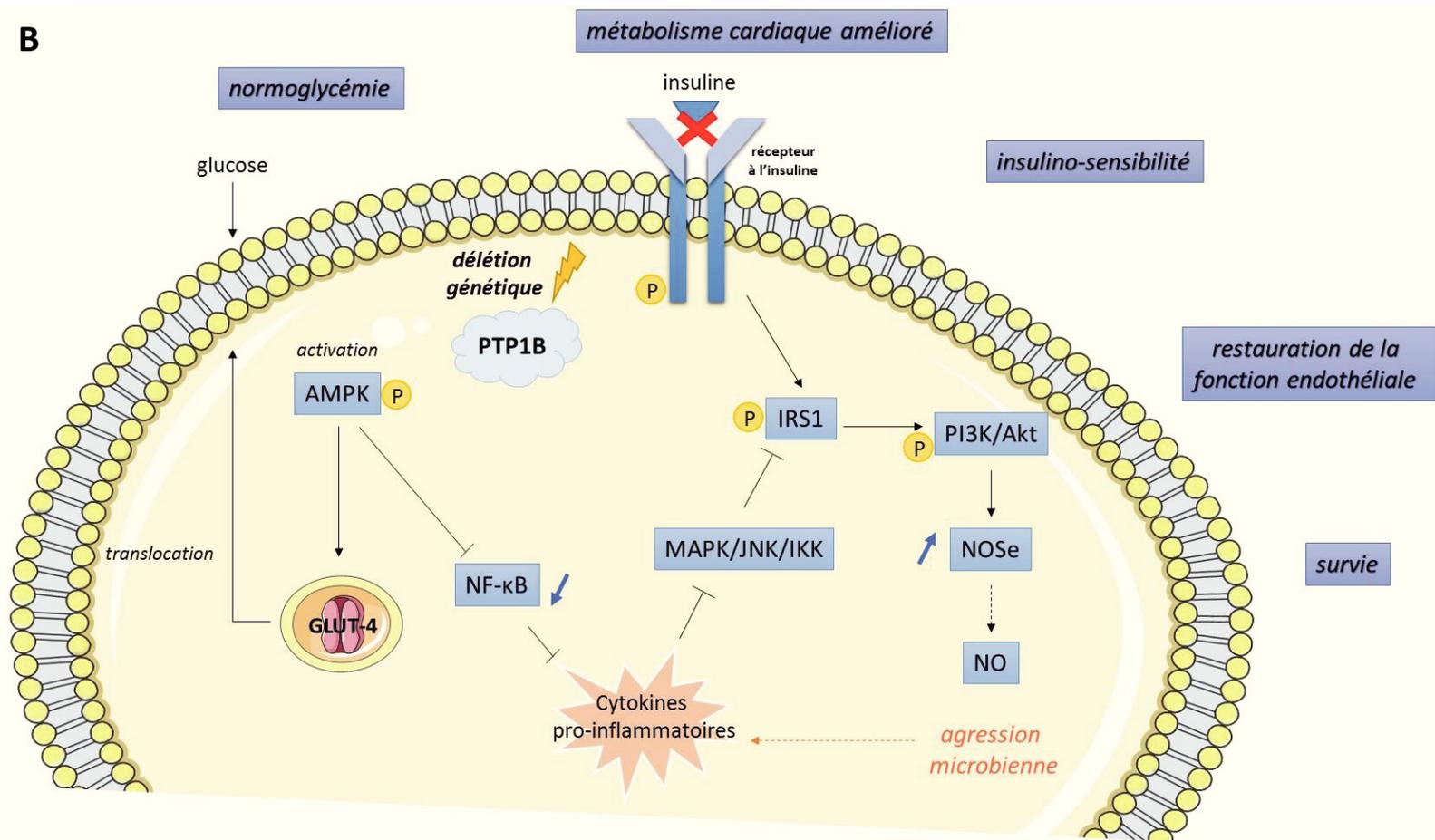


Figure 54 (B) : Vue d'ensemble du rôle de la délétion génétique de PTP1B dans les cellules myocardiques et vasculaires lors du sepsis.

La délétion génétique de PTP1B permet de restaurer la phosphorylation d'AMPK favorisant ainsi l'expression et la translocation des GLUT-4 à la membrane qui permet une absorption de glucose limitant le phénomène d'hyperglycémie. De la même manière, la voie AMPK inhibe le NF-κB favorisant une diminution des cytokines pro-inflammatoires aboutissant à la restauration de l'insulino-sensibilité et de la fonction endothéliale de par l'expression de NOe et la libération du NO. Ces phénomènes s'accompagnent d'une amélioration du métabolisme cardiaque et de la fonction d'organes favorisant la survie.

PERSPECTIVES

À la suite de ces travaux de recherche, de nombreuses perspectives aussi bien fondamentales que cliniques peuvent être envisagées. Nos objectifs sont de compléter notre compréhension sur l'impact de l'inhibition de la PTP1B dans l'optique d'établir un axe nouveau de prise en charge du sepsis.

Afin de compléter nos études concernant l'insulino-résistance et le métabolisme glucidique, il serait intéressant de mesurer l'activité métabolique des organes. Une approche par Tomodensitométrie par Émission de Positons couplé à un scanner (PET-Scan), technique d'imagerie nucléaire, pourrait être réalisée. Le suivi de la désintégration d'un traceur radioactif injecté au préalable tel que le glucose marqué d'un atome 18F-fluorodésoxyglucose, permettrait de suivre le transport et l'utilisation de cette molécule par les organes et donc de connaître l'activité métabolique des organes.

L'étude de la dysfonction mitochondriale et de ses conséquences dans la toxicité du glucose pourrait également être envisagée. Dans un premier temps, une évaluation du stress oxydant pourrait être réalisée par mesure de la production des Espèces Réactives de l'Oxygène. Dans un second temps, une quantification de l'enzyme PARP et des autres facteurs impliqués dans les voies de signalisation en aval pourrait être envisagée. Cette perspective sera d'ailleurs étudiée dans le travail de thèse de Sarah Fert sur un modèle murin de CLP avec apport de glucose en continu permettant d'obtenir une hyperglycémie prolongée chez les animaux et ainsi de pouvoir étudier la toxicité du glucose dans le contexte septique.

Afin de s'affranchir des éventuels phénomènes compensatoires mis en place dans le développement embryonnaire des animaux Tie2PTP1B^{-/-} et des problèmes liés à la fuite du promoteur Tie2 dans les cellules hématopoïétiques, il serait intéressant de développer une lignée de souris déficientes en PTP1B endothéliale inductible. Pour cela, l'utilisation de souris VE-Cadhérines Cre inductible présentes au sein de notre animalerie et permettant l'obtention de souris déficientes endothéliales spécifiques pourrait être envisagée. La fuite de l'expression au niveau des cellules hématopoïétiques a été décrite comme négligeable dans la littérature ⁴⁶⁴.

L'utilisation de modèle d'inactivation génique est une approche expérimentale utile pour la compréhension de mécanismes physiopathologiques mais discutable d'un point de vue clinique. Ainsi, l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de PTP1B tels que la claramine et la trodusquemine déjà

utilisés au laboratoire dans des études préliminaires permettrait de s'affranchir des difficultés posées par un modèle d'organisme génétiquement modifié et présenterait un intérêt expérimental et clinique important. Cette perspective est également envisagée prochainement dans le laboratoire avec dans un premier temps, la mise en place d'études pharmacocinétiques et dans un second temps, l'impact de l'utilisation de ces inhibiteurs dans un contexte de sepsis (collaboration avec l'équipe du Pr. O. Lesur – Canada).

Dans une perspective clinique, une première étude portant sur la corrélation entre l'expression de la PTP1B et la défaillance d'organe au cours du choc septique (SEPP1B) et une seconde portant sur l'évaluation de l'expression des marqueurs du stress du réticulum endoplasmique au cours des inflammations systémiques chez l'Homme sont actuellement en cours d'étude. Ces essais cliniques réalisés sur du sang périphérique de patient en choc septique, menés par le Pr. Fabienne Tamion en collaboration avec le service de réanimation du CHU de Rouen, ont pour but de déterminer l'impact pronostique de ces marqueurs permettant de guider la pratique clinique (annexe 1). Ces études constituent une étape préliminaire à l'approche thérapeutique visant à inhiber la PTP1B chez les patients septiques.

ANNEXE

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Publications

Reduced insulin resistance contributes to the beneficial effect of protein tyrosine phosphatase-1B deletion in a mouse model of sepsis.

E. Delile, R. Nevière, P-A. Thiébaud, J. Maupoint, P. Mulder, D. Coquerel, S. Renet, J. Rieusset, V. Richard, F. Tamion.

Shock, 2017

PTP1B endothelial gene deletion limits cardiovascular dysfunction and mortality during experimental septic shock.

E. Delile, J. Maupoint, P-A. Thiébaud, D. Coquerel, P. Mulder, S. Renet, V. Richard, F. Tamion.

En preparation.

Gene deletion of protein tyrosine phosphatase 1B protects against sepsis-induced cardiovascular dysfunction and mortality.

D. Coquerel, R. Nevière, E. Delile, P. Mulder, X. Maréchal, D. Montaigne, S. Renet, I. Rémy-Jouet, E. Gomez, J-P. Henry, J-C. do Rego, V. Richard, F. Tamion.

Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., Mai 2014.

Protein Tyrosine Phosphatase 1B regulates endothelial endoplasmic reticulum stress: role in septic shock.

P-A. Thiébaud, E. Delile, D. Coquerel, J-M. Brunel, F. Tamion, V. Richard.

Soumis

Endothelial protein tyrosine phosphatase 1B deficiency improves insulin sensitivity and reduces both endothelial and cardiac dysfunction in a mouse model of insulinoreistance

J. Maupoint, E. Delile, J-C. do Rego, M. Coëffier, A. Dumesnil, J-P. Henry, O. Boyer, F. Tamion, J. Martinet, P. Mulder, V. Richard.

En préparation

Chapitres

Endothélium vasculaire : un nouvel organe

E. Delile, D. Coquerel, F. Tamion.

Traité de Réanimation 3^{ème} édition, Collège National des Enseignants de Réanimation, Elsevier/Masson.

Les voies du monoxyde d'azote dans le sepsis.

E. Besnier, E. Delile, D. Coquerel, F. Tamion.

Réanimation, Volume 24, Chapitre 2, pp 191-200, Mars 2015

Le glycocalyx : tapis protecteur de l'endothélium.

D.Coquerel, E. Delile, F. Tamion.

Réanimation, Volume 22, Chapitre 2, pp 173-180, Mars 2013

Communications orales

*29th Annual Congress of the European Society of Intensive Care Medicine to be held – Milan, Italie
Octobre 2016*

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

E. Delile, R. Nevière, P-A. Thiébaud, J. Maupoint, P. Mulder, D. Coquerel, S. Renet, J. Rieusset, V. Richard, F. Tamion.

*44ème congrès international de la Société de Réanimation de Langue Française – Paris
Janvier 2016*

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

E. Delile, P.-A. Thiébaud, J.-C. Do Rego, D. Coquerel, R. Nevière, V. Richard, F. Tamion.

*43ème congrès international de la Société de Réanimation de Langue Française – Paris
Janvier 2015*

Consequences of endoplasmic reticulum stress modulation in experimental septic shock

E. Delile, P.A. Thiébaud, D. Coquerel, V. Richard, F. Tamion.

PTP1B inhibition and insulin resistance in experimental model of sepsis

E. Delile, J. Maupoint, D. Coquerel, V. Richard, F. Tamion.

9ème édition du Printemps de la cardiologie – Strasbourg

Avril 2014

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

E. Delile, D. Coquerel, R. Nevière, V. Richard, F. Tamion.

9ème congrès de Physiologie, Pharmacologie et Thérapeutique – Poitiers

Avril 2014

Finaliste du Prix de Thèse

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

E. Delile, D. Coquerel, R. Nevière, V. Richard, F. Tamion.

42ème congrès international de la Société de Réanimation de Langue Française – Paris

Janvier 2014

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

E. Delile, D. Coquerel, R. Nevière, V. Richard, F. Tamion.

Communications affichées

45ème congrès international de la Société de Réanimation de Langue Française – Paris

Janvier 2017

PTP1B endothelial gene deletion limits cardiovascular dysfunction and mortality during experimental septic shock

E. Delile, J. Maupoint, P-A Thiébaud, D. Coquerel, V. Richard, F. Tamion.

4ème journée annuelle de l'Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB) – Rouen

Juin 2015

PTP1B endothelial gene deletion limits cardiovascular dysfunction during experimental septic shock

E. Delile, J. Maupoint, D. Coquerel, V. Richard, F. Tamion.

10ème édition du Printemps de la cardiologie – Toulouse

Avril 2015

PTP1B endothelial gene deletion limits cardiovascular dysfunction during experimental septic shock

E. Delile, J. Maupoint, D. Coquerel, V. Richard, F. Tamion.

9ème édition du Printemps de la cardiologie – Strasbourg

Avril 2014

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

E. Delile, D. Coquerel, R. Nevière, V. Richard, F. Tamion.

3ème journée annuelle de l'IRIB – Evreux – Juin 2014

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

E. Delile, D. Coquerel, R. Nevière, V. Richard, F. Tamion.

2ème journée annuelle de l'IRIB – Rouen – Juin 2013

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

E. Delile, D. Coquerel, R. Nevière, V. Richard, F. Tamion.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Geroulanos, S. & Douka, E. T. Historical perspective of the word 'sepsis'. *Intensive Care Med.* **32**, 2077 (2006).
2. Funk, D. J., Parrillo, J. E. & Kumar, A. Sepsis and septic shock: a history. *Crit. Care Clin.* **25**, 83–101, viii (2009).
3. Thurston, A. J. Of blood, inflammation and gunshot wounds: the history of the control of sepsis. *Aust. N. Z. J. Surg.* **70**, 855–861 (2000).
4. Majno, G. The ancient riddle of sigma eta psi iota sigma (sepsis). *J. Infect. Dis.* **163**, 937–945 (1991).
5. Beutler, B. & Rietschel, E. T. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 169–176 (2003).
6. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit. Care Med.* **20**, 864–874 (1992).
7. Linde-Zwirble, W. T. & Angus, D. C. Severe sepsis epidemiology: sampling, selection, and society. *Crit. Care Lond. Engl.* **8**, 222–226 (2004).
8. Annane, D., Aegerter, P., Jars-Guincestre, M. C., Guidet, B. & CUB-Réa Network. Current epidemiology of septic shock: the CUB-Réa Network. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **168**, 165–172 (2003).
9. Brun-Buisson, C. [Epidemiology of severe sepsis]. *Presse Medicale Paris Fr.* 1983 **35**, 513–520 (2006).
10. Quenot, J.-P. *et al.* The epidemiology of septic shock in French intensive care units: the prospective multicenter cohort EPISS study. *Crit. Care Lond. Engl.* **17**, R65 (2013).
11. Alberti, C. *et al.* Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Med.* **28**, 108–121 (2002).
12. Brun-Buisson, C., Meshaka, P., Pinton, P., Vallet, B. & EPISEPSIS Study Group. EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. *Intensive Care Med.* **30**, 580–588 (2004).
13. Williams, M. D. *et al.* Hospitalized cancer patients with severe sepsis: analysis of incidence, mortality, and associated costs of care. *Crit. Care Lond. Engl.* **8**, R291-298 (2004).
14. Lin, M. T. & Albertson, T. E. Genomic polymorphisms in sepsis. *Crit. Care Med.* **32**, 569–579 (2004).
15. Hubacek, J. A. *et al.* Gene variants of the bactericidal/permeability increasing protein and lipopolysaccharide binding protein in sepsis patients: gender-specific genetic predisposition to sepsis. *Crit. Care Med.* **29**, 557–561 (2001).
16. Esposito, S. *et al.* Genetic polymorphisms and the development of invasive bacterial infections in children. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **29**, 99–104 (2016).
17. Angus, D. C. *et al.* Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit. Care Med.* **29**, 1303–1310 (2001).
18. Adhikari, N. K. J., Fowler, R. A., Bhagwanjee, S. & Rubenfeld, G. D. Critical care and the global burden of critical illness in adults. *Lancet Lond. Engl.* **376**, 1339–1346 (2010).
19. Martin, G. S., Mannino, D. M., Eaton, S. & Moss, M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1546–1554 (2003).
20. Dombrovskiy, V. Y., Martin, A. A., Sunderram, J. & Paz, H. L. Occurrence and outcomes of sepsis: influence of race. *Crit. Care Med.* **35**, 763–768 (2007).
21. Levy, M. M. *et al.* 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med.* **29**, 530–538 (2003).

22. Ferreira, F. L., Bota, D. P., Bross, A., Mélot, C. & Vincent, J. L. Serial evaluation of the SOFA score to predict outcome in critically ill patients. *JAMA* **286**, 1754–1758 (2001).
23. Marshall, J. C. *et al.* Multiple organ dysfunction score: a reliable descriptor of a complex clinical outcome. *Crit. Care Med.* **23**, 1638–1652 (1995).
24. Singer, M. *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* **315**, 801–810 (2016).
25. Lemaout, C., Gonzalez, H., Aboab, J. & Annane, D. [Pathophysiology of septic shock]. *Presse Medicale Paris Fr.* **1983** **35**, 521–527 (2006).
26. Remick, D. G. Pathophysiology of sepsis. *Am. J. Pathol.* **170**, 1435–1444 (2007).
27. Liew, F. Y., Xu, D., Brint, E. K. & O'Neill, L. A. J. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 446–458 (2005).
28. Cinel, I. & Opal, S. M. Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. *Crit. Care Med.* **37**, 291–304 (2009).
29. Takeuchi, O. *et al.* Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* **11**, 443–451 (1999).
30. Gordon, S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* **111**, 927–930 (2002).
31. Lee, I.-T., Shih, R.-H., Lin, C.-C., Chen, J.-T. & Yang, C.-M. Role of TLR4/NADPH oxidase/ROS-activated p38 MAPK in VCAM-1 expression induced by lipopolysaccharide in human renal mesangial cells. *Cell Commun. Signal. CCS* **10**, 33 (2012).
32. Hsu, C.-C. *et al.* Yuwen02f1 suppresses LPS-induced endotoxemia and adjuvant-induced arthritis primarily through blockade of ROS formation, NFkB and MAPK activation. *Biochem. Pharmacol.* **85**, 385–395 (2013).
33. Su, B. Linking stress to immunity? *Nat. Immunol.* **6**, 541–542 (2005).
34. Hallahan, D., Clark, E. T., Kuchibhotla, J., Gewertz, B. L. & Collins, T. E-selectin gene induction by ionizing radiation is independent of cytokine induction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **217**, 784–795 (1995).
35. Mackman, N. How do oxidized phospholipids inhibit LPS signaling? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 1133–1136 (2003).
36. Weaver, L. K., Pioli, P. A., Wardwell, K., Vogel, S. N. & Guyre, P. M. Up-regulation of human monocyte CD163 upon activation of cell-surface Toll-like receptors. *J. Leukoc. Biol.* **81**, 663–671 (2007).
37. Calandra, T. Pathogenesis of septic shock: implications for prevention and treatment. *J. Chemother. Florence Italy* **13 Spec No 1**, 173–180 (2001).
38. Heumann, D., Barras, C., Severin, A., Glauser, M. P. & Tomasz, A. Gram-positive cell walls stimulate synthesis of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by human monocytes. *Infect. Immun.* **62**, 2715–2721 (1994).
39. McEver, R. P., Moore, K. L. & Cummings, R. D. Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J. Biol. Chem.* **270**, 11025–11028 (1995).
40. Languino, L. R. *et al.* Fibrinogen mediates leukocyte adhesion to vascular endothelium through an ICAM-1-dependent pathway. *Cell* **73**, 1423–1434 (1993).
41. Brandtzaeg, P. *et al.* Net inflammatory capacity of human septic shock plasma evaluated by a monocyte-based target cell assay: identification of interleukin-10 as a major functional deactivator of human monocytes. *J. Exp. Med.* **184**, 51–60 (1996).
42. Wang, F. *et al.* The inflammation induced by lipopolysaccharide can be mitigated by short chain fatty acid, butyrate, through up-regulation of IL-10 in septic shock. *Scand. J. Immunol.* (2016). doi:10.1111/sji.12515
43. Huston, J. M. *et al.* Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. *J. Exp. Med.* **203**, 1623–1628 (2006).
44. Rosas-Ballina, M. *et al.* Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. *Science* **334**, 98–101 (2011).

45. Cuenca, A. G., Delano, M. J., Kelly-Scumpia, K. M., Moldawer, L. L. & Efron, P. A. Cecal ligation and puncture. *Curr. Protoc. Immunol.* **Chapter 19**, Unit 19.13 (2010).
46. Hotchkiss, R. S. & Karl, I. E. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N. Engl. J. Med.* **348**, 138–150 (2003).
47. Gogos, C. A., Drosou, E., Bassaris, H. P. & Skoutelis, A. Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J. Infect. Dis.* **181**, 176–180 (2000).
48. Xing, K., Murthy, S., Liles, W. C. & Singh, J. M. Clinical utility of biomarkers of endothelial activation in sepsis—a systematic review. *Crit. Care Lond. Engl.* **16**, R7 (2012).
49. Skibsted, S. *et al.* Biomarkers of endothelial cell activation in early sepsis. *Shock Augusta Ga* **39**, 427–432 (2013).
50. Lee, M. M., Schuessler, G. B. & Chien, S. Time-dependent effects of endotoxin on the ultrastructure of aortic endothelium. *Artery* **15**, 71–89 (1988).
51. Mutunga, M. *et al.* Circulating endothelial cells in patients with septic shock. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **163**, 195–200 (2001).
52. Polunovsky, V. A., Wendt, C. H., Ingbar, D. H., Peterson, M. S. & Bitterman, P. B. Induction of endothelial cell apoptosis by TNF alpha: modulation by inhibitors of protein synthesis. *Exp. Cell Res.* **214**, 584–594 (1994).
53. Messmer, U. K., Briner, V. A. & Pfeilschifter, J. Tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide induce apoptotic cell death in bovine glomerular endothelial cells. *Kidney Int.* **55**, 2322–2337 (1999).
54. Ardoin, S. P., Shanahan, J. C. & Pisetsky, D. S. The role of microparticles in inflammation and thrombosis. *Scand. J. Immunol.* **66**, 159–165 (2007).
55. Johnson, B. L. *et al.* Neutrophil derived microparticles increase mortality and the counter-inflammatory response in a murine model of sepsis. *Biochim. Biophys. Acta* (2017). doi:10.1016/j.bbadis.2017.01.012
56. Matsumoto, H. *et al.* Clinical Significance of Tissue Factor and CD13 Double-Positive Microparticles in SIRS Patients with Trauma and Severe Sepsis. *Shock Augusta Ga* (2016). doi:10.1097/SHK.0000000000000768
57. Heckel, K., Kiefmann, R., Dörger, M., Stoeckelhuber, M. & Goetz, A. E. Colloidal gold particles as a new in vivo marker of early acute lung injury. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **287**, L867–878 (2004).
58. Ait-Oufella, H., Maury, E., Lehoux, S., Guidet, B. & Offenstadt, G. The endothelium: physiological functions and role in microcirculatory failure during severe sepsis. *Intensive Care Med.* **36**, 1286–1298 (2010).
59. Russell, J. A. Management of sepsis. *N. Engl. J. Med.* **355**, 1699–1713 (2006).
60. Levi, M. & van der Poll, T. Coagulation and sepsis. *Thromb. Res.* **149**, 38–44 (2017).
61. Prabhakaran, P. *et al.* Elevated levels of plasminogen activator inhibitor-1 in pulmonary edema fluid are associated with mortality in acute lung injury. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **285**, L20-28 (2003).
62. Levin, E. G., Marotti, K. R. & 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.* **264**, 16030–16036 (1989).
63. Annane, D. *et al.* Compartmentalised inducible nitric-oxide synthase activity in septic shock. *Lancet Lond. Engl.* **355**, 1143–1148 (2000).
64. Laubach, V. E., Shesely, E. G., Smithies, O. & Sherman, P. A. Mice lacking inducible nitric oxide synthase are not resistant to lipopolysaccharide-induced death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 10688–10692 (1995).
65. Coquerel, D. *et al.* Gene deletion of protein tyrosine phosphatase 1B protects against sepsis-induced cardiovascular dysfunction and mortality. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **34**, 1032–1044 (2014).

66. Macarthur, H., Westfall, T. C., Riley, D. P., Misko, T. P. & Salvemini, D. Inactivation of catecholamines by superoxide gives new insights on the pathogenesis of septic shock. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 9753–9758 (2000).
67. Araújo, A. V. *et al.* Prostacyclin, not only nitric oxide, is a mediator of the vasorelaxation induced by acetylcholine in aortas from rats submitted to cecal ligation and perforation (CLP). *Vascul. Pharmacol.* **54**, 44–51 (2011).
68. Shi, Y. & Vanhoutte, P. M. Macro- and Microvascular Endothelial Dysfunction in Diabetes. *J. Diabetes* (2017). doi:10.1111/1753-0407.12521
69. Levy, B. *et al.* Vascular hyporesponsiveness to vasopressors in septic shock: from bench to bedside. *Intensive Care Med.* **36**, 2019–2029 (2010).
70. Jeanneret, S., Sanchez, B. & Liaudet, L. [Pathophysiological mechanisms and treatment of septic shock-induced vasoplegia]. *Rev. Med. Suisse* **7**, 2435–2438 (2011).
71. Landry, D. W. & Oliver, J. A. The pathogenesis of vasodilatory shock. *N. Engl. J. Med.* **345**, 588–595 (2001).
72. McMillan, M., Chernow, B. & Roth, B. L. Hepatic alpha 1-adrenergic receptor alteration in a rat model of chronic sepsis. *Circ. Shock* **19**, 185–193 (1986).
73. Rubio-Gayosso, I., Platts, S. H. & Duling, B. R. Reactive oxygen species mediate modification of glycocalyx during ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **290**, H2247–2256 (2006).
74. Marechal, X. *et al.* Endothelial glycocalyx damage during endotoxemia coincides with microcirculatory dysfunction and vascular oxidative stress. *Shock Augusta Ga* **29**, 572–576 (2008).
75. Zuurbier, C. J., Demirci, C., Koeman, A., Vink, H. & Ince, C. Short-term hyperglycemia increases endothelial glycocalyx permeability and acutely decreases lineal density of capillaries with flowing red blood cells. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **99**, 1471–1476 (2005).
76. Hunter, J. D. & Doddi, M. Sepsis and the heart. *Br. J. Anaesth.* **104**, 3–11 (2010).
77. Tamion, F. *et al.* Myocardial dysfunction in early state of endotoxemia role of heme-oxygenase-1. *J. Surg. Res.* **158**, 94–103 (2010).
78. Charpentier, J. *et al.* Brain natriuretic peptide: A marker of myocardial dysfunction and prognosis during severe sepsis. *Crit. Care Med.* **32**, 660–665 (2004).
79. Ver Elst, K. M. *et al.* Cardiac troponins I and T are biological markers of left ventricular dysfunction in septic shock. *Clin. Chem.* **46**, 650–657 (2000).
80. Zaky, A., Deem, S., Bendjelid, K. & Treggiari, M. M. Characterization of cardiac dysfunction in sepsis: an ongoing challenge. *Shock Augusta Ga* **41**, 12–24 (2014).
81. Cunnion, R. E., Schaer, G. L., Parker, M. M., Natanson, C. & Parrillo, J. E. The coronary circulation in human septic shock. *Circulation* **73**, 637–644 (1986).
82. Soriano, F. G. *et al.* Endotoxemic myocardial dysfunction: subendocardial collagen deposition related to coronary driving pressure. *Shock Augusta Ga* **42**, 472–479 (2014).
83. Lorigados, C. B., Ariga, S. K., Batista, T. R., Velasco, I. T. & Soriano, F. G. Endotoxaemic myocardial dysfunction: the role of coronary driving pressure in subendocardial perfusion. *Crit. Care Resusc. J. Australas. Acad. Crit. Care Med.* **17**, 12–22 (2015).
84. Merx, M. W. *et al.* Statin treatment after onset of sepsis in a murine model improves survival. *Circulation* **112**, 117–124 (2005).
85. McDonough, K. H. & Virag, J. I. Sepsis-induced myocardial dysfunction and myocardial protection from ischemia/reperfusion injury. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **11**, 23–32 (2006).
86. Ren, J., Ren, B. H. & Sharma, A. C. Sepsis-induced depressed contractile function of isolated ventricular myocytes is due to altered calcium transient properties. *Shock Augusta Ga* **18**, 285–288 (2002).
87. Poelaert, J., Declerck, C., Vogelaers, D., Colardyn, F. & Visser, C. A. Left ventricular systolic and diastolic function in septic shock. *Intensive Care Med.* **23**, 553–560 (1997).
88. Rudiger, A. & Singer, M. Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction. *Crit. Care Med.* **35**, 1599–1608 (2007).

89. Böhm, M., Kirchmayr, R., Gierschik, P. & Erdmann, E. Increase of myocardial inhibitory G-proteins in catecholamine-refractory septic shock or in septic multiorgan failure. *Am. J. Med.* **98**, 183–186 (1995).
90. Wu, L.-L. *et al.* G protein and adenylate cyclase complex-mediated signal transduction in the rat heart during sepsis. *Shock Augusta Ga* **19**, 533–537 (2003).
91. Abi-Gerges, N. *et al.* Sequential changes in autonomic regulation of cardiac myocytes after in vivo endotoxin injection in rat. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **160**, 1196–1204 (1999).
92. Wu, L. L. & Liu, M. S. Altered ryanodine receptor of canine cardiac sarcoplasmic reticulum and its underlying mechanism in endotoxin shock. *J. Surg. Res.* **53**, 82–90 (1992).
93. Hobai, I. A. *et al.* SERCA Cys674 sulphonylation and inhibition of L-type Ca²⁺ influx contribute to cardiac dysfunction in endotoxemic mice, independent of cGMP synthesis. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **305**, H1189-1200 (2013).
94. Wu, L. L., Tang, C. & Liu, M. S. Altered phosphorylation and calcium sensitivity of cardiac myofibrillar proteins during sepsis. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **281**, R408-416 (2001).
95. Mazzeo, A. T., La Monaca, E., Di Leo, R., Vita, G. & Santamaria, L. B. Heart rate variability: a diagnostic and prognostic tool in anesthesia and intensive care. *Acta Anaesthesiol. Scand.* **55**, 797–811 (2011).
96. Hoyer, D. *et al.* Prognostic impact of autonomic information flow in multiple organ dysfunction syndrome patients. *Int. J. Cardiol.* **108**, 359–369 (2006).
97. Annane, D. *et al.* Inappropriate sympathetic activation at onset of septic shock: a spectral analysis approach. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **160**, 458–465 (1999).
98. Camm, A. J. *et al.* 2012 focused update of the ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation: an update of the 2010 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation--developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association. *Eur. Eur. Pacing Arrhythm. Card. Electrophysiol. J. Work. Groups Card. Pacing Arrhythm. Card. Cell. Electrophysiol. Eur. Soc. Cardiol.* **14**, 1385–1413 (2012).
99. Dhainaut, J. F. *et al.* Coronary hemodynamics and myocardial metabolism of lactate, free fatty acids, glucose, and ketones in patients with septic shock. *Circulation* **75**, 533–541 (1987).
100. Suliman, H. B., Welty-Wolf, K. E., Carraway, M., Tatro, L. & Piantadosi, C. A. Lipopolysaccharide induces oxidative cardiac mitochondrial damage and biogenesis. *Cardiovasc. Res.* **64**, 279–288 (2004).
101. Watts, J. A., Kline, J. A., Thornton, L. R., Grattan, R. M. & Brar, S. S. Metabolic dysfunction and depletion of mitochondria in hearts of septic rats. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **36**, 141–150 (2004).
102. Lancel, S. *et al.* Ventricular myocyte caspases are directly responsible for endotoxin-induced cardiac dysfunction. *Circulation* **111**, 2596–2604 (2005).
103. Zhang, K. & Kaufman, R. J. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* **454**, 455–462 (2008).
104. Gregor, M. F. & Hotamisligil, G. S. Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *J. Lipid Res.* **48**, 1905–1914 (2007).
105. Ron, D. & Walter, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 519–529 (2007).
106. Zhang, B. *et al.* Cortistatin protects myocardium from endoplasmic reticulum stress induced apoptosis during sepsis. *Mol. Cell. Endocrinol.* **406**, 40–48 (2015).
107. Ferlito, M. *et al.* Hydrogen sulfide [corrected] increases survival during sepsis: protective effect of CHOP inhibition. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **192**, 1806–1814 (2014).
108. Kim, H. J. *et al.* Inhibition of endoplasmic reticulum stress alleviates lipopolysaccharide-induced lung inflammation through modulation of NF-κB/HIF-1α signaling pathway. *Sci. Rep.* **3**, 1142 (2013).
109. Khan, M. M., Yang, W.-L., Brenner, M., Bolognese, A. C. & Wang, P. Cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) causes sepsis-associated acute lung injury via induction of endoplasmic reticulum stress. *Sci. Rep.* **7**, 41363 (2017).

110. Rubenfeld, G. D. *et al.* Incidence and outcomes of acute lung injury. *N. Engl. J. Med.* **353**, 1685–1693 (2005).
111. D'Alessio, F. R. *et al.* CD4+CD25+Foxp3+ Tregs resolve experimental lung injury in mice and are present in humans with acute lung injury. *J. Clin. Invest.* **119**, 2898–2913 (2009).
112. Strnad, P., Tacke, F., Koch, A. & Trautwein, C. Liver - guardian, modifier and target of sepsis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **14**, 55–66 (2017).
113. Wang, D., Yin, Y. & Yao, Y. Advances in sepsis-associated liver dysfunction. *Burns Trauma* **2**, 97–105 (2014).
114. Kolios, G. *et al.* Nitric oxide and MCP-1 regulation in LPS activated rat Kupffer cells. *Mol. Cell. Biochem.* **319**, 91–98 (2008).
115. Dizier, S. *et al.* Early Hepatic Dysfunction Is Associated with a Worse Outcome in Patients Presenting with Acute Respiratory Distress Syndrome: A Post-Hoc Analysis of the ACURASYS and PROSEVA Studies. *PLoS One* **10**, e0144278 (2015).
116. Koch, A. *et al.* Increased liver stiffness denotes hepatic dysfunction and mortality risk in critically ill non-cirrhotic patients at a medical ICU. *Crit. Care Lond. Engl.* **15**, R266 (2011).
117. Deitch, E. A. Gut-origin sepsis: evolution of a concept. *Surg. J. R. Coll. Surg. Edinb. Irel.* **10**, 350–356 (2012).
118. Tamion, F., Richard, V., Renet, S. & Thuillez, C. Intestinal preconditioning prevents inflammatory response by modulating heme oxygenase-1 expression in endotoxic shock model. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **293**, G1308-1314 (2007).
119. Coquerel, D. *et al.* Omega-3 polyunsaturated fatty acids delay the progression of endotoxic shock-induced myocardial dysfunction. *Inflammation* **36**, 932–940 (2013).
120. Doi, K. & Rabb, H. Impact of acute kidney injury on distant organ function: recent findings and potential therapeutic targets. *Kidney Int.* **89**, 555–564 (2016).
121. Gonçalves, G. M., Zamboni, D. S. & Câmara, N. O. S. The role of innate immunity in septic acute kidney injuries. *Shock Augusta Ga* **34 Suppl 1**, 22–26 (2010).
122. Kelly, K. J. Distant effects of experimental renal ischemia/reperfusion injury. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **14**, 1549–1558 (2003).
123. Adam, N., Kandelman, S., Mantz, J., Chrétien, F. & Sharshar, T. Sepsis-induced brain dysfunction. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **11**, 211–221 (2013).
124. Polito, A. *et al.* Hyperglycaemia and apoptosis of microglial cells in human septic shock. *Crit. Care Lond. Engl.* **15**, R131 (2011).
125. Bell, G. I. *et al.* Sequence of the human insulin gene. *Nature* **284**, 26–32 (1980).
126. Hubbard, S. R. The insulin receptor: both a prototypical and atypical receptor tyrosine kinase. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, a008946 (2013).
127. White, M. F. The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia* **40 Suppl 2**, S2-17 (1997).
128. Boller, S. *et al.* From signal transduction to signal interpretation: an alternative model for the molecular function of insulin receptor substrates. *Arch. Physiol. Biochem.* **118**, 148–155 (2012).
129. Sparrow, L. G. *et al.* The disulfide bonds in the C-terminal domains of the human insulin receptor ectodomain. *J. Biol. Chem.* **272**, 29460–29467 (1997).
130. Capeau, J. [Insulin signaling: mechanisms altered in insulin resistance]. *Med. Sci. MS* **19**, 834–839 (2003).
131. Moller, D. E., Yokota, A., Caro, J. F. & Flier, J. S. Tissue-specific expression of two alternatively spliced insulin receptor mRNAs in man. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **3**, 1263–1269 (1989).
132. Frasca, F. *et al.* Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 3278–3288 (1999).
133. Shier, P. & Watt, V. M. Primary structure of a putative receptor for a ligand of the insulin family. *J. Biol. Chem.* **264**, 14605–14608 (1989).
134. De Meyts, P., Ursø, B., Christoffersen, C. T. & Shymko, R. M. Mechanism of insulin and IGF-I receptor activation and signal transduction specificity. Receptor dimer cross-linking, bell-shaped curves, and sustained versus transient signaling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **766**, 388–401 (1995).

135. Kido, Y., Nakae, J. & Accili, D. Clinical review 125: The insulin receptor and its cellular targets. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**, 972–979 (2001).
136. Tavaré, J. M. & Siddle, K. Mutational analysis of insulin receptor function: consensus and controversy. *Biochim. Biophys. Acta* **1178**, 21–39 (1993).
137. Hubbard, S. R., Wei, L., Ellis, L. & Hendrickson, W. A. Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *Nature* **372**, 746–754 (1994).
138. Sesti, G., Federici, M., Lauro, D., Sbraccia, P. & Lauro, R. Molecular mechanism of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus: role of the insulin receptor variant forms. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **17**, 363–373 (2001).
139. Bakke, J. & Haj, F. G. Protein-tyrosine phosphatase 1B substrates and metabolic regulation. *Semin. Cell Dev. Biol.* **37**, 58–65 (2015).
140. Sun, X. J. *et al.* Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* **352**, 73–77 (1991).
141. Sun, X. J. *et al.* Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature* **377**, 173–177 (1995).
142. Lavan, B. E. *et al.* A novel 160-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family. *J. Biol. Chem.* **272**, 21403–21407 (1997).
143. Shimizu, Y. & Shimazu, T. Effects of wortmannin on increased glucose transport by insulin and norepinephrine in primary culture of brown adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202**, 660–665 (1994).
144. Okada, T., Kawano, Y., Sakakibara, T., Hazeki, O. & Ui, M. Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes. Studies with a selective inhibitor wortmannin. *J. Biol. Chem.* **269**, 3568–3573 (1994).
145. Saltiel, A. R. & Pessin, J. E. Insulin signaling pathways in time and space. *Trends Cell Biol.* **12**, 65–71 (2002).
146. Biggs, W. H., Meisenhelder, J., Hunter, T., Cavenee, W. K. & Arden, K. C. Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 7421–7426 (1999).
147. Jeong, W., Kim, J., Bazer, F. W. & Song, G. Stimulatory Effect of Vascular Endothelial Growth Factor on Proliferation and Migration of Porcine Trophectoderm Cells and Their Regulation by the Phosphatidylinositol-3-Kinase-AKT and Mitogen-Activated Protein Kinase Cell Signaling Pathways. *Biol. Reprod.* **90**, 50 (2014).
148. Miralem, T. *et al.* Interaction of human biliverdin reductase with Akt/protein kinase B and phosphatidylinositol-dependent kinase 1 regulates glycogen synthase kinase 3 activity: a novel mechanism of Akt activation. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **30**, 2926–2944 (2016).
149. Roberts, T. M. Cell biology. A signal chain of events. *Nature* **360**, 534–535 (1992).
150. Porras, A., Muszynski, K., Rapp, U. R. & Santos, E. Dissociation between activation of Raf-1 kinase and the 42-kDa mitogen-activated protein kinase/90-kDa S6 kinase (MAPK/RSK) cascade in the insulin/Ras pathway of adipocytic differentiation of 3T3 L1 cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 12741–12748 (1994).
151. Baldwin, J. M., Gorga, J. C. & Lienhard, G. E. The monosaccharide transporter of the human erythrocyte. Transport activity upon reconstitution. *J. Biol. Chem.* **256**, 3685–3689 (1981).
152. Sun, L. *et al.* Crystal structure of a bacterial homologue of glucose transporters GLUT1-4. *Nature* **490**, 361–366 (2012).
153. Joost, H.-G. *et al.* Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **282**, E974-976 (2002).
154. Gould, G. W. & Holman, G. D. The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. *Biochem. J.* **295 (Pt 2)**, 329–341 (1993).
155. Leto, D. & Saltiel, A. R. Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 383–396 (2012).
156. Bryant, N. J., Govers, R. & James, D. E. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 267–277 (2002).

157. Bose, A. *et al.* Glucose transporter recycling in response to insulin is facilitated by myosin Myo1c. *Nature* **420**, 821–824 (2002).
158. Halachmi, N. & Lev, Z. The Sec1 family: a novel family of proteins involved in synaptic transmission and general secretion. *J. Neurochem.* **66**, 889–897 (1996).
159. Tellam, J. T., McIntosh, S. & James, D. E. Molecular identification of two novel Munc-18 isoforms expressed in non-neuronal tissues. *J. Biol. Chem.* **270**, 5857–5863 (1995).
160. Cheatham, B. *et al.* Insulin-stimulated translocation of GLUT4 glucose transporters requires SNARE-complex proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 15169–15173 (1996).
161. Sylow, L. *et al.* Rac1 signaling is required for insulin-stimulated glucose uptake and is dysregulated in insulin-resistant murine and human skeletal muscle. *Diabetes* **62**, 1865–1875 (2013).
162. Bakke, J., Beltaieb, A., Nagata, N., Matsuo, K. & Haj, F. G. Regulation of the SNARE-interacting protein Munc18c tyrosine phosphorylation in adipocytes by protein-tyrosine phosphatase 1B. *Cell Commun. Signal. CCS* **11**, 57 (2013).
163. Mul, J. D., Stanford, K. I., Hirshman, M. F. & Goodyear, L. J. Exercise and Regulation of Carbohydrate Metabolism. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **135**, 17–37 (2015).
164. Kim, J., Yang, G., Kim, Y., Kim, J. & Ha, J. AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities. *Exp. Mol. Med.* **48**, e224 (2016).
165. Carling, D. The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 18–24 (2004).
166. Foretz, M. *et al.* [Regulation of energy metabolism by AMPK: a novel therapeutic approach for the treatment of metabolic and cardiovascular diseases]. *Med. Sci. MS* **22**, 381–388 (2006).
167. Hardie, D. G., Scott, J. W., Pan, D. A. & Hudson, E. R. Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett.* **546**, 113–120 (2003).
168. Corton, J. M., Gillespie, J. G. & Hardie, D. G. Role of the AMP-activated protein kinase in the cellular stress response. *Curr. Biol. CB* **4**, 315–324 (1994).
169. Hawley, S. A. *et al.* Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **271**, 27879–27887 (1996).
170. Cheung, P. C., Salt, I. P., Davies, S. P., Hardie, D. G. & Carling, D. Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding. *Biochem. J.* **346 Pt 3**, 659–669 (2000).
171. Woods, A. *et al.* Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab.* **2**, 21–33 (2005).
172. Hurley, R. L. *et al.* The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. *J. Biol. Chem.* **280**, 29060–29066 (2005).
173. Hawley, S. A. *et al.* Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab.* **2**, 9–19 (2005).
174. Fryer, L. G. D., Parbu-Patel, A. & Carling, D. The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **277**, 25226–25232 (2002).
175. Hardie, D. G. & Carling, D. The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? *Eur. J. Biochem.* **246**, 259–273 (1997).
176. Leclerc, I., Kahn, A. & Doiron, B. The 5'-AMP-activated protein kinase inhibits the transcriptional stimulation by glucose in liver cells, acting through the glucose response complex. *FEBS Lett.* **431**, 180–184 (1998).
177. Foretz, M., Carling, D., Guichard, C., Ferré, P. & Foufelle, F. AMP-activated protein kinase inhibits the glucose-activated expression of fatty acid synthase gene in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **273**, 14767–14771 (1998).
178. Winder, W. W. *et al.* Activation of AMP-activated protein kinase increases mitochondrial enzymes in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* **1985** **88**, 2219–2226 (2000).

179. Fryer, L. G. D. *et al.* Characterization of the role of the AMP-activated protein kinase in the stimulation of glucose transport in skeletal muscle cells. *Biochem. J.* **363**, 167–174 (2002).
180. Yuan, H.-X., Xiong, Y. & Guan, K.-L. Nutrient sensing, metabolism, and cell growth control. *Mol. Cell* **49**, 379–387 (2013).
181. Hardie, D. G. & Pan, D. A. Regulation of fatty acid synthesis and oxidation by the AMP-activated protein kinase. *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 1064–1070 (2002).
182. Hardie, D. G. Regulation of fatty acid synthesis via phosphorylation of acetyl-CoA carboxylase. *Prog. Lipid Res.* **28**, 117–146 (1989).
183. Minokoshi, Y. *et al.* Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* **415**, 339–343 (2002).
184. Yamauchi, T. *et al.* Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat. Med.* **8**, 1288–1295 (2002).
185. Kudo, N., Barr, A. J., Barr, R. L., Desai, S. & Lopaschuk, G. D. High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase. *J. Biol. Chem.* **270**, 17513–17520 (1995).
186. Iglesias, M. A. *et al.* AICAR administration causes an apparent enhancement of muscle and liver insulin action in insulin-resistant high-fat-fed rats. *Diabetes* **51**, 2886–2894 (2002).
187. Marsin, A. S. *et al.* Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Curr. Biol. CB* **10**, 1247–1255 (2000).
188. Hardie, D. G. AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev.* **25**, 1895–1908 (2011).
189. Jørgensen, S. B. *et al.* The alpha2-5'AMP-activated protein kinase is a site 2 glycogen synthase kinase in skeletal muscle and is responsive to glucose loading. *Diabetes* **53**, 3074–3081 (2004).
190. Gamble, J. & Lopaschuk, G. D. Insulin inhibition of 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase in the heart results in activation of acetyl coenzyme A carboxylase and inhibition of fatty acid oxidation. *Metabolism.* **46**, 1270–1274 (1997).
191. Beauloye, C. *et al.* Insulin antagonizes AMP-activated protein kinase activation by ischemia or anoxia in rat hearts, without affecting total adenine nucleotides. *FEBS Lett.* **505**, 348–352 (2001).
192. Kovacic, S. *et al.* Akt activity negatively regulates phosphorylation of AMP-activated protein kinase in the heart. *J. Biol. Chem.* **278**, 39422–39427 (2003).
193. Rutter, G. A., Da Silva Xavier, G. & Leclerc, I. Roles of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homeostasis. *Biochem. J.* **375**, 1–16 (2003).
194. Viollet, B. *et al.* The AMP-activated protein kinase alpha2 catalytic subunit controls whole-body insulin sensitivity. *J. Clin. Invest.* **111**, 91–98 (2003).
195. Villena, J. A. *et al.* Induced adiposity and adipocyte hypertrophy in mice lacking the AMP-activated protein kinase-alpha2 subunit. *Diabetes* **53**, 2242–2249 (2004).
196. Randle, P. J., Garland, P. B., Hales, C. N. & Newsholme, E. A. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet Lond. Engl.* **1**, 785–789 (1963).
197. Girard, J. [Contribution of free fatty acids to impairment of insulin secretion and action: mechanism of beta-cell lipotoxicity]. *Med. Sci. MS* **19**, 827–833 (2003).
198. Shulman, G. I. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **106**, 171–176 (2000).
199. Griffin, M. E. *et al.* Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* **48**, 1270–1274 (1999).
200. Dresner, A. *et al.* Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J. Clin. Invest.* **103**, 253–259 (1999).
201. Roden, M. *et al.* Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J. Clin. Invest.* **97**, 2859–2865 (1996).
202. Shao, D. & Tian, R. Glucose Transporters in Cardiac Metabolism and Hypertrophy. *Compr. Physiol.* **6**, 331–351 (2015).

203. Russell, R. R., Bergeron, R., Shulman, G. I. & Young, L. H. Translocation of myocardial GLUT-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR. *Am. J. Physiol.* **277**, H643-649 (1999).
204. Sambandam, N. & Lopaschuk, G. D. AMP-activated protein kinase (AMPK) control of fatty acid and glucose metabolism in the ischemic heart. *Prog. Lipid Res.* **42**, 238-256 (2003).
205. Szablewski, L. Glucose transporters in healthy heart and in cardiac disease. *Int. J. Cardiol.* (2016). doi:10.1016/j.ijcard.2016.12.083
206. Boudina, S. & Abel, E. D. Diabetic cardiomyopathy revisited. *Circulation* **115**, 3213-3223 (2007).
207. Sohn, K. *et al.* Absence of glucose transporter 4 diminishes electrical activity of mouse hearts during hypoxia. *Exp. Physiol.* **98**, 746-757 (2013).
208. Vaughan, G. M. *et al.* Cortisol and corticotrophin in burned patients. *J. Trauma* **22**, 263-273 (1982).
209. McGuinness, O. P. *et al.* Role of epinephrine and norepinephrine in the metabolic response to stress hormone infusion in the conscious dog. *Am. J. Physiol.* **273**, E674-681 (1997).
210. Norbury, W. B., Jeschke, M. G. & Herndon, D. N. Metabolism modulators in sepsis: propranolol. *Crit. Care Med.* **35**, S616-620 (2007).
211. Singer, M., De Santis, V., Vitale, D. & Jeffcoate, W. Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation. *Lancet Lond. Engl.* **364**, 545-548 (2004).
212. Geer, E. B., Islam, J. & Buettner, C. Mechanisms of glucocorticoid-induced insulin resistance: focus on adipose tissue function and lipid metabolism. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **43**, 75-102 (2014).
213. Span, L. F. *et al.* Adrenocortical function: an indicator of severity of disease and survival in chronic critically ill patients. *Intensive Care Med.* **18**, 93-96 (1992).
214. Journey, T. H., Cockrell, J. L., Lindberg, J. S., Lamiell, J. M. & Wade, C. E. Spectrum of serum cortisol response to ACTH in ICU patients. Correlation with degree of illness and mortality. *Chest* **92**, 292-295 (1987).
215. Agwunobi, A. O., Reid, C., Maycock, P., Little, R. A. & Carlson, G. L. Insulin resistance and substrate utilization in human endotoxemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**, 3770-3778 (2000).
216. Samuels, A. J. Primary and secondary leucocyte changes following the intramuscular injection of epinephrine hydrochloride. *J. Clin. Invest.* **30**, 941-947 (1951).
217. Harris, T. J., Waltman, T. J., Carter, S. M. & Maisel, A. S. Effect of prolonged catecholamine infusion on immunoregulatory function: implications in congestive heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **26**, 102-109 (1995).
218. Sugita, H. *et al.* Inducible nitric oxide synthase plays a role in LPS-induced hyperglycemia and insulin resistance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **282**, E386-394 (2002).
219. Kyriakis, J. M. & Avruch, J. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. *Physiol. Rev.* **92**, 689-737 (2012).
220. Baud, V. & Karin, M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol.* **11**, 372-377 (2001).
221. Hirosumi, J. *et al.* A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* **420**, 333-336 (2002).
222. del Aguila, L. F., Claffey, K. P. & Kirwan, J. P. TNF-alpha impairs insulin signaling and insulin stimulation of glucose uptake in C2C12 muscle cells. *Am. J. Physiol.* **276**, E849-855 (1999).
223. Nakatani, Y. *et al.* Modulation of the JNK pathway in liver affects insulin resistance status. *J. Biol. Chem.* **279**, 45803-45809 (2004).
224. Deutschman, C. S. & Tracey, K. J. Sepsis: current dogma and new perspectives. *Immunity* **40**, 463-475 (2014).
225. Corbett, J. A., Lancaster, J. R., Sweetland, M. A. & McDaniel, M. L. Interleukin-1 beta-induced formation of EPR-detectable iron-nitrosyl complexes in islets of Langerhans. Role of nitric oxide in interleukin-1 beta-induced inhibition of insulin secretion. *J. Biol. Chem.* **266**, 21351-21354 (1991).

226. Bédard, S., Marcotte, B. & Marette, A. Cytokines modulate glucose transport in skeletal muscle by inducing the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biochem. J.* **325 (Pt 2)**, 487–493 (1997).
227. Prauchner, C. A. Oxidative stress in sepsis: Pathophysiological implications justifying antioxidant co-therapy. *Burns J. Int. Soc. Burn Inj.* (2016). doi:10.1016/j.burns.2016.09.023
228. Evans, J. L., Maddux, B. A. & Goldfine, I. D. The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance. *Antioxid. Redox Signal.* **7**, 1040–1052 (2005).
229. Blair, A. S., Hajduch, E., Litherland, G. J. & Hundal, H. S. Regulation of glucose transport and glycogen synthesis in L6 muscle cells during oxidative stress. Evidence for cross-talk between the insulin and SAPK2/p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **274**, 36293–36299 (1999).
230. Lin, Y. *et al.* The hyperglycemia-induced inflammatory response in adipocytes: the role of reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* **280**, 4617–4626 (2005).
231. Kumashiro, N. *et al.* Impact of oxidative stress and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha in hepatic insulin resistance. *Diabetes* **57**, 2083–2091 (2008).
232. Andrades, M., Ritter, C., Moreira, J. C. F. & Dal-Pizzol, F. Oxidative parameters differences during non-lethal and lethal sepsis development. *J. Surg. Res.* **125**, 68–72 (2005).
233. Khan, M. M., Yang, W.-L. & Wang, P. ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS IN SEPSIS. *Shock Augusta Ga* **44**, 294–304 (2015).
234. Ozcan, U. *et al.* Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* **306**, 457–461 (2004).
235. Winnay, J. N., Boucher, J., Mori, M. A., Ueki, K. & Kahn, C. R. A regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase increases the nuclear accumulation of X-box-binding protein-1 to modulate the unfolded protein response. *Nat. Med.* **16**, 438–445 (2010).
236. Urano, F. *et al.* Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* **287**, 664–666 (2000).
237. Ozawa, K. *et al.* The endoplasmic reticulum chaperone improves insulin resistance in type 2 diabetes. *Diabetes* **54**, 657–663 (2005).
238. Ozcan, U. *et al.* Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* **313**, 1137–1140 (2006).
239. Brownlee, M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* **54**, 1615–1625 (2005).
240. French, S., Giulivi, C. & Balaban, R. S. Nitric oxide synthase in porcine heart mitochondria: evidence for low physiological activity. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **280**, H2863–2867 (2001).
241. Kanai, A. J. *et al.* Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 14126–14131 (2001).
242. Ghafourifar, P. & Richter, C. Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Lett.* **418**, 291–296 (1997).
243. Boczkowski, J. *et al.* Endogenous peroxynitrite mediates mitochondrial dysfunction in rat diaphragm during endotoxemia. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **13**, 1637–1646 (1999).
244. Boveris, A., Alvarez, S. & Navarro, A. The role of mitochondrial nitric oxide synthase in inflammation and septic shock. *Free Radic. Biol. Med.* **33**, 1186–1193 (2002).
245. Brealey, D. *et al.* Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet Lond. Engl.* **360**, 219–223 (2002).
246. Berger, N. A. Poly(ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage. *Radiat. Res.* **101**, 4–15 (1985).
247. Szabó, C., Cuzzocrea, S., Zingarelli, B., O'Connor, M. & Salzman, A. L. Endothelial dysfunction in a rat model of endotoxic shock. Importance of the activation of poly (ADP-ribose) synthetase by peroxynitrite. *J. Clin. Invest.* **100**, 723–735 (1997).
248. Zhang, L. *et al.* Poly (ADP-ribose) synthetase inhibitor has a heart protective effect in a rat model of experimental sepsis. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 9824–9835 (2015).

249. Du, X. *et al.* Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. *J. Clin. Invest.* **112**, 1049–1057 (2003).
250. Xie, L. *et al.* Regulation of Thrombin-Induced Lung Endothelial Cell Barrier Disruption by Protein Kinase C Delta. *PLoS One* **11**, e0158865 (2016).
251. Lopes-Pires, M. E. *et al.* PKC and AKT Modulate cGMP/PKG Signaling Pathway on Platelet Aggregation in Experimental Sepsis. *PLoS One* **10**, e0137901 (2015).
252. Patiag, D., Gray, S., Idris, I. & Donnelly, R. Effects of tumour necrosis factor-alpha and inhibition of protein kinase C on glucose uptake in L6 myoblasts. *Clin. Sci. Lond. Engl.* **1979** **99**, 303–307 (2000).
253. Grewal, A. S., Bhardwaj, S., Pandita, D., Lather, V. & Sekhon, B. S. Updates on Aldose Reductase Inhibitors for Management of Diabetic Complications and Non-diabetic Diseases. *Mini Rev. Med. Chem.* **16**, 120–162 (2016).
254. Ramana, K. V. & Srivastava, S. K. Aldose reductase: a novel therapeutic target for inflammatory pathologies. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**, 17–20 (2010).
255. Ramana, K. V. *et al.* Endotoxin-induced cardiomyopathy and systemic inflammation in mice is prevented by aldose reductase inhibition. *Circulation* **114**, 1838–1846 (2006).
256. Ramana, K. V. *et al.* Aldose reductase mediates the lipopolysaccharide-induced release of inflammatory mediators in RAW264.7 murine macrophages. *J. Biol. Chem.* **281**, 33019–33029 (2006).
257. Pladzyk, A. *et al.* Inhibition of aldose reductase prevents lipopolysaccharide-induced inflammatory response in human lens epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **47**, 5395–5403 (2006).
258. Federici, M. *et al.* Insulin-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase is impaired by O-linked glycosylation modification of signaling proteins in human coronary endothelial cells. *Circulation* **106**, 466–472 (2002).
259. van Zoelen, M. A. D. *et al.* Receptor for advanced glycation end products facilitates host defense during Escherichia coli-induced abdominal sepsis in mice. *J. Infect. Dis.* **200**, 765–773 (2009).
260. Bierhaus, A. *et al.* Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. *Diabetes* **50**, 2792–2808 (2001).
261. Degryse, B. *et al.* The high mobility group (HMG) boxes of the nuclear protein HMG1 induce chemotaxis and cytoskeleton reorganization in rat smooth muscle cells. *J. Cell Biol.* **152**, 1197–1206 (2001).
262. Lutterloh, E. C. *et al.* Inhibition of the RAGE products increases survival in experimental models of severe sepsis and systemic infection. *Crit. Care Lond. Engl.* **11**, R122 (2007).
263. Siriopol, D. *et al.* Tissue advanced glycation end products (AGEs), measured by skin autofluorescence, predict mortality in peritoneal dialysis. *Int. Urol. Nephrol.* **47**, 563–569 (2015).
264. Lutterloh, E. C. & Opal, S. M. Antibodies against RAGE in sepsis and inflammation: implications for therapy. *Expert Opin. Pharmacother.* **8**, 1193–1196 (2007).
265. Bopp, C. *et al.* sRAGE is elevated in septic patients and associated with patients outcome. *J. Surg. Res.* **147**, 79–83 (2008).
266. Mangmool, S., Denkaew, T., Parichatikanond, W. & Kurose, H. β -Adrenergic Receptor and Insulin Resistance in the Heart. *Biomol. Ther.* **25**, 44–56 (2017).
267. Orban, J.-C., Deroche, D. & Ichai, C. [Septic shock: blood glucose regulation]. *Ann. Fr. Anesth. Reanim.* **25**, 275–279 (2006).
268. Zeng, G. & Quon, M. J. Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin. Direct measurement in vascular endothelial cells. *J. Clin. Invest.* **98**, 894–898 (1996).
269. Steinberg, H. O., Brechtel, G., Johnson, A., Fineberg, N. & Baron, A. D. Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent. A novel action of insulin to increase nitric oxide release. *J. Clin. Invest.* **94**, 1172–1179 (1994).
270. Jiang, Z. Y. *et al.* Characterization of selective resistance to insulin signaling in the vasculature of obese Zucker (fa/fa) rats. *J. Clin. Invest.* **104**, 447–457 (1999).

271. Rask-Madsen, C. & Kahn, C. R. Tissue-specific insulin signaling, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 2052–2059 (2012).
272. Rask-Madsen, C. *et al.* Loss of insulin signaling in vascular endothelial cells accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E null mice. *Cell Metab.* **11**, 379–389 (2010).
273. Mazumder, P. K. *et al.* Impaired cardiac efficiency and increased fatty acid oxidation in insulin-resistant ob/ob mouse hearts. *Diabetes* **53**, 2366–2374 (2004).
274. Park, S.-Y. *et al.* Cardiac-specific overexpression of peroxisome proliferator-activated receptor- α causes insulin resistance in heart and liver. *Diabetes* **54**, 2514–2524 (2005).
275. Park, S.-Y. *et al.* Unraveling the temporal pattern of diet-induced insulin resistance in individual organs and cardiac dysfunction in C57BL/6 mice. *Diabetes* **54**, 3530–3540 (2005).
276. Way, K. J. *et al.* Expression of connective tissue growth factor is increased in injured myocardium associated with protein kinase C β 2 activation and diabetes. *Diabetes* **51**, 2709–2718 (2002).
277. Rivers, E. *et al.* Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N. Engl. J. Med.* **345**, 1368–1377 (2001).
278. Rhodes, A. & Bennett, E. D. Early goal-directed therapy: an evidence-based review. *Crit. Care Med.* **32**, S448–450 (2004).
279. Mouncey, P. R. *et al.* Trial of early, goal-directed resuscitation for septic shock. *N. Engl. J. Med.* **372**, 1301–1311 (2015).
280. ProCESS Investigators *et al.* A randomized trial of protocol-based care for early septic shock. *N. Engl. J. Med.* **370**, 1683–1693 (2014).
281. ARISE Investigators *et al.* Goal-directed resuscitation for patients with early septic shock. *N. Engl. J. Med.* **371**, 1496–1506 (2014).
282. Kirkland, T. N. & Ziegler, E. J. An immunoprotective monoclonal antibody to lipopolysaccharide. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **132**, 2590–2592 (1984).
283. Ziegler, E. J. *et al.* Treatment of gram-negative bacteremia and septic shock with HA-1A human monoclonal antibody against endotoxin. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The HA-1A Sepsis Study Group. *N. Engl. J. Med.* **324**, 429–436 (1991).
284. McCloskey, R. V., Straube, R. C., Sanders, C., Smith, S. M. & Smith, C. R. Treatment of septic shock with human monoclonal antibody HA-1A. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. CHESS Trial Study Group. *Ann. Intern. Med.* **121**, 1–5 (1994).
285. Fisher, C. J. *et al.* Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group. *N. Engl. J. Med.* **334**, 1697–1702 (1996).
286. Abraham, E., Jesmok, G., Tuder, R., Allbee, J. & Chang, Y. H. Contribution of tumor necrosis factor- α to pulmonary cytokine expression and lung injury after hemorrhage and resuscitation. *Crit. Care Med.* **23**, 1319–1326 (1995).
287. Fisher, C. J. *et al.* Recombinant human interleukin 1 receptor antagonist in the treatment of patients with sepsis syndrome. Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Phase III rhIL-1ra Sepsis Syndrome Study Group. *JAMA* **271**, 1836–1843 (1994).
288. Delano, M. J. *et al.* MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *J. Exp. Med.* **204**, 1463–1474 (2007).
289. Fink, M. P. Animal models of sepsis. *Virulence* **5**, 143–153 (2014).
290. Dhainaut, J. F. *et al.* Confirmatory platelet-activating factor receptor antagonist trial in patients with severe gram-negative bacterial sepsis: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. BN 52021 Sepsis Investigator Group. *Crit. Care Med.* **26**, 1963–1971 (1998).
291. Vincent, J. L., Spapen, H., Bakker, J., Webster, N. R. & Curtis, L. Phase II multicenter clinical study of the platelet-activating factor receptor antagonist BB-882 in the treatment of sepsis. *Crit. Care Med.* **28**, 638–642 (2000).
292. Opal, S. M. *et al.* Effect of eritoran, an antagonist of MD2-TLR4, on mortality in patients with severe sepsis: the ACCESS randomized trial. *JAMA* **309**, 1154–1162 (2013).

293. Abraham, E. *et al.* Efficacy and safety of tifacogin (recombinant tissue factor pathway inhibitor) in severe sepsis: a randomized controlled trial. *JAMA* **290**, 238–247 (2003).
294. Wunderink, R. G. *et al.* Recombinant tissue factor pathway inhibitor in severe community-acquired pneumonia: a randomized trial. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **183**, 1561–1568 (2011).
295. Warren, B. L. *et al.* Caring for the critically ill patient. High-dose antithrombin III in severe sepsis: a randomized controlled trial. *JAMA* **286**, 1869–1878 (2001).
296. Bakker, J. *et al.* Administration of the nitric oxide synthase inhibitor NG-methyl-L-arginine hydrochloride (546C88) by intravenous infusion for up to 72 hours can promote the resolution of shock in patients with severe sepsis: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter study (study no. 144-002). *Crit. Care Med.* **32**, 1–12 (2004).
297. Jaimes, F. *et al.* Unfractionated heparin for treatment of sepsis: A randomized clinical trial (The HETRASE Study). *Crit. Care Med.* **37**, 1185–1196 (2009).
298. Ranieri, V. M. *et al.* Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock. *N. Engl. J. Med.* **366**, 2055–2064 (2012).
299. Seeley, E. J. & Bernard, G. R. Therapeutic Targets in Sepsis: Past, Present, and Future. *Clin. Chest Med.* **37**, 181–189 (2016).
300. Goldenberg, N. M., Steinberg, B. E., Slutsky, A. S. & Lee, W. L. Broken barriers: a new take on sepsis pathogenesis. *Sci. Transl. Med.* **3**, 88ps25 (2011).
301. Song, J. W. *et al.* Therapeutic Restoration of Endothelial Glycocalyx in Sepsis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2017). doi:10.1124/jpet.116.239509
302. Yang, Y. *et al.* Fibroblast Growth Factor Signaling Mediates Pulmonary Endothelial Glycocalyx Reconstitution. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* (2017). doi:10.1165/rcmb.2016-0338OC
303. Xu, J. *et al.* Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat. Med.* **15**, 1318–1321 (2009).
304. Remick, D. G., Newcomb, D. E., Bolgos, G. L. & Call, D. R. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. *Shock Augusta Ga* **13**, 110–116 (2000).
305. Starr, M. E. & Saito, H. Sepsis in old age: review of human and animal studies. *Aging Dis.* **5**, 126–136 (2014).
306. Malmberg, K. Prospective randomised study of intensive insulin treatment on long term survival after acute myocardial infarction in patients with diabetes mellitus. DIGAMI (Diabetes Mellitus, Insulin Glucose Infusion in Acute Myocardial Infarction) Study Group. *BMJ* **314**, 1512–1515 (1997).
307. Zerr, K. J. *et al.* Glucose control lowers the risk of wound infection in diabetics after open heart operations. *Ann. Thorac. Surg.* **63**, 356–361 (1997).
308. van den Berghe, G. *et al.* Intensive insulin therapy in critically ill patients. *N. Engl. J. Med.* **345**, 1359–1367 (2001).
309. Krinsley, J. S. Effect of an intensive glucose management protocol on the mortality of critically ill adult patients. *Mayo Clin. Proc.* **79**, 992–1000 (2004).
310. Krinsley, J. S. Glycemic control, diabetic status, and mortality in a heterogeneous population of critically ill patients before and during the era of intensive glycemic management: six and one-half years experience at a university-affiliated community hospital. *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **18**, 317–325 (2006).
311. Cariou, A., Vinsonneau, C. & Dhainaut, J.-F. Adjunctive therapies in sepsis: an evidence-based review. *Crit. Care Med.* **32**, S562-570 (2004).
312. Jeschke, M. G., Klein, D. & Herndon, D. N. Insulin treatment improves the systemic inflammatory reaction to severe trauma. *Ann. Surg.* **239**, 553–560 (2004).
313. Shapiro, N. I. *et al.* Implementation and outcomes of the Multiple Urgent Sepsis Therapies (MUST) protocol. *Crit. Care Med.* **34**, 1025–1032 (2006).
314. Clayton, S. B., Mazur, J. E., Condren, S., Hermayer, K. L. & Strange, C. Evaluation of an intensive insulin protocol for septic patients in a medical intensive care unit. *Crit. Care Med.* **34**, 2974–2978 (2006).

315. Van den Berghe, G. *et al.* Intensive insulin therapy in the medical ICU. *N. Engl. J. Med.* **354**, 449–461 (2006).
316. Arabi, Y. M. *et al.* Intensive versus conventional insulin therapy: a randomized controlled trial in medical and surgical critically ill patients. *Crit. Care Med.* **36**, 3190–3197 (2008).
317. Lacherade, J.-C., Jacqueminet, S. & Preiser, J.-C. An overview of hypoglycemia in the critically ill. *J. Diabetes Sci. Technol.* **3**, 1242–1249 (2009).
318. Ali, N. A. *et al.* Glucose variability and mortality in patients with sepsis. *Crit. Care Med.* **36**, 2316–2321 (2008).
319. Krinsley, J. S. Glycemic variability: a strong independent predictor of mortality in critically ill patients. *Crit. Care Med.* **36**, 3008–3013 (2008).
320. Egi, M., Bellomo, R., Stachowski, E., French, C. J. & Hart, G. Variability of blood glucose concentration and short-term mortality in critically ill patients. *Anesthesiology* **105**, 244–252 (2006).
321. Dellinger, R. P. *et al.* Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit. Care Med.* **36**, 296–327 (2008).
322. Dellinger, R. P. *et al.* Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive Care Med.* **39**, 165–228 (2013).
323. Rhodes, A. *et al.* Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Med.* (2017). doi:10.1007/s00134-017-4683-6
324. Alonso, A. & Pulido, R. The extended human PTPome: a growing tyrosine phosphatase family. *FEBS J.* **283**, 1404–1429 (2016).
325. Alonso, A. *et al.* Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* **117**, 699–711 (2004).
326. Rayapureddi, J. P. *et al.* Eyes absent represents a class of protein tyrosine phosphatases. *Nature* **426**, 295–298 (2003).
327. Andersen, J. N. *et al.* A genomic perspective on protein tyrosine phosphatases: gene structure, pseudogenes, and genetic disease linkage. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **18**, 8–30 (2004).
328. Pavic, K., Duan, G. & Köhn, M. VHR/DUSP3 phosphatase: structure, function and regulation. *FEBS J.* **282**, 1871–1890 (2015).
329. Denu, J. M. & Dixon, J. E. Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**, 633–641 (1998).
330. Barford, D., Das, A. K. & Egloff, M. P. The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27**, 133–164 (1998).
331. Tonks, N. K., Diltz, C. D. & Fischer, E. H. Purification of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta. *J. Biol. Chem.* **263**, 6722–6730 (1988).
332. Charbonneau, H., Tonks, N. K., Walsh, K. A. & Fischer, E. H. The leukocyte common antigen (CD45): a putative receptor-linked protein tyrosine phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 7182–7186 (1988).
333. Tonks, N. K., Charbonneau, H., Diltz, C. D., Fischer, E. H. & Walsh, K. A. Demonstration that the leukocyte common antigen CD45 is a protein tyrosine phosphatase. *Biochemistry (Mosc.)* **27**, 8695–8701 (1988).
334. den Hertog, J. Protein-tyrosine phosphatases in development. *Mech. Dev.* **85**, 3–14 (1999).
335. Stoker, A. & Dutta, R. Protein tyrosine phosphatases and neural development. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **20**, 463–472 (1998).
336. Goldstein, B. J. Protein-tyrosine phosphatases and the regulation of insulin action. *J. Cell. Biochem.* **48**, 33–42 (1992).
337. Dalamaga, M. *et al.* Leptin at the intersection of neuroendocrinology and metabolism: current evidence and therapeutic perspectives. *Cell Metab.* **18**, 29–42 (2013).
338. Hendriks, W. J. A. J. *et al.* Protein tyrosine phosphatases in health and disease. *FEBS J.* **280**, 708–730 (2013).
339. Scharl, M. *et al.* Protein tyrosine phosphatase N2 regulates TNF α -induced signalling and cytokine secretion in human intestinal epithelial cells. *Gut* **60**, 189–197 (2011).

340. Au, A. C. *et al.* Protein tyrosine phosphatase PTPN14 is a regulator of lymphatic function and choanal development in humans. *Am. J. Hum. Genet.* **87**, 436–444 (2010).
341. Wang, Z. *et al.* Mutational analysis of the tyrosine phosphatome in colorectal cancers. *Science* **304**, 1164–1166 (2004).
342. Chernoff, J., Schievella, A. R., Jost, C. A., Erikson, R. L. & Neel, B. G. Cloning of a cDNA for a major human protein-tyrosine-phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 2735–2739 (1990).
343. Bourdeau, A., Dubé, N. & Tremblay, M. L. Cytoplasmic protein tyrosine phosphatases, regulation and function: the roles of PTP1B and TC-PTP. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**, 203–209 (2005).
344. Yip, S.-C., Saha, S. & Chernoff, J. PTP1B: a double agent in metabolism and oncogenesis. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 442–449 (2010).
345. Tonks, N. K. PTP1B: from the sidelines to the front lines! *FEBS Lett.* **546**, 140–148 (2003).
346. Kamerlin, S. C. L., Rucker, R. & Boresch, S. A molecular dynamics study of WPD-loop flexibility in PTP1B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **356**, 1011–1016 (2007).
347. Brandão, T. A. S., Johnson, S. J. & Hengge, A. C. The molecular details of WPD-loop movement differ in the protein-tyrosine phosphatases YopH and PTP1B. *Arch. Biochem. Biophys.* **525**, 53–59 (2012).
348. Kim, S. J. & Ryu, S. E. Structure and catalytic mechanism of human protein tyrosine phosphatome. *BMB Rep.* **45**, 693–699 (2012).
349. Frangioni, J. V., Beahm, P. H., Shifrin, V., Jost, C. A. & Neel, B. G. The nontransmembrane tyrosine phosphatase PTP-1B localizes to the endoplasmic reticulum via its 35 amino acid C-terminal sequence. *Cell* **68**, 545–560 (1992).
350. Brown-Shimer, S. *et al.* Molecular cloning and chromosome mapping of the human gene encoding protein phosphotyrosyl phosphatase 1B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 5148–5152 (1990).
351. Fukada, T. & Tonks, N. K. The reciprocal role of Egr-1 and Sp family proteins in regulation of the PTP1B promoter in response to the p210 Bcr-Abl oncoprotein-tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* **276**, 25512–25519 (2001).
352. Fukada, T. & Tonks, N. K. Identification of YB-1 as a regulator of PTP1B expression: implications for regulation of insulin and cytokine signaling. *EMBO J.* **22**, 479–493 (2003).
353. Zabolotny, J. M. *et al.* Protein-tyrosine phosphatase 1B expression is induced by inflammation in vivo. *J. Biol. Chem.* **283**, 14230–14241 (2008).
354. Hu, S. *et al.* MicroRNA-210 as a novel therapy for treatment of ischemic heart disease. *Circulation* **122**, S124–131 (2010).
355. Yang, Y. M., Seo, S. Y., Kim, T. H. & Kim, S. G. Decrease of microRNA-122 causes hepatic insulin resistance by inducing protein tyrosine phosphatase 1B, which is reversed by licorice flavonoid. *Hepatol. Baltim. Md* **56**, 2209–2220 (2012).
356. Inada, S. *et al.* Glucose enhances protein tyrosine phosphatase 1B gene transcription in hepatocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* **271**, 64–70 (2007).
357. Ide, R., Maegawa, H., Kikkawa, R., Shigeta, Y. & Kashiwagi, A. High glucose condition activates protein tyrosine phosphatases and deactivates insulin receptor function in insulin-sensitive rat 1 fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **201**, 71–77 (1994).
358. Baker, B. F. & Monia, B. P. Novel mechanisms for antisense-mediated regulation of gene expression. *Biochim. Biophys. Acta* **1489**, 3–18 (1999).
359. Zinker, B. A. *et al.* PTP1B antisense oligonucleotide lowers PTP1B protein, normalizes blood glucose, and improves insulin sensitivity in diabetic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 11357–11362 (2002).
360. Zhang, Z.-Y. Protein tyrosine phosphatases: structure and function, substrate specificity, and inhibitor development. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **42**, 209–234 (2002).
361. Lee, S. R., Kwon, K. S., Kim, S. R. & Rhee, S. G. Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* **273**, 15366–15372 (1998).

362. van Montfort, R. L. M., Congreve, M., Tisi, D., Carr, R. & Jhoti, H. Oxidation state of the active-site cysteine in protein tyrosine phosphatase 1B. *Nature* **423**, 773–777 (2003).
363. Salmeen, A. *et al.* Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenylamide intermediate. *Nature* **423**, 769–773 (2003).
364. Flint, A. J., Gebbink, M. F., Franza, B. R., Hill, D. E. & Tonks, N. K. Multi-site phosphorylation of the protein tyrosine phosphatase, PTP1B: identification of cell cycle regulated and phorbol ester stimulated sites of phosphorylation. *EMBO J.* **12**, 1937–1946 (1993).
365. Ravichandran, L. V., Chen, H., Li, Y. & Quon, M. J. Phosphorylation of PTP1B at Ser(50) by Akt impairs its ability to dephosphorylate the insulin receptor. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **15**, 1768–1780 (2001).
366. Bandyopadhyay, D. *et al.* Protein-tyrosine phosphatase 1B complexes with the insulin receptor in vivo and is tyrosine-phosphorylated in the presence of insulin. *J. Biol. Chem.* **272**, 1639–1645 (1997).
367. Hay, R. T. SUMO: a history of modification. *Mol. Cell* **18**, 1–12 (2005).
368. Dadke, S. *et al.* Regulation of protein tyrosine phosphatase 1B by sumoylation. *Nat. Cell Biol.* **9**, 80–85 (2007).
369. Frangioni, J. V., Oda, A., Smith, M., Salzman, E. W. & Neel, B. G. Calpain-catalyzed cleavage and subcellular relocation of protein phosphotyrosine phosphatase 1B (PTP-1B) in human platelets. *EMBO J.* **12**, 4843–4856 (1993).
370. Azam, M. *et al.* Disruption of the mouse mu-calpain gene reveals an essential role in platelet function. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 2213–2220 (2001).
371. Kuchay, S. M., Kim, N., Grunz, E. A., Fay, W. P. & Chishti, A. H. Double knockouts reveal that protein tyrosine phosphatase 1B is a physiological target of calpain-1 in platelets. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 6038–6052 (2007).
372. Tiganis, T., Bennett, A. M., Ravichandran, K. S. & Tonks, N. K. Epidermal growth factor receptor and the adaptor protein p52Shc are specific substrates of T-cell protein tyrosine phosphatase. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 1622–1634 (1998).
373. Liu, F. & Chernoff, J. Protein tyrosine phosphatase 1B interacts with and is tyrosine phosphorylated by the epidermal growth factor receptor. *Biochem. J.* **327 (Pt 1)**, 139–145 (1997).
374. Haj, F. G., Markova, B., Klamann, L. D., Bohmer, F. D. & Neel, B. G. Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatase-1B. *J. Biol. Chem.* **278**, 739–744 (2003).
375. Valentino, L. & Pierre, J. JAK/STAT signal transduction: regulators and implication in hematological malignancies. *Biochem. Pharmacol.* **71**, 713–721 (2006).
376. Myers, M. P. *et al.* TYK2 and JAK2 are substrates of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J. Biol. Chem.* **276**, 47771–47774 (2001).
377. Gu, F. *et al.* Protein-tyrosine phosphatase 1B potentiates IRE1 signaling during endoplasmic reticulum stress. *J. Biol. Chem.* **279**, 49689–49693 (2004).
378. Agouni, A. *et al.* Liver-specific deletion of protein tyrosine phosphatase (PTP) 1B improves obesity- and pharmacologically induced endoplasmic reticulum stress. *Biochem. J.* **438**, 369–378 (2011).
379. Delibegovic, M. *et al.* Liver-specific deletion of protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) improves metabolic syndrome and attenuates diet-induced endoplasmic reticulum stress. *Diabetes* **58**, 590–599 (2009).
380. Krishnan, N., Fu, C., Pappin, D. J. & Tonks, N. K. H₂S-Induced sulfhydration of the phosphatase PTP1B and its role in the endoplasmic reticulum stress response. *Sci. Signal.* **4**, ra86 (2011).
381. Tartaglia, L. A. The leptin receptor. *J. Biol. Chem.* **272**, 6093–6096 (1997).
382. Park, H.-K. & Ahima, R. S. Leptin signaling. *F1000prime Rep.* **6**, 73 (2014).
383. Tsou, R. C., Rak, K. S., Zimmer, D. J. & Bence, K. K. Improved metabolic phenotype of hypothalamic PTP1B-deficiency is dependent upon the leptin receptor. *Mol. Metab.* **3**, 301–312 (2014).

384. Tsou, R. C., Zimmer, D. J., De Jonghe, B. C. & Bence, K. K. Deficiency of PTP1B in leptin receptor-expressing neurons leads to decreased body weight and adiposity in mice. *Endocrinology* **153**, 4227–4237 (2012).
385. Bence, K. K. *et al.* Neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity and leptin action. *Nat. Med.* **12**, 917–924 (2006).
386. Zabolotny, J. M. *et al.* PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo. *Dev. Cell* **2**, 489–495 (2002).
387. Cheng, A. *et al.* Attenuation of leptin action and regulation of obesity by protein tyrosine phosphatase 1B. *Dev. Cell* **2**, 497–503 (2002).
388. Koren, S. & Fantus, I. G. Inhibition of the protein tyrosine phosphatase PTP1B: potential therapy for obesity, insulin resistance and type-2 diabetes mellitus. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **21**, 621–640 (2007).
389. Venable, C. L. *et al.* Overexpression of protein-tyrosine phosphatase-1B in adipocytes inhibits insulin-stimulated phosphoinositide 3-kinase activity without altering glucose transport or Akt/Protein kinase B activation. *J. Biol. Chem.* **275**, 18318–18326 (2000).
390. Egawa, K. *et al.* Protein-tyrosine phosphatase-1B negatively regulates insulin signaling in I6 myocytes and Fao hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 10207–10211 (2001).
391. Chen, H. *et al.* Protein-tyrosine phosphatases PTP1B and syp are modulators of insulin-stimulated translocation of GLUT4 in transfected rat adipose cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 8026–8031 (1997).
392. Mahadev, K., Zilbering, A., Zhu, L. & Goldstein, B. J. Insulin-stimulated hydrogen peroxide reversibly inhibits protein-tyrosine phosphatase 1b in vivo and enhances the early insulin action cascade. *J. Biol. Chem.* **276**, 21938–21942 (2001).
393. Florez, J. C., Hirschhorn, J. & Altshuler, D. The inherited basis of diabetes mellitus: implications for the genetic analysis of complex traits. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **4**, 257–291 (2003).
394. Echwald, S. M. *et al.* A P387L variant in protein tyrosine phosphatase-1B (PTP-1B) is associated with type 2 diabetes and impaired serine phosphorylation of PTP-1B in vitro. *Diabetes* **51**, 1–6 (2002).
395. Di Paola, R. *et al.* A variation in 3' UTR of hPTP1B increases specific gene expression and associates with insulin resistance. *Am. J. Hum. Genet.* **70**, 806–812 (2002).
396. Cheyssac, C. *et al.* Analysis of common PTPN1 gene variants in type 2 diabetes, obesity and associated phenotypes in the French population. *BMC Med. Genet.* **7**, 44 (2006).
397. Bento, J. L. *et al.* Association of protein tyrosine phosphatase 1B gene polymorphisms with type 2 diabetes. *Diabetes* **53**, 3007–3012 (2004).
398. Feldhammer, M., Uetani, N., Miranda-Saavedra, D. & Tremblay, M. L. PTP1B: a simple enzyme for a complex world. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **48**, 430–445 (2013).
399. Gomez, E. *et al.* Reduction of heart failure by pharmacological inhibition or gene deletion of protein tyrosine phosphatase 1B. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **52**, 1257–1264 (2012).
400. Nakamura, Y. *et al.* Role of protein tyrosine phosphatase 1B in vascular endothelial growth factor signaling and cell-cell adhesions in endothelial cells. *Circ. Res.* **102**, 1182–1191 (2008).
401. Besnier, M. *et al.* Enhanced angiogenesis and increased cardiac perfusion after myocardial infarction in protein tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **28**, 3351–3361 (2014).
402. Kubo, S. H., Rector, T. S., Bank, A. J., Williams, R. E. & Heifetz, S. M. Endothelium-dependent vasodilation is attenuated in patients with heart failure. *Circulation* **84**, 1589–1596 (1991).
403. Varin, R. *et al.* Exercise improves flow-mediated vasodilatation of skeletal muscle arteries in rats with chronic heart failure. Role of nitric oxide, prostanoids, and oxidant stress. *Circulation* **99**, 2951–2957 (1999).
404. Maupoint, J. *et al.* Selective Vascular Endothelial Protection Reduces Cardiac Dysfunction in Chronic Heart Failure. *Circ. Heart Fail.* **9**, e002895 (2016).
405. Lessard, L., Stuble, M. & Tremblay, M. L. The two faces of PTP1B in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1804**, 613–619 (2010).

406. Brown-Shimer, S., Johnson, K. A., Hill, D. E. & Bruskin, A. M. Effect of protein tyrosine phosphatase 1B expression on transformation by the human neu oncogene. *Cancer Res.* **52**, 478–482 (1992).
407. Woodford-Thomas, T. A., Rhodes, J. D. & Dixon, J. E. Expression of a protein tyrosine phosphatase in normal and v-src-transformed mouse 3T3 fibroblasts. *J. Cell Biol.* **117**, 401–414 (1992).
408. Zheng, L.-Y., Zhou, D.-X., Lu, J., Zhang, W.-J. & Zou, D.-J. Down-regulated expression of the protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) is associated with aggressive clinicopathologic features and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **420**, 680–684 (2012).
409. Wiener, J. R. *et al.* Overexpression of the protein tyrosine phosphatase PTP1B in human breast cancer: association with p185c-erbB-2 protein expression. *J. Natl. Cancer Inst.* **86**, 372–378 (1994).
410. Julien, S. G. *et al.* Protein tyrosine phosphatase 1B deficiency or inhibition delays ErbB2-induced mammary tumorigenesis and protects from lung metastasis. *Nat. Genet.* **39**, 338–346 (2007).
411. Lessard, L. *et al.* PTP1B is an androgen receptor-regulated phosphatase that promotes the progression of prostate cancer. *Cancer Res.* **72**, 1529–1537 (2012).
412. Dubé, N. *et al.* Genetic ablation of protein tyrosine phosphatase 1B accelerates lymphomagenesis of p53-null mice through the regulation of B-cell development. *Cancer Res.* **65**, 10088–10095 (2005).
413. Fang, C. X., Doser, T. A., Yang, X., Sreejayan, N. & Ren, J. Metallothionein antagonizes aging-induced cardiac contractile dysfunction: role of PTP1B, insulin receptor tyrosine phosphorylation and Akt. *Aging Cell* **5**, 177–185 (2006).
414. González-Rodríguez, A. *et al.* Essential role of protein tyrosine phosphatase 1B in obesity-induced inflammation and peripheral insulin resistance during aging. *Aging Cell* **11**, 284–296 (2012).
415. Lyu, J. *et al.* Sepsis-induced brain mitochondrial dysfunction is associated with altered mitochondrial Src and PTP1B levels. *Brain Res.* **1620**, 130–138 (2015).
416. Grant, L. *et al.* Myeloid-cell protein tyrosine phosphatase-1B deficiency in mice protects against high-fat diet and lipopolysaccharide-induced inflammation, hyperinsulinemia, and endotoxemia through an IL-10 STAT3-dependent mechanism. *Diabetes* **63**, 456–470 (2014).
417. Grinnell, K. L., Chichger, H., Braza, J., Duong, H. & Harrington, E. O. Protection against LPS-induced pulmonary edema through the attenuation of protein tyrosine phosphatase-1B oxidation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **46**, 623–632 (2012).
418. Xu, H. *et al.* Phosphatase PTP1B negatively regulates MyD88- and TRIF-dependent proinflammatory cytokine and type I interferon production in TLR-triggered macrophages. *Mol. Immunol.* **45**, 3545–3552 (2008).
419. Thiebaut, P.-A., Besnier, M., Gomez, E. & Richard, V. Role of protein tyrosine phosphatase 1B in cardiovascular diseases. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **101**, 50–57 (2016).
420. Cho, H. Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) and obesity. *Vitam. Horm.* **91**, 405–424 (2013).
421. Elchebly, M. *et al.* Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* **283**, 1544–1548 (1999).
422. Klamon, L. D. *et al.* Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 5479–5489 (2000).
423. Herren, D. J. *et al.* Deletion of Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) Enhances Endothelial Cyclooxygenase 2 Expression and Protects Mice from Type 1 Diabetes-Induced Endothelial Dysfunction. *PLoS One* **10**, e0126866 (2015).
424. Owen, C. *et al.* Adipocyte-specific protein tyrosine phosphatase 1B deletion increases lipogenesis, adipocyte cell size and is a minor regulator of glucose homeostasis. *PLoS One* **7**, e32700 (2012).

425. Delibegovic, M. *et al.* Improved glucose homeostasis in mice with muscle-specific deletion of protein-tyrosine phosphatase 1B. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 7727–7734 (2007).
426. Banno, R. *et al.* PTP1B and SHP2 in POMC neurons reciprocally regulate energy balance in mice. *J. Clin. Invest.* **120**, 720–734 (2010).
427. He, R., Zeng, L.-F., He, Y., Zhang, S. & Zhang, Z.-Y. Small molecule tools for functional interrogation of protein tyrosine phosphatases. *FEBS J.* **280**, 731–750 (2013).
428. Lau, K. H., Farley, J. R. & Baylink, D. J. Phosphotyrosyl protein phosphatases. *Biochem. J.* **257**, 23–36 (1989).
429. Brautigan, D. L., Bornstein, P. & Gallis, B. Phosphotyrosyl-protein phosphatase. Specific inhibition by Zn. *J. Biol. Chem.* **256**, 6519–6522 (1981).
430. Swarup, G., Cohen, S. & Garbers, D. L. Inhibition of membrane phosphotyrosyl-protein phosphatase activity by vanadate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **107**, 1104–1109 (1982).
431. Tonks, N. K., Diltz, C. D. & Fischer, E. H. Characterization of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta. *J. Biol. Chem.* **263**, 6731–6737 (1988).
432. Vercauteren, M. *et al.* Improvement of peripheral endothelial dysfunction by protein tyrosine phosphatase inhibitors in heart failure. *Circulation* **114**, 2498–2507 (2006).
433. Wiesmann, C. *et al.* Allosteric inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 730–737 (2004).
434. Krishnan, N. *et al.* Targeting the disordered C terminus of PTP1B with an allosteric inhibitor. *Nat. Chem. Biol.* **10**, 558–566 (2014).
435. Lantz, K. A. *et al.* Inhibition of PTP1B by trodusquemine (MSI-1436) causes fat-specific weight loss in diet-induced obese mice. *Obes. Silver Spring Md* **18**, 1516–1523 (2010).
436. Shimoda, M. *et al.* Conditional ablation of MHC-II suggests an indirect role for MHC-II in regulatory CD4 T cell maintenance. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **176**, 6503–6511 (2006).
437. Toutain, C. E. *et al.* Estrogen receptor alpha expression in both endothelium and hematopoietic cells is required for the accelerative effect of estradiol on reendothelialization. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 1543–1550 (2009).
438. Dejager, L., Pinheiro, I., Dejonckheere, E. & Libert, C. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? *Trends Microbiol.* **19**, 198–208 (2011).
439. Brooks, H. F., Osabutey, C. K., Moss, R. F., Andrews, P. L. R. & Davies, D. C. Caecal ligation and puncture in the rat mimics the pathophysiological changes in human sepsis and causes multi-organ dysfunction. *Metab. Brain Dis.* **22**, 353–373 (2007).
440. Do, H. J., Jin, T., Chung, J. H., Hwang, J. W. & Shin, M.-J. Voglibose administration regulates body weight and energy intake in high fat-induced obese mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **443**, 1110–1117 (2014).
441. Fuller, W., Eaton, P., Medina, R. A., Bell, J. & Shattock, M. J. Differential centrifugation separates cardiac sarcolemmal and endosomal membranes from Langendorff-perfused rat hearts. *Anal. Biochem.* **293**, 216–223 (2001).
442. Heather, L. C. *et al.* Differential translocation of the fatty acid transporter, FAT/CD36, and the glucose transporter, GLUT4, coordinates changes in cardiac substrate metabolism during ischemia and reperfusion. *Circ. Heart Fail.* **6**, 1058–1066 (2013).
443. Hagiwara, S., Iwasaka, H., Hasegawa, A., Asai, N. & Noguchi, T. Hyperglycemia contributes to cardiac dysfunction in a lipopolysaccharide-induced systemic inflammation model. *Crit. Care Med.* **37**, 2223–2227 (2009).
444. Delile, E. *et al.* Reduced Insulin Resistance Contributes to the Beneficial Effect of Protein Tyrosine Phosphatase-1B Deletion in a Mouse Model of Sepsis. *Shock Augusta Ga* (2017). doi:10.1097/SHK.0000000000000853
445. Haden, D. W. *et al.* Mitochondrial biogenesis restores oxidative metabolism during *Staphylococcus aureus* sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **176**, 768–777 (2007).
446. Singer, P. & Singer, J. La calorimétrie indirecte : un outil précis trop peu utilisé. *Réanimation* **21**, 406–410 (2012).

447. Wang, A. *et al.* Opposing Effects of Fasting Metabolism on Tissue Tolerance in Bacterial and Viral Inflammation. *Cell* **166**, 1512–1525.e12 (2016).
448. Richter, E. A. & Hargreaves, M. Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake. *Physiol. Rev.* **93**, 993–1017 (2013).
449. Sriwijitkamol, A. *et al.* Effect of acute exercise on AMPK signaling in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes: a time-course and dose-response study. *Diabetes* **56**, 836–848 (2007).
450. Kandadi, M. R. *et al.* Deletion of protein tyrosine phosphatase 1B rescues against myocardial anomalies in high fat diet-induced obesity: Role of AMPK-dependent autophagy. *Biochim. Biophys. Acta* **1852**, 299–309 (2015).
451. Salminen, A., Hyttinen, J. M. T. & Kaarniranta, K. AMP-activated protein kinase inhibits NF- κ B signaling and inflammation: impact on healthspan and lifespan. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* **89**, 667–676 (2011).
452. Schrauwen, P., Timmers, S. & Hesselink, M. K. C. Blocking the entrance to open the gate. *Diabetes* **62**, 703–705 (2013).
453. Martin, C. M., Yaghi, A., Sibbald, W. J., McCormack, D. & Paterson, N. A. Differential impairment of vascular reactivity of small pulmonary and systemic arteries in hyperdynamic sepsis. *Am. Rev. Respir. Dis.* **148**, 164–172 (1993).
454. Cauwels, A. *et al.* Nitrite protects against morbidity and mortality associated with TNF- or LPS-induced shock in a soluble guanylate cyclase-dependent manner. *J. Exp. Med.* **206**, 2915–2924 (2009).
455. Roy, D., Perreault, M. & Marette, A. Insulin stimulation of glucose uptake in skeletal muscles and adipose tissues in vivo is NO dependent. *Am. J. Physiol.* **274**, E692-699 (1998).
456. González-Rodríguez, A. *et al.* Essential role of protein tyrosine phosphatase 1B in obesity-induced inflammation and peripheral insulin resistance during aging. *Aging Cell* **11**, 284–296 (2012).
457. Xu, H., Ye, X., Steinberg, H. & Liu, S. F. Selective blockade of endothelial NF- κ B pathway differentially affects systemic inflammation and multiple organ dysfunction and injury in septic mice. *J. Pathol.* **220**, 490–498 (2010).
458. Kassan, M. *et al.* Endoplasmic reticulum stress is involved in cardiac damage and vascular endothelial dysfunction in hypertensive mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 1652–1661 (2012).
459. Raetzsch, C. F. *et al.* Lipopolysaccharide inhibition of glucose production through the Toll-like receptor-4, myeloid differentiation factor 88, and nuclear factor kappa b pathway. *Hepatol. Baltim. Md* **50**, 592–600 (2009).
460. Heuer, J. G. *et al.* Cecal ligation and puncture with total parenteral nutrition: a clinically relevant model of the metabolic, hormonal, and inflammatory dysfunction associated with critical illness. *J. Surg. Res.* **121**, 178–186 (2004).
461. Owen, C. *et al.* Inducible liver-specific knockdown of protein tyrosine phosphatase 1B improves glucose and lipid homeostasis in adult mice. *Diabetologia* **56**, 2286–2296 (2013).
462. Nemoto, S., Matsumoto, T., Taguchi, K. & Kobayashi, T. Relationships among protein tyrosine phosphatase 1B, angiotensin II, and insulin-mediated aortic responses in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Atherosclerosis* **233**, 64–71 (2014).
463. Panzhinskiy, E., Ren, J. & Nair, S. Protein tyrosine phosphatase 1B and insulin resistance: role of endoplasmic reticulum stress/reactive oxygen species/nuclear factor kappa B axis. *PLoS One* **8**, e77228 (2013).
464. Monvoisin, A. *et al.* VE-cadherin-CreERT2 transgenic mouse: a model for inducible recombination in the endothelium. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **235**, 3413–3422 (2006).
1. Geroulanos, S. & Douka, E. T. Historical perspective of the word ‘sepsis’. *Intensive Care Med.* **32**, 2077 (2006).
2. Funk, D. J., Parrillo, J. E. & Kumar, A. Sepsis and septic shock: a history. *Crit. Care Clin.* **25**, 83–101, viii (2009).