



HAL
open science

TREM-1, nouvel acteur de la cellule endothéliale et de la plaquette

Lucie Jolly

► **To cite this version:**

Lucie Jolly. TREM-1, nouvel acteur de la cellule endothéliale et de la plaquette. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2018. Français. NNT : 2018LORR0014 . tel-01835682v1

HAL Id: tel-01835682

<https://theses.hal.science/tel-01835682v1>

Submitted on 11 Jul 2018 (v1), last revised 11 Jul 2018 (v2)

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Lucie JOLLY**

TREM-1, nouvel acteur de la cellule endothéliale et de la plaquette

Soutenue le 01 mars 2018

Membres du jury :

Rapporteurs :	Mr Pierre-Louis THARAUX	Directeur de recherche, PARCC, Paris
	Mme Julie HELMS	MCU-PH, CHRU, Strasbourg
Examineurs :	Mr Pierre-Emmanuel CHARLES	PU-PH, CHRU, Dijon
	Mme Véronique REGNAULT	Directrice de recherche, UMR_S 1116, Nancy
	Mr Sébastien GIBOT	PU-PH, UMR_S 1116, Nancy
Membres invités :	Mr Amir BOUFENZER	Dr, INOTREM, Nancy

UMR_S 1116, « Défaillance cardiovasculaire aiguë et chronique », Faculté de Médecine de
Nancy, Université de Lorraine.
INOTREM, Nancy.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Pierre-Louis Tharaux et le Dr Julie Helms d'avoir accepté d'examiner mes travaux et d'en être les rapporteurs.

Je remercie le Pr Pierre-Emmanuel Charles d'avoir accepté de faire partie de mon jury en tant qu'examineur. Je remercie plus particulièrement le Dr Véronique Regnault pour ses judicieux conseils lors de l'initiation du projet « plaquette » et pour avoir accepté de faire partie de mon jury en tant qu'examineur.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, le Pr Sébastien Gibot, de m'avoir encadré durant ces années de thèse. Merci pour ta disponibilité et tes conseils avisés qui m'ont permis de me forger une expérience scientifique et technique.

Je remercie le Dr Amir Boufenzar pour m'avoir fait confiance depuis mon M1 et pour son encadrement durant tout ce travail de thèse. Son aide scientifique et technique, ses conseils et sa disponibilité m'ont été d'un très grand soutien durant ces années passées au laboratoire.

Je remercie sincèrement le Dr Marc Derive, directeur scientifique d'INOTREM, de m'avoir accueilli au sein de l'équipe recherche d'INOTREM et de m'avoir permis de travailler dans de bonnes conditions.

Je remercie le Dr Jérémie Lemarié pour sa bonne humeur communicative, sa sympathie, son aide et sa participation au projet « plaquette ».

Je remercie le Dr Jean-Jacques Garaud, directeur général d'INOTREM, pour m'avoir donné la possibilité d'effectuer ma thèse au sein d'INOTREM. Merci également à tous les membres de l'équipe développement d'INOTREM, Margarita, Valérie, Aurélie, Myriam, Stephan, Emilie, Elisabeth et Philippe.

Je remercie le Dr Patrick Lacolley, directeur de recherche INSERM U1116, pour m'avoir permis d'accéder à ses installations. Merci également à tout le personnel de son laboratoire pour leur aide et leur présence.

Je tiens à remercier Anne-Laure Leblanc pour son aide, sa gentillesse, sa bonne volonté et sa bonne gestion de nos différentes lignées de souris.

Je tiens à remercier mon collègue de bureau, Kévin Carrasco, pour son aide et son soutien quotidien. Je tiens également à lui exprimer toute ma reconnaissance pour sa bonne humeur et son esprit positif dans les moments les plus difficiles. Ces années de thèse n'auraient pas été les mêmes sans toi, tu es passé de collègue à véritable ami.

Merci à Caroline Laroye, collègue de travail devenu amie, pour ses nombreux « café-potins » et son soutien sans faille.

Je remercie également tous mes amis et plus particulièrement Agathe, Christine, Thibaut, Océane, Mylène, Ingrid et Anthony qui ont toujours été là pour moi. Merci pour tous ces bons moments passés avec vous.

Je souhaite adresser des remerciements plus particulièrement à ma famille. Merci à mes parents pour leur amour, leur soutien tout au long de mes études et leurs conseils qui m'ont fait arriver là où je suis actuellement.

CONFERENCES FRANÇAISES

Jolly L, Boufenzer A, Lemarié J, Carrasco K, Derive M, Gibot S. L'abolition de TREM-1 au niveau endothélial protège les souris du choc septique. 10^{ème} journée de la recherche hospitalo-universitaire, Nancy, 13 novembre 2015 (communication orale).

Jolly L, Boufenzer A, Derive M, Gibot S. Targeted endothelial Trem-1 deletion protects mice during septic shock. 20th Annual Meeting of the French Society of Pharmacology and Therapeutics, Nancy, 19-21 avril 2016 (communication orale).

CONFERENCES INTERNATIONALES

Jolly L, Carrasco K, Derive M, Boufenzer A, Gibot S. Targeted endothelial Trem-1 deletion protects mice during septic shock. International Sepsis Forum, Paris, 11-13 septembre 2017 (communication orale et affichée).

Jolly L, Carrasco K, Derive M, Boufenzer A, Gibot S. Targeted endothelial Trem-1 deletion protects mice during septic shock. European Shock Society, Paris, 13-15 septembre 2017 (communication orale et affichée).

PUBLICATIONS

Jolly L, Lemarié J, Carrasco K, Popovic B, Derive M, Boufenzer A, Gibot S. Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1: a new player in platelet aggregation. Thrombosis and Haemostasis, 2017.

Jolly L, Carrasco K, Derive M, Lemarié J, Boufenzer A, Gibot S. Targeted endothelial gene deletion of Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1 protects mice during septic shock. Cardiovascular Research, in press.

Carrasco K, Boufenzer A, **Jolly L**, Le Cordier H, Wang G, Heck AJR, Cerwenka A, Vinolo E, Nazabal A, Kriznik A, Launay P, Gibot S, Derive M. TREM-1 multimerization is essential for its activation on monocytes and neutrophils. Cellular & Molecular Immunology, in press.

Laroye C, Lemarié J, Labroca P, Boufenzer A, Cunat L, Alauzet C, Groubatch F, **Jolly L**, Bensoussan D, Reppel L, Gibot S. Clinical grade mesenchymal stem cells derived from umbilical cord improve septic shock in pigs. Shock, submitted.

Parent M, Boudier A, Maincent P, Gibot S, Ait-Oufella H, Boufenzer A, **Jolly L**, Derive M, Kouach M, Goossens JF, Leroy P, Clarot I. LR12-peptide quantitation in whole blood by RP-HPLC and intrinsic fluorescence detection: Validation and pharmacokinetic study. Biomedical Chromatography, 2017.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES	8
LISTE DES TABLEAUX	10
ABREVIATIONS	11
1 Introduction	13
1.1 Le choc septique.....	13
1.1.1 Anciennes définitions	13
1.1.2 Nouvelles définitions : SEPSIS-3	13
1.1.3 Epidémiologie.....	15
1.1.4 Physiopathologie du choc septique	16
1.1.4.1 Initiation de l'inflammation excessive	16
1.1.4.2 Défaillance multiviscérale	19
1.2 Endothélium	22
1.2.1 Histologie.....	22
1.2.2 Plasticité et hétérogénéité endothéliales	24
1.2.3 Fonctions	27
1.2.3.1 Contrôle du tonus vasculaire	27
1.2.3.2 Contrôle de l'hémostase	30
1.2.3.2.1 Contrôle de l'hémostase primaire.....	30
1.2.3.2.2 Contrôle de la coagulation	31
1.2.3.2.3 Contrôle de la fibrinolyse	35
1.2.3.3 Contrôle de l'inflammation	35
1.2.3.4 Contrôle de la perméabilité vasculaire.....	36
1.2.4 Endothélium et sepsis	37
1.2.4.1 Dysfonction endothéliale.....	37
1.2.4.2 Atteinte du tonus vasculaire.....	41
1.2.4.3 Altération de la relaxation endothélium dépendante au cours du sepsis ..	42
1.3 Les plaquettes	43
1.3.1 Histologie.....	43
1.3.2 Fonctions	44
1.3.3 Plaquettes et sepsis.....	46
1.3.3.1 Interactions plaquettes, cellules endothéliales et neutrophiles	46
1.3.3.2 Coagulopathie	50
1.3.3.3 Thrombopénie.....	51

1.4	TREM : Triggering receptor expressed on myeloid cells	54
1.4.1	Structure TREM-1	54
1.4.2	Fonction de TREM-1	56
1.4.3	LR12, un inhibiteur pharmacologique de TREM-1	60
2	Objectifs du travail	63
3	Matériels et méthodes	64
3.1	Animaux.....	64
3.2	Peptide LR12.....	65
3.3	Etude endothéliale	65
3.3.1	Culture de cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires humaines (HPMEC)	65
3.3.2	Mesure de la production de NO intracellulaire	66
3.3.3	Test d'adhésion cellulaire.....	66
3.3.4	Modèle de sepsis murin par Ligature et Perforation Caecale (CLP)	68
3.3.5	Réactivité vasculaire.....	69
3.3.6	Cytométrie en flux.....	71
3.3.7	ELISA	72
3.3.8	RT-PCR	72
3.3.9	Western Blot.....	73
3.3.10	Statistiques	73
3.4	Etude plaquettaire	74
3.4.1	Prélèvement sanguin.....	74
3.4.2	Isolement des plaquettes.....	74
3.4.3	Mesure de l'agrégation plaquettaire	74
3.4.4	Etude de l'adhésion plaquettaire en condition de flux.....	75
3.4.5	Etude de la thrombogénèse in vitro.....	75
3.4.6	Etudes des sécrétions plaquettares	77
3.4.7	Mesure du calcium intracellulaire.....	77
3.4.8	Western Blot.....	78
3.4.9	RT-PCR	78
3.4.10	Cytométrie en flux.....	79
3.4.11	Spreading.....	79
3.4.12	Modèle de thrombose carotidienne induite au FeCl ₃	80
3.4.13	Modèle de thromboembolie généralisée	81
3.4.14	Statistiques	82

4	Résultats	83
4.1	La délétion ciblée de TREM-1 au niveau endothélial protège les souris du choc septique.....	83
4.1.1	<i>Trem-1</i> est exprimé par les cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires humaines (HPMEC).....	83
4.1.2	<i>Trem-1</i> est exprimé par l'endothélium vasculaire	86
4.1.3	La modulation de TREM-1 inhibe la dysfonction vasculaire induite par le LPS .	89
4.1.4	L'inhibition de TREM-1 protège les souris de la dysfonction vasculaire induite par le choc septique	91
4.1.5	La délétion de <i>Trem-1</i> au niveau endothélial protège les souris contre le choc septique.....	93
4.2	TREM-1, un nouvel acteur de l'agrégation plaquettaire.....	100
4.2.1	Trem-1 est exprimé de manière constitutive par les plaquettes.....	100
4.2.2	La modulation de TREM-1 réduit la sécrétion plaquettaire.....	103
4.2.3	La modulation de TREM-1 réduit l'agrégation et l'adhésion plaquettaire	104
4.2.4	L'inhibition du TREM-1 prévient de la thrombose in vitro et in vivo	111
4.2.5	L'inhibition de TREM-1 protège les souris de l'embolie pulmonaire	111
5	Discussion	115
5.1	TREM-1 et endothélium	115
5.1.1	TREM-1, un nouveau récepteur endothélial	115
5.1.2	Le LR12 diminue l'inflammation et la dysfonction vasculaire induite par le sepsis	115
5.1.3	TREM-1 endothélial, une nouvelle cible thérapeutique	118
5.1.4	Perspectives.....	119
5.1.4.1	Peptides SLC.....	119
5.1.4.2	Modèle double hit.....	122
5.2	TREM-1 et plaquettes.....	123
5.2.1	TREM-1, un nouveau récepteur plaquettaire	123
5.2.2	TREM-1 module l'adhésion, l'activation et l'agrégation plaquettares in vitro	124
5.2.3	TREM-1 régule in vivo la thrombose	125
5.2.4	Limites de l'étude	125
6	Bibliographie	127
7	Annexes	140

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Voie de signalisation des TLR	18
Figure 2 : Représentation schématique de l'évolution de la réponse immune suite à un polytraumatisme	20
Figure 3 : Structure d'un vaisseau sanguin	23
Figure 4 : L'endothélium sain	25
Figure 5 : La cellule endothéliale à l'interface sang/tissus	25
Figure 6 : Les multiples fonctions de l'endothélium	28
Figure 7 : Rôle des CE à l'interface entre l'hémostase primaire, la coagulation et la fibrinolyse	33
Figure 8 : La cascade de coagulation	34
Figure 9 : L'endothélium au cours du sepsis	38
Figure 10 : Représentation schématique de la dysfonction endothéliale au cours du choc septique	40
Figure 11 : Représentation schématique des grandes voies d'activation des plaquettes sanguines	45
Figure 12 : Présentation des différents signaux capables d'induire l'activation de la plaquette	48
Figure 13 : Représentation schématique du rôle clé des plaquettes à l'interface entre l'endothélium et les neutrophiles au cours du choc septique	49
Figure 14 : Schéma simplifié de la physiopathologie de la CIVD	52
Figure 15 : Présentation du cluster de gène TREM chez l'homme et chez la souris	55
Figure 16 : Les différents domaines structuraux de TREM-1.....	55
Figure 17 : Représentation graphique des deux hypothèses proposées pour l'origine de la forme soluble TREM-1 (sTREM-1).	57
Figure 18 : Voie de signalisation de TREM-1 et des TLR	59
Figure 19 : Genèse d'un inhibiteur de TREM-1	61
Figure 20 : Réaction chimique permettant la détection du monoxyde d'azote (NO) par le DAF-FM diacétate et le DAF-FM ¹	67
Figure 21 : Schéma représentatif de l'ensemble des éléments du myographe DMT	70

Figure 22 : Principe de la méthode de Born par mesure au cours du temps de la variation de transmission d'un faisceau lumineux infra-rouge au travers d'une suspension plaquettaire	76
Figure 23 : <i>Trem-1</i> est exprimé par les cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires humaines (HPMEC)	84
Figure 24 : <i>Trem-1</i> est exprimé par les cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires humaines (HPMEC)	85
Figure 25 : Le LPS induit l'expression de Trem-1 par l'endothélium vasculaire	87
Figure 26 : <i>Trem-1</i> est exprimé in vivo par l'endothélium vasculaire	88
Figure 27 : La modulation de TREM-1 inhibe in vitro la dysfonction vasculaire induite par le LPS	90
Figure 28 : La surexpression de TREM-1 sur les cellules U937 favorise l'adhésion aux cellules endothéliales	92
Figure 29 : L'inhibition pharmacologique de TREM-1 protège les souris de la dysfonction et de l'inflammation vasculaire induite par le choc septique	94
Figure 30 : L'inhibition pharmacologique de TREM-1 module les signaux intracellulaires impliqués dans la dysfonction vasculaire induite par le choc septique	95
Figure 31 : La délétion de <i>Trem-1</i> au niveau endothélial protège les souris du choc septique	97
Figure 32 : Etude du trafic leucocytaire chez les souris WT et EndoTrem-1 ^{-/-} septiques	99
Figure 33 : TREM-1 est exprimé par les plaquettes humaines	101
Figure 34 : TREM-1 est exprimé par les plaquettes humaines	102
Figure 35 : Effet du peptide LR12 sur la mobilisation de Ca ²⁺ intracellulaire, sur la synthèse d'AMPc, de thromboxane B2 et d'ATP, et sur l'activation de l'intégrine αIIbβ3	105
Figure 36 : Effet du peptide LR12 sur l'agrégation plaquettaire humaine	106
Figure 37 : Comparaison de plaquettes de souris WT et TREM-1 ^{-/-}	108
Figure 38 : Effet du peptide LR12 sur l'agrégation plaquettaire murine	109
Figure 39 : Effet du peptide LR12 sur l'adhésion plaquettaire	110
Figure 40 : L'inhibition de TREM-1 prévient de la thrombose in vitro et	112
Figure 41 : L'inhibition du TREM-1 protège les souris de l'embolie pulmonaire	114
Figure 42 : Stratégie de développement d'un inhibiteur pharmacologique spécifique du TREM-1 endothélial	121

LISTES DES TABLEAUX

Tableau 1 : Critères diagnostiques de SIRS, sepsis et choc septique	14
Tableau 2 : Exemples de marqueurs endothéliaux différemment exprimés en fonction de la localisation	26
Tableau 3 : Profil d'expression cellulaire des protéines de la famille des TREMs.....	116

ABREVIATIONS

ACCP : American College of Chest Physicians
Ach : Acétylcholine
ADP : Adénosine diphosphate
Akt : Protéine kinase B
AMPc : Adénosine monophosphate
AP1 : Activator Protein 1
AT : Antithrombine
ATP : Adénosine triphosphate
Ca²⁺ : Calcium
[Ca²⁺]i : Calcium intracellulaire
CARS : Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrom
CDR : Complementary Determining Region
CE : Cellules Endothéliales
CIVD : Coagulation IntraVasculaire Disséminée
CLP : Caecal Ligation and Perforation
CML : Cellules Musculaires Lisses
COX : Cyclooxygénase
DAF-2 DA : 4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluorescein Diacetate
DAF-FM : 4-Amino-5-methylamino- 2',7'-Difluorescein
DAMPs : Damage Associated Molecular Patterns
DAP12 : DNA-Activating Protein 12
DRO : Dérivés Réactifs de l'Oxygène
eNOS : NOS endothéliale
ERK1/2 : Extracellular signal-Regulated Kinases 1/2
ET-1 : Endothéline
FT : Facteur tissulaire
GMPc : Guanosine monophosphate cyclique
GP : Glycoprotéine
HPMEC : Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells
ICAM : InterCellular Adhesion Molecule
Ig : Immunoglobuline
Ig-SF : Superfamille des immunoglobulines
IL : Interleukine
iNOS : NOS inductible
JAM-C : Junctional Adhesion Molecule C
LPS : Lipopolysaccharide
LR12 : Peptide synthétique de 12 acides aminés issu de TLT-1
MAP : Mitogen-Activated Protein
MAPK : Mitogen Activated Protein Kinases
NETS : Neutrophil Extracellular Traps
NFAT : Nuclear Factor of Activated T cells
NF-κB : Nuclear factor kappa B
NLR : NOD Like Receptors
NO : Monoxyde d'azote

NOS : NO synthase
PAF : Platelet Activating Factor
PAI-1 : Plasminogen Activator Inhibitor 1
PAMPs : Pathogen-Associated Molecular Patterns
PAR : Protease Activated Receptor
PCa : Protéine C activée
PECAM : Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
PGI2 : Prostacycline
Phe : Phényléphrine
PI3-K : Phosphatidylinositol 3-kinase
PLC γ : Phospholipase C gamma
PLF : Peritoneal Lavage Fluid
PNN : Polynucléaires neutrophiles
PPP : Plasma Pauvre en Plaquette
PRP : Plasma Riche en Plaquettes
PRR : Pattern Recognition Receptor
PSGL-1 : P-selectin glycoprotein ligand
qSOFA : quick Sequential Organ Failure Assessment
SAM : Syndrome d'activation macrophagique
SCCM : Society of Critical Care Medicine
SCO : Système Canaliculaire Ouvert
SDMV : Syndrome de Défaillance Multiviscérale
SIP : Sphingosine-1-phosphate
SIRS : Syndrome de réponse inflammatoire systémique
SOFA : Sequential Organ Failure Assessment
sTREM-1 : Forme soluble de TREM-1
SYK : Spleen Tyrosine Kinase
TFPI : Tissue Factor Pathway Inhibitor
TIR : Toll/interleukin-1 receptor
TLR : Toll Like Receptor
TLT-1 : TREM-like transcript-1
TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha
TXA2 : Thromboxane A2
TXB2 : Thromboxane B2
t-PA : Activateur tissulaire du plasminogène
TREM : Triggering receptor expressed on myeloid cells
u-PA : Activateur du plasminogène de type urokinase
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VCAM : Vascular Cell Adhesion Molecule
vWF : Facteur von Willebrand
WT : Wild-Type
ZAP 70 : Z-chain Associated Protein 70

1 Introduction

1.1 Le choc septique

1.1.1 Anciennes définitions

Le terme sepsis provient du grec Σήψις, qui veut dire putréfaction, renvoyant à la notion d'infection générale grave de l'organisme par des germes pathogènes. Le choc septique est la forme la plus grave du sepsis. Un patient est dit en état de choc septique lorsqu'il est victime d'une défaillance circulatoire aiguë, entraînant des désordres hémodynamiques, métaboliques, viscéraux, déclenchée par une dérégulation de la réponse de l'hôte à une infection. Ces bouleversements de l'homéostasie conduisent au décès dans un tableau de défaillance multi-viscérale.

La conférence de consensus internationale de 1991 de l'American College of Chest Physicians (ACCP) et de la Society of Critical Care Medicine (SCCM), révisée en 2001, a permis de distinguer différents états septiques selon leur gravité^{1,2}. Les niveaux de gravité des états septiques se définissent comme dans le tableau suivant (**Tableau 1**).

Cependant plusieurs critiques ont été émises par rapport à la multiplicité des items diagnostiques qui ne permettent pas de dégager des critères pertinents. Les critères sur lesquels reposent le syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS) sont tellement larges qu'ils deviennent insuffisamment spécifiques. En effet, 43 % des patients vu aux urgences pour pathologie aiguës tout venant présentent ces critères qui peuvent s'observer en situation de stress et en dehors de tout contexte infectieux³. De plus, 34% des patients en sepsis sévère et 24% en choc septique pris en charge aux urgences ne présentent les critères de SIRS alors qu'ils présentent à l'évidence un sepsis⁴. Il y a donc une confusion entre les termes sepsis et sepsis sévère même chez les cliniciens qui utilisent ces deux termes de façon interchangeable.

1.1.2 Nouvelles définitions : SEPSIS-3

C'est dans ce contexte qu'en 2016 de nouvelles définitions ont émergé des groupes de travail de la « Society of Critical Care Medicine » et de l'«European Society of Intensive Care Medicine»⁵⁻⁷. Alors que les définitions précédentes reposaient largement sur le niveau

Infection	Réponse inflammatoire provoquée par l'invasion d'un tissu, d'un liquide ou d'une cavité normalement stérile par des micro-organismes pathogènes ou potentiellement pathogènes.
SIRS : réponse inflammatoire à une agression sévère	Deux ou plus des signes suivants : Température > 38,3°C ou < 36,0°C ; Fréquence cardiaque > 90/min ; Fréquence respiratoire > 20/min ou PaCO ₂ < 32 mmHg ou ventilation mécanique; Compte leucocytaire > 12000/mm ³ ou < 4000/mm ³ ou > 10 % de cellules immatures.
Sepsis	SIRS + infection « cliniquement ou microbiologiquement documentée »
Sepsis sévère	Sepsis + au moins un signe d'hypoperfusion ou de dysfonction d'organe <u>Fonction circulatoire :</u> Hypotension artérielle (PAS < 90 mmHg ou PAM < 60 mmHg) Hyperlactatémie artérielle (lactate > 2 mmol/L); <u>Fonction respiratoire :</u> Hypoxémie (PaO ₂ /FIO ₂ < 300) ; <u>Fonctions supérieures :</u> Présence d'encéphalopathie ou syndrome confusionnel (Glasgow < 14); <u>Fonction rénale :</u> Oligurie (débit urinaire < 0,5 mL/kg/h persistant malgré le remplissage); Créatinine > 177 µmol/L (20 mg/L); <u>Coagulation :</u> Thrombopénie < 100 000/mm ³ ; <u>Fonction hépatique :</u> Hyperbilirubinémie > 34 µmol/L;
Choc septique	Sepsis sévère + persistance , malgré un remplissage vasculaire adapté, de Hypotension artérielle (PAS < 90 mmHg, PAM < 60 mmHg), et signes d'hypoperfusion (lactatémie > 4 mmol/L, oligurie, troubles de la conscience, ...).

Tableau 1 : Critères diagnostiques de SIRS, sepsis et choc septique (D'après Bone et al., 1992)¹

d'inflammation la nouvelle est basée sur la dysfonction d'organe et le niveau de mortalité observé.

Le sepsis est maintenant défini comme une dysfonction d'organe menaçant le pronostic vital et causé par une réponse inappropriée de l'hôte à une infection. Il n'y a plus de distinction sepsis/sepsis sévère. Le manque de spécificité du concept de SIRS a entraîné son abandon. Il est aussi proposé une définition opérationnelle et pratique basée sur une augmentation du score SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) d'au moins 2 points lié à l'infection. Le SOFA basal est supposé être à zéro en l'absence de dysfonction d'organe, aigüe ou chronique, préexistante. Il est compris entre 0 et 4, un score supérieur à 2 est associé à un risque de mortalité de 10 %⁶.

Le choc septique, quant à lui, est maintenant défini comme un sous-groupe du sepsis avec anomalies importantes circulatoires et métaboliques et une mortalité d'environ 40%. Il est caractérisé par l'association de :

- Sepsis
- Besoin de drogues vasopressives pour maintenir une PAM \geq 65 mm Hg
- Lactates $>$ 2 mmol/L (18mg/dL) malgré un remplissage adéquat

La complexité du score SOFA et la nécessité de prélèvement biologiques limitent son application en dehors des services de réanimation, c'est pourquoi une version simplifiée de score SOFA a été proposée. On parle de quick SOFA (qSOFA), il repose sur les trois critères suivants :

- Pression artérielle systolique \leq 100 mm Hg
- Fréquence respiratoire \geq 22/min
- Confusion, altération de la conscience

Le qSOFA ne constitue pas un critère de diagnostic du sepsis en tant que tel mais un outil permettant une identification rapide des patients les plus graves ou susceptibles de s'aggraver. Cette notion de précocité de la prise en charge est d'autant plus importante que 50 % des cas de sepsis sont observés en dehors des services de réanimation⁸.

1.1.3 Epidémiologie

Le sepsis et le choc septique sont des pathologies fréquentes qui montrent une incidence en constante augmentation. En effet, une étude américaine regroupant les bases de données de

750 millions d'hospitalisation sur une période de 22 ans a objectivé une incidence de 240.4 cas pour 100 000 en 2000 contre 82.7 pour 100 000 en 1979, soit une augmentation par an de 8.7 %⁹. Plusieurs explications peuvent expliquer cette tendance à l'augmentation comme le vieillissement de la population, la fréquence croissante des comorbidités associées, une sensibilisation à la détection et une prise en charge de plus intensive de ces pathologies¹⁰.

Le sepsis et le choc septique sont l'une des principales causes de décès dans le monde. En effet, la mortalité associée à ces deux pathologies reste élevée puisque la mortalité associée au sepsis peut atteindre 25-30 %, voire 40-50% en cas de choc septique¹¹.

En France, le choc septique reste associé à une lourde mortalité hospitalière malgré une tendance à l'amélioration du pronostic. Une étude française menée sur 3 ans (2009-2011) regroupant les données de 14 services de réanimation rapporte un taux de mortalité hospitalière de 42 % à 28 jours¹². De plus, les patients hospitalisés pour un sepsis ou un choc septique présentent un risque plus élevé pour une nouvelle hospitalisation et pour le développement de certaines complications, ces pathologies impactent donc également le pronostic à long terme et la qualité de vie¹³.

1.1.4 Physiopathologie du choc septique

1.1.4.1 Initiation de l'inflammation excessive

Le point de départ de l'état septique est la colonisation d'un organe, compartiment ou fluide de l'organisme par un microorganisme pathogène ou potentiellement pathogène, induisant d'abord une réaction inflammatoire locale². Au niveau tissulaire, la première ligne de défense de l'organisme après pénétration d'un microorganisme est assurée par les monocytes circulants, les macrophages tissulaires et les cellules dendritiques^{14,15}. Ces cellules immunitaires grâce à des récepteurs particuliers, les Pattern Recognition Receptor (PRR) dont les plus connus sont les Toll Like Receptor (TLR), détectent la présence de ces microorganismes^{16,17}. Les TLR sont une famille de protéines transmembranaires de type I remarquablement conservées chez les eucaryotes¹⁸. Découvertes lors d'une étude sur l'embryogenèse chez la drosophile¹⁸, ces récepteurs sont composés d'un domaine extracellulaire riche en leucine, leur conférant leur spécificité, et d'un domaine intracellulaire, homologue au récepteur à l'interleukine 1 (appelé domaine TIR (Toll/interleukin-1 receptor)), permettant l'activation de la cascade de signalisation intracellulaire^{19,20}. Treize récepteurs TLR

ont été mis en évidence chez les mammifères et reconnaissent des motifs présents sur la grande majorité des bactéries, virus ou champignons : les Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) (**Figure 1**). Ainsi, le TLR4 est le récepteur pour l'endotoxine (ou lipopolysaccharide (LPS)) des bactéries à Gram-négatif. Le LPS est couramment utilisé dans les modèles expérimentaux de choc septique (endotoxinique) car son injection reproduit l'ensemble des signes cliniques et des conséquences biologiques observés au cours de ce type de choc. Le TLR2 est impliqué dans la réponse cellulaire aux mycobactéries et aux bactéries à Gram-positif par la reconnaissance de lipoprotéines, de composants du peptidoglycane et de l'acide lipotéichoïque. Les TLR sont exprimés à la surface des cellules impliquées dans la réponse immunitaire mais également par les cellules impliquées dans la réponse systémique (cellules endothéliales (CE), cellules musculaires lisses (CML) et cardiomyocytes). Par ailleurs au niveau du site de l'infection, des signaux endogènes générés par les dommages cellulaires et tissulaires, les DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns), initiés par les agents microbiens vont également contribuer à la réponse inflammatoire en activant les TLR pour ainsi transmettre un signal de danger.

La signalisation intracellulaire initiée par les PAMPs et les DAMPs conduit à la production de nombreux médiateurs solubles de l'inflammation. Ainsi, les macrophages vont rapidement sécréter des cytokines pro- inflammatoires, et tout particulièrement l'interleukine-1 β (IL-1 β), le TNF α (Tumor Necrosis Factor alpha) et l'interleukine-6 (IL-6), qui vont orchestrer une cascade de médiateurs contribuant directement au processus inflammatoire. Les effets complémentaires de l'IL-1 β et du TNF- α (qui stimulent la synthèse de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales), et de la chimiokine IL-8, permettent le recrutement d'autres leucocytes, en particulier les polynucléaires neutrophiles (PNN). Leur fonction principale est de détruire les agents pathogènes phagocytés via la libération de granules contenant des molécules de dégradation des bactéries et la formation de dérivés actifs de l'oxygène. Les PNN activés vont ainsi permettre l'élimination des microorganismes mais ils vont également entraîner des lésions endothéliales via la libération de médiateurs qui augmentent la perméabilité vasculaire. Par ailleurs, les cellules endothéliales activées libèrent

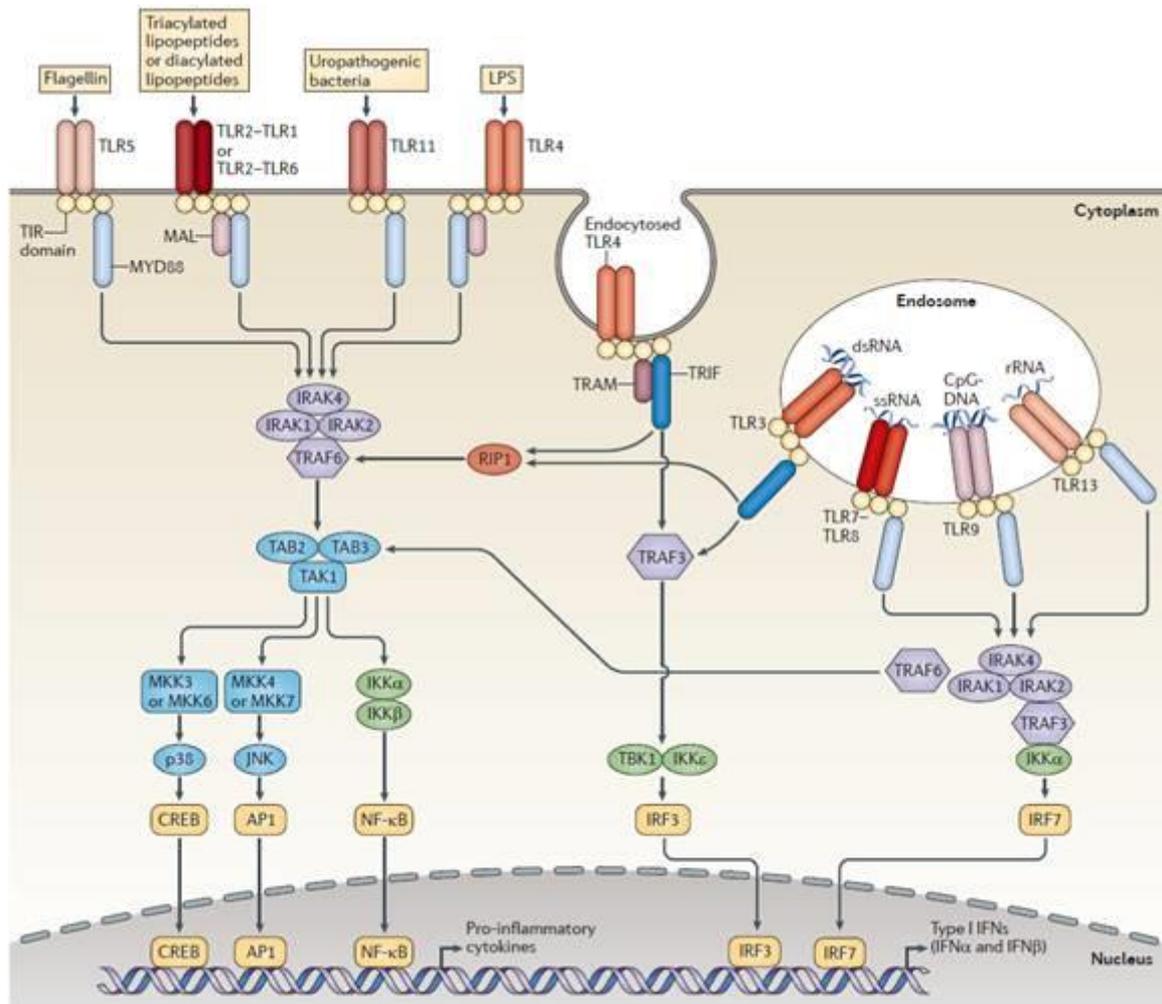


Figure 1 : Voie de signalisation des TLR (D'après O'Neil and al., 2013)²¹

Les TLR 5, 11, 4, 2, 1 et 6 interagissent avec leurs ligands respectifs à la surface de la cellule tandis que les TLR3, 7, 8, 9 et 13 se situent au niveau des endosomes. Deux voies de signalisation se distinguent : Myd88 (Myeloid differentiation primary response 88) dépendante et TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β) dépendante. Elles mènent respectivement à l'expression de cytokines pro-inflammatoires et d'interféron.

du monoxyde d'azote (NO), un vasodilatateur puissant qui agit comme un médiateur clé au cours du choc septique²².

Alors que de nombreuses cytokines pro-inflammatoires sont produites, l'organisme sécrète également des protéines anti-inflammatoires dont l'IL-10, les récepteurs solubles antagonistes du TNF α et de l'IL-1 qui contre balancent les effets pro-inflammatoires, ce phénomène est appelé CARS (Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome)^{23,24}. En effet, l'IL-10 favorise la compartimentalisation de l'inflammation au site de l'infection et atténue ses effets systémiques, pouvant ainsi faciliter une dépression immunitaire et des infections secondaires. Rapidement la conception initiale opposant SIRS et CARS comme étant deux phases successives des mécanismes de défense de l'organisme a été abandonnée²⁵. Les deux entités coexisteraient dès la phase initiale, la différence entre les patients qui présentent des complications (infection, défaillance d'organe) et ceux qui ont une évolution simple réside dans l'intensité d'expression du SIRS et du CARS (**Figure 2**)²⁶. Le sepsis est donc associé à une production exacerbée de cytokines aussi bien pro- qu'anti-inflammatoires, on parle alors de « tempête cytokinique »¹⁰.

1.1.4.2 Défaillance multiviscérale

Une réponse immunitaire exagérée va avoir des conséquences délétères au niveau de nombreux organes (système nerveux central, système respiratoire, hépato-splanchnique, rénal et cardio-vasculaire)^{27,28}. Les dommages cellulaires induits provoquent des dysfonctions d'organes même à distance du foyer infectieux initial, conduisant ainsi au choc septique²⁸. Il a été démontré que plus le nombre d'organes défaillants est élevé plus la mortalité augmente^{29,30}. De plus, des études histologiques ont montré que les organes défaillants présentent peu d'anomalie de structure en comparaison aux altérations fonctionnelles observées³¹. La dysfonction d'organe serait donc plutôt liée à une perte de leur fonction ; les mécanismes sous-jacents expliquant cette théorie sont l'altération de l'oxygénation tissulaire et la réduction de l'activité mitochondriale^{5,32}.

Plusieurs facteurs comme l'hypotension, la réduction de la déformabilité des globules rouges et la thrombose microvasculaire contribuent à une diminution de l'apport d'oxygène au cours du choc septique. L'inflammation engendre un dysfonctionnement de l'endothélium vasculaire, accompagnée d'une mort cellulaire et d'une perte d'intégrité de la barrière, provoquant des œdèmes³³. Les dommages mitochondriaux causés par le stress oxydant et

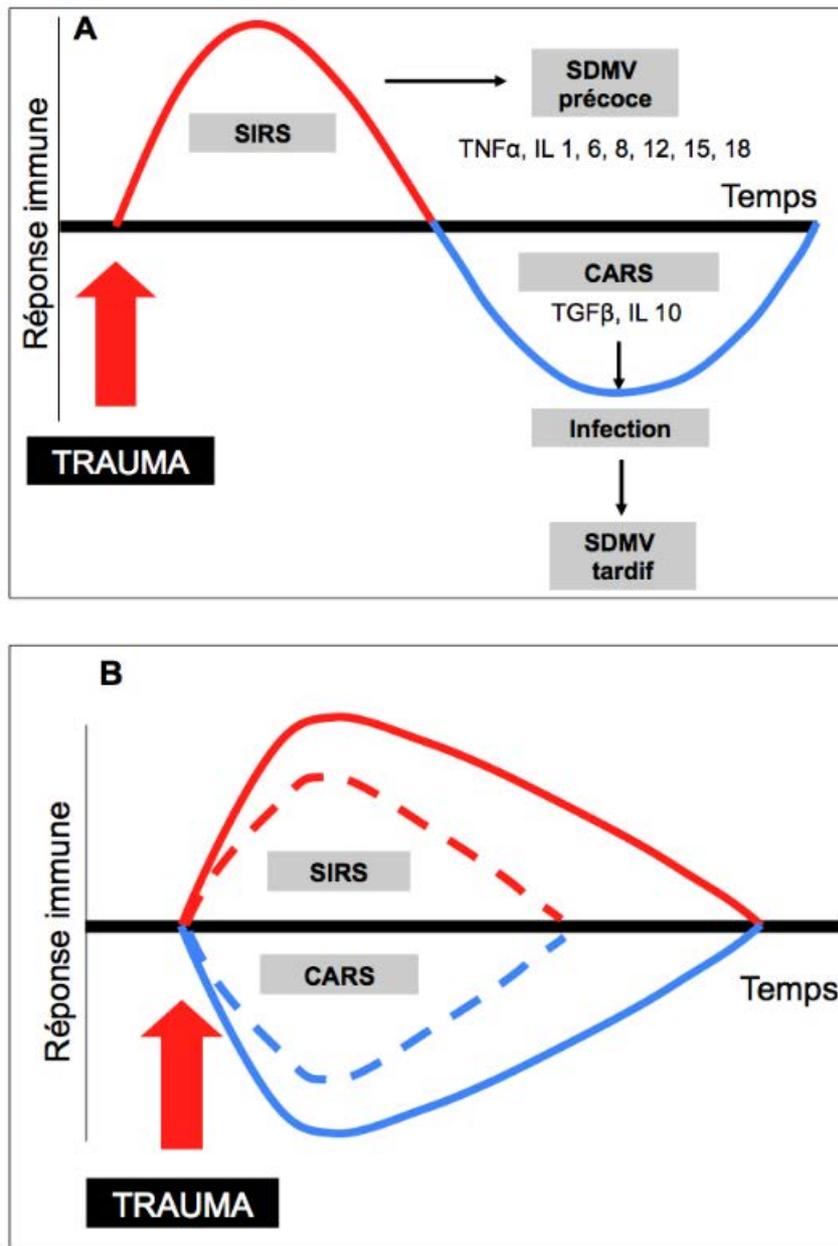


Figure 2 : Représentation schématique de l'évolution de la réponse immunitaire suite à un polytraumatisme (D'après Harrois et al., 2016)³⁴

A) Profil décrit par Moore et al., montrant une phase pro-inflammatoire (SIRS) suivie d'une phase anti-inflammatoire (CARS)

B) Profil décrit par Xiao et al., montrant la coexistence dès la phase aigüe d'éléments de SIRS et CARS. Les courbes en pointillés représentent la réponse immunitaire des patients qui ne présentent pas de complications. Les courbes en continu représentent la réponse immunitaire des patients qui présentent des complications post-traumatiques (infections, défaillance d'organe).

SIRS : Syndrome de réponse inflammatoire systémique ; CARS : Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome ; SDMV : Syndrome de Défaillance Multiviscérale

d'autres mécanismes nuisent à l'utilisation de l'oxygène³⁵. Les mitochondries lésées libèrent par ailleurs de nombreux signaux de danger dans l'environnement extracellulaire, comme de l'ADN mitochondrial et les peptides formyliques, qui peuvent activer les neutrophiles et causer d'autres lésions tissulaires³⁶.

Parmi les nombreux acteurs cellulaires de la physiopathologie du choc septique, nous allons nous intéresser à deux acteurs cellulaires qui semblent jouer un rôle prépondérant dans l'apparition des nombreuses dysfonctions d'organe : l'endothélium et les plaquettes.

L'endothélium est un véritable organe, imposant tant par ses dimensions que par ses multiples fonctions, il n'en demeure pas moins complexe par sa plasticité et son hétérogénéité. Au cours du choc septique, la plupart des fonctions endothéliales sont perturbées, aboutissant à un état pro-coagulant, anti-fibrinolytique et pro-adhésif.

Les plaquettes quant à elles sont des cellules clés de l'hémostase qui exercent en parallèle un rôle pro-inflammatoire, elles interviennent donc de façon exacerbée à ce double titre. On observe fréquemment au cours du choc septique une dérégulation de la coagulation ainsi qu'une thrombopénie.

1.2 Endothélium

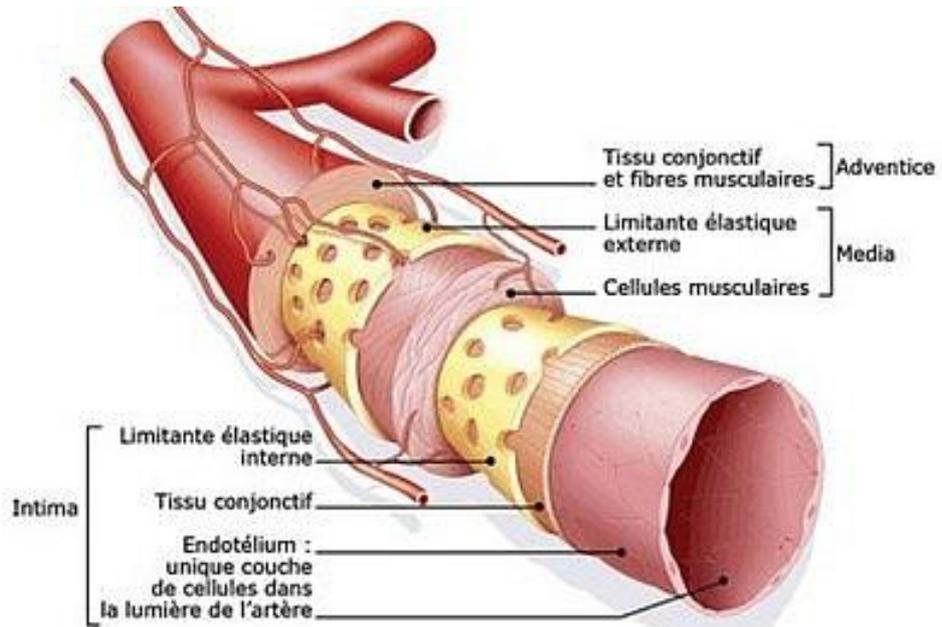
La paroi artérielle est constituée de trois tuniques disposées de manières concentriques et séparées par des lames élastiques : l'intima, la média et l'adventice (**Figure 3**). L'intima est la tunique la plus interne et la plus fine constituée de l'endothélium, formée par une juxtaposition ordonnée de cellules endothéliales (CE) en contact direct avec le sang et d'une couche sous endothéliale qui correspond à un tissu conjonctif lâche. La média est la tunique la plus épaisse de la paroi artérielle, elle est principalement constituée de cellules musculaires lisses (CML) qui ont un rôle primordial sur la motricité du vaisseau. L'adventice est la tunique externe de la paroi vasculaire. Elle est constituée d'un tissu conjonctif peu organisé, riche en collagène et en fibres élastiques, et contenant des fibroblastes et des adipocytes.

L'endothélium a pendant longtemps été considéré comme une surface inerte, mais aujourd'hui il est clair qu'il s'agit d'une structure disséminée active et hétérogène, communiquant avec son environnement et participant à de nombreux processus physiologiques³⁷.

1.2.1 Histologie

Constitué d'une fine couche monocellulaire, l'endothélium tapisse la face interne de tous les vaisseaux. Les cellules endothéliales se trouvent à l'interface entre les éléments figurés du sang et la paroi vasculaire. Les cellules endothéliales sont des cellules allongées et aplaties présentant un noyau bombé dans la lumière, leur taille est d'environ 0,5µm d'épaisseur, 100µm de longueur et 10µm de largeur. Elles ont une forme bien caractéristique en forme de losange et leur juxtaposition constitue un tapis cellulaire en mosaïque. Elles reposent sur une membrane basale riche en collagène et en glycoprotéines. Cette position stratégique des CE montre le rôle complexe de ces cellules qui d'un côté doivent favoriser la circulation du sang et de l'autre, interagissent avec une matrice de collagène, puissant activateur des plaquettes et de la coagulation.

Les membranes plasmiques des CE se rapprochent en un ou plusieurs points afin de former des jonctions serrées (tight junction) ou des jonctions communicantes (gap junction). Les jonctions communicantes permettent une communication directe entre les CE en formant des conduits au travers desquels peut avoir lieu l'échange de métabolites, d'ions et de petites



Artère de moyen calibre et ses trois tuniques : intima, média, adventice

Figure 3 : Structure d'un vaisseau sanguin³⁸

molécules de signalisation. Ces structures abondantes et intimement associées aux jonctions serrées constituent un réseau interconnecté entre les CE (**Figure 4**).

1.2.2 *Plasticité et hétérogénéité endothéliales*

Les CE, de par leur position à l'interface entre une phase liquide (le plasma) et une structure solide (la matrice extracellulaire de la membrane basale), ont des relations importantes avec leur environnement et sont capables de moduler leur structure et leur fonction, c'est ce qu'on appelle la plasticité endothéliale. En effet, en réponse à un stimulus chimique ou à un stimulus physique comme une modification du flux sanguin, les CE s'adaptent et modifient leur phénotype (**Figure 5**). De nombreuses études reportent qu'*in vitro* en condition de culture statique, les CE ont une forme cubique alors que dès qu'elles sont exposées à des contraintes de cisaillement comme dans une chambre de perfusion qui mime le flux sanguin, les CE prennent une forme allongée dans le sens du flux avec un important remaniement de leur squelette^{39,40}. De plus, les CE interagissent en permanence avec la matrice extracellulaire de la membrane basale sur laquelle elles reposent et modifient leur phénotype en fonction de celle-ci. Jallali et *coll.* ont montré que des CE en culture soumise à un flux laminaire dans une chambre de perfusion présentent une expression membranaire des intégrines différente, en quantité et en répartition, selon le type de matrice sur laquelle elles reposaient (fibronectine ou vitronectine)⁴¹.

La notion d'hétérogénéité endothéliale a été abordée pour la première fois par des histologistes qui ont observé des différences morphologiques majeures entre l'endothélium jointif imperméable du cerveau et l'endothélium fenestré des glandes endocrines. En effet, les CE, en fonction de leur localisation au sein de l'organisme, présentent des propriétés communes mais aussi des caractéristiques propres⁴². La recherche expérimentale, notamment grâce à la microscopie électronique a confirmé les différences structurelles et fonctionnelles des cellules endothéliales en fonction des organes (**Tableau 2**).

Par exemple, l'endothélium des capillaires est beaucoup plus perméable que celui des artères de gros calibres ce qui facilite la diffusion moléculaire. La perméabilité varie selon les tissus considérés, ces différences sont liées à des variations de structures des endothéliums selon lesquelles se distinguent trois types de capillaires^{43,44,45}.

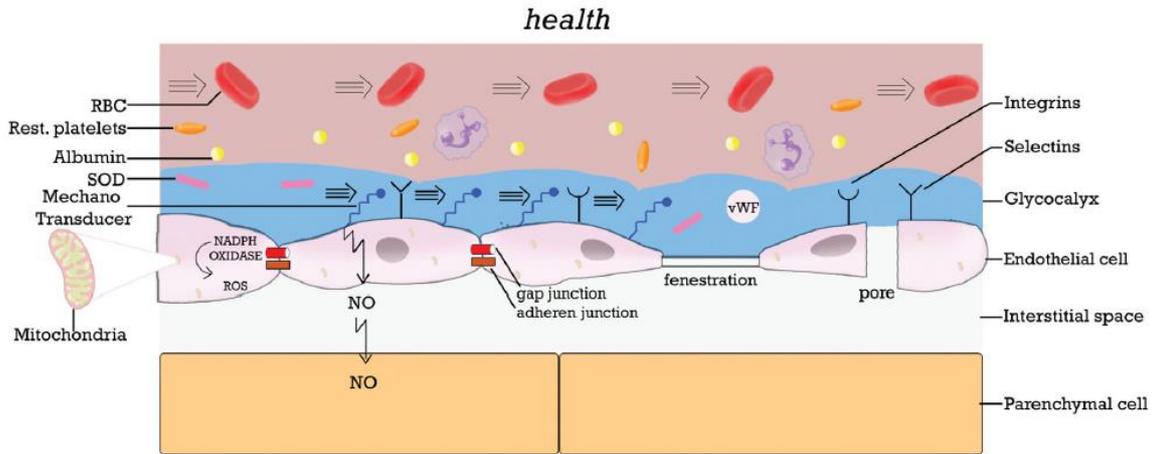


Figure 4 : L'endothélium sain (D'après Ince et al., 2017)⁴⁶

Présentation schématique des éléments de l'endothélium sain responsables de son rôle clé à l'interface entre le sang circulant et les cellules parenchymateuses.

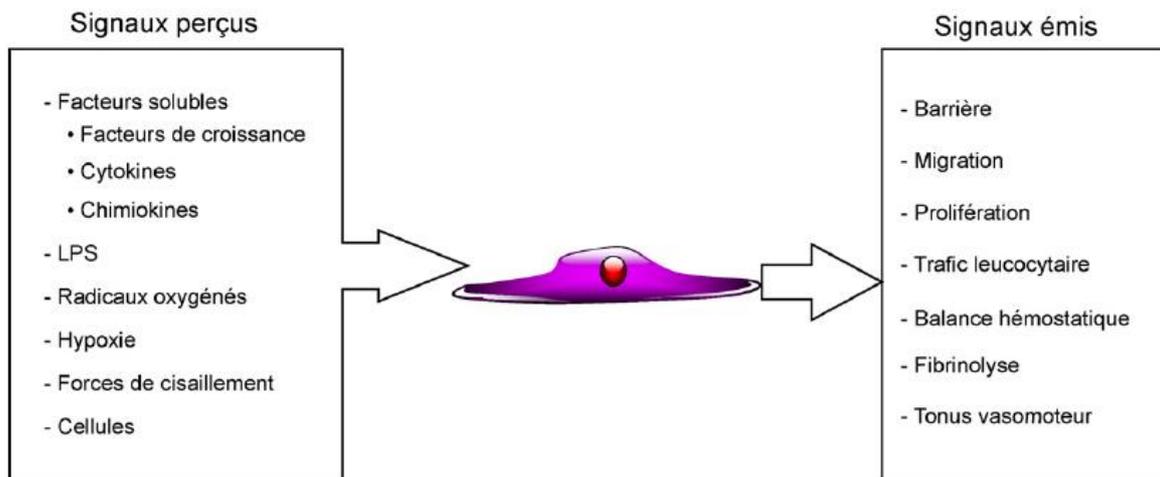


Figure 5 : La cellule endothéliale à l'interface sang/tissus (D'après Ait-Oufella et al. 2010)⁴⁷

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

Tableau 2 : Exemples de marqueurs endothéliaux différemment exprimés en fonction de la localisation (D'après Ait-Oufella et al., 2010)⁴⁷

De plus, l'endothélium des grosses artères de conductance est lui très sensible aux contraintes mécaniques, plus particulièrement aux contraintes de cisaillement qui impactent directement l'architecture même des cellules endothéliales. Au niveau du sinus aortique où le flux n'est pas laminaire et le cisaillement endothélial est faible, l'endothélium a un aspect en forme de « pavés ». En revanche, où le flux laminaire et le cisaillement est normal, les CE sont allongées puisqu'elles s'adaptent aux forces de friction entre les cellules et le sang circulant^{43,45}.

L'hétérogénéité concerne aussi l'intensité de la réponse endothéliale. En réponse à un même stimulus physiologique ou pathologique, les cellules endothéliales de deux territoires distincts peuvent activer une séquence de gènes identiques, mais en quantités différentes⁴⁸.

Le plus difficile est de déterminer le statut endothélial : inactivé, activé ou anormalement activé. Cette distinction est subtile et limitée actuellement par le manque d'outils cliniques performants pour évaluer le fonctionnement endothélial⁴⁹.

1.2.3 Fonctions

L'endothélium présente diverses fonctions ce qui explique son implication dans de nombreuses pathologies. Il participe au contrôle de la fluidité sanguine, à l'agrégation plaquettaire, au tonus vasculaire, aux fonctions immunologique, inflammatoire, angiogénique et apoptotique. Il a également un rôle anti oxydant et régule la croissance cellulaire (**Figure 6**). Chacune de ces activités est régulée différemment dans l'espace et dans le temps grâce à leur plasticité⁵⁰.

1.2.3.1 Contrôle du tonus vasculaire

L'endothélium sécrète des molécules vasodilatatrices comme le monoxyde d'azote ou la prostacycline (PGI₂), ainsi que des molécules vasoconstrictrices comme l'endothéline (ET-1) et le facteur d'activation plaquettaire (PAF, Platelet Activating Factor) ce qui permet la régulation de la pression sanguine et du flux sanguin. Le NO est produit de manière constitutive par l'endothélium et est modulé par de nombreux stimuli exogènes, mécaniques ou chimiques alors que la synthèse des autres médiateurs est inductible.

Le NO, qui est le principal agent vasorelaxant d'origine endothéliale⁵¹, est un radical libre synthétisé lors de l'oxydation de la L-arginine en L-citrulline par la NO synthase (NOS) endothéliale (eNOS) exprimée de manière constitutive dans les cellules endothéliales. Le NO

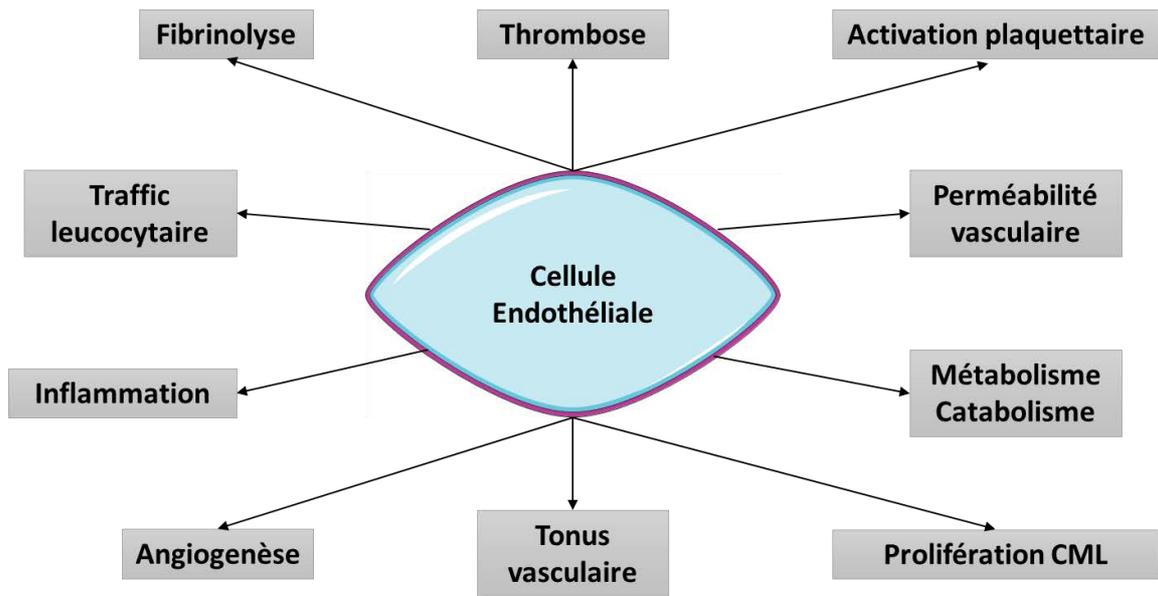


Figure 6 : Les multiples fonctions de l'endothélium (Adapté de Feletou, 2011)⁵²

est libéré de manière continue au niveau des vaisseaux sanguins en réponse aux forces de cisaillement générées par l'écoulement du sang, phénomène à l'origine d'une vasodilatation dite flux-dépendante. L'activité de la eNOS dépend de la présence de calcium (Ca^{2+}) et de la calmoduline. Elle est modulée par des changements de la concentration du Ca^{2+} intracellulaire ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) et activée par tout stimulus induisant une élévation de celui-ci. Cette activation passe aussi par des mécanismes de phosphorylation et de déphosphorylation. De nombreuses études ont montré que des forces de cisaillements activent la eNOS, indépendamment de l'élévation du $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en phosphorylant des résidus sérines par la voie PI3-K (phosphatidylinositol 3-kinase) / Akt (protéine kinase B)⁵¹. L'activation de la eNOS indépendamment d'une élévation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ peut être observée avec des stimuli non mécaniques comme le facteur de croissance endothélial (VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor), l'acétylcholine et les estrogènes^{53,54}. Furchgott et Zawadzki ont montré pour la première fois en 1980 qu'en présence d'endothélium, l'acétylcholine entraînait une vasodilatation du vaisseau pré-contracté mais qu'en revanche sur un vaisseau désendothélialisé l'acétylcholine n'avait plus aucun effet⁵¹. La voie commune finale de ce phénomène est la production de NO qui diffuse en profondeur et active la guanylate cyclase soluble des CML, responsable de la formation de guanosine monophosphate cyclique (GMPc), qui à son tour active la protéine G-kinase i. Cette dernière enzyme diminue le stock de calcium libre cytosolique et inhibe la contraction de la CML⁵⁵. De plus le NO inhibe l'adhésion des leucocytes et des plaquettes à l'endothélium et il favorise la désagrégation plaquettaire lors de la formation du clou hémostatique⁵⁶. Il existe deux autres formes de NO synthase, la neuronale calcium dépendante et la NOS inducible (iNOS) induite notamment par les cytokines pro-inflammatoires comme au cours du sepsis.

L'ET-1 est le plus puissant agent vasoconstricteur produit uniquement par l'endothélium en réponse à des stimuli comme l'hypoxie, les forces de cisaillement et l'ischémie⁵⁷. Elle entraîne la contraction des CML après action sur son récepteur ET-A, par augmentation du calcium intracellulaire et activation de la protéine kinase C. Elle stimule aussi la prolifération cellulaire avec un effet à long terme par accumulation du calcium en intracellulaire, que le NO peut réverser. Son action sur le récepteur ET-B, présent sur les CE, est impliquée dans la sécrétion du NO et de la PGI₂.

La PGI₂ et le PAF permettent d'affiner la régulation du tonus vasculaire. Ces molécules lipidiques impliquées dans le signalement intercellulaire peuvent être synthétisées

rapidement et leur demi-vie est courte. La PGI₂, qui est un eicosanoïde, dérivé de l'acide arachidonique, agit par un mécanisme paracrine après sa libération par les CE. La PGI₂ permet la relaxation des CML par fixation sur son récepteur IP et l'augmentation d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), et inhibe l'agrégation plaquettaire, ainsi que la prolifération des CML. Sa synthèse est induite au niveau des sites de perturbation vasculaire et elle a aussi un rôle dans les réponses inflammatoires locales. Le PAF est un phospholipide qui reste à la surface des CE et qui permet l'adhésion des leucocytes à la paroi vasculaire, agissant ainsi selon un mode juxtacrine : il provoque une vasoconstriction^{58,59}.

1.2.3.2 Contrôle de l'hémostase

En cas de blessure d'un vaisseau, pour arrêter l'hémorragie, les plaquettes obturent la brèche en venant y agréger. Cette première phase est l'HEMOSTASE PRIMAIRE. Mais cet agrégat plaquettaire est instable et perméable, il doit être consolidé. C'est le rôle de la COAGULATION qui transforme, après une cascade d'activations enzymatiques, le fibrinogène soluble en fibrine insoluble qui vient consolider l'agrégat plaquettaire en le coiffant d'un fin réseau fibrineux. La masse fibrino-plaquettaire qui a obturé la brèche sera résorbée les jours suivants par la troisième phase, la FIBRINOLYSE, après réparation de la paroi du vaisseau. Les CE interviennent dans ces trois étapes clés de l'hémostase.

1.2.3.2.1 Contrôle de l'hémostase primaire

Dans les conditions physiologiques, le sang est en contact avec des CE et reste fluide. La surface luminale des CE quiescentes est anticoagulante et non thrombogène, les plaquettes et les leucocytes ne peuvent donc pas adhérer aux CE et le système de coagulation reste inactivé. En revanche, les macromolécules de la lame basale, synthétisées par les cellules endothéliales, sont fortement thrombogènes et les CE activées favorisent la formation de thrombus. Les CE ont donc un rôle central où elles régulent l'équilibre entre la thrombose, l'hémostase et la thrombo-résistance⁵².

Lors d'une lésion vasculaire, il se produit une vasoconstriction réflexe conduisant à une diminution du débit sanguin pour limiter l'hémorragie. Dans un premier temps, les plaquettes circulantes adhèrent à la matrice extracellulaire et aux fibres de collagènes et commencent le processus hémostatique. Le recrutement des plaquettes se fait principalement *via* la glycoprotéine (GP) membranaire Ib et les facteurs IX et V favorisant ainsi l'adhésion des

plaquettes à la fibronectine et à la laminine de la matrice extra cellulaire. Cependant, le facteur von Willebrand (vWF) semble jouer un rôle majeur dans le recrutement initial des plaquettes et la formation de thrombus, surtout lorsque le débit sanguin est élevé (force de cisaillement élevée). Le vWF est une protéine multimérique, principalement synthétisé par les CE et stocké dans les corps de Weibel-Palade. Le vWF une fois libéré dans la circulation sanguine stabilise le facteur VIII et s'associe au collagène VI dans le sous-endothélium. Ainsi au niveau des lésions vasculaires, le vWF agit comme un pont entre les tissus et les plaquettes via le récepteur de la glycoprotéine GPIb/IX/V. Le vWF circulant se lie au collagène exposé et participe aux interactions entre les plaquettes et les CE⁶⁰. Les CE synthétisent également le facteur d'activation plaquettaire qui favorise l'activation des plaquettes et leur adhérence aux CE⁶¹. Il y a ainsi formation d'une première couche monocellulaire de plaquettes. Ces interactions entre les plaquettes et les CE sont à l'interface entre l'hémostase et l'inflammation (**Figure 7**).

Après la phase d'adhésion, les plaquettes s'activent rapidement, libèrent le contenu de leurs granules et passent d'une forme oblongue à une structure étoilée (émission de pseudopodes). La libération d'ADP (adénosine diphosphate), d'ATP, de thromboxane A₂, de sérotonine, de vWF et de fibrinogène active davantage les plaquettes voisines ce qui amplifie le processus d'agrégation et favorise la formation du clou plaquettaire permettant ainsi l'arrêt du saignement. Les CE quiescentes, en réponse à la plupart de ces médiateurs, libèrent du PGI₂ et du NO afin de limiter l'adhésion, l'activation, la sécrétion et l'agrégation plaquettaire et favorise leur désagrégation par un mécanisme dépendant du GMPc.

1.2.3.2.2 Contrôle de la coagulation

L'endothélium est impliqué dans le contrôle des phénotypes thrombotiques puisqu'il agit sur la balance coagulation/anticoagulation et sur les systèmes fibrinolyse-antifibrinolyse⁶². L'initiation de la cascade de coagulation est principalement médiée par le facteur tissulaire (FT) qui se trouve dans la matrice extracellulaire des CE, dans l'adventice et dans les tissus sous-cutanés. Les CE quiescentes n'expriment pas le FT ; en revanche il a été montré que son expression pouvait être induite in vitro lorsque les CE sont activées par des plaquettes, l'endotoxine, plusieurs cytokines, la fibrine, la thrombine ou l'hypoxie. In vivo, l'expression du FT est induite rapidement après une lésion vasculaire, et il est retrouvé au niveau des plaques d'athérosclérose et des vaisseaux dérivés des tumeurs.

Les CE présentent un phénotype anticoagulant puisqu'elles participent au maintien de la fluidité du sang en inhibant l'adhésion, l'activation et l'agrégation plaquettaire (**Figure 7**). En effet, il existe quatre systèmes qui visent à limiter l'activation de la cascade de coagulation : le TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor), l'antithrombine (AT), la PCa (Protéine C activée) et le système de la protéine Z^{47,63}.

Le TFPI est une protéine synthétisée principalement par les CE et minoritairement par les mégacaryocytes. Il existe deux isoformes de cette protéine : le TFPIa et le TFPIb qui présentent des ligands différents au niveau des CE. L'activité anticoagulante du TFPI est principalement médiée par l'isoforme TFPIa : le TFPI se lie au facteur Xa ce qui inhibe la formation du complexe FT-FVIIa et aboutit à la formation d'un complexe quaternaire TFPI-FT-FVIIa-FXa⁶⁴ ().

L'AT est une glycoprotéine synthétisée par le foie, elle se retrouve ensuite soit dans le plasma sous forme libre soit au niveau de la partie apicale de l'endothélium (glycocalyx) où elle est liée à des héparanes sulfates. L'AT inhibe la thrombine, le facteur Xa et, à un degré moindre, plusieurs autres protéases de la coagulation (IXa, VIIa, XIa et XIIa) en formant un complexe équimoléculaire irréversible qui se fixe sur les récepteurs hépatocytaires. L'action de l'AT est largement potentialisée par l'héparine.

La PC est également une glycoprotéine synthétisée par le foie qui est au centre du système physiologique inhibiteur de la coagulation. La thrombine se lie à la thrombomoduline qui est protéine intégrante des CE, perdant alors ses propriétés pro-coagulantes et activant la PC en PCa. La PCa en présence de son cofacteur la protéine S, de calcium et de phospholipides inhibe les facteurs Va et VIIa ce qui bloque ainsi la boucle d'amplification de la génération de thrombine.

L'étape majeure d'acquisition pour l'endothélium d'un phénotype pro-coagulant passe par l'exposition du FT. En effet, le FT est induit par de nombreux médiateurs comme la thrombine, l'endotoxine, les cytokines, les forces de cisaillements, l'hypoxie ou encore les lipides oxydés^{65,66} ce qui va induire la rencontre et l'activation du facteur VII. Le complexe FT-VIIa active à son tour les facteurs IX et X qui sont ancrés par leur résidus gammacarboxiques aux phospholipides membranaires des plaquettes et des CE. Le facteur IXa active le facteur X. Le facteur Xa catalyse la génération de thrombine, la thrombine va à son tour cliver le fibrinogène en fibrine pour ainsi former un réseau de fibrine qui avec l'agrégation plaquettaire va permettre de stabiliser le caillot fibrinoplaquettaire (**Figure 7, Figure 8**).

Endothelial cells as regulator of thrombosis, hemostasis and fibrinolysis

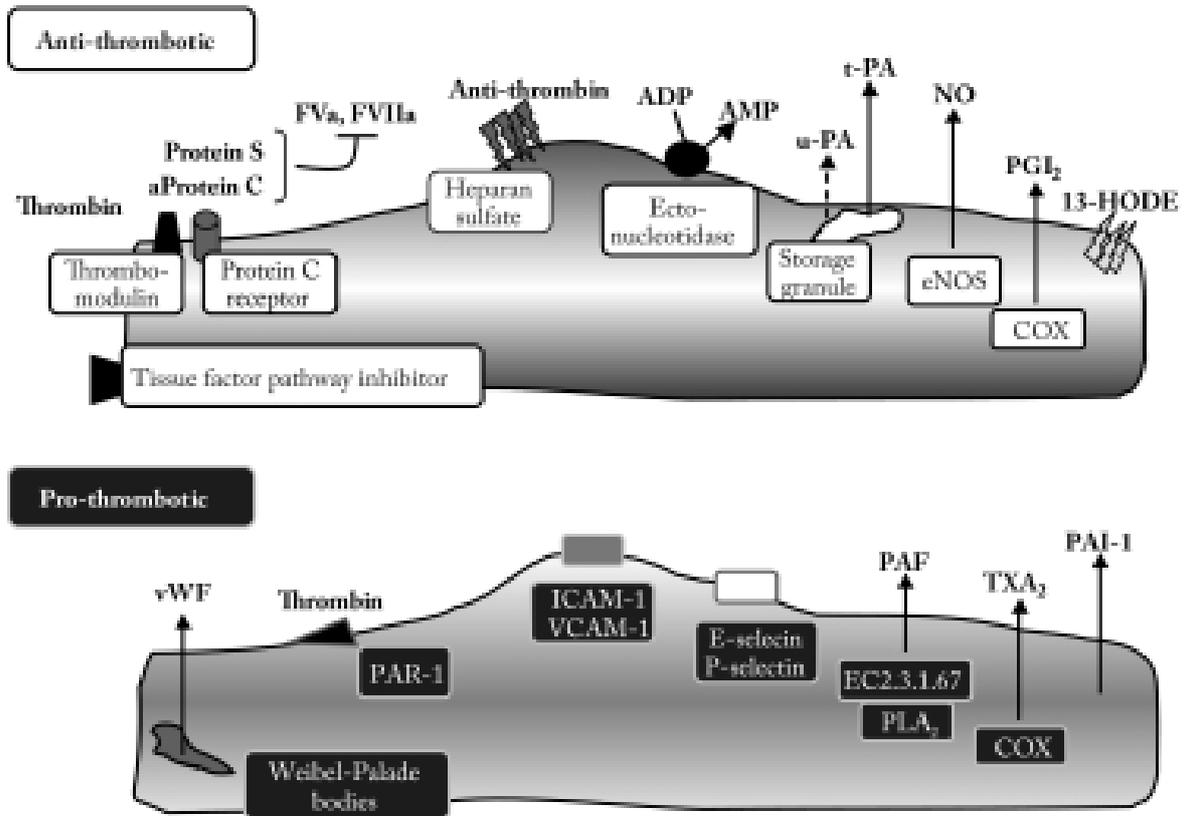


Figure 7 : Rôle des CE à l'interface entre l'hémostase primaire, la coagulation et la fibrinolyse (D'après Feletou., 2011)⁵²

En conditions normales, les CE ont un phénotype procoagulant [dégradation de l'ADP par une ectonucléotidase; inhibition de l'hémostase primaire (activation, adhésion et agrégation plaquettaire) par expression de l'acide 13-hydroxyoctadécadiénoïque (13-HODE), libération de PGI₂, et de NO], et un phénotype anticoagulant [expression de la TM et du système protéine C/S; expression de l'inhibiteur de la voie du FT et la fixation/activation de l'antithrombine aux glycosaminoglycanes (héparane sulfate)] et un phénotype profibrinolytique [libération de t-PA et, de u-PA] (Panel supérieur).

Après une lésion vasculaire et dans des conditions pathologiques, le phénotype endothélial se modifie. Il y a libération de vWf, de TXA₂ et de PAF. Expression de molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1, ESelectine, P-Selectine), et production de PAI-1, qui empêche la fibrinolyse en inhibant le t-PA et u-PA (Panel inférieur).

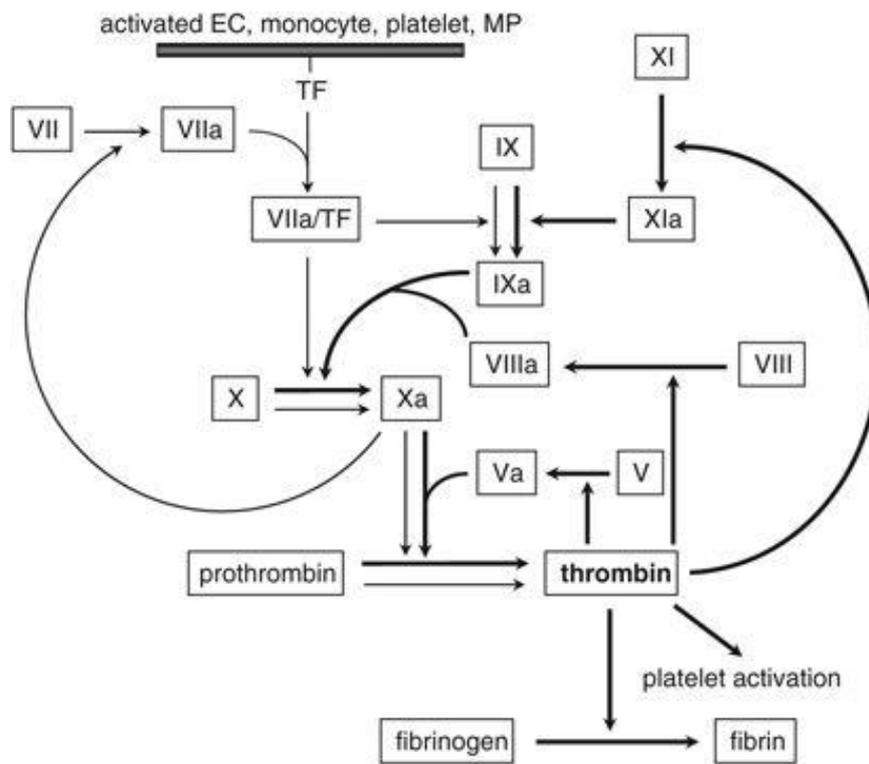


Figure 8 : La cascade de coagulation (D'après Cowan, 2000)⁶²

1.2.3.2.3 Contrôle de la fibrinolyse

Cette dernière phase intervient après la coagulation pour éliminer le clou hémostatique formé de fibrine et, d'une façon générale, tous les dépôts fibrineux qui peuvent se former dans l'organisme quelle que soit leur localisation.

L'endothélium est physiologiquement pro-fibrinolytique. En effet le principal activateur intravasculaire de la fibrinolyse, l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA), est une protéase libérée par les CE qui permet la transformation du plasminogène en plasmine. Cette réaction a lieu soit sur un caillot plaquettaire soit sur une surface cellulaire, l'endothélium. L'activateur du plasminogène de type urokinase (u-PA) qui est un autre activateur du plasminogène peut également être synthétisé et libéré par les CE, par exemple en réponse à des cytokines ou des facteurs de croissance. Le t-PA et l'u-PA ont donc des rôles majeurs dans la fibrinolyse mais leurs activités sont fortement régulées. En condition d'activation par divers stimuli, tels que la thrombine et les endotoxines, les CE peuvent sécréter le principal inhibiteur du t-PA, le PAI-1 (plasminogen activator inhibitor 1) dans le sang circulant ce qui neutralise l'activité fibrinolytique du t-PA et de l'u-PA produite par d'autres cellules que la CE (**Figure 7**).

1.2.3.3 Contrôle de l'inflammation

L'interaction des monocytes/neutrophiles avec les CE est médiée par des molécules d'adhésion qui régulent le trafic leucocytaire du compartiment sanguin vers le compartiment tissulaire. Ce recrutement leucocytaire au niveau endothélial se fait en quatre étapes : attachement des cellules par une liaison réversible permettant le roulement des cellules à la surface de l'endothélium, puis activation des cellules adhérentes avec une adhésion qui devient irréversible et résistante au flux, et enfin diapédèse des leucocytes entre les CE pour exercer leurs fonctions dans les tissus sous-jacent. L'intégrité du glycocalyx est primordiale lors de ce processus, en effet les molécules d'adhésion responsables de l'adhésion des leucocytes conduisant à une extravasation dans des conditions physiologiques sont enchâssées dans le glycocalyx, les empêchant ainsi d'adhérer aux leucocytes. Alors que dans des conditions inflammatoires comme le sepsis, les cytokines et les espèces réactives induisent le clivage du glycocalyx, exposant par conséquent les molécules d'adhésion qui initient l'adhésion aux leucocytes, entraînant une transmigration vers les tissus.

Des molécules d'adhésion différentes interviennent au cours de chaque étape de ce processus. Les premières interactions transitoires et réversibles entre les leucocytes et

l'endothélium sont médiées par la liaison de la E-, P- ou L-sélectine avec leurs ligands comme le PSGL-1 (P-sélectine glycoprotéine ligand). Le PSGL-1 présent sur les leucocytes se lie à la fois à l'endothélium et aux E- et P-sélectine. La P-sélectine est stockée dans des corps de Weibel-Palade, les stimuli inflammatoires induisant son exposition rapide à la surface endothéliale apicale, alors que la E-sélectine est synthétisée *de novo* à la suite d'une stimulation pro-inflammatoire⁶⁷.

Au cours de l'étape d'activation induite par les chimiokines, la liaison de faible affinité se transforme en adhésion à haute affinité des leucocytes aux CE via l'interaction des intégrines leucocytaires comme $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$, $\alpha M\beta 2$ et $\alpha L\beta 2$ et leur ligands endothéliaux ICAM-1 et ICAM-2 (Intercellular Adhesion Molecule) et VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule)⁶⁸.

La dernière étape de transmigration (diapédèse) est médiée par PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule) qui est un membre de la superfamille des immunoglobulines exprimé à la fois par les leucocytes, les plaquettes et les jonctions interendothéliales⁶⁹. Cependant, une transmigration inversée des neutrophiles a été mise en évidence *via* la molécule d'adhésion JAM-C (Junctional Adhesion Molecule C) qui peuvent ainsi disséminer l'inflammation systémique. Ce phénomène a notamment été observé *in vivo* dans un modèle d'ischémie reperfusion⁷⁰.

1.2.3.4 Contrôle de la perméabilité vasculaire

Une régulation précise de la perméabilité endothéliale est cruciale afin de maintenir une homéostasie circulatoire et les fonctions physiologiques des divers organes. Le transport à travers la barrière endothéliale peut s'effectuer *via* deux voies différentes : la voie trans-cellulaire et la voie para-cellulaire⁷¹.

La perméabilité trans-cellulaire consiste au transport à travers la cellule endothéliale par le biais de cavéoles. Les cavéoles ont été identifiées et définies pour la première fois en 1953 grâce à la microscopie électronique comme des fosses de 60 à 80nm de diamètre au sein de la membrane plasmique. Ce sont des vésicules résultant de l'invagination de la membrane plasmique et ayant la forme de flasque où la cavité est reliée au milieu extracellulaire *via* le col. Les cavéoles interviennent dans la transcytose c'est-à-dire qu'elles permettent de transvaser le cytoplasme d'une cellule d'une région extracellulaire à une autre région extracellulaire à une particule ou une substance comme l'albumine, le fer, l'insuline, les chimiokines, la transferrine.

La perméabilité para-cellulaire est régulée quant à elle par les jonctions cellules-cellules comme les jonctions inter-endothéliales dont la fonction principale est de restreindre le libre passage de macromolécules ayant un diamètre égal ou supérieur de 3 nm et d'assurer le transport des molécules de moins de 3 nm entre les cellules.

La perméabilité dépend des propriétés adhésives des protéines provenant des jonctions serrées (tight junctions), des jonctions adhérentes (adherens junctions) et les jonctions communicantes. Les jonctions serrées sont fortement présentes dans les endothéliums où le contrôle des échanges entre le sang et les tissus est stricte comme le cerveau ou les artères de gros calibres. Les jonctions adhérentes sont présentes tout le long de l'arbre vasculaire et jouent un rôle primordial dans la mise en place initiale de la monocouche de l'endothélium.

1.2.4 Endothélium et sepsis

La défaillance vasculaire est caractérisée par une diminution du tonus artériel (vasoplégie) et une hyporéactivité vasculaire avec une moindre sensibilité aux agents vasopresseurs. Il en résulte une vasodilatation et une hypotension artérielle persistante pouvant conduire au décès du patient. Dans de nombreux modèles expérimentaux de choc septique, il a été montré que l'activation de l'endothélium vasculaire, ainsi que son atteinte fonctionnelle et morphologique, étaient à l'origine de la survenue du syndrome de défaillance multiviscérale. La dysfonction endothéliale semble être le point de départ de cette défaillance vasculaire.

1.2.4.1 Dysfonction endothéliale

Les modifications structurales et fonctionnelles de la cellule endothéliale sont des phénomènes centraux de ces altérations et la cause première des dysfonctions d'organe induites par le sepsis (**Figure 9**).

Au cours du sepsis l'endothélium devient perméable et perd sa fonction de barrière. La perte de fluide dans l'espace extravasculaire entraîne la formation d'œdème dans plusieurs organes comme les poumons, le rein et le cerveau. Des modifications structurelles caractéristiques des CE sont notées au cours du sepsis, telles qu'un détachement des CE de la membrane basale à l'origine d'un œdème sous-endothélial, une vacuolisation nucléaire, une protrusion et une fragmentation cytoplasmique. Le délai d'apparition varie de quelques minutes, en cas d'injection de lipopolysaccharide, à plusieurs heures pour le modèle par CLP (Caecal Ligation

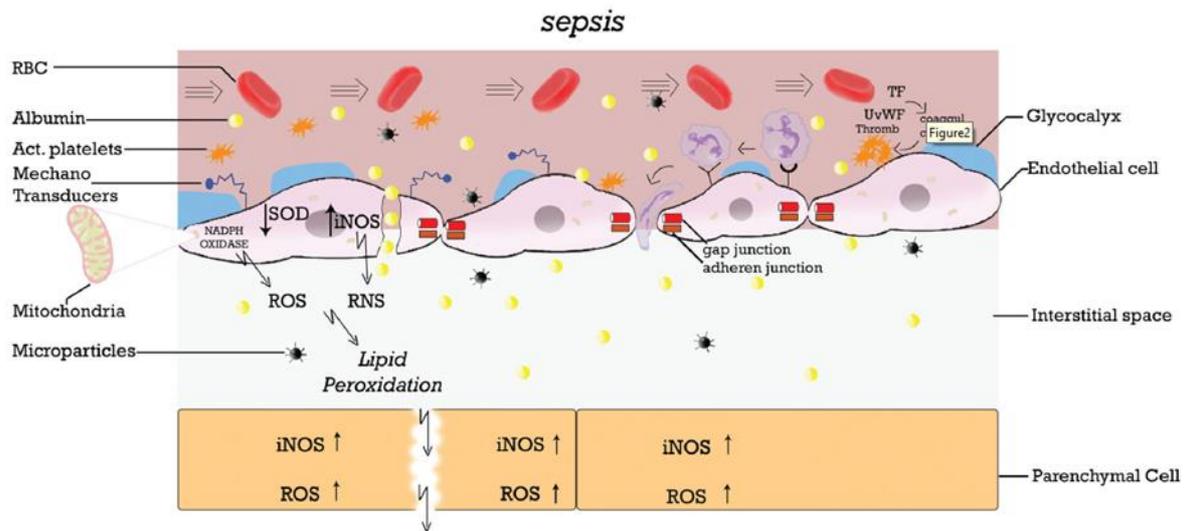


Figure 9 : L'endothélium au cours du sepsis (D'après Ince et al., 2017)⁴⁶

Représentation schématique de l'effet du sepsis sur l'endothélium entraînant son altération fonctionnelle (perte de la fonction de barrière vasculaire, modification du tonus vasculaire et perturbation hémostatique). La destruction du glycocalyx entraîne l'exposition des molécules d'adhésion responsables de la capture et de la transmigration des leucocytes activés et l'activation des composés hémostatiques en faveur d'un état pro-coagulant. La fonction de barrière de l'endothélium est compromise par la destruction directe de la membrane due à la peroxydation lipidique induite par les ROS/RNS. La perturbation du tonus vasomoteur est dû à la perte de fonction du système mécano transducteur et de la surproduction de monoxyde d'azote (NO) médiée par la iNOS. La destruction endothéliale entraîne également la libération de microparticules contribuant à l'effet pathogène du sepsis sur l'endothélium.

ROS : Reactive Oxygen Species ; RNS : Reactive Nitrogen Species ; iNOS : inducible Nitric Oxide Synthase

and Perforation). Par conséquent, le nombre de cellules endothéliales circulantes augmente, proportionnellement à la sévérité de l'agression microvasculaire.

Mais il y a également au cours du sepsis des changements fonctionnels des CE. En effet la libération des médiateurs de l'inflammation (TNF α , IL-1, interféron, dérivés réactifs de l'oxygène) par les leucocytes et l'hypoxie augmentent l'apoptose des CE. Les CE apoptotiques vont alors exprimer des molécules d'adhésion (ICAM et VCAM) et relarguer des dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) ce qui va amplifier le recrutement de leucocytes. L'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion peut être directement reliée à l'activation/dysfonction de l'endothélium. Cela favorise le rolling et l'adhérence des neutrophiles à l'endothélium et aboutit à leur diapédèse dans les tissus sous-jacents. Cette accumulation des neutrophiles est en partie bénéfique car elle permet l'élimination des agents infectieux mais elle peut aussi aggraver les dommages tissulaires par la production des médiateurs de l'inflammation (cytokines, DRO, protéases). Les molécules oxydantes produites sont responsables des modifications structurales des CE et altèrent l'intégrité de la barrière endothéliale favorisant ainsi l'augmentation de la perméabilité endothéliale, déjà augmentée par le processus inflammatoire⁷² (**Figure 10**).

En effet, au cours du sepsis, la perturbation au niveau de la barrière endothéliale conduit au passage des protéines et de solutés en dehors de la circulation et aboutit à la formation d'œdèmes⁷³. De nombreux médiateurs sont impliqués dans le maintien des fonctions de barrières vasculaires comme la bradykine, l'histamine, le PAF et le VEGF. Ces facteurs sont connus pour augmenter la perméabilité vasculaire, et il a été reporté qu'au cours du sepsis ces médiateurs ainsi que leurs récepteurs étaient up-régulés^{74,75}. D'autre part, plusieurs molécules issues des plaquettes comme la sérotonine, l'angiopoietine-1, la sphingosine-1-phosphate (SIP) améliorent les propriétés de la barrière endothéliale.

Les CE sont fortement hétérogènes en termes de morphologie et de fonction du fait de la grande diversité entre les vaisseaux (artères, artérioles, capillaires, veinules et veines)⁴⁴, mais aussi entre les organes. Une telle diversité se reflète dans l'hétérogénéité de la réponse des différents organes au choc septique.

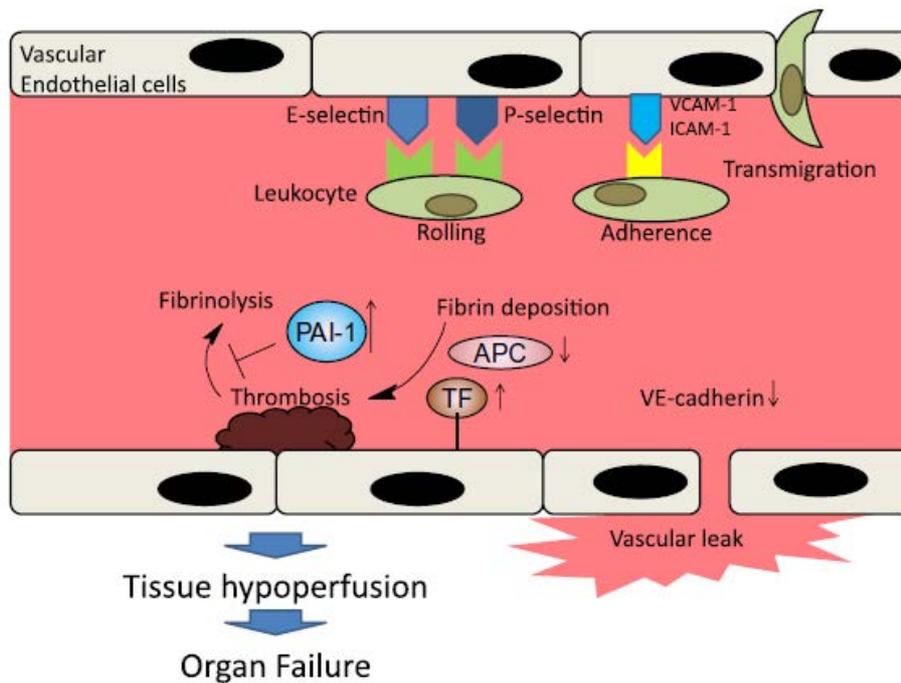


Figure 10 : Représentation schématique de la dysfonction endothéliale au cours du choc septique (D'après Hattori and al., 2017)⁷⁶

Les cellules endothéliales activées sécrètent des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines et expriment des molécules d'adhésion ce qui facilite le « rolling » des leucocytes, leur adhésion et leur transmigration dans les tissus. Il y a également formation d'un thrombus microvasculaire dû à l'activation simultanée des mécanismes de coagulation suite à l'activation du facteur tissulaire et à l'altération des mécanismes anticoagulants (réduction de l'activité de la protéine C activée (APC) et libération accrue de PAI-1. L'oxygénation tissulaire est encore altérée par la perte des fonctions de la VE-cadhérine. Ces modifications entraînent une hypoperfusion tissulaire ce qui contribue au développement de la défaillance d'organe.

1.2.4.2 *Atteinte du tonus vasculaire*

L'instabilité hémodynamique survenant au cours des états infectieux graves est la conséquence d'un déséquilibre du tonus vasomoteur et d'une fuite plasmatique interstitielle. La dysfonction endothéliale, et plus particulièrement les perturbations de la production de NO, est la principale cause de l'insuffisance circulatoire. Cependant, les perturbations de la production de NO au cours du sepsis sont complexes et évolutives. On observe dans un premier temps une « nitrosopénie » c'est-à-dire une diminution de la production de NO par la eNOS⁷⁷. Ce phénomène peut être dû à des modifications des récepteurs de surface, des défauts de transduction du signal ou des altérations quantitatives ou qualitatives de la eNOS. En effet, il a été montré in vitro qu'il y avait une down régulation de l'ARNm de la eNOS lorsque les CE étaient stimulées par du LPS ou du TNF⁷⁸.

Dans un second temps, on observe une augmentation de la production de NO par la iNOS. Cette grande quantité de NO relarguée par les CML et les CE entraîne une diminution du tonus vasculaire et de la réactivité aux agents vasopresseurs. En effet le NO produit va, de façon paracrine, réagir avec le groupement héminique de la guanylate cyclase. Cette enzyme catalyse la formation de GMPc dans les CML. GMPc active alors la phosphatase de la chaîne légère de myosine, permettant le relâchement de l'appareil contractile de la cellule musculaire lisse entraînant ainsi une vasodilatation plus diffuse de la microcirculation et donc une chute de la pression artérielle. Par ailleurs, des concentrations élevées de NO peuvent directement activer les canaux potassium calcium-dépendants, hyperpolarisant la membrane des CML et entraînant une vasodilatation.

D'autres effets délétères de la surproduction du NO ont été considérés dans la physiopathologie du choc septique. En effet, le NO va se lier à des enzymes (Protein nitrosylation) ce qui entraîne des dommages cellulaires, stimuler les macrophages et le burst oxydatif des neutrophiles, et inhiber de fonction mitochondriale. Le NO peut interagir avec le radical superoxyde et être à l'origine de la surproduction de peroxy-nitrite, puissant agent oxydant et inhibiteur de la respiration mitochondriale, aboutissant ainsi à la réduction de la glycolyse et de la production d'ATP⁷⁹.

1.2.4.3 Altération de la relaxation endothélium dépendante au cours du sepsis

L'atteinte de la réactivité vasculaire a été mise en évidence dans plusieurs études utilisant des modèles animaux de choc septique. Une atteinte de la relaxation endothélium dépendante est observée sur des vaisseaux d'animaux septiques. Cette défaillance observée peut être le résultat de plusieurs mécanismes : altération des récepteurs de surface endothéliaux, modification de la voie de transduction des récepteurs, découplage de la eNOS, et altération de la fonction et de l'expression de la eNOS par les peroxy-nitrites. En effet, *in vitro*, la stimulation de cellules endothéliales par le TNF α ou le LPS induit une down-régulation de l'ARN messager de la eNOS . Ces changements dans la voie de signalisation de la eNOS suggèrent une diminution de la production de NO par la eNOS. La diminution de la synthèse endothéliale des molécules vasorelaxantes NO et PGI₂ contribue également aux anomalies de perfusion, même si l'induction des enzymes iNOS et COX-2 permet, au moins théoriquement, de relayer secondairement le défaut de production initial de NO et de PGI₂⁸⁰.

1.3 Les plaquettes

1.3.1 Histologie

Les plaquettes sont des cellules anucléées provenant de la segmentation du cytoplasme des mégacaryocytes. Les mégacaryocytes possèdent à l'intérieur de leur cytoplasme des membranes de démarcation, qui apparaissent au cours de la maturation. Ces membranes vont délimiter les futures plaquettes. Chaque mégacaryocyte produit 2000 à 5000 plaquettes environ. Le nombre de plaquettes circulantes chez l'adulte est de $150 \text{ à } 400 \cdot 10^9/\text{L}$. Leur durée de vie est de 8 à 10 jours chez l'homme et de 3 à 4 jours chez la souris. Leur destruction se fait par les macrophages du système réticulo-histiocytaire de la rate, du foie, de la moelle osseuse. Les plaquettes circulent à l'état non activé sous forme discoïde, avec un diamètre de $2 \mu\text{m}$ et un volume de $7 \text{ à } 12 \mu\text{m}^3$ chez l'homme et de $5 \mu\text{m}^3$ chez la souris. Les plaquettes sont hétérogènes en termes de taille ou de forme. Lors de l'activation plaquettaire leur morphologie arrondie ou ovale se modifie : elles deviennent sphériques et émettent des pseudopodes. La microscopie électronique a permis de mettre en évidence trois régions principales dans la plaquette : la membrane plasmique, le cytosquelette et les organelles.

Comme pour les autres types cellulaires, la membrane plaquettaire est constituée d'une bicouche phospholipidique. Les phospholipides anioniques, et notamment la phosphatidylsérine, sont situés sur le feuillet interne de la membrane plaquettaire au repos et sont externalisés suite à l'activation plaquettaire, recrutant et concentrant les facteurs de la coagulation. La composition de la membrane plaquettaire en glycoprotéines dépend du stade d'activation. De plus, la membrane présente des invaginations ouvertes sur l'extérieur formant le système canaliculaire ouvert (SCO). Le SCO permet l'endocytose de substances plasmatiques et favorise la libération du contenu des granules.

Le maintien de la forme discoïde des plaquettes au repos est assuré par un cytosquelette intracellulaire organisé en un réseau flexible. Le cytosquelette de la plaquette est principalement composé de microtubules (majoritairement la tubuline $\beta 1$), de polymères d'actine et de protéines qui leurs sont associées. Au cours de l'activation plaquettaire, il y a redistribution des protéines du cytosquelette et réorganisation des filaments d'actine, qui s'associent à la myosine pour générer l'activité contractile nécessaire à la sécrétion.

Les organelles des plaquettes comprennent des mitochondries, des grains de glycogène et des granules de sécrétion. En effet, le cytoplasme des plaquettes renferme des granulations de

trois types : les granules α , δ et λ . Les granules sont entourés d'une membrane et lors de l'activation plaquettaire, il y a libération du contenu à l'extérieur de la cellule après fusion avec les membranes cellulaires. Les granules α sont de grande taille et les plus nombreux (entre 20 à 200 par plaquette). Ils sont le principal réservoir de protéines qui jouent un rôle important dans la coagulation, l'inflammation, la cicatrisation ou les relations cellule-matrice. On retrouve notamment des facteurs plaquettaires spécifiques (PF4, β -thromboglobuline), des glycoprotéines adhésives parmi lesquelles le fibrinogène et le facteur Willebrand, des facteurs de la coagulation (FV, FXI, FXIII), des facteurs de croissance (PDGF, TGF- β , EGF, FEGF...), des inhibiteurs de la fibrinolyse, de l'albumine, des immunoglobulines, et la P-sélectine. Les granules δ ou denses sont plus petits et moins nombreux (entre 2 à 10 par plaquette). Ces granules renferment une grande quantité de calcium et de sérotonine ainsi que de l'ADP et de l'ATP ce qui permet la stabilisation de l'agrégation plaquettaire et le recrutement des plaquettes circulantes. Les granules λ ou lysosomes contiennent des hydrolases acides ainsi que des protéases ; elles jouent un rôle important dans l'initiation de la lyse des thrombi.

1.3.2 Fonctions

Les plaquettes sanguines s'activent rapidement au contact d'une paroi vasculaire lésée, changent de forme, s'étalent sur la surface, sécrètent le contenu de leurs granules, recrutent des plaquettes circulantes pour former un clou hémostatique, composé principalement de plaquettes mais aussi de fibrine produite au contact des plaquettes activées par la thrombine générée localement.

On distingue classiquement plusieurs phases de l'activation plaquettaire à savoir l'adhérence initiale, l'activation au contact de la paroi lésée, la sécrétion et l'amplification de l'activation et enfin, l'agrégation des plaquettes entre elles (**Figure 11**).

La voie finale commune mène à l'activation de l'intégrine α IIb β 3 (aussi appelée glycoprotéine IIb/IIIa (GPIIb/IIIa)). L'intégrine α IIb β 3 est l'intégrine majoritaire des plaquettes (entre 50 000 à 100 000 copies par plaquette), elle joue un rôle central dans l'agrégation plaquettaire. Ce rôle est lié à sa capacité à modifier sa conformation d'une forme inactive de basse affinité à une forme de haute affinité pour ses ligands qui sont principalement le fibrinogène plasmatique et le vWF, permettant ainsi l'agrégation des plaquettes entre elles.

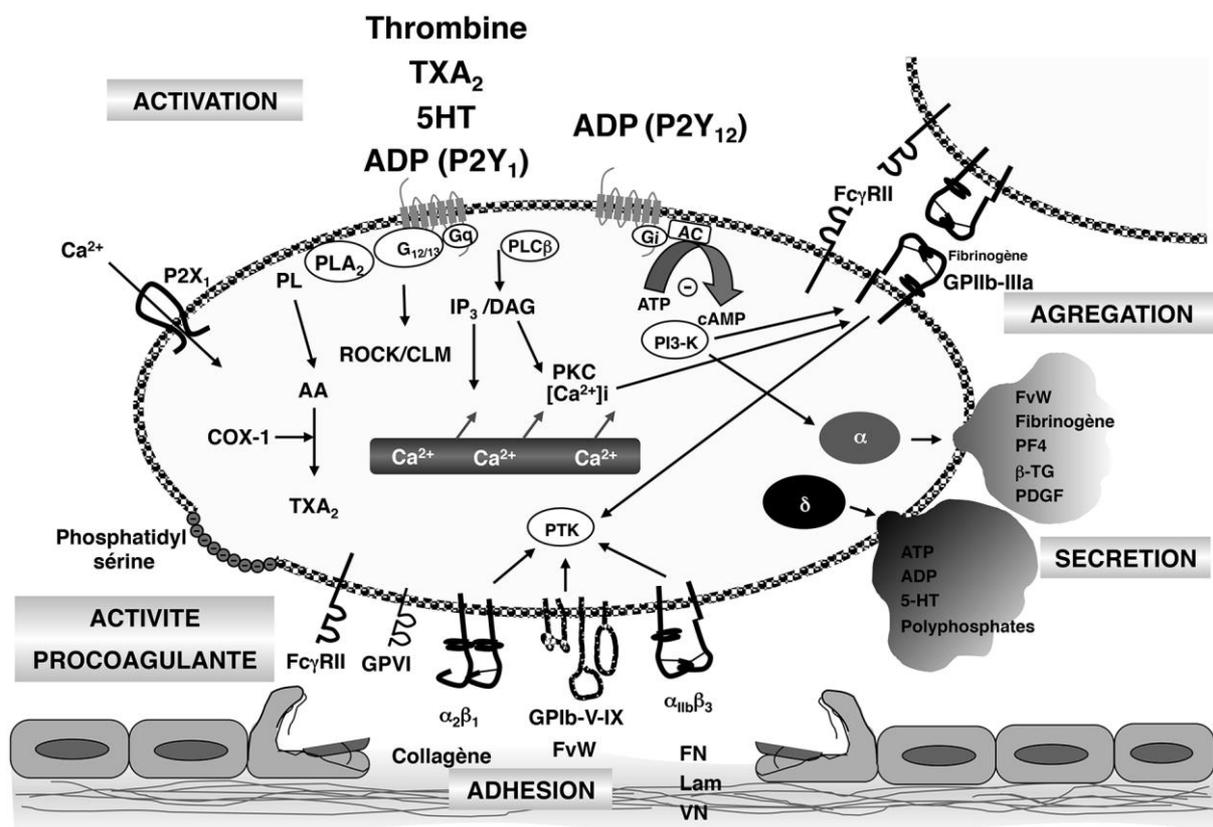


Figure 11 : Représentation schématique des grandes voies d'activation des plaquettes sanguines (D'après Gachet., 2013).⁸¹

Comme toutes les intégrines, l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ a une structure en hétéro dimère d'une sous-unité α et d'une sous unité β . La sous -unité αIIb est restreinte à la lignée mégacaryocytoplaquettaire tandis que la sous-unité β3 est ubiquitaire. Chaque sous-unité est composée d'une grande portion extracellulaire, d'un seul domaine transmembranaire et d'une courte queue cytoplasmique. Les portions intracellulaires proches de la membrane plasmique et les domaines transmembranaires des deux sous-unités forment un complexe qui contraint l'intégrine dans sa conformation de repos. C'est la disjonction de ce complexe qui induit l'activation de l'intégrine et sa capacité à lier le fibrinogène. Ce mécanisme de jonction/disjonction est régulé par de nombreux partenaires de liaison des queues cytoplasmiques parmi lesquels la taline et les protéines de type kindlin jouent un rôle majeur pour déclencher l'événement ultime d'activation de l'intégrine⁸². Ce mécanisme d'activation est appelé « inside-out signaling ». Lorsque l'intégrine modifiée est occupée par ses ligands, d'importants phénomènes de signalisation de l'extérieur vers l'intérieur de la plaquette ont lieu, appelés « outside-in signaling », qui ne sont pas moins importants pour la fonction hémostatique des plaquettes. Ces mécanismes régulent les fonctions liées à l'ancrage et à l'étalement des plaquettes aux protéines de matrice de la paroi vasculaire lésée, la stabilité de l'agrégat plaquettaire et le phénomène de rétraction du caillot.

Les plaquettes peuvent être considérées comme des sentinelles du réseau vasculaire de par l'éventail d'immunorécepteurs fonctionnels et d'intégrines qu'elles possèdent mais également de par leur nombre très élevé dans la circulation sanguine. L'engagement de ces récepteurs déclenche, en marge de la réponse hémostatique, la libération de cytokines/chimiokines importantes dans l'amplification de la réponse immunitaire. De plus elles participent également aux actions mises en œuvre contre les agents infectieux puisqu'elles sont capables d'alerter le système immunitaire.

1.3.3 Plaquettes et sepsis

1.3.3.1 Interactions plaquettes, cellules endothéliales et neutrophiles

De nombreuses études ont souligné le rôle central de l'endothélium au cours du sepsis, la dysfonction endothéliale semble être le point de départ des complications associées au sepsis à savoir les multiples dysfonctions d'organe. Cependant les plaquettes activées contribuent aussi l'apparition de ses dysfonctions d'organe *via* leur rôle dans l'inflammation et la coagulation. En effet, de nombreux signaux comme les pathogènes et les médiateurs générés

par l'inflammation et la coagulation activent les plaquettes au cours du sepsis. Les plaquettes activées vont ainsi relarguer des vésicules comme des microparticules plaquettaires et des exosomes (**Figure 12**). Les plaquettes représentent la source majeure microparticules circulantes^{83,84}.

Par exemple au niveau pulmonaire, les lésions de l'endothélium vasculaire sont la cause primaire de l'altération de la barrière alvéolo-capillaire menant à l'œdème pulmonaire⁸⁵. Les plaquettes sont séquestrées au niveau des lits micro-vasculaires pulmonaires ce qui contribue à l'insulte initiale de l'endothélium pulmonaire. L'activation des CE par les stimuli inflammatoires comme les PAMPs entraîne l'accumulation et de l'activation des plaquettes ce qui va contribuer à l'entretien de la cascade pro-inflammatoire et pro-coagulantes dans les poumons. Les interactions plaquettes/neutrophiles sont également importantes dans l'apparition des dysfonctions d'organe. L'afflux de neutrophiles est un événement caractéristique au cours du sepsis et leurs activations inappropriées entraînent de nombreuses lésions tissulaires. En effet, les plaquettes favorisent le recrutement et l'activation des neutrophiles ce qui déclenche la libération de cytokines, chimiokines, de dérivés réactifs de l'oxygène et à la formation de NETs (Neutrophil Extracellular Traps)⁸⁶. En effet, les neutrophiles sont capables de relarguer le contenu de leur noyau, ADN et histones, formant un maillage qui supporte des enzymes comme la myéloperoxidase ou l'élastase. Ces structures, décrites pour la première fois en 2004, sont appelées NETs et sont capables de capturer des pathogènes dans leur réseau macromoléculaire⁸⁷. Les NETs exercent une fonction antimicrobienne en piégeant bactéries et mycètes, mais pourraient également avoir un rôle dans la thrombino-formation. Ainsi, les NETs semblent être un acteur majeur d'un nouveau concept appelé immunothrombose⁸⁸.

De plus, les plaquettes ont un rôle différentiel dans le contrôle de l'intégrité de la barrière vasculaire. Le concept démontrant le rôle protecteur des plaquettes vis-à-vis de la barrière endothéliale repose sur des études montrant qu'une thrombopénie sévère s'accompagne d'une augmentation de la perméabilité des capillaires^{89,90}. Cependant d'autres études montrent qu'une déplétion en plaquette protège de l'atteinte pulmonaire dans plusieurs modèles animaux^{91,92}.

Les plaquettes jouent donc un rôle central *via* leurs interactions avec l'endothélium et les neutrophiles dans l'apparition des dysfonctions d'organes associés au sepsis (**Figure 13**).

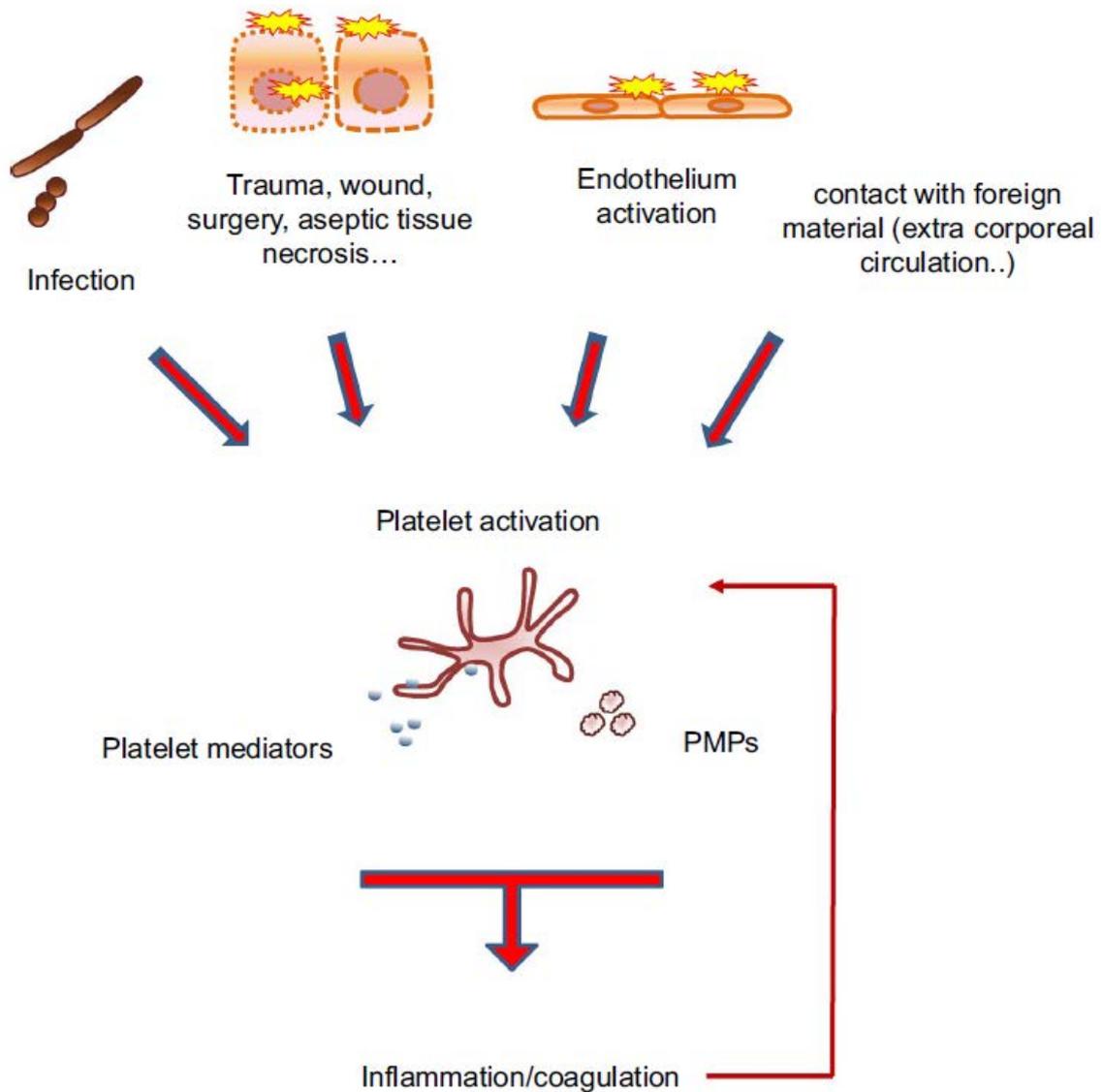


Figure 12 : Présentation des différents signaux capables d'induire l'activation de la plaquette (D'après Dewitte et al, 2017)⁸³

Les plaquettes sont activées par différents signaux générés lors d'une situation de danger pour l'organisme. L'interaction avec les agents pathogènes, les lésions tissulaires/endothéliales et l'interaction avec des substances étrangères activent les plaquettes. L'activation plaquettaire déclenche plusieurs réponses comprenant les voies de l'inflammation et de la coagulation. Les signaux générés par l'inflammation et la coagulation peuvent, en retour, activer les plaquettes (flèche fine).

PMPs : microparticules plaquettaires

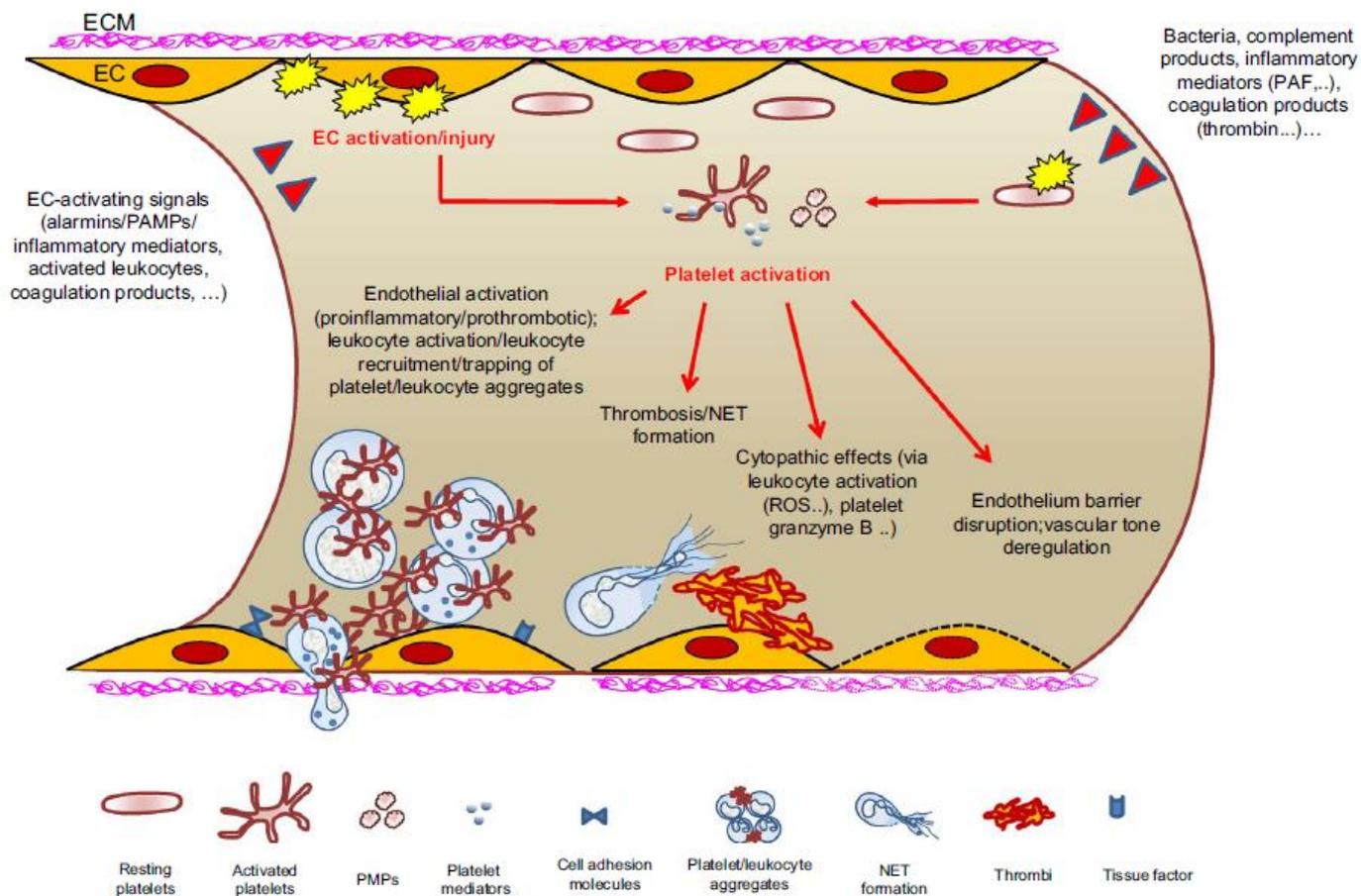


Figure 13 : Représentation schématisée du rôle clé des plaquettes à l'interface entre l'endothélium et les neutrophiles au cours du choc septique (D'après Dewitte et al, 2017)⁸³

Présentation schématisée des différents événements physiologiques impliquant les plaquettes dans l'altération de la barrière endothéliale et l'insuffisance microcirculatoire responsables des dysfonctionnements d'organe

ROS : Reactive Oxygen Species ; EC : Endothelial Cells ; NETs : Neutrophil Extracellular Traps ; PMPs : microparticules plaquettaires

1.3.3.2 *Coagulopathie*

Le sepsis est associé à une forte activation du système de coagulation, plus précisément à une augmentation des facteurs pro-coagulants et à une diminution des facteurs anticoagulants ce qui conduit à un déséquilibre de la balance coagulation/anticoagulation pouvant entraîner une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD). Ce syndrome se définit par l'association d'anomalies biologiques avec ou sans signes cliniques témoins de la formation accrue de thrombine et de fibrine, et d'une consommation excessive de plaquettes et de facteurs de la coagulation. En effet, des données datant du début des années 2000 montrent que 30 à 50% des patients en sepsis sévère présentent une CIVD^{93,94}.

Le FT est le principal moteur de l'activation de la coagulation au cours du sepsis⁹⁵. En effet, le LPS stimule la synthèse de facteur tissulaire par les cellules endothéliales, ce qui active la cascade de la coagulation et aboutit à la formation de thrombi microvasculaires. L'inhibition du FT chez les primates atténue fortement l'activation de la coagulation après la perfusion d'endotoxine ou de bactéries. L'inhibition du FT prévient également de la dysfonction d'organe et diminue la mortalité dans un modèle de sepsis léthal chez le babouin⁹⁵. L'effet protecteur induit par l'inhibition du FT n'est probablement pas dû qu'à une atténuation de la coagulation car des liens clairs existent entre la coagulation et l'inflammation.

En effet, les troubles de la coagulation liés au sepsis ont mis en avant le rôle des plaquettes dans la physiopathologie du sepsis, plus particulièrement au travers de leurs fonctions hémostatiques. Cependant, une des clés pour comprendre les mécanismes de la CIVD et ses conséquences est l'interaction entre la coagulation et l'inflammation⁵⁰. En effet, il apparait maintenant de façon claire que les plaquettes possèdent également une fonction inflammatoire. La thrombine joue un rôle amplificateur de la réaction inflammatoire au niveau microcirculatoire par interaction avec les PAR (Protease Activated Receptor) présents sur les plaquettes, les cellules endothéliales et les leucocytes⁹⁶. L'activation de ces cellules par les PAR augmente la synthèse de cytokines et de chémokines, du facteur activateur plaquettaire et l'expression de P-sélectine⁹⁷. Parmi les quatre sous-types de PARs identifiés, PAR1 est particulièrement impliqué dans le sepsis. PAR1 a des effets cytoprotecteurs lorsqu'il est stimulé par de faible quantité de thrombine ou par la protéine C activée. A l'inverse, des quantités importantes de thrombine perturbent la fonction de barrière endothéliale¹⁰. Ces interactions inflammation/coagulation constituent un cercle vicieux qui entretient la CIVD. De plus, les plaquettes participent également directement à l'amplification de l'inflammation

associée aux phases précoces du sepsis notamment *via* l'expression des TLRs à leur surface et par le large panel de molécules inflammatoires qu'elles peuvent libérer suite à une stimulation bactérienne⁹⁸.

Les dérivés réactifs de l'oxygène libérées en quantité massive lors de la phase aiguë du sepsis sont aussi responsables de la coagulopathie. Ainsi, chez des souris KO pour l'oxyde nitrique synthase (enzyme produisant les DRO) et chez lesquelles un sepsis est induit, la vasoconstriction est réduite par rapport aux souris sauvages. En favorisant la vasoconstriction, les DRO participent à l'altération de la circulation au niveau des capillaires sanguins. De plus, les DRO ont un effet direct sur l'activation hémostatique des plaquettes⁹⁹.

L'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion est un élément supplémentaire favorisant la coagulopathie. Dans des modèles d'endotoxémie, l'expression des molécules d'adhésion est augmentée aussi bien au niveau des membranes des plaquettes que des cellules endothéliales. L'adhésion des plaquettes à l'endothélium va ainsi favoriser une activation de ces deux types cellulaires et une accumulation des plaquettes conduisant à l'occlusion du vaisseau^{100,101}.

Après la phase d'activation de la coagulation s'ajoutent des mécanismes d'entretien et d'amplification de la thrombino-formation, d'inhibition de la fibrinolyse et une diminution des anticoagulants naturels qui contrôlent physiologiquement la formation de thrombine (**Figure 14**).

1.3.3.3 Thrombopénie

L'implication des plaquettes dans le sepsis se caractérise aussi par une thrombopénie fréquente mais pas constante chez les patients¹⁰²⁻¹⁰⁴. Plusieurs études ont montré que la thrombopénie était un marqueur prédictif du taux de mortalité des patients en soins intensifs, le sepsis étant le facteur de risque principal d'une thrombopénie en réanimation¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. En effet, il a été démontré dans une étude récente regroupant plus de milles patients qu'une thrombopénie dans les 24 premières heures du choc septique est associée à un risque accru de décès au 28^{ème} jour. Une numération plaquettaire est peu couteuse et facile à effectuer, elle peut ainsi devenir une alerte précoce pour le clinicien¹⁰².

Plusieurs mécanismes important expliquent la diminution du taux de plaquettes circulantes au cours du sepsis¹⁰⁸. La première hypothèse incrimine la coagulopathie induite par le sepsis

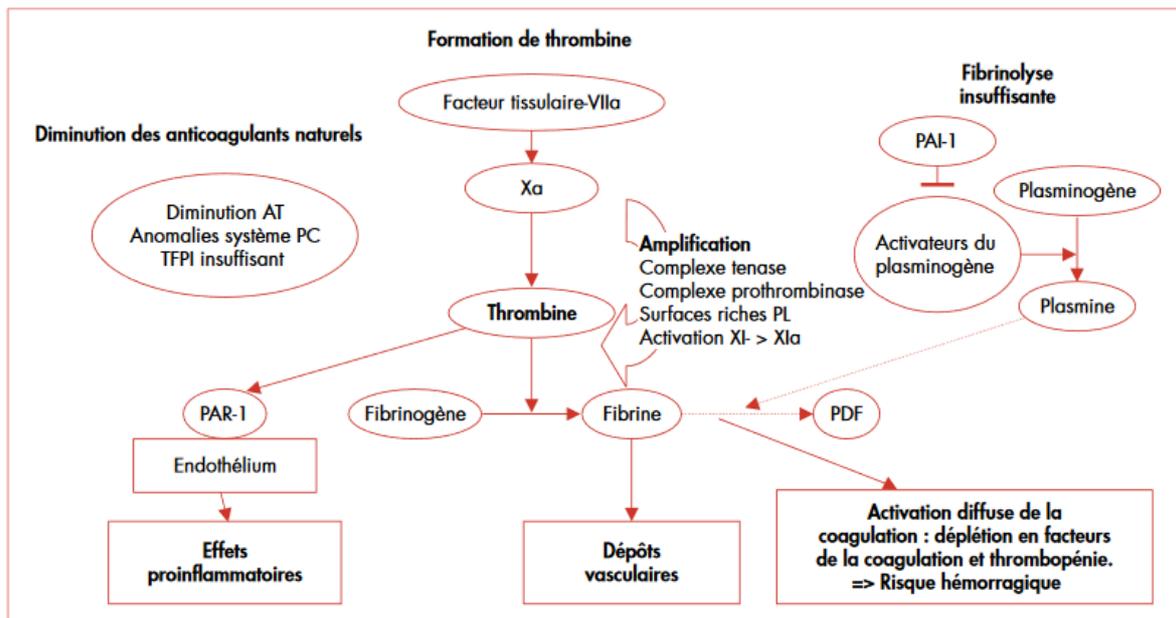


Figure 14 : Schéma simplifié de la physiopathologie de la CIVD (D'après Lerolle et al., 2007)¹¹⁰

La CIVD est caractérisée par une génération de thrombine non contrôlée suite à une exposition systémique et excessive du facteur tissulaire. La formation de thrombine provoque la conversion du fibrinogène en fibrine à l'origine des dépôts vasculaires, ainsi que la production endothéliale de l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA), permettant le déclenchement de la fibrinolyse qui vient normalement contrebalancer la fibrinogenèse. Suite à la phase d'activation de la coagulation se met en place plusieurs mécanismes d'entretien et d'amplification de la thrombinogénèse et d'inhibition partielle de la fibrinolyse : i) la thrombine amplifie sa propre production en activant les cofacteurs V et VII, en activant les plaquettes qui apportent une surface procoagulante et en transformant le facteur XI en XI activé ii) diminution des anticoagulants naturels iii) inactivation du t-PA par le PAI-1. L'interaction entre la coagulation et l'inflammation est un mécanisme clé de la CIVD, en effet la thrombine par l'intermédiaire de son récepteur tissulaire PAR-1 présent sur les CE active la production de cytokines et l'expression de molécules d'adhésion permettant le recrutement des cellules inflammatoires. Les deux conséquences majeures de la CIVD sont les défaillances multiviscérales et le risque d'hémorragie.

PAR-1 : protease activated receptor-1 ; PL : phospholipides ; PDF : produits de dégradation de la fibrine ; PAI-1 : plasminogen activator inhibitor-1 ; PC : protéine C ; AT : antithrombine ; TFPI : tissue factor pathway inhibitor

qui entraîne une CIVD. Ce syndrome qui entraîne la formation exagérée de thrombine et de fibrine déclenche une consommation excessive de plaquettes.

La deuxième hypothèse met en cause une destruction immunologique des plaquettes. En effet, des anticorps de type IgG associés aux plaquettes ont été décrits depuis plus de 30 ans et sont retrouvés chez 30 à 40% des patients septiques thrombopéniques¹⁰⁹. Ces anticorps associés aux plaquettes sont capables de se fixer sur les produits bactériens présents à la surface des plaquettes ; ils peuvent également se fixer sur une surface plaquettaire altérée ou se lier à des complexes immuns circulants. Les bactéries peuvent agir directement sur les plaquettes en favorisant leur agrégation et donc l'apparition d'une thrombopénie. En effet, la présence isolée d'endotoxine bactérienne est capable d'induire directement la formation d'agrégats plaquettaires. Ces agrégats sont alors captés par le système réticuloendothélial, et l'élimination des bactéries est ainsi favorisée. L'adhésion à l'endothélium vasculaire puis l'agrégation des plaquettes est également rapportée après une lésion de l'endothélium par une bactérie et/ou son endotoxine.

La dernière hypothèse expliquant la chute du nombre de plaquettes est l'hémophagocytose des plaquettes qui semble être favorisée par l'état pathologique du sepsis¹¹¹. On parle de syndrome d'activation macrophagique (SAM) pour également définir ce phénomène. Le SAM se caractérise par une prolifération non néoplasique et une activation anormale des macrophages à l'origine d'une phagocytose des éléments figurés du sang, en particulier au niveau médullaire. Selon l'intensité du phénomène, la traduction clinico-biologique peut aller de la simple thrombopénie jusqu'à une pancytopénie profonde.

1.4 TREM : Triggering receptor expressed on myeloid cells

La détection des pathogènes est garantie par les PRR, qui identifient des agents pathogènes spécifiques, activent les réponses immunitaires innées et sous-tendent l'immunité adaptative. Récemment, une nouvelle classe de récepteurs cellulaire a été identifiée : Triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM). Ces récepteurs sont des régulateurs importants de la réponse immunitaire, en raison de leur capacité à amplifier ou à diminuer les signaux induits par les PRR.

La famille TREM est un ensemble de récepteurs dont les gènes sont clustérisés sur le chromosome 6p21 chez l'homme¹¹² et sur le chromosome 17B3 chez la souris¹¹³. TREMs appartiennent à la superfamille des immunoglobulines (Ig-SF)¹¹⁴. Le gène codant TREM-1 a été découvert par l'équipe de Bouchon en 2000¹¹⁵. Au sein de cette famille de récepteurs, il existe au moins deux récepteurs activateurs, TREM-1 et TREM-2, et un récepteur inhibiteur, TLT-1 (TREM-like transcript-1, TREML1) (**Figure 15**).

1.4.1 Structure TREM-1

TREM-1 est une glycoprotéine transmembranaire comprenant un unique domaine extracellulaire de type immunoglobuline (Ig) de 181 acides aminés, une région transmembranaire avec un résidu chargé lysine de 25 acides aminés et une petite région intracellulaire dépourvue de tout motif de signalisation de 5 acides aminés. Le domaine extracellulaire de type Ig contient le motif DxGxYxC qui correspond à un domaine Ig de type V. Cette portion est connectée à la région transmembranaire par un fragment de 60 acides aminés qui comporte trois sites de N-glycosylation (**Figure 16**). Le résidu lysine de la région transmembranaire, qui est chargé positivement, s'associe avec un résidu acide aspartique chargé négativement appartenant à DAP12 (DNA-Activating Protein 12) : c'est ainsi qu'est formé le partenariat entre TREM-1 et sa molécule adaptatrice¹¹⁵.

Le domaine extracellulaire de TREM-1 peut aussi être trouvé sous forme soluble (sTREM-1) dans les fluides biologiques ou dans les surnageants de cultures cellulaires. Deux hypothèses sont mises en avant concernant son origine, la première fait référence à un épissage

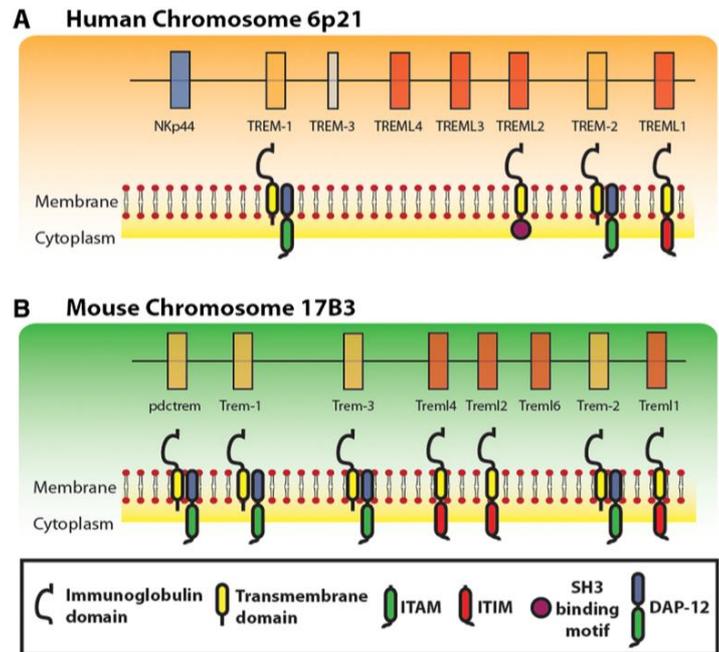


Figure 15 : Présentation du cluster de gène TREM chez l'homme et chez la souris (D'après Genua et al., 2014)¹¹⁶

Représentation schématique qui compare l'ordre des gènes dans le cluster TREM chez l'homme (A) et chez la souris (B). Les gènes codant pour la protéine TREM ont été dessinés en orange, tandis que les gènes codant pour TREML (TLT) sont représentés en rouge. La protéine correspondante est présentée en dessous du gène. La protéine adaptatrice DAP12 est illustrée avec son domaine ITAM alors que les protéines TLT sont illustrées avec leur domaine ITIM correspondant.

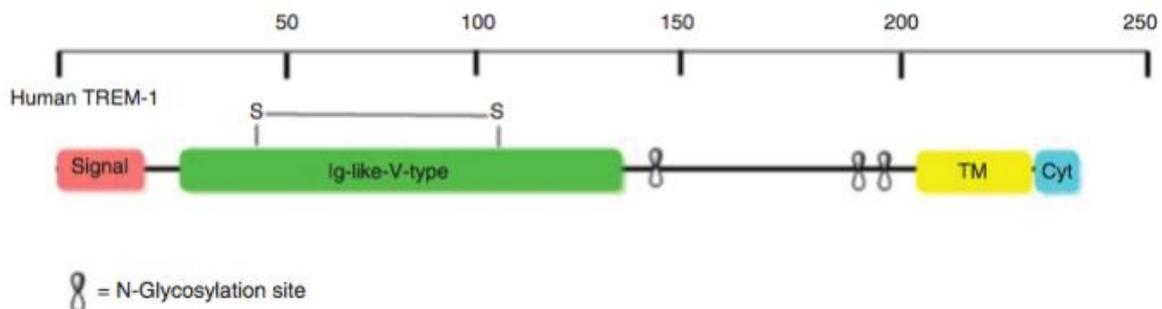


Figure 16 : Les différents domaines structuraux de TREM-1 (D'après Pelham et al., 2014)¹¹⁷

La représentation de protéine a été obtenue sur la base des séquences d'acides aminés d'UniProt et de Worldwide Protein Data Bank. Cyt: Cytoplasmic; Ig-like-V-type: Immunoglobulin-like variable-type; Signal: Signal peptide; S-S: ponts disulfures entre les résidus ; TM: Transmembrane; TREM: Triggering receptor expressed on myeloid cells.

alternatif¹¹⁸. La protéine produite dans ce cas a une taille de 17,5 kDa, comparée aux 27 kDa de la forme membranaire TREM-1. Suite à cette étude, un nouveau variant d'épissage de TREM-1 a été récemment décrit dans les granules de neutrophiles humains¹¹⁹. Cette isoforme, d'un poids moléculaire de 15 kDa, a été isolée à partir des fractions α et β des neutrophiles, riches en granules primaires et secondaires respectivement. Selon Baruah et *al.* la libération de ce TREM-1sv pourrait moduler la réponse inflammatoire en inhibant la migration des neutrophiles régulée par la forme membranaire de TREM-1 et agirait comme un récepteur leurre dans la circulation. La seconde hypothèse quant à l'origine de sTREM-1 fait référence à un clivage protéolytique médié par les métalloprotéinases¹²⁰. En effet, lorsque des monocytes sont traités avec du LPS, une augmentation du taux de sTREM-1 est observée alors qu'en présence d'inhibiteurs de métalloprotéinase ce taux est très nettement diminué (**Figure 17**). Deux études concernant la structure de TREM-1 ont été réalisées, la première basée sur la cristallographie aux rayons X suggère que TREM-1 en solution forme un unique dimère avec deux sites prédits pour la liaison du/des ligand(s)¹²¹. En revanche la deuxième étude basée sur la cristallographie aux rayons X et la RMN de TREM-1 murin et humain, suggère que TREM-1 existe aussi sous forme de monomère en solution avec cette fois ci un seul site prédit pour la liaison du/des ligand(s)¹²².

1.4.2 Fonction de TREM-1

TREM-1 est exprimé à la surface des polynucléaires neutrophiles, des macrophages et des monocytes matures, c'est-à-dire à la surface des principales cellules effectrices de l'immunité innée. En plus de ces cellules, TREM-1 est également exprimé à la surface de cellules non myéloïdes comme les cellules épithéliales¹²³. Malgré de nombreuses études sur ce sujet, le ligand naturel de TREM 1 est encore inconnu actuellement.

L'engagement de TREM-1, une fois associé à sa molécule adaptatrice DAP12, déclenche une voie de signalisation impliquant deux protéines kinase, ZAP 70 (Z-chain Associated Protein 70) et SYK (Spleen Tyrosine Kinase). En effet, la phosphorylation de DAP12 par les kinases Src permet le recrutement et l'activation de la kinase SYK. SYK, à son tour va activer les molécules de signalisation en aval, à savoir PI3K, PLC γ (Phospholipase C gamma), ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinases 1/2) et MAP (Mitogen-Activated Protein) kinases ce qui va entraîner

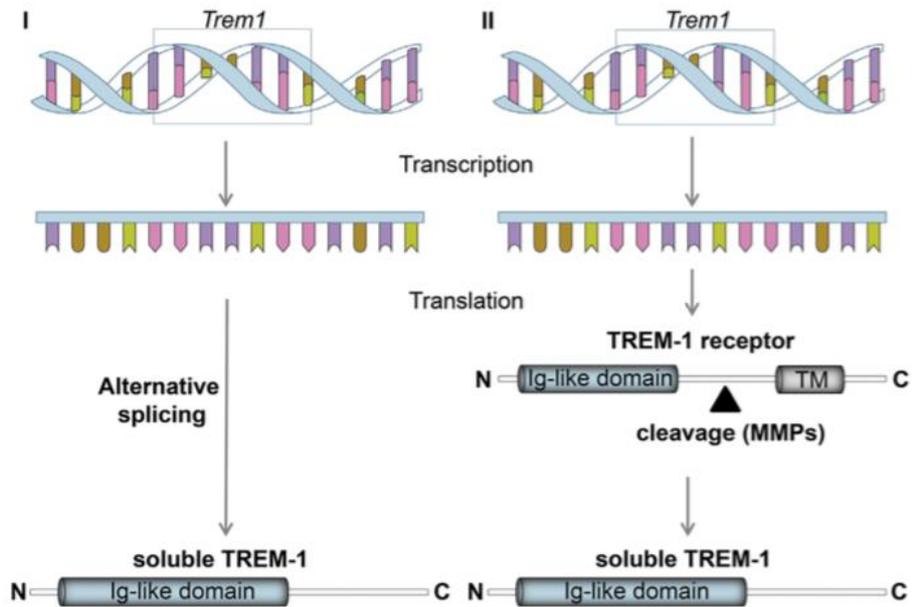


Figure 17 : Représentation graphique des deux hypothèses proposées pour l'origine de la forme soluble TREM-1 (sTREM-1).

(D'après Tammaro et al., 2017)¹²⁴

Lors de la transcription, l'épissage alternatif du gène *Trem1* conduit à la synthèse d'une protéine plus petite, qui ne contient que le domaine de type immunoglobuline (domaine de type Ig). Cette protéine est appelée sTREM-1 (I : à gauche). La traduction produit la protéine TREM-1, qui se compose du domaine de type Ig et du domaine transmembranaire (TM). Ce récepteur, lors du clivage protéolytique par les métalloprotéinases (MMP), conduit à la génération de protéine sTREM-1 (II : à droite)

la mobilisation des réserves calciques, un réarrangement du cytosquelette et l'activation de complexes transcriptionnels au sein du noyau. Il s'agit des complexes NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells), AP1 (Activator Protein1) et NF- κ B. Ces complexes de transcription vont permettre d'induire les gènes qui codent pour les cytokines et chimiokines inflammatoires dont MCP-1, MIP1- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , ainsi que des gènes codant pour des molécules d'adhésion (**Figure 18**). En effet, la transcription du gène *Trem-1* est positivement régulée par les facteurs de transcription AP-1, NFAT, NF- κ B, par l'AMPc, l'hypoxie et la vitamine D et négativement régulée par le facteur de transcription PU.1¹²⁵⁻¹²⁷.

Il est maintenant établi que pour la mise en place d'une immunité innée équilibrée et efficace, il est crucial d'avoir un dialogue entre plusieurs voies de signalisation de l'immunité innée. De nombreuses études récentes ont établi un modèle de synergie entre TREM-1 et d'autres PRR, bien que les mécanismes précis ne soient pas encore clairs. La synergie entre les TLR et les TREM pourrait se faire à deux niveaux. Premièrement, la capacité des ligands de TLR à augmenter l'expression d'ARNm de TREM-1, et deuxièmement l'amplification de la réponse inflammatoire induite par les TLR passerait par TREM-1. En effet, l'engagement des TLR induit une surexpression de TREM-1 membranaire et la sécrétion de la forme soluble de ce récepteur. La forme soluble de TREM-1 inactive TREM-1 via une liaison avec son ligand ce qui semble atténuer la production de cytokines pro-inflammatoires. Cette forme soluble agit donc comme un leurre pour le ligand naturel de TREM-1 et s'oppose ainsi à l'activation de TREM-1¹¹⁴. Parallèlement, lorsque TREM-1 est activé en présence d'un ligand pour TLR2 ou TLR4, il y a une surproduction de cytokines (TNF- α et IL-1 α). En revanche, le silencing de TREM-1 au niveau des cellules myéloïdes stimulées par du LPS est responsable d'une diminution de l'expression de plusieurs facteurs clés de la cascade de signalisation de TLR4¹²⁸. Il y a donc une coopération étroite entre TLR et TREM-1 pour la génération de la réponse inflammatoire avec une majoration de cette réponse en cas d'engagement de TREM-1. L'activation du facteur de transcription NF- κ B par les TLRs contrôle l'expression de TREM-1 qui, une fois engagé, active d'autres facteurs de transcription pouvant être synergiques avec NF- κ B quant à l'activation de gènes pro-inflammatoires. TREM-1 joue donc un rôle fondamental dans l'amplification de la réponse inflammatoire faisant suite à une agression microbienne. Il est naturellement tentant de vouloir moduler l'activation de TREM-1 au cours de pathologies impliquant une inflammation excessive comme le sepsis.

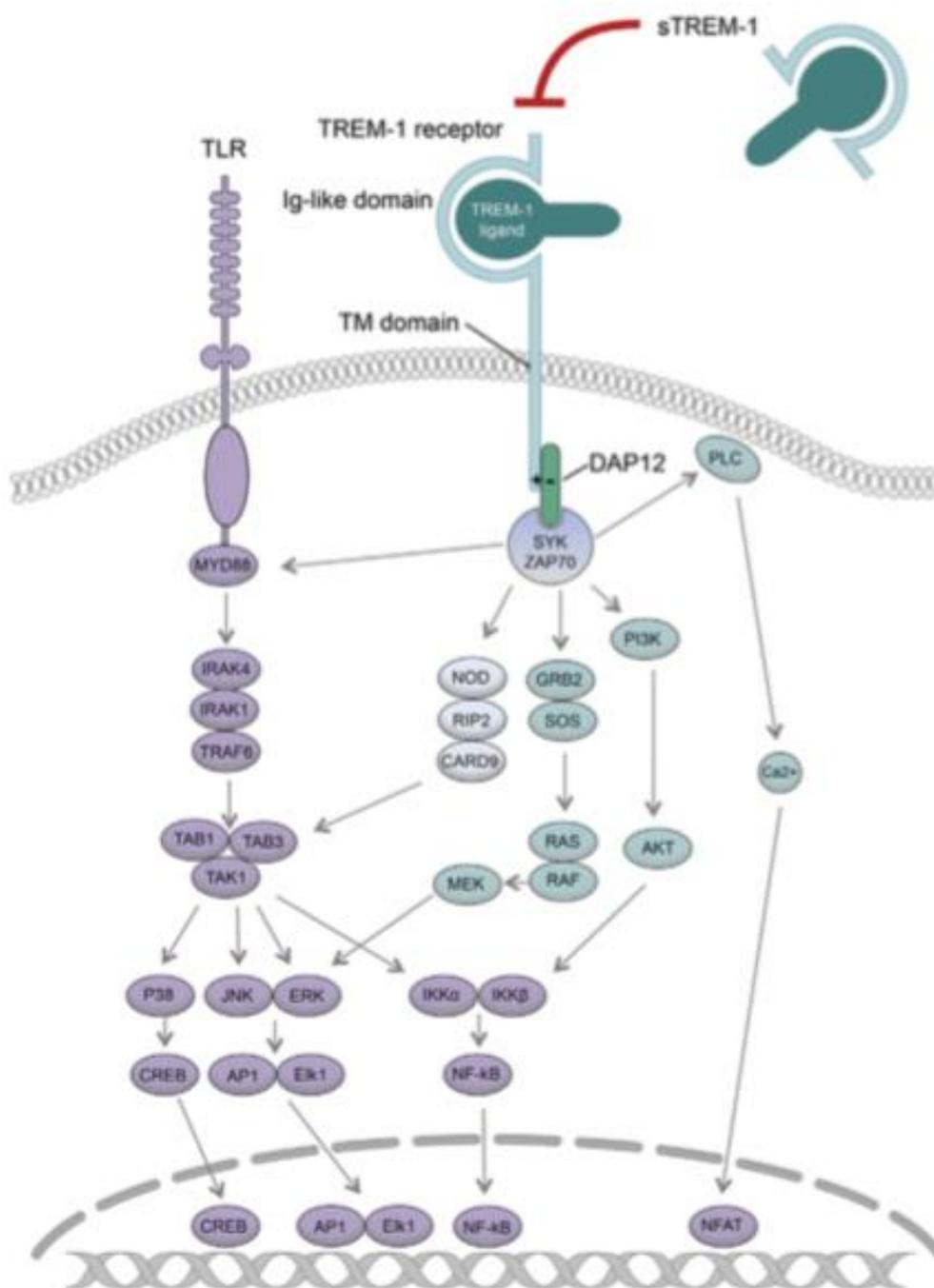


Figure 18 : Voie de signalisation de TREM-1 et des TLR

(D'après Tammaro et al., 2017)¹²⁴

Le domaine l'immunoglobuline like (Ig-like domain) de TREM-1 au niveau extracellulaire est responsable de la liaison du ligand, tandis que le domaine transmembranaire (TM) s'associe à la molécule adaptatrice DAP12. Suite à l'association TREM-1/DAP12, les protéines tyrosine kinases SYK et ZAP70 sont recrutées conduisant à l'activation des voies de signalisation PLC, PI3K et ERK. Les tyrosine kinases SYK et ZAP70 peuvent également activer la voie des récepteurs de type NOD (NLR), qui fusionne avec la voie des récepteurs de type Toll (TLR) initié par Myd88. La voie de signalisation de TREM-1 coopère avec la voie des TLR. L'engagement de Myd88 stimule les voies de signalisation en aval qui impliquent les protéines IRAK, ce qui conduit à l'activation des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases) JNK et p38, et à l'activation des facteurs de transcription NF- κ B, CREB, AP-1 et Elk, responsables de la transcription des gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires et les chimiokines. La forme soluble de TREM-1 (sTREM-1) en piégeant le ligand TREM-1 est capable d'inhiber la signalisation de cette voie inflammatoire.

1.4.3 LR12, un inhibiteur pharmacologique de TREM-1

De nombreuses études montrent que le blocage de la signalisation TREM-1 peut atténuer l'hyperactivation de la réponse immunitaire. Il a été démontré que sTREM-1 agit comme un récepteur endogène qui se lie aux ligands de TREM-1 et empêche donc l'engagement de TREM-1 à la membrane. Les récepteurs solubles ont une utilisation limitée en tant qu'agents thérapeutiques car ils sont soumis à un degré élevé de dégradation. Néanmoins, sTREM-1 a quand même été un bon outil servant de base pour le développement de peptides courts conçus pour contrecarrer les ligands de TREM-1.

LR12 est un peptide synthétique de 12 acides aminés (LQEEDAGEYGCM) issus de la portion extracellulaire de TLT-1. TLT-1 est un autre membre de la famille TREM exclusivement exprimé par les mégacaryocytes et les plaquettes et localisé au sein des granules alpha des plaquettes non activées. Après activation des plaquettes, TLT-1 est exposé à la membrane et favorise l'agrégation plaquettaire^{129,130}. Il a été retrouvé de façon inattendue un effet anti-inflammatoire de la portion extracellulaire soluble de TLT-1, similaire à celui observé avec sTREM-1¹²⁹. Or, TREM-1 et TLT-1 partagent une grande homologie de séquence¹²². La séquence peptidique du LR12 comprend également les sites de reconnaissance d'un ligand pour TREM (boucles de type CDR (Complementary Determining Region)) qui ont été prédits par cristallographies. De plus, il existe une forte homologie entre les séquences humaines, simiennes, murines et porcines du LR12. Toutes ces données font du LR12 un candidat de choix en tant qu'inhibiteur pharmacologique de TREM-1 (**Figure 19**).

Le peptide LR12 est capable de réduire les réponses inflammatoires induites par le LPS et de prévenir les anomalies tissulaires et les nombreuses dysfonctions d'organes induites par le sepsis, ce qui se traduit par une amélioration de la survie¹³⁰. De plus il a été montré dans un modèle de péritonite chez le porc que le traitement des animaux avec le LR12 était associé à un besoin réduit en norépinephrine et à une amélioration des paramètres cardiaques¹³¹. Au cours d'un modèle d'endotoxémie chez le singe, l'administration de LR12 protège les animaux en atténuant la diminution de la pression artérielle et la libération de cytokines inflammatoires dans le sang¹³².

Il a récemment été montré dans un modèle expérimental de colite que l'inhibition de TREM-1 par le peptide LR12 protégeait les souris en modulant l'activité autophagique et le stress du réticulum. En effet, l'administration de LR12 diminuait la sévérité de la colite au niveau clinique, endoscopique et histologique. Ces résultats ont été confirmés chez les souris

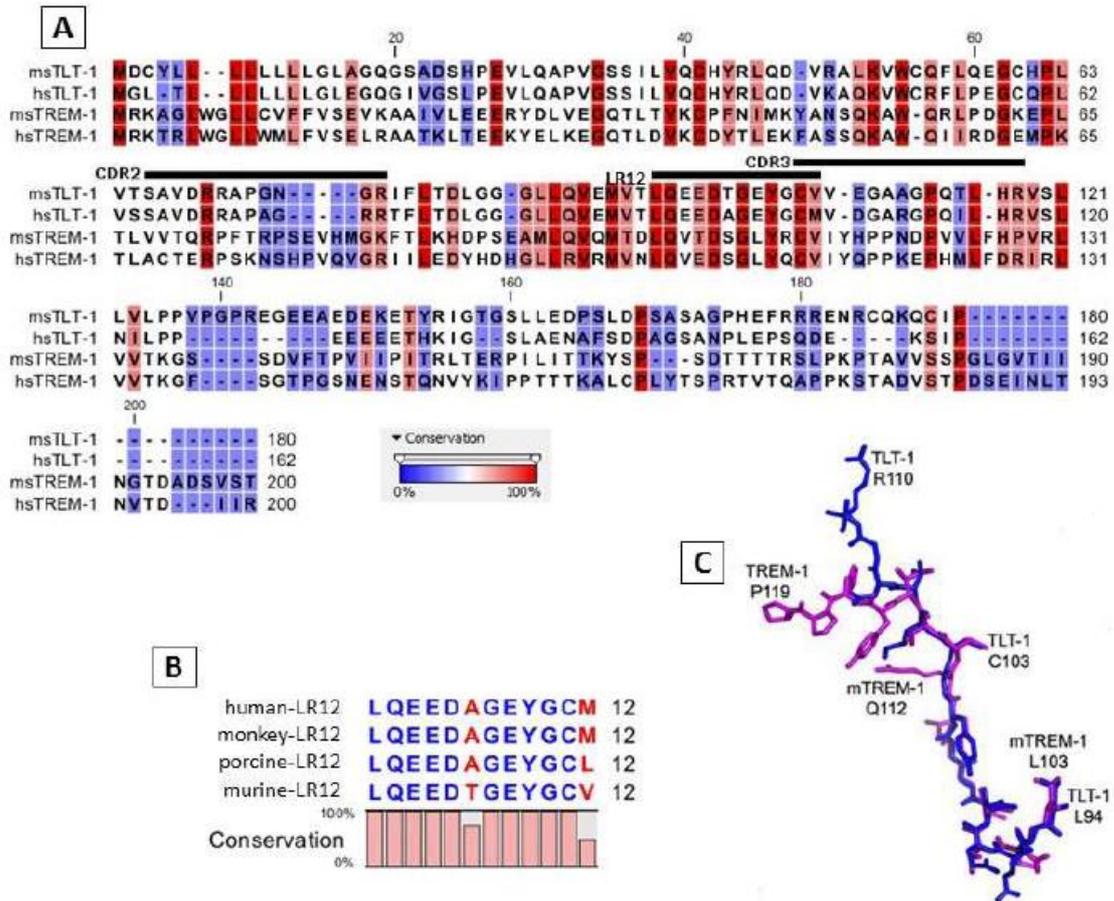


Figure 19 : Genèse d'un inhibiteur de TREM-1

(adapté de Kelker et al., 2004)¹²²

A : illustration de l'homologie des séquences des portions extracellulaires des protéines murines (ms) et humaines (hs) TLT-1 et TREM-1, avec emplacements des CDR-2 et -3 (complementary determining region) ainsi que de la séquence LR12.

B : conservation de la séquence LR12 entre différentes espèces (humaine, simienne, porcine et murine).

C : illustration tridimensionnelle des protéines TLT-1 et TREM-1 murines mettant en évidence leurs similitudes structurelles.

Trem-1^{-/-} ¹³³. Ces découvertes font de TREM-1 une nouvelle cible thérapeutique dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

LR12 a également des effets bénéfiques dans des modèles animaux de maladies non-infectieuses comme l'infarctus du myocarde et l'athérosclérose. Par exemple, Boufenzler et *al.* ont montré que l'administration de LR12 au cours de l'infarctus du myocarde expérimental chez le rongeur réduisait le recrutement leucocytaire dans la zone infarctée du cœur, limitait l'inflammation *in situ*, le remodelage cardiaque et la taille de l'infarctus¹³⁴. Ces résultats ont été confirmés dans un modèle porcin d'infarctus du myocarde aigu¹³⁵. De plus, une étude montre que le blocage pharmacologique de TREM-1 par LR12 chez des souris ApoE^{-/-} réduit considérablement le développement de l'athérosclérose dans l'ensemble de l'arbre vasculaire et diminue l'inflammation au sein de la plaque d'athérome¹³⁶.

La sécurité, la tolérance et la pharmacocinétique du LR12 ont été évaluées chez des volontaires sains lors d'un essai clinique de phase I randomisé en double aveugle. L'administration par voie intraveineuse du LR12 a été très bien tolérée et n'a montrée aucun effet secondaire à toutes les doses testées. Les résultats obtenus montrent une adéquation entre la distribution et le comportement pharmacocinétique du LR12 chez l'homme et les résultats obtenus dans les différents modèles animaux en préclinique. La phase II visant à confirmer l'activité pharmacologique du LR12 chez des patients septiques a débuté en Belgique, en France, en Espagne et aux Pays-Bas.

2 Objectifs du travail

L'administration du LR12 est associée à un effet protecteur du système cardiovasculaire et à une amélioration de la survie dans des modèles expérimentaux de choc septique chez le petit et le gros animal^{131,137-139}. Cependant le mécanisme d'action vasculaire du LR12 est encore inconnu. Il existe néanmoins deux hypothèses possibles : s'agit-il d'un mécanisme d'action indirect qui se traduit par une diminution de l'activation de l'endothélium ou s'agit-il d'une action directe du LR12 au niveau de l'endothélium ? Pour répondre à cette question, nous avons démontré que TREM-1 est exprimé par les cellules endothéliales vasculaires et qu'il est impliqué dans la genèse de la dysfonction endothéliale induite par le choc septique à l'aide d'une approche *in vitro* utilisant des cellules endothéliales humaines et une approche *in vivo* utilisant des souris KO conditionnelles délétées pour *Trem-1* uniquement au niveau de l'endothélium.

Le choc septique se caractérise non seulement par une dysfonction endothéliale mais aussi par une activation rapide et excessive de la coagulation qui est responsable de la formation de dépôts de fibrine dans la microcirculation provoquant l'apparition de zones focales d'hypoperfusion et d'hypoxie tissulaire ce qui aboutit au syndrome de défaillance multiviscérale. Alors qu'une corrélation entre la gravité de l'état infectieux et l'activation de la coagulation est connue depuis plus de 30 ans¹⁴⁰, l'interaction entre inflammation et coagulation a été mise en évidence plus récemment. Nous avons montré, dans un modèle de choc septique chez le cochon, que le traitement par LR12 atténuait la coagulopathie. Ces travaux nous ont ainsi incités à nous intéresser aux plaquettes. La seconde partie du travail a permis de montrer que TREM-1 est exprimé par les plaquettes et qu'il participe *in vitro* aux phénomènes d'adhésion, d'activation et d'agrégation plaquettaires. A l'aide de modèles animaux de thrombose et d'embolie pulmonaire où la composante plaquettaire est largement plus pertinente que dans des modèles de choc septique, nous avons étudié le rôle du TREM-1 plaquettaire *in vivo*.

3 Matériels et méthodes

3.1 Animaux

Toutes les expériences réalisées sont conformes aux règles institutionnelles françaises et européennes concernant les soins et l'utilisation des animaux de laboratoire. Les expériences ont été approuvées par le Comité d'Éthique Lorrain en Matière d'Expérimentation Animale (numéro 01079.01) et menées conformément aux guidelines de la directive 2010/63/UE du Parlement Européen sur la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques

Les animaux ont été hébergés dans un environnement contrôlé au sein d'une animalerie réglementaire et certifiée, pendant au moins 7 jours après réception, à une température de 22°C et exposés à un cycle de 12 heures de lumière pour 12 heures d'obscurité, avec une humidité maintenue autour de 65%. Les animaux ont eu un accès libre à l'eau et à la nourriture.

Trois groupes de souris ont été utilisés pour l'ensemble des travaux :

- Souris Trem-1^{-/-} : souris C57BL6 KO constitutives délétées pour *Trem-1* dans tout l'organisme de l'animal. Ces souris ont été obtenues par délétion de l'exon 1 comprenant le codon start ATG. Cette technique entraîne l'absence de toutes les isoformes de Trem-1 puisque l'exon 1 contient le codon start ATG.
- Souris EndoTrem-1^{-/-} : souris C57BL6 KO conditionnelles délétées pour *Trem-1* uniquement au niveau de l'endothélium. Ces souris ont été obtenues par le croisement d'une souris Lox (locus of X-over P1) pour le gène *Trem-1* et d'une souris Cre (cyclic recombinase) sous la dépendance du promoteur VE-Cadhérine fonctionnel uniquement au sein de l'endothélium. Cette technique entraîne l'absence de toutes les isoformes de *Trem-1* au niveau de l'endothélium.
- Souris Wild-Type (WT) : souris C57BL6 présentant le même fond génétique que les souris Trem-1^{-/-} ou EndoTrem-1^{-/-} selon l'étude.

Toutes les expériences ont été réalisées sur des souris mâles de 6-8 semaines. Les souris Trem-1^{-/-} et EndoTrem-1^{-/-} sont semblables phénotypiquement en termes de taille, de poids et de fertilité aux souris WT. Les souris EndoTrem-1^{-/-} ont été utilisées pour l'étude endothéliale alors que les souris Trem-1^{-/-} ont été utilisées pour l'étude plaquettaire.

3.2 Peptide LR12

Deux peptides ont été utilisés pour l'ensemble des travaux :

- LR12, dont la séquence humaine est : LQEEDAGEYGCM (séquence murine : LQEEDTGEYGCV)
- LR12 scramble (LR12scr), dont la séquence humaine est : EDGQYECLMEGA (séquence murine EDGQYECLVEGT). Ce peptide présente les mêmes acides aminés que le peptide d'intérêt (LR12) mais dans un ordre aléatoire. Ce peptide est donc inactif et sert de contrôle.

Ces deux peptides ont été synthétisés par Pepscan sous forme de peptides amidés : ils présentent donc une queue COOH en C-terminal afin d'éviter les dégradations par les protéases. De plus, ces peptides sont dépourvus d'endotoxine.

3.3 Etude endothéliale

3.3.1 Culture de cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires humaines (HPMEC)

Les cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires humaines (HPMEC) (PromoCell, Heidelberg, Germany) sont maintenues à 37°C dans un incubateur à atmosphère humidifiée avec 5% de CO₂, cultivées en milieu de culture complet (Endothelial Cell Growth Medium MV, PromoCell) et utilisées entre les passages 2 et 5. Les cellules sont cultivées dans des flasques de 75cm²; l'expansion est effectuée en rinçant les boîtes avec 7mL d'HEPES chaud (30mM HEPES, DetachKit, Promocell) puis en les incubant 5 minutes à température ambiante avec 7mL trypsine-EDTA chaude (Trypsin/EDTA Solution 0.04 %/0.03 %, DetachKit, Promocell). Une observation microscopique est faite afin de vérifier que les cellules sont bien décollées puis 7mL d'une solution neutralisante pour la trypsine (Trypsin Neutralizing Solution (TNS), DetachKit, Promocell) sont ajoutés dans la flasque pour inhiber les effets de la trypsine. Les cellules sont ensuite centrifugées à 300g pendant 5 minutes, le culot obtenu est resuspendu dans du milieu de culture qui sera redistribué dans de nouvelles flasques ou en plaques de 6 puits (90 000 cellules par puits) lorsque les cellules sont stimulées pour les expériences d'extraction d'ARN ou de protéines, de cytométrie en flux et pour la mesure des cytokines et de la production de NO.

Les cellules ont été stimulées en milieu de culture complet avec 10µg/mL d'*Escherichia coli* LPS (0111:B4; Sigma-Aldrich Saint-Quentin Fallavier, France) en présence ou non de 50µg/mL de LR12 pendant différents temps de stimulation en fonction de l'expérimentation. Les surnageants cellulaires ont été collectés et conservés à -80°C pour doser les cytokines et les cellules ont été analysées par cytométrie en flux ou lysées pour les études de Western Blot et de qPCR.

3.3.2 *Mesure de la production de NO intracellulaire*

Principe :

La production de monoxyde d'azote intracellulaire dans les HPMEC a été déterminée en utilisant du DAF-2-DA (4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluorescein Diacetate). Le DAF-2-DA est un composé non-fluorescent et perméable ; il traverse donc les membranes cellulaires par diffusion passive. Une fois dans la cellule, il est dé-acétylé par les estérases intracellulaires pour devenir DAF-FM (4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorescein). Par l'interaction avec le NO, le DAF-FM modifie sa structure et devient fluorescent. Cette technique développée par Kojima et coll. permet de quantifier de faibles concentrations en monoxyde d'azote (**Figure 20**).

Protocole expérimental :

Les HPMEC ont été stimulées pendant 18 heures avec 10 µg/mL d'*Escherichia coli* LPS en présence ou non de 50µg/mL de LR12. Une heure avant la fin de la stimulation, 5 µM de DAF-2 DA (Sigma Aldrich) a été ajouté dans le milieu de culture. Les cellules ont ensuite été lavées deux fois (PBS puis HEPES), avant d'être récupérées par trypsinisation. Après centrifugation (5 minutes, 300g), les cellules ont été fixées à l'aide de paraformaldehyde 4% (poids/volume). La fluorescence du DAF-FM a été comparée à des témoins (sans DAF-2-DA) avec 10 000 événements enregistrés par condition, en utilisant le cytomètre en flux Accuri C6 (Becton Dickinson). Les essais ont été effectués en triplicate.

3.3.3 *Test d'adhésion cellulaire*

Les HPMEC ont été ensemencées dans les capillaires de la puce Vena8Fluoro+ Biochips (Cellix) afin d'obtenir 80% de confluence avant le début du test. Les cellules ont ensuite été stimulées dans du milieu complet (Endothelial Cell Growth Medium MV, PromoCell) avec du TNFα

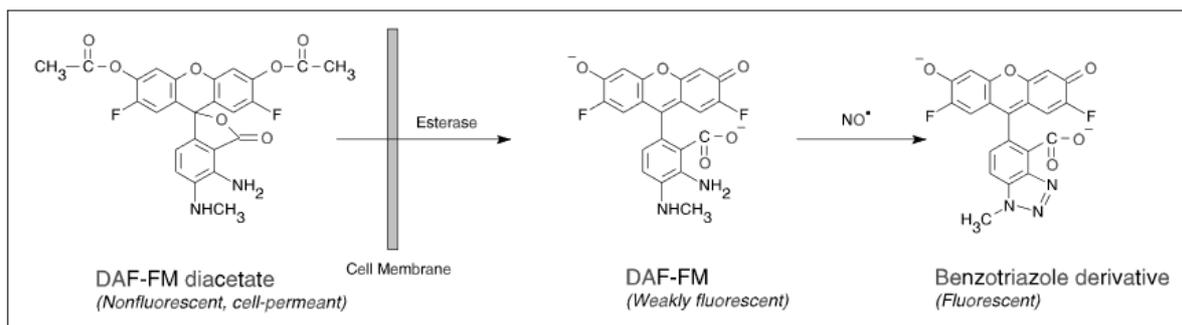


Figure 20 : Réaction chimique permettant la détection du monoxyde d'azote (NO) par le DAF-FM diacétate et le DAF-FM¹⁴¹

(10ng/mL, RnDsystems) pendant 2 heures. Le milieu a été retiré et les cellules ont été lavées une fois avec du PBS. Deux lignées de cellules monocytaires ont été utilisées : la lignée U937 qui exprime très faiblement TREM-1 et la lignée U937-TD (Trem-1/Dap12) qui sur-exprime TREM-1¹⁴². Les cellules U937 et U937-TD ont été centrifugées pendant 5 minutes à 200g et le culot cellulaire a été remis en suspension dans du RPMI à une concentration finale de 3x10⁶ cellules/mL. Ces suspensions monocytaires ont été injectées à l'aide de la nanopompe Mirus (Cellix, Dublin, Irlande) pendant 3 minutes dans les capillaires de la puce recouverts de cellules endothéliales sous une force de cisaillement constante de 0,5 dyne.cm⁻². L'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales a été évaluée et enregistrée à l'aide du microscope à fluorescence ZEISS Axiovert 40 CFL et d'une caméra (Q-IMAGING ROLERA-XR). Les images présentées sont représentatives de 3 champs microscopiques pour chaque condition. Les images ont été analysées à l'aide du logiciel DucoCell (Cellix).

3.3.4 Modèle de sepsis murin par Ligature et Perforation Caecale (CLP)

Les souris WT et EndoTrem-1^{-/-} sont anesthésiées à l'isoflurane dans une chambre d'induction puis l'anesthésie est maintenue tout au long de la chirurgie. Les animaux sont placés sur une plaque chauffante afin de garder la température des animaux stable. Après avoir rasé les poils des souris au niveau de l'abdomen, une laparotomie médiane d'environ 1cm est réalisée afin de pouvoir sortir le caecum. Le caecum est ligaturé en dessous de la valve iléo-caecale grâce à un fil (Prolène 6/0, non résorbable), puis perforé à l'aide d'une aiguille de 0.8mm diamètre (21G, BD Microlance TM). La paroi musculaire abdominale et la peau sont refermées (Prolène 6/0, résorbable), puis les animaux retournent dans leur cage où ils sont surveillés jusqu'à leur réveil complet. Suite à la chirurgie, tous les animaux ont reçu une injection sous-cutanée de 0,5 mL de sérum salé (NaCl 0.9%, pH≈6, B RAUN) afin d'assurer la restauration volémique.

Les souris sont randomisées afin de constituer 4 groupes de souris (n=6 par groupe) :

- Contrôle (groupe Sham) : souris WT ayant subi une incision de l'abdomen avec manipulation de caecum mais sans ligature et perforation caecale.
- CLP : souris WT ayant subi une ligature et perforation caecale, puis injection une heure après la ligature de LR12scr solubilisé dans du PBS par voie intra-péritonéale (5mg/kg).

- CLP LR12 : souris WT ayant subi une ligature et perforation caecale, puis injection 1 heure après la ligature de LR12 solubilisé dans du PBS par voie intra-péritonéale (5mg/kg).
- EndoTrem-1^{-/-} CLP : souris Trem-1^{-/-} ayant subi une ligature et perforation caecale. 24 heures et 72 heures après la CLP, les souris sont mises à mort par injection en intra-péritonéal de pentobarbital (100mg/kg). 1mL de PBS est injecté dans le péritoine afin de récupérer le fluide de lavage péritonéal (PLF), le poumon et la rate sont collectés, ainsi que du sang par ponction intra-cardiaque afin d'obtenir le plasma par centrifugation.

3.3.5 Réactivité vasculaire

Principe :

Le myographe à fils pour petits vaisseaux a été introduit en 1976 par les professeurs MJ. Mulvany et W. Halpern. Deux fils métalliques de tungstène, de 40µm chacun, sont insérés dans la lumière du vaisseau. Le premier fil est relié à un support dont la position peut être modifiée grâce à un micromètre. Le second fil métallique est relié à un capteur de force (jauge de contrainte, mesure de force isométrique) relié à un amplificateur et à un système d'acquisition et de traitement des données. (**Figure 21**) Il est ainsi possible de mesurer les changements de tension par rapport à l'étirement initial du segment.

Protocole expérimental :

18 heures après la CLP, l'aorte thoracique et l'artère mésentérique sont prélevées, puis placées dans une solution saline physiologique froide (130mM NaCl, 14,9mM NaHCO₃, 3,7mM KCl, 1,2mM MgSO₄, 2,5mM CaCl₂, 1,2 mM KH₂PO₄, 5,5 mM glucose, pH=7,4) et disséquées sous une loupe binoculaire Stemi 2000 (ZEISS, Microsystèmes, France). Des vaisseaux issus de souris WT saines sont également prélevés et incubés ou non en présence de 10µg/mL *Escherichia coli* LPS, 20µg/mL de LR12 ou 5µg/mL d'anticorps monoclonal agoniste de TREM-1 (αTREM-1) (MAB1278, Biotechne, R&D Systems, USA). Pour les deux types de vaisseaux, le tissu adipeux est retiré soigneusement et le vaisseau est coupé en petits anneaux de 2-3mm de longueur, ces anneaux serviront à l'étude de la réactivité vasculaire *ex vivo*. Le reste des vaisseaux est congelé dans l'azote liquide à -80°C afin d'étudier l'expression génique de Trem-1 et de la réponse inflammatoire par l'étude des cytokines inflammatoires.

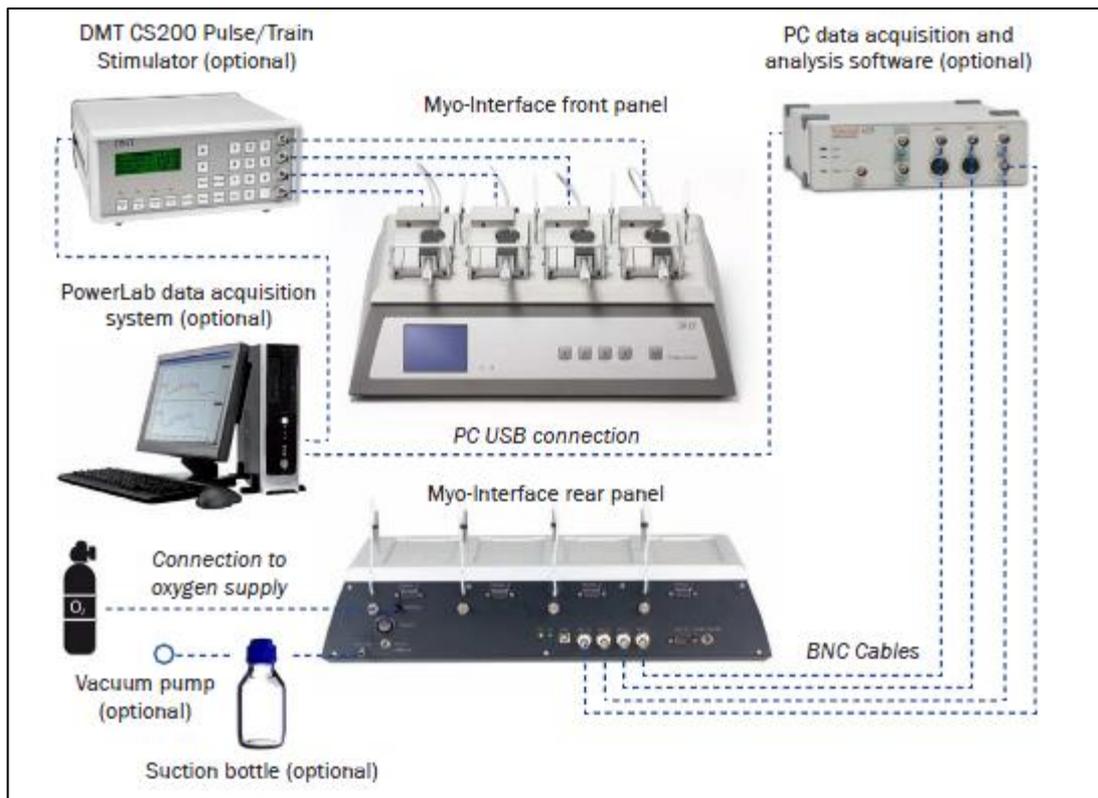


Figure 21 : Schéma représentatif de l'ensemble des éléments du myographe
 DMT (Multi Wire Myograph System Model 620M)
 (D'après User Manual, version 1.0, 2010)

Les anneaux aortiques et mésentériques sont montés dans les chambres du myographe (Multi Wire Myograph System Model 620M, DMT) contenant 8mL de PSS. La solution est bullée avec un mélange de 95% O₂ et 5% CO₂ et rincée toutes les 10 minutes ce qui permet de maintenir les vaisseaux en vie plusieurs heures après le prélèvement. Une pré-tension de 9,8mN et 4,9mN est exercée respectivement sur les segments aortiques et mésentériques permettant le développement d'une tension suffisante pour qu'ils puissent à nouveau exercer leur activité vasomotrice. Après une période de stabilisation de 20 minutes, la concentration maximale des vaisseaux est mesurée en deux étapes : dépolarisation dans un bain de KCl (80mM), contraction au KCl (80mM) + phényléphrine (10⁻⁵M). La courbe « concentration-réponse » aux agonistes vasoconstricteurs est établie grâce à l'utilisation d'une gamme de concentration de phényléphrine (Phe) de 1nM à 100µM, ce qui nous a permis de déterminer la concentration de phényléphrine nécessaire pour un niveau de contraction identique dans les différents groupes. La courbe « concentration-réponse » aux agonistes vasodilatateurs est établie grâce à l'utilisation d'une gamme de concentration d'acétylcholine (ACh) de 1nM à 100µM suite à une précontraction par la phényléphrine (80% de la contraction maximale).

3.3.6 Cytométrie en flux

Les suspensions cellulaires ont été préparées de la façon suivante. Les poumons ont été coupés en petits morceaux et incubés dans un cocktail de collagénase I et DNase I (Sigma) pendant 1 heure à 37°C sous agitation. Les cellules ont ensuite été récupérées et centrifugées à 300 g pendant 10 minutes à 4°C. Les rates ont été broyées dans une solution d'HBSS à 4°C à l'aide du bout d'une seringue de 2mL puis filtrées sur un filtre en nylon de 70µm. La suspension cellulaire a ensuite été centrifugée à 300 g pendant 10 minutes à 4°C. Les cellules pulmonaires et spléniques ont ensuite été lavées avec du HBSS puis remises en suspension dans du HBSS-BSA 0,2%. Enfin, 1 mL de PBS a été injecté dans le péritoine de la souris pour récupérer le fluide de lavage péritonéal. Le nombre total de cellules viables a été déterminé à partir d'aliqots à l'aide d'un compteur automatique de cellules (TC10™ Automated Cell Counter, BioRad) après coloration au bleu trypan. Les suspensions cellulaires ont été incubées dans un cocktail d'anticorps (CD45-PerCP, CD11b-PB, Ly6G-PE, Ly6C-FITC, F4/80-APC, Miltenyi Biotec) afin de pouvoir différencier les neutrophiles, les monocytes Ly6C^{High} et Ly6C^{Low}. Le nombre de cellules a été calculé par le produit du nombre de cellules viables et du

pourcentage de cellules dans la fenêtre d'intérêt et rapporté par mg de tissus (poumon), par organe (rate) ou mL (PLF). Les données ont été acquises sur le cytomètre Gallios (Beckman Coulter).

L'expression de TREM-1 dans les HPMEC a été détectée par cytométrie en flux après marquage avec l'anticorps anti TREM-1-APC (Miltenyi Biotec) pendant 30 minutes dans l'obscurité à 4°C. Les échantillons ont ensuite été lavés avec du PBS puis fixés à l'aide de paraformaldehyde 4% (poids/volume) avant d'être analysés à l'aide du cytomètre en flux Accuri C6 (Becton Dickinson). Des isotypes contrôles ont été utilisés pour tous les anticorps.

3.3.7 ELISA

Les taux de TREM-1 soluble (sTREM-1) ont été mesurés dans le plasma, le poumon et le PLF des souris WT et EndoTrem-1^{-/-} par ELISA (mouse/rat TREM-1 Quantikine ELISA Kits; R&D Systems) selon les instructions du fournisseur. Les concentrations en sVCAM-1 et IL-6 ont également été évaluées dans le plasma et le poumon par ELISA (mouse IL-6 et sVCAM-1/CD106 Quantikine ELISA Kits; R&D Systems).

Les concentrations en IL-6, sICAM-1 et sE-sélectine ont été mesurées dans les surnageants cellulaires des HPMEC après 24h de stimulation par ELISA selon les instructions du fournisseur (human IL-6, ICAM-1/CD54 et sE-Selectin/CD62E Quantikine ELISA Kits; R&D Systems).

3.3.8 RT-PCR

Les ARN totaux des HPMEC et des vaisseaux murins (aortes et artères mésentériques) ont été extraits à l'aide du kit RNeasy Plus Mini (QIAGEN, Venlo, The Netherlands) puis quantifiés grâce au spectrophotomètre Nano Drop 1000 (Thermo Scientific) avant d'être rétro-transcrits (iScript cDNA synthesis kit, BioRad, Hercules, CA, USA) et quantifiés par PCR quantitative. L'expression génique de *Trem-1* a été étudiée dans les HPMEC ; l'expression génique de *Trem-1*, *Il-6*, *Il-10*, *Tnfα* a été évaluée dans les vaisseaux. Les résultats obtenus sont quantifiés à l'aide d'un gène de référence (β -actine). Les PCR en temps réel ont été effectuées grâce au MyiQ™ Single-Color Real-Time PCR Detection System (BioRad). Chaque mélange réactionnel est composé de 5 μ L d'ADNc dilué et 20 μ L d'un mélange contenant 10 μ M des amorces sens et antisens (Quantitect Primer, Qiagen, France), de SYBR® Green PCR MasterMix (BioRad), de l'iTaq polymérase, des dNTPs, de SYBR® Green fluorescéine, de KCl, de Tris-HCl pH 8,4, et de

MgCl₂. Les échantillons sont incubés 3 minutes à 95 °C, puis 40 cycles de PCR sont effectués : une dénaturation de 10 secondes à 95 °C suivie d'une étape d'hybridation de 10 secondes à 59°C puis une étape d'élongation de 30 secondes à 72°C. A la fin du programme de PCR les échantillons sont maintenus à 4°C dans le thermocycleur.

3.3.9 Western Blot

Les protéines totales des HPMEC et des vaisseaux murins (aortes et artères mésentériques) ont été extraites à l'aide du Ripa Buffer (Novagen, Merck Biosciences, Nottingham, UK) puis centrifugées pendant 10min à 16000g à 4°C pour collecter les surnageants. Les concentrations protéiques ont été déterminées selon la méthode de Bradford (Comassie Protein Assay Kit, Pierce, ThermoScientific, Berbières, France). 30µg de chaque échantillon a été déposé sur un gel d'acrylamide Criterion XT Bis-Tris Gel 4–12% (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) afin de faire migrer les protéines selon leur poids moléculaire. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane PVDF (Millipore, Saint+Quentin en Yvelines, France). Une fois le transfert terminé, la membrane est saturée dans une solution de TBS-0,1% tween-5% lait pendant 2 heures. La membrane est ensuite incubée avec les anticorps primaires anti-(p)Erk1/2, anti-(p)p38 MAPK, anti-(p)NFκB p65, anti-iNOS, anti-(p)Akt, anti-Cox1, and anti-Cox2 (Cell Signaling, USA) toute la nuit à 4°C. Après trois lavages de 10 minutes au TBS 0.1% tween, la membrane est incubée pendant une heure avec l'anticorps secondaire correspondant couplé à la HRP. Les formes non phosphorylées, la tubuline ou l'actine (Cell Signaling) ont été utilisées pour la normalisation. L'acquisition et l'analyse quantitative des signaux étaient effectuées à l'aide du LAS+4000 imager (FSVT, Courbevoie, France) et du logiciel Multi+Gauge (LifeScience FujiFilm, France).

3.3.10 Statistiques

Toutes les données brutes, sauf indication contraire, ont une distribution normale et sont présentées en moyenne ± SD. Les différences significatives entre les groupes ont été obtenues à l'aide du test t de Student (comparaison de données 2 à 2) ou du test ANOVA à deux voies (comparaison de plusieurs groupes (>2) dans un même test). Les courbes de survie de Kaplan-Meier ont été analysées à l'aide du test Log-Rank. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel Prism Version 6 (GraphPad) et une valeur P <0,05 a été considérée comme significative.

3.4 Etude plaquettaire

3.4.1 Prélèvement sanguin

Chez la souris :

Les souris sont anesthésiées à l'isoflurane dans une chambre d'induction puis l'anesthésie est maintenue tout au long du prélèvement sanguin. Le sang est prélevé par ponction intracardiaque dans une seringue contenant 1 volume d'ACD (Acid Citrate Dextrose, citrate de sodium-124 mM, acide citrique-130 mM, glucose-110 mM) pour 6 volumes de sang.

Chez l'Homme :

Les échantillons sanguins proviennent de donneurs sains n'ayant pas pris de médicaments pouvant interférer avec les fonctions plaquettaires depuis au moins dix jours. Le sang est prélevé par ponction intraveineuse et recueilli dans des tubes citratés.

3.4.2 Isolement des plaquettes

Les tubes de sang sont, dans un premier temps, centrifugés à 190g pendant 4 minutes à 22°C puis directement recentrifugés à 1900g pendant 1 minute à 22°C afin d'obtenir le PRP (Plasma Riche en Plaquettes). Le PRP est immédiatement réparti dans des tubes coniques et centrifugé à 6000g pendant 4 minutes à 22°C. Le surnageant ou PPP (Plasma Pauvre en Plaquette) est éliminé, le culot plaquettaire est resuspendu dans du Tyrode-BSA (NaCl- 137 mM, KCl-2,7 mM, NaHCO₃-12 mM, Na₂HPO₄-0,4 mM, CaCl₂-2 mM, MgCl₂-1 mM, Hépès-5 mM, glucose-5,5 mM, albumine-0,35 % (poids/v), pH=7,3) à une concentration finale de 3×10^8 /mL.

3.4.3 Mesure de l'agrégation plaquettaire

Principe :

L'agrégation plaquettaire est mesurée sur les plaquettes resuspendues dans du tyrode-BSA, selon la méthode turbidimétrie de Born (1962). Elle consiste à mesurer de façon continue l'augmentation de la transmission d'un faisceau lumineux au travers de la suspension plaquettaire après addition d'un agoniste. Ce changement de transmission est détecté par la cellule photoélectrique de l'agrégomètre TA-8V (SD Innovation, Frouard, France). Un enregistreur couplé à l'agrégomètre permet de suivre la cinétique en temps réel de

l'agrégation. L'agrégation totale (100% de transmission du faisceau lumineux) est obtenue avec 300µl de PPP. Le 0% de transmission est établi avec 300µl de PRP avant l'addition de l'agoniste (**Figure 22**).

Protocole expérimental :

La suspension plaquettaire est dans un premier temps pré-incubée avec le peptide LR12 (50 µg/mL) pendant 5 minutes à 37°C, puis l'agrégation est déclenchée par l'ajout de 5µg/mL collagène (SD Innovation), 5µM ADP (SD Innovation) ou 0,1/1U/mL thrombine (HYPHEN Biomed, Neuville sur Oise, France). L'agrégation est mesurée pendant 6 minutes à 37°C sous agitation continue à 1000 rpm.

3.4.4 Etude de l'adhésion plaquettaire en condition de flux

Les capillaires de la puce Vena8Fluoro+ Biochips (Cellix, Dublin, Irlande) ont été coatés avec du fibrinogène (125µg/mL) durant une nuit à 4°C. Le lendemain, les puces ont été bloquées avec de la BSA (10mg/ml) pendant 30 minutes à température ambiante, puis lavées avec du PBS contenant 0,2mM de Ca²⁺ et 0,5mM de Mg²⁺. Les plaquettes humaines lavées ont été prétraitées avec le peptide LR12 ou le LR12scr (20µg/mL ou 50 µg/mL). L'ADP (10 µM) a été ajouté juste avant le début de la perfusion. Les plaquettes ont ensuite été mélangées avec 1mM de CaCl₂ et immédiatement perfusées dans les capillaires revêtus de fibrinogène avec une vitesse de cisaillement constante de 2,5dynes.cm⁻² pendant 6 minutes à l'aide de la nanopompe Mirus (Cellix). L'adhésion des plaquettes a été enregistrée à l'aide du microscope fluorescent ZEISS Axiovert 40 CFL, en utilisant un appareil photo numérique Q-IMAGING ROLERA-XR. Les images des plaquettes ont été capturées sur trois champs pour chaque échantillon et les images ont été analysées à l'aide du logiciel DucoCell (Cellix).

3.4.5 Etude de la thrombogénèse in vitro

Les capillaires de la puce Vena8Fluoro+ Biochips (Cellix) ont été coatés avec du collagène, bloqués et lavés comme décrit précédemment. Le sang total recueilli à l'aide de tube de citrate de sodium à 3,8% a été incubé avec 1µM de DiOC6 (3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide)

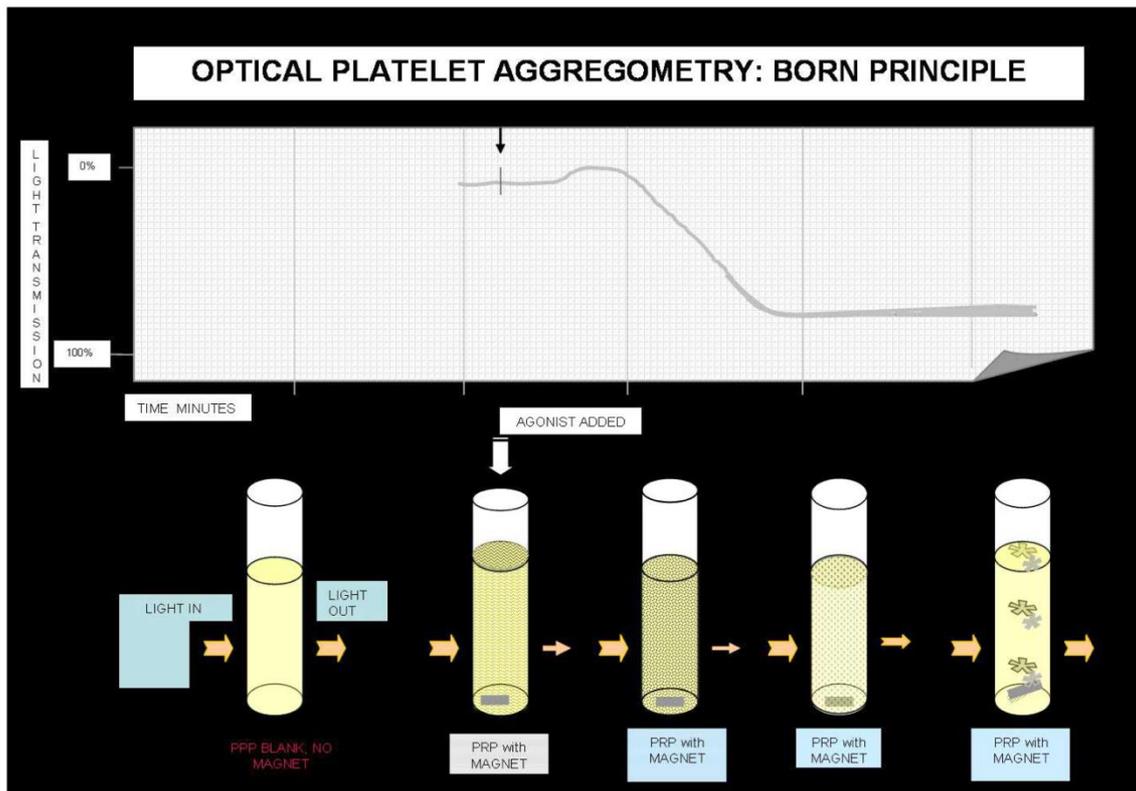


Figure 22 : Principe de la méthode de Born par mesure au cours du temps de la variation de transmission d'un faisceau lumineux infra-rouge au travers d'une suspension plaquettaire¹⁴³

pendant 10 minutes à l'obscurité. Le peptide LR12 (20 µg/mL ou 50µg/mL) ou la prostaglandine E2 (PGE2, 10µM) ont été ajoutés 5 minutes avant le début de la perfusion. La perfusion a été effectuée à une vitesse de cisaillement de 30dynes.cm⁻² et l'étude microscopique a été effectuée comme décrit précédemment pour l'adhésion plaquettaire.

3.4.6 Etudes des sécrétions plaquettaires

Dosage du TXA2 et de l'AMPc :

Le peptide LR12 (50µg/mL) a été pré-incubé pendant 5 minutes à 37°C. La génération de thromboxane A2 (TXA2) et d'AMPc a été déterminée après 5 minutes d'agrégation induite par 0,1U/mL de thrombine et 10nM de convulxine (Pentapharm, Basel, Switzerland). L'agrégation a été stoppée au bout de 5 minutes, les surnageants plaquettaires ont été obtenus par centrifugation des échantillons pendant 4 minutes à 6000g à 22°C. Les taux de thromboxane B2 (TXB2), le métabolite stable du TXA2, et les taux d'AMPc ont été déterminés en utilisant respectivement les kits Thromboxane B2 assay et cAMP Paramater assay (R&D Systems, Abingdon, UK) en suivant les recommandations du fournisseur.

Dosage de l'ATP :

La sécrétion des granules denses est évaluée en mesurant l'ATP (Adenosine Triphosphate) relarguée dans les conditions décrites précédemment à l'aide du kit ATP détermination (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) en suivant les recommandations du fournisseur.

3.4.7 Mesure du calcium intracellulaire

Principe :

Du fait de l'importance des ions calcium Ca²⁺ en tant que second messenger universel dans tous les types cellulaires, de nombreuses méthodes ont été développées afin de mesurer les variations de concentrations intracellulaires en ion calcium ([Ca²⁺]_i). Pour cela, des sondes calciques permettant d'effectuer des mesures dynamiques de la concentration en ions calcium libre ont été mises au point. Elles sont constituées d'une partie capable de fixer de manière spécifique un ou plusieurs ions calcium, cette partie étant associée à un chromophore. La sonde utilisée est la Fluo 3-AM, cette sonde est dite estérifiée ce qui permet à la sonde de passer à travers la membrane plasmique. Une fois dans le milieu intracellulaire,

cette sonde perd son groupement acétomethylester du fait de l'action des estérases endogènes. La sonde reste alors piégée dans le milieu intracellulaire. Les pics d'absorption et d'émission de la sonde Fluo 3-AM sont respectivement de 506 et 526 nm. On peut donc l'exciter avec un laser argon à 488 nm, et son émission de fluorescence acquise autour de 520 nm augmente avec l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$. La fluorescence du Fluo 3 augmente de 40 à 200 fois lorsqu'elle lie le calcium, ce qui en fait un bon outil pour mesurer les variations de la $[Ca^{2+}]_i$ qui peut augmenter de 5 à 10 fois lors d'une stimulation cellulaire.

Protocole expérimental :

La sonde Fluo 3-AM est dissoute dans du dimethyl sulfoxide (DMSO) afin d'obtenir une solution stock de 1 mM. Dans un premier temps, les plaquettes ont été incubées pendant 30 minutes à température ambiante à l'obscurité avec la sonde Fluo 3-AM (1 μ M, Sigma) et de l'acide pluronique (1 μ M) afin de stabiliser la sonde. Les plaquettes sont retirées du milieu contenant le Fluo 3-AM et rincées avec du tyrode-BSA. Après prétraitement des plaquettes avec le peptide LR12 (50 μ g/mL), la mobilisation calcique induite par le collagène (25 μ g/mL), le TRAP (25 μ M) et l'ADP (5 μ M) a été analysée en temps réel grâce au cytomètre en flux Accuri C6 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA). Les valeurs de fluorescence sont analysées grâce à FlowJo et normalisées à l'aide de Graphpad Prism. La ligne de base correspond au 0%, le maximum d'influx calcique (100%) est défini par l'ajout de la ionomycine (1 μ M, Sigma).

3.4.8 Western Blot

Les Western Blots ont été réalisés selon le même protocole que décrit précédemment. Les anticorps primaires utilisés dans cette partie sont les suivants : anti-(p)ERK1/2, anti-(p)PLC γ 2, anti-tubuline (Cell Signaling) ou anti-TREM-1 (AbD Serotec et RnDsystems).

3.4.9 RT-PCR

Les ARN totaux ont été extraits à l'aide du TriZol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, Californie, USA) à partir de plaquettes humaines ou murines (WT et TREM-1^{-/-}) préalablement stimulées pendant 5 minutes par la thrombine (1U/mL), puis quantifiés grâce au spectrophotomètre Nano Drop 1000 (Thermo Scientific) avant d'être rétro-transcrits (iScript cDNA synthesis kit,

BioRad, Hercules, CA, USA) et quantifiés par PCR quantitative pour *Trem-1* et *Dap12* pour les plaquettes humaines et pour *Trem1-1* (TLT-1) pour les plaquettes murines. Les PCR ont été réalisées selon le même protocole que décrit précédemment.

3.4.10 Cytométrie en flux

Les plaquettes humaines lavées (10^8 /mL) ont été stimulées pendant 5 minutes à 37°C avec de l'ADP (5µM) ou du TRAP (25µM) après prétraitement ou non des plaquettes avec le peptide LR12 (50µg/mL). Les plaquettes ont ensuite été incubées pendant 30 minutes à 4°C à l'obscurité avec les anticorps anti CD62P-APC, PAC1-PE et fibrinogène-FITC (Miltenyi Biotec) afin d'étudier l'expression de la P-sélectine et de la glycoprotéine IIb/IIIa ainsi que la liaison du fibrinogène. Les échantillons ont ensuite été lavés avec du PBS puis fixés à l'aide de paraformaldehyde 4% (poids/volume) avant d'être analysés à l'aide du cytomètre en flux Accuri C6 (Becton Dickinson).

Pour le marquage de TREM-1 juste après la stimulation par la thrombine (5 minutes, 1U/mL), les plaquettes ont été fixées avec du paraformaldehyde 4% (poids/volume) et perméabilisées avec du Triton 0,5% (poids/volume). Après plusieurs lavages, les plaquettes ont été resuspendues dans du tryrode-BSA et incubées pendant 15 minutes à 4°C dans le noir avec un anticorps anti-TREM couplé au FITC (BIOSS).

L'expression basale des marqueurs plaquettaire CD31, CD36, CD41, CD62P, TLT-1 et GPIIbIIIa a été étudié par cytométrie en flux chez les souris WT et TREM-1^{-/-} selon le même protocole que pour les plaquettes humaines.

Des isotypes contrôles ont été utilisés pour tous les anticorps.

3.4.11 Spreading

Les chambres de culture LAB-TEK ont été coatées avec du fibrinogène (40µg/mL) ou avec du collagène bovin de type I (100µg/mL) pendant une nuit, puis bloquées avec 2% de BSA. Les plaquettes ont été lavées, resuspendues dans du Tyrode-BSA (3×10^7 /mL), préincubées avec le LR12 pendant 5 minutes à 37°C, puis déposées dans les chambres de cultures LAB-TEK précoatées afin de pouvoir étudier le spreading des plaquettes. Après une heure, les plaquettes non adhérentes ont été éliminées par retournement et les plaquettes liées à la

surface ont été lavées avec du PBS. Les plaquettes adhérentes dans les chambres de cultures LAB-TEK ont ensuite été fixées avec du paraformaldéhyde à 4% pendant 20 minutes à température ambiante et marquées avec du CytoPainter Phalloidin iFluor 555 (Abcam, Cambridge, Royaume-Uni) pendant une heure dans l'obscurité à température ambiante. Ce marqueur se lie spécifiquement aux filaments d'actine, également connu sous le nom de F-actine qui est le constituant majeur du cytosquelette plaquettaire. Après plusieurs lavages, le spreading (étalement) des plaquettes a été visualisé à l'aide du microscope confocal TCS SP5 X (Leica) et les images ont été traitées à l'aide du logiciel LAS AF Lite blue (Leica).

3.4.12 Modèle de thrombose carotidienne induite au FeCl₃

Principe :

Ce modèle est le plus utilisé chez les rongeurs, car il est simple à mettre en œuvre sur des animaux de petite taille. Il a permis de mettre en évidence le rôle de principales protéines et récepteurs impliqués dans les mécanismes d'hémostase et de thrombose. Les artères ciblées peuvent être de diamètre important (artères carotides, fémorales), auquel cas le FeCl₃ est appliqué à l'aide d'un papier filtre imbibé de la substance chimique, mais également de faible diamètre (mésentère, crémaster) et dans ce cas la lésion vasculaire est induite par superfusion d'une solution de FeCl₃. L'utilisation du FeCl₃ dérive du modèle de lésion électrique, utilisant des électrodes en fer. En effet, il est admis que FeCl₃ provoque un stress oxydant majeur avec la génération de radicaux libres, ce qui conduit à la peroxydation lipidique et à la destruction des cellules endothéliales, entraînant ainsi la formation d'un thrombus occlusif. La nature du thrombus occlusif formé dans la carotide a été décrit comme riche en plaquettes et fibrine et en globules rouges en aval de la lésion aux fortes concentrations de FeCl₃ (10 et 20%)¹⁴⁴.

Protocole expérimental :

Les souris (WT et Trem-1^{-/-}) ont été anesthésiées avec 2% isoflurane, l'artère carotide droite a été isolée et le flux sanguin mesuré à l'aide d'une sonde à ultrasons (0,5 PSB Nanoprobe, Transonic, Ithaca, NY). Les souris ont été randomisées pour recevoir par injection intrapéritonéale 100µL de PBS ou 100µL de LR12 (=100µg) Le thrombus est déclenché en appliquant un morceau de papier-filtre de 1mm² imbibé de solution aqueuse de FeCl₃ à 10% sur l'extérieur de la carotide. Après 2 minutes, le papier-filtre est retiré et le vaisseau lavé avec du PBS. Le flux carotidien est enregistré en continu.

3.4.13 *Modèle de thromboembolie généralisée*

Principe :

Ce modèle n'est pas à proprement parler un modèle de thrombose artérielle, il correspond au niveau physiopathologique à une coagulation intravasculaire disséminée. Une forte composante plaquettaire est obtenue par l'injection du mélange d'agoniste collagène/épinephrine. En réponse à ce traitement, des agrégats plaquettaires se forment dans la circulation aboutissant à l'obstruction de la microcirculation pulmonaire, ce qui aboutit à la mort de l'animal.

Protocole expérimental :

Après anesthésie à l'isoflurane 2%, les souris (WT et Trem-1^{-/-}) ont reçu par injection dans la veine jugulaire droite un mélange contenant 100µg/mL de collagène et 15µg/mL d'épinephrine (ABP, Epsom, UK). 2 minutes après cette injection intraveineuse, les souris ont reçu comme traitement 100µg/mL de LR12 ou du PBS dans un volume égal. Sauf pour l'étude de la survie, les souris ont été mises à mort 3 minutes après l'injection du mélange collagène-épinephrine. Le sang et les poumons ont été prélevés afin de compter les plaquettes et de réaliser des coupes histologiques.

Le lobe inférieur droit du poumon a été fixé dans du paraformaldéhyde à 4% puis paraffiné afin de réaliser des coupes histologiques colorées à l'hématoxyline et de l'éosine. Cinq champs (x20) ont ainsi été numérisés pour chaque échantillon et le nombre de thrombi par champ a été compté.

Le lobe inférieur gauche du poumon a, dans un premier temps, été broyé manuellement puis digéré enzymatiquement pendant 45 minutes à 37°C à l'aide d'une solution de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) comprenant 2 mg de collagénase de type I, 30 µg de DNase par mL et 10% de FCS (Fœtal Calf Serum) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Cette suspension cellulaire pulmonaire a ensuite été incubée avec un cocktail d'anticorps dirigé contre CD45, CD11b, Ly6G et Ly6C (Miltenyi Biotec) pendant 30 minutes à 4°C à l'obscurité afin de pouvoir différencier les monocytes/macrophages des neutrophiles. Les cellules ont été lavées au PBS puis fixées avec du paraformaldéhyde à 4% avant d'être analysées par cytométrie en flux. Les données FACS ont été acquises sur Gallios (Beckman Coulter, Indianapolis, États-Unis) et exprimées en nombre de cellules totales par lobe.

3.4.14 Statistiques

Toutes les données brutes, sauf indication contraire, ont une distribution normale et sont présentées en moyenne \pm SD. Les différences significatives entre les groupes ont été obtenues à l'aide du test t de Student. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel Prism Version 6 (GraphPad) et une valeur $P < 0,05$ a été considérée comme significative.

4 Résultats

4.1 La délétion ciblée de TREM-1 au niveau endothélial protège les souris du choc septique

4.1.1 *Trem-1 est exprimé par les cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires humaines (HPMEC)*

Les cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires humaines (HPMEC) sont des cellules primaires isolées du poumon à partir d'un seul donneur. Les cellules sont systématiquement analysées par coloration immunofluorescente par le fournisseur (PromoCell, Heidelberg, Germany) : elles sont positives pour le marqueur CD31 (Platelet endothelial cell adhesion molecule -1, PECAM-1) et pour le facteur von Willebrand (vWF) et négatives pour l'alpha-actine des muscles lisses.

L'expression de *Trem-1* dans les HPMEC a dans un premier temps été analysée par qRT-PCR. On remarque que *Trem-1* est très faiblement exprimé au niveau basal (contrôle), mais suite à une stimulation avec du LPS (10µg/mL) on observe une augmentation significative de l'expression de *Trem-1* avec un pic atteint après 6 heures de stimulation (**Figure 23A**). L'addition de LR12 (50µg/mL), un dodécapeptide synthétique inhibiteur TREM-1, amorti cette régulation positive de TREM-1 induite par LPS.

Pour confirmer ces résultats, l'expression TREM-1 a été analysée par cytométrie en flux (**Figure 23B, C**). La stimulation par LPS a induit une augmentation du pourcentage de cellules positives pour TREM-1 de façon dépendante du temps de stimulation avec également un pic après 6 heures de stimulation. Le niveau d'expression (intensité de fluorescence moyenne) a également été augmenté suite à la stimulation par LPS. Le LR12 réduit de façon significative l'expression de TREM-1 après 3 heures et 6 heures de stimulation. Le LR12 ne présente plus d'effets après 12 heures de stimulation.

Afin de connaître la localisation cellulaire de TREM-1 dans les HPMEC, les cellules ont été marquées pour le facteur von Willebrand (vWF) et pour le noyau à l'aide du TO-PRO3 ainsi que pour TREM-1 (**Figure 24**). TREM-1 n'a pas été observé dans les cellules non stimulées (panel supérieur). Le LPS induit une expression de TREM-1 qui semble être co-localisée avec le facteur Von Willebrand dans les HPMEC (panel inférieur).

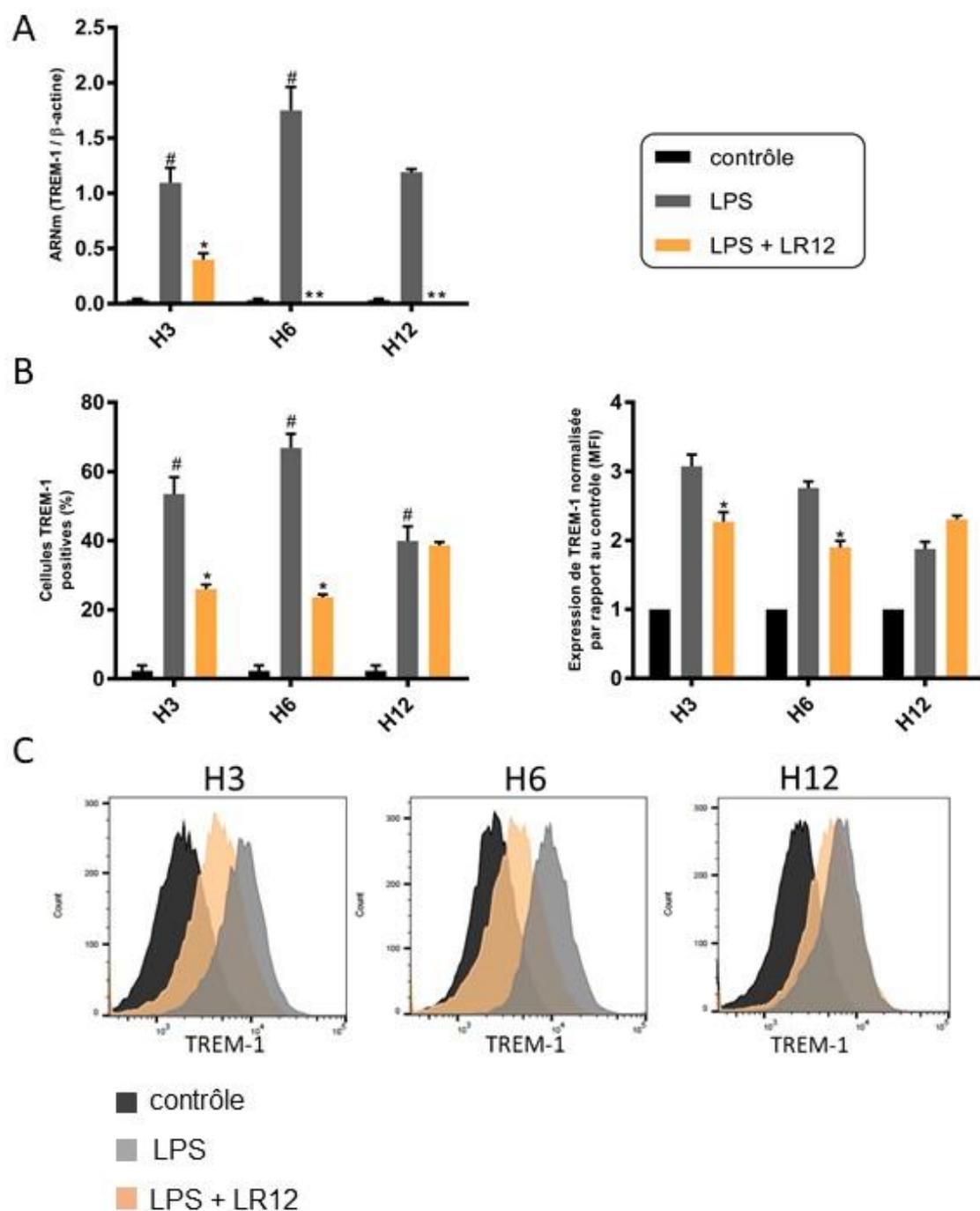
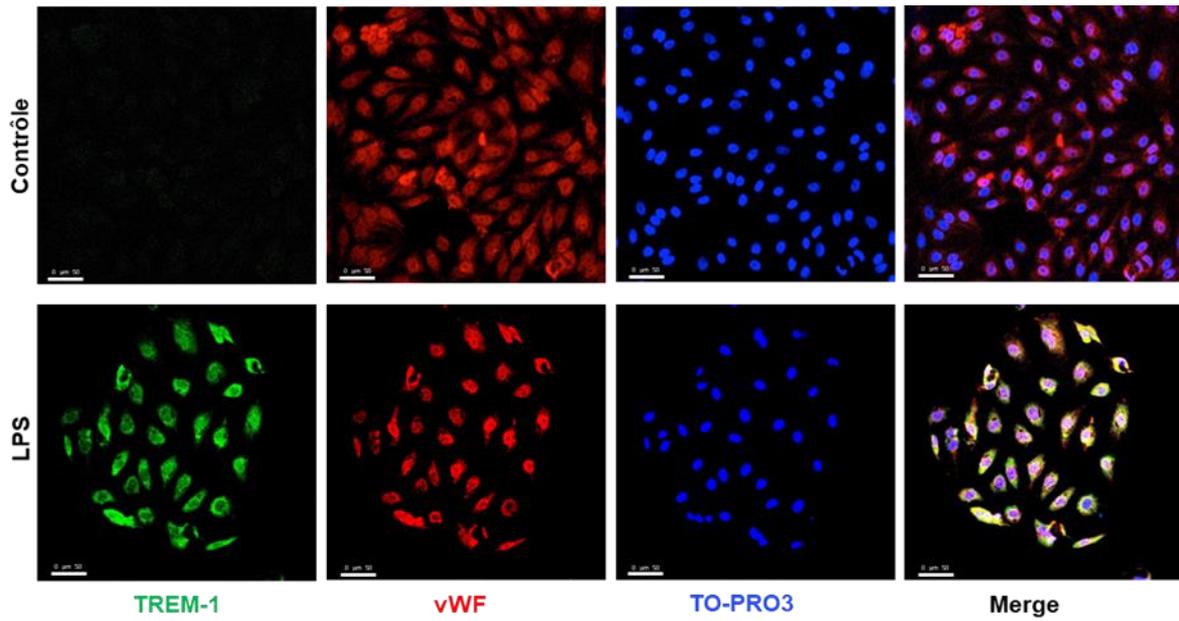


Figure 23 : Trem-1 est exprimé par les cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires humaines (HPMEC)

(A) Quantification par qRT-PCR de l'expression génique de *Trem-1* dans les HPMEC au cours du temps après stimulation par LPS (10µg/mL) en présence ou non de LR12 (50µg/mL), n= 5 par condition, # P<0,05 contrôle vs LPS; *P<0,05, **P<0,01 LPS vs LPS + LR12 (t test). (B) Analyse par cytométrie en flux de l'expression de TREM-1 dans les HPMEC au cours du temps après stimulation par LPS (10µg/mL) en présence ou non de LR12 (50µg/mL). Les résultats présentent le pourcentage de cellules positives pour TREM-1 (panel de gauche) ou le taux d'expression de TREM-1 par rapport au contrôle (fold increase) (panel de droite), n=3 par condition, # P<0,05 contrôle vs LPS; *P<0,05, **P<0,01 LPS vs LPS + LR12 (t test). (C) Histogramme représentatif de l'expression de TREM-1 dans les HPMEC dans les trois groupes aux temps indiqués.



*Figure 24 : Trem-1 est exprimé par les cellules endothéliales
microvasculaires pulmonaires humaines (HPMEC)*

Images de microscopie confocale des HPMEC non stimulées (panel du haut) et stimulées au LPS (10μg/mL) (panel du bas). Les cellules ont été marquées pour TREM-1, le facteur von Willebrand (vWF) et TO-PRO3, échelle = 50μm. Images représentatives de 3 expériences distinctes.

L'ensemble de ces résultats obtenus à l'aide de trois techniques différentes permet de conclure que *Trem-1* est exprimé *in vitro* par les cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires humaines suite à une stimulation par LPS.

4.1.2 *Trem-1* est exprimé par l'endothélium vasculaire

Pour confirmer l'expression de TREM-1 par les cellules endothéliales, nous avons étudié son expression par qRT-PCR dans des aortes et des artères mésentériques prélevées chez des souris WT saines. Ces vaisseaux, une fois prélevés, ont été stimulés *ex vivo* avec du LPS (10µg/mL) pendant 6 heures. L'expression de *Trem-1* est très faible dans les vaisseaux non stimulés mais suite à la stimulation par LPS on observe une augmentation significative de l'expression de *Trem-1* à la fois dans les aortes (**Figure 25A**) et dans les artères mésentériques (**Figure 25B**). On remarque de façon très intéressante que lorsque les aortes ont été préalablement désendothélialisées, l'expression de *Trem-1* disparaît. Ce dernier résultat permet ainsi de conclure que l'expression de *Trem-1* par les vaisseaux est portée par les cellules endothéliales et non par les cellules musculaires lisses ou autres composants de la paroi vasculaire (**Figure 25A**). Ces résultats ont été confirmés par microscopie confocale (**Figure 25C**).

Dans un deuxième temps, des aortes et des artères mésentériques de souris ont été prélevées 18 heures après induction d'un choc septique par ligature et perforation caecale (CLP). Les mêmes résultats que précédemment ont été observés au niveau aortique et mésentérique : *Trem-1* est up-régulé dans les aortes et les artères mésentériques prélevées 18 heures après la CLP (**Figure 26A, B**). L'injection de LR12 2 heures après la chirurgie diminue de façon significative l'expression de *Trem-1*.

L'analyse par microscopie confocale des poumons de souris contrôles et septiques (CLP) révèle que l'expression de TREM-1 est faible chez les animaux sains, mais que celle-ci augmente fortement au cours du choc septique (**Figure 26C**).

Ces données expérimentales nous permettent de conclure que :

- TREM-1 est exprimé *in vivo* par l'endothélium vasculaire, son expression s'accroît au cours du sepsis expérimental chez la souris
- Son expression est modulée par le traitement par LR12

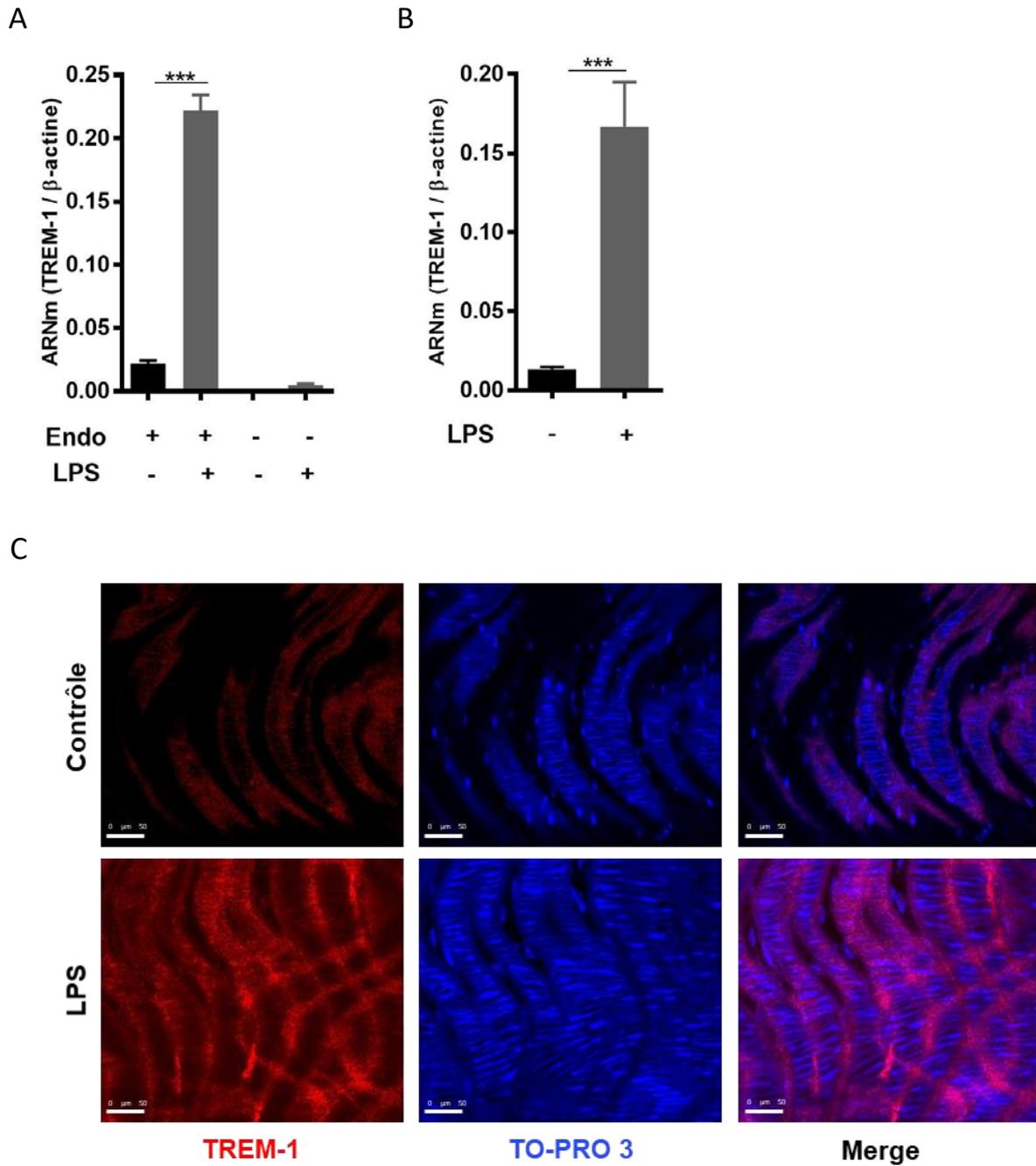


Figure 25 : Le LPS induit l'expression de Trem-1 par l'endothélium vasculaire

Des anneaux aortiques (A) ou mésentériques (B) de souris saines ont été prélevés, nettoyés et stimulés pendant 24h avec du LPS (10 μ g/mL). L'endothélium aortique a été retiré (+Endo) ou non (-Endo) et l'expression génique de *Trem-1* a été déterminée par qRT-PCR, n=6 par groupe, *** P<0,005 (t test). (C) Images de microscopie confocale d'aortes des souris saines contrôles (panel du haut) et des souris saines stimulées pendant 24h avec du LPS (10 μ g/mL) (panel du bas). Ces vaisseaux ont été marqués pour TREM-1, et TO-PRO3, échelle = 50 μ m. Images représentatives de 3 expériences distinctes.

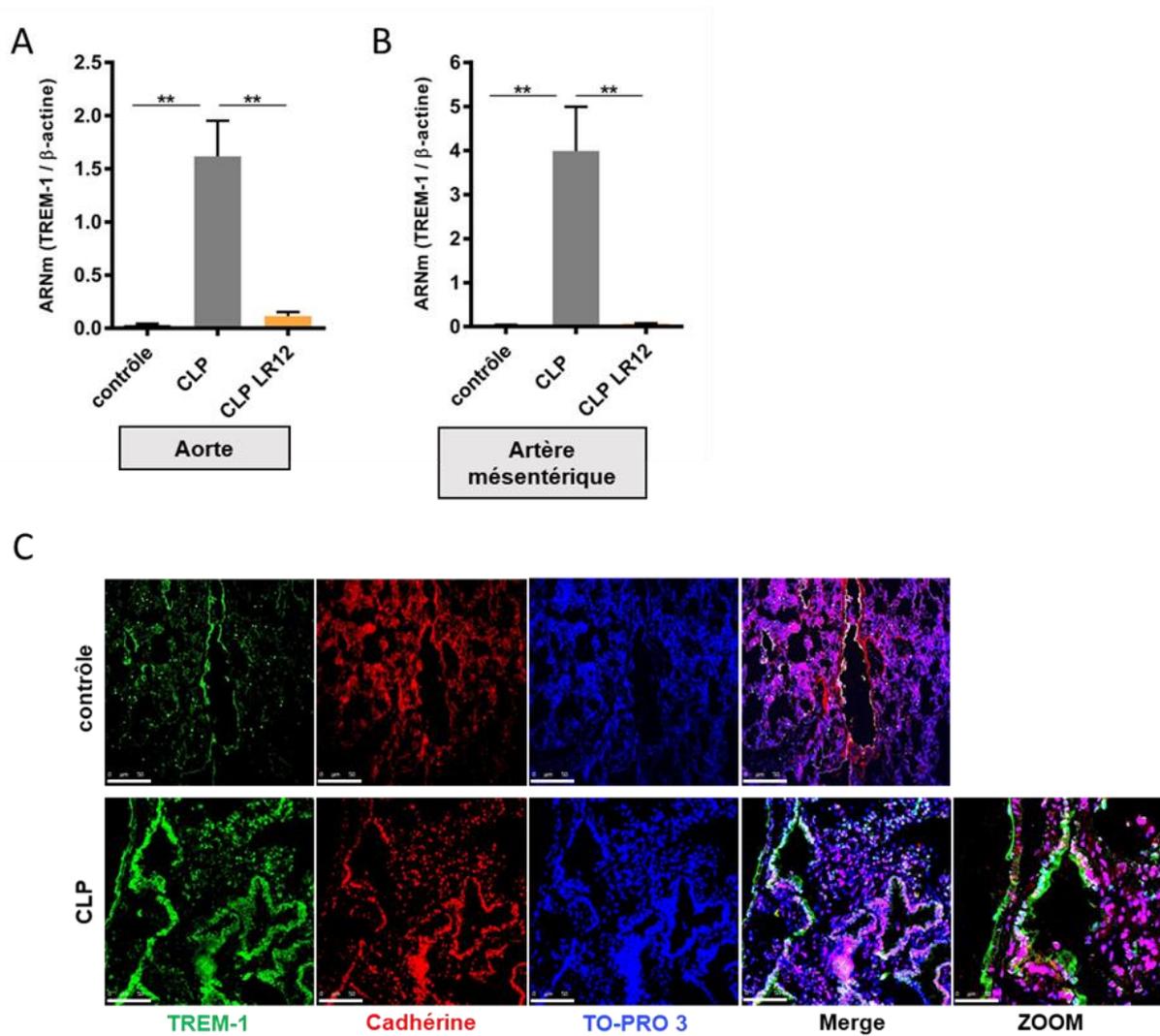


Figure 26 : Trem-1 est exprimé in vivo par l'endothélium vasculaire

Quantification par qRT-PCR de l'expression génique de *Trem-1* dans les aortes (A) et les artères mésentériques (B) des souris contrôles, septiques (CLP) et septiques traitées par LR12 (CLP LR12) (5mg/kg IP, 1 heure après la CLP), n=6 par groupe, **P<0,01 (t test). (C) Images de microscopie confocale des poumons des souris contrôles (panel du haut) et des souris septiques (CLP) (panel du bas). Les poumons ont été marqués pour TREM-1, cadhérine 5 et TO-PRO3, échelle = 50 μ m. Images représentatives de 3 expériences distinctes.

4.1.3 La modulation de TREM-1 inhibe la dysfonction vasculaire induite par le LPS

Nous avons par la suite examiné la fonction du TREM-1 endothélial. Pour cela, des aortes de souris WT saines ont été prélevées afin d'étudier la réponse contractile à la phényléphrine et la relaxation à l'acétylcholine après stimulation avec du LPS et un anticorps monoclonal agoniste de TREM-1. Comme attendu, l'incubation des anneaux aortiques avec du LPS pendant 4 heures a altéré la contractilité et la relaxation (**Figure 27A**). Le LPS induit une hyporeactivité vasculaire et une atteinte de la relaxation endothélium dépendante. La co-incubation avec le peptide LR12 a pratiquement restauré la réponse contractile à la phényléphrine et la relaxation à l'acétylcholine. En revanche, l'activation du TREM-1 endothélial, induite par la stimulation des anneaux aortiques avec un anticorps monoclonal agoniste de TREM-1 (α TREM-1), entraîne une diminution de la contractilité et de la relaxation semblable à celle obtenue avec le LPS. La stimulation avec un anticorps isotypique contrôle n'a aucun effet. Ces données suggèrent que l'engagement de TREM-1 (induit par le LPS ou par l'anticorps agonistique) altère la réactivité vasculaire.

Pour évaluer les effets du peptide LR12 sur les HPMEC stimulées au LPS, la production de NO, s-ICAM-1, s-E-sélectine et IL-6 a été mesurée. La stimulation par LPS induit une production accrue de NO, s-ICAM-1, s-E-sélectine et IL-6 qui a été partiellement réduite par LR12 (**Figure 27B-27E**).

Une analyse de la cinétique d'expression des protéines de signalisation dans les HPMEC a révélé une augmentation de la phosphorylation de ERK1/2, Akt, p38 et p65 et une augmentation de l'expression de COX-2 suite à la stimulation par LPS. Le traitement par LR12 réduit l'expression de ces différentes protéines (**Figure 27F**).

Au-delà d'être responsable du maintien de la réactivité vasculaire, l'endothélium est aussi impliqué dans le trafic de leucocytes. En effet, à la suite de leur adhérence aux cellules endothéliales, les leucocytes sanguins traversent la paroi des vaisseaux pour se retrouver sur le site même de l'inflammation. Nous avons pour cela étudié l'adhésion de monocytes sur une couche de cellules endothéliale (HMPEC) en condition de flux. Deux lignées de cellules monocytaires ont été utilisées : la lignée U937 qui exprime très faiblement TREM-1 et la lignée U937-TD qui sur-exprime TREM-1¹⁴². On remarque que peu de cellules U937 adhèrent aux cellules endothéliales en condition basale. En revanche suite à la stimulation par TNF α le

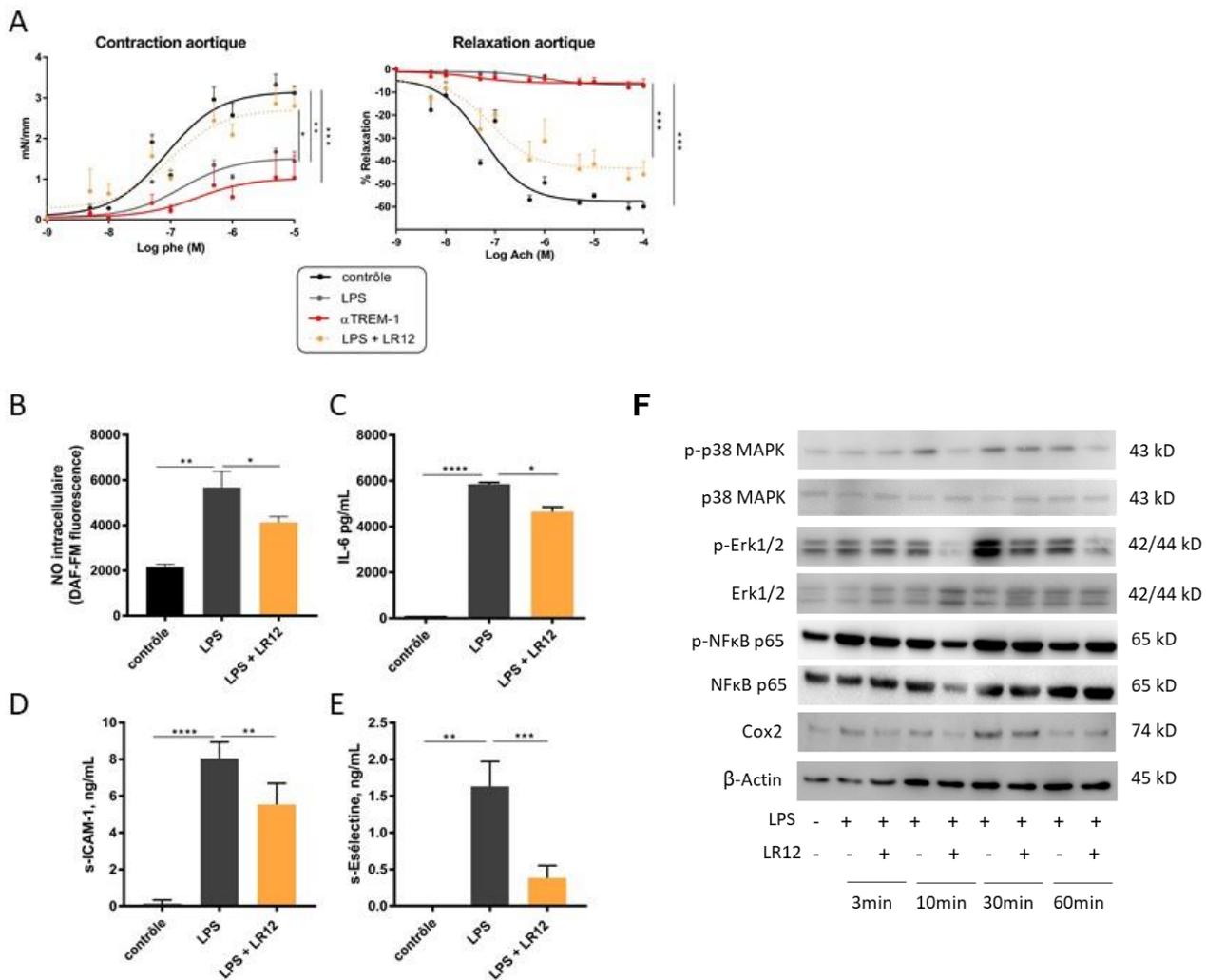


Figure 27 : La modulation de TREM-1 inhibe *in vitro* la dysfonction vasculaire induite par le LPS

(A) Des anneaux aortiques issus de souris WT saines ont été prélevés, nettoyés et stimulés pendant 4 heures avec du LPS (10µg/mL), l'anticorps monoclonal agoniste de TREM-1 (αTREM-1) (5µg/mL) ou du LR12 (20µg/mL) afin d'étudier la réponse à la phényléphrine (Phe) (panel de gauche) et la réponse à l'acétylcholine (Ach) (panel de droite), n=5 par groupe, *P<0,05, **P<0,01, *** P<0,005 (Two-way ANOVA). (B) Les taux de NO intracellulaire produits dans les HPMEC ont été déterminés par cytométrie en flux après stimulation pendant 24 heures par LPS (10µg/mL) en présence ou non de LR12 (50µg/mL), n=3 par condition, *P<0,05, **P<0,01 (t test). Quantification par ELISA des taux d'IL-6 (C), s-ICAM-1 (D) et s-Eslectine (E) dans les surnageants de culture des HPMEC après 24 heures de stimulation par LPS (10µg/mL) en présence ou non de LR12 (50µg/mL), n=6 par condition, *P<0,05, **P<0,01, *** P<0,005 (t test). (F) Analyse par Western Blot des voies de signalisation dans les HPMEC après 3, 10, 30 et 60 minutes de stimulation par LPS (10µg/mL) en présence ou non de LR12 (50µg/mL), Blots représentatifs de 3 expériences.

nombre de monocytes adhérents augmente (**Figure 28**). L'adhésion des monocytes est encore plus marquée lorsque l'on utilise des cellules U937-TD. Cette approche nous permet de conclure que la surexpression TREM-1 sur les cellules U937 favorise l'adhésion aux cellules endothéliales.

L'ensemble de ces résultats indique un rôle de TREM-1 dans l'activation de l'endothélium et la réactivité vasculaire.

4.1.4 L'inhibition de TREM-1 protège les souris de la dysfonction vasculaire induite par le choc septique

Nous avons ensuite étudié l'effet du traitement par LR12 sur la réponse contractile à la phényléphrine ainsi que sur la relaxation à l'acétylcholine endothélium dépendante au niveau d'anneaux issus d'aortes thoraciques et d'artères mésentériques de souris ayant subi un choc septique par péritonite (CLP).

Nous constatons que la réponse contractile à la phényléphrine des vaisseaux aortiques et mésentérique est significativement réduite chez les souris septiques (CLP) par rapport aux souris saines (contrôles). On observe également que la relaxation endothélium dépendante induite par l'acétylcholine est sévèrement altérée chez les souris septiques par rapport aux souris saines. Il y a donc une altération de la réactivité vasculaire avec une moindre sensibilité aux catécholamines et une dysfonction endothéliale ce qui se traduit par une hyporeactivité vasculaire et une atteinte de la relaxation endothélium dépendante au cours du sepsis. Ces phénomènes sont caractéristiques de la dysfonction vasculaire observée au cours du sepsis. Après traitement par LR12, la réponse contractile à la phényléphrine et la relaxation à l'acétylcholine au niveau aortique et mésentérique sont améliorées (**Figure 29A**).

Nous avons également étudié l'impact de l'administration du LR12 sur la réponse inflammatoire au niveau vasculaire en s'intéressant plus particulièrement à l'expression génique de trois cytokines inflammatoires :

- TNF α : cytokine pro-inflammatoire d'expression précoce
- IL-6 : cytokine pro-inflammatoire d'expression secondaire
- IL-10 : cytokine anti-inflammatoire

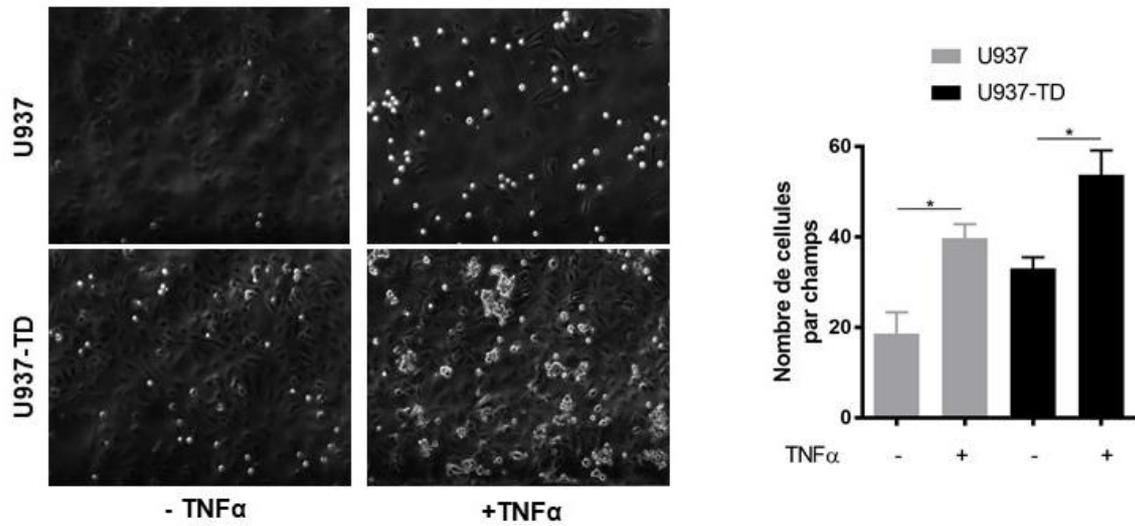


Figure 28 : La surexpression de TREM-1 sur les cellules U937 favorise l'adhésion aux cellules endothéliales

Analyse de l'adhésion des cellules U937 et U937-TD sur une couche de cellule endothéliales (HPMEC) dans des conditions de flux constant (0,5 dyne·cm⁻² pendant 3 minutes). Les cellules endothéliales ont été stimulées ou non par du TNF α (10ng/mL) pendant 2 heures. Images représentatives de 3 champs microscopiques pour chaque condition, le nombre de cellules adhérentes a été calculé et analysé, n=3 par condition, *P< 0,05 (t test).

On observe les mêmes résultats au niveau aortique qu'au niveau mésentérique par rapport au profil d'expression de ces trois gènes. (**Figure 29B, C**)

Nous remarquons une augmentation significative de l'expression génique de *Tnfa*, *Il-10* et *Il-6* chez les souris malades (CLP) par rapport aux souris saines (contrôles). Le choc septique induit une réponse inflammatoire vasculaire massive comme en témoignent la surexpression de ces gènes pro et anti-inflammatoires. En revanche, il existe une diminution significative de l'expression de *Tnfa*, *Il-10* et *Il-6* lorsque les souris malades ont été traitées par LR12 (CLP LR12) par rapport aux souris malades (CLP).

Au cours du choc septique, il a été démontré une atteinte de la synthèse et de la production de certaines protéines constitutives et une surexpression de protéines inductibles. Les deux voies de signalisation les plus impliquées sont la voie des NOS (PI3K/Akt/eNOS) et des cyclooxygénases (COX-1, COX-2)^{145,146}. Que ce soit au niveau aortique ou au niveau mésentérique, on observe dans le groupe CLP, une diminution de l'expression des protéines constitutives p-Akt et COX-1 par rapport aux animaux témoins. Le traitement par LR12 restaure l'expression de ces deux protéines (**Figure 30A, B**). Parallèlement, nous avons quantifié l'expression des protéines inductibles (iNOS, COX-2). Le choc septique induit une augmentation de l'expression de ces protéines, et ce phénomène est atténué par LR12.

L'inhibition pharmacologique de TREM-1 par l'utilisation du peptide LR12 permet donc de prévenir de l'inflammation et la dysfonction vasculaire induit par un choc septique en :

- Améliorant la réponse contractile et relaxante *ex vivo*
- Modulant la réponse inflammatoire au niveau aortique et mésentérique

Cet effet bénéfique passe vraisemblablement par la modulation de la voie de TREM-1 et peut être le reflet d'une action directe sur l'endothélium.

4.1.5 La délétion de Trem-1 au niveau endothélial protège les souris contre le choc septique

Pour répondre à cette question des souris délétées pour le gène *Trem-1* au niveau endothélial (EndoTrem-1^{-/-}) ont été utilisées. Nous avons étudié dans un premier temps l'effet de la délétion de *Trem-1* au niveau endothélial sur la réponse contractile à la phényléphrine ainsi que sur la relaxation à l'acétylcholine endothélium dépendante sur des anneaux issus d'aortes

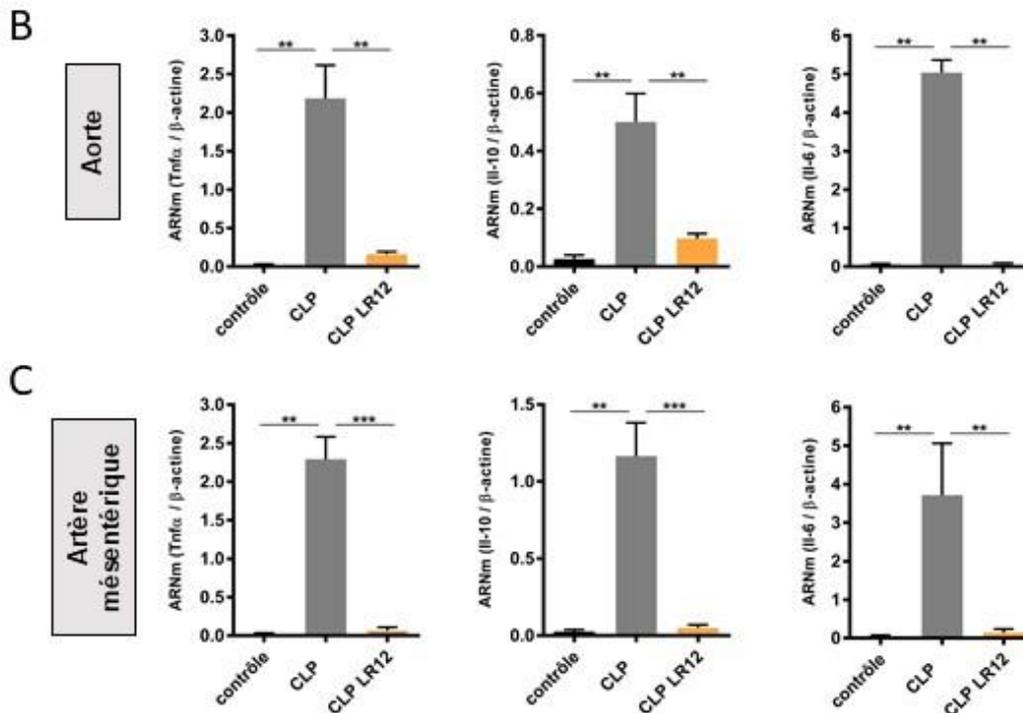
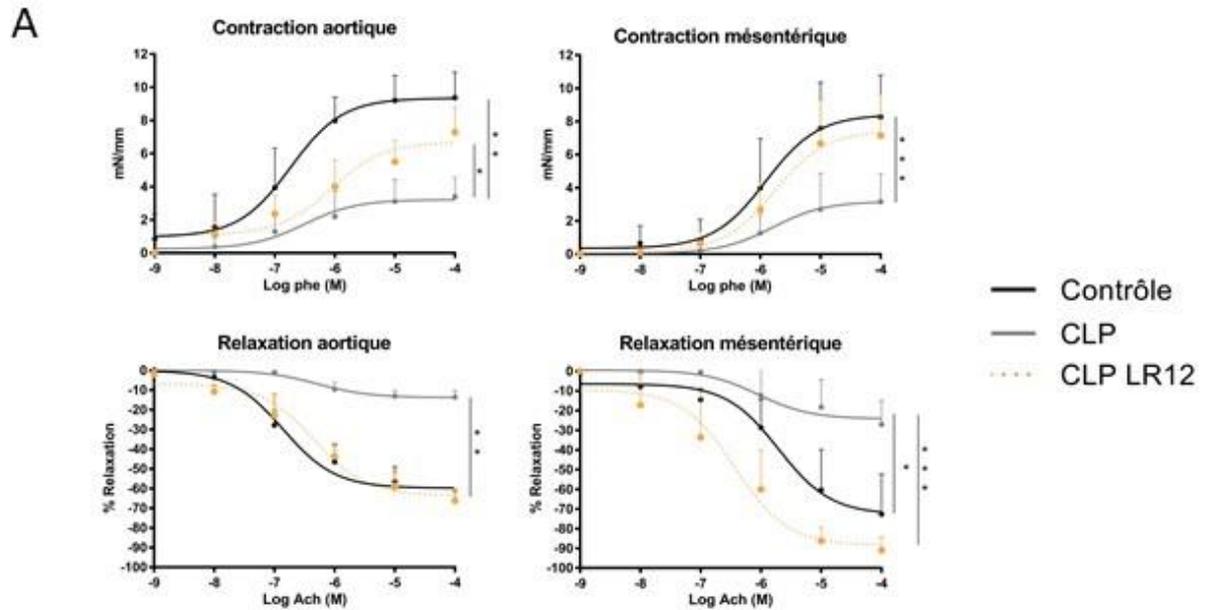


Figure 29 : L'inhibition pharmacologique de TREM-1 protège les souris de la dysfonction et de l'inflammation vasculaire induite par le choc septique

(A) Etude de la réponse à la phényléphrine (Phe) (panel du haut) et de la réponse à l'acétylcholine (Ach) (panel du bas) au niveau d'anneaux aortiques et mésentériques de souris contrôles, septiques (CLP) et septiques traitées par LR12 (CLP LR12), $n=7-9$ par groupe de souris, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,005$ (Two-way ANOVA). Quantification par qRT-PCR de l'expression génique de *Tnfa*, *Il-10* and *Il-6* dans les aortes (B) et les artères mésentériques (C) des trois groupes de souris, $n=6$ par groupe, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,005$ (t test).

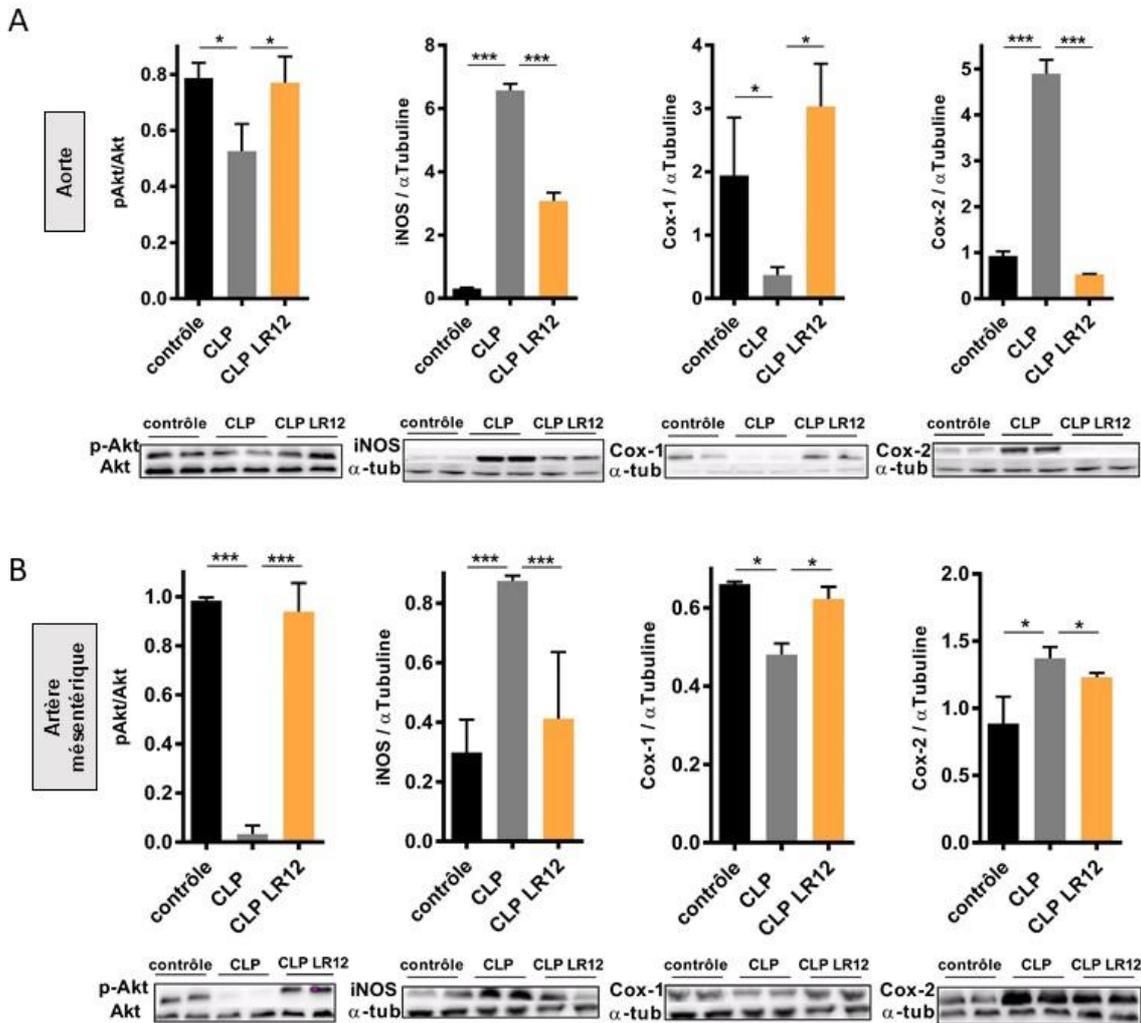


Figure 30 : L'inhibition pharmacologique de TREM-1 module les signaux intracellulaires impliqués dans la dysfonction vasculaire induite par le choc septique

Analyse par Western Blot de l'expression de (p)Akt, iNOS, COX-1 et COX-2 au cours du choc septique au niveau de l'aorte (A) et de l'artère mésentérique (B) des souris contrôles, septiques (CLP) et septiques traitées par LR12 (CLP LR12) 24 heures après la CLP, blots représentatifs en dessous de chaque histogramme, n=6 par groupe, *P<0,05, *** P<0,005 (t test).

thoraciques et d'artères mésentériques de souris ayant subi un choc septique par péritonite (CLP). Comme attendu, on observe une hyporeactivité vasculaire et une atteinte de la relaxation endothélium dépendante chez les souris WT septiques (CLP) (**Figure 31A**). On observe que la relaxation à l'acétylcholine au niveau aortique et mésentérique est préservée après la CLP chez les souris EndoTrem-1^{-/-}. En revanche, la réponse contractile à la phényléphrine est identique chez les souris WT et EndoTrem-1^{-/-} septiques. L'abolition sélective de *Trem-1* au niveau endothélial restaure la relaxation endothélium dépendante donc atténue la dysfonction endothéliale induite par le choc septique. Ces résultats indiquent, pour la première fois, un rôle du TREM-1 endothélial dans la relaxation vasculaire.

Les concentrations de sTREM-1, un marqueur soluble de l'activation de TREM-1, ont été mesurées par ELISA dans le plasma, le poumon et le liquide péritonéal des différents groupes de souris. On observe une nette augmentation de sTREM-1 dans le plasma, le poumon et le liquide péritonéal chez les souris WT septiques 24 heures et 72 heures après la CLP (CLP H24, CLP H72) par rapport aux souris contrôles. Chez les souris EndoTREM-1^{-/-} septiques, le niveau de sTREM-1 dans les trois compartiments cellulaires a été partiellement ou totalement réduit, ce qui indique que les cellules endothéliales semblent être une source majeure de TREM-1 (**Figure 31B, E, H**). Les taux de sVCAM-1 et IL-6 ont également été mesurés dans le plasma et le poumon, on observe une diminution significative des concentrations plasmatiques en sVCAM-1 et IL-6 chez les souris EndoTREM-1^{-/-} septiques par rapport aux souris WT septiques (**Figure 31C, D**). En revanche, on n'observe pas de différence significative entre les taux pulmonaires de sVCAM-1 et IL-6 chez les souris WT septiques et chez les souris EndoTREM-1^{-/-} septiques (**Figure 31F, G**).

On remarque également que la survie est très nettement améliorée chez le groupe de souris EndoTREM-1^{-/-} par rapport au groupe de souris WT (**Figure 31I**).

Nous avons ensuite voulu savoir si la modulation de l'inflammation pouvait s'expliquer par une réduction du nombre de cellules inflammatoires dans les poumons, la rate et le liquide péritonéal (**Figure 32**). Pour cela, nous avons suivi par FACS l'infiltration des neutrophiles et des monocytes Ly6C^{high} et Ly6C^{Low} dans ces trois compartiments. Dans le poumon, on remarque une accumulation de neutrophiles et de monocytes Ly6C^{high} 24 heures après la CLP chez les souris WT. Cette accumulation est réduite chez les souris EndoTrem-1^{-/-} septiques, ce qui suggère que le blocage de *Trem-1* au niveau endothélial réduit la mobilisation des monocytes et des neutrophiles dans le poumon.

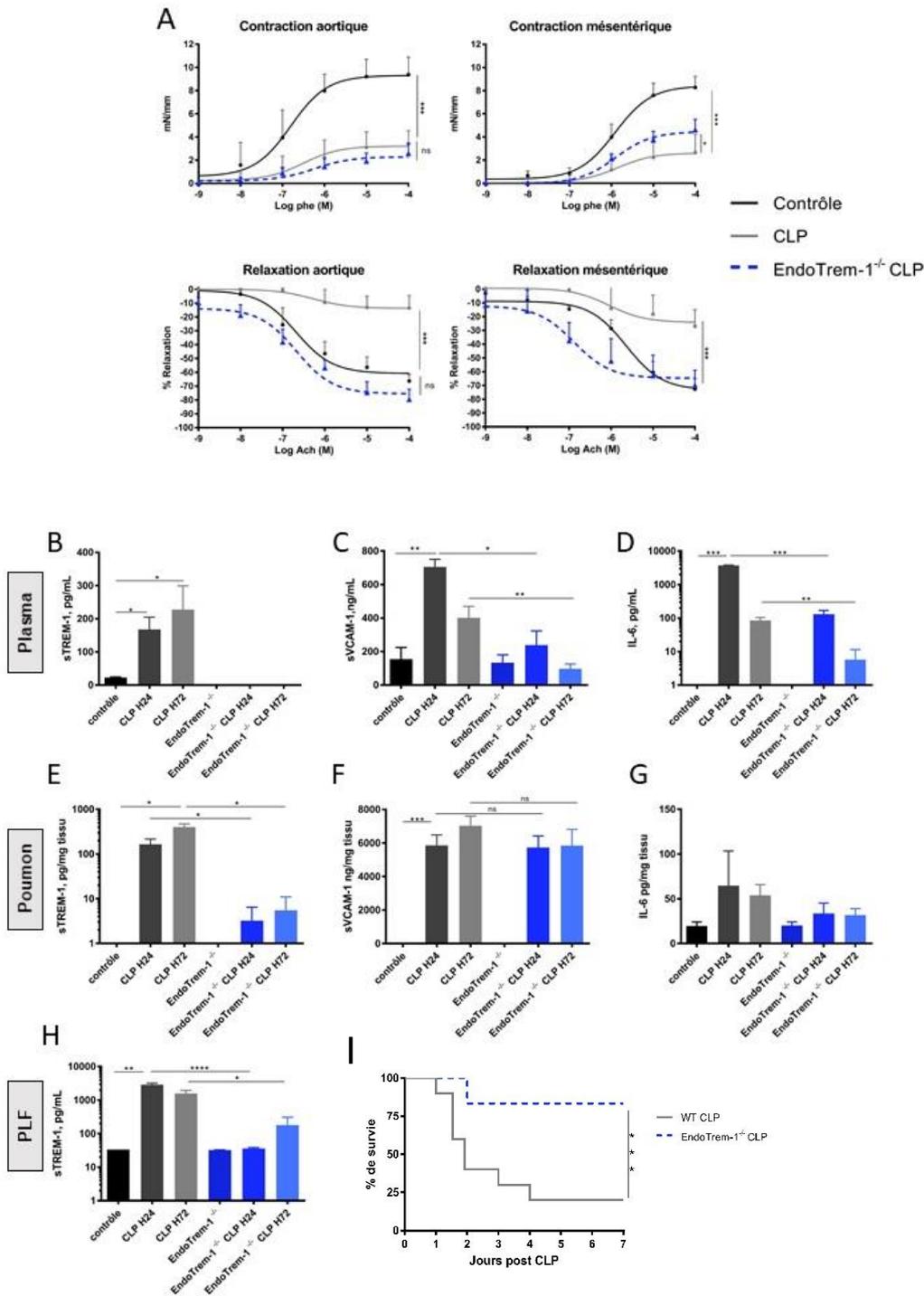


Figure 31 : La délétion de Trem-1 au niveau endothélial protège les souris du choc septique

(A) Etude de la réponse à la phényléphrine (Phe) (panel du haut) et à l'acétylcholine (Ach) (panel du bas) au niveau d'anneaux aortiques et mésentériques de souris contrôles, WT septiques (CLP) et EndoTrem-1^{-/-} septiques (EndoTrem-1^{-/-} CLP), n=7-9 par groupe, *** P<0,005 (Two-way ANOVA). (B-H) Quantification par ELISA des taux de sTREM-1, IL-6 et sVCAM-1 dans le plasma, le poumon et le liquide péritonéal (PLF) des souris contrôles, WT septiques (CLP) et EndoTrem-1^{-/-} septiques (EndoTrem-1^{-/-} CLP), n=6 par groupe, *P< 0,05, **P<0,01 (t test). (I) Etude de la survie post CLP chez les souris WT et EndoTrem-1^{-/-}, n=15, ***P=0,0006 WT vs EndoTrem-1^{-/-} (Log Rank test).

Il est à noter que la délétion de *Trem-1* au niveau endothélial favorise l'accumulation dans le poumon de cellules réparatrices à savoir les monocytes Ly6C^{low} (**Figure 32A**). On observe 72 heures après la CLP une forte infiltration de la rate par les neutrophiles et les monocytes chez les souris WT, cette accumulation est significativement réduite chez les souris EndoTrem-1^{-/-} septiques (**Figure 32B**). En revanche, on constate chez les souris EndoTrem-1^{-/-} septiques une infiltration importante de monocytes Ly6C^{high} et Ly6C^{Low} dans la cavité péritonéale par rapport aux souris WT (**Figure 32C**).

Ces observations suggèrent un rôle du TREM-1 endothélial dans la régulation du trafic leucocytaire.

L'ensemble de ces données nous a permis de montrer pour la première fois que *Trem-1* est exprimé et inductible dans les cellules endothéliales. Il joue un rôle direct dans l'inflammation et la dysfonction vasculaire. L'abolition sélective de *Trem-1* au niveau endothélial protège les animaux en modulant le recrutement et l'activation des cellules inflammatoires, en restaurant la réactivité vasculaire et en améliorant la survie.

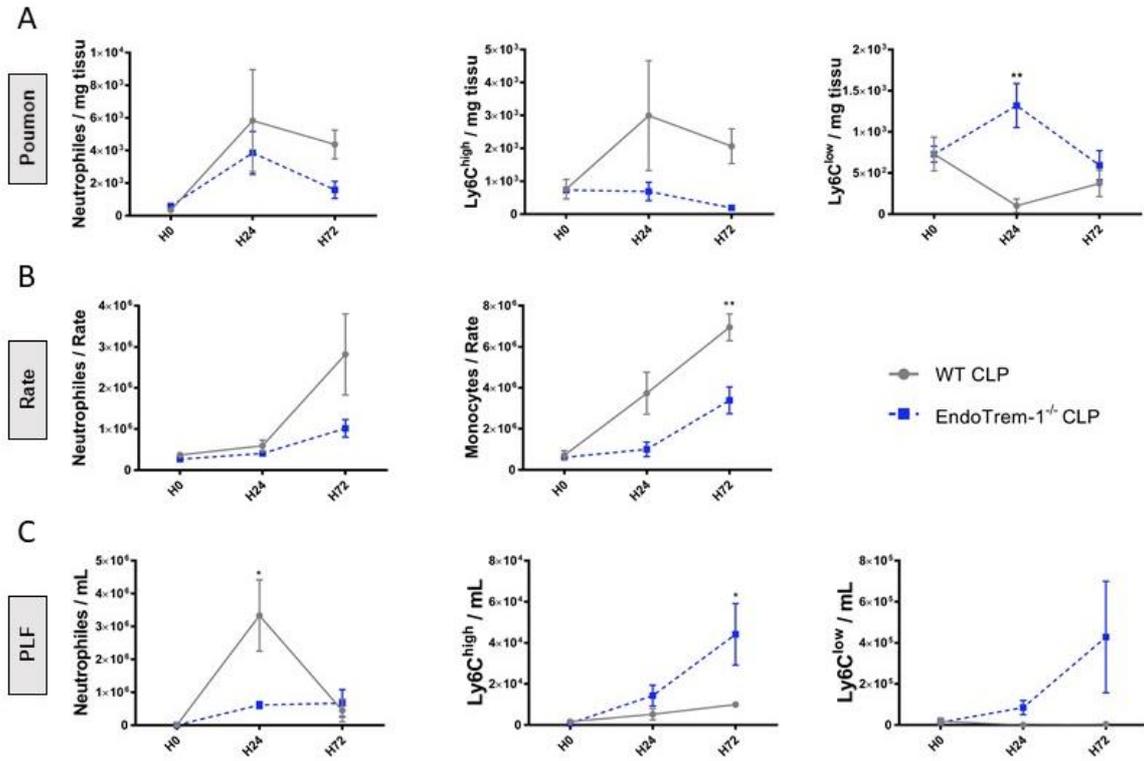


Figure 32 : Etude du trafic leucocytaire chez les souris WT et EndoTrem-1^{-/-} septiques

Quantification par cytométrie en flux du nombre de monocytes (Ly6C^{High} and Ly6C^{Low}) et de neutrophiles dans le poumon (A), la rate (B) et le liquide péritonéal (PLF) (C) 24 et 72 heures après la CLP, n=6 par groupe, *P< 0,05, **P<0,01 WT vs EndoTrem-1^{-/-} (Two-way ANOVA).

4.2 TREM-1, un nouvel acteur de l'agrégation plaquettaire

4.2.1 *Trem-1* est exprimé de manière constitutive par les plaquettes

Triggering receptor expressed on myeloid cells Like Transcript-1 (TLT-1) est un récepteur membranaire présent à la surface des plaquettes et des mégacaryocytes. Il est initialement retrouvé dans les granules alpha des plaquettes non activées, mais suite à l'activation de ces cellules, TLT-1 se retrouve exposé à la membrane^{129,147}. Il est à noter que le gène codant pour TLT-1 se trouve dans le cluster génique des TREMs : cela nous a donc incité à s'interroger sur l'expression de *Trem-1* par les plaquettes. Pour vérifier la présence de TREM-1 dans les plaquettes, son expression génique ainsi que celle de sa protéine adaptatrice DAP12 a été évalué par qRT-PCR. La **Figure 33A** nous permet de conclure à la présence d'ARNm codant pour *Trem-1* et *Dap12* dans les plaquettes lorsque celles-ci ont été activées par la thrombine (1U/mL) pendant 5minutes.

Pour confirmer ces résultats obtenus au niveau génique, l'expression de TREM-1 au niveau protéique a dans un second temps été analysé. La présence de la protéine TREM-1 dans les plaquettes inactivées et activées par la thrombine a été confirmée par Western Blot grâce à l'utilisation de deux anticorps différents (**Figure 33B, C**). La Figure 31B révèle la présence de TREM-1 dans les plaquettes grâce à l'utilisation de l'anticorps monoclonal de chez AbD Serotec (Mouse anti Human Trem-1 antibody, clone TREM-37). L'autre anticorps utilisé (**Figure 33C**) vient de chez RnDsystems (Goat Anti-Human TREM-1, # AF1278), des monocytes ont été utilisés ici comme contrôle positif.

De plus, l'analyse par cytométrie en flux révèle une faible expression basale de TREM-1 par les plaquettes, mais suite à l'activation par la thrombine, on observe une augmentation significative de l'expression de TREM-1. Ces résultats sont encore plus nets lorsque les plaquettes ont été préalablement perméabilisées (**Figure 33D**).

Afin de connaître la localisation cellulaire de TREM-1 dans les plaquettes, celles-ci ont été marquées pour CD62P (P-sélectine) et GPIIb (Glycoprotéine IIb) qui sont deux marqueurs plaquettaires ainsi que pour TREM-1. L'analyse par microscopie confocale révèle que TREM-1 semble être co-localisé avec CD62P dans les plaquettes inactivées et activées par la thrombine. On remarque également, qu'après activation des plaquettes par la thrombine, TREM-1 se clustérise au niveau de la membrane (**Figure 34A**). Les plaquettes ont également

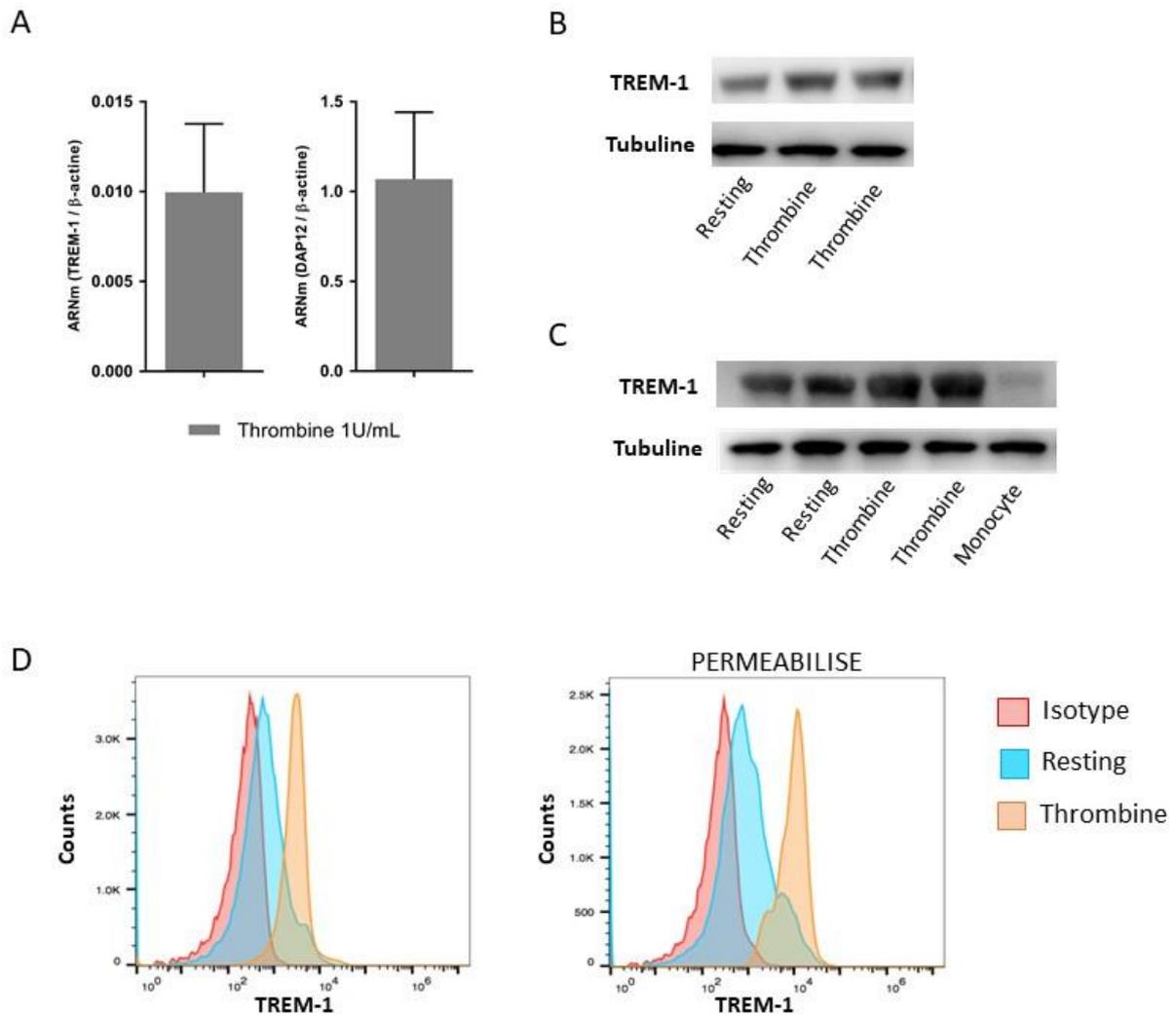


Figure 33 : TREM-1 est exprimé par les plaquettes humaines

(A) Quantification par qRT-PCR de l'expression génique de *Trem-1* et *Dap12* dans les plaquettes humaines activées par la thrombine (1U/mL, 5 minutes), n=5 par condition. (B) Analyses par Western Blot de l'expression de TREM-1 (anti-TREM-1 Ab Serotec) et de la tubuline (Cell Signalling) dans des plaquettes non activées (Resting) et activées par la thrombine (1U/mL, 5 minutes). (C) Analyses par Western Blot de l'expression de TREM-1 avec un deuxième anticorps (anti-TREM-1 RnD Systems) et de la tubuline, dans des plaquettes non activées, activées par la thrombine et dans des monocytes humains non stimulés. (D) Analyses par cytométrie en flux de l'expression de TREM-1 dans les plaquettes humaines non perméabilisées (panel gauche) et perméabilisées (panel droit).

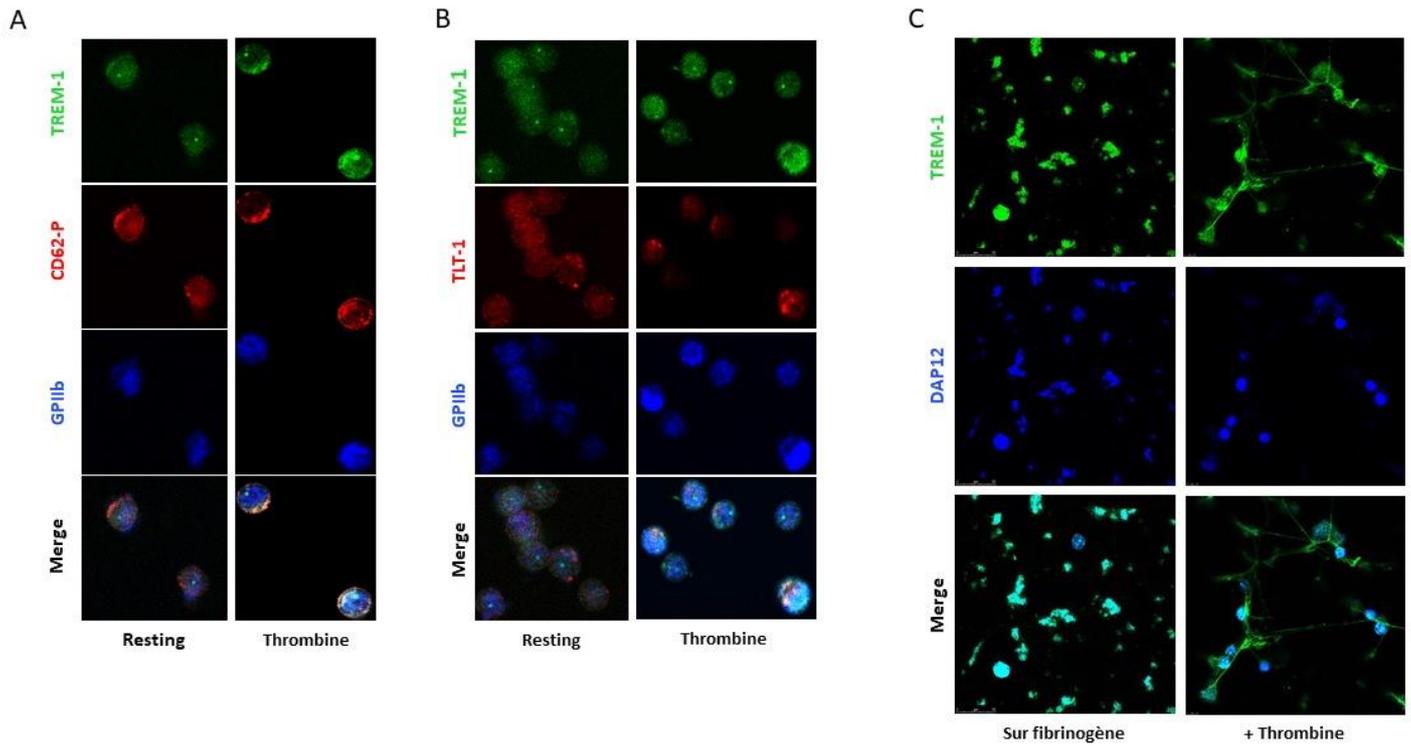


Figure 34 : TREM-1 est exprimé par les plaquettes humaines

Images de microscopie confocale de plaquettes humaines non activées (Resting) et activées (Thrombine 1U/mL ; 5 minutes). Les plaquettes ont été marquées pour TREM-1, CD62P et GPIIb (A) ou pour TREM-1, TLT-1 et GPIIb (B), échelle : 10 μ m. (C) Images de microscopie confocale de plaquettes humaines adhérentes sur une matrice de fibrinogène. Les plaquettes ont été activées ou non par la thrombine (1U/mL, 5 minutes) et marquées pour TREM-1 et DAP12, échelle : 25 μ m. Images représentatives de 3 expériences distinctes.

été marquées pour TLT-1 ; on observe que TREM-1 et TLT-1 sont colocalisés dans les plaquettes inactivées ; en revanche ce n'est plus le cas lorsque les plaquettes sont activées (**Figure 34B**). De plus lorsque les plaquettes ont adhéré sur du fibrinogène, on observe une colocalisation de TREM-1 et DAP12, mais une fois les plaquettes activées par la thrombine, TREM-1 se clustérise et les plaquettes forment de longs filaments entre elles contenant une quantité importante de TREM-1 alors que le marquage de DAP12 reste lui inchangé (**Figure 34C**).

L'ensemble de ces résultats obtenus par différentes techniques permet de conclure que TREM-1 est exprimé de façon constitutive dans les granules alpha et se clustérise à la membrane lors de l'activation des plaquettes.

4.2.2 La modulation de TREM-1 réduit la sécrétion plaquettaire

L'élévation de la concentration en calcium intracellulaire est une conséquence immédiate de la stimulation des plaquettes et constitue un événement crucial de leur activation. Pour inhiber TREM-1, le peptide synthétique LR12 a été utilisé ainsi que le peptide LR12Scr comme contrôle. La pré-incubation du LR12 induit une nette réduction de la mobilisation de calcium induite par TRAP, ADP et collagène (**Figure 35A**). En plus de la mobilisation de calcium intracellulaire, l'activation des plaquettes implique d'autres mécanismes de signalisation comme la synthèse d'AMPc et de thromboxane A2. L'effet du LR12 sur ces voies de signalisations a donc été étudié dans des plaquettes inactivées et activées par la thrombine ou la convulxine. La thrombine et la convulxine inhibent l'accumulation d'AMPc dans les plaquettes et ce phénomène est atténué en présence de LR12 (**Figure 35B**). La libération de thromboxane B2 par les plaquettes (le métabolite stable du thromboxane A2) induite par la thrombine est réduite de façon significative par le LR12 (**Figure 35C**). L'effet de l'inhibition de TREM-1 sur les sécrétions des granules denses a également été étudié, en s'intéressant plus particulièrement à la libération d'ATP suite à une stimulation par la thrombine et la convulxine. Le peptide LR12 diminue la libération d'ATP par les plaquettes suite à l'activation par ces deux agonistes (**Figure 35D**).

La P-sélectine (CD62P) est une protéine majeure des granules alpha qui est fortement exprimée à la surface des plaquettes lors de l'activation. Le LR12 réduit l'expression de la

P-sélectine suite à l'activation des plaquettes par TRAP. En revanche, aucun effet du LR12 n'est observé suite à l'activation des plaquettes par l'ADP (**Figure 35E**).

Nous avons ensuite voulu savoir si la réduction de la sécrétion plaquettaire observée en présence de LR12 était associée à une diminution de l'activation de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. Pour cela, la liaison de l'anticorps anti-PAC-1 a été mesurée par cytométrie en flux. Comme l'illustre la **Figure 35F**, ADP et TRAP induisent la liaison de PAC-1, cette liaison est significativement diminuée suite au traitement par LR12.

La signalisation inside-out de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ joue un rôle essentiel dans la modulation de sa conformation pour augmenter son affinité pour le fibrinogène plasmatique ainsi que sa liaison au facteur von Willebrand (vWF) et par conséquent augmenter l'agrégation plaquettaire. On remarque grâce la **Figure 35G** que le LR12 réduit la liaison du fibrinogène aux plaquettes activées.

L'inhibition de TREM-1 est également associée à une diminution de la phosphorylation des protéines ERK1/2 et PLC γ 2, qui sont deux protéines intervenant dans la signalisation intracellulaire de TREM-1 (**Figure 35H**).

L'ensemble de ces données nous permettent de conclure que la modulation de TREM-1 réduit l'activation et la sécrétion plaquettaire.

4.2.3 La modulation de TREM-1 réduit l'agrégation et l'adhésion plaquettaire

Pour étudier le rôle de TREM-1 dans la régulation de l'activation plaquettaire, nous avons évalué l'effet de LR12 sur l'agrégation plaquettaire en réponse à divers agonistes plaquettaires, à savoir le collagène, l'ADP, la thrombine et l'acide arachidonique. L'agrégation plaquettaire induite par le collagène, l'ADP, de faibles doses de thrombine et l'acide arachidonique est altérée par le LR12 chez l'homme. Lorsqu'on augmente la concentration en thrombine (1U/mL), qui est un agoniste plaquettaire puissant, l'effet anti-agrégant du LR12 disparaît (**Figure 36A**). L'effet inhibiteur du LR12 disparaît également lorsqu'on diminue sa concentration (25 et 5 $\mu\text{g/mL}$) (**Figure 36B**). Le peptide LR12 scramble ne montre aucun effet sur l'agrégation plaquettaire (**Figure 36C**).

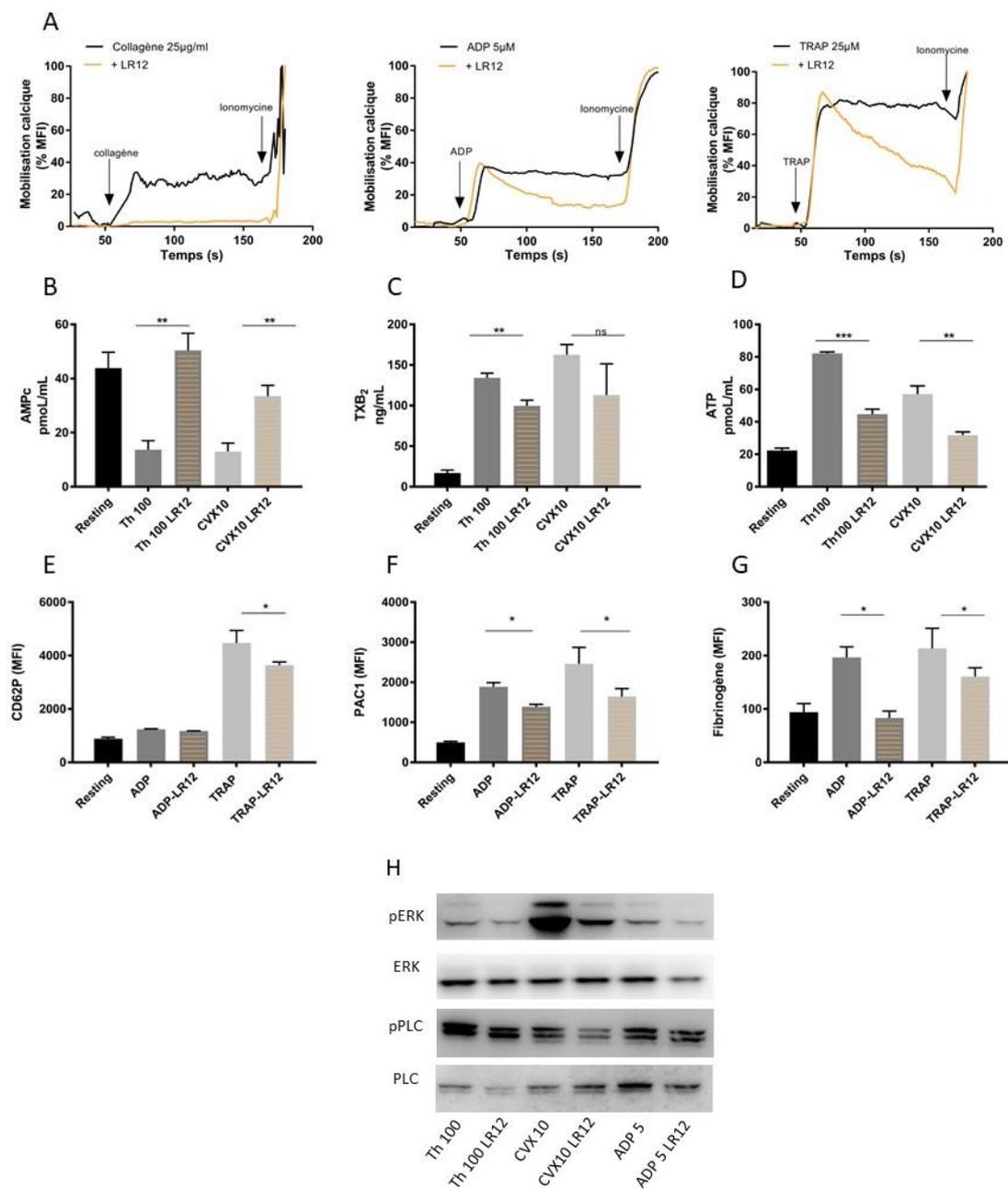


Figure 35 : Effet du peptide LR12 sur la mobilisation de Ca^{2+} intracellulaire, sur la synthèse d'AMPc, de thromboxane B2 et d'ATP, et sur l'activation de l'intégrine $\alpha IIb \beta 3$.

(A) Effet du peptide LR12 (50µg/mL) sur la mobilisation de Ca^{2+} intracellulaire dans des plaquettes activées par le TRAP (25µM), le collagène (25µg/mL) ou l'ADP (5µM). Les résultats sont représentatifs de 3 expériences et exprimés en pourcentage de MFI normalisé entre le taux basal (0%) et le taux maximum (Ionomycine, 100%). L'accumulation d'AMPc (B) et de thromboxane B₂ (TXB₂) (C) a été déterminée dans les plaquettes inactivées et activées par la thrombine (100mU/mL) ou la convulxine (CVX 10nM) pendant 5 minutes en présence ou non de LR12 (50µg/mL), n=3 par condition, **P<0,01 (t test). (D) L'effet du LR12 (50µg/mL) sur la sécrétion des granules denses a été évalué en mesurant la libération d'ATP induite par la thrombine (100mU/mL) ou la convulxine (CVX 10nM), n=3 par condition, **P<0,01; ***P<0,005 (t test). Analyse par cytométrie en flux de l'expression de CD62P (E), de la liaison de PAC-1 (F) et du fibrinogène (G) aux plaquettes humaines stimulées par ADP (5µM) ou TRAP (50µM) en présence ou non de LR12 (50µg/mL), n=8, *P<0.05 (t test). (H) Etude de l'expression de (p)ERK et p(PLC) par Western Blot dans des plaquettes activées par la thrombine (100mU/mL), la convulxine (CVX 10nM) et l'ADP (5µM) en présence ou non de LR12 (50µg/mL). Résultats représentatifs de 3 expériences.

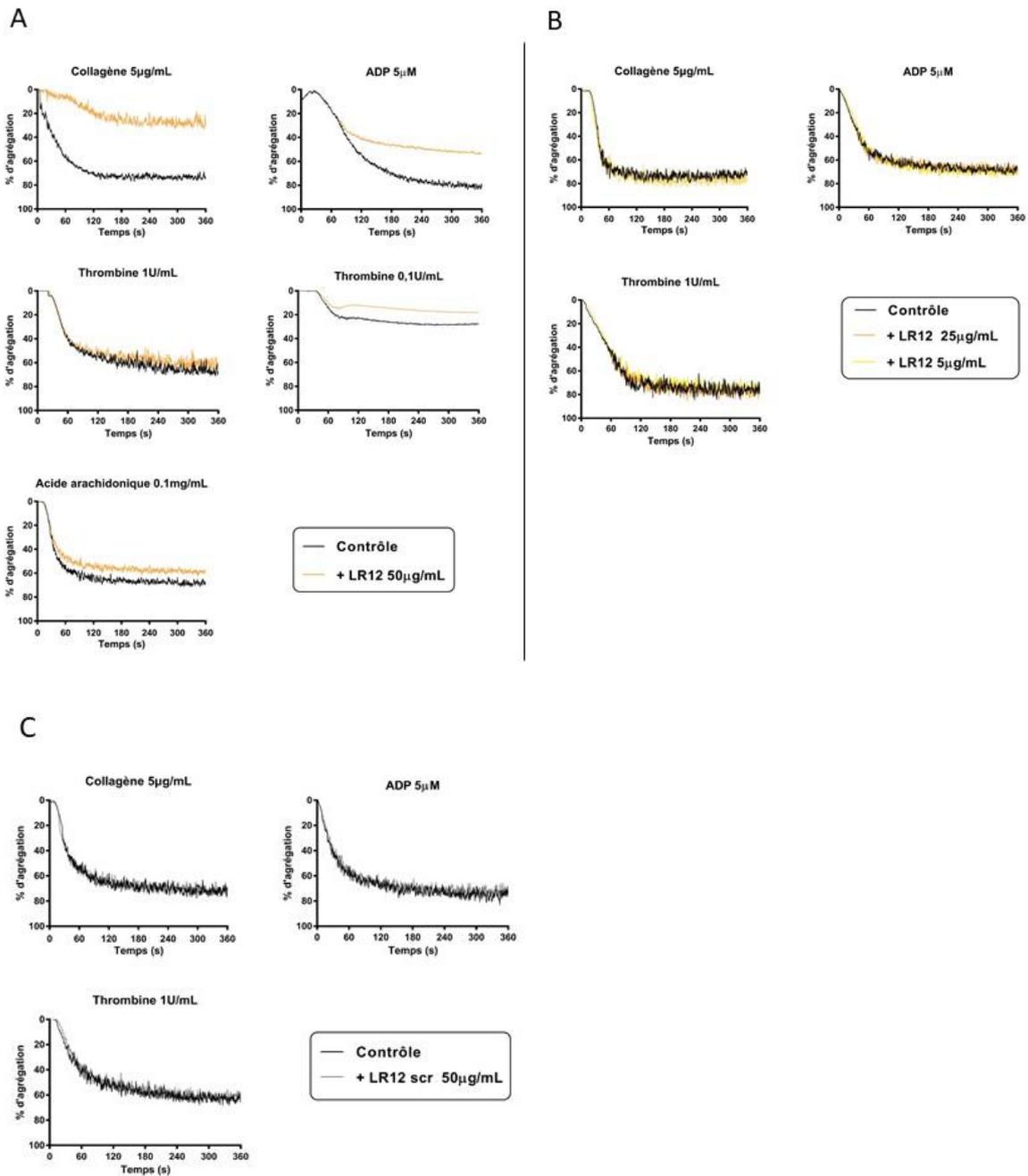


Figure 36 : Effet du peptide LR12 sur l'agrégation plaquettaire humaine

(A) L'agrégation des plaquettes humaines lavées a été induite par le collagène, l'ADP, la thrombine et l'acide arachidonique en présence ou non de LR12 (50µg/mL). (B) L'agrégation des plaquettes humaines lavées a été induite par le collagène, l'ADP et la thrombine en présence de dose plus faibles de LR12 (5 et 25µg/mL). (C) L'agrégation des plaquettes humaines lavées a été induite par le collagène, l'ADP et la thrombine en présence ou non de LR12scr (50µg/mL). Courbes représentatives de 6-8 donneurs sains par condition.

Pour confirmer définitivement le rôle de TREM-1 dans l'agrégation, nous avons utilisé des plaquettes lavées de souris Trem-1^{-/-} et WT. Le nombre de plaquettes obtenus après isolation ne varie pas entre les souris Trem-1^{-/-} et les souris WT contrôles. De plus, l'expression de CD31 (PECAM-1), CD36 (GPIV), CD41 (GPIIb), P-sélectine (CD62P), GPIIb/IIIa (JON/A) et TLT-1 qui sont différents marqueurs plaquettaires ne diffère pas entre les souris Trem-1^{-/-} et WT (**Figure 37A**). L'expression génique de *Trem1* (TLT-1) est également similaire entre les plaquettes des souris WT et des souris déficientes en *Trem-1* lorsque celles-ci ont été activées par la thrombine (1U/mL) pendant 5 minutes (**Figure 37B**). La **Figure 37C** montre que l'agrégation plaquettaire induite par le collagène, l'ADP, la thrombine et l'acide arachidonique est fortement altérée chez les souris Trem-1^{-/-} comparée aux souris WT contrôles. Nous avons également testé l'effet du LR12 murin sur des plaquettes TREM-1^{-/-} et WT : le peptide LR12 n'a aucun effet sur l'agrégation plaquettaire induite par le collagène, l'ADP et la thrombine chez les souris Trem-1^{-/-} alors qu'il réduit l'agrégation chez les souris WT (**Figure 38A, B**). Ces dernières données permettent d'exclure une action du peptide LR12 sur TLT-1 mais prouve une action directe via TREM-1.

Afin d'approfondir le mécanisme d'action du LR12 et de savoir s'il interfère dans l'adhésion et l'étalement des plaquettes médiés par l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, nous avons effectué des tests de «spreading» des plaquettes en utilisant des plaquettes humaines lavées prétraitées avec du LR12. Comme le montre la **Figure 39**, le traitement par LR12 diminue l'étalement des plaquettes et les interactions plaquettaires-plaquettes sur le collagène ou le fibrinogène.

L'ensemble de ces résultats *in vitro* met en évidence un rôle fonctionnel de TREM-1 dans l'agrégation et d'adhésion plaquettaire.

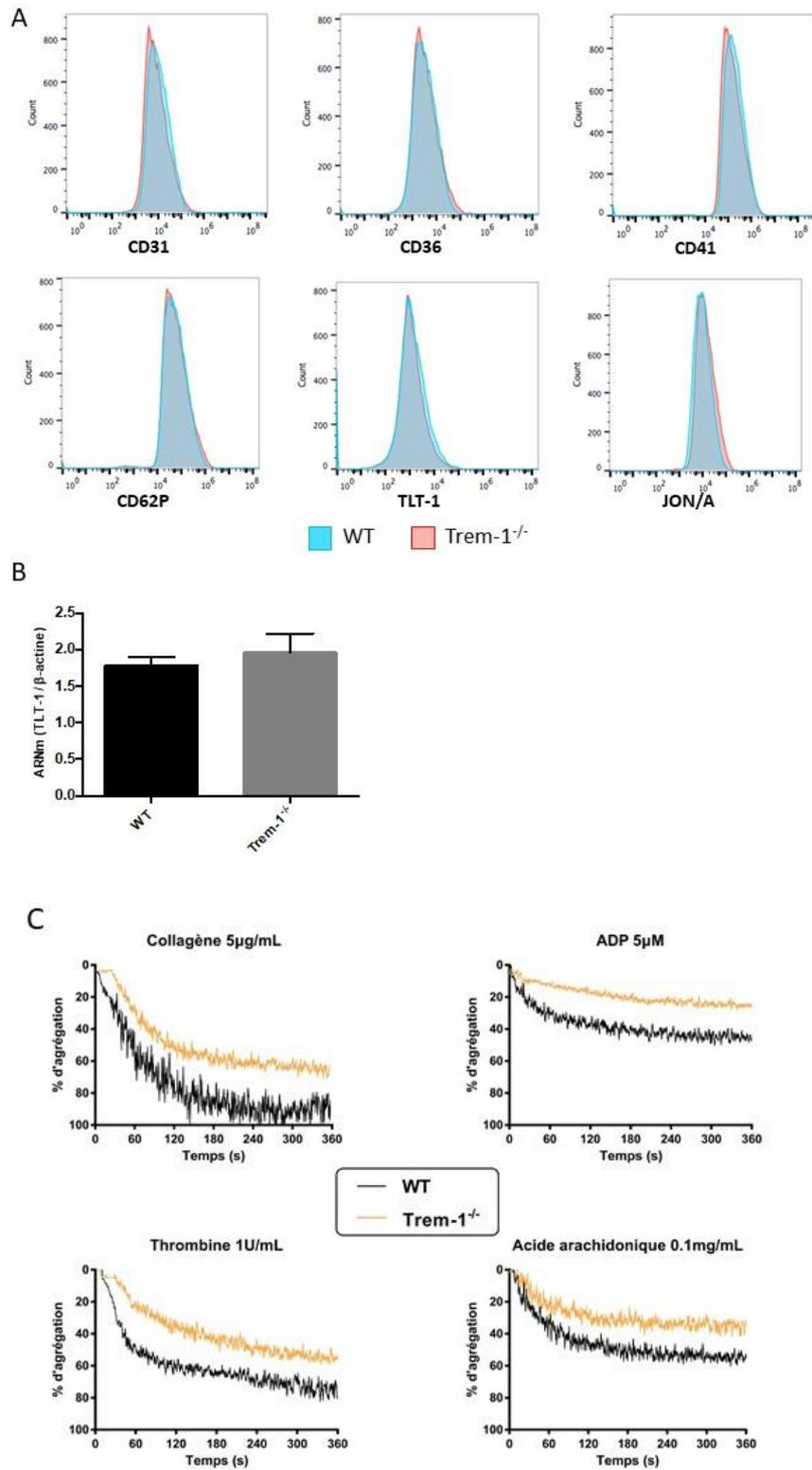


Figure 37 : Comparaison de plaquettes de souris WT et *Trem-1*^{-/-}

(A) Analyse par cytométrie en flux des plaquettes de souris WT et *Trem-1*^{-/-}, les plaquettes ont été marquées pour les marqueurs suivants : CD31, CD36, CD41, CD62P, TLT-1 et JON/A. (B) Quantification par qRT-PCR de l'expression génique de *Trem1-1* dans des plaquettes stimulées pendant 5 minutes par la thrombine (1U/mL), n=4-5 par condition. (C) L'agrégation des plaquettes murines WT et *Trem-1*^{-/-} lavées a été induite par le collagène, l'ADP, la thrombine et l'acide arachidonique. Courbes représentatives de 6-8 animaux par condition.

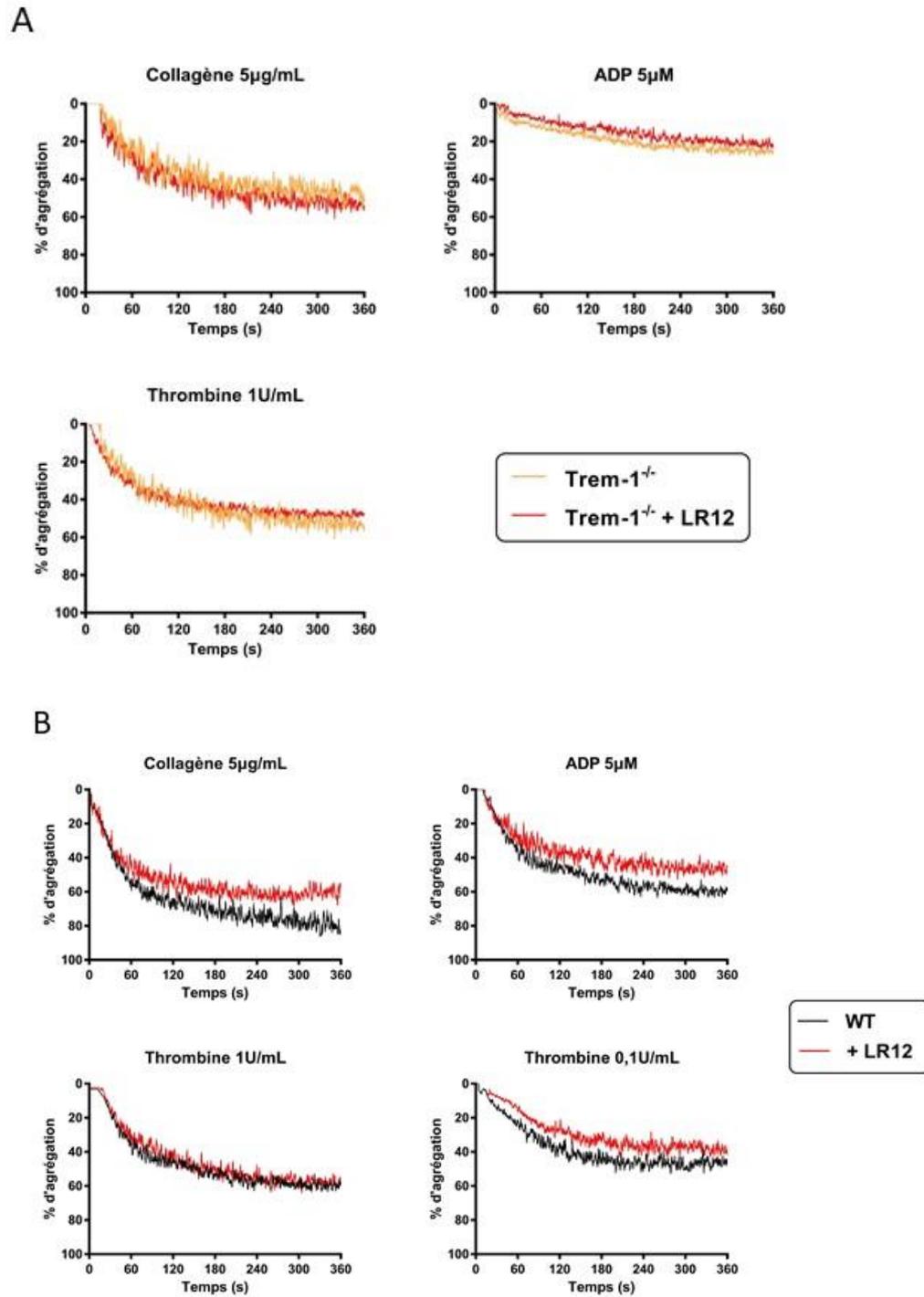


Figure 38 : Effet du peptide LR12 sur l'agrégation plaquettaire murine

L'agrégation des plaquettes murines WT (B) et Trem-1^{-/-} (A) lavées a été induite par le collagène, l'ADP et la thrombine en présence ou non de LR12 (50µg/mL). Courbes représentatives de 4-5 animaux par condition.

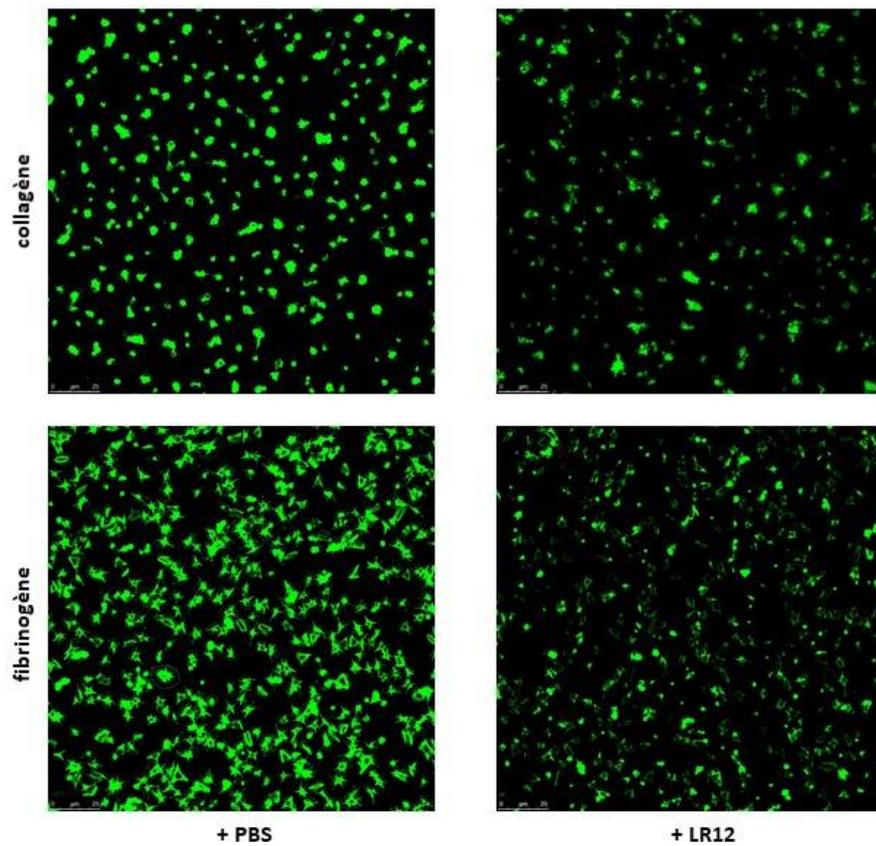


Figure 39 : Effet du peptide LR12 sur l'adhésion plaquettaire

Des plaquettes humaines lavées ont été préincubées en présence ou non de LR12 (50µg/mL) pendant 5 minutes à 37°C puis incubées pendant 1 h à 37°C afin de permettre leur adhésion dans des LAB-TEK pré-coatées avec du fibrinogène ou du collagène. Les plaquettes ont ensuite été fixées puis marquées avec du CytoPainter Phalloidin iFluor 555 et analysées à l'aide d'un microscope confocal. Images représentatives de 3 donneurs différents.

4.2.4 *L'inhibition du TREM-1 prévient de la thrombose in vitro et in vivo*

Dans un premier temps, nous avons évalué l'effet du LR12 sur la formation de thrombus en sang total à l'aide d'une matrice de collagène en condition de flux (30 dynes.cm⁻²) (**Figure 40A**). Les plaquettes ont adhéré à la matrice de collagène puis rapidement formé des agrégats stables. LR12 diminue la taille et le nombre de thrombi formés quelle que soit la concentration utilisée. La prostaglandine E2 (PGE₂) sert ici de contrôle positif.

Nous avons ensuite étudié l'adhésion et la formation de thrombus à l'aide d'une suspension de plaquettes lavées sur une matrice de fibrinogène. Les plaquettes ont été activées avec de l'ADP (10μM) et perfusées dans des capillaires recouverts de fibrinogène sous une contrainte de cisaillement constante de 2,5 dynes.cm⁻². Le prétraitement des plaquettes avec le LR12, quelle que soit la concentration, entraîne une diminution significative de l'adhésion des plaquettes au fibrinogène comparé au contrôle (ADP) (**Figure 40B, C**).

Finalement, la formation de thrombus *in vivo* a été explorée à l'aide d'un modèle murin de thrombose carotidienne induite par le FeCl₃. La **Figure 40D** montre que l'invalidation génétique ou l'inhibition pharmacologique de la TREM-1 retarde le temps d'occlusion de la carotide et empêche ainsi en grande partie l'occlusion complète du vaisseau, en raison de la présence de thrombi instables.

Ces trois expériences nous permettent ainsi de conclure que l'inhibition de TREM-1 diminue la formation de thrombus à la fois *in vitro* et *in vivo* dans un modèle pertinent de thrombose artérielle.

4.2.5 *L'inhibition de TREM-1 protège les souris de l'embolie pulmonaire*

Nous avons ensuite étudié le rôle de TREM-1 dans un modèle d'embolie pulmonaire au collagène/épinephrine chez la souris via deux outils : l'inhibiteur pharmacologique de TREM-1 (LR12) et les souris KO Trem-1^{-/-}.

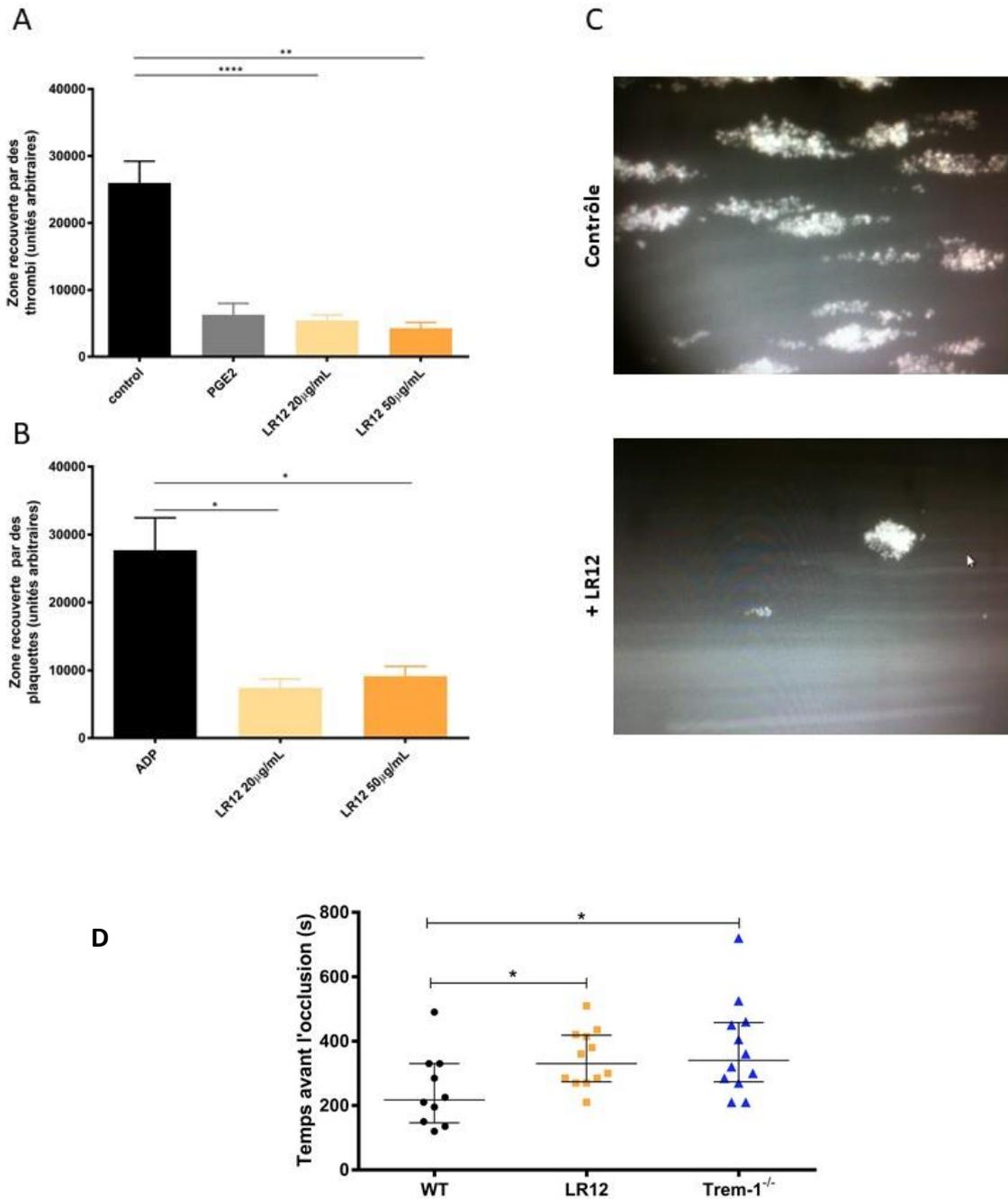


Figure 40 : L'inhibition de TREM-1 prévient de la thrombose *in vitro* et *in vivo*

Effet du peptide LR12 (20-50µg/mL) sur la formation de thrombus en sang total (A) ou en suspension plaquettaire (B) sur une matrice de collagène (A) ou de fibrinogène (B) en condition de flux (30 and 2.5 dynes.cm⁻² respectivement). Durant la perfusion, la formation des thrombi et des agrégats plaquettaires a été observée à l'aide d'un microscope à épifluorescence, l'aire recouverte par les thrombi (A) ou les plaquettes (B) a été calculée lors de 3 expériences indépendantes par condition, *P<0,05; **P<0,01; *** P<0,005 (t test). (C) Image représentative de la formation d'agrégats plaquettaires sur une matrice de fibrinogène en condition de flux (2.5 dynes.cm⁻²) en présence ou non du peptide LR12 (50µg/mL). Images représentatives de 3 expériences distinctes. (D) Temps d'occlusion de l'artère carotide induite par FeCl₃ chez les souris WT, WT traitées par LR12 (100µg) et Trem-1^{-/-}, n=10-12 par groupe, *P<0.05 (t test).

La **Figure 41A** montre une augmentation du temps de survie suite à l'injection du mélange collagène/épinephrine lorsque les souris ont été traitées avec le peptide LR12. Dans un second temps, le nombre total de plaquettes a été déterminé avant et après induction de l'embolie pulmonaire ainsi que le nombre de neutrophiles et monocytes/macrophages dans le poumon. L'embolie pulmonaire est associée à une diminution significative du nombre de plaquettes dans le sang chez les souris WT (PBS). Cette thrombocytopénie est atténuée chez les souris traitées avec le LR12 et chez les souris Trem-1^{-/-} (**Figure 41B**). De plus, très rapidement après l'induction de l'embolie pulmonaire (3 minutes), les neutrophiles et les monocytes/macrophages infiltrent le poumon chez les souris WT (PBS). L'inhibition pharmacologique ou génique de TREM-1 réduit ce recrutement (**Figure 41C, D**). L'analyse histologique des poumons prélevés 3 minutes après l'induction de l'embolie pulmonaire révèle que le nombre de thrombi par champ observé est très nettement diminué chez les souris traitées par LR12 et chez les souris Trem-1^{-/-} (**Figure 41E, F**).

TREM-1 semble donc jouer un rôle dans la formation de thrombus *in vivo*. L'inhibition de TREM-1 protège les souris de l'embolie pulmonaire en réduisant le recrutement leucocytaire dans le poumon, en limitant la formation de thrombus et en améliorant la survie.

Nous avons montré pour la première fois que TREM-1 est constitutivement exprimé par les plaquettes. L'invalidation génique de *Trem-1* ou son inhibition pharmacologique par le peptide LR12 diminue la sécrétion, l'adhésion et l'agrégation plaquettaire. Cette réduction de l'activation plaquettaire semble être bénéfique puisqu'elle protège les animaux de la thrombose artérielle et de l'embolie pulmonaire. Ces résultats apportent de nouvelles connaissances sur la biologie TREM-1, avec un impact potentiel sur la physiopathologie et le traitement des désordres thrombotiques.

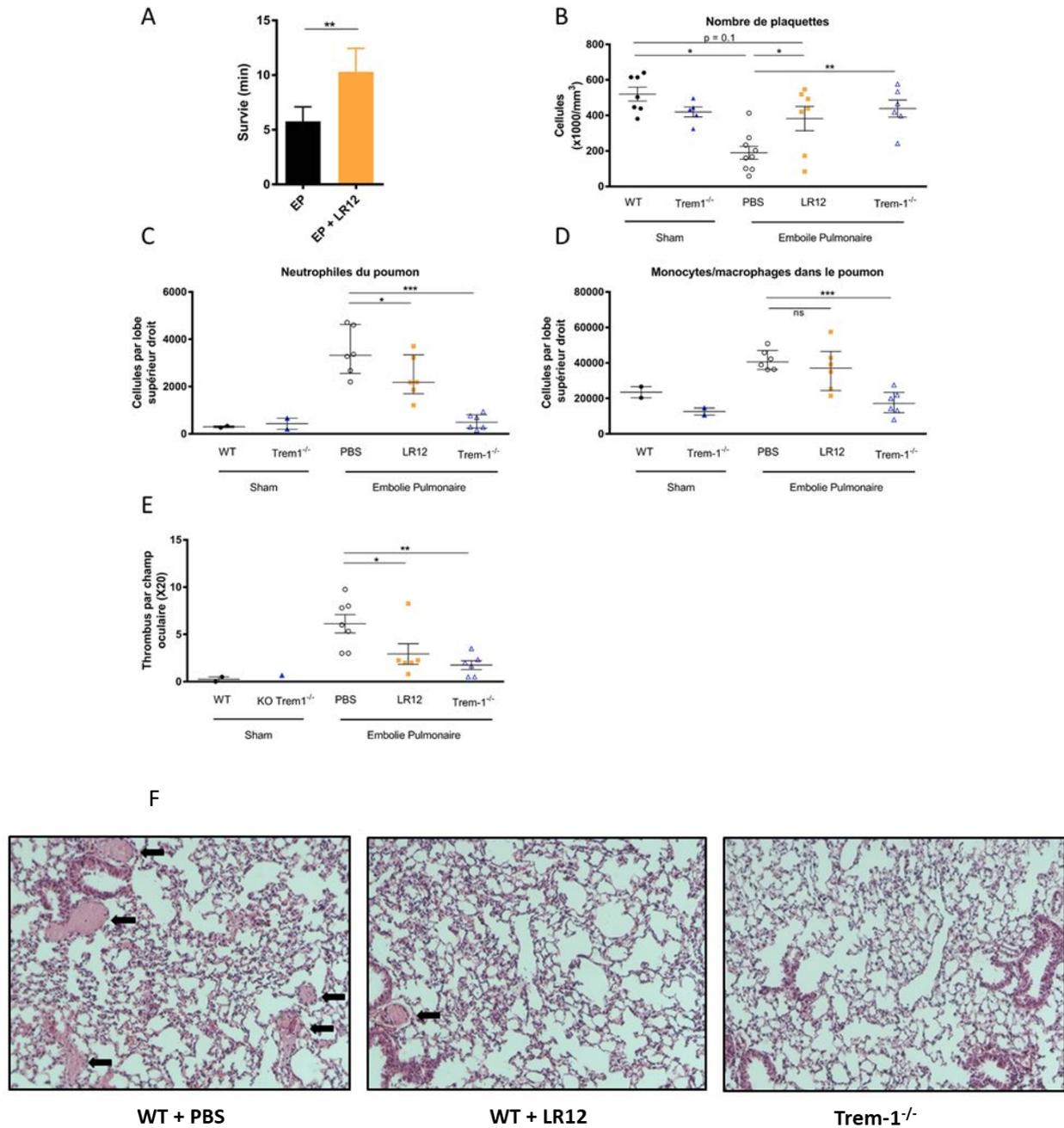


Figure 41 : L'inhibition du TREM-1 protège les souris de l'embolie pulmonaire

(A) Etude de la mortalité associée à une embolie pulmonaire (EP) après injection d'un mélange collagène/épinéphrine chez les souris WT (noire) et les souris WT traitées par LR12 (100µg) (orange), n=6 par groupe, **P<0,01 (t test). (B) Numération plaquettaire chez les souris WT, WT+LR12 et Trem-1^{-/-} avant (Sham) et après embolie, n=6 par groupe, *P<0,5; **P<0,01 (t test). Quantification par cytométrie en flux du nombre de neutrophiles (C) et de monocytes/macrophages (D) dans le poumon des souris WT, WT+LR12 et Trem-1^{-/-} avant (Sham) et après l'embolie pulmonaire, n=6 par groupe, *P<0,5; **P<0,01; *** P<0,005 (t test). (E) Nombre de thrombi par champ dans le poumon des souris WT, WT+LR12 et Trem-1^{-/-} après EP, nombre déterminé par la moyenne du nombre de thrombi observés pour 10 champs microscopiques par coupe de poumon, *P<0,05; **P<0,01 (t test). (F) Représentation histologique des coupes de poumon après EP. Flèche noire : thrombus intravasculaire occlusif.

5 Discussion

5.1 TREM-1 et endothélium

5.1.1 *TREM-1, un nouveau récepteur endothélial*

TREM-1 a été identifié pour la première fois en 2000 à la surface des monocytes et neutrophiles stimulés par du LPS, ce pourquoi les recherches autour de TREM-1 se sont limitées aux cellules immunitaires « professionnelles »¹¹⁵. TREM-1 est fortement exprimé par les monocytes, les neutrophiles, les cellules dendritiques et les cellules NK (Natural Killer), et faiblement exprimé par les lymphocytes T et par toutes les sous-populations de lymphocytes B^{112,123,148}. Cependant depuis quelques années, les recherches autour de TREM-1 se sont élargies aux cellules non immunitaires chez l'homme et chez la souris : la présence de TREM-1 (ainsi que les autres membres de la famille TREM) dans les différents types cellulaires en fonction des espèces est présentée dans le **Tableau 4**. TREM-1 a été observé dans les cellules épithéliales et les fibroblastes ainsi qu'au niveau tissulaire dans les ganglions lymphatiques, la moelle épinière, les poumons, le cœur et le placenta¹⁴⁹⁻¹⁵².

Nous montrons ici que TREM-1 est également exprimé sur les cellules endothéliales (CE) et est up-régulé après une stimulation par LPS. Ces résultats sont en accord avec ceux de Laskin et coll. qui ont été les premiers à suggérer une expression de TREM-1 dans les CE hépatiques de souris. Cette expression endothéliale chez la souris était up-régulée suite à une stimulation par LPS, TNF α ou l'IL-1 β .

Les résultats obtenus élargissent les connaissances sur l'expression cellulaire de TREM-1 puisque nous montrons que TREM-1 est entièrement fonctionnel et inductible au niveau endothélial à la fois chez la souris et chez l'homme.

5.1.2 *Le LR12 diminue l'inflammation et la dysfonction vasculaire induite par le sepsis*

TREM-1 est impliqué dans la réponse inflammatoire vasculaire au cours du sepsis en tant qu'amplificateur de cette réponse ce qui se traduit par le relargage des cytokines pro-inflammatoires. Nous avons observé une forte augmentation de l'expression de *Trem-1* au niveau vasculaire que ce soit au niveau des artères de conductance ou des artères de résistance aussi bien *in vivo* dans un modèle CLP qu'*ex vivo* après stimulation par LPS.

Cell type/tissue	Species	References
TREM-1		
Neutrophils, CD14 ^{high} Monocytes	Human	Bouchon et al., 2000
NK cell line, fibrosarcoma (HT1080)	Human	Allcock et al., 2003
Differentiated U937 cells	Human	Gingras et al., 2002
Lymph nodes, placenta, spinal cord, lung, spleen, and heart tissues	Human	Gingras et al., 2002
High expression: Monocytes, granulocytes, DCs, NK cell	Human	Matesanz-Isabel et al., 2011
Low expression: T cells and all subsets of B cells except plasma cells		
Normal bronchial epithelial cells	Human	Rigo et al., 2011
Myofibroblasts and primary hepatic stellate cells	Human	Liao et al., 2012
Gastric epithelial cell lines	Human	Schmaußer et al., 2008
Liver endothelial cells	Mouse	Chen et al., 2008
Kupfer cells and neutrophils	Mouse	Wu et al., 2012
Peritoneal macrophages	Mouse	Bouchon et al., 2001a
Immature dendritic cells	Mouse	Zangi et al., 2012
TREM-2		
Monocyte derived dendritic cells	Human	Bouchon et al., 2001a
NK cell line, fibrosarcoma (HT1080), U937, and THP-1	Human	Allcock et al., 2003
Activated macrophages, peritoneal macrophages, RAW264 cells	Mouse	Turnbull et al., 2006
Ostoclasts	Human	Paloneva et al., 2003
Microglia	Mouse	Schmid et al., 2002
High expression in CNS, heart and lungs as compared to lymph nodes, kidney, liver, and testes	Mouse	Schmid et al., 2002
TREM-3		
RAW264, MT2 macrophage cell lines, and T cell lines	Mouse	Chung et al., 2002
pDC-TREM (TREM-4)		
pDCs (CD11c ^{dull} population)	Mouse	Watarai et al., 2008
TLT-1		
Platelets and megakaryocytes	Mouse	Washington et al., 2004
TLT-2		
B cells, neutrophils, and macrophages	Mouse	King et al., 2006

Tableau 3 : Profil d'expression cellulaire des protéines de la famille des TREMs (D'après Roe et al., 2014)¹⁵³

Cette expression est diminuée de façon significative par le LR12. TREM-1 joue donc un rôle important au cours du choc septique et il semble que son expression soit modulée par le LR12. De plus, nous avons montré dans notre modèle de CLP chez la souris, une forte augmentation de l'expression génique de *Tnfa*, *Il-6* et *Il-10* au niveau des vaisseaux aortiques et mésentériques. Cette surexpression est corrigée par LR12. La synthèse des protéines de l'inflammation est sous la dépendance d'une signalisation cellulaire intégrante de l'immunité innée, et dont les effecteurs sont activés après stimulation des récepteurs de la famille des Toll-like receptors (TLR). Les TLR reconnaissent des profils antigéniques structuraux ou non de différents types de micro-organismes. Par exemple, le TLR-4 reconnaît le lipopolysaccharide. La stimulation de TLR-4 permet la synthèse de cytokines pro-inflammatoires et notamment de TNF α . Ces cytokines pro-inflammatoires expliquent en partie l'adhésion à l'endothélium, du fait de la surexpression des intégrines, des polynucléaires neutrophiles dont la présence contribuerait au dommage d'organe.

Le choc septique s'accompagne d'une hyporéactivité vasculaire avec une altération de la réponse aux agents pharmacologiques et une désensibilisation de leurs récepteurs. Cette hyporéactivité vasculaire est principalement due à une forte production du NO inductible. Dans notre modèle de sepsis expérimental par CLP, la péritonite a bien induit une hyporéactivité vasculaire et une désensibilisation des récepteurs à la phényléphrine avec une surexpression de l'iNOS. L'hyporéactivité vasculaire induite par la péritonite est très atténuée par le LR12, aussi bien au niveau des artères de conductance qu'au niveau des artères de résistance. Cette prévention peut s'expliquer, au moins en partie, par une moindre surexpression d'iNOS en présence de LR12.

De plus, une dysfonction endothéliale est observée dans notre modèle de sepsis 18h après la CLP, ce qui se traduit par une altération de la relaxation des vaisseaux *via* une diminution de la sensibilité des récepteurs endothéliaux à l'acétylcholine. A l'échelle moléculaire cette atteinte fonctionnelle se traduit par une baisse de l'activité de la eNOS en relation avec la faible expression de p-Akt. Le LR12 corrige cette dysfonction endothéliale avec une amélioration de la réponse à l'Ach et cela via la protection de la voie la eNOS. En effet, le LR12 permet de restaurer l'expression de la eNOS et sa phosphorylation ainsi que celle de Akt. Plusieurs travaux montrent qu'une libération des cytokines inflammatoires et de l'anion superoxyde dans le sang provoquent une dysfonction endothéliale^{154,155}. Cependant, la

production accrue de TNF- α et IL-10 peut être attribuée à l'induction d'iNOS et donc à une forte production de NO. L'excès de NO produit par l'iNOS peut être toxique pour les cellules endothéliales et être à l'origine de la dysfonction vasculaire. TNF- α down-régule l'eNOS au niveau de l'endothélium, augmente le stress oxydant et induit l'apoptose et la dysfonction endothéliale¹⁵⁶. Les résultats obtenus *in vivo* sont en accord avec les résultats obtenus *in vitro* montrant que le peptide LR12 réduit la production du NO intracellulaire par les HPMEC après stimulation par LPS.

A côté de la voie des NOS, la voie des cyclooxygénases semble être aussi impliquée dans l'atteinte de la réactivité vasculaire. Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* montrent que l'activité de COX2 est augmentée dans certains états inflammatoires et est induite par des cytokines pro-inflammatoires¹⁵⁷. L'expression de COX-1 est fortement diminuée au cours du sepsis ; le LR12 restaure l'expression de cette protéine constitutive. COX-2 est surexprimée au cours du sepsis et le LR12 atténue cette surexpression ce qui permet de limiter la production de médiateurs lipidiques toxiques.

5.1.3 *TREM-1 endothélial, une nouvelle cible thérapeutique*

Il a été montré à maintes reprises et dans de nombreux modèles expérimentaux que l'inhibition pharmacologique ou la délétion génétique de TREM-1 protège les animaux de la réponse inflammatoire exacerbée et de la mort au cours de maladies inflammatoires aiguës. L'effet «endothélium-protecteur» observé ici *in vivo* pourrait simplement découler d'une diminution de l'inflammation systémique et de l'activation des cellules inflammatoires par LR12. Afin d'exclure cette possibilité, nous avons généré des souris KO conditionnelles délétées pour *Trem-1* au niveau endothélial (EndoTrem-1^{-/-}), l'expression de *Trem-1* restant inchangée dans tous les autres territoires tissulaires et cellulaires. A l'aide de ces souris, nous avons clairement montré que la délétion de *Trem-1* au niveau des CE protégeait également les souris en diminuant l'inflammation et la dysfonction vasculaire, en modulant le trafic leucocytaire et améliorait la survie. Ces résultats suggèrent un rôle direct de TREM-1 endothélial dans la médiation des nombreux aspects délétères du choc septique. Ces résultats sous-tendent l'hypothèse selon laquelle la délétion de TREM-1 au niveau de l'endothélium protège de la dysfonction vasculaire alors que la préservation de TREM-1 au niveau de cellules effectrices de l'immunité innée (monocytes/neutrophiles) permet l'élimination microbienne.

En effet, dans toutes ces études précliniques, la modulation de TREM-1 s'avère bénéfique car cette modulation ne s'accompagne jamais d'une inhibition totale de la réponse inflammatoire cruciale pour la clairance bactérienne. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment par le laboratoire. En effet, il a été montré chez la souris grâce l'utilisation de siRNA dirigé contre TREM-1 que l'inhibition partielle de TREM-1 protégeait les souris de la péritonite alors l'inhibition complète de TREM-1 était létale pour les souris septiques¹³⁸. La réponse inflammatoire semble donc dépendre du degré d'activation de TREM-1 au cours du choc septique. Cet effet TREM-1-dépendant est également observé dans les modèles de maladies non infectieuses comme le choc hémorragique et la pancréatite (inflammation aiguë) et dans des modèles plus chroniques comme les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)¹⁵⁸.

Cependant dans notre modèle expérimental chez les souris *EndoTrem-1^{-/-}*, nous n'avons pas suivi la pression artérielle, ni étudié les dysfonctions des organes. Nous ne pouvons donc pas par conséquent conclure si les effets bénéfiques conférés par la délétion de *Trem-1* au niveau de l'endothélium sont liés à une amélioration hémodynamique, à une protection des organes ou aux deux. Néanmoins, le laboratoire a déjà montré dans deux modèles expérimentaux différents (modèle de péritonite chez le cochon et endotoxinémie chez le singe) que l'administration de LR12 prévient la diminution de la pression artérielle^{131,132}.

Ces résultats confirment le rôle central de la voie de TREM-1 au cours du choc septique. En plus de renforcer les connaissances sur la physiologie du choc septique et sur la biologie de TREM-1, cette étude pourrait avoir des implications cliniques. Le peptide LR12 est actuellement en cours de développement clinique pour le choc septique (Phase IIa).

5.1.4 Perspectives

5.1.4.1 Peptides SLC

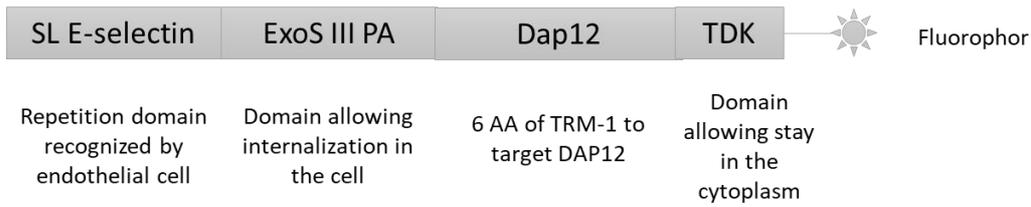
Une des préoccupations qui pourrait survenir suite à l'inhibition totale de TREM-1 avec le peptide LR12 est qu'il pourrait compromettre plusieurs fonctions importantes de TREM-1 telles que la clairance bactérienne ou la survie des cellules myéloïdes. C'est pourquoi la conception d'inhibiteurs de TREM-1 spécifiques de l'endothélium pourrait s'avérer intéressante puisqu'ils permettraient de prévenir la dysfonction endothéliale tout en préservant la fonctionnalité des cellules myéloïdes. Ces peptides spécifiques du TREM-1

endothélial nous permettraient aussi de confirmer les résultats obtenus avec les souris EndoTrem-1^{-/-}.

Pour cela, nous avons développé et fait produire en collaboration avec la société RD biotech deux nouveaux peptides, les peptides SLC1 et SLC2. Ces peptides ont été construits et structurés afin de cibler spécifiquement la cellule endothéliale et TREM-1. Ils présentent les domaines suivants (**Figure 42**) :

- Domaine SL E-sélectine : domaine de répétition de la E-sélectine reconnu spécifiquement par les cellules endothéliales.
- Domaine ExoS III PA : domaine codant pour la toxine ExoS de *Pseudomonas aeruginosa*. Ce domaine va permettre l'internalisation des peptides dans la cellule endothéliale. En effet, la toxine ExoS est connue pour être impliquée dans les phénomènes de translocation dans les cellules eucaryotes.
- Domaine DAP12 : domaine de 6 acides aminés de TREM-1 qui va permettre de cibler DAP12. Ce domaine varie en fonction des deux peptides, en effet le peptide SLC1 va cibler l'interaction TREM-1/DAP12 au niveau transmembranaire alors que le peptide SLC2 va cibler l'interaction DAP12/SYK au niveau intracytoplasmique puisqu'il inhibe la phosphorylation de DAP12 par SYK qui est la première tyrosine kinase intervenant dans la voie de signalisation de TREM-1.
- Domaine TDK : domaine codant pour la thymidine kinase, ce domaine permet le maintien des peptides dans le cytoplasme.
- Fluorophore : afin de suivre *in vitro* et *in vivo* les peptides.

Ces peptides seront, dans un premier temps, testés *in vitro*. La première chose à vérifier est de savoir si ces peptides rentrent et restent bien dans les cellules endothéliales. Ensuite l'efficacité de ces peptides sera testée à l'aide d'approches simples (dosage de cytokines par ELISA, mesure du NO intracellulaire, expression de *Trem-1*) en utilisant des HPMEC après stimulation par LPS. Finalement, ces peptides pourront être testés *in vivo* dans des modèles animaux de choc septique.



Two peptides :

- SLC 1 → TREM-1/DAP12
- SLC 2 → DAP12/SYK

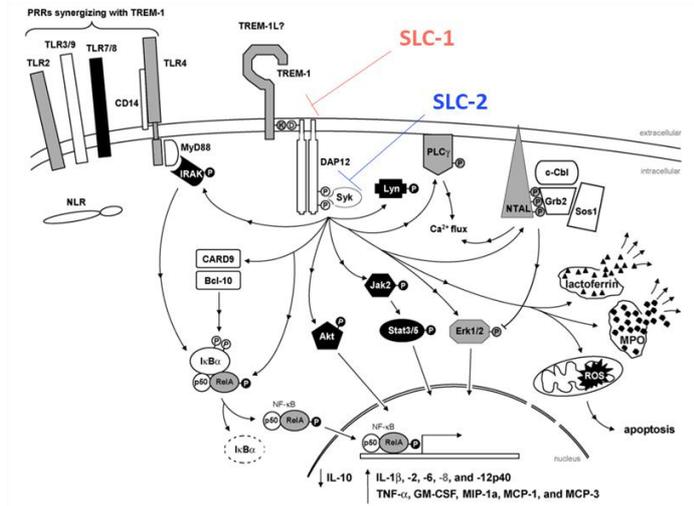


Figure 42 : Stratégie de développement d'un inhibiteur pharmacologique spécifique du TREM-1 endothélial (Adapté de Tessarz et al., 2008)¹⁵⁹

5.1.4.2 Modèle double hit

Dans la conception classique de la physiopathologie du sepsis, la réaction inflammatoire déclenchée par le pathogène est considérée comme responsable des défaillances d'organe et de la mortalité. Grâce aux progrès thérapeutiques, la majorité des patients septiques actuellement pris en charge en réanimation survivent à l'agression initiale. Cependant des dysfonctions immunitaires acquises altèrent les défenses anti-infectieuses du patient septique au-delà des facteurs de risque classiques liés aux soins, aux comorbidités et à la sévérité de l'affection aiguë. En effet, le sepsis induit des anomalies quantitatives et fonctionnelles des cellules de l'immunité innée et adaptative, qui aboutissent à une immunodépression post-infectieuse complexe¹⁶⁰. Ces dernières années, des progrès dans la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires de ces phénomènes ont été réalisés grâce à des études translationnelles chez des patients septiques et au développement de modèles animaux mimant des situations cliniques fréquemment rencontrées en réanimation. De nombreux modèles animaux se rapprochant le plus de la situation clinique ont été mis au point par différentes équipes : on parle de modèle double hit. Le « first hit » amorce la machinerie inflammatoire qui est subclinique au stade précoce, le « second hit » déclenche le relargage massif des différents médiateurs et entraîne l'apparition de la réponse inflammatoire exacerbée à l'origine des multiples dysfonctions d'organes. Le « first hit » et le « second hit » sont choisis en fonction de la situation clinique à mimer. Pour le choc septique, le modèle le plus couramment utilisé est celui d'une infection pulmonaire à *Pseudomonas aeruginosa* induite 24 heures après un sepsis polymicrobien (CLP). Dans ce type de pneumonie précoce, un inoculum bactérien non létal chez les animaux contrôles induit rapidement une forte létalité chez les animaux septiques¹⁶¹. Si le sepsis polymicrobien confère une susceptibilité accrue à des pneumonies, en revanche l'administration de LPS s'accompagne d'une résistance aux infections secondaires liée à une amélioration de la clairance bactérienne et une atténuation de la réaction inflammatoire : on parle de phénomène de tolérance à l'endotoxine^{162,163}. Il est donc primordial de prendre en compte ces différents modèles concernant la physiopathologie du choc septique et donc de ne plus se limiter à un simple modèle de choc septique induit par injection de LPS ou par une CLP. Il est donc tentant d'évaluer l'effet de l'inhibition pharmacologique de TREM-1 ainsi que la délétion spécifique de *Trem-1* au niveau endothélial afin de connaître le rôle de TREM-1 dans la genèse de la dysfonction endothéliale dans des modèles se rapprochant le plus de la clinique.

5.2 TREM-1 et plaquettes

5.2.1 TREM-1, un nouveau récepteur plaquettaire

La famille des récepteurs TREM comprend au moins cinq récepteurs différents qui partagent une faible homologie de séquence entre eux. Parmi ces récepteurs, TREM-1 est exprimé à la surface des neutrophiles, des monocytes matures, des macrophages et des cellules dendritiques hypoxiques et il joue un rôle majeur dans la physiopathologie des pathologies inflammatoires¹¹⁴. Il a été montré dans plusieurs modèles animaux de sepsis que l'inhibition de TREM-1 en plus de réduire l'inflammation et d'améliorer la survie protégeait les animaux de thrombocytopenie et de la coagulation intravasculaire disséminée^{137,164}. Au sein de cette famille, le récepteur TLT-1 (TREM-like transcript 1) a été retrouvé exclusivement dans les granules alpha des mégacaryocytes et des plaquettes. Son expression est drastiquement up-régulée suite à l'activation des plaquettes ce qui suggère un rôle dans l'hémostase et/ou la thrombose. En effet, suite à l'activation plaquettaire, TLT-1 migre à la membrane où il améliore l'influx calcique et favorise l'agrégation plaquettaire^{147,165}. Giomarelli et *coll.* ont identifié et caractérisé des anticorps humains monoclonaux qui se liaient spécifiquement au domaine extracellulaire de TLT-1 (scFvs : single chain Fv fragments). Ses anticorps capturent la forme soluble de TLT-1 (sTLT-1) mais surtout sont capables d'inhiber l'agrégation plaquettaire induite par de faibles doses de thrombine ; cette inhibition est réversible par de fortes doses d'agoniste¹⁶⁶. En revanche ces anticorps n'ont pas d'effet en présence d'ADP, de PMA, de convulxine ou de collagène. De plus, les plaquettes de souris *Tlt-1^{-/-}* ont une agrégation plaquettaire réduite à l'ADP et un temps de saignement prolongé¹²⁹. Ces différentes observations nous ont incitées à vérifier la présence et l'expression de TREM-1 dans les plaquettes.

Nous montrons ici que TREM-1 est constitutivement exprimé dans les plaquettes non activées et que suite à l'activation de ces plaquettes il y a formation d'un cluster de TREM-1 à la membrane. De plus, alors que TREM-1 et TLT-1 semblent colocalisés dans les plaquettes au repos, ce phénomène n'est plus observé dans les plaquettes activées suggérant un rôle différent dans les phénomènes plaquettaires pour ces deux récepteurs issus pourtant de la même famille.

5.2.2 *TREM-1 module l'adhésion, l'activation et l'agrégation plaquettaires in vitro*

En réponse à une lésion vasculaire, les plaquettes réagissent par une succession de phénomènes biochimiques rapides et de modifications cellulaires conduisant à la formation d'un thrombus plaquettaire. L'interaction plaquettes-vaisseau comporte une phase d'adhésion et d'étalement, une phase d'activation et de sécrétion, une phase d'agrégation et une phase d'activité coagulante. En effet, l'activation plaquettaire entraîne un changement conformationnel de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ qui joue un rôle central dans l'agrégation plaquettaire puisqu'elle va pouvoir se lier principalement au fibrinogène plasmatique et ainsi former un réseau de plaquettes agrégées. Il existe de multiples inducteurs de l'agrégation plaquettaire comme la thrombine et le collagène qui sont de forts agonistes tandis que d'autres médiateurs sont libérés par les plaquettes activées tels que l'ADP et le thromboxane A₂ ce qui potentialise la cascade d'activation en recrutant d'autres plaquettes.

L'inhibition de TREM-1 via l'utilisation du peptide LR12 ou l'inactivation génétique de TREM-1 réduit l'agrégation plaquettaire induite par la thrombine, l'ADP et le collagène. De plus, en présence de LR12, il y a une diminution de l'activation de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ c'est-à-dire une diminution de l'activation plaquettaire ainsi qu'une diminution de la liaison du fibrinogène aux plaquettes activées. LR12 diminue également l'étalement des plaquettes et les interactions plaquettes-plaquettes sur le collagène ou le fibrinogène. Ces résultats obtenus *in vitro* suggèrent un rôle de TREM-1 dans l'adhésion, l'activation et l'agrégation plaquettaire.

Les grandes voies de l'adhésion et de l'activation plaquettaire empruntent principalement des voies de signalisation liées à des Src kinases (Fyn, Lyn) qui recrutent la tyrosine kinase Syk ce qui aboutit, par une série de réactions de phosphorylation de divers substrats et effecteurs à l'activation de la phospholipase C γ 2 (PLC γ 2), et à la mobilisation des stocks intracellulaires de calcium¹⁶⁷. L'engagement de TREM-1, une fois associé à DAP12, conduit à la mise en jeu de plusieurs voies de signalisation impliquant ces mêmes kinases, ce qui induit la mobilisation des réserves calciques et l'activation de complexes transcriptionnels¹⁵⁹. L'inhibition de TREM-1 diminue l'activation de PLC γ 2 et ERK1/2 dans les plaquettes activées ainsi que la mobilisation calcique qui est un événement majeur de l'activation des plaquettes et de TREM-1.

Les plaquettes sont en outre impliquées dans des phénomènes inflammatoires, et sont capables d'influencer la réponse immunitaire de plusieurs manières. En effet, les systèmes de l'hémostase, de l'inflammation et de l'immunité, à la fois innée et adaptative, sont intimement liés.

La P-sélectine (CD62P), encapsulée dans les granules α des plaquettes non activées, est externalisée sur la membrane plasmique après activation. Elle joue un rôle clé dans la modulation des interactions entre l'endothélium et les plaquettes et peut être impliquée dans des événements cardiovasculaires aigus^{168,169}. En effet, la P-sélectine permet l'adhésion des plaquettes activées aux monocytes et aux neutrophiles : ces 3 types de cellules coopèrent pour initier et favoriser la thrombose¹⁷⁰. Ces phénomènes sont notamment observés au cours de chocs septiques¹⁷¹. Des études récentes indiquent que les médicaments antiplaquettaires réduisent la mortalité due aux infections et au sepsis ce qui suggère une possible pertinence clinique de la modification des réponses plaquettaires à l'inflammation¹⁷². Le LR12 réduisant l'activation plaquettaire (y compris l'expression de la P-sélectine), ses effets bénéfiques au cours du choc septique et de l'infarctus du myocarde^{134,135,137} pourraient ne pas être limités à une action sur les cellules myéloïdes mais impliquer également une modulation de l'activation plaquettaire.

5.2.3 *TREM-1 régule in vivo la thrombose*

Dans un modèle de thrombose carotidienne induite par FeCl₃ nous observons une augmentation significative du temps d'occlusion chez les souris déficientes en *Trem-1* ou traitées par LR12. Nous avons également constaté que l'inactivation génique ou la modulation pharmacologique de TREM-1 protégeait les souris de la thromboembolie pulmonaire qui se traduit par une diminution de l'inflammation pulmonaire et du nombre de thrombi occlusifs ainsi qu'une mort retardée. Ces résultats suggèrent un rôle important de TREM-1 au cours des processus thrombotiques *in vivo*.

5.2.4 *Limites de l'étude*

Notre étude présente néanmoins plusieurs limites.

Même si les souris Trem-1^{-/-} présentent clairement un défaut d'agrégation plaquettaire, nous ne pouvons pas savoir si les plaquettes sont réellement impliquées dans les phénomènes

bénéfiques observés dans les modèles expérimentaux d'embolie pulmonaire et de thrombose carotidienne puisque nous avons utilisé des souris KO constitutive pour *Trem-1*.

Nous ne pouvons pas non plus exclure une action hors cible du peptide LR12, sur TLT-1 par exemple, qui est connu pour être impliqué dans les phénomènes d'agrégation plaquettaire. Nous avons néanmoins montré que le peptide LR12 n'avait aucun effet sur l'agrégation étudiée à partir de plaquette de souris *Trem-1*^{-/-} : ces résultats rendent ainsi cette hypothèse moins probable.

Enfin, le mécanisme précis par lequel la délétion de TREM-1 diminue l'activation des plaquettes reste inconnu car de nombreuses étapes importantes sont simultanément réduites (mobilisation calcique, sécrétion plaquettaire, expression CD62P et α IIb β 3, ...). Cependant, Haselmayer et *coll.* ont observé la présence d'un ligand plaquettaire de TREM-1¹⁷³. A l'aide d'une protéine de fusion recombinante de TREM-1, ils ont ainsi montré une liaison spécifique de TREM-1 aux plaquettes. Cette liaison est nécessaire pour l'augmentation des fonctions des neutrophiles induites par les plaquettes. Cependant l'interaction de TREM-1 avec son ligand n'est pas nécessaire pour la formation du complexe plaquette/neutrophile. Il est donc tentant de spéculer que le blocage de l'interaction du TREM-1 plaquettaire (surexprimée après stimulation) avec son ligand plaquettaire exprimé de manière constitutive diminue l'activation, au moins en présence d'agonistes plaquettaires faibles. Mais comme la nature de ce ligand reste insaisissable, des conclusions définitives ne peuvent être tirées.

Dans cette étude, nous avons montré que TREM-1 est exprimé par les plaquettes où il joue un rôle important dans la médiation de leur activation. La modulation pharmacologique ou l'invalidation génétique de TREM-1 altère l'activation plaquettaire et prévient la formation de thrombus artériel ou veineux. Ces résultats suggèrent que les agents modulateurs de TREM-1 tels que LR12 pourraient potentiellement être des ajouts utiles dans les thérapies antiplaquettaires dans le cadre de troubles thrombotiques. Ils fournissent également un nouvel aperçu de la biologie TREM-1 et peuvent expliquer l'action protectrice de la modulation TREM-1 au cours des maladies inflammatoires aiguës, au-delà de leurs effets sur les cellules myéloïdes.

6 Bibliographie

1. Bone, R. C. *et al.* Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* **101**, 1644–1655 (1992).
2. Levy, M. M. *et al.* 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med.* **29**, 530–538 (2003).
3. Liao, M. M. *et al.* Sensitivity of Systemic Inflammatory Response Syndrome for Critical Illness Among Emergency Department Patients. *Am. J. Emerg. Med.* **32**, 1319–1325 (2014).
4. Shapiro, N. *et al.* The association of sepsis syndrome and organ dysfunction with mortality in emergency department patients with suspected infection. *Ann. Emerg. Med.* **48**, 583–590, 590.e1 (2006).
5. Singer, M. *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* **315**, 801–810 (2016).
6. Seymour, C. W. *et al.* Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* **315**, 762–774 (2016).
7. Shankar-Hari, M. *et al.* Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* **315**, 775–787 (2016).
8. Brun-Buisson, C., Doyon, F. & Carlet, J. Bacteremia and severe sepsis in adults: a multicenter prospective survey in ICUs and wards of 24 hospitals. French Bacteremia-Sepsis Study Group. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **154**, 617–624 (1996).
9. 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).
10. Angus, D. C. & van der Poll, T. Severe sepsis and septic shock. *N. Engl. J. Med.* **369**, 840–851 (2013).
11. Vincent, J.-L. *et al.* *Assessment of the worldwide burden of critical illness: the Intensive Care Over Nations (ICON) audit.* (2014). doi:10.1016/S2213-2600(14)70061-X
12. Quenot, J.-P. *et al.* The epidemiology of septic shock in French intensive care units: the prospective multicenter cohort EPISS study. *Crit. Care* **17**, R65 (2013).

13. Prescott, H. C., Langa, K. M. & Iwashyna, T. J. Readmission diagnoses after hospitalization for severe sepsis and other acute medical conditions. *JAMA* **313**, 1055–1057 (2015).
14. Stearns-Kurosawa, D. J., Osuchowski, M. F., Valentine, C., Kurosawa, S. & Remick, D. G. The pathogenesis of sepsis. *Annu. Rev. Pathol.* **6**, 19–48 (2011).
15. Efron, P. & Moldawer, L. L. Sepsis and the dendritic cell. *Shock Augusta Ga* **20**, 386–401 (2003).
16. Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783–801 (2006).
17. Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**, 805–820 (2010).
18. Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M. & Hoffmann, J. A. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle*/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**, 973–983 (1996).
19. Gay, N. J. & Keith, F. J. *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature* **351**, 355–356 (1991).
20. O’Neill, L. A. & Dinarello, C. A. The IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense. *Immunol. Today* **21**, 206–209 (2000).
21. O’Neill, L. A. J., Golenbock, D. & Bowie, A. G. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 453–460 (2013).
22. Russell, J. A. Management of sepsis. *N. Engl. J. Med.* **355**, 1699–1713 (2006).
23. Adib-Conquy, M. & Cavaillon, J.-M. Compensatory anti-inflammatory response syndrome. *Thromb. Haemost.* **101**, 36–47 (2009).
24. Bone, R. C., Grodzin, C. J. & Balk, R. A. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest* **112**, 235–243 (1997).
25. Moore, F. A. *et al.* Postinjury multiple organ failure: a bimodal phenomenon. *J. Trauma* **40**, 501-510; discussion 510-512 (1996).
26. Xiao, W. *et al.* A genomic storm in critically injured humans. *J. Exp. Med.* **208**, 2581–2590 (2011).
27. Wang, H. & Ma, S. The cytokine storm and factors determining the sequence and severity of organ dysfunction in multiple organ dysfunction syndrome. *Am. J. Emerg. Med.* **26**, 711–715 (2008).

28. Abraham, E. & Singer, M. Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. *Crit. Care Med.* **35**, 2408–2416 (2007).
29. Vincent, J.-L. *et al.* Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit. Care Med.* **34**, 344–353 (2006).
30. Cohen, J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* **420**, 885–891 (2002).
31. Hotchkiss, R. S. *et al.* Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit. Care Med.* **27**, 1230–1251 (1999).
32. Cinel, I. & Opal, S. M. Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. *Crit. Care Med.* **37**, 291–304 (2009).
33. 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).
34. Harrois, A. *et al.* Réponse inflammatoire exacerbée après traumatisme sévère : de la physiopathologie au traitement. *Sfar* (2016).
35. Galley, H. F. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. *Br. J. Anaesth.* **107**, 57–64 (2011).
36. Zhang, Q. *et al.* Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* **464**, 104–U115 (2010).
37. Cines, D. B. *et al.* Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* **91**, 3527–3561 (1998).
38. Sanofi en France - Accueil. Available at: <http://www.sanofi.fr/l/fr/fr/index.jsp>. (Accessed: 18th October 2017)
39. Davies, P. F. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol. Rev.* **75**, 519–560 (1995).
40. Malek, A. M. & Izumo, S. Control of endothelial cell gene expression by flow. *J. Biomech.* **28**, 1515–1528 (1995).
41. Jalali, S. *et al.* Integrin-mediated mechanotransduction requires its dynamic interaction with specific extracellular matrix (ECM) ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 1042–1046 (2001).
42. Auerbach, R., Alby, L., Morrissey, L. W., Tu, M. & Joseph, J. Expression of organ-specific antigens on capillary endothelial cells. *Microvasc. Res.* **29**, 401–411 (1985).
43. Aird, W. C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ. Res.* **100**, 158–173 (2007).

44. Aird, W. C. Endothelial cell heterogeneity. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, a006429 (2012).
45. Tse, D. & Stan, R. V. Morphological heterogeneity of endothelium. *Semin. Thromb. Hemost.* **36**, 236–245 (2010).
46. Ince, C. *et al.* THE ENDOTHELIUM IN SEPSIS. *Shock Augusta Ga* **45**, 259–270 (2016).
47. 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).
48. Aird, W. C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ. Res.* **100**, 174–190 (2007).
49. Aird, W. C. Endothelial cell heterogeneity. *Crit. Care Med.* **31**, S221-230 (2003).
50. Aird, W. C. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood* **101**, 3765–3777 (2003).
51. Furchgott, R. F. & Zawadzki, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**, 373–376 (1980).
52. Félétou, M. *Multiple Functions of the Endothelial Cells*. (Morgan & Claypool Life Sciences, 2011).
53. Bauersachs, J., Fleming, I., Scholz, D., Popp, R. & Busse, R. Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor, But Not Nitric Oxide, Is Reversibly Inhibited by Brefeldin A. *Hypertension* **30**, 1598–1605 (1997).
54. Dudzinski, D. M. & Michel, T. Life history of eNOS: partners and pathways. *Cardiovasc. Res.* **75**, 247–260 (2007).
55. Moncada, S., Palmer, R. M. & Higgs, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**, 109–142 (1991).
56. Mendelsohn, M. E., O'Neill, S., George, D. & Loscalzo, J. Inhibition of fibrinogen binding to human platelets by S-nitroso-N-acetylcysteine. *J. Biol. Chem.* **265**, 19028–19034 (1990).
57. Levin, E. R. Endothelins. *N. Engl. J. Med.* **333**, 356–363 (1995).
58. Imaizumi, T. A. *et al.* Platelet-activating factor: a mediator for clinicians. *J. Intern. Med.* **238**, 5–20 (1995).
59. Lorant, D. E., Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M. & Prescott, S. M. Platelet-activating factor mediates procoagulant activity on the surface of endothelial cells by promoting leukocyte adhesion. *Semin. Cell Biol.* **6**, 295–303 (1995).

60. Verhamme, P. & Hoylaerts, M. F. The pivotal role of the endothelium in haemostasis and thrombosis. *Acta Clin. Belg.* **61**, 213–219 (2006).
61. Pearson, J. D. Endothelial cell function and thrombosis. *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **12**, 329–341 (1999).
62. Cowan, P. J. Coagulation and the xenograft endothelium. *Xenotransplantation* **14**, 7–12 (2007).
63. Simmons, J. & Pittet, J.-F. The Coagulopathy of Acute Sepsis. *Curr. Opin. Anaesthesiol.* **28**, 227–236 (2015).
64. Broze, G. J. Tissue factor pathway inhibitor. *Thromb. Haemost.* **74**, 90–93 (1995).
65. Bevilacqua, M. P. *et al.* Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: characterization and comparison with the actions of interleukin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 4533–4537 (1986).
66. Moore, K. L., Andreoli, S. P., Esmon, N. L., Esmon, C. T. & Bang, N. U. Endotoxin enhances tissue factor and suppresses thrombomodulin expression of human vascular endothelium in vitro. *J. Clin. Invest.* **79**, 124–130 (1987).
67. McEver, R. P. Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 581–586 (2002).
68. Chavakis, E., Choi, E. Y. & Chavakis, T. Novel aspects in the regulation of the leukocyte adhesion cascade. *Thromb. Haemost.* **102**, 191–197 (2009).
69. Muller, W. A. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol.* **24**, 327–334 (2003).
70. Woodfin, A. *et al.* Junctional adhesion molecule-C (JAM-C) regulates polarized neutrophil transendothelial cell migration in vivo. *Nat. Immunol.* **12**, 761–769 (2011).
71. Minshall, R. D. & Malik, A. B. Transport across the endothelium: regulation of endothelial permeability. *Handb. Exp. Pharmacol.* 107–144 (2006).
72. Peters, K., Unger, R. E., Brunner, J. & Kirkpatrick, C. J. Molecular basis of endothelial dysfunction in sepsis. *Cardiovasc. Res.* **60**, 49–57 (2003).
73. Opal, S. M. & van der Poll, T. Endothelial barrier dysfunction in septic shock. *J. Intern. Med.* **277**, 277–293 (2015).
74. Hattori, M. *et al.* Critical role of endogenous histamine in promoting end-organ tissue injury in sepsis. *Intensive Care Med. Exp.* **4**, 36 (2016).

75. Mathiak, G., Szewczyk, D., Abdullah, F., Ovadia, P. & Rabinovici, R. PLATELET-ACTIVATING FACTOR (PAF) IN EXPERIMENTAL AND CLINICAL SEPSIS. *Shock* **7**, 391 (1997).
76. Hattori, Y., Hattori, K., Suzuki, T. & Matsuda, N. Recent advances in the pathophysiology and molecular basis of sepsis-associated organ dysfunction: Novel therapeutic implications and challenges. *Pharmacol. Ther.* **177**, 56–66 (2017).
77. Salzman, A. L. *et al.* Endotoxin-induced ileal mucosal hyperpermeability in pigs: role of tissue acidosis. *Am. J. Physiol.* **266**, G633–646 (1994).
78. Wiel, E. *et al.* Effects of the angiotensin-converting enzyme inhibitor perindopril on endothelial injury and hemostasis in rabbit endotoxic shock. *Intensive Care Med.* **30**, 1652–1659 (2004).
79. Price, S., Anning, P. B., Mitchell, J. A. & Evans, T. W. Myocardial dysfunction in sepsis: mechanisms and therapeutic implications. *Eur. Heart J.* **20**, 715–724 (1999).
80. Kloner, R. A. *et al.* Time course of the interaction between tadalafil and nitrates. *J. Am. Coll. Cardiol.* **42**, 1855–1860 (2003).
81. Gachet, C. [Molecular mechanisms of platelet activation]. *Bull. Acad. Natl. Med.* **197**, 361–373 (2013).
82. Coller, B. S. & Shattil, S. J. The GPIIb/IIIa (integrin α IIb β 3) odyssey: a technology-driven saga of a receptor with twists, turns, and even a bend. *Blood* **112**, 3011–3025 (2008).
83. Dewitte, A. *et al.* Blood platelets and sepsis pathophysiology: A new therapeutic prospect in critical ill patients? *Ann. Intensive Care* **7**, (2017).
84. Melki, I., Tessandier, N., Zufferey, A. & Boilard, E. Platelet microvesicles in health and disease. *Platelets* **28**, 214–221 (2017).
85. Bhattacharya, J. & Matthay, M. A. Regulation and repair of the alveolar-capillary barrier in acute lung injury. *Annu. Rev. Physiol.* **75**, 593–615 (2013).
86. Middleton, E. A., Weyrich, A. S. & Zimmerman, G. A. Platelets in Pulmonary Immune Responses and Inflammatory Lung Diseases. *Physiol. Rev.* **96**, 1211–1259 (2016).
87. Brinkmann, V. *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **303**, 1532–1535 (2004).
88. Engelmann, B. & Massberg, S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 34–45 (2013).
89. Ho-Tin-Noé, B., Demers, M. & Wagner, D. D. How platelets safeguard vascular integrity. *J. Thromb. Haemost. JTH* **9 Suppl 1**, 56–65 (2011).

90. Weyrich, A. S. & Zimmerman, G. A. Platelets in lung biology. *Annu. Rev. Physiol.* **75**, 569–591 (2013).
91. Zarbock, A., Singbartl, K. & Ley, K. Complete reversal of acid-induced acute lung injury by blocking of platelet-neutrophil aggregation. *J. Clin. Invest.* **116**, 3211–3219 (2006).
92. Asaduzzaman, M. *et al.* Platelets support pulmonary recruitment of neutrophils in abdominal sepsis. *Crit. Care Med.* **37**, 1389–1396 (2009).
93. Levi, M. & Ten Cate, H. Disseminated intravascular coagulation. *N. Engl. J. Med.* **341**, 586–592 (1999).
94. Dhainaut, J.-F. *et al.* Treatment effects of drotrecogin alfa (activated) in patients with severe sepsis with or without overt disseminated intravascular coagulation. *J. Thromb. Haemost. JTH* **2**, 1924–1933 (2004).
95. Levi, M. & van der Poll, T. Coagulation and sepsis. *Thromb. Res.* **149**, 38–44 (2017).
96. Coughlin, S. R. Thrombin receptor function and cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc. Med.* **4**, 77–83 (1994).
97. Nieman, M. T. Protease-activated receptors in hemostasis. *Blood* **128**, 169–177 (2016).
98. Cognasse, F. *et al.* Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets. *Immunol. Cell Biol.* **83**, 196–198 (2005).
99. Tyml, K. Critical role for oxidative stress, platelets, and coagulation in capillary blood flow impairment in sepsis. *Microcirc. N. Y. N* **1994** **18**, 152–162 (2011).
100. Heptinstall, S. Platelet Activation by an Extracellular Adherence Protein From *Staphylococcus aureus* Acting via Modulation of Sulfhydryl Groups on Platelets. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 1751–1752 (2012).
101. Waller, A. K. *et al.* *Staphylococcus aureus* Lipoteichoic Acid Inhibits Platelet Activation and Thrombus Formation via the Paf Receptor. *J. Infect. Dis.* **208**, 2046–2057 (2013).
102. Thiery-Antier, N. *et al.* Is Thrombocytopenia an Early Prognostic Marker in Septic Shock? *Crit. Care Med.* **44**, 764 (2016).
103. Tsigotis, P. *et al.* Thrombocytopenia in critically ill patients with severe sepsis/septic shock: Prognostic value and association with a distinct serum cytokine profile. *J. Crit. Care* **32**, 9–15 (2016).
104. Antier, N. *et al.* Mechanisms and etiologies of thrombocytopenia in the intensive care unit: impact of extensive investigations. *Ann. Intensive Care* **4**, 24 (2014).

105. Vanderschueren, S. *et al.* Thrombocytopenia and prognosis in intensive care. *Crit. Care Med.* **28**, 1871–1876 (2000).
106. Crowther, M. A. *et al.* Thrombocytopenia in medical-surgical critically ill patients: prevalence, incidence, and risk factors. *J. Crit. Care* **20**, 348–353 (2005).
107. Mohamed, A. K. S., Mehta, A. A. & James, P. Predictors of mortality of severe sepsis among adult patients in the medical Intensive Care Unit. *Lung India Off. Organ Indian Chest Soc.* **34**, 330–335 (2017).
108. Bedet, A. *et al.* Mechanisms of Thrombocytopenia During Septic Shock: A Multiplex Cluster Analysis of Endogenous Sepsis Mediators. *Shock Publish Ahead of Print*, (2017).
109. Stéphan, F. *et al.* Thrombocytopenia in a surgical ICU. *Chest* **115**, 1363–1370 (1999).
110. Lerolle, N., Borgel, D. & Diehl, J.-L. Coagulation intravasculaire disséminée en réanimation : physiopathologie, épidémiologie, diagnostic et prise en charge thérapeutique. *Hématologie* **13**, 409–420 (2007).
111. François, B. *et al.* Thrombocytopenia in the sepsis syndrome: role of hemophagocytosis and macrophage colony-stimulating factor. *Am. J. Med.* **103**, 114–120 (1997).
112. Allcock, R. J. N., Barrow, A. D., Forbes, S., Beck, S. & Trowsdale, J. The human TREM gene cluster at 6p21.1 encodes both activating and inhibitory single IgV domain receptors and includes NKp44. *Eur. J. Immunol.* **33**, 567–577 (2003).
113. Chung, D.-H., Seaman, W. E. & Daws, M. R. Characterization of TREM-3, an activating receptor on mouse macrophages: definition of a family of single Ig domain receptors on mouse chromosome 17. *Eur. J. Immunol.* **32**, 59–66 (2002).
114. Bouchon, A., Facchetti, F., Weigand, M. A. & Colonna, M. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature* **410**, 1103–1107 (2001).
115. Bouchon, A., Dietrich, J. & Colonna, M. Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **164**, 4991–4995 (2000).
116. Genua, M., Rutella, S., Correale, C. & Danese, S. The triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM) in inflammatory bowel disease pathogenesis. *J. Transl. Med.* **12**, 293 (2014).
117. Pelham, C. J., Pandya, A. N. & Agrawal, D. K. Triggering receptor expressed on myeloid cells receptor family modulators: a patent review. *Expert Opin. Ther. Pat.* **24**, 1383–1395 (2014).

118. Gingras, M.-C., Lapillonne, H. & Margolin, J. F. TREM-1, MDL-1, and DAP12 expression is associated with a mature stage of myeloid development. *Mol. Immunol.* **38**, 817–824 (2002).
119. Baruah, S. *et al.* Identification of a Novel Splice Variant Isoform of TREM-1 in Human Neutrophil Granules. *J. Immunol.* **195**, 5725–5731 (2015).
120. Gómez-Piña, V. *et al.* Metalloproteinases Shed TREM-1 Ectodomain from Lipopolysaccharide-Stimulated Human Monocytes. *J. Immunol.* **179**, 4065–4073 (2007).
121. Radaev, S., Kattah, M., Rostro, B., Colonna, M. & Sun, P. D. Crystal structure of the human myeloid cell activating receptor TREM-1. *Struct. Lond. Engl.* **1993** **11**, 1527–1535 (2003).
122. Kelker, M. S., Debler, E. W. & Wilson, I. A. Crystal structure of mouse triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (TREM-1) at 1.76 Å. *J. Mol. Biol.* **344**, 1175–1181 (2004).
123. Rigo, I. *et al.* Induction of triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM-1) in airway epithelial cells by 1,25(OH)₂ vitamin D₃. *Innate Immun.* **18**, 250–257 (2012).
124. Tammaro, A. *et al.* TREM-1 and its potential ligands in non-infectious diseases: from biology to clinical perspectives. *Pharmacol. Ther.* (2017). doi:10.1016/j.pharmthera.2017.02.043
125. Kim, T.-H. *et al.* Regulation of TREM-1 expression by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in human monocytes/macrophages. *Immunol. Lett.* **154**, 80–85 (2013).
126. Zeng, H., Ornatowska, M., Joo, M. S. & Sadikot, R. T. TREM-1 expression in macrophages is regulated at transcriptional level by NF-κB and PU.1. *Eur. J. Immunol.* **37**, 2300–2308 (2007).
127. Hosoda, H., Tamura, H., Kida, S. & Nagaoka, I. Transcriptional regulation of mouse TREM-1 gene in RAW264.7 macrophage-like cells. *Life Sci.* **89**, 115–122 (2011).
128. Ornatowska, M. *et al.* Functional genomics of silencing TREM-1 on TLR4 signaling in macrophages. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **293**, L1377–L1384 (2007).
129. Washington, A. V. *et al.* TREM-like transcript-1 protects against inflammation-associated hemorrhage by facilitating platelet aggregation in mice and humans. *J. Clin. Invest.* **119**, 1489–1501 (2009).
130. Derive, M. *et al.* Soluble TREM-like transcript-1 regulates leukocyte activation and controls microbial sepsis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **188**, 5585–5592 (2012).
131. Derive, M. *et al.* Effects of a TREM-like transcript 1-derived peptide during hypodynamic septic shock in pigs. *Shock Augusta Ga* **39**, 176–182 (2013).

132. Derive, M., Boufenger, A. & Gibot, S. Attenuation of responses to endotoxin by the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 inhibitor LR12 in nonhuman primate. *Anesthesiology* **120**, 935–942 (2014).
133. Kökten, T. *et al.* TREM-1 inhibition restores impaired autophagy activity and reduces colitis in mice. *J. Crohns Colitis* (2017). doi:10.1093/ecco-jcc/jjx129
134. Boufenger, A. *et al.* TREM-1 Mediates Inflammatory Injury and Cardiac Remodeling Following Myocardial Infarction. *Circ. Res.* **116**, 1772–1782 (2015).
135. Lemarié, J. *et al.* Pharmacological inhibition of the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 limits reperfusion injury in a porcine model of myocardial infarction. *ESC Heart Fail.* **2**, 90–99 (2015).
136. Joffre, J. *et al.* Genetic and Pharmacological Inhibition of TREM-1 Limits the Development of Experimental Atherosclerosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* **68**, 2776–2793 (2016).
137. Derive, M., Boufenger, A. & Gibot, S. Attenuation of responses to endotoxin by the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 inhibitor LR12 in nonhuman primate. *Anesthesiology* **120**, 935–942 (2014).
138. Gibot, S. *et al.* TREM-1 promotes survival during septic shock in mice. *Eur. J. Immunol.* **37**, 456–466 (2007).
139. Gibot, S. *et al.* A soluble form of the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 modulates the inflammatory response in murine sepsis. *J. Exp. Med.* **200**, 1419–1426 (2004).
140. Corrigan, J. J., Ray, W. L. & May, N. Changes in the blood coagulation system associated with septicemia. *N. Engl. J. Med.* **279**, 851–856 (1968).
141. Nitric Oxide Indicators: DAD-FM and DAF-FM Diacetate - mp23841.pdf. Available at: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp23841.pdf>. (Accessed: 11th October 2017)
142. Tessarz, A. S. *et al.* Non-T cell activation linker (NTAL) negatively regulates TREM-1/DAP12-induced inflammatory cytokine production in myeloid cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **178**, 1991–1999 (2007).
143. Platelet Function Testing: Light Transmission Aggregometry. Available at: http://www.practical-haemostasis.com/Platelets/platelet_function_testing_lta.html. (Accessed: 11th October 2017)
144. Denis, C. V. *et al.* Towards standardization of in vivo thrombosis studies in mice. *J. Thromb. Haemost. JTH* **9**, 1641–1644 (2011).

145. Stoclet, J. C. *et al.* Induction of nitric oxide synthase and dual effects of nitric oxide and cyclooxygenase products in regulation of arterial contraction in human septic shock. *Circulation* **100**, 107–112 (1999).
146. Levy, R. J. Mitochondrial dysfunction, bioenergetic impairment, and metabolic down-regulation in sepsis. *Shock Augusta Ga* **28**, 24–28 (2007).
147. Washington, A. V. *et al.* A TREM family member, TLT-1, is found exclusively in the alpha-granules of megakaryocytes and platelets. *Blood* **104**, 1042–1047 (2004).
148. Matesanz-Isabel, J. *et al.* New B-cell CD molecules. *Immunol. Lett.* **134**, 104–112 (2011).
149. Gingras, M.-C., Lapillonne, H. & Margolin, J. F. TREM-1, MDL-1, and DAP12 expression is associated with a mature stage of myeloid development. *Mol. Immunol.* **38**, 817–824 (2002).
150. Chen, L. C., Laskin, J. D., Gordon, M. K. & Laskin, D. L. Regulation of TREM expression in hepatic macrophages and endothelial cells during acute endotoxemia. *Exp. Mol. Pathol.* **84**, 145–155 (2008).
151. Wu, J. *et al.* The Proinflammatory Myeloid Cell Receptor TREM-1 Controls Kupffer Cell Activation and Development of Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res.* **72**, 3977–3986 (2012).
152. Zangi, L. *et al.* Deletion of cognate CD8 T cells by immature dendritic cells: a novel role for perforin, granzyme A, TREM-1, and TLR7. *Blood* **120**, 1647–1657 (2012).
153. Roe, K., Gibot, S. & Verma, S. Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1): a new player in antiviral immunity? *Front. Microbiol.* **5**, (2014).
154. Landmesser, U. *et al.* Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation* **106**, 3073–3078 (2002).
155. Swirski, F. K. *et al.* Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* **325**, 612–616 (2009).
156. Heba, G., Krzemiński, T., Porc, M., Grzyb, J. & Dembińska-Kieć, A. Relation between expression of TNF alpha, iNOS, VEGF mRNA and development of heart failure after experimental myocardial infarction in rats. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* **52**, 39–52 (2001).
157. Bishop-Bailey, D., Larkin, S. W., Warner, T. D., Chen, G. & Mitchell, J. A. Characterization of the induction of nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase in rat aorta in organ culture. *Br. J. Pharmacol.* **121**, 125–133 (1997).

158. Barraud, D. & Gibot, S. Triggering receptor expressed on myeloid cell 1. *Crit. Care Clin.* **27**, 265–279 (2011).
159. Tessarz, A. S. & Cerwenka, A. The TREM-1/DAP12 pathway. *Immunol. Lett.* **116**, 111–116 (2008).
160. Boomer, J. S. *et al.* Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA* **306**, 2594–2605 (2011).
161. Restagno, D. *et al.* Mice Survival and Plasmatic Cytokine Secretion in a “Two Hit” Model of Sepsis Depend on Intratracheal *Pseudomonas Aeruginosa* Bacterial Load. *PLoS ONE* **11**, (2016).
162. Shi, D.-W. *et al.* LPS pretreatment ameliorates multiple organ injuries and improves survival in a murine model of polymicrobial sepsis. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. Al* **60**, 841–849 (2011).
163. Wheeler, D. S. *et al.* INDUCTION OF ENDOTOXIN TOLERANCE ENHANCES BACTERIAL CLEARANCE AND SURVIVAL IN MURINE POLYMICROBIAL SEPSIS. *Shock Augusta Ga* **30**, 267 (2008).
164. Gibot, S. *et al.* Modulation of the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 pathway during pneumonia in rats. *J. Infect. Dis.* **194**, 975–983 (2006).
165. Barrow, A. D. *et al.* Cutting edge: TREM-like transcript-1, a platelet immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif encoding costimulatory immunoreceptor that enhances, rather than inhibits, calcium signaling via SHP-2. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **172**, 5838–5842 (2004).
166. Giomarelli, B. *et al.* Inhibition of thrombin-induced platelet aggregation using human single-chain Fv antibodies specific for TREM-like transcript-1. *Thromb. Haemost.* **97**, 955–963 (2007).
167. Ragab, A. *et al.* Roles of the C-terminal tyrosine residues of LAT in GPVI-induced platelet activation: insights into the mechanism of PLC γ 2 activation. *Blood* **110**, 2466–2474 (2007).
168. Furie, B., Furie, B. C. & Flaumenhaft, R. A journey with platelet P-selectin: the molecular basis of granule secretion, signalling and cell adhesion. *Thromb. Haemost.* **86**, 214–221 (2001).
169. Blann, A. D., Nadar, S. K. & Lip, G. Y. H. The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease. *Eur. Heart J.* **24**, 2166–2179 (2003).

170. von Brühl, M.-L. *et al.* Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J. Exp. Med.* **209**, 819–835 (2012).
171. Thomas, M. R. & Storey, R. F. The role of platelets in inflammation. *Thromb. Haemost.* **114**, 449–458 (2015).
172. Toner, P., McAuley, D. F. & Shyamsundar, M. Aspirin as a potential treatment in sepsis or acute respiratory distress syndrome. *Crit. Care Lond. Engl.* **19**, 374 (2015).
173. Haselmayer, P., Grosse-Hovest, L., Landenberg, P. von, Schild, H. & Radsak, M. P. TREM-1 ligand expression on platelets enhances neutrophil activation. *Blood* **110**, 1029–1035 (2007).

7 Annexes

ARTICLE n°1: accepted in *Cardiovascular Research*, 2018

Targeted endothelial gene deletion of Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1 protects mice during septic shock

Lucie Jolly^{1,2}; Kevin Carrasco¹; Marc Derive, PhD²; Jérémie Lemarié, MD^{1,3}; Amir Boufenzer*, PhD²; Sébastien Gibot*, MD, PhD^{1,3}

¹ INSERM UMRS-1116, Faculté de Médecine Nancy, Université de Lorraine, Nancy, France

² INOTREM SA, Nancy, France

³ CHRU Nancy, Hôpital Central, Service de Réanimation Médicale, Nancy, France

* co-last authors

ABSTRACT

AIMS

TREM-1 (Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1) is an immunoreceptor expressed on neutrophils and monocytes/macrophages whose role is to amplify the inflammatory response driven by Toll-Like Receptors engagement. The pharmacological inhibition of TREM-1 confers protection in several pre-clinical models of acute inflammation. In this study, we aimed to decipher the role of TREM-1 on the endothelium.

METHODS AND RESULTS

We first showed by qRT-PCR, flow cytometry and confocal microscopy that TREM-1 was expressed in human pulmonary microvascular endothelial cells as well as in mouse vasculature (aorta, mesenteric artery, and pulmonary vessels). TREM-1 expression was upregulated following septic insult. We next observed that TREM-1 engagement impaired mouse vascular reactivity and promoted vascular inflammation. The pharmacological inhibition of TREM-1 (using the synthetic inhibitory peptide LR12) prevented these disorders both in vitro and in vivo. We generated endothelium-conditional Trem-1 ko mice (EndoTREM-1^{-/-}) and submitted them to a caecal ligation and puncture-induced septic shock. As compared to wild-type littermates, targeted endothelial *Trem-1* deletion conferred protection during septic shock in modulating inflammatory cells mobilization and activation, in restoring vasoreactivity, and in improving the survival.

CONCLUSION

We reported that TREM-1 is expressed and inducible in endothelial cells and plays a direct role in vascular inflammation and dysfunction. The targeted deletion of endothelial *Trem-1* conferred protection during septic shock in modulating inflammatory cells mobilization and activation, restoring vasoreactivity and improving survival. The effect of TREM-1 on vascular tone, while impressive, deserves further investigations including the design of endothelium specific TREM-1 inhibitors.

KEYWORDS

TREM-1, endothelium, septic shock

INTRODUCTION

Septic shock, a complex clinical syndrome resulting from a harmful and damaging host response to infection, is the leading cause of mortality in intensive care units.^{1,2} Sepsis develops when the initial appropriate host response to systemic infection becomes deregulated and over-amplified with an intimate crosstalk between inflammation and coagulation.³

An important hallmark of sepsis is endothelial activation and dysfunction, which appears to play a pivotal role in the development of this syndrome. The consequences of this endothelial dysfunction include not only alterations in the control of vasomotor and platelet functions, but also an amplification of the inflammatory response associated with programmed cell death, adhesion molecule overexpression and increased leukocyte trafficking.⁴⁻⁷ Moreover, endothelial dysfunction is associated with an increased risk of cardiovascular events.^{8,9} Whereas the protection of the endothelium is of paramount importance in acute (septic shock) or chronic conditions (cardiovascular illnesses), available pharmacological tools are scarce.

The Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1 (TREM-1) is an immune-receptor that plays a key role in the amplification of inflammation, crosstalk with other Pattern Recognition Receptors pathways and activation of antigen-presenting cells.^{10,11} Membrane TREM-1 presents three distinct domains: an Ig-like structure, a transmembrane part and a cytoplasmic tail which associates with the adaptor molecule DAP12.¹² TREM-1 has been identified with high level of expression in neutrophils, mature monocytes, macrophages and natural killer cells, and with low level of expression on some epithelial cells.¹³⁻¹⁵ A recent study from our group also showed that TREM-1 is expressed by platelets where it plays a key role in mediating their activation.¹⁶

Following the engagement of Toll Like Receptor (TLR)-2 or -4, TREM-1 is up-regulated in a Myeloid Differentiation factor 88 (MyD88)-dependent way through the involvement of the transcription factors NF- κ B, PU.1 and Activator Protein 1 (AP1)¹⁰⁻¹². On the opposite, TREM-1 silencing down-regulates of several key players of the TLRs pathway, such as MyD88, the cluster of differentiation 14 (CD14), NF- κ B Inhibitor alpha ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha$), as well as several inflammatory mediators such as interleukin 1 beta (IL-1 β), monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) and IL-10¹⁷.

Although the pathophysiological role of TREM-1 was first identified during infectious diseases this receptor is involved in many acute and chronic inflammatory disorders.¹⁸ Indeed, TREM-1 pharmacological inhibition or genetic invalidation reduces hyper-responsiveness and death during various experimental septic shock models^{19–21}, protects from cardiovascular dysfunction following myocardial infarction^{22,23}, and prevents atherosclerosis.^{24,25} Moreover, pharmacological modulation of TREM-1 impairs platelet activation and prevents from arterial or venous thrombosis.¹⁶

To modulate TREM-1 activity, a dodecapeptide (LR12) designed to mimic a highly-conserved sequence across various species (human, monkey, porcine and murine sequences) and across two genes belonging to the TREM family (*trem-1* and *trem11*) has been used in these former studies. Indeed, LR12 does not bind to TREM-1 but to its (still unknown) ligand(s), acting as a decoy receptor, and as such is not a *direct* TREM-1 inhibitor. However, LR12 seems to specifically inhibit TREM-1 as this peptide shows not effect in the absence of TREM-1.^{16,26}

In this study, we demonstrate that TREM-1 is expressed by endothelial cells and show that its pharmacological inhibition by LR12 dampens vascular dysfunction induced by endotoxin or bacterial peritonitis. Moreover, we report that targeted endothelial *Trem-1* deletion protects mice during septic shock in modulating inflammatory cells mobilization and activation, in restoring vasoreactivity, and in improving survival.

METHODS

Animals

Endothelium-conditional Trem-1 ko mice were generated using a targeting vector designed for conditional deletion of exon 2 that encodes for the extracellular domain of TREM-1. Breeding of C57Bl/6 Trem-1^{+/*flox*} chimeric offspring mice with Cadherin 5 Cre deleted mice yielded viable Trem1^{+/*x*}(Cadh5) Cre^{+/*-*} offsprings. Interbreeding of Trem1^{+/*-*} mice gave rise to endothelium-specific Trem-1^{-/*-*} (EndoTrem1^{-/*-*}) mice at the expected Mendelian frequencies. EndoTrem1^{-/*-*} mice were equal in size, weight, and fertility to littermate controls. Moreover, the composition and abundance of immune cells in blood, BM, spleen, and lungs did not differ between groups. All animals were housed in plastic cages maintained on a 12h light/dark cycle at a controlled temperature (24±2°C) and humidity (50±5%), and allowed free access to standard mice chow and water. We used 6 to 8-week-old male EndoTrem-1^{-/*-*} and WT littermates. Experiments were approved by our institutional Animal Care and Use Committee (number 01079.01), and conducted according to the guidelines from Directive 2010/63/EU of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes.

LR12 peptide

LR12 peptide (LQEEDAGEYGCM) and a scramble inactive peptide (EDGQYECLMEGA) were chemically synthesized (Pepscan Presto BV, Lelystad, The Netherlands) as a COOH terminally amidated peptides. The correct peptides were obtained with >99% yields and were homogeneous after preparative purification, as confirmed by mass spectrometry and analytic reversed-phase high-performance liquid chromatography. These peptides were free of endotoxin. In every experiment involving LR12, the scramble peptide served as control.

Cell culture and stimulation

Human pulmonary microvascular endothelial cells (HPMEC) were purchased from Promocell (6 different batches originating from 6 different donors) (Heidelberg, Germany). The cells were maintained in complete endothelial cells growth medium MV (Promocell) at 37 °C in a 5 % CO₂ humidified atmosphere incubator. All experiments were performed between passages 2 and 5.

Cells were stimulated in complete medium supplemented with 10µg/ml *Escherichia coli* LPS (O111:B4; Sigma-Aldrich Saint-Quentin Fallavier, France) in presence or absence of 50µg/ml LR12 during various times depending of the experiments. Supernatants were collected for cytokines measurements and cells subjected to flow cytometry or lysed for protein phosphorylation and mRNA analyses.

Supernatants from stimulated cells were recovered after 24h stimulation and the concentrations of IL-6, ICAM-1 and E-selectin were measured using human Quantikine ELISA kits (R&D Systems, Abingdon, UK) according to the manufacturer's protocol.

Measurement of intracellular NO production

The intracellular nitric oxide (NO) production in HPMEC was determined using DAF-FM diacetate (4-amino-5-methylamino- 2',7'-difluorofluorescein diacetate; Sigma Aldrich). DAF-FM diacetate is a cell-permeable molecule and non-fluorescent until it reacts with NO. By the interaction with NO, DAF-FM diacetate changes its structure to cell membrane-impermeable and yields fluorescence. After treatment, HPMEC were incubated with 5µM DAF-2 DA for 1h at 37°C, washed twice in PBS and collected by trypsinization. DAF-FM fluorescence was compared to unstained controls with 10,000 events recorded, using Accuri C6 flow cytometer. Assays were conducted three times in triplicate.

Adhesion assay

HPMEC plated on Vena8Fluoro+ Biochips were assayed at 80% confluency. Briefly, HPMEC were stimulated in complete medium supplemented with TNFα (10ng/mL for 2 hours). The medium was removed and cell monolayers were washed once with PBS. U937 (expressing TREM-1 at a very low level) or U937 overexpressing Trem-1/Dap12 (U937-TD)²⁷ were centrifuged at 200g and resuspended in RPMI at a concentration of 3x10⁶ cells/ml. Cell suspension was added to the monolayers coated channels at a constant shear stress of 0.5 dyne·cm⁻² for 3min using the Mirus nanopump (Cellix, Dublin, Ireland). Cell adhesion was recorded on a ZEISS Axiovert 40 CFL fluorescence microscope, using a Q-IMAGING ROLERA-XR digital camera. Cell images of 3 microscopic fields from each channel were captured, and images were analyzed using DucoCell software (Cellix).

Caecal ligation and puncture (CLP) polymicrobial sepsis model

Male (6–8 weeks) wild-type littermates (WT) and EndoTrem-1^{-/-} C57Bl/6 mice were anesthetized with isoflurane. The caecum was exposed through a 1.0cm abdominal midline incision and subjected to a ligation of the distal half followed by puncture with a G21 needle. A small amount of stool was expelled from the punctures to ensure patency. The caecum was replaced into the peritoneal cavity and the abdominal incision closed in two layers. After surgery, all mice were injected s.c. with 0.5mL 0.9% NaCl solution for fluid resuscitation. Animals were sacrificed by pentobarbital i.p injection at 24h and 72h after CLP to collect organs (lungs and spleen) and blood.

In another experiment, survival was monitored for 7 days.

Vascular Reactivity Procedure

Animals were sacrificed by pentobarbital i.p injection (100mg/kg) and the thoracic aorta and the mesenteric artery from operated animals were dissected and placed in an ice-cold physiological salt solution with the following composition: 130mM NaCl, 14,9mM NaHCO₃, 3.7mM KCl, 1.2mM MgSO₄, 2,5mM CaCl₂, 1,2mM KH₂PO₄, 5,5mM glucose.

Vessels from healthy mice were also sampled and incubated with 10µg/ml *Escherichia coli* LPS, 20µg/mL LR12 or 5µg/mL of the agonistic anti-TREM-1 antibody (αTREM-1) (MAB1278, Biotechne, R&D Systems, USA) during 4h. Then, a 2mm-length ring was cut and mounted on a 40µm stainless steel wire in a small vessel myograph (Danish Myo Technology, Arhus, Denmark). The preparation was supplied with carbogen gas mixture (95%O₂, 5%CO₂). After an equilibration period (at least 20min) under optimal passive tension, two successive contractions in response to the combination of KCl depolarization (100mM) and phenylephrine were used to test the maximal contractile capacity of the vessels. Concentration response curves to phenylephrine (1nM à 100µM) were performed. After a washout period of 20min, the vessels were pre-contracted with phenylephrine (1µM) to 80% of the maximum contraction and the acetylcholine concentration response curve was obtained (1nM à 100µM).

FACS analysis

Cell suspensions are prepared in the following way. The lungs were cut into small pieces and incubated in a cocktail of collagenase I and DNase I and shaken at 37°C for 1h. Cells were then

triturerated and centrifuged at 300g for 10min at 4°C. The spleens were crushed in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) at 4°C with the end of a syringe of 2ml and then filtered on a 70µm nylon filter. The cell suspension was centrifuged at 300g for 10min at 4°C. Pulmonary and spleen cells were then washed with HBSS and re-suspended in HBSS supplemented with 0.2% BSA. Finally, 1ml of PBS was injected into the mouse peritoneum to recover the peritoneal lavage fluid (PLF). Cells were then obtained as above.

Total viable cell numbers were determined from aliquots using a hemacytometer with Trypan blue staining (BioRad). Cell suspensions were incubated in a cocktail of mAbs (CD45-PerCP, CD11b-PB, Ly6G-PE, Ly6C-FITC, Miltenyi Biotech). The gating strategy has been previously described by our group²². Data were acquired on a Gallios FACS analyzer (Beckman Coulter). The expression of TREM-1 on HPMEC was detected by FACS after staining with 5µL allophycocyanin (APC)-conjugated mouse monoclonal anti-human TREM-1 antibody (Miltenyi Biotech) for 30min at 4 °C in dark. After washing with PBS twice, the cells were re-suspended and fixed with 4% paraformaldehyde. Accuri C6 flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) was used for analysis.

ELISA assay

Soluble TREM-1 levels were assessed in plasma, lung and PLF using enzyme-linked immunosorbent assay (mouse/rat TREM-1 Quantikine ELISA Kits; R&D Systems) according to the manufacturer's protocol. sVCAM-1 and IL-6 concentrations were also measured in plasma and lung in enzyme-linked immunosorbent assay with murine cytokine assay (mouse IL-6 or sVCAM-1/CD106 Quantikine ELISA Kits; R&D Systems).

Real-time PCR

Total RNAs were extracted from HPMEC or tissues (aorta and mesenteric artery) using RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands) and quantified with NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) before being reverse transcribed using the iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and quantified by quantitative polymerase chain reaction (PCR) using Qiagen probes (Quantitect Primers) for human TREM-1 and ActB, or murine TREM-1, IL-6, IL-10, TNF- α , and ActB. ActB serves as housekeeping gene.

Immunoblotting

HPMEC and cells from aortas or mesenteric arteries were lysed in PhosphoSafe Extraction Reagent (Novagen, Merck Biosciences, Nottingham, U.K.) and centrifuged for 5min at 16,000 g at 4°C to collect the supernatant. Protein concentration was determined (BCA Protein Assay Kit, Pierce; ThermoScientific), and thirty micrograms of each sample were electrophoresed on a Criterion XT Bis-Tris Gel 4–12% (Bio-Rad) and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Millipore, Saint-Quentin en Yvelines, France). The membrane was blocked with 5% w/v skim milk powder in TBST (0.1 M Tris-HCl pH 8, 1.5 M NaCl and 1% Tween-20) for 2h at room temperature, and subsequently incubated with anti-(p)ERK1/2, anti-(p)Akt, anti-(p)P38 (p38 mitogen activated protein kinase), anti-(p)P65 (Nuclear Factor- κ B p65), anti-iNOS, anti-COX-1, and anti-COX-2 (Cell Signaling, USA) antibodies overnight at 4°C. After vigorous washing in TBST, the membrane was incubated with secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase for 1h at room temperature. Immunocomplexes were detected with the SuperSignal West Femto Substrate (Pierce; ThermoScientific). Non-phosphorylated forms, tubulin or actin (Cell Signaling) were used for normalization. Acquisition and quantitative signal density analyses were performed by a LAS-4000 imager (FSVT) and Multi-Gauge software (LifeScience Fujifilm, Tokyo, Japan).

Confocal microscopy

The mouse lungs or aortas were frozen in Tissue-Tek OCT (VWR, Pennsylvania, USA) and cut by cryostat into 10 μ m sections and mounted on slides. After fixation, the frozen section slides were incubated with the indicated primary antibodies (TREM-1, Cadherin and TO-PRO3) (BIOSS, MA, USA) overnight at 4°C. Then, the slides were washed, mounted, and visualized through sequentially scanning on TCS SP5 X confocal microscope (Leica, Wetzlar, Germany). Images were processed using LAS AF Lite blue software (Leica).

HPMEC were seeded and stimulated on Nunc LabTek chambers (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for 24h. After stimulation, cells were then washed and fixed with paraformaldehyde (4%) for 20min, permeabilized with Triton 0.1% for 30min, and blocked in 1% bovine-serum albumin for 1 hour prior to incubation with indicated primary antibodies at 4°C overnight (TREM-1, vWF) (BIOSS, MA, USA). Nuclei were stained with 1 μ g/mL TO-PRO3 (Invitrogen, USA) for 1h at 37°C. After washing with PBS coverslips were mounted on

Vectashield (Vector Laboratories, CA, USA) and examined with the same confocal microscope and analyzing software.

Statistical analysis

All data, unless indicated, were normally distributed and then are presented as mean \pm SD. Statistical significance between groups was analyzed using Student t-test or two-way ANOVA test. Dunn's post-hoc testing was applied for repeated measures. Kaplan–Meier survival curves were analyzed using the log-rank test. Statistical analysis was performed using Prism Version 6 software (GraphPad) and a P value <0.05 was deemed significant.

RESULTS

TREM-1 is expressed by human pulmonary microvascular endothelial cells (HPMEC)

The expression of *Trem-1* in HPMEC was analyzed by qRT-PCR. Although *Trem-1* was barely detectable under basal condition, LPS stimulation induced a significant increase in expression with a peak reached at 6 hours (**Figure 1A**). Addition of LR12, a synthetic dodecapeptide that inhibits TREM-1, dampened this LPS-induced TREM-1 upregulation. To confirm these results, TREM-1 expression was monitored by flow cytometry (**Figure 1B,C**). LPS stimulation induced a time-dependent increase of the percentage of TREM-1⁺ cells as well as their level of expression (mean fluorescence intensity), which was again modulated by LR12.

To get insights on the localization of TREM-1 in HPMEC, we stained these cells for TREM-1, Von Willebrand factor and TO-PRO3 (**Figure 1D**). TREM-1 was not observed in resting cells (upper panel). LPS stimulation induced TREM-1 expression that seemed to co-localize with the Von Willebrand factor in HPMEC (lower panel).

Using three different techniques we thus demonstrated that TREM-1 is expressed in human microvascular endothelial cells upon LPS stimulation.

TREM-1 is expressed by vascular endothelium

To confirm the expression of TREM-1 by endothelial cells, we studied its expression by qRT-PCR in isolated mouse aortas and mesenteric arteries stimulated with LPS for 6 hours. *Trem-1* expression was very low in resting condition and sharply increased upon LPS stimulation both in aortas (**Figure 2A**) and mesenteric arteries (**Figure 2B**). Interestingly, *Trem-1* became undetectable after endothelium removal (**Figure 2A**). Confocal imaging of aortas confirmed this LPS-induced TREM-1 upregulation (**Figure 2E**). The same findings were observed during septic shock induced by caecal ligation and puncture: Trem-1 was over-expressed in aortas and mesenteric arteries harvested 18 hours after the onset of sepsis (**Figure 2C,D**). LR12 injection 2 hours after the surgery prevented from this up-regulation.

Confocal microscopy of the lung vasculature reveals that the expression of TREM-1 was low in healthy animals while strongly increased during septic shock (**Figure 2F**).

TREM-1 is therefore expressed by the vascular endothelium following acute septic insult.

TREM-1 modulation inhibits LPS-induced vascular dysfunction

We next examined the function of endothelial TREM-1. Aortas from healthy wild-type mice were harvested and vascular reactivity assessed. As expected, incubation of aortas' rings with LPS severely impaired both contractility and endothelium-dependent relaxation (**Figure 3A**). Co-incubation with LR12 almost completely restored vasoreactivity. By contrast, TREM-1 activation induced by an anti-TREM-1 agonistic monoclonal antibody (α TREM-1) decreased contractility and relaxation to the same extent of that obtained with LPS. Similar results were observed on mesenteric arteries (not shown). As shown in Figure 2, although TREM-1 is very low in resting vessels, its expression is not null and therefore sufficient for its engagement by anti-TREM-1 antibody. Of note, we used a control isotypic antibody that showed no effect on vasoreactivity.

These data suggest that TREM-1 engagement (either induced by LPS or by agonistic mAb) impairs vascular reactivity.

To evaluate the effects of LR12 on LPS-stimulated HPMEC, the production of NO, s-ICAM-1, s-E-selectin and IL-6 was examined. LPS induced an increased production of NO, s-ICAM-1, s-E-selectin and IL-6 that was partially reduced by LR12 (**Figure 3B-E**). Using PCR-array (84 innate immune response genes) we observed that LR12 impacted the expression of 28 genes with a fold change superior > 4 as compared to LPS alone (**Supplementary Figure 1**).

A kinetic analysis of protein expression in HPMEC by western blot revealed an increase phosphorylation of ERK1/2, p38 and p65 and an increased expression of COX-2 upon LPS stimulation that was again reduced by LR12 (**Figure 3F**).

Beyond being responsible for maintaining vascular reactivity, endothelium is involved in leukocyte trafficking. We thus performed cell–cell adhesion assays under flux to address the role of TREM-1 on leukocyte adhesion to the endothelium. We used two different monocytic cell lines: U937 that express TREM-1 at a very low level and U937-TD that over-express TREM-1.²⁵ While few U937 adhered to unstimulated endothelial cells, TNF α increased the number of adherent monocytes (**Figure 3G**). Monocytes adhesion was exaggerated when using U937-TD cells. This approach revealed that TREM-1 over-expression on U937 favors adhesion to endothelial cells.

Altogether, these findings point to a role of TREM-1 in endothelium activation and vascular reactivity.

TREM-1 inhibition protects mice from vascular dysfunction induced by septic shock

We studied the effect of LR12 on vascular reactivity during CLP-induced septic shock. The contractile response to phenylephrine in aortic and mesenteric vessels as well as the endothelium-dependent relaxation induced by acetylcholine were significantly altered in septic mice as compared to control animals (**Figure 4A**). This vascular dysfunction was abrogated in LR12 treated mice.

Septic shock was responsible for a massive vascular inflammatory response as witnessed by the overexpression of both pro- and anti-inflammatory genes (*Tnfa*, *Il-10* and *Il-6*) in aortas and mesenteric arteries (**Figure 4B,C**). This inflammation was largely reduced in LR12-treated mice.

During septic shock, the existence of an impaired synthesis and production of some constitutive proteins and an overexpression of inducible proteins has been demonstrated. The two most important signaling pathways are the NOS and COX pathways.²⁸ In the CLP group, a decreased expression of p-Akt and COX-1 was observed relative to the control animals. LR12 administration restored the expression of these two proteins (**Figure 4D,E**). In parallel, we quantified the expression of inducible proteins (iNOS, COX-2). CLP induced an increase expression of these proteins, and this phenomenon was attenuated by LR12.

Pharmacological inhibition of TREM-1 is thus able to prevent from septic shock induced vascular inflammation and dysfunction.

Targeted endothelial *Trem-1* deletion protects mice from septic shock

Septic shock was induced by CLP in endothelium-conditional *Trem-1* deficient mice (EndoTREM-1^{-/-}) and WT littermates. As expected, sepsis induced a profound vascular hyporeactivity in WT animals, both in terms of contractility and endothelium-dependent relaxation (**Figure 5A**). Although contractility was still impaired in EndoTREM-1^{-/-} mice, vasorelaxation was completely restored, pointing to a role of endothelial TREM-1 in vascular relaxation.

Soluble TREM-1 concentrations, a marker of TREM-1 activation, were markedly increased in the plasma, the peritoneal lavage fluid and the lungs from WT septic compared to sham-operated animals (control). In EndoTREM-1^{-/-} mice, sTREM-1 level was reduced, pointing to endothelial cells as a major source of TREM-1 (**Figure 5B,E,H**). Plasma concentrations of

soluble VCAM-1 and IL-6 were also reduced in EndoTREM1^{-/-} animals (**Figure 5C,D**). Finally, survival was clearly improved in the EndoTrem1^{-/-} group as compared to the WT group (**Figure 5I**).

Using PCR-arrays, we found that the sepsis induced alteration of many inflammatory genes in the lungs was dampened in EndoTREM-1^{-/-} mice (**Supplementary Table 1**), mostly at 24 hours after CLP.

We finally examined whether the modulation of inflammation could be explained by a reduction of the number of inflammatory infiltrating cells in the lungs, spleen, and PLF (**Figure 6**). In the lung, the most commonly organ reported to be involved during sepsis,²⁹ we observed an accumulation of neutrophils and inflammatory Ly6C^{high} monocytes at 24 hours in WT septic mice. This accumulation was dampened in EndoTrem1^{-/-} mice suggesting that blocking endothelial *Trem-1* reduced monocytes and neutrophil mobilization to the lung. By contrast, endothelial *Trem-1* deletion favored the accumulation of reparative cells (Ly6C^{low} monocytes). Although spleen infiltration by myeloid cells was reduced in EndoTrem1^{-/-} mice, the peritoneal cavity was rapidly populated with monocytes, suggesting a role of endothelial TREM-1 in regulating leukocytes trafficking.

All in all, targeted endothelial *Trem-1* deletion confers protection during septic shock in modulating inflammatory cells mobilization and activation, in restoring vasoreactivity, and in improving the survival.

DISCUSSION

The TREM family encompasses at least 5 different receptors sharing low sequence homology with each other. Among them, TREM-1 is expressed on the surface of neutrophils, mature monocytes, macrophages and hypoxic dendritic cells, and plays a major role in the pathophysiology of inflammation-associated disorders.¹² During various models of sepsis, we observed that the TREM-1 inhibition, in addition to reducing inflammation and improving survival, prevented from hemodynamic instability.^{19,20}

Indeed, vascular hyporeactivity is the hallmark of septic shock and is attributed to endothelial dysfunction.^{4,8} Although TREM-1 has first been described on myeloid cells, several studies support its presence in nonprofessional immune cells such as epithelial cells or platelets.^{10,15,16} We here showed that TREM-1 is also expressed on endothelial cells (ECs) especially after LPS stimulation. These results are in line with those of Laskin *et al* who were the first to suggest a TREM-1 expression in mouse liver ECs, which was upregulated upon stimulation with LPS, TNF α , or IL-1 β .^{30,31} We further extended these findings in showing the TREM-1 is fully functional at the endothelial level both in mice and humans.

A crucial role of the endothelium is to regulate the vasomotor tone: we observed that TREM-1 activation compromised both contractility and relaxation and that this alteration was abrogated with LR12, a clinical-range TREM-1 inhibitory peptide^{20,22,24}, both *in vitro* and *in vivo*. Nitric oxide (NO) overproduction by activated ECs has been pointed to be responsible for the vascular hyporeactivity. As such, we found that TREM-1 inhibition reduced NO production by ECs as well as inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in septic mice. Moreover, the sepsis induced vascular inflammation was also largely decreased in LR12 treated animals. The LR12 peptide does not bind to TREM-1 but prevents ligation of the TREM-1 ligand and then specifically inhibits TREM-1²⁶. Indeed, LPS activates TLR4 that in turn leads to TREM-1 up-regulation, clustering and multimerization, and the generation of TREM-1 ligand(s) that binds TREM-1, further amplifying the inflammatory response (**Figure 7**). Hence, LR12 by acting as a decoy receptor for TREM-1 ligand(s), abrogates this amplification loop, without interfering with the initial response.

However, despite several candidates, the nature of the TREM-1 ligand remains largely speculative and this precludes precise analysis of LR12-TREM-1 ligand interactions¹⁸.

A limitation of the use of TREM-1 inhibitory peptides such as LR12 is that the 'endothelio-protective' effect observed *in vivo* may just be the result of a decrease of systemic

inflammation and inflammatory cells activation: it has repeatedly been shown that pharmacologic inhibition or genetic deletion of TREM-1 prevented from hyper-responsiveness and death during acute inflammatory diseases.^{21-23,31} To get rid of this concern we generated endothelial-conditional *Trem-1* ko (EndoTrem1^{-/-}) mice whose non-ECs normally express TREM-1. Using these animals, we clearly found that deletion of *Trem-1* in ECs protected from sepsis induced vascular dysfunction, inflammation, and modulated leukocyte trafficking. Finally, survival was strikingly improved in septic EndoTrem1^{-/-} mice as compared to WT littermates. This pointed to a clear role of endothelial TREM-1 in mediating many of the deleterious aspects of septic shock. However, we did not monitor blood pressure, nor investigate organ dysfunction in our septic shock model and thus cannot ascertain whether the beneficial effects conferred by endothelial Trem-1 deletion were mostly related to hemodynamic improvement, organ protection or both. Nevertheless, we previously showed both in septic shock pigs and endotoxemic monkeys that LR12 administration prevented from blood pressure decrease^{19,20}.

Beyond adding to the knowledge of sepsis physiology and TREM-1 biology, this study may have clinical implications. Indeed, the LR12 peptide is under clinical development (www.clinicaltrials.gov, NCT03158948) for septic shock. A concern that may arise for the broad inhibition of TREM-1 with LR12 is that it could compromise several important functions of TREM-1 such as bacterial clearance or myeloid cells survival. As such, the design of endothelium-specific TREM-1 inhibitors may prove interesting in preventing endothelial dysfunction while preserving myeloid cells functionality.

We reported that TREM-1 is expressed and inducible in endothelial cells and plays a direct role in vascular inflammation and dysfunction. The targeted deletion of endothelial *Trem-1* conferred protection during septic shock in modulating inflammatory cells mobilization and activation, restoring vasoreactivity and improving survival. Targeting mechanisms responsible for endothelial dysfunction that occurs during acute inflammatory disorders could be a great interest in the management of critically ill patients.

FUNDING

This work was supported by INSERM and INOTREM SA

CONFLICT OF INTERESTS

Marc Derive and Sébastien Gibot are co-founders of INOTREM SA, a company developing TREM-1 inhibitors.

REFERENCES

1. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche J-D, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, Poll T van der, Vincent J-L, Angus DC. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016;**315**:801–810.
2. Poll T van der, Veerdonk FL van de, Scicluna BP, Netea MG. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nat Rev Immunol* 2017;**17**:407–420.
3. Levi M, Poll T van der. Coagulation and sepsis. *Thromb Res* 2017;**149**:38–44.
4. 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* 2010;**36**:1286–1298.
5. Skibsted S, Jones AE, Puskarich MA, Arnold R, Sherwin R, Trzeciak S, Schuetz P, Aird WC, Shapiro NI. Biomarkers of endothelial cell activation in early sepsis. *Shock Augusta Ga* 2013;**39**:427–432.
6. Vallet B, Wiel E. Endothelial cell dysfunction and coagulation. *Crit Care Med* 2001;**29**:S36-41.
7. Volk T, Kox WJ. Endothelium function in sepsis. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc AI* 2000;**49**:185–198.
8. Opal SM, Poll T van der. Endothelial barrier dysfunction in septic shock. *J Intern Med* 2015;**277**:277–293.
9. Rudiger A, Singer M. Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction. *Crit Care Med* 2007;**35**:1599–1608.
10. Bouchon A, Dietrich J, Colonna M. Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *J Immunol Baltim Md 1950* 2000;**164**:4991–4995.
11. Bouchon A, Facchetti F, Weigand MA, Colonna M. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature* 2001;**410**:1103–1107.
12. Klesney-Tait J, Turnbull IR, Colonna M. The TREM receptor family and signal integration. *Nat Immunol* 2006;**7**:1266-1273.
13. Allcock RJN, Barrow AD, Forbes S, Beck S, Trowsdale J. The human TREM gene cluster at 6p21.1 encodes both activating and inhibitory single IgV domain receptors and includes NKp44. *Eur J Immunol* 2003;**33**:567–577.
14. Matesanz-Isabel J, Sintes J, Llinàs L, Salort J de, Lázaro A, Engel P. New B-cell CD molecules. *Immunol Lett* 2011;**134**:104–112.

15. Rigo I, McMahon L, Dhawan P, Christakos S, Yim S, Ryan LK, Diamond G. Induction of triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM-1) in airway epithelial cells by 1,25(OH)₂ vitamin D₃. *Innate Immun* 2012;**18**:250–257.
16. Jolly L, Lemarié J, Carrasco K, Popovic B, Derive M, Boufenzer A, Gibot S. Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1: a new player in platelet aggregation. *Thromb Haemost* 2017;**117**:1772-1781.
17. Ornotowska M, Azim AC, Wang X, Christman JW, Xiao L, Joo M, Sadikot RT. Functional genomics of silencing TREM-1 on TLR4 signaling in macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;**293**:L1377-L1384.
18. Tammaro A, Derive M, Gibot S, Leemans JC, Florquin S, Dessing MC. TREM-1 and its potential ligands in non-infectious diseases: from biology to clinical perspectives. *Pharmacol Ther* 2017;**177**:81-95.
19. Derive M, Boufenzer A, Bouazza Y, Groubatch F, Alauzet C, Barraud D, Lozniewski A, Leroy P, Tran N, Gibot S. Effects of a TREM-like transcript 1-derived peptide during hypodynamic septic shock in pigs. *Shock Augusta Ga* 2013;**39**:176–182.
20. Derive M, Boufenzer A, Gibot S. Attenuation of responses to endotoxin by the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 inhibitor LR12 in nonhuman primate. *Anesthesiology* 2014;**120**:935–942.
21. Gibot S, Kolopp-Sarda M-N, Béné M-C, Bollaert P-E, Lozniewski A, Mory F, Levy B, Faure GC. A soluble form of the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 modulates the inflammatory response in murine sepsis. *J Exp Med* 2004;**200**:1419–1426.
22. Boufenzer A, Lemarié J, Simon T, Derive M, Bouazza Y, Tran N, Maskali F, Groubatch F, Bonnin P, Bastien C, Bruneval P, Marie P-Y, Cohen R, Danchin N, Silvestre J-S, Ait-Oufella H, Gibot S. TREM-1 Mediates Inflammatory Injury and Cardiac Remodeling Following Myocardial Infarction. *Circ Res* 2015;**116**:1772–1782.
23. Lemarié J, Boufenzer A, Popovic B, Tran N, Groubatch F, Derive M, Labroca P, Barraud D, Gibot S. Pharmacological inhibition of the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 limits reperfusion injury in a porcine model of myocardial infarction. *ESC Heart Fail* 2015;**2**:90–99.
24. Joffre J, Potteaux S, Zeboudj L, Loyer X, Boufenzer A, Laurans L, Esposito B, Vandestienne M, Jager SCA de, Hénique C, Zlatanova I, Taleb S, Bruneval P, Tedgui A, Mallat Z, Gibot S, Ait-Oufella H. Genetic and Pharmacological Inhibition of TREM-1 Limits the Development of Experimental Atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2016;**68**:2776–2793.
24. Zysset D, Weber B, Rihs S, Brasseit J, Freigang S, Riether C, Banz Y, Cerwenka A, Simillion C, Marques-Vidal P, Ochsenein AF, Saurer L, Mueller C. TREM-1 links dyslipidemia to inflammation and lipid deposition in atherosclerosis. *Nat Commun* 2016;**7**:13151.

25. Tessarz AS, Weiler S, Zanzinger K, Angelisová P, Horejsí V, Cerwenka A. Non-T cell activation linker (NTAL) negatively regulates TREM-1/DAP12-induced inflammatory cytokine production in myeloid cells. *J Immunol Baltim Md 1950* 2007;**178**:1991–1999.
26. Derive M, Bouazza Y, Sennoun N, Marchionni S, Quigley L, Washington V, Massin F, Max JP, Ford J, Alauzet C, Levy B, McVicar DW, Gibot S. Soluble TREM-like transcript-1 regulates leukocyte activation and controls microbial sepsis. *J immunol* 2012;**88**:5585-5592.
27. Stoclet JC, Martínez MC, Ohlmann P, Chasserot S, Schott C, Kleschyov AL, Schneider F, Andriantsitohaina R. Induction of nitric oxide synthase and dual effects of nitric oxide and cyclooxygenase products in regulation of arterial contraction in human septic shock. *Circulation* 1999;**100**:107–112.
28. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001;**29**:1303–1310.
29. Chen LC, Laskin JD, Gordon MK, Laskin DL. Regulation of TREM expression in hepatic macrophages and endothelial cells during acute endotoxemia. *Exp Mol Pathol* 2008;**84**:145-155.
30. Laskin DL, Chen L, Hankey PA, Laskin JD. Role of STK in mouse liver macrophage and endothelial cell responsiveness during acute endotoxemia. *J Leukoc Biol* 2010;**88**:373-382.
31. Weber B, Schuster S, Zysset D, Rihs S, Dickgreber N, Schürch C, Riether C, Siegrist M, Schneider C, Pawelski H, Gurzeler U, Ziltener P, Genitsch V, Tacchini-Cottier F, Ochsenbein A, Hofstetter W, Kopf M, Kaufmann T, Oxenius A, Reith W, Saurer L, Mueller C. TREM-1 deficiency can attenuate disease severity without affecting pathogen clearance. *PLoS Pathog* 2014;**10**:e1003900.

LEGENDS

Figure 1: Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) is expressed by human pulmonary microvascular endothelial cells (HPMEC).

(A) Time course of *Trem-1* mRNA expression determined by real-time qPCR in HPMEC upon LPS or LPS+LR12 stimulation. # $P < 0.001$ control vs LPS; * $P < 0.001$ LPS vs LPS + LR12, $n = 5$ per group (Two-way ANOVA). **(B)** Flow cytometry analysis of TREM-1 expression in HPMEC upon LPS or LPS+LR12 stimulation at the indicated times. Percentage of positive TREM-1 cells (left panel) or TREM-1 expression (in mean fluorescence intensity) fold increase vs control (right panel). # $P < 0.001$ control vs LPS; * $P < 0.005$ LPS vs LPS + LR12, $n = 3$ per group (Two-way ANOVA). **(C)** Histograms of TREM-1 expression in HPMEC after 3, 6, or 12 hours stimulation or not with LPS or LPS+LR12. Images are representative from 3 different experiments.

(D) Confocal fluorescent images of resting HPMEC (top panels) or LPS (10 μ g/mL, 24 hours) stimulated HPMEC (bottom panels). Cells were stained with anti-human TREM-1 (green), vWF (red) and TO-PRO3 (blue) mAbs, Scale bars: 50 μ m. Images are representative from 3 different experiments.

Figure 2: Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) is expressed by vascular endothelium.

Aortic **(A)** or mesenteric **(B)** rings from healthy mice were sampled, cleaned and stimulated with LPS (10 μ g/mL for 24 hours). Endothelium was removed by scrapping and flushing (-Endo) or not (+Endo) in aorta and *Trem-1* mRNA expression was determined by real-time qPCR. *** $P < 0.005$, $n = 5$ per group (t-test). **(C-D)** Quantification of *Trem-1* gene expression in aortas **(C)** or mesenteric arteries **(D)** from control (black), septic (CLP) (grey) and LR12-treated (5mg/kg i.p. one hour after CLP) septic mice (CLP LR12) (orange). Vessels were harvested 24 hours after the surgery. ** $P < 0.0001$, $n = 6$ per group (One-way ANOVA). **(E)** Aorta from healthy mice were sampled, cleaned and stimulated with LPS (10 μ g/mL for 24 hours). Confocal fluorescent images of unstimulated (control) (top panels) or LPS stimulated (bottom panels) aortas stained with anti-human TREM-1 (red) and TO-PRO3 (blue) mAbs. Scale bars: 50 μ m. Images are representative from 3 different experiments.

(F) Confocal fluorescent images of the lungs from control (top panels) or septic (CLP) mice (bottom panels). Lungs were harvested 24 hours after surgery and stained with anti-human TREM-1 (green), Cadherin5 (red) and TO-PRO3 (blue) mAbs. Scale bars: 50 μ m.

Figure 3: Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) modulation inhibits LPS-induced vascular dysfunction.

(A) Aortic rings from healthy mice were sampled, cleaned and stimulated with LPS (10 μ g/mL), agonistic anti-TREM-1 antibody (α TREM-1) (5 μ g/mL), or LR12 (20 μ g/mL) during 4h. Concentration response curves to phenylephrine (Phe) (left panel) and to acetylcholine (Ach) (right panel) in aortas from the different group. *P< 0.05, **P<0.01, *** P<.005, n=5 per group (Two-way ANOVA). **(B)** The levels of intracellular NO production were determined in HPMEC after 24h of stimulation (LPS 10 μ g/mL +/- LR12 20 μ g/mL) by FACS using DAF-FM diacetate. *P< 0.05, ***P=0.0002, n=3 per condition (One-way ANOVA). ELISA quantifications of s-ICAM-1 **(C)**, s-Eselectin **(D)** and IL-6 **(E)** after 24h of stimulation in HPMEC supernatants. *** P<.005, ****P<0.0001, n=6 per conditions (t-test). **(F)** Western blot of lysates of HPMEC treated for 3, 10, 30, and 60 min with LPS 10 μ g/mL +/- LR12 20 μ g/mL and their densitometric quantification (AU: Arbitrary Units). *P< 0.05, **P<0.01, *** P<.005, n=3 per condition (Two-way ANOVA). **(G)** U937 or U937-TD cells adhesion to HPMEC under flux at a constant shear stress of 0.5 dyne-cm⁻² for 3min. HPMEC were stimulated with TNF α (10ng/mL) or not for 2 h. Cell images of 3 microscopic fields from each channel were captured, and number of adhering cells analyzed. *P< 0.05, n=3 per condition (t-test).

Figure 4: Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) inhibition protects mice from vascular dysfunction induced by septic shock.

(A) Concentration response curves to phenylephrine (Phe) (top panels) and to acetylcholine (Ach) (bottom panels) in aortas and mesenteric arteries from control (black), septic (CLP) (grey) and LR12-treated (5mg/kg i.p. one hour after CLP) septic mice (CLP LR12) (orange). Vessels were harvested 24 hours after the surgery. *P< 0.05, **P<0.01, *** P<.005, n=7-9 per group (Two-way ANOVA analysis). Quantification of *Tnfa*, *Il-10* and *Il-6* gene expression in aortas **(B)** or mesenteric arteries **(C)** from the three groups of mice. **P<0.0001, n=6 per group (One-way ANOVA). Western blots of (p)-AKT, iNOS, COX-1 and COX-2 of aorta **(D)** and mesenteric arteries **(E)** from the three groups of mice and their densitometric quantification (AU: Arbitrary Units). *P= 0.001, ** P<.0001, n=6 per group (One-way ANOVA).

Figure 5: Targeted endothelial *Trem-1* deletion ('EndoTrem-1^{-/-}') protects mice from septic shock.

(A) Concentration response curves to phenylephrine (Phe) (top panels) and to acetylcholine (Ach) (bottom panels) in aortas and mesenteric arteries from control (black), WT CLP (grey) and EndoTrem-1^{-/-} CLP (blue) mice. Vessels were harvested 24 hours after the surgery. *P< 0.05, **P<0.01, n=7-9 per group (Two-way ANOVA analysis). **(B-H)** ELISA quantifications of sTREM-1, sVCAM-1 and IL-6 in plasma, lung and peritoneal lavage fluid (PLF) in WT CLP and EndoTrem-1^{-/-} CLP mice at the indicated times. *P< 0.05, **P<0.001, n=6 per group (One-way ANOVA). **(I)** Kaplan–Meier estimate of survival after CLP in WT and EndoTrem-1^{-/-} mice (n=12–15 per group). Survival curves are compared using the log-rank test. ***P=0.0006 WT vs EndoTrem-1^{-/-}.

Figure 6: Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) regulates leukocytes mobilization from remote compartments.

Flow-cytometric quantification of monocytes (Ly6C^{High} and Ly6C^{Low}) and neutrophils in the lung **(A)**, spleen **(B)**, and peritoneal lavage fluid (PLF) **(C)** at different time points after CLP. *P< 0.05, **P<0.01 WT vs EndoTrem-1^{-/-}, n=6 per group (Two-way ANOVA analysis).

Figure 7: Schematic representation of TLR4-TREM-1 relationship

Lipopolysaccharide binds to TLR4 and triggers the activation and translocation of the transcription factor into the nucleus where it induces the transcription of several pro-inflammatory, including *Trem-1*. This yields to a TREM-1 up-regulation, clusterization and multimerization. After ligation of its ligand, TREM-1 associates with the adaptor molecule DAP12 (that possesses an ITAM motif), leading to phosphorylation of a panel of downstream kinases that in turn activate NF-κB and amplify the inflammatory response. The LR12 peptide, by trapping TREM-1 ligand(s), inhibits TREM-1 engagement and therefore modulates this amplification loop.

Figure 1

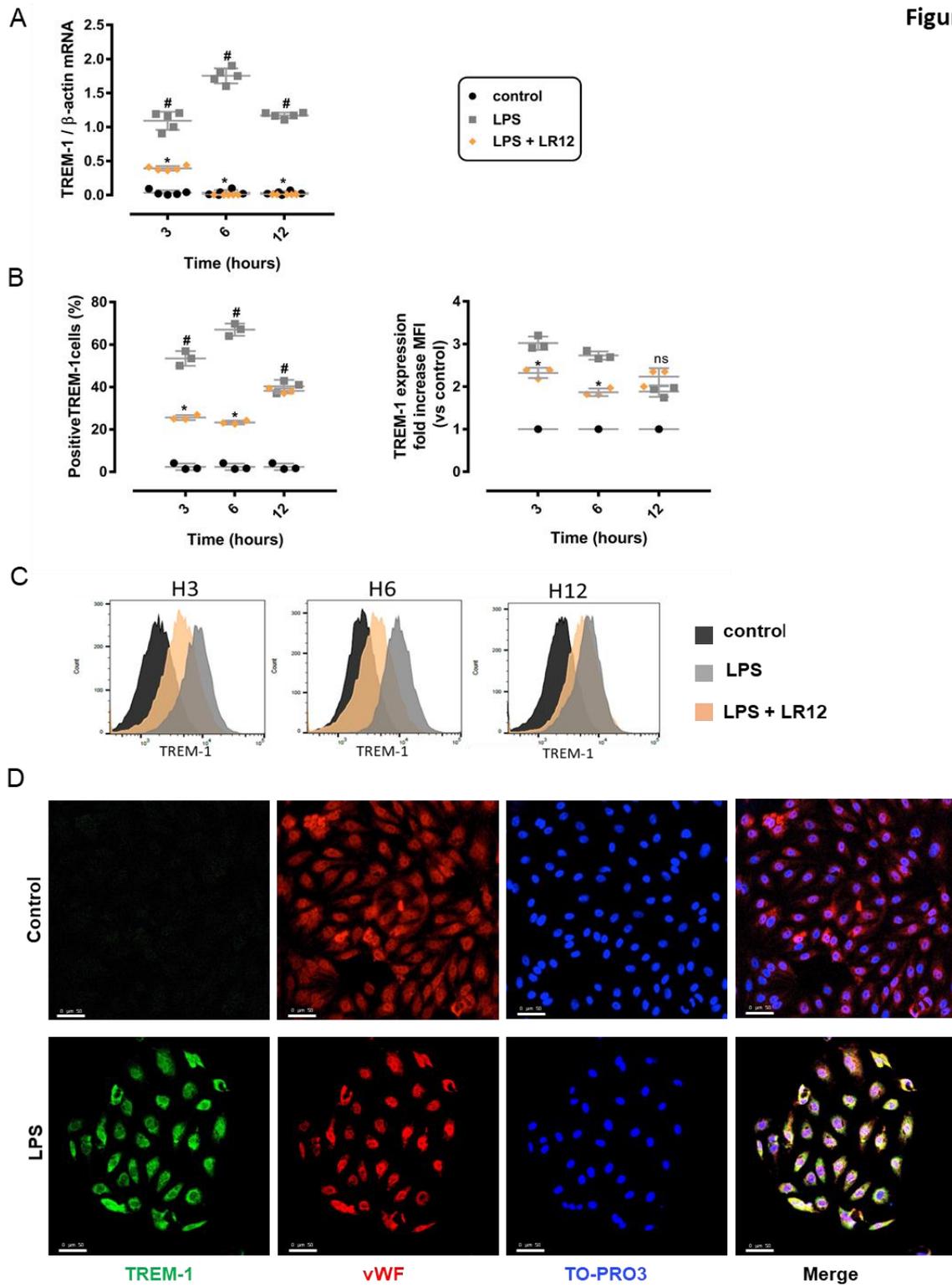


Figure 2

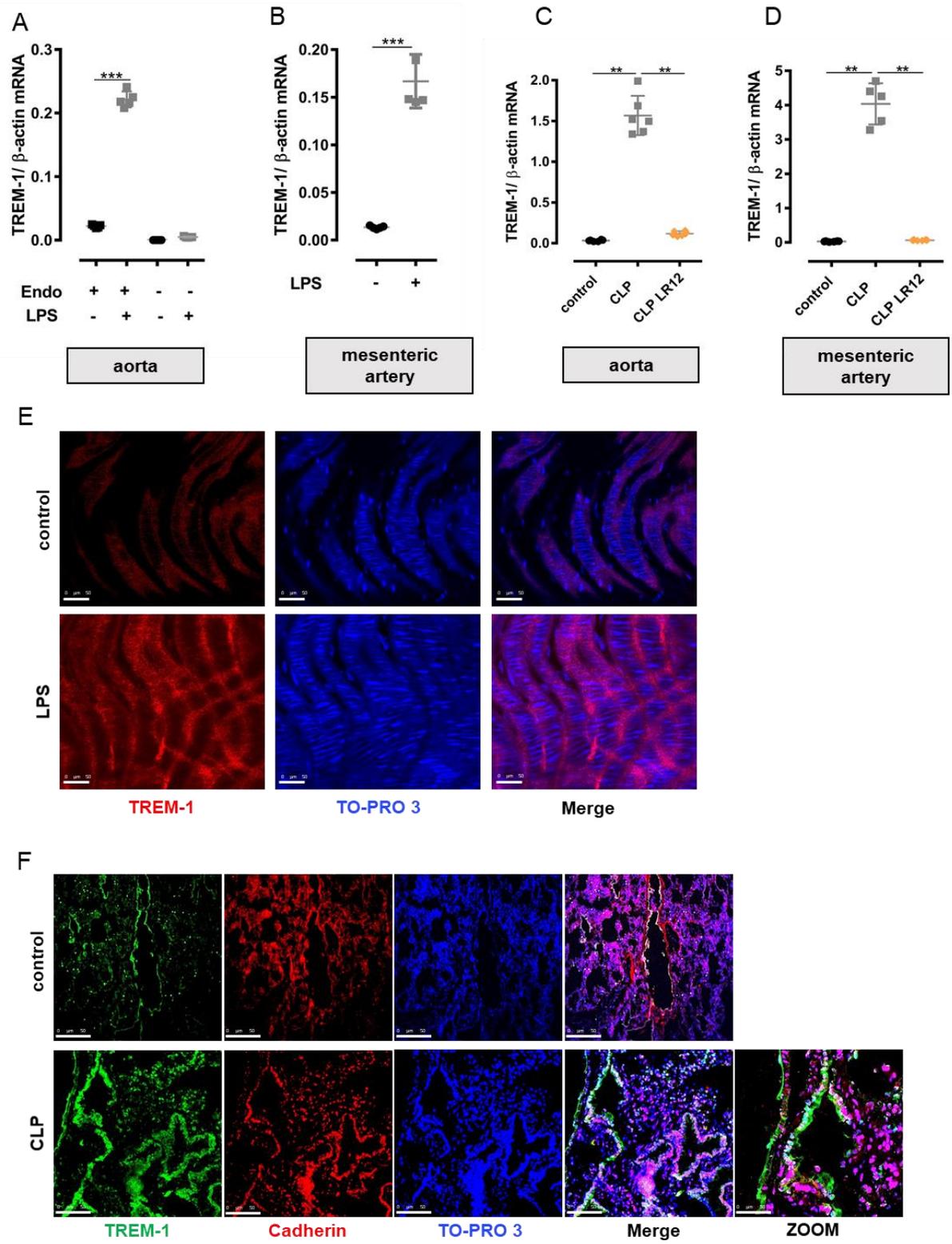


Figure 3

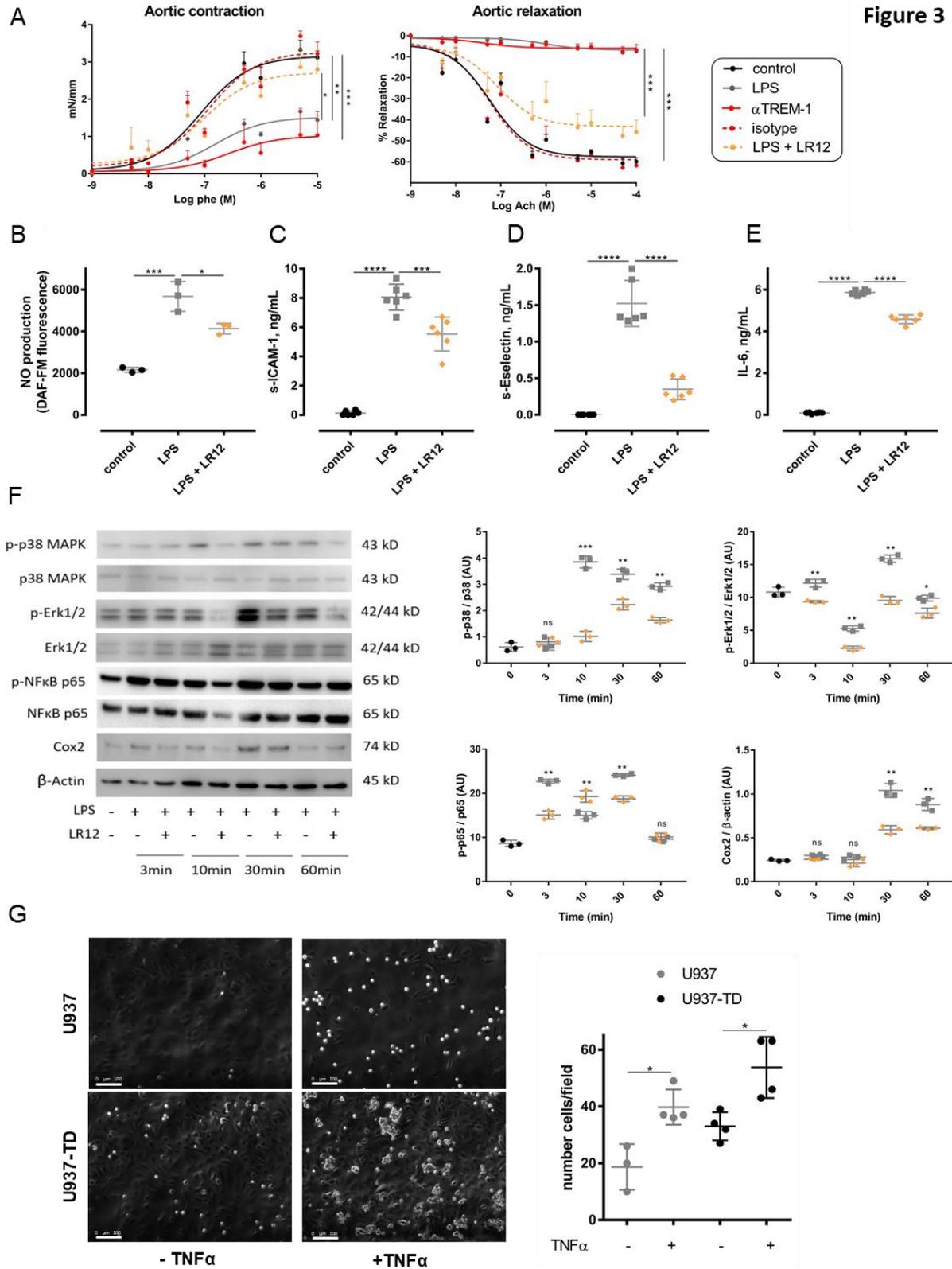


Figure 4

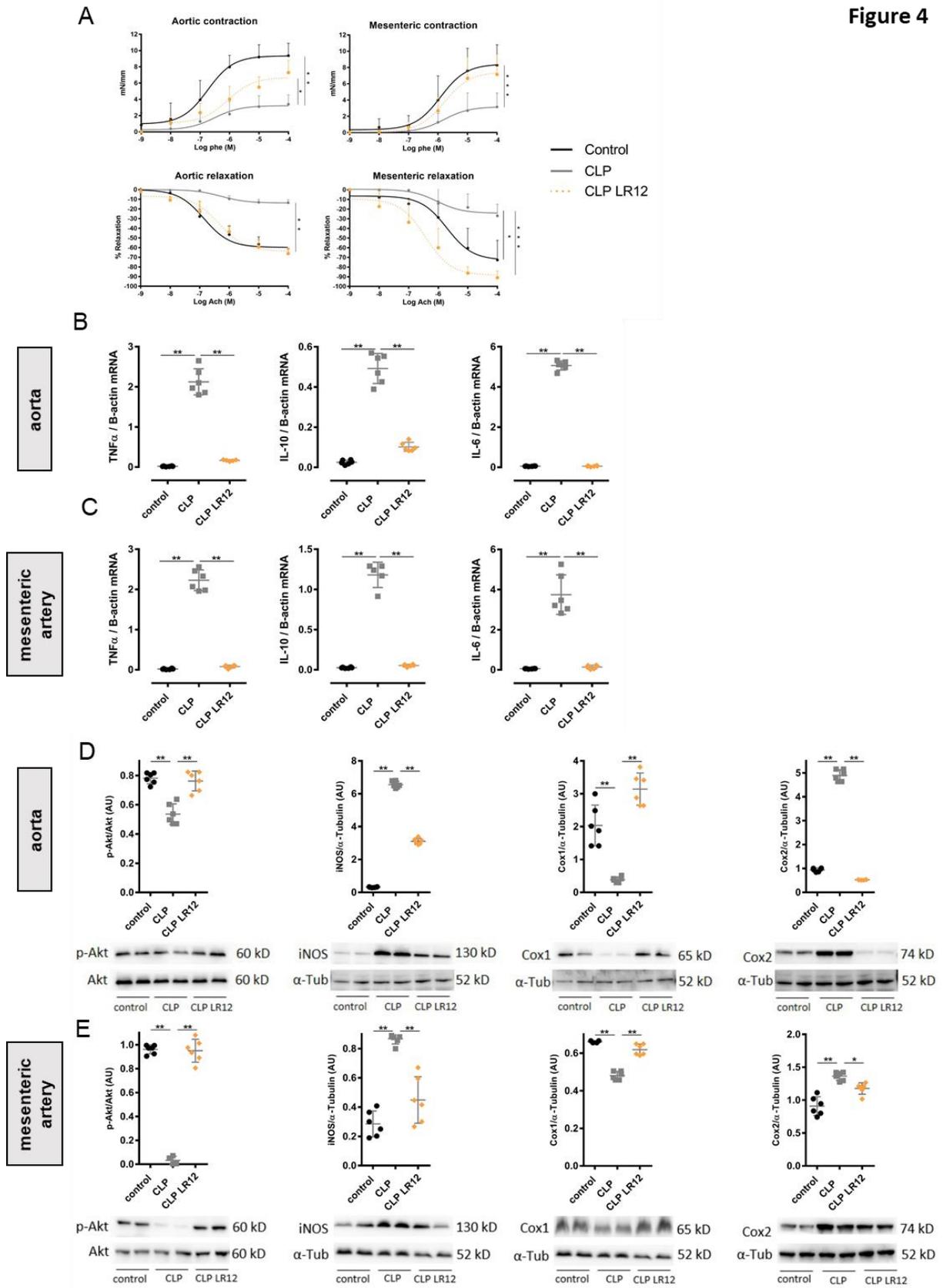


Figure 5

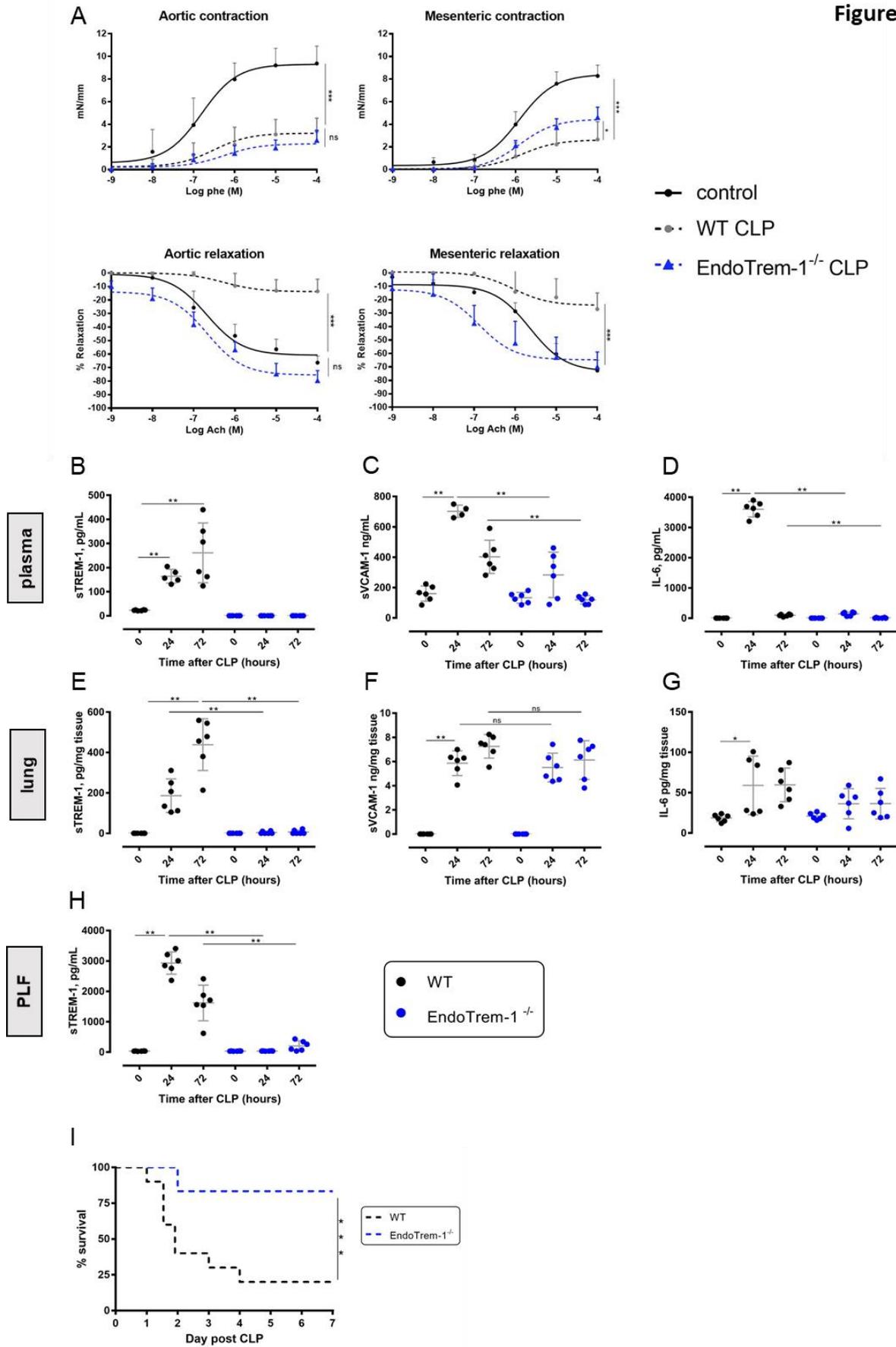


Figure 6

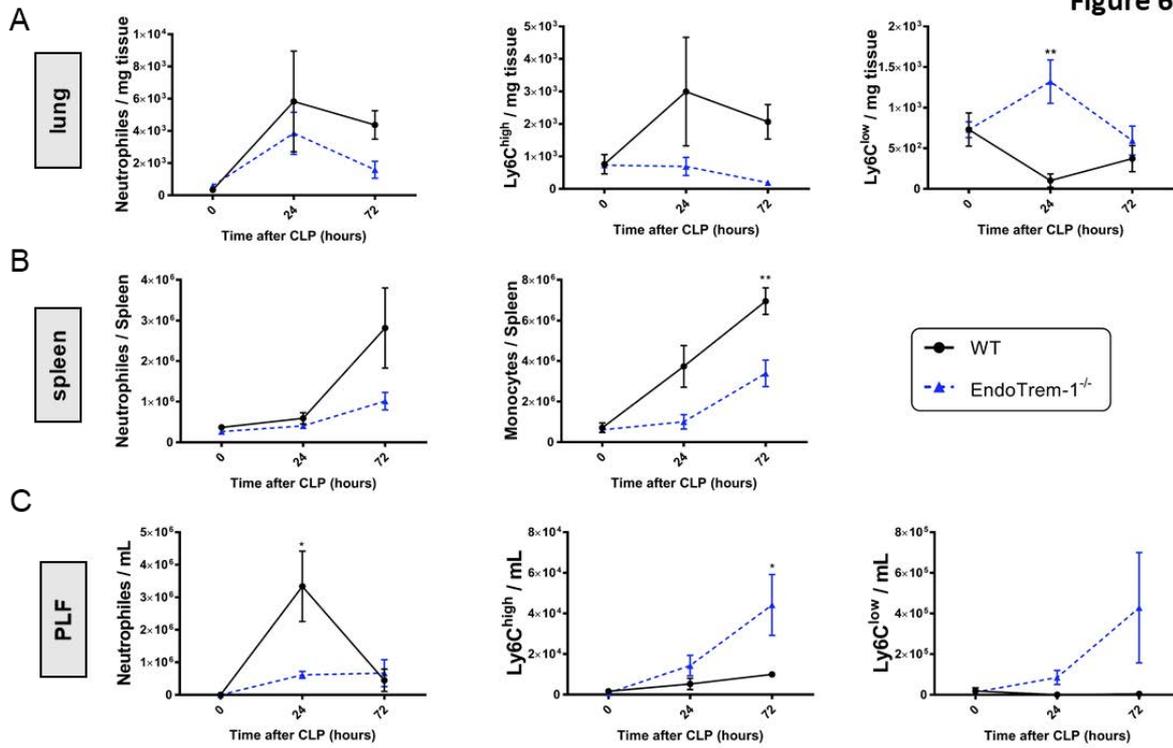
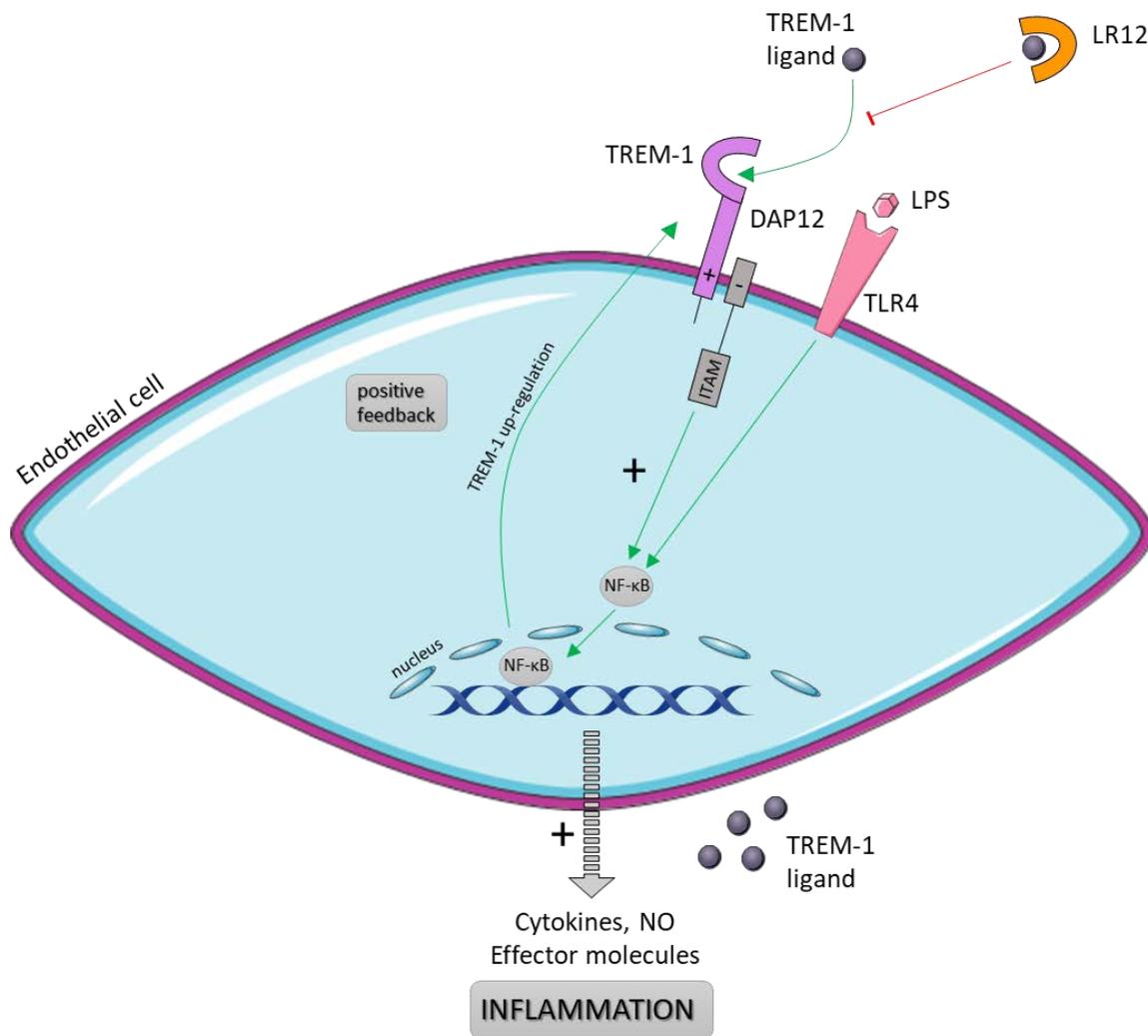
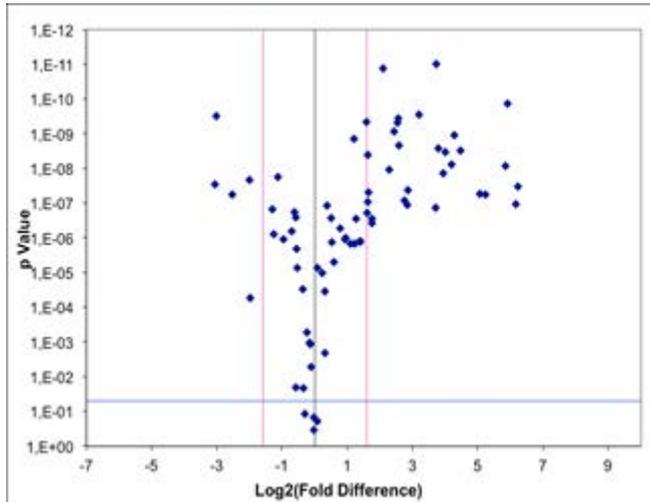


Figure 7



SUPPLEMENTARY FIGURE 1



Volcano plot representation of differentially expressed genes by mouse lung microvascular endothelial cells stimulated for 12 hours with or without LR12.

Genes with a fold change > 4 are shown in the table

Volcano Plot		
Symbol	Log ₂ (FC) LPS/ LPS+LR12	p Value
Adam17	3,79	2,7E-09
Agtr1a	3,95	1,4E-08
Bax	2,76	8,3E-08
Bcl2l1	3,72	1,3E-07
Birc2	4,01	3,4E-09
Cxcr5	3,72	1,0E-11
Casp3	-3,02	3,1E-10
Casp6	2,86	4,3E-08
Ccl5	3,20	2,9E-10
Cflar	2,54	4,9E-10
Cradd	4,20	7,9E-09
Csf2	6,24	3,4E-08
Edn1	2,43	8,7E-10
Fgf1	-2,53	5,8E-08
Il1b	4,47	3,1E-09
Il6	-3,06	2,9E-08
Kit	5,06	5,5E-08
Mmp9	5,24	5,9E-08
Nos2	4,27	1,1E-09
Pecam1	2,11	1,3E-11
Sell	6,17	1,1E-07
Selplg	5,91	1,4E-10
Sod1	2,30	1,1E-08
Tgfb1	2,59	2,2E-09
Tnf	5,86	8,6E-09
Tnfaip3	2,84	1,1E-07
Vcam1	-2,00	2,2E-08
Vwf	2,57	3,6E-10

SUPPLEMENTARY TABLE 1:

Gene expression by PCR-array in the lungs of septic (CLP) WT littermates and endothelium conditional Trem-1 ko (EndoTrem-1^{-/-}) mice 24 and 72 hours after the onset of sepsis. n=3 per condition.

Gene Symbol	2 ^Δ Ct		Fold Change	t-TEST	2 ^Δ Ct		Fold Change	t-TEST
	CLP H24	EndoTrem-1 ^{-/-} H24			CLP H72	EndoTrem-1 ^{-/-} H72		
Ace	2,97E+00	1,81E-02	-163,87	<0.0001	6,17E-02	2,08E-01	3,37	ns
Adam17	3,25E-01	2,19E-02	-14,83	<0.0001	6,27E-03	5,12E-02	8,16	ns
Agt	1,72E-01	1,24E-02	-13,86	<0.0001	2,16E-03	9,94E-03	4,61	ns
Agtr1a	3,51E-01	2,14E-02	-16,44	<0.0001	5,35E-02	7,27E-02	1,36	ns
Angpt1	4,15E-01	2,55E-02	-16,31	<0.0001	5,80E-02	3,83E-03	-15,13	ns
Anxa5	6,28E+00	4,02E-02	-156,19	<0.0001	1,45E-01	5,42E-01	-3,74	ns
Apcs	1,62E+01	1,62E-01	-99,89	0.0025	7,88E-01	8,72E-03	-90,33	<0.0001
Bax	2,11E-01	1,80E-02	-11,73	<0.0001	5,53E-03	4,19E-02	7,58	ns
Bcl2	2,41E-01	1,99E-02	-12,13	ns	5,13E-03	3,71E-02	7,24	ns
Bcl2l1	4,76E-01	2,30E-02	-20,74	<0.0001	1,10E-02	7,02E-02	6,39	ns
C3	1,72E+01	2,61E-01	-65,98	0,034	5,90E-01	8,83E-02	-6,68	ns
C5ar1	3,28E+01	1,71E-01	-192,03	0,038	3,12E-02	1,31E-02	-2,39	ns
Casp1	4,34E-01	3,53E-02	-12,29	ns	6,22E-02	7,97E-02	1,28	ns
Casp3	3,24E-01	3,09E-02	-10,51	ns	6,23E-03	5,30E-02	8,52	ns
Ccl2	9,39E-01	3,19E-02	-29,44	ns	5,31E-03	6,46E-02	12,16	ns
Ccl5	3,74E-01	1,36E-02	-27,42	<0.0001	3,18E-02	2,16E-02	-1,47	ns
Ccr4	6,00E-01	2,02E-01	-2,97	ns	1,21E-01	1,13E-02	-10,76	ns
Ccr5	2,86E+01	1,90E-01	-150,65	0,037	1,21E-01	1,20E-02	-10,07	ns
Ccr6	1,14E+00	1,88E-01	-6,08	0,019	1,09E-01	2,03E-02	-5,37	ns
Ccr8	5,01E+00	1,74E-01	-28,85	0,002	8,79E-02	9,69E-03	-9,07	ns
Cd14	6,26E+00	2,45E-01	-25,58	0,011	3,09E-01	4,99E-02	-6,21	ns
Cd4	6,40E-01	1,68E-01	-3,81	ns	1,08E-01	9,75E-03	-11,05	ns
Cd40	1,09E+00	2,04E-01	-5,33	0,021	3,08E-02	1,40E-02	-2,21	ns
Cd40lg	2,96E+00	6,07E-02	-48,84	0,000	1,03E-02	3,91E-03	-2,64	ns
Cd80	1,69E-01	1,42E-01	-1,19	ns	4,91E-02	1,27E-02	-3,85	ns
Cd86	8,73E-02	1,74E-01	1,99	ns	2,34E-02	1,87E-02	-1,25	ns
Cd8a	4,54E-02	1,40E-01	3,25	ns	1,83E-02	9,27E-03	-1,97	ns
Cflar	9,25E-01	6,45E-02	-14,35	<0.0001	1,35E-02	1,30E-01	9,60	ns
Cradd	2,39E-01	2,54E-02	-9,41	<0.0001	4,53E-03	4,79E-02	10,58	ns
Crp	2,11E-01	3,12E-01	1,47	ns	1,64E-01	2,06E-02	-7,96	ns
Csf2	3,95E+00	1,60E-01	-24,68	<0.0001	7,59E-02	8,74E-03	-8,69	ns
Cx3cl1	1,71E-01	1,72E-02	-9,95	ns	3,07E-03	2,58E-02	8,40	ns

Cxcl1	1,13E-01	4,60E-03	-24,56	ns	9,52E-02	7,26E-04	-131,04	<0.0001
Cxcl10	3,61E+00	1,92E-01	-18,87	<0.0001	1,02E-01	1,18E-02	-8,65	ns
Cxcl2	2,19E-01	1,21E-02	-18,08	ns	1,96E-03	2,07E-02	10,60	ns
Cxcr3	2,23E+00	6,58E-02	-33,96	0,004	2,92E-02	3,89E-03	-7,51	ns
Cxcr5	1,08E-01	1,14E-02	-9,47	<0.0001	2,28E-02	2,15E-03	-9,42	ns
Ddx58	3,25E-01	1,99E-01	-1,63	ns	1,02E-01	1,37E-02	-7,47	ns
Edn1	4,37E-01	1,40E-02	-31,20	<0.0001	5,24E-03	3,49E-02	6,66	ns
Edn2	1,33E-01	1,74E-02	-7,67	ns	2,39E-03	2,32E-02	9,69	ns
Ednra	4,41E-01	2,93E-02	-15,05	ns	6,86E-03	5,89E-02	8,58	ns
Eng	6,94E-01	1,57E-02	-44,09	ns	9,18E-03	6,84E-02	7,45	ns
F2r	8,66E-01	1,09E-02	-79,28	ns	1,37E-02	7,47E-02	5,45	ns
F2rl1	3,27E-01	2,46E-02	-13,29	ns	5,16E-03	4,19E-02	8,12	ns
F3	9,29E-01	1,32E-02	-70,57	ns	2,23E-02	8,04E-02	3,61	ns
Fas	1,30E+00	4,67E-02	-27,81	<0.0001	2,61E-02	1,44E-01	5,52	ns
Fasl	1,26E-01	2,17E-01	1,72	ns	4,66E-02	2,85E-02	-1,63	ns
Flt1	3,45E-01	1,14E-02	-30,21	<0.0001	5,65E-03	3,66E-02	6,48	ns
Fn1	5,06E-01	1,84E-02	-27,53	ns	2,35E-01	9,97E-03	-23,56	ns
Foxp3	7,13E-01	8,88E-02	-8,03	ns	4,00E-02	2,92E-03	-13,68	ns
Gata3	5,04E-01	2,28E-01	-2,21	ns	4,13E-02	1,29E-02	-3,20	ns
H2-Q10	1,47E-01	1,25E-01	-1,17	ns	7,60E-02	7,56E-03	-10,06	ns
H2-T23	1,22E-01	3,32E-01	2,70	ns	1,24E-01	1,24E-01	1,00	ns
Icam1	5,63E-02	1,10E-01	2,00	ns	3,01E-02	2,23E-02	-1,35	ns
Ifna2	1,70E-01	1,12E-01	-1,52	ns	7,63E-02	2,18E-02	3,51	ns
Ifnar1	9,30E-02	1,52E-01	1,64	ns	4,39E-02	1,18E-02	-3,73	ns
Ifnb1	2,34E+00	2,60E-01	-9,00	<0.0001	1,10E-01	1,05E-02	-10,44	ns
Ifng	2,78E+00	3,82E-01	-7,27	0,004	1,65E-01	1,74E-02	-9,48	ns
Ifngr1	9,52E-01	2,21E-01	-4,31	0,035	1,67E-01	4,09E-02	-4,07	ns
Il11	8,04E-02	9,99E-03	-8,05	ns	1,41E-03	2,29E-02	-16,22	ns
Il18	3,16E+01	3,06E-01	-103,23	0,043	5,57E-02	4,01E-02	-1,39	ns
Il1a	2,70E+00	2,60E-01	-10,39	0.0001	5,64E-02	2,15E-02	-2,62	ns
Il1b	4,96E-01	2,13E-02	-23,24	<0.0001	3,67E-02	1,85E-02	-1,99	ns
Il1r1	2,55E-01	2,07E-01	-1,23	ns	4,34E-02	2,06E-02	-2,10	ns
Il2	1,32E-01	2,12E-01	1,61	ns	4,33E-02	1,73E-02	-2,51	ns
Il23a	2,53E-01	1,56E-01	-1,62	ns	2,12E-02	7,28E-03	-2,91	ns
Il4	5,96E+00	1,97E-01	-30,29	0,006	4,87E-02	8,98E-03	-5,42	ns
Il5	6,31E+00	2,38E-01	-26,56	0,010	7,69E-02	1,26E-02	-6,11	ns
Il6	4,19E-01	2,90E-02	-14,45	0.023	3,78E-03	3,11E-02	8,23	ns
Il7	2,61E-01	3,81E-02	-6,84	ns	5,57E-03	4,72E-02	8,48	ns
Itga5	2,66E-01	1,44E-02	-18,46	<0.0001	5,35E-03	3,10E-02	5,80	ns
Itgam	1,61E+00	1,59E-01	-10,08	0.003	4,68E-02	1,90E-02	-2,46	ns
Itgav	4,23E-01	2,89E-02	-14,64	<0.0001	6,31E-03	6,59E-02	10,44	ns

Itgb1	2,70E+00	3,58E-02	-75,32	ns	6,95E-02	3,12E-01	4,48	ns
Itgb3	1,29E-01	1,04E-02	-12,38	ns	3,55E-03	2,95E-02	8,30	ns
Jak2	5,32E-01	3,00E-01	-1,77	ns	7,00E-02	3,73E-02	-1,88	ns
Kdr	6,30E-01	3,30E-02	-19,08	ns	1,33E-02	9,31E-02	7,03	ns
Kit	4,41E-01	1,94E-02	-22,70	ns	7,00E-03	5,37E-02	7,67	ns
Ly96	1,03E-01	2,46E-01	2,38	ns	1,71E-02	1,27E-02	-1,35	ns
Lyz2	7,66E-04	4,37E-02	50,00	<0.0001	8,78E-01	1,37E+00	1,56	ns
Mapk1	7,43E-01	3,71E-01	2,00	ns	9,14E-02	4,94E-02	-1,85	ns
Mapk8	6,55E-02	4,20E-01	6,25	ns	9,52E-02	3,75E-02	-2,53	ns
Mbl2	1,40E+00	2,67E-01	-5,23	ns	1,85E-01	1,27E-02	-14,61	0.026
Mmp1a	6,25E-01	2,66E-02	-23,48	<0.0001	3,83E-02	1,11E-01	2,89	ns
Mmp2	2,65E-01	2,32E-02	-11,42	ns	7,35E-03	4,66E-02	6,34	ns
Mmp9	9,35E-01	2,64E-02	-35,46	<0.0001	2,07E-02	1,93E-01	9,33	ns
Mpo	2,74E+00	2,05E-01	-13,40	<0.0001	7,04E-02	9,14E-03	-7,70	ns
Nlrp3	4,91E-01	1,77E-01	-2,78	ns	5,19E-02	9,88E-03	5,25	ns
Nod1	7,67E-02	9,26E-02	1,20	ns	1,47E-02	6,70E-03	-2,19	ns
Nod2	2,23E-01	1,41E-01	-1,58	ns	1,27E-02	6,99E-03	-1,82	ns
Nos3	1,48E-01	1,32E-02	-11,25	ns	2,29E-03	1,99E-02	8,65	ns
Nppb	2,07E-01	1,05E-02	-19,67	<0.0001	2,92E-03	2,95E-02	10,10	ns
Npr1	1,54E-01	2,27E-02	-6,79	ns	3,58E-03	2,54E-02	7,11	ns
Ocln	4,50E-01	3,62E-02	-12,43	ns	9,05E-03	6,99E-02	7,72	ns
Pdgfra	6,42E-01	1,65E-02	-38,83	ns	1,81E-02	6,83E-02	3,77	ns
Pecam1	1,07E+00	2,87E-03	-374,15	<0.0001	2,63E-02	1,35E-01	5,13	ns
Pf4	4,27E-01	1,99E-02	-21,50	<0.0001	1,32E-02	8,11E-02	6,16	ns
Pgf	1,80E-01	1,29E-02	-13,97	<0.0001	2,49E-03	2,26E-02	9,06	ns
Plat	1,18E+00	3,56E-02	-33,15	ns	1,33E-02	8,12E-02	6,09	ns
Plau	6,50E-02	8,18E-03	-7,95	ns	1,12E-03	2,01E-02	18,03	ns
Plg	2,02E-01	1,82E-02	-11,10	ns	8,26E-01	3,41E-03	-242,52	<0.0001
Procr	2,43E-01	1,90E-02	-12,77	<0.0001	4,19E-03	3,71E-02	8,84	ns
Ptgis	1,59E+00	7,65E-03	-207,22	<0.0001	2,53E-02	1,20E-01	4,75	ns
Ptgs2	3,44E-01	3,37E-02	-10,21	ns	5,57E-03	5,55E-02	9,95	ns
Rag1	2,55E-01	4,23E-02	-6,03	ns	5,99E-02	1,30E-02	4,61	ns
Rorc	5,29E-01	2,39E-01	-2,22	ns	3,68E-02	1,32E-02	-2,79	ns
Sele	1,62E-01	1,98E-02	-8,17	ns	3,16E-03	2,78E-02	8,79	ns
Sell	8,13E-02	1,38E-03	-59,13	<0.0001	6,18E-03	3,84E-02	6,21	ns
Selp	3,96E-01	3,54E-02	-11,18	<0.0001	7,66E-03	7,25E-02	9,46	ns
Selpg	2,20E-01	1,12E-02	-19,68	ns	5,81E-03	5,00E-02	8,60	ns
Serpine1	1,17E-01	8,36E-03	-14,04	ns	1,89E-03	2,20E-02	11,66	ns
Slc11a1	1,35E-01	2,47E-01	1,85	ns	9,16E-02	1,54E-04	-595,15	<0.0001
Sod1	7,81E+00	6,40E-02	-122,02	ns	1,80E-01	1,74E+00	9,71	ns
Stat1	2,09E+00	2,35E-01	-8,90	<0.0001	1,26E-01	3,23E-02	-3,91	ns

Stat3	3,31E+00	2,17E-01	-15,28	<0.0001	1,25E-01	1,72E-02	-7,27	ns
Stat4	4,85E-01	2,77E-01	-1,75	ns	1,25E-01	1,70E-02	-7,37	ns
Stat6	5,10E-02	1,41E-02	-3,61	ns	8,07E-03	5,38E-04	-14,99	<0.0001
Tbx21	7,24E-02	5,25E-02	-1,38	ns	1,54E-02	2,09E-03	-7,36	ns
Tek	7,55E-01	2,44E-02	-31,00	<0.0001	9,44E-03	8,37E-02	8,87	ns
Tfpi	1,15E-01	3,17E-03	-36,17	<0.0001	2,89E-02	4,32E-04	-66,94	<0.0001
Tgfb1	2,53E-01	1,35E-02	-18,70	ns	4,85E-03	4,37E-02	9,00	ns
Thbd	1,18E-01	5,75E-03	-20,43	ns	2,19E-03	2,05E-02	9,36	ns
Thbs1	5,67E-01	1,94E-02	-29,24	ns	1,32E-02	5,22E-02	3,97	ns
Ticam1	2,44E-01	9,67E-02	-2,52	ns	3,22E-02	3,65E-03	-8,81	ns
Tlr1	7,66E-01	2,48E-01	-3,09	ns	4,86E-02	3,05E-02	-1,59	ns
Tlr2	1,37E+00	1,21E-01	-11,27	0.02	2,13E-02	7,67E-03	-2,77	ns
Tlr3	6,56E-02	2,75E-01	4,16	ns	8,42E-02	1,81E-02	-4,65	ns
Tlr4	1,01E-01	6,54E-02	-1,55	ns	8,91E-02	2,80E-02	-3,18	ns
Tlr5	1,13E-01	2,48E-01	2,17	ns	4,52E-02	1,50E-02	-3,01	ns
Tlr6	1,44E-01	3,55E-01	2,50	ns	9,66E-02	2,10E-02	-4,61	ns
Tlr7	4,24E+00	1,51E-01	-28,11	<0.0001	9,55E-02	1,18E-02	-8,09	ns
Tlr8	1,23E+00	1,42E-01	-8,63	0.025	8,58E-02	9,17E-03	-9,36	ns
Tlr9	1,26E-01	1,43E-01	0,88	ns	5,60E-02	3,25E-03	-17,23	<0.0001
Tnf	1,59E-01	1,34E-02	-11,86	0.031	5,49E-02	7,82E-03	-7,02	ns
Traf6	3,05E-02	2,76E-01	9,09	ns	1,50E-01	1,88E-02	-8,02	ns
Tyk2	5,31E-01	1,11E-01	-4,80	ns	4,85E-02	6,73E-03	-7,20	ns
Tymp	1,19E-01	1,19E-02	-10,03	ns	2,31E-03	2,58E-02	11,16	ns
Vcam1	2,32E-01	9,81E-03	-23,67	<0.0001	4,11E-03	3,71E-02	9,04	ns
Vegfa	6,58E-01	1,71E-02	-38,43	ns	1,64E-02	1,19E-01	7,22	ns
Vwf	2,95E-01	1,19E-02	-24,75	ns	4,88E-03	4,01E-02	8,21	ns

ARTICLE n°2: accepted in *Thrombosis and Haemostasis*, 2017.

DOI: 10.1160/TH17-03-0156

Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1: a new player in platelet aggregation

Lucie Jolly¹; Jérémie Lemarié, MD^{1,2}; Kevin Carrasco¹; Batric Popovic, MD, PhD^{1,3}; Marc Derive, PhD⁴; Amir Boufenzer, PhD⁴; Sébastien Gibot*, MD, PhD^{1,2}

¹ INSERM UMRS-1116, Faculté de Médecine Nancy, Université de Lorraine, Nancy, France

² CHU Nancy, Hôpital Central, Service de Réanimation Médicale, Nancy, France

³ CHU Nancy, Hôpital Brabois, Service de Cardiologie, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

⁴ INOTREM SA, Nancy, France

Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1: a new player in platelet aggregation

Lucie Jolly¹; Jérémie Lemarié^{1,2}; Kevin Carrasco¹; Batric Popovic^{1,3}; Marc Derive⁴; Amir Boufenzar⁴; Sébastien Gibot^{1,2}

¹INSERM UMRS-1116, Faculté de Médecine Nancy, Université de Lorraine, Nancy, France ; ²CHU Nancy, Hôpital Central, Service de Réanimation Médicale, Nancy, France ; ³CHU Nancy, Hôpital Brabois, Service de Cardiologie, Vandoeuvre-lès-Nancy, France ; ⁴INOTREM SA, Nancy, France

Summary

Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1 (TREM-1) is an immunoreceptor initially known to be expressed on neutrophils and monocytes/macrophages. TREM-1 acts as an amplifier of the inflammatory response during both infectious and aseptic inflammatory diseases. Another member of the TREM family, The Triggering receptor expressed on myeloid cells Like Transcript-1 (TLT-1) is exclusively expressed in platelets and promotes platelet aggregation. As the gene that encodes for TLT-1 is located in the TREM-1 gene cluster, this prompted us to investigate the expression of TREM-1 on platelets. Here we show that TREM-1 is constitutively expressed in α -granules

and mobilised at the membrane upon platelet activation. Pharmacologic inhibition of TREM-1 reduces platelet activation as well as platelet aggregation induced by collagen, ADP, and thrombin in human platelets. Aggregation is similarly impaired in platelets from Trem-1^{-/-} mice. *In vivo*, TREM-1 inhibition decreases thrombus formation in a carotid artery model of thrombosis and protects mice during pulmonary embolism without excessive bleeding. These findings suggest that TREM-1 inhibition could be useful adducts in antiplatelet therapies.

Keywords

Platelets, TREM-1

Correspondence to:

Prof. Sébastien Gibot
Service de Réanimation Médicale, Hôpital Central
29 avenue de Lattre de Tassigny
54035 Nancy Cedex, France
Tel.: +33 383852970, Fax: +33 383858511
E-mail: sgibot@yahoo.fr

Received: March 7, 2017

Accepted after minor revision: May 11, 2017

Epub ahead of print: July 27, 2017

<https://doi.org/10.1160/TH17-03-0156>

Thromb Haemost 2017; 117: 1772–1781

Supplementary Material to this article is available online at www.thrombosis-online.com.

Introduction

The main role of blood platelets is to ensure vascular integrity and haemostasis in case of vascular damage. Platelet functions involved in these physiological processes are also at work in arterial thrombosis, which is a dramatic complication of atherosclerosis that may lead to vascular occlusion. Despite the established benefits of currently approved antiplatelet drugs, a large number of patients continue to display adverse thrombotic events, highlighting the need for targeting other platelets activation pathways (1–3).

Over the past years, it has become clear that platelets are important, not only in haemostasis and thrombosis but also in inflammation and in distinct aspects of atherosclerosis (4). Platelets are able to interact with a large variety of cell types, such as leukocytes (5), endothelial cells (6, 7), and smooth muscle cells (SMCs) (8), and these interactions have been implicated in the pathophysiology of vascular inflammation. The question remains, however, to which extent these proinflammatory and prothrombotic functions can be separated and targeted (9).

The Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1 (TREM-1) is an immune-receptor expressed by human and murine neutrophils, mature monocytes and macrophages that acts as an amplifier of the innate immune response (10, 11). Activation of TREM-1 signalling is initiated upon binding of its ligand, which

triggers the association and phosphorylation of an immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) of the adaptor protein DAP12 (12). TREM-1 engagement phosphorylates spleen tyrosine kinase (Syk) and leads to NF- κ B activation, expression of inflammatory genes in a cell-specific manner, calcium influx (13), neutrophil degranulation and production of reactive oxygen species in addition to cytokines and chemokines (14, 15).

Pharmacological inhibition of TREM-1 by the use of synthetic peptides (such as LR12) or fusion protein repeatedly prevented hyper-responsiveness and death in various models of severe infections (16–20) or inflammation, including myocardial infarction (21, 22) and atherosclerosis (23, 24). LR12 is a 12-aa peptide that mimics a well conserved extra-cellular domain of TREM-1 involved in the binding of its putative ligand. LR12 thus acts as a decoy receptor for the TREM-1 ligand and modulates its activation (19, 21–24).

In this study, we examined the role of TREM-1 in platelets. We first showed that TREM-1 is constitutively expressed by platelets. Then we found that *Trem-1* genetic invalidation or pharmacological inhibition with LR12 decreased platelet secretion, spreading and aggregation. This reduction of platelet activation proved to be protective during arterial thrombosis and pulmonary embolism in mice. These findings provide new insights on the TREM-1 biology, with a potential impact on the pathophysiology and treatment of thrombotic disorders.

Methods

All methods were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations and approved by the French Ministry of Research (under the no. 66).

Animals

Trem-1^{-/-} adult male C57BL/6 (6–8 weeks) and wild-type (WT) littermates were used in the experiments. Trem-1^{-/-} mice have recently been described in detail by Weber et al [18]. Experiments were approved by our institutional Animal Care and Use Committee.

LR12 peptide

LR12 peptide (LQEEDAGEYGCM) or a scramble inactive peptide (EDGQYECLMEGA) were chemically synthesised (Pepscan Presto BV, Lelystad, The Netherlands) as a COOH terminally amidated peptides. The correct peptides were obtained with >99% yields and were homogeneous after preparative purification, as confirmed by mass spectrometry and analytic reversed-phase high-performance liquid chromatography. These peptides were free of endotoxin.

Preparation of mouse and human washed platelets

Mice were anaesthetised with 2% isoflurane in 0.5 l/minute (min) oxygen, and whole blood was collected by cardiac puncture into syringes containing one-sixth the volume of an acid citrate dextrose. For human, after informed consent fresh blood was taken from free of medication healthy volunteers with citrate like anticoagulant. Platelet-rich plasma was obtained by centrifuging whole blood 190g for 4 min followed by 60 seconds at 1900g at room temperature (RT). Platelets were obtained from platelet-rich plasma by centrifugation (4 min at 6000g) and resuspended at a final concentration of 3×10^8 /ml in Tyrode-BSA buffer (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Purity was constantly >99.99%.

Platelet aggregation assay

Platelet aggregation was monitored by measuring light transmission through the stirred suspension of washed platelets (3×10^8 /ml) at 37°C using a TA-8V aggregometer (SD Innovation, Frouard, France). When required, platelets were first incubated with LR12 (50 µg/ml) for 5 min at 37°C. Platelet aggregation was triggered by adding 5 µg/ml collagen (SD Innovation), 5 µM ADP (SD Innovation) and 0.1 or 1 U/ml thrombin (HYPHEN Biomed, Neuville sur Oise, France). Aggregation was monitored for 10 min and results are expressed as the percentage change in light transmission with respect to the blank (buffer without platelets), set at 100%.

Platelet adhesion under flow

Vena8Fluoro+ Biochips (Cellix, Dublin, Ireland) were coated with fibrinogen (125 µg/ml) at 4°C overnight. On the next day, the

chips were blocked with BSA (10 mg/ml) for 30 min at RT and then washed once more with PBS containing 0.9 mM Ca²⁺ and 0.5 mM Mg²⁺. Washed platelets were pretreated with vehicle or LR12 (20 µg/ml or 50 µg/ml). ADP (10 µM) was added directly prior to perfusion start. Platelets were then mixed with 1 mM CaCl₂ and immediately perfused over the fibrinogen-coated channels at constant shear stress of 2.5 dynes·cm⁻² for 6 min using the Mirus nanopump (Cellix). Platelet adhesion was recorded on a ZEISS Axiovert 40 CFL fluorescence microscope, using a Q-IMAGING ROLERA-XR digital camera. Cell images of three microscopic fields from each channel were captured, and images were analysed using DucoCell software (Cellix).

In vitro thrombogenesis

Vena8Fluoro+ Biochips were coated with collagen, blocked and washed as described earlier. Whole blood collected in 3.8% sodium citrate was incubated with 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide (1 µM) in the dark for 10 min. LR12 (20 µg/ml or 50 µg/ml) or PGE2 (10 µM) were added 5 min before the perfusion was started. Perfusion was performed at a shear rate of 30 dynes·cm⁻², and microscopically was carried out as described earlier for platelet adhesion.

Platelet dense granule secretion

Dense granule secretion was quantified by measuring adenosine triphosphate (ATP) release after platelet aggregation with the ATP Determination Kit (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), following the manufacturer's instructions.

Measurement of TXA₂ and cAMP generation

When required, LR12 (50 µg/ml) was pre-incubated for 5 min at 37°C. TXA₂ and cAMP generation were determined in conditions of platelet aggregation induced by 10 nM convulxin (Pentapharm, Basel, Switzerland) or 0.1 U/ml thrombin. Platelet aggregation was stopped after 5 min of stimulation and supernatant was obtained by centrifuging sample for 4 min at 6000g at RT. Levels of TXB₂, the stable metabolite of TXA₂, were determined with the Thromboxane B₂ assay Kit following the manufacturer's instructions (R&D Systems, Abingdon, UK). Accumulation of cAMP was determined in platelets using cAMP Parameter assay Kit (R&D Systems), according to the manufacturer's instruction.

Measurement of intracellular free calcium concentration

Human platelets (2×10^8 platelets/ml) were loaded with a probe of the acetoxymethyl ester of the fluorescent Ca²⁺ indicator Fluo-3 (1 µM, Sigma) and pluronic acid (1 µM) for 30 min at RT. After pretreatment of platelets with LR12 (50 µg/ml), Ca²⁺ mobilisation induced by agonists (collagen 25 µg/ml, TRAP 25 µM, ADP 5 µM) was analysed in Tyrode-BSA buffer using an Accuri C6 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) flow cytometer. Individual fluorescence values were then analysed with FlowJo and Graphpad

Prism to normalize the fluorescence with the first value according to the equation $(F/F_0)-1$, where 'F' is the fluorescence at specific time point and 'F₀' is the fluorescence at time 0.

Immunoblotting

Platelets were lysed in RIPA buffer (Sigma Aldrich), kept for 5 min on ice and centrifuged for 10 min at 8000g at 4°C to collect the supernatant. Protein concentration was determined (BCA Protein Assay Kit, Pierce; ThermoScientific). Thirty micrograms of each sample were migrated on a Criterion XT Bis-Tris Gel 4–12% (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Millipore, Saint-Quentin en Yvelines, France). The membrane was blocked with 5% w/v skim milk powder in TBST (0.1 M Tris-HCl pH 8, 1.5 M NaCl and 1% Tween-20) for 2 hours (h) at RT, and subsequently incubated with anti-(p)ERK1/2, anti-(p)PLCγ2, anti-tubulin (Cell Signaling) or anti-TREM-1 (AbD Serotec, or R&D Systems) antibodies overnight at 4°C. After vigorous washing in TBST, the membrane was incubated with secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase for 1 h at RT. Immunocomplexes were detected with the SuperSignal West Femto Substrate (Pierce; ThermoScientific). Acquisition and quantitative signal density analyses were performed by a LAS-4000 imager (FSVT) and Multi-Gauge software (LifeScience Fujifilm, Tokyo, Japan).

Real-time PCR

Total RNAs were extracted from platelets using RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands) and quantified with NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) before being retrotranscribed using the iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad) and quantified by quantitative polymerase chain reaction (PCR) using Qiagen available probes (Quantitect Primers) for human Trem-1, Dap12, and ActB. ActB serves as housekeeping gene.

Flow cytometry analysis

Washed platelets (10^8 /ml) were stimulated with ADP 5 μM or TRAP 25 μM. After incubation for 5 min at 37°C without stirring, platelets were incubated with fluorescein isothiocyanate (FITC)-fibrinogen, phycoerythrin (PE)-labeled anti-human PAC1, allophycocyanin (APC)-labeled anti-human CD62P (P-selectin) mAb (Miltenyi Biotech) and directly analysed on an Accuri C6 flow cytometer (Becton Dickinson).

For TREM-1 staining, platelets were fixed with 4% (wt/vol) paraformaldehyde (PFA) and permeabilised or not with 0.5% wt/vol Triton X-100. After washing, they were resuspended in Tyrode-BSA buffer and incubated for 15 min at 4°C in the dark with FITC-labeled anti-human TREM-1 mAb (BIOSS). Isotype controls were used for all antibodies (Miltenyi Biotech and BIOSS).

Confocal microscopy

Sterile glass coverslips were coated with 50 μg/ml human fibrinogen for 24 h at 4°C. Washed platelets were placed onto fibri-

nogen-coated coverslips for 1 h at 37°C. Platelets were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min, washed with PBS, permeabilised with 0.2% triton X-100, and blocked 2 h with 2% BSA. Cells were then incubated with the indicated primary antibodies (CD62p, DAP12, GPIIb, TLT-1, TREM-1) (BIOSS, MA, USA) overnight at 4°C. After washing with PBS coverslips were mounted on Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and examined with a TCS SP5 X confocal microscope (Leica, Wetzlar, Germany), and images were processed using LAS AF Lite blue software (Leica). Alternatively, in order to prevent platelets activation, fixation, permeabilisation and blockade were performed before adding platelets to untreated coverslips. Co-localisation scores were calculated by ImageJ software based on 3 independent experiments. Human coronary artery thrombi were obtained using a thrombectomy catheter at the time of percutaneous coronary intervention for ST-segment elevation myocardial infarction. Thrombus fragments were placed in formalin, embedded in paraffin, sectioned (5 μm), and stained as above.

Platelets adhesion under static conditions

Glass coverslips were coated with fibrinogen (40 μg/ml) or bovine type I collagen (100 μg/ml) overnight, and then blocked with 2% BSA. Washed human platelets in Tyrode's buffer (3×10^7 platelets/ml) preincubated with LR12 for 5 min at 37°C were allowed to spread on the fibrinogen/collagen-coated surfaces. After 1 h, non-adherent platelets were discarded, and surface-bound platelets were washed with phosphate buffer saline (PBS). Coverslips were fixed in 4% paraformaldehyde, and labelled with CytoPainter Phalloidin iFluor 555 (Abcam, Cambridge, UK) for 1 h in the dark. Then platelets were visualised by TCS SP5 X confocal microscope (Leica), and images were processed using LAS AF Lite blue software (Leica).

FeCl₃-induced carotid artery thrombosis model

Mice were anaesthetised with 2% isoflurane in 0.5 l/min oxygen and body temperature was kept constant using a heating plate. The right common carotid artery was isolated through a midline cervical incision and blood flow was monitored with an ultrasound transit-time flow probe (0.5 PSB Nanoprobe; Transonic, Ithaca, NY, USA). Mice were randomly assigned to receive i.p. injection of 100 μl PBS or 100 μl (=100 μg) LR12 just before thrombus formation was induced by applying a 1 mm² piece of filter paper soaked in 10% aqueous FeCl₃ solution. After 2 min, filter paper was removed and the vessel was washed with warm PBS. Time to complete carotid occlusion was monitored.

Pulmonary thromboembolism model

Collagen-induced pulmonary thromboembolism was carried out as follows. Mice were challenged with 100 μl of a mixture containing 100 μg/ml of collagen and 15 μg/ml of epinephrine (both from ABP, Epsom, UK) in PBS injected into right jugular vein, 2 min after IV injection of 100 μl of 1:1 LR12 solution or PBS. Except for

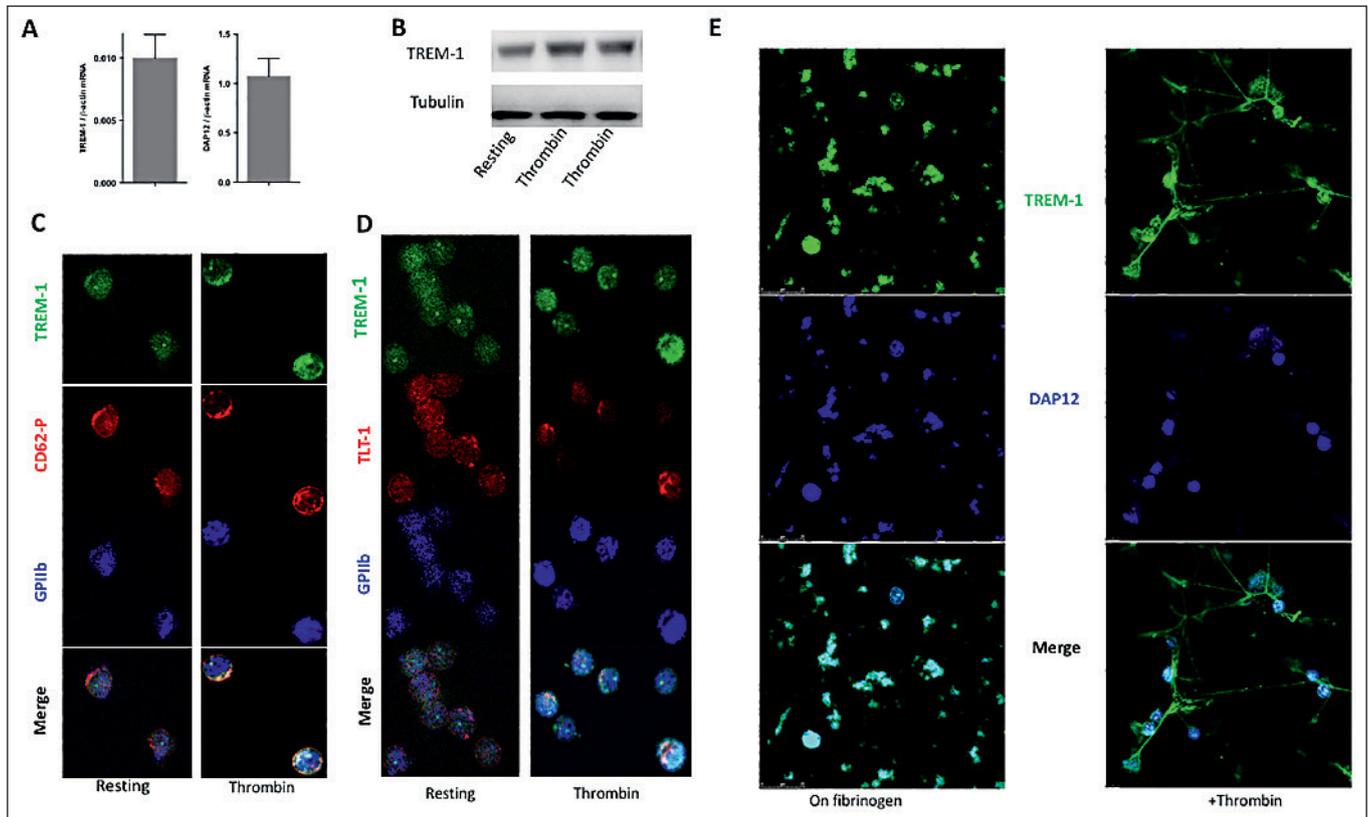


Figure 1: TREM-1 is expressed in platelets. A) Quantification of Trem-1 and Dap12 gene expression in human platelets by qRT-PCR; n=4–5 per condition; * P<0.05. B) Analysis of TREM-1 (anti-TREM-1 Ab Serotec) and tubulin (Cell Signalling) expression in resting or thrombin (1 U/ml, 5 min) activated-platelets by immunoblotting. C) Confocal fluorescent images of resting platelets (left panels) or thrombin (1 U/ml, 5 min) activated platelets (right panels).

Platelets were stained with anti-human TREM-1 (green), CD62-P (red) and GPIIb (blue) mAb; or D) TREM-1 (green), TLT-1 (red) and GPIIb (blue), Scale bars: 10 μ m; E) Confocal fluorescent images of fibrinogen-adherent platelets without (right panels) or with thrombin (1 U/ml, 5 min) (right panels). Platelets were stained with anti-human TREM-1 (green) and DAP-12 (blue) mAb, Scale bar=25 μ m.

survival analysis, mice were killed 3 min after collagen-epinephrine injection and blood and lungs were collected for platelet count and histological studies. Right-lower lobe was fixed in 4% paraformaldehyde and then paraffin-embedded. Lung sections stained with hematoxylin and eosin were digitally imaged. Five random X 20 fields were photographed for each specimen and thrombus number for each mouse was analysed. Lung single-cell suspension was obtained by manual grinding followed by a 45-min enzymatic digestion (2 mg of collagenase type-I and 30 μ g of DNase per ml of DMEM with 10% FCS, all from Sigma-Aldrich) before incubation in a cocktail of mAbs against CD45, CD11b, Ly6G, Ly6C and TREM-1 (all antibodies from Miltenyi Biotec). FACS data were acquired on Gallios (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA) and expressed as total cell number per lobe.

Statistical analysis

All of the reported figures are representative of at least three different experiments and then are presented as mean \pm SD. Statistical analysis was performed using Prism Version 6 software (GraphPad) and the data were compared by unpaired t-test. A p-value <0.05 was deemed significant.

Results

Trem-1 is constitutively expressed in platelets

The Triggering receptor expressed on myeloid cells Like Transcript-1 (TLT-1) (26) is a membrane-bound protein, abundant in the α -granules of resting platelets and at the surface of activated platelets (27). The gene that encodes for TLT-1 is located in the TREM gene cluster. This prompted us to investigate the expression of TREM-1 on human platelets.

To verify the presence of TREM-1 in platelets its gene expression was evaluated (\blacktriangleright Figure 1A). TREM-1 signalling requires its association with the adaptor protein DAP12. We also observed the presence of DAP12 mRNA in platelets (\blacktriangleright Figure 1A). The presence of the TREM-1 protein was confirmed by Western blot using 2 different antibodies (\blacktriangleright Figure 1B, Suppl. Figure 1, available online at www.thrombosis-online.com). Flow cytometry analysis revealed that TREM-1 was detectable at low level in resting non-permeabilised platelets, while staining was evident after activation and permeabilisation (Suppl. Figure 2, available online at www.thrombosis-online.com).

To get insights on the localisation of TREM-1 in platelets, we stained these cells for TREM-1, CD62p and GPIIb. In resting and

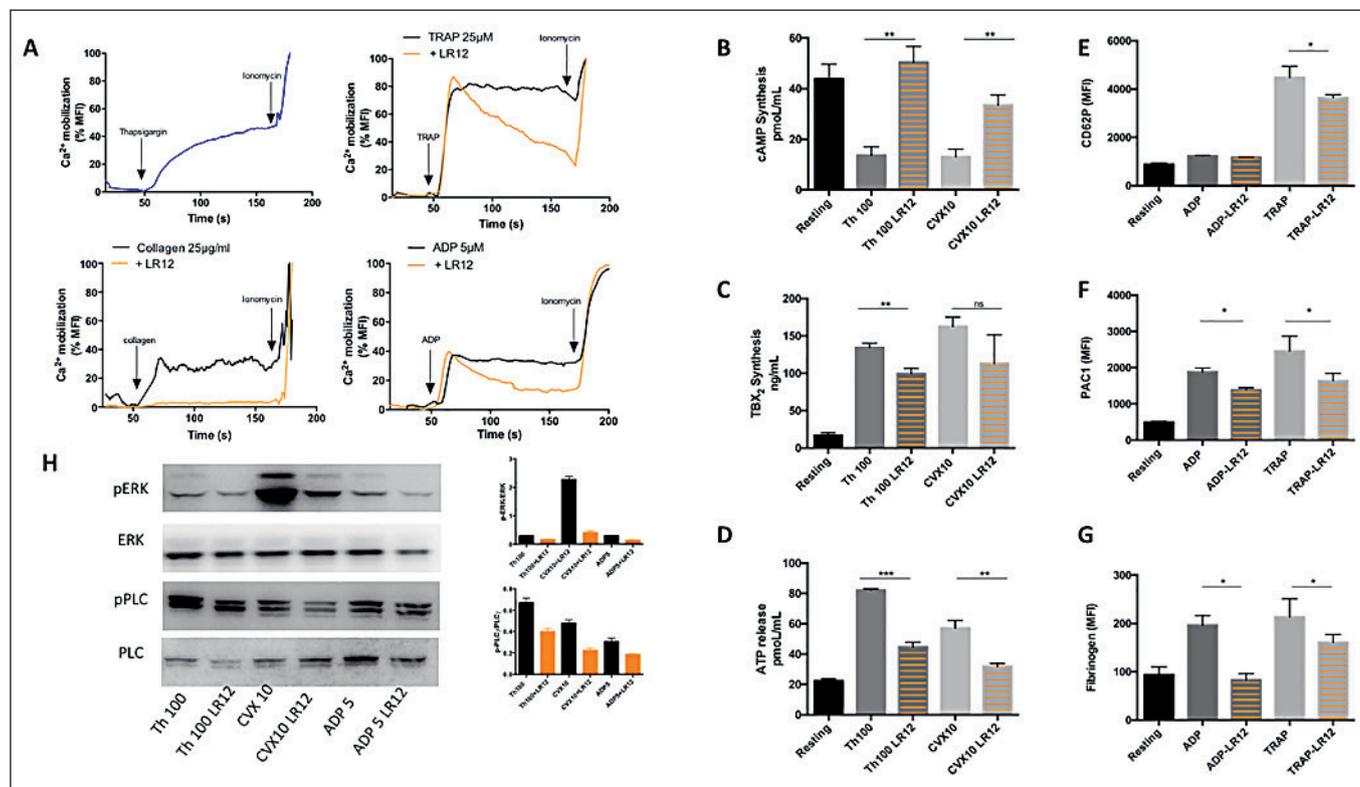


Figure 2: Effect of LR12 on Ca²⁺ mobilisation, cAMP and thromboxane B2 synthesis, platelet secretion and integrin IIb3 inside-out activation. A) Effect of LR12 (50 µg/ml) on intracellular Ca²⁺ mobilisation in human platelets activated by TRAP (25 µM), collagen (25 µg/ml) and ADP (5 µM). Results are representative of three experiments and expressed as percentage of MFI normalised by difference between baseline and ionomycin (100%). Accumulation of cAMP (B) and Thromboxane B2 (TBX2) (C) was determined in resting and thrombin (Th, 100 mU/ml) or convulxin (CVX, 10 nM) activated platelets (5 min) in the presence of LR12 (50 µg/ml) or control peptide (LR12 scramble, 50 µg/ml). Results represent the mean ± SD of at least three separate experiments, each performed in triplicate. Statistical significance was determined by unpaired Student t-test (*P<0.05; **P<0.01). C) Effect of LR12 (50 µg/ml) on dense granule secretion assessed by measuring

ATP release induced by thrombin (Th, 100 mU/ml) or convulxin (CVX, 10 nM). Results were expressed as mean ± SD of at least three separate experiments, each performed in triplicate, and statistical significance was determined by unpaired Student t-test (**P<0.01; ***P<0.005). Flow cytometric analysis of APC-labelled CD62-P exposure (E), PE-labelled PAC-1 binding (F) or FITC-labelled fibrinogen binding (G) to washed human platelets treated with LR12 (50 µg/ml) or control peptide, stimulated with ADP (5 µM) or TRAP (50 µM). Data are expressed as mean ± SD of eight different donors. Statistical significance was determined by unpaired Student t-test (*P<0.05). H) Western blot of (p)ERK and (p)PLC 2 in resting and thrombin (Th, 100 mU/ml), convulxin (CVX, 1 nM), or ADP (ADP, 5 µM) activated platelets (5 min) in the presence of LR12 (50 µg/ml) or control peptide. Results are representative of three experiments.

thrombin activated platelets, TREM-1 seems to co-localise with CD62p and DAPI2 but not GPIIb (colocalisation scores 0.619, 0.708, and 0.102, respectively) (► Figure 1C, Suppl. Figure 3, available online at www.thrombosis-online.com). Upon platelet activation TREM-1 clusters at the membrane (► Figure 1C). Interestingly, although TREM-1 and TLT-1 appear to co-localise in resting platelets, this is no more observed in activated cells (colocalisation score 0.171) (► Figure 1D).

In fibrinogen-adherent platelets, TREM-1 and DAPI2 are largely co-localised. Once activated with thrombin, TREM-1 clusters and platelets generates in-between strands containing large amounts of TREM-1, while DAPI2 expression remains almost unchanged (► Figure 1E, Suppl. Figure 4, available online at www.thrombosis-online.com).

Therefore, TREM-1 seems constitutively expressed in α-granules and clusters at the membrane upon platelet activation.

Coronary thrombi obtained from acute myocardial infarction patients also displayed an intense TREM-1 staining (Suppl. Figure 5, available online at www.thrombosis-online.com).

TREM-1 modulation reduces platelet secretion

Elevation in cellular calcium concentration is an immediate consequence of platelets stimulation and is a crucial event in their activation. To inhibit TREM-1, we used the synthetic peptide LR12 (19), the scramble LR12 peptide served as control. Pre-incubation of platelets with LR12 strongly reduced TRAP-, ADP- and collagen-induced calcium rising (► Figure 2A). In addition to intracellular calcium mobilisation, platelet activation involves other signalling mechanisms, including cAMP, and TXA2 synthesis. We therefore assessed the effect of LR12 on these signalling pathways in resting and thrombin or convulxin activated platelets. Although

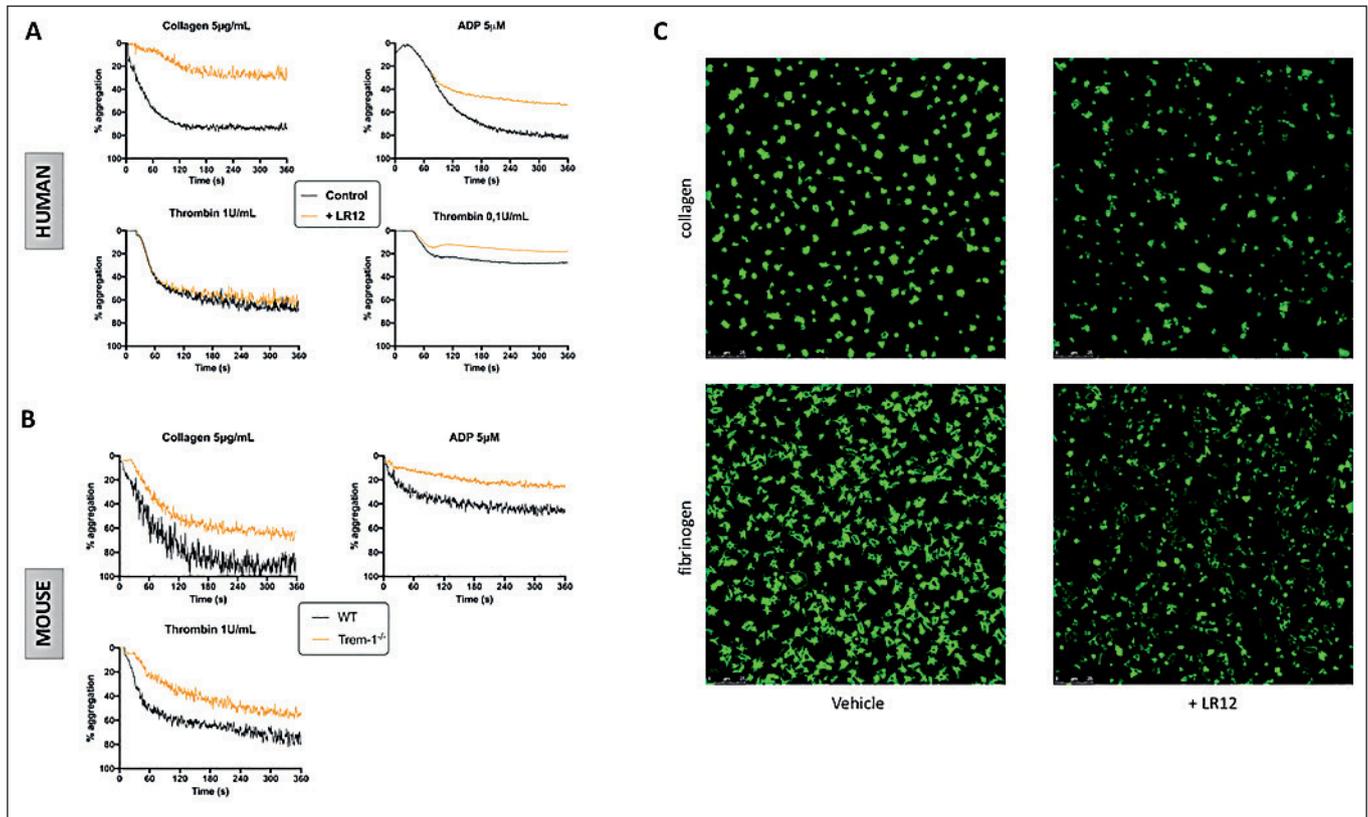


Figure 3: Effect of LR12 on platelet aggregation and adhesion. A) Aggregation of washed human platelets induced by indicated concentrations of collagen, thrombin or ADP with or without incubation with LR12 (50 µg/ml). Experiments were performed on 6–8 healthy blood donors. B) Aggregation of washed platelets from WT and Trem-1^{-/-} mice induced by indicated concentrations of collagen, thrombin or ADP. Traces are representative of 5–6 animals per condition. Results are expressed as the percentage change in light

transmission with respect to the blank (buffer without platelets), set at 100%. C) Washed human platelets were preincubated with or without LR12 (50 µg/ml) for 5 min at 37 °C. Platelets were allowed to spread on fibrinogen or collagen-coated glasses for 1 h at 37 °C. Then platelets were fixed, labelled with phalloidin and photographed under a fluorescence microscope. Representative images from three different blood donors with similar results.

thrombin and convulxin inhibited cAMP accumulation in platelets, this phenomenon was prevented by LR12 (► Figure 2B). As shown in ► Figure 2C, thrombin-induced TXB2 (the stable metabolite of TxA2) release by platelets was reduced by LR12 and a trend was observed with convulxin. LR12 also dampened thromboxane production triggered by arachidonic acid (Suppl. Figure 6, available online at www.thrombosis-online.com). We next assessed the effect of TREM-1 inhibition on the secretion of dense granules by measuring the release of ATP upon stimulation by thrombin and convulxin. The presence of LR12 decreased ATP release after platelet activation by thrombin and convulxin (► Figure 2D).

P-selectin (CD62P) is a major α -granule protein that is highly expressed on the platelet surface during activation. To examine the effects of LR12 on platelet activation, P-selectin expression was monitored by flow cytometry. Results showed that LR12 reduced TRAP-induced P-selectin expression (► Figure 2E).

We next analysed whether the reduced platelet secretion observed in the presence of LR12 was associated with an impaired activation of integrin α Ib β 3 by measuring binding of the conformational dependent antibody PAC-1. As illustrated in ► Figure

2F, TRAP and ADP induced PAC-1 binding was decreased by TREM-1.

Platelet inside-out signalling to integrin α Ib β 3 plays an essential role in the modulation of its conformation to increase affinity for plasma fibrinogen and von Willebrand factor (vWF) binding and subsequent platelet aggregation (24). As a consequence of a reduction of α Ib β 3 activation, LR12 decreased the binding of fibrinogen to activated platelets (► Figure 2G).

TREM-1 inhibition was also associated with a reduction of thrombin, convulxin and ADP ERK1/2 and PLC γ 2 phosphorylation (► Figure 2H).

TREM-1 modulation therefore reduces platelet activation and secretion.

TREM-1 modulation impairs platelet aggregation and adhesion

To investigate the role of TREM-1 in the regulation of platelet activation, we evaluated the effect of LR12 on platelet aggregation in response to various platelet agonists, including collagen, ADP, and thrombin. Platelet aggregation induced by collagen, ADP, and low

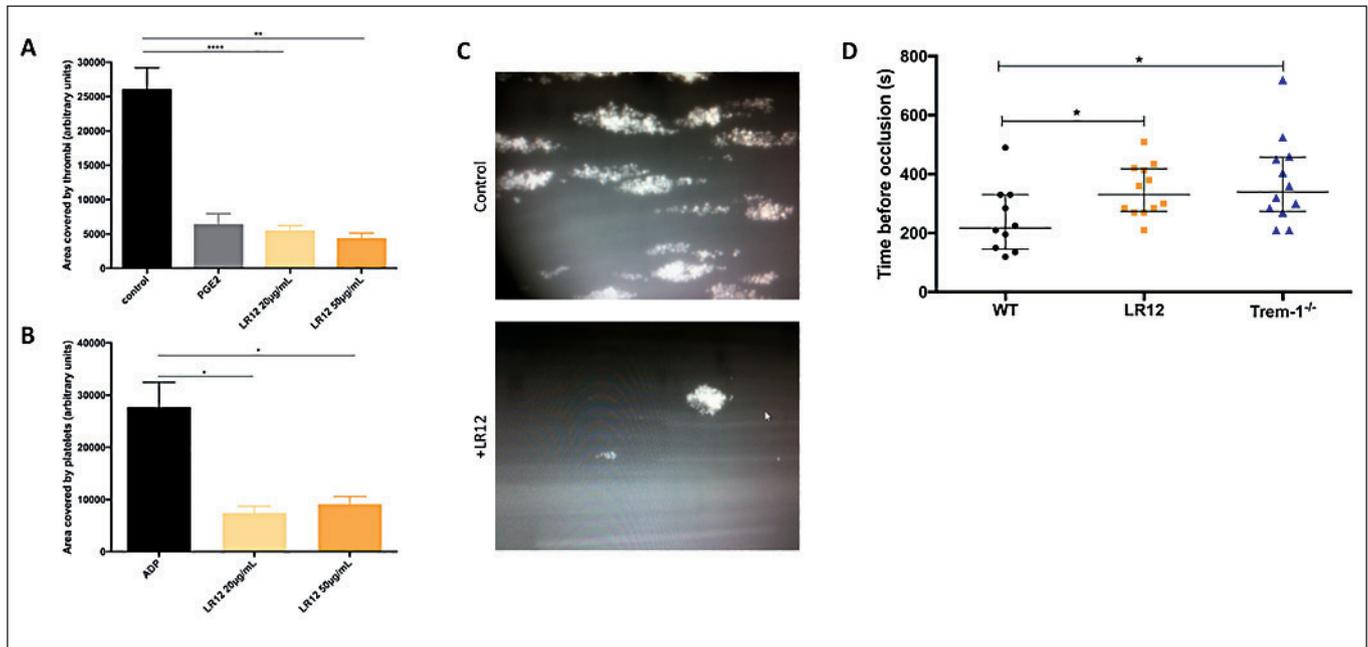


Figure 4: TREM-1 inhibition prevents thrombosis *in vitro* and *in vivo*. Effect of LR12 (20–50 µg/ml) pretreatment on whole blood (A) or washed platelets (B) perfusion into laminar flow chambers coated, respectively, with collagen and fibrinogen under a flow of 30 and 2.5 dynes.cm⁻², respectively. PGE2 (10 µM) was used as control of inhibition of thrombus formation. During perfusion, the formation of thrombi was observed under an epifluorescence microscope. The area covered by thrombi (A) or platelets (B) were calculated

in three independent experiments. Results are mean ± SD. Statistical significance was determined by unpaired Student t-test (*P<0.05; **P<0.01; *** P<0.005). C) Representative image of thrombi formation in the capillary in absence or presence of LR12 (50 µg/ml). D) Carotid artery occlusion times induced by FeCl₃ in WT, WT treated by i.p. LR12 (100 µg), and Trem-1^{-/-} mice. Results are mean ± SD (n=10–12 mice per group). Statistical significance was determined by unpaired Student t-test (*P<0.05).

dose of thrombin was impaired by LR12 in humans. The inhibitory effect of LR12 disappeared in the presence of highest concentration of thrombin (► Figure 3A) or lower doses of peptide (Suppl. Figure 7, available online at www.thrombosis-online.com). The scramble LR12 peptide showed no effect on platelet aggregation (Suppl. Figure 8, available online at www.thrombosis-online.com).

To definitely confirm the role of TREM-1 on aggregation we used washed platelets from Trem-1^{-/-} mice. Platelet counts were similar and expression of CD31, CD36, CD41, P-Selectin, αIIbβ3, and TLT-1 did not differ between WT and Trem-1^{-/-} mice (Suppl. Figure 9, available online at www.thrombosis-online.com). Gene expression of Trem1 (TLT-1) was also similar between WT and Trem-1 deficient platelets (Suppl. Figure 10, available online at www.thrombosis-online.com). ► Figure 3B shows that aggregation induced by collagen, ADP, and thrombin was strongly impaired in Trem-1-deficient platelets. While LR12 inhibited aggregation of WT platelets, it had no effect on Trem-1^{-/-} platelets (Suppl. Figure 11, available online at www.thrombosis-online.com), ruling out an action of LR12 on TLT-1. TREM-1 inhibition also reduced platelets aggregation induced by arachidonic acid (Suppl. Figure 6, available online at www.thrombosis-online.com).

To further investigate whether LR12 interferes with integrin outside-in signalling, we performed platelet spreading assays using washed human platelets pretreated with LR12. As shown in ► Figure 3C, LR12 treatment decreased platelet spreading and platelet-platelet interactions on collagen or fibrinogen.

These data support a role of TREM-1 during *in vitro* platelet aggregation.

TREM-1 inhibition prevents thrombosis *in vitro* and *in vivo*

Inhibition of thrombus formation by LR12 was assessed in a whole-blood perfusion assay over a collagen matrix under a shear rate of 30 dynes.cm⁻² (► Figure 4A). Platelets adhered to collagen matrix and rapidly built stable aggregates. By contrast, LR12 decreased the size and number of thrombi. We next investigated the adhesion of washed platelets to fibrinogen under flow conditions. Platelets were activated with ADP (10 µM) and perfused under constant low shear stress of 2.5 dynes.cm⁻² over fibrinogen-coated biochips. Pretreatment of platelets with LR12 caused a significant decrease of platelet adhesion to fibrinogen ► Figure 4B and C).

Using a FeCl₃-induced carotid artery thrombosis model (► Figure 4D), we observed that genetic invalidation or pharmacological inhibition of TREM-1 delayed the time to arterial occlusion, and sometimes largely prevented the complete vessel occlusion, due to the presence of unstable thrombi.

Tail bleeding times, measured by transecting the tails of isoflurane anesthetised mice 5 mm from the tip that were then placed in a plastic cup filled with 37°C saline, were similar between the three groups of animals (WT: 295 ± 25 sec, WT+LR12: 306 ± 34 sec, Trem-1 Ko mice: 302 ± 24 sec).

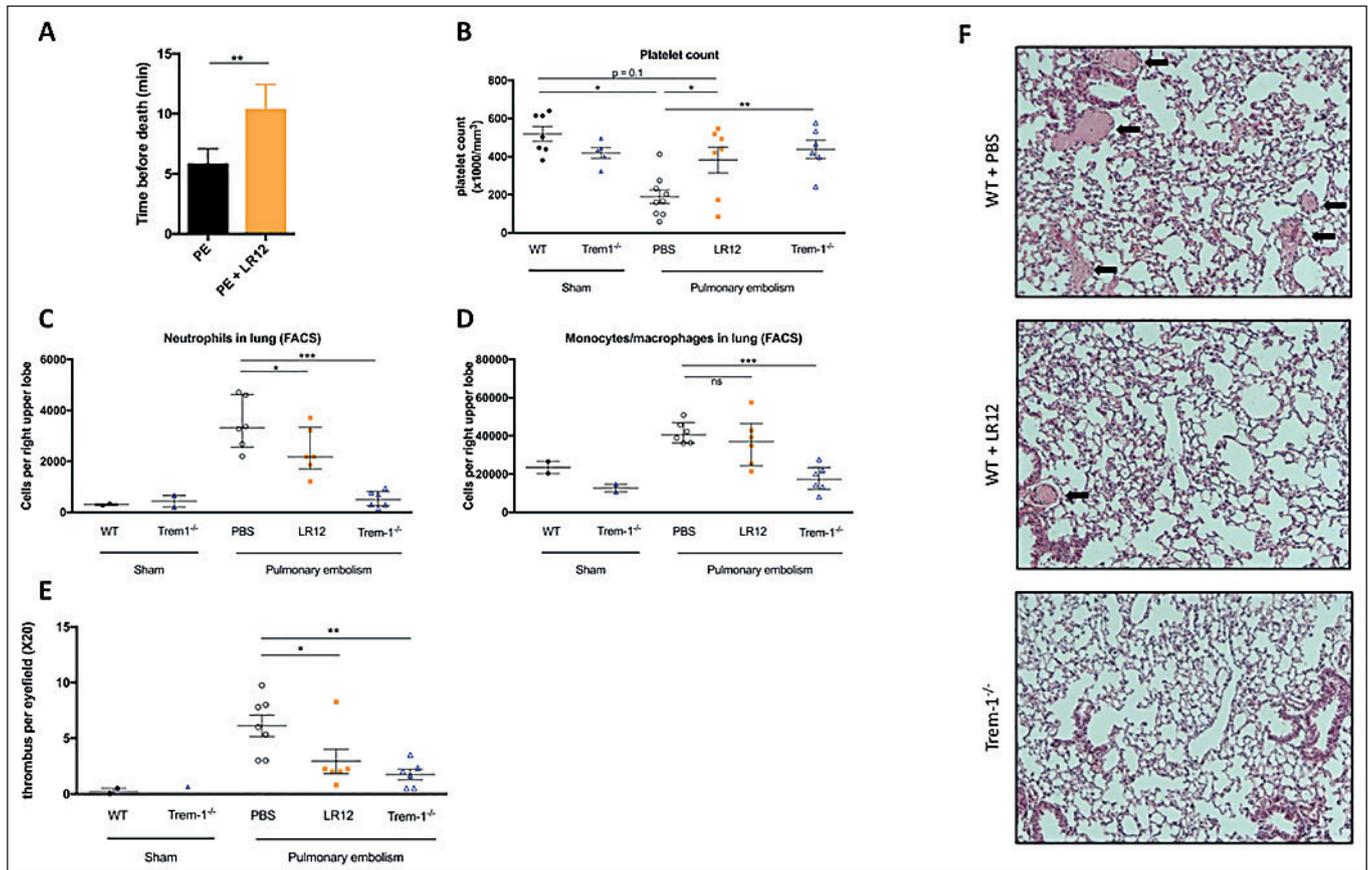


Figure 5: TREM-1 inhibition protects mice from pulmonary embolism in reducing lung leukocytes recruitment and thrombi formation. A) Pulmonary embolism (PE) associated mortality caused by injection of epinephrine plus collagen in control (100 μ l PBS) (black bars) and LR12 (100 μ l=100 μ g) treated (orange bars) mice. Data are reported as the mean \pm SD. Statistical significance was determined by unpaired Student t-test (** P <0.01). B) Platelet count in WT, WT+LR12 and Trem-1^{-/-} mice before (Sham) and 3 min after pulmonary embolism (PE). Flow-cytometric quantification of neutrophils (C) and monocytes/macrophages (D) in lung from WT,

WT+LR12 and Trem-1^{-/-} mice before (Sham) and 3 min after pulmonary embolism. Data are reported as the mean \pm SD. Statistical significance was determined by unpaired Student t-test (* P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.005). E) Number of thrombus per eye field in the lungs of WT+PBS, WT+LR12 and Trem-1^{-/-} mice by count in 10 microscopic fields for each lung section. Data are reported as the mean \pm SD. Statistical significance was determined by unpaired Student t-test (* P <0.05; ** P <0.01) (F) Representative histological section of lungs of WT, WT+LR12 and Trem-1^{-/-} mice 3 min after induction of pulmonary embolism. Black arrows: Occlusive intravascular thrombi.

TREM-1 inhibition thus decreases thrombus formation both *in vitro* and in a relevant model of arterial thrombosis.

TREM-1 inhibition protects mice from pulmonary embolism

We next assessed the role of TREM-1 in a pulmonary thromboembolism model. Time to death was delayed in Trem-1^{-/-} or LR12 treated mice (► Figure 5A). Pulmonary embolism (PE) was associated with a rapid thrombocytopenia. This phenomenon was prevented when TREM-1 was inhibited (► Figure 5B).

Using flow cytometry, we analysed PE-induced leukocytes recruitment to the lungs. Very early (3 min) after the induction of PE, neutrophils and monocytes/macrophages infiltrated the lungs. TREM-1 inhibition largely reduced this inflammatory recruitment (► Figure 5C and D).

Histologic analysis of isolated lungs collected 3 min after PE induction showed that the percentage of vessels occluded by thrombi was significantly lower in Trem-1^{-/-} and LR12 treated mice (► Figure 5E and F). These results indicate that TREM-1 plays a relevant role in thrombus formation *in vivo*.

TREM-1 inhibition protects mice during pulmonary embolism in reducing lung leukocytes recruitment and thrombi formation.

Discussion

The TREM family encompasses at least five different receptors sharing low sequence homology with each other. Among them, TREM-1 is expressed at the surface of neutrophils, mature monocytes, macrophages and hypoxic dendritic cells, and plays a major role in the pathophysiology of inflammation-associated disorders (11). During various models of sepsis, we observed that the

TREM-1 inhibition, in addition to reducing inflammation and improving survival, prevented from thrombocytopenia and disseminated intra-vascular coagulation (17, 19). Moreover, another member of the TREM family, the TREM-like transcript 1 (TLT-1) receptor, has been found in α -granules of megakaryocytes and platelets (26). Upon platelet activation, TLT-1 transports to the membrane where it enhances Ca^{2+} influx and promotes platelet aggregation (27, 28). Giomarelli et al. showed anti-TLT-1 scFvs inhibited low-dose thrombin-induced human platelets aggregation (29). Moreover, platelets isolated from *Tlt-1^{-/-}* mice displayed poor aggregation *in vitro* (28). These different findings prompted us to investigate whether TREM-1 is also present in platelets.

Indeed, we observed that TREM-1 is constitutively expressed in resting platelets and clusters at the membrane upon activation. Interestingly, although TREM-1 and TLT-1 seems to co-localise in resting platelets, this is no more observed in activated platelets.

Platelet aggregation plays a key role in thrombosis, leading to many disorders. Platelet activation is achieved through various surface receptors that include G protein-coupled receptors, integrins, and glycoproteins receptors. Activation of these receptors is mainly mediated by the strong agonists thrombin and collagen, whereas other mediators released by activated platelets, such ADP and TxA₂, potentiate the activation cascade by recruiting other platelets. We found that genetic invalidation or pharmacologic inhibition (with the use of the inhibitory peptide LR12) of TREM-1 inhibited ADP, collagen and thrombin induced platelet aggregation. Activation of the glycoprotein (GP)IIb/IIIa receptor is the most common pathway for agonists-induced platelet aggregation. As we observed in presence of LR12 a reduced expression of the conformational dependent anti-GPIIb/IIIa antibody PAC-1, a decreased fibrinogen binding and platelet spreading, this effect was likely the consequence of an impaired integrin α Ib β 3 inside-out activation.

In myeloid cells, TREM-1 engagement leads to the phosphorylation of several kinase including PLC γ 2 and ERK1/2 (12). These kinases are also known to be involved in collagen, thrombin and ADP-dependent signalling in platelets (30). TREM-1 inhibition decreased PLC γ 2 and ERK1/2 activation in stimulated platelets.

The role of activated platelets during acute inflammatory disorders is well established. For example, the adhesion molecule

P-selectin (CD62P), a component of the α -granules membranes, plays a dominant role in modulating interactions between platelets and the endothelium, and may be involved in acute cardiovascular events (31, 32). Furthermore, P-selectin can lead activated platelets to adhere to monocytes and neutrophils: these three cell types cooperate to initiate and propagate thrombosis (33). This may be especially true during sepsis (34). Recent studies have indicated that antiplatelet medications may reduce mortality from infections and sepsis, which suggests a possible clinical relevance of modifying platelet responses to inflammation (35). As LR12 reduces platelet activation (including P-selectin expression) its beneficial effects during sepsis and myocardial infarction (19, 21) may not be restricted to an action on myeloid cells but also involves a modulation of platelet activation.

The reduced *ex vivo* aggregation of platelets from *Trem-1^{-/-}* mice in response to collagen, ADP, and thrombin suggests that TREM-1 may also represent a novel molecular target for anti-thrombotic agents. This possibility is strengthened by our findings demonstrating an important role for TREM-1 in thrombosis *in vivo*. Using a FeCl₃-induced carotid artery thrombosis model, we showed a significant increase of time-to-occlusion in *Trem-1* deficient or LR12 treated mice. Moreover, we also found that genetic invalidation or pharmacologic modulation of TREM-1 conferred protection against pulmonary thromboembolism with a reduced lung inflammation, number of occlusive thrombi and delayed death. These findings point to an important role of TREM-1 in regulating *in vivo* platelet function.

Our study has several limitations: the mouse model of *Trem-1^{-/-}* is a full knockout that does not allow us to definitely implicate platelets in our carotid artery and pulmonary embolism experiments. However, aggregation defect was clearly observed in TREM-1 Ko isolated platelets. Another member of the TREM family, TLT-1, has been shown to be involved in platelet aggregation. Although we cannot completely exclude off-target effects of LR12, for example on TLT-1, this peptide has no action in TREM-1 Ko animals (who display a similar TLT-1 expression compared to WT controls), rendering this hypothesis less probable. Finally, the precise mechanism by which TREM-1 deletion decreases platelets activation remains elusive as many important steps are reduced at once (calcium mobilisation, integrin expression...). However, Haselmayer et al. observed the presence of a TREM-1 ligand in both resting and stimulated platelets (15). It is therefore tempting to speculate that blocking the interaction of platelet TREM-1 (over-expressed after stimulation) with its constitutively expressed platelet ligand decreases activation, at least in the presence of weak platelets agonists. But as the nature of this ligand remains elusive definite conclusions cannot be drawn.

In this study, we showed that TREM-1 is expressed by platelets where it plays an important role in mediating their activation. Pharmacological modulation or genetic invalidation of TREM-1 impairs platelet activation and prevents from arterial or venous thrombus formation. These findings suggest that TREM-1 modulating agents such as LR12 could potentially be useful adducts in antiplatelet therapies in the setting of thrombotic disorders. They also provide a new insight on the TREM-1 biology and may ex-

What is known about this topic?

- The Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1 (TREM-1) is an immunoreceptor expressed by neutrophils and monocytes.
- TREM-1 activation on myeloid cells amplifies the inflammatory response triggered by Toll Like Receptor engagement.

What does this paper add?

- Here we show that TREM-1 is also expressed by platelets.
- TREM-1 plays an important role in mediating platelets activation.
- Modulation of TREM-1 impairs platelet activation and prevents from thrombus formation.

plain the protective action of the TREM-1 modulation during acute inflammatory diseases, beyond their effects on myeloid cells.

Acknowledgements

This work was supported by INSERM and INOTREM SA.

Author contributions

LJ and SG designed the research and wrote the paper. LJ, JL, KC, BP, MD, AB, and SG performed experiments and analysed the data.

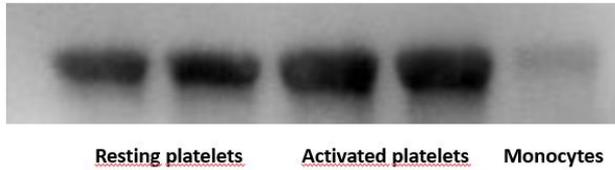
Conflicts of interest

Marc Derive and Sébastien Gibot are co-founders of INOTREM SA, a company developing TREM-1 inhibitors.

References

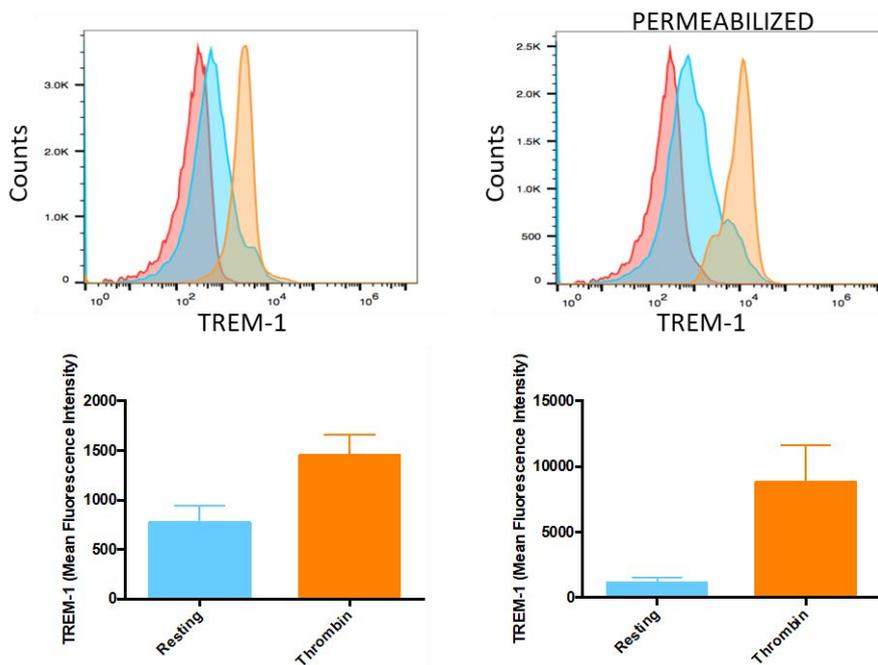
- American College of Emergency Physicians. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2013; 61: e78–140.
- Members, 2012 Writing Committee. 2012 ACCF/AHA Focused Update of the Guideline for the Management of Patients With Unstable Angina/Non-ST-Elevation Myocardial Infarction (Updating the 2007 Guideline and Replacing the 2011 Focused Update) A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* 2012; 126: 875–910.
- Franchi F, Angiolillo D. Novel antiplatelet agents in acute coronary syndrome. *Nat Rev Cardiol* 2015; 12: 30–47.
- Borisoff JI, Spronk HMH, ten Cate H. The hemostatic system as a modulator of atherosclerosis. *N Engl J Med* 2011; 364: 1746–1760.
- van Gils JM, Zwavinga JJ, Hordijk PL. Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases. *J Leukoc Biol* 2009; 85: 195–204.
- Frenette PS, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD. Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7450–7454.
- Frenette PS, Denis CV, Weiss L, et al. P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *Exp Med* 2000; 191: 1413–1422.
- Weber AA, Köppen HO, Schrör K. Platelet-Derived Microparticles Stimulate Coronary Artery Smooth Muscle Cell Mitogenesis by a PDGF-Independent Mechanism. *Thromb Res* 2000; 98: 461–466.
- Projahn D, Koenen RR. Platelets: key players in vascular inflammation. *Leukoc Biol* 2012; 92: 1167–1175.
- Bouchon A, Dietrich J, Colonna M. Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *Immunol* 2000; 164: 4991–4995.
- Bouchon A, Facchetti F, Weigand MA, Colonna M. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature* 2001; 410: 1103–1107.
- Tessarz AS, Cerwenka A. The TREM-1/DAP12 pathway. *Immunol Lett* 2008; 116: 111–116.
- Arts RJW, Joosten LAB, van der Meer JWM, Netea MG. TREM-1: intracellular signaling pathways and interaction with pattern recognition receptors. *Leukoc Biol* 2013; 93: 209–215.
- Radsak MP, Salih HR, Rammensee HG, Schild H. Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in neutrophil inflammatory responses: differential regulation of activation and survival. *Immunol* 2004; 172: 4956–4963.
- Haselmayer P, Grosse-Hovest L, Landenberg P, et al. TREM-1 ligand expression on platelets enhances neutrophil activation. *Blood* 2007; 110: 1029–1035.
- Gibot S, Kolopp-Sarda MN, Béné MC, et al. A soluble form of the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 modulates the inflammatory response in murine sepsis. *Exp Med* 2004; 200: 1419–1426.
- Gibot S, Alauzet C, Massin F, et al. Modulation of the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 pathway during pneumonia in rats. *Infect Dis* 2006; 194: 975–983.
- Weber B, Schuster S, Zysset D, et al. TREM-1 deficiency can attenuate disease severity without affecting pathogen clearance. *PLoS Pathog* 2014; 10: e1003900.
- Derive M, Boufenzler A, Gibot S. Attenuation of responses to endotoxin by the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 inhibitor LR12 in nonhuman primate. *Anesthesiology* 2014; 120: 935–942.
- Liu T, Zhou Y, Li P, et al. Blocking triggering receptor expressed on myeloid cells-1 attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via inhibiting NLRP3 inflammasome activation. *Sci Rep* 2016; 6: 39473.
- Boufenzler A, Lemarié J, Simon T, et al. TREM-1 Mediates Inflammatory Injury and Cardiac Remodeling Following Myocardial Infarction. *Circ Res* 2015; 116: 1772–1782.
- Lemarié J, Boufenzler A, Popovic B, et al. Pharmacological inhibition of the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 limits reperfusion injury in a porcine model of myocardial infarction. *ESC Heart Fail* 2015; 2: 90–99.
- Zysset D, Weber B, Rihs S, et al. TREM-1 links dyslipidemia to inflammation and lipid deposition in atherosclerosis. *Nat Commun* 2016; 7: 13151.
- Joffre J, Potteaux S, Zeboudj L, et al. Genetic and pharmacological inhibition of TREM-1 limits the development of experimental atherosclerosis. *Am Coll Cardiol* 2016; 68: 2776–2793.
- Allcock RJN, Barrow AD, Forbes S, et al. The human TREM gene cluster at 6p21.1 encodes both activating and inhibitory single IgV domain receptors and includes NKp44. *Eur Immunol* 2003; 33: 567–577.
- Washington AV, Gibot S, Acevedo I, et al. A TREM family member, TLT-1, is found exclusively in the alpha-granules of megakaryocytes and platelets. *Blood* 2004; 104: 1042–1047.
- Washington AV, et al. TREM-like transcript-1 protects against inflammation-associated hemorrhage by facilitating platelet aggregation in mice and humans. *Clin Invest* 2009; 119: 1489–1501.
- Barrow AD, Astoul E, Floto A, et al. Cutting edge: TREM-like transcript-1, a platelet immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif encoding costimulatory immunoreceptor that enhances, rather than inhibits, calcium signaling via SHP-2. *Immunol* 2004; 172: 5838–5842.
- Giomarelli B, Washington VA, Chisholm MM, et al. Inhibition of thrombin-induced platelet aggregation using human single-chain Fv antibodies specific for TREM-like transcript-1. *Thromb Haemost* 2007; 97: 955–963.
- Ragab A, Séverin S, Gratacap MP, et al. Roles of the C-terminal tyrosine residues of LAT in GPVI-induced platelet activation: insights into the mechanism of PLCγ2 activation. *Blood* 2007; 110: 2466–2474.
- Furie B, Furie BC, Flaumenhaft R. A journey with platelet P-selectin: the molecular basis of granule secretion, signalling and cell adhesion. *Thromb Haemost* 2001; 86: 214–221.
- Blann AD, Nadar SK, Lip GYH. The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease. *Eur Heart J* 2003; 24: 2166–2179.
- von Brühl ML, Stark K, Stenhardt A, et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *Exp Med* 2012; 209: 819–835.
- Thomas MR, Storey RF. The role of platelets in inflammation. *Thromb Haemost* 2015; 114: 449–458.
- Toner P, McAuley DF, Shyamsundar M. Aspirin as a potential treatment in sepsis or acute respiratory distress syndrome. *Crit Care* 2015; 19: 274.

Supplementary Material to Jolly et al. "Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1: a new player in platelet aggregation" (<https://doi.org/10.1160/TH17-03-0156>)



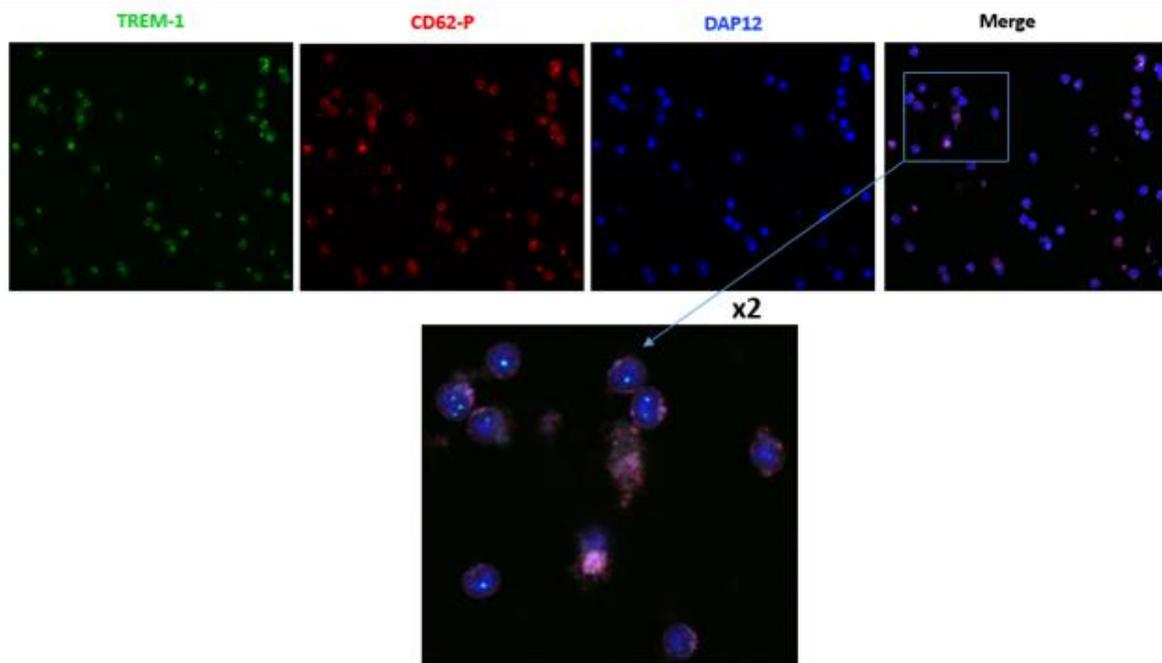
Supplementary Figure 1

Analysis of TREM-1 (anti-TREM-1 RnD Systems) expression in resting or thrombin (1U/mL, 5 minutes) activated-human platelets, and in unstimulated human monocytes by immunoblotting.



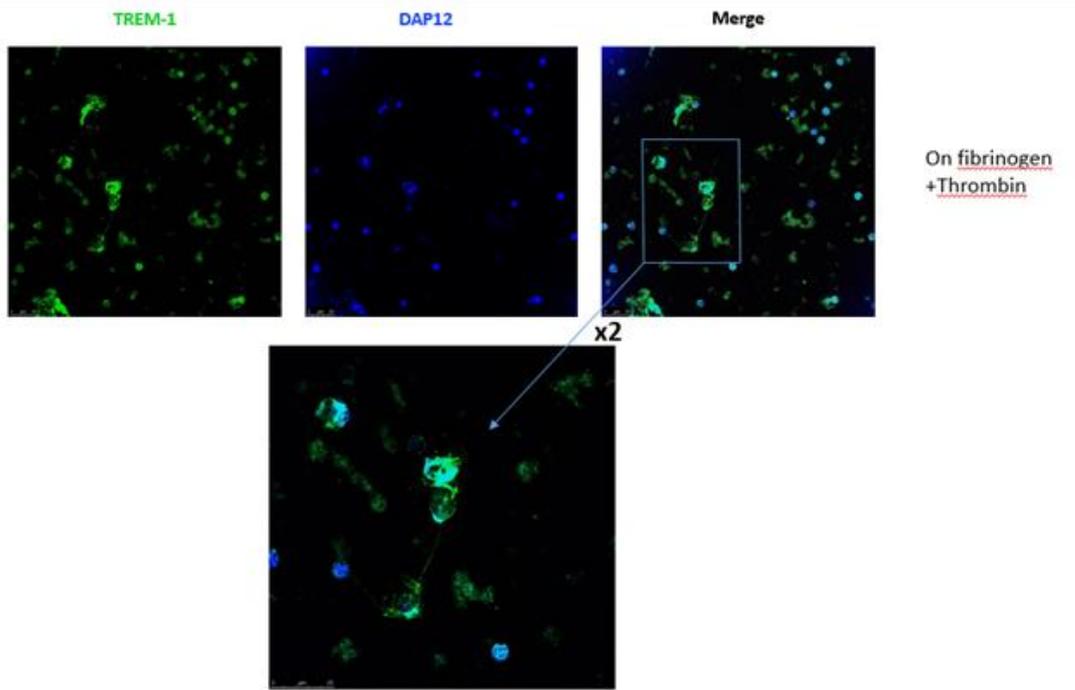
Supplementary Figure 2

Flow cytometry analysis of TREM-1 expression in non-permeabilized (left panel) and permeabilized human platelets. Isotype control antibody (red), anti-TREM-1-FITC in resting cells (blue), and anti-TREM-1-FITC in thrombin activated cells (orange).



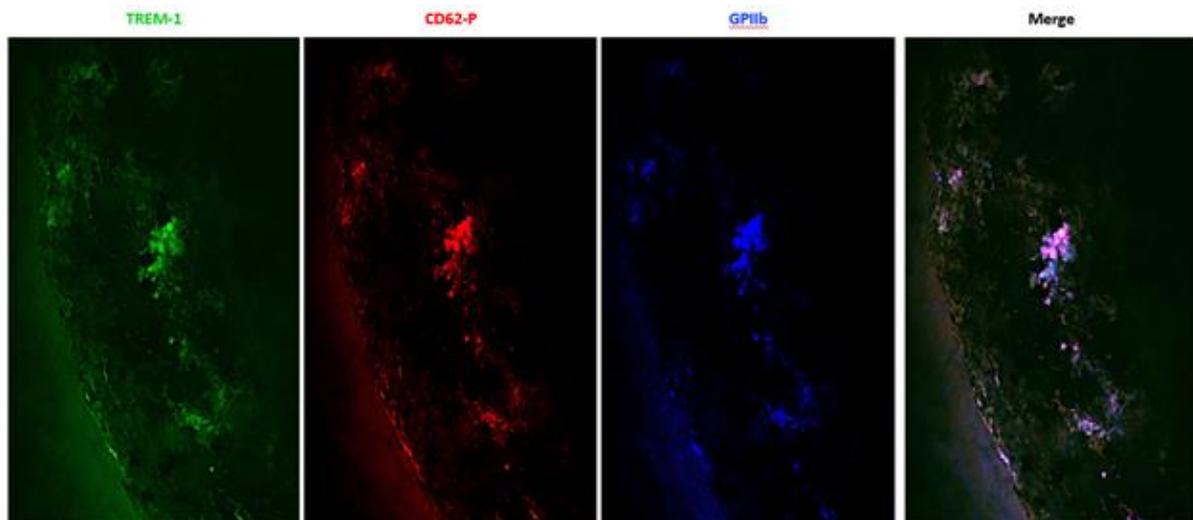
Supplementary Figure 3

Confocal fluorescent images of resting platelets stained with anti-human TREM-1 (green), CD62-P (red) and DAP12 (blue) mAb.



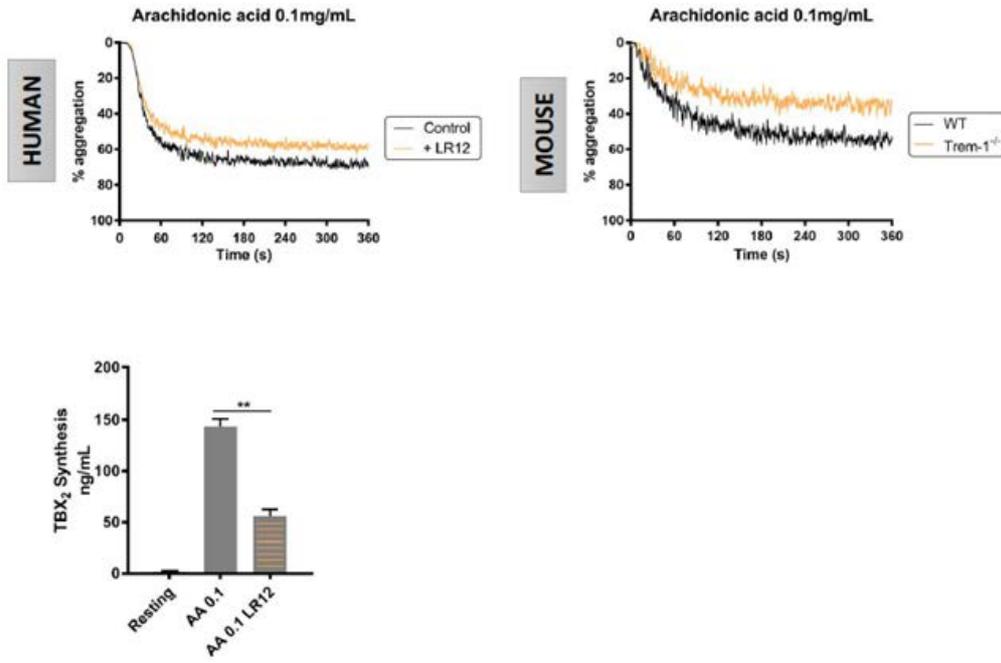
Supplementary Figure 4

Confocal fluorescent images of fibrinogen-adherent platelets stimulated with thrombin (1U/mL, 5 minutes). Platelets were stained with anti-humanTREM-1 (green) and DAP12 (blue) mAb, Scale bar=25 μ m.



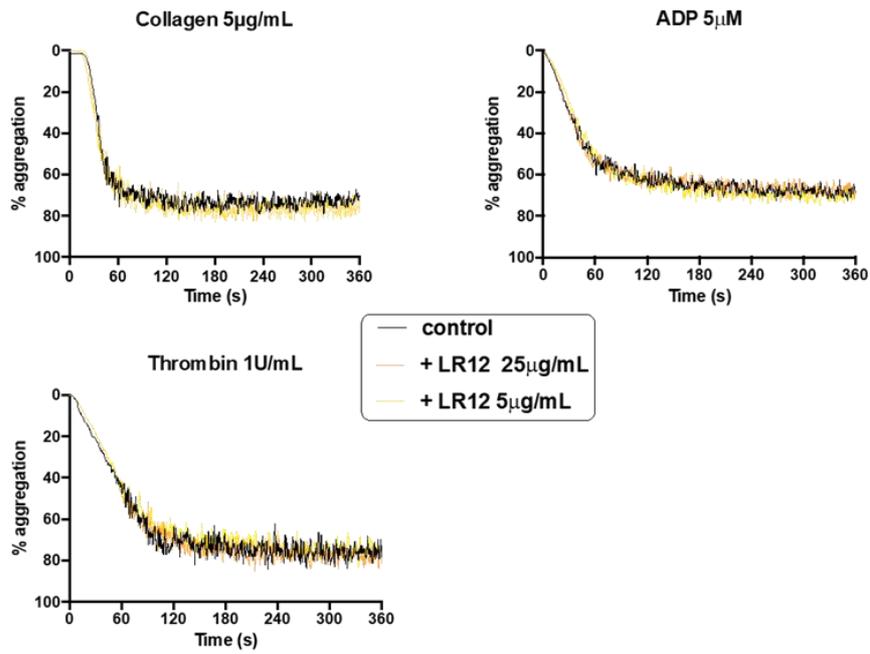
Supplementary Figure 5

Human coronary artery thrombus was obtained using a thrombectomy catheter at the time of percutaneous coronary intervention for ST-segment elevation myocardial infarction. Thrombus fragments were placed in formalin, embedded in paraffin, sectioned (5 μ m), and stained for TREM-1 (green), CD62-P (red) and GPIIb (blue)



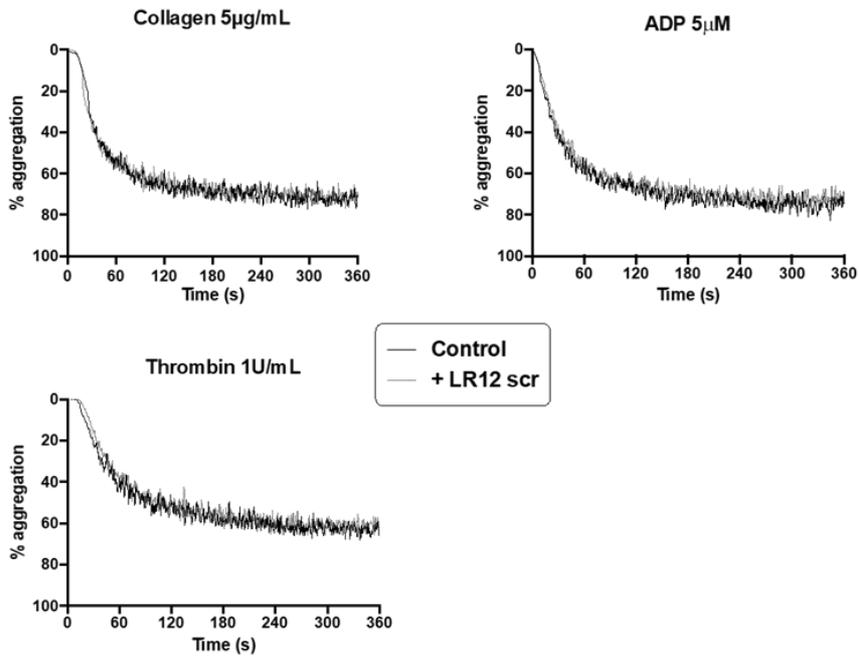
Supplementary Figure 6

Aggregation of washed human and mouse platelets induced with arachidonic acid with or without 50 μg/mL LR12 (upper panel). Thromboxane production by human platelets upon stimulation with arachidonic acid (aa) in the presence or not of 50 μg/mL LR12 (lower panel). Experiments were performed twice on 4 healthy blood donors or mice per groups. ** p<0.01.



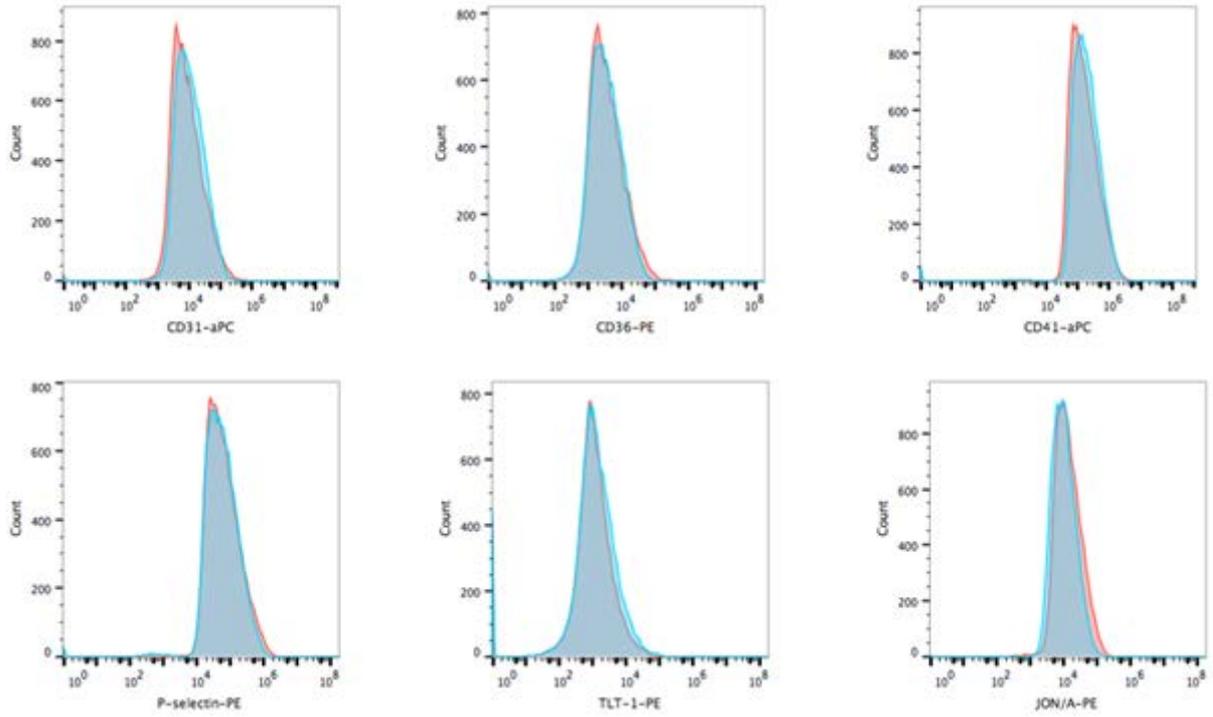
Supplementary Figure 7

Aggregation of washed human platelets induced by indicated concentrations of collagen, thrombin or ADP incubated with 5 or 25µg/mL of LR12. Experiments were performed on 6-8 healthy blood donors.



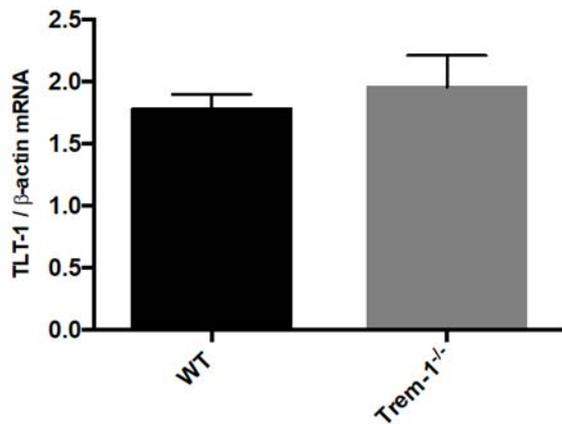
Supplementary Figure 8

Aggregation of washed human platelets induced by indicated concentrations of collagen, thrombin or ADP incubated with 25µg/mL of LR12 scramble (LR12 scr). Experiments were performed on 6-8 healthy blood donors.



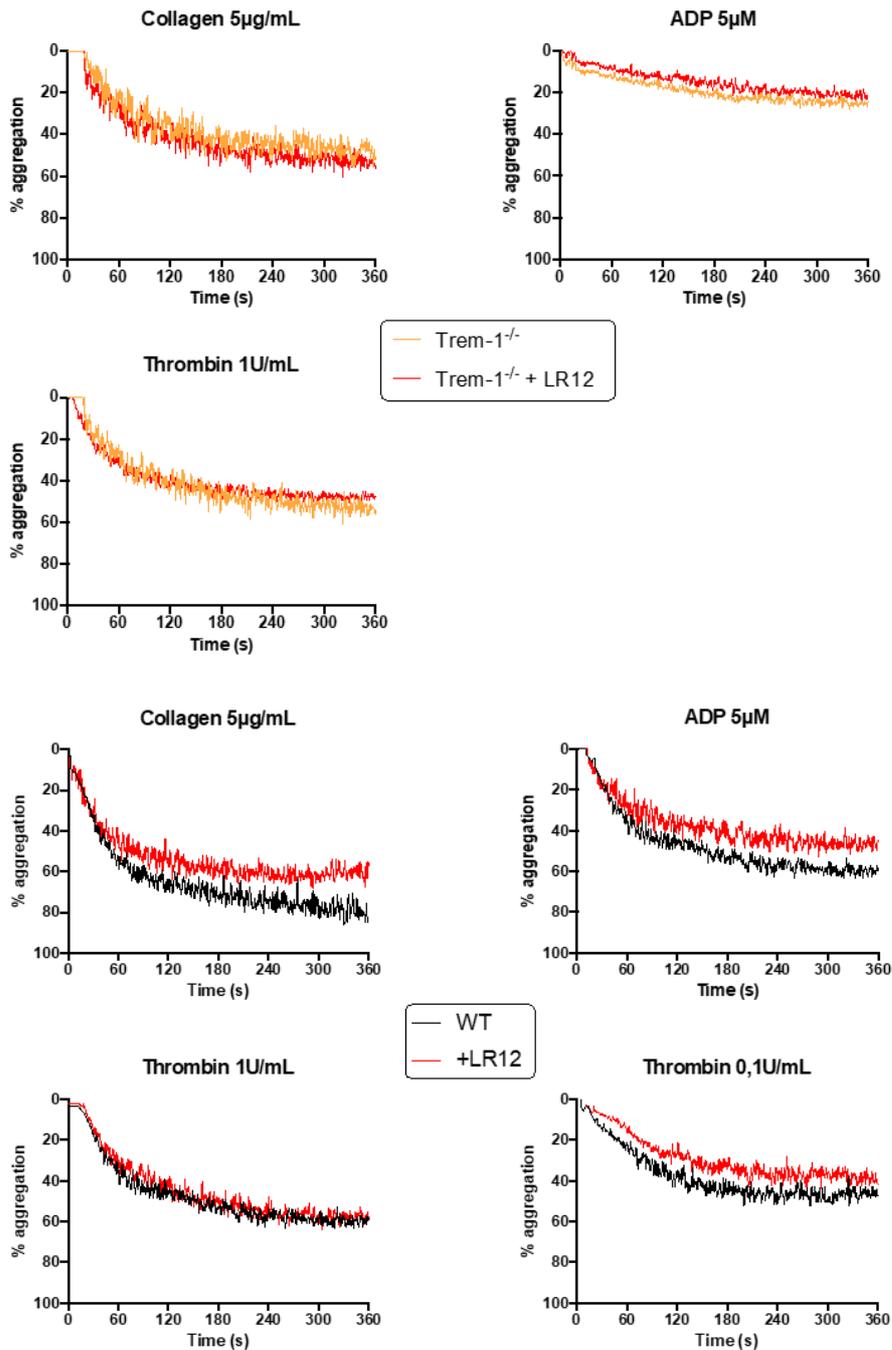
Supplementary Figure 9

FACS analysis of isolated platelets from WT (Red) and Trem-1 KO (Blue) mice stained for various membrane markers.



Supplementary Figure 10

Quantification of Trem-1 gene expression in mouse platelets by qRT-PCR; n=4-5 per condition.



Supplementary Figure 11

Aggregation of washed platelets from TREM-1 KO (upper panels) or WT (lower panels) induced by indicated concentrations of collagen, thrombin or ADP incubated with 50µg/mL of LR12. Experiments were performed on 3-5 animals per condition

RESUME

TREM-1 (Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1) est un immunorécepteur connu pour être exprimé par les neutrophiles et les monocytes/macrophages. Il joue un rôle fondamental dans l'amplification de la réponse inflammatoire via les TLR (Toll-like receptor). A l'aide de plusieurs outils expérimentaux, nous montrons pour la première fois que TREM-1 est exprimé par deux nouveaux types cellulaires : la cellule endothéliale et les plaquettes. La délétion sélective de TREM-1 au niveau endothélial protège du choc septique en réduisant la dysfonction et l'inflammation vasculaire, en modulant le recrutement et l'activation des cellules inflammatoires, et en améliorant la survie. De plus, la modulation pharmacologique *via* l'utilisation du peptide LR12 ou l'invalidation génétique de TREM-1 altère l'activation plaquettaire et prévient la formation de thrombus. Ces résultats fournissent un nouvel aperçu de la biologie TREM-1 et peuvent expliquer l'action protectrice de la modulation TREM-1 au cours des maladies inflammatoires aiguës comme le choc septique, au-delà de leurs effets sur les cellules myéloïdes. De plus, les agents modulateurs de TREM-1 tels que LR12 pourraient potentiellement être des ajouts utiles dans les thérapies antiplaquettaires dans le cadre de troubles thrombotiques.

Mots clés : TREM-1, endothélium, plaquettes, sepsis, LR12

ABSTRACT

TREM-1 (Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1) is an immunoreceptor known to be expressed by neutrophils and monocytes / macrophages. It plays a fundamental role in the amplification of the inflammatory response mediated by TLR (Toll-like receptor) engagement. Using several experimental tools, we show for the first time that TREM-1 is expressed by two other cell types: endothelial cells and platelets. The selective deletion of TREM-1 at the endothelial level protects against septic shock by reducing dysfunction and vascular inflammation, modulating the recruitment and the activation of inflammatory cells, and improves survival. In addition, pharmacological modulation *via* the use of the LR12 peptide or genetic invalidation of TREM-1 alters platelet activation and prevents the formation of thrombi. These results provide new insights on the TREM-1 biology and may explain the protective effect of the TREM-1 modulation during acute inflammatory diseases such as septic shock beyond its role on myeloid cells. In addition, TREM-1 modulating agents such as LR12 could potentially be useful additions in antiplatelet therapies for thrombotic disorders.

Key words: TREM-1, endothelium, platelets, sepsis, LR12