



HAL
open science

L'activation des polynucléaires neutrophiles au cours du choc septique

Laure Stiel

► **To cite this version:**

Laure Stiel. L'activation des polynucléaires neutrophiles au cours du choc septique. Hématologie. Université de Strasbourg, 2019. Français. NNT : 2019STRAJ069 . tel-02900895

HAL Id: tel-02900895

<https://theses.hal.science/tel-02900895>

Submitted on 16 Jul 2020

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.

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

INSERM UNISTRA, UMR 1260, Regenerative Nanomedicine

THÈSE présentée par :

Laure STIEL

soutenue le : **16 septembre 2019**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Hématologie et physiopathologie vasculaire

**L'ACTIVATION DES
POLYNUCLÉAIRES NEUTROPHILES
AU COURS DU CHOC SEPTIQUE**

THÈSE dirigée par :

M. MEZIANI Ferhat
M. MAUVIEUX Laurent

Professeur, Université de Strasbourg
Professeur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme. JOURDAIN Mercé
Mme. BORGEL Delphine

Professeur, Université de Lille
Professeur, Université de Paris-Sud

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mme. BOEHM Nelly
Mme. ZAFRANI Lara

Professeur, Université de Strasbourg
Professeur, Université de Paris Diderot

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes directeur et co-directeur de thèse, Monsieur le Professeur Ferhat Meziani et Monsieur le Professeur Laurent Mauvieux pour la direction de ces travaux, leur encadrement, et les résultats auxquels ils ont abouti. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de toute ma considération.

Un grand merci à Madame le Professeur Nelly Boehm, Madame le Professeur Delphine Borgel, Madame le Professeur Mercé Jourdain et Madame le Professeur Lara Zafrani d'avoir accepté de juger ce travail.

Je voudrais également exprimer toute ma gratitude envers les personnes qui ont rendu ce travail possible en me faisant partager leurs connaissances : Xavier Delabranche, Julie Helms, Florence Toti, Caroline Mayeur-Rousse, Anne-Cécile Galois, Delphine Rolland, Carine Gervais, Lélia Grunebaum, Christine Carapito, Aurélie Hirschler, François Séverac. Merci aussi à tous ceux qui m'ont aidée dans la réalisation de ce travail, Samir Chenaf, Hayat Allam, Vicenta Franja, Fatiha Zobairi, et toute l'équipe de techniciennes de cytométrie.

Je souhaite également remercier pour leur soutien mes collègues de médecine intensive et réanimation, du NHC et de Haute-pierre.

Enfin, j'adresse mes pensées à ceux qui m'ont toujours soutenue dans les moments difficiles : mon Sneb -je ne m'étalerai pas, les meilleurs moments se vivent et ne se racontent pas-, mes amis -pour tous les bons moments partagés-, ma famille, pour leur soutien affectif. Merci maman et papa pour la relecture attentive de ce manuscrit.

À ceux qui « soignent aussi l'injustice »

Médecins du Monde

« Quand il ne peut plus lutter contre le vent et la mer pour poursuivre sa route, il y a deux allures que peut encore prendre un voilier : la cape (le foc bordé à contre et la barre dessous) le soumet à la dérive du vent et de la mer, et la fuite devant la tempête en épaulant la lame sur l'arrière avec un minimum de toile. La fuite reste souvent, loin des côtes, la seule façon de sauver le bateau et son équipage. Elle permet aussi de découvrir des rivages inconnus qui surgiront à l'horizon des calmes retrouvés. Rivages inconnus qu'ignoreront toujours ceux qui ont la chance apparente de pouvoir suivre la route des cargos et des tankers, la route sans imprévu »

Henri Laborit, Eloge de la fuite (1976)

Table des matières

Table des matières	1
Liste des tableaux	3
Liste des figures	4
Liste des abréviations	5
Introduction	9
I. Le choc septique	14
1.1. Le choc septique : généralités	14
1.1.1. Définition, épidémiologie	14
1.1.2. Diagnostic	15
1.2. La physiopathologie du choc septique	17
1.2.1. Inflammation aiguë systémique et activation des cellules de l'immunité	17
1.2.2. Activation vasculaire aiguë : l'activation endothéliale et plaquettaire	23
1.2.3. Activation de la coagulation au cours du choc septique	26
1.2.4. Les microparticules, marqueurs de l'activation cellulaire pro-coagulante du choc septique	33
II. Les polynucléaires neutrophiles dans la réponse de l'hôte à l'infection	36
2.1. Les polynucléaires neutrophiles dans l'immunité innée	36
2.1.1. Libération médullaire des neutrophiles	36
2.1.2. Chimiotactisme	37
2.1.3. Phagocytose et dégranulation	37
2.2. Les polynucléaires neutrophiles dans l'immunité adaptative	38
2.2.1. Modulation de l'activité lymphocytaire B par les PNNs	38
2.2.2. Modulation de l'activité lymphocytaire T par les PNNs	40
2.2.3. Modulation de l'activité des cellules présentatrices d'antigènes par les PNNs	42
2.3. Les polynucléaires neutrophiles dans l'immunothrombose	43
2.3.1. Mécanismes de la NETose	44
2.3.2. Les NETs participent à la défense antimicrobienne	44
2.3.3. Les NETs participent à l'activation de la coagulation	45
III. Dysfonction des polynucléaires neutrophiles au cours du choc septique	48
3.1. Dysfonction immunitaire innée des neutrophiles et sepsis	48
3.1.1. Relargage de polynucléaires nucléaires neutrophiles incompétents	48
3.1.2. Une migration mal dirigée	49
3.1.3. Altération des fonctions de phagocytose	52
3.2. Dysfonction immunitaire adaptative au cours du choc septique	53

3.3. L'activation des neutrophiles au cours du choc septique est responsable d'une dérégulation de l'immunothrombose	56
Objectifs	63
Travaux personnels	67
Chapitre 1.....	69
Neutrophil activation during septic shock	69
Chapitre 2.....	85
Neutrophil Fluorescence: A New Indicator of Cell Activation During Septic Shock– Induced Disseminated Intravascular Coagulation.....	85
Étude de confirmation (données non publiées) :	95
Chapitre 3.....	103
Evidence of NETosis in septic shock-induced disseminated intravascular coagulation	103
Chapitre 4.....	113
First visualization of circulating Neutrophil Extracellular Traps using cell fluorescence during human septic shock-induced Disseminated Intravascular Coagulation.....	113
Chapitre 5.....	141
DIComics: une étude protéomique	141
Discussion	161
Conclusion et perspectives.....	173
Bibliographie.....	179

Liste des tableaux

Tableau 1 : Le score SOFA (<i>Sequential Organ Failure Assesment</i>) d'après (Vincent et al., 1996).....	15
Tableau 2 : Le score Quick SOFA d'après (Singer et al., 2016).....	16
Tableau 3: Les scores diagnostiques de la coagulopathie et de la CIVD du choc septique d'après (Iba et al., 2019b, 2016; Taylor et al., 2001).....	30
Tableau 4: Marqueurs de surface des MPs spécifiques de la cellule émettrice d'après (McVey et al., 2012).....	34
Tableau 5 : Caractéristiques des patients à l'admission.....	98
Tableau 6: Caractéristiques des patients	150

Liste des figures

Figure 1: Signalisation par les TLRs (d'après (Kumar et al., 2013)).....	18
Figure 2: Rôle de l'immunité adaptative dans le choc septique (d'après (Aziz et al., 2013)) .	20
Figure 3 : SIRS et CARS (d'après (Hotchkiss et al., 2013) et (Gentile et al., 2012)).....	21
Figure 4: Dysfonction endothéliale au cours du choc septique d'après (Boisramé-Helms et al., 2013) et (Vallet, 2003)	24
Figure 5: Rôle des plaquettes dans la réponse immunitaire	26
Figure 6: L'activation de la coagulation au cours des états septiques.....	28
Figure 7: Les polynucléaires modulent l'activité lymphocytaire B d'après (Stiel et al., 2017)	39
Figure 8: Les polynucléaires neutrophiles modulent l'activité lymphocytaire T et les cellules dendritiques d'après (Stiel et al., 2017).....	40
Figure 9: Voies de la NETose d'après (Brinkmann and Zychlinsky, 2012).....	43
Figure 10: L'immunothrombose, un mécanisme de défense locale en réponse à l'infection d'après (Stiel et al., 2017)	47
Figure 11: Dysfonction de la réponse immunitaire immune au cours du choc septique d'après (Stiel et al., 2017)	51
Figure 12: Les polynucléaires neutrophiles modulent l'activité lymphocytaire T et les cellules dendritiques d'après (Stiel et al., 2017).....	54
Figure 13: L'immunothrombose dérégulée d'après (Stiel et al., 2017)	61
Figure 14: La CIVD est associée à une augmentation de la fluorescence des PNN quel que soit le fluorochrome utilisé.....	100
Figure 15: L'augmentation de la fluorescence des neutrophiles NEUT-SFL est spécifique de la CIVD du choc septique chez les patients de réanimation.	101
Figure 16: Préparation des échantillons pour analyse protéomique (in gel stacking).....	146
Figure 17:Caractéristiques hématologiques des patients.....	151
Figure 18: Analyse par regroupement hiérarchique non supervisé sur la base des 1721 protéines présentes dans 70% des échantillons	152
Figure 19 : Analyses bioinformatiques des protéines exprimées différemment chez les patients en choc septique sans CIVD par rapport aux témoins	153
Figure 20 : Analyses bioinformatiques des protéines différemment exprimées chez les patients en choc septique avec CIVD par rapport aux témoins.....	154
Figure 21:Analyses bioinformatiques des protéines différemment exprimées chez les patients en choc septique avec CIVD par rapport aux patients en choc septique sans CIVD.	155
Figure 22: Analyse en GO termes des protéines de neutrophile sous exprimées au cours de la CIVD.	157
Figure 23: Analyse en GO termes des protéines de neutrophile sur-exprimées au cours de la CIVD.	158
Figure 24: Représentation des réseaux d'association fonctionnelle des protéines différemment exprimées.....	159

Liste des abréviations

Ac : anticorps

ACN : acétonitrile

ADN : acide désoxyribonucléique

AF : acide formique

Ag : antigène

AGC : contrôle automatique de gain

AT : antithrombine

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

AT : antithrombine

CD : cluster de différenciation

CIVD : coagulation intravasculaire disséminée

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : cellules présentatrices d'antigènes

CQ : contrôle qualité

CXCR : récepteur aux chémokines

DAMPs : *damaged associated molecular patterns*

DD : D-dimères

ERN : espèces réactives de l'azote

ERO : espèces réactives de l'oxygène

FDR : *False Discovery Rate*

FM : facteur numéro M (M est un chiffre romain)

fMLP : formylmethionyl-leucyl-phenylalanine

FT : facteur tissulaire

iNOS : NO synthétase inductible

IL : interleukine

ISTH : *International Society on Thrombosis and Haemostasis*

JAAM : *Japanese Association for Acute Medicine*

LBP : *lipopolysaccharide binding protein*

LFQ : *label free quantification*

LPS : lipopolysaccharide

MAMPs : *microbe associated molecular patterns*

MAP-k : *mitogen-activated protein kinase*

MGG : May Grünwald Giemsa

MPO : myéloperoxidase

MPs : microparticules

NE : neutrophile élastase

NETs : *Neutrophil Extracellular Traps*

NF-κB : *nuclear factor-kappa B*

NO : monoxyde d'azote

PAD4 : peptidylarginine-déiminase 4

PAI-1 : *plasminogen activator inhibitor-1*

PAMPs : *pathogen associated molecular patterns*

PAR : récepteur associé aux protéases

PCa : protéine C activée

PhtdSer : phosphatidylsérine

PMA : *phorbol-myristate-acetate*

PNN : polynucléaires neutrophiles

Ppm : *parts per million*

PRR : *pattern recognition receptor*

RANTES : *Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted*

SAPS2 : *Simplified Acute Physiology Score*

SIC : *sepsis-induced coagulopathy*

SIRS : *systemic inflammatory response syndrome*

SOFA : *Sepsis-related Organ Failure Assessment*

TFPI : *tissue factor inhibitor*

TLR : *toll like receptor*

TM : thrombomoduline

TP : taux de prothrombine

Introduction

Le choc septique correspond à la forme la plus grave de la réponse de l'hôte à une infection par un micro-organisme pathogène (Angus and van der Poll, 2013). S'il s'agit d'un syndrome décrit depuis l'antiquité, le choc septique reste associé à une mortalité élevée qui traduit une compréhension encore trop incomplète des mécanismes sous-jacents (Annane et al., 2005; Funk et al., 2009). L'évolution de la définition du choc septique vers une description phénotypique illustre ces interrogations: le choc septique correspond ainsi à un sepsis associé à une hypotension artérielle persistante chez un patient euvoémique nécessitant l'introduction d'un support vasopresseur, et à une lactatémie ≥ 2 mmol/L (Singer et al., 2016). D'un point de vue physiopathologique, l'invasion par un pathogène et sa dissémination dans l'organisme a longtemps semblé le *primum movens* du choc septique (Angus and van der Poll, 2013). Néanmoins, malgré le développement de traitements anti-infectieux efficaces permettant l'éradication du pathogène s'intégrant à une prise en charge précoce et optimale, la mortalité du choc septique reste élevée (Quenot et al., 2013). La physiopathologie du choc septique semble ainsi caractérisée par une réponse inflammatoire systémique exagérée et inappropriée de l'hôte à une infection aiguë médiée par les cellules immunitaires plus qu'à la pathogénicité du micro-organisme (Parrillo, 1993; Thomas, 1972).

La réponse inflammatoire de l'hôte qui résulte de l'infection est associée à une activation de la coagulation. Lorsque les mécanismes régulateurs sont dépassés, l'activation de la coagulation peut évoluer vers la coagulation intravasculaire disséminée (CIVD). Environ un tiers des malades en choc septique développe ce syndrome associé à une surmortalité. D'un point de vue physiopathologique, la CIVD est caractérisée par une formation excessive de thrombine et de fibrine à l'origine de la formation de *microthrombi* et de la consommation des facteurs de la coagulation (Fourrier, 2012; Levi, 2010).

À l'échelle cellulaire, la CIVD du choc septique est caractérisée par une intense activation de l'ensemble des cellules du compartiment vasculaire (Delabranche et al., 2013). Dans un travail précédent, notre équipe a mis en évidence les microparticules (MPs) comme marqueurs de cette activation, mettant en évidence une activation endothéliale (MPs endothéliales CD105) mais aussi leucocytaire (MPs CD11a) au cours de la CIVD (Delabranche et al., 2016, 2013).

Parmi les leucocytes, les polynucléaires neutrophiles (PNNs) sont des acteurs précoces de la réponse immunitaire innée de l'hôte à l'infection (Borregaard, 2010; Nathan, 2006). Après migration par chimiotactisme sur le site de l'infection, les PNNs sont activés et deviennent

capables de capturer le pathogène par phagocytose et de relarguer le contenu de leurs granules (Brown et al., 2006; Nordenfelt and Tapper, 2011). Ils participent ainsi à la clairance microbienne, mais sont dans le même temps à l'origine d'un état hyper-inflammatoire pouvant contribuer à l'apparition de lésions tissulaires (Brown et al., 2006).

Plus récemment, il a été mis en évidence que les PNNs participent à la réponse précoce à l'infection par régulation de la réponse lymphocytaire notamment au niveau splénique (Mócsai, 2013). Les neutrophiles sont également capables de relarguer le contenu de leur noyau, acide désoxyribonucléique (ADN) et histones modifiées, sous forme d'une maillasse qui supporte des enzymes comme la myéloperoxydase (MPO) et la neutrophile élastase (NE). Ces structures, appelées *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs), capturent des pathogènes et des cellules sanguines circulantes dans leur filet (Brinkmann et al., 2004). Les NETs participent ainsi à la défense immunitaire de l'hôte. Ils forment aussi une vaste surface pro-coagulante, en activant la phase contact de la coagulation (Iba et al., 2014).

Les PNNs sont aussi capables de modifier le profil membranaire des cellules vasculaires, notamment endothéliales par la sécrétion de cytokines et de médiateurs pro-inflammatoires. Ils contribuent ainsi à la dysfonction cellulaire du choc septique et à la coagulopathie (Brown et al., 2006; Fang et al., 2015).

Les PNNs, notamment par le phénomène de NETose, pourraient donc jouer un rôle fondamental dans les interactions entre immunité et thrombose (Fuchs et al., 2010; Martinod and Wagner, 2014). Ces deux phénomènes ont été récemment réunis sous le terme d'« immunothrombose » (Engelmann and Massberg, 2013). L'immunothrombose désigne une réponse immunitaire innée intravasculaire à l'origine de la génération de thrombine et de la formation de *thrombi*, notamment dans les micro-vaisseaux. C'est un mécanisme de défense indépendant qui permet la reconnaissance des pathogènes, leur endiguement, puis leur destruction grâce à l'activation de la coagulation et au recrutement des cellules immunitaires (Engelmann and Massberg, 2013).

L'immunothrombose participe à la reconnaissance des pathogènes et à la défense de l'hôte, son activation incontrôlée au cours du choc septique pourrait devenir délétère pour l'hôte en favorisant notamment l'évolution vers la CIVD (Fourrier, 2012; Levi, 2010; Singer et al., 2016).

À la lumière de ces éléments, la compréhension des mécanismes d'activation des polynucléaires neutrophiles au cours du choc septique pourrait permettre de mieux appréhender la dysfonction vasculaire du choc septique et la réponse de l'hôte associant immunité et thrombose. C'est l'objectif de ce travail de thèse.

Ce manuscrit articule des données de recherche clinique et expérimentale.

Le premier travail, mené chez cent patients en choc septique, identifie la fluorescence des neutrophiles comme un nouvel indicateur d'activation cellulaire au cours de la coagulation intravasculaire disséminée du choc septique. Dans ce travail, la fluorescence des neutrophiles comme marqueur d'activation du neutrophile apparaît comme un outil diagnostique intéressant de la CIVD du choc septique.

J'ai poursuivi ce travail par l'étude d'un des phénomènes biologiques associés à cette fluorescence, la NETose, plaçant ainsi le neutrophile comme un élément clef de la dysfonction vasculaire du choc septique à l'interaction entre immunité et thrombose.

J'ai ensuite confirmé l'implication de la NETose dans la CIVD du choc septique par la visualisation directe du phénomène dans le sang de patients.

Enfin, par une approche protéomique, la dernière partie de ce travail de thèse cherche à identifier de façon plus large les mécanismes intracellulaires impliqués dans l'activation des PNNs au cours du choc septique.

Les résultats obtenus identifient certains mécanismes d'activation des PNNs au cours du choc septique, à la fois comme potentiels marqueurs diagnostics et comme cibles thérapeutiques.

Avant de présenter ces différents travaux de recherche, je rappellerai la définition de l'état de choc septique et l'intense activation cellulaire qui le caractérise. L'introduction de ce manuscrit présentera ensuite les polynucléaires neutrophiles comme acteurs de l'immunité innée et adaptative, puis leur place dans l'immunothrombose. Je proposerai ensuite une approche physiopathologique du choc septique intégrant le neutrophile comme élément « central » de la dysfonction vasculaire du choc septique associant immunité et thrombose à partir de laquelle une revue de la littérature a été publiée.

I. Le choc septique

1.1. Le choc septique : généralités

1.1.1. Définition, épidémiologie

Le sepsis et le choc septique représentent deux stades de gravité de l'infection. Au cours d'un épisode infectieux, l'évolution vers le sepsis voire le choc septique semble dépendante des capacités de réponse de l'hôte plus que du pathogène (Parrillo, 1993). Le sepsis résulte ainsi d'une réponse inadaptée de l'hôte à l'infection se traduisant par une hypoperfusion tissulaire avec dysfonction d'organes et défaillance viscérale menaçant le pronostic vital (Singer et al., 2016). La dysfonction d'organe au cours du sepsis est mesurée à l'aide du score SOFA (*Sequential Organ Failure Assesment*) (Vincent et al., 1996). C'est sur ce score que repose la définition du sepsis dans la dernière conférence de consensus: le sepsis est infection suspectée ou prouvée à l'origine d'une dysfonction d'organe non préexistante à l'infection, identifiée par un score SOFA supérieur ou égal à 2 (Singer et al., 2016). Le sepsis est une affection grave responsable d'une mortalité d'environ 10% (Fleischmann et al., 2016; Seymour et al., 2016).

Le choc septique correspond à la forme la plus grave d'une infection par un pathogène. Cliniquement, il se caractérise par une hypotension artérielle réfractaire au remplissage vasculaire nécessitant le recours à des drogues vasopressives pour maintenir une pression artérielle moyenne supérieure ou égale à 65 mmHg. Biologiquement, l'hypotension artérielle persistante est associée à une hyperlactatémie supérieure à 2 mmol/L (Shankar-Hari et al., 2016) reflétant l'hypoperfusion tissulaire et la dérégulation du métabolisme aérobie (Kraut and Madias, 2014), et corrélée à la gravité et à une surmortalité (Casserly et al., 2015). En France, l'incidence du choc septique est de 50 cas pour 100 000 habitants par an (Quenot et al., 2013) et serait en augmentation au cours des dernières années, du fait du vieillissement de la population et d'une meilleure reconnaissance du choc septique (Gaieski et al., 2013). Malgré un traitement étiologique adapté, c'est-à-dire le traitement anti-infectieux, associé à une prise en charge symptomatique optimale par la suppléance des organes défaillants, la mortalité reste élevée de l'ordre de 42% à 28 jours (Quenot et al., 2013). Le choc septique serait ainsi à l'origine de 6 millions de décès par an dans le monde (Fleischmann et al., 2016),

et représente un réel enjeu de santé public. L'Organisation Mondiale de la Santé a ainsi défini en 2017 la prévention, le diagnostic et la prise en charge du sepsis comme une priorité en terme de santé publique (Reinhart et al., 2017).

1.1.2. Diagnostic

Si l'on se réfère aux définitions préalablement présentées, le clinicien peut poser le diagnostic de sepsis chez un patient présentant une infection associée à une défaillance d'organe évaluée par un score SOFA résumé dans le tableau 1 (Singer et al., 2016; Vincent et al., 1996). Le diagnostic de sepsis est retenu si le score SOFA est supérieur ou égal à 2. Néanmoins, de par les différents items qu'il réunit, ce score est difficilement applicable au lit du malade.

Points	0	1	2	3	4
PaO ₂ /FiO ₂	≥400	<400	<300	<200	<100
Plaquettes (G/L)	≥150	<150	<100	<5	<20
Bilirubine (µmol/L)	<20	20-32	22-101	102-204	>204
PAM (mmHg)	≥70mmHg	<70mmHg	Dobutamine ou Dopamine <5	Dobutamine 5-15 ou adrénaline/noradrénaline ≤0,1	Dobutamine >15 ou adrénaline/noradrénaline >0,1
Amines (µg/kg/min)					
Score de Glasgow	15	13-14	10-12	6-9	<6
Créatinine (µmol/L)	<110	110-170	171-299	300-440	>440

Tableau 1 : Le score SOFA (*Sequential Organ Failure Assesment*) d'après (Vincent et al., 1996)

Afin de faciliter le diagnostic de sepsis, un SOFA « simplifié » ou quick SOFA a été créé et comprend 3 items (tableau 2) : la fréquence respiratoire, l'état de conscience et la pression artérielle systolique. La présence d'au moins 2 critères a la même valeur prédictive de sepsis que le SOFA ≥ 2, et facilite un diagnostic précoce (Singer et al., 2016). Le diagnostic de choc septique sera posé si les signes d'hypoperfusion persistent malgré une expansion volémique bien menée, nécessitant l'introduction d'un support vasopresseur, associé à une hyperlactatémie.

Fréquence respiratoire $\geq 22/\text{min}$

Troubles de la conscience : score de Glasgow < 15

Pression artérielle systolique $\leq 100 \text{ mmHg}$

Tableau 2 : Le score Quick SOFA d'après (Singer et al., 2016)

En pratique clinique, l'utilisation de ces scores reste marginale et le diagnostic est posé sur un faisceau d'arguments cliniques traduisant une défaillance circulatoire associée à des dysfonctions d'organe. Ainsi, le malade est hypotendu (pression artérielle moyenne $< 65\text{mmHg}$), tachycarde (fréquence cardiaque ≥ 120 battements/minute), oligurique (diurèse $< 0,5\text{mL/kg/h}$ pendant 2 heures) et polypnéique (fréquence respiratoire ≥ 22 cycles/minute). Le patient peut être fébrile, ou à l'opposé hypotherme, avec parfois des frissons. Les autres signes cliniques traduisent les défaillances des différents organes : l'hypoperfusion cérébrale est responsable d'un tableau d'encéphalopathie dite septique associant à des degrés variables une agitation, une torpeur ou une confusion. Au niveau périphérique, le patient est marbré, ses extrémités sont froides.

Sur le plan biologique, il n'existe aucun marqueur spécifique du choc septique (Faix, 2013). En effet, si le choc septique comprend par définition une hyperlactatémie $\geq 2\text{mmol/L}$, ce marqueur traduit l'hypoperfusion tissulaire mais est aspécifique. Des éléments paracliniques sont néanmoins évocateurs du diagnostic, notamment le syndrome inflammatoire. Celui-ci se traduit par une hyperleucocytose, ou *a contrario* une leuco- neutropénie, associée à une élévation des protéines de l'inflammation, comme la protéine C réactive ou la procalcitonine (Beqja-Lika et al., 2013; Faix, 2013). D'autres perturbations du bilan biologique sont fréquemment associées au choc septique, traduisant les défaillances d'organes par exemple rénale ou hépatique ou bien les stigmates de CIVD. La preuve de l'infection n'est possible que par l'identification microbiologique, ce qui est le cas chez 70% des malades (Quenot et al., 2013).

1.2. La physiopathologie du choc septique

Si les premières descriptions du choc septique datent du IV^{ème} siècle avant JC, il n'en demeure pas moins un des syndromes les plus complexes et insaisissables (Funk et al., 2009). Sa physiopathologie est multifactorielle et caractérisée par une activation incontrôlée et excessive de différents mécanismes de défense cellulaire que je détaillerai successivement.

1.2.1. Inflammation aiguë systémique et activation des cellules de l'immunité

La reconnaissance du micro-organisme pathogène par les cellules de l'immunité innée induit la sécrétion massive de médiateurs pro-inflammatoires, appelée « orage cytokinique » (Aziz et al., 2013). Après interaction avec le pathogène, les cellules de l'immunité adaptative libèrent à leur tour des cytokines, certaines entretenant l'état hyper-inflammatoire tandis que d'autres le contrebalancent.

Reconnaissance du pathogène en réponse à l'infection : réponse immunitaire innée

L'invasion par un pathogène entraîne une réponse immédiate de l'organisme agressé *via* la mise en jeu de l'immunité innée. Dès 1989, Janeway avait proposé la reconnaissance de motifs moléculaires conservés associés aux pathogènes par les cellules immunitaires de l'hôte. La reconnaissance du pathogène implique la détection de signaux de danger, les PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*) ou MAMPs (*microbe associated molecular patterns*) exprimés à la surface des pathogènes, notamment le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries gram négatif ou l'acide lipotéichoïque, et les DAMPs, (*damaged associated molecular patterns*), signaux endogènes exprimés après contact avec le pathogène (Tang et al., 2012). La reconnaissance des PAMPs et des DAMPs se fait par des récepteurs transmembranaires spécifiques, les PRR (*pattern recognition receptors*), dont les TLRs (*toll like receptors*), exprimés à la surface des cellules immunitaires, comme les macrophages, les cellules présentatrices d'antigènes (Ag) ou les lymphocytes (Kumar and Bot, 2013). La formation du complexe TLR-ligand active des voies de signalisation intracellulaire, responsables de la réponse immunitaire innée (Takeda et al., 2003). Cette cascade aboutit à l'activation de facteurs de transcription, tel que le NF- κ B (*nuclear factor-kappa B*) (Kumar et al., 2013) (Figure 1).

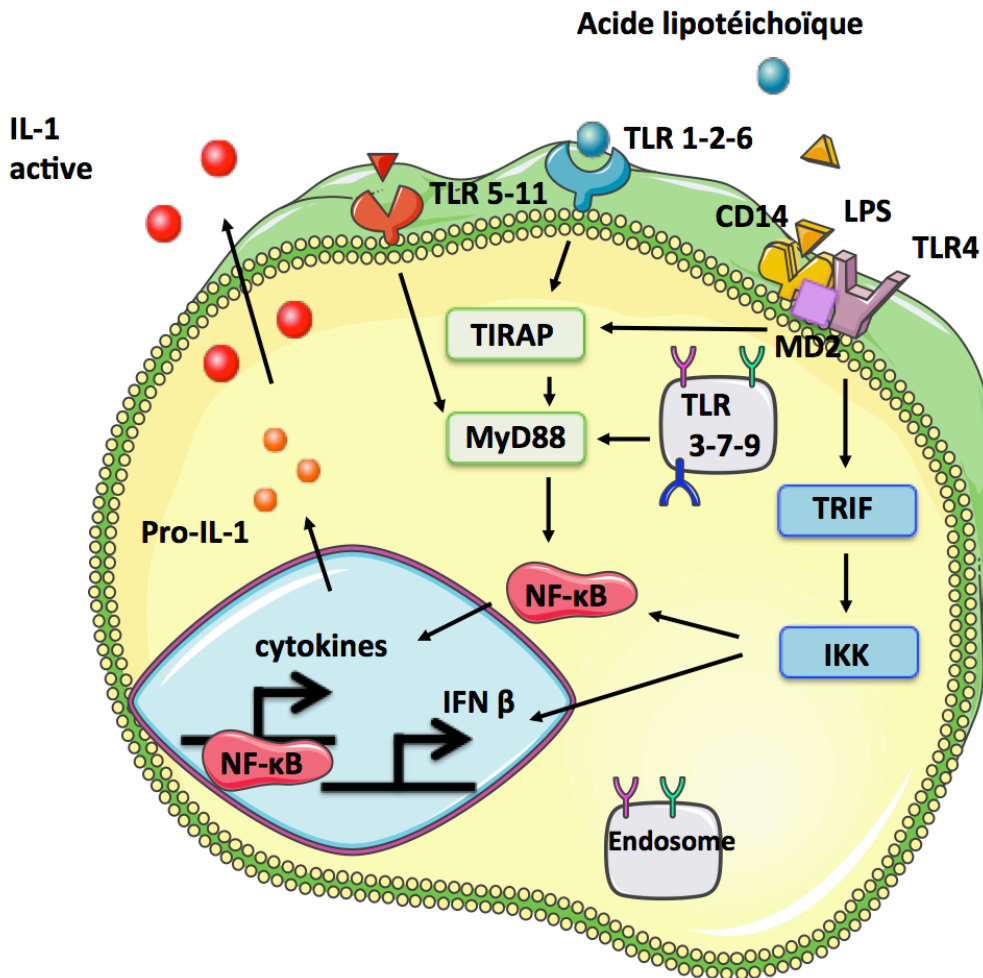


Figure 1: Signalisation par les TLRs (d'après (Kumar et al., 2013))

Les cellules immunitaires possèdent des TLRs membranaires (TLR-1, -2, -4, -5, -6, -11) et endosomaux (TLR-3, -7, -9). Après liaison de leurs ligands, les TLRs induisent une voie de signalisation permettant l'activation de NF-κB par l'intermédiaire de MyD88. Les TLR-1, -2 et -6 activent les TIRAP (*Toll/IL-1R domain-containing adaptor protein*) comme premier intermédiaire. Le TLR-4 recrute également TRIF (*TIR-containing adaptor inducing interferon β*), qui permet la transcription des gènes de l'interféron β (IFN-β) par une voie indépendante de MyD88.

Le NF-κB active la transcription de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires, telles l'interleukine-1 (IL-1) et l'interleukine-12 (IL-12). Le NF-κB est également activé par la voie du LPS-TLR4 et entraînerait ainsi la transcription des gènes de l'interféron β (Park et al., 2009). Cytokines et interféron β auto-amplifient la boucle d'activation (Gautier et al., 2005). L'activation simultanée de plusieurs TLRs est nécessaire à la reprogrammation des cellules immunitaires vers un phénotype pro-inflammatoire (Suet Ting Tan et al., 2013). En réponse à ces modifications transcriptionnelles, les cellules immunitaires libèrent des peptides antimicrobiens (interféron β, Tumor Necrosis Factor α TNFα, IL-6, IL-8, IL-1...), activent le complément et recrutent d'autres cellules circulantes, notamment les neutrophiles, qui migreront par chimiotactisme sur le site de l'infection.

Au cours du choc septique, la reconnaissance du LPS par le TLR4 est un des principaux mécanismes de défense de l'hôte (Bosmann and Ward, 2013). Les monocytes et les macrophages reconnaissent le LPS qui se lie à sa protéine de liaison *LPS Binding Protein* (LBP) jusqu'à son récepteur. Le complexe LPS-LBP se lie à son récepteur, le CD14, co-récepteur du TLR4, exprimé à la surface des cellules myéloïdes. La protéine adaptatrice MD2 permet la formation du complexe CD14/TLR4 et initie la transduction du signal notamment la voie de signalisation NF- κ B entraînant la sécrétion de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (Guha and Mackman, 2001).

Le polymorphisme génétique au niveau des protéines impliquées dans la reconnaissance du pathogène pourrait être un des éléments explicatifs de la susceptibilité de certains individus à l'infection. Ainsi, certaines mutations impliquant notamment le TLR4 et diminuant son interaction avec le LPS ont notamment été identifiées comme facteur de risque de choc septique en cas d'infection par un bacille gram négatif (Lorenz et al., 2002).

Réponse immunitaire adaptative

La reconnaissance des pathogènes est médiée par les cellules de l'immunité innée. De façon un peu décalée, les cellules de l'immunité adaptative permettant la prolifération de cellules effectrices spécifiques basée sur la reconnaissance spécialisée de l'antigène (Ag) par des cellules spécialisées. Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) sont des cellules nucléées capables d'endocyter des Ag, de les dégrader, puis de les exprimer à leur surface en association au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type 2, induisant ainsi le contact avec les lymphocytes T naïfs (Th0) qui circulent entre les organes lymphoïdes secondaires. Après contact avec leur Ag spécifique exposé par les CPA, les lymphocytes Th0 se différencient en lymphocytes T effecteurs Th1 et Th2, qui subissent une expansion clonale avec spécificité antigénique (Verbist et al., 2012). Les Th1 relarguent des cytokines (interleukines IL-2, IL-12, leucotriènes, Tumor Necrosis Factor TNF α ,...), qui assurent la défense contre les pathogènes extracellulaires par la production d'anticorps et stimulent l'activité microbicide des macrophages envers les pathogènes intracellulaires. Les Th2 ont un rôle immunomodulateur par l'intermédiaire de médiateurs humoraux (IL-4, IL-5, IL-9...) (Figure 2).

Le profil lymphocytaire évolue au cours du choc septique : à une première phase où les lymphocytes expriment préférentiellement un phénotype Th1, succède un profil Th2 qui participe à l'immunosuppression post-septique (Aziz et al., 2013; Verbist et al., 2012). Il existe un troisième phénotype, les lymphocytes Th17 qui relarguent préférentiellement l'IL-17A, impliquée dans l'interaction entre lymphocytes et phagocytes (Weaver et al., 2007).

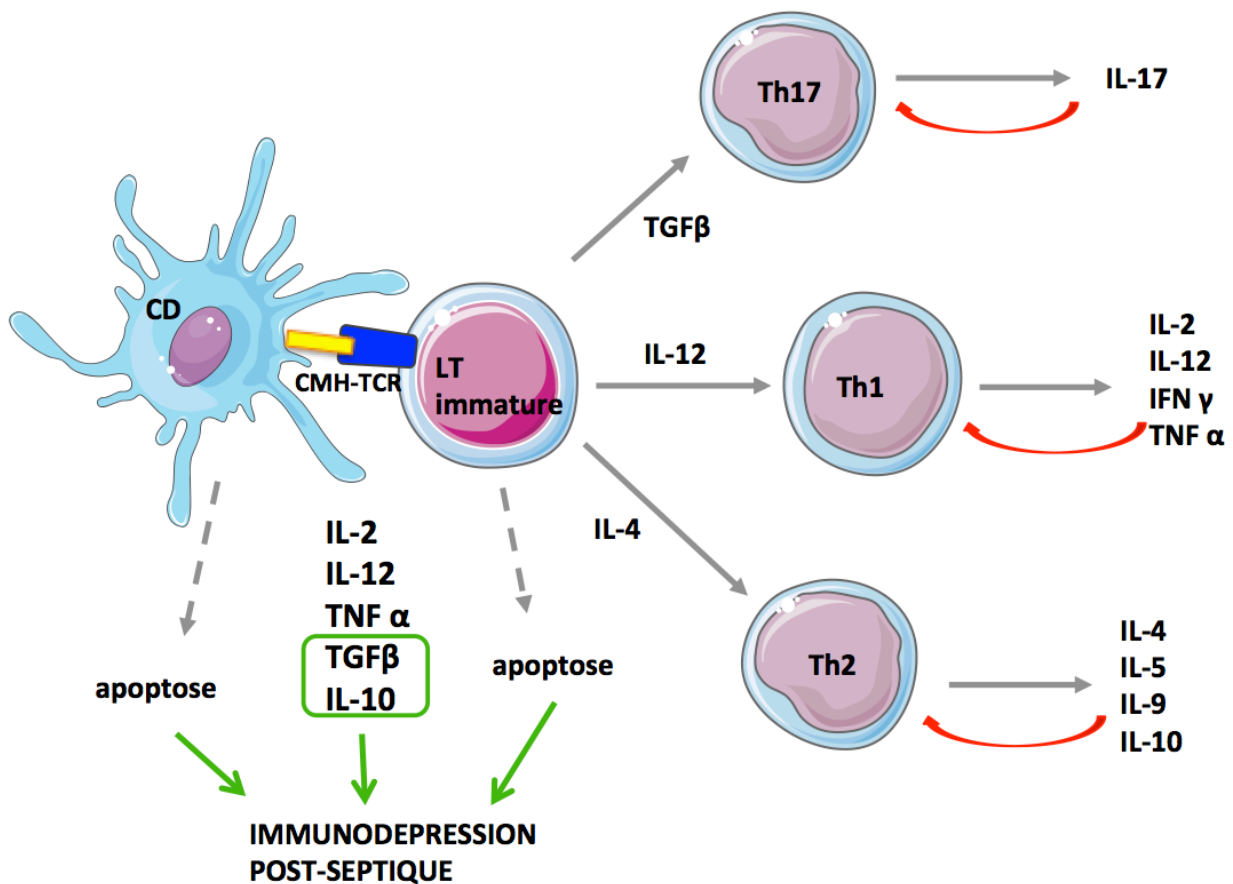


Figure 2: Rôle de l'immunité adaptative dans le choc septique (d'après (Aziz et al., 2013))

Les cellules dendritiques préalablement activées par l'interaction avec le pathogène activent les lymphocytes T immatures Th0. Les lymphocytes T immatures se différencient soit en lymphocytes Th1 capables de sécréter de l'IL17, de l'IL-2, de l'IL-12, de l'IFN et du TNF α , soit en lymphocytes Th2 capables de sécréter de l'IL-4, IL-5, IL-9, IL-10. Au cours du choc septique, l'apoptose des cellules immunitaires et certaines cytokines anti-inflammatoires contribuent à l'évolution vers un état d'immunodépression secondaire. CD : cellules dendritiques, CMH : complexe majeur d'histocompatibilité, IFN : interféron, IL : interleukine, LT : lymphocyte T, TCR : récepteur des lymphocytes T, TGF : *transforming growth factor*, TNF : *tumor necrosis factor*

Orage cytokinique

L'interaction des cellules immunitaires avec les pathogènes est à l'origine d'un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS, *systemic inflammatory response syndrom*), non spécifique de l'état infectieux (Angus and van der Poll, 2013). Le SIRS est caractérisé par la libération de cytokines, chémokines, peptides vasoactifs et médiateurs lipidiques aux propriétés pro-inflammatoires (Bone, 1996). Ces molécules, aux fonctions chimiotactiques, sont à l'origine du recrutement et de la séquestration des cellules immunitaires innées, macrophages et polynucléaires neutrophiles, sur le site de l'infection (Zarbock and Ley, 2008). Elles participent ainsi à la première ligne de défense immunitaire mais majorent l'inflammation induisant des lésions tissulaires (Figure 3).

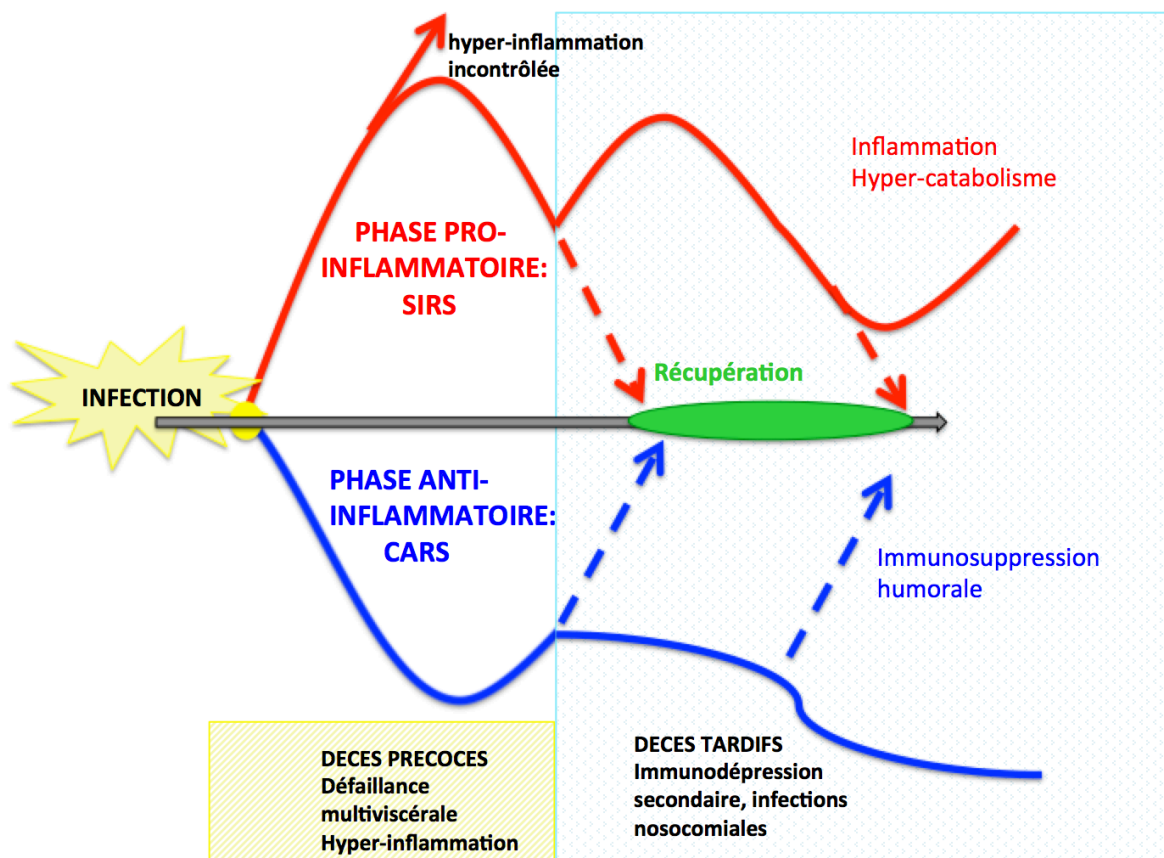


Figure 3 : SIRS et CARS (d'après (Hotchkiss et al., 2013) et (Gentile et al., 2012))

Le choc septique est caractérisé par une réponse immune inflammatoire ou SIRS (en rouge) et anti-inflammatoire ou CARS (en bleu). Les décès à la phase précoce (jusqu'au troisième jour) sont secondaires à l'orage cytokinique responsable d'un choc vasoplégique et de défaillance multiviscérale. Certains patients survivent et recouvrent des fonctions immunitaires satisfaisantes. D'autres développent une immunosuppression post-septique à l'origine d'une surmortalité à distance du choc.

Des médiateurs anti-inflammatoires contrebalancent ces effets pro-inflammatoires : c'est le CARS, *compensatory anti-inflammatory response syndrome* (Adib-Conquy and Cavaillon, 2009; Bone, 1996). Le CARS serait à l'origine d'une immunodépression post-septique notamment expliquée par une apoptose splénique lymphocytaire B et T (clusters de différenciation CD4 et 8 principalement) (Munford and Pugin, 2001). Cette immuno-paralysie au décours du choc septique, qui se traduit par une lymphopénie, une anergie cutanée et surtout une incidence accrue des infections nosocomiales, serait responsable d'une surmortalité à distance (Voll et al., 1997).

Stress oxydant et nitrosant

En *sus* des médiateurs de l'inflammation, les cellules immunitaires participent au déséquilibre de la balance d'oxydo-réduction. Ce déséquilibre est secondaire à l'utilisation d'oxygène dans la chaîne respiratoire mitochondriale au cours du métabolisme anaérobie qui donne lieu à une libération excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERN) (Suet Ting Tan et al., 2013; Taylor and Piantadosi, 1995). Ce phénomène est concomitant d'un déficit des systèmes protecteurs antioxydants. Les ERO portent des radicaux libres et des dérivés peroxidés capables d'interagir avec les acides nucléiques et les protéines constitutives de la cellule induisant des lésions cellulaires (Taylor and Piantadosi, 1995). Ces dommages cellulaires altèrent le fonctionnement de l'endothélium et les interactions entre les différentes cellules (endothéliales, plaquettaires et leucocytaires) du compartiment vasculaire (Trzeciak et al., 2008). Les *stimuli* oxydants et nitrosants diminuent de cette façon l'extraction tissulaire de l'oxygène induisant des lésions hypoxiques des tissus (Taylor and Piantadosi, 1995; Vincent and De Backer, 2005).

Le stress oxydant est aussi médié par l'activation des autres cellules du secteur vasculaire. Aussi, l'activation leucocytaire, en particulier, neutrophilique, à laquelle je consacrerai la deuxième partie de cette introduction, s'accompagne d'une activation des autres cellules du compartiment vasculaire, notamment l'endothélium et les plaquettes. Cette réaction d'abord localisée, peut devenir systémique. L'activation cellulaire vasculaire participe aussi à l'activation de la coagulation.

1.2.2. Activation vasculaire aiguë : l'activation endothéliale et plaquettaire

Activation endothéliale aiguë

Les cellules endothéliales sont parmi les premières à s'activer en réponse à l'infection. L'importance de la réponse endothéliale à l'infection vient de son rôle de « barrière » entre le sang et les tissus, qui permet des échanges contrôlés entre les deux secteurs. Les cellules endothéliales sont ainsi sensibles aux modifications physiques (hypoxie, cisaillement...) ou chimiques (composés bactériens) du milieu extracellulaire. La réponse des cellules endothéliales à ces *stimuli* peut être contenue et adaptée, c'est l'activation endothéliale, ou *a contrario* excessive et inadaptée, c'est la dysfonction endothéliale (Boisramé-Helms et al., 2013).

A l'échelle moléculaire, l'activation endothéliale est caractérisée par une augmentation de production de molécules d'adhésion à l'origine d'une perte des propriétés anti-adhésives et anti-agrégantes (Trzeciak et al., 2008). L'endothélium acquiert un phénotype pro-coagulant et anti-fibrinolytique du fait d'une surexpression du facteur tissulaire (FT) et d'une diminution de l'expression de la thrombomoduline (TM) (Boisramé-Helms et al., 2013; Vincent and De Backer, 2001). Cette modification du phénotype endothélial favorise l'adhésion leucocytaire et plaquettaire (Vallet, 2003) (Figure 4). La perméabilité de l'endothélium est également modifiée par l'internalisation de protéines des jonctions serrées telle la cadhérine endothéliale vasculaire (VE-cadhérine) : il en résulte une fuite de liquide vers l'espace intercellulaire à l'origine d'une hypovolémie intravasculaire, de l'apparition d'un troisième secteur, et d'une altération de l'extraction périphérique d'oxygène responsable d'une hypoxémie tissulaire. (Schouten et al., 2008; Vallet, 2003; Vincent and De Backer, 2005).

Ces modifications s'ajoutent aux altérations fonctionnelles induites par les *stimuli* inflammatoires et les ERO/ERN (Trzeciak et al., 2008). Ces molécules, tout comme certains composants bactériens tel le LPS altèrent les voies de signalisation intracellulaire endothéliale (Tymml et al., 2001; Wu et al., 2001), notamment par l'induction d'une enzyme, la NO synthétase (iNOS) (Ding et al., 1988; Walford and Loscalzo, 2003). La NO synthétase permet la synthèse de monoxyde d'azote (NO) à partir de la L- arginine. Il existe plusieurs isoformes de cette enzyme. iNOS est exprimée par l'endothélium et les cellules musculaires lisses (Barbato and Tzeng, 2004). Le NO est une molécule à demi-vie très courte qui existe en faible

quantité chez l'individu sain dont les effets sont limités aux cellules de voisinage (Cauwels, 2007). Le NO est un puissant vasodilatateur, qui se lie à la guanylate cyclase soluble dans le cytosol des cellules musculaires lisses et entraîne une diminution du calcium intracellulaire, d'où une relaxation des cellules musculaires lisses (Horowitz et al., 1996). Au cours du choc septique, l'induction majeure de la transcription d'iNOS entraîne une synthèse importante de NO, participant à la vasoplégie du choc septique et à la nécessité de recourir aux drogues vasopressives (Cauwels, 2007).

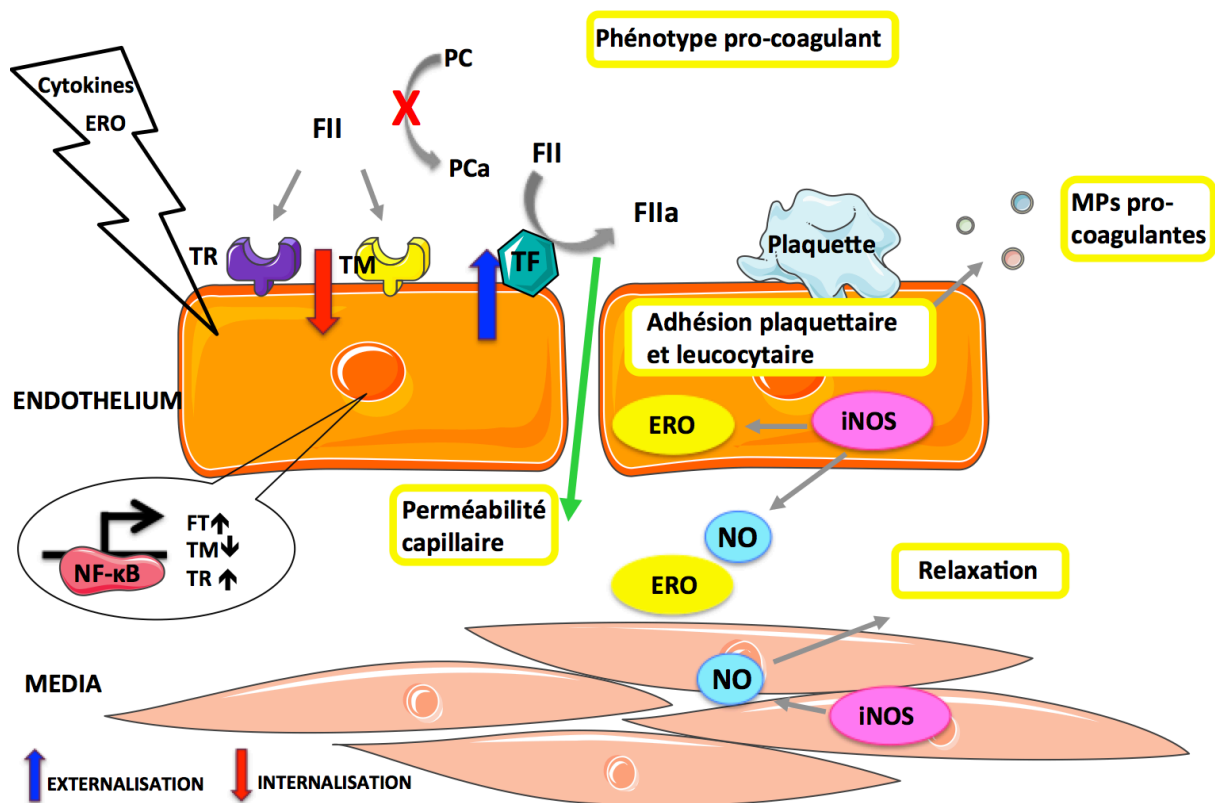


Figure 4: Dysfonction endothéliale au cours du choc septique d'après (Boisramé-Helms et al., 2013) et (Vallet, 2003)

Au cours du choc septique, la TM et le récepteur à la thrombine, normalement présents à la surface de la cellule endothéliale, sont internalisés alors que le FT est externalisé : la production de PCa est effondrée, l'endothélium devient pro-coagulant. Parallèlement, il existe une hyperperméabilité des jonctions cellulaires, des MPs pro-coagulantes sont émises et l'adhésion des cellules sanguines circulantes est augmentée. NF-κB et iNOS sont activées.

CML : cellule musculaire lisse, ERO : espèces réactives de l'oxygène, FII : thrombine, FIIa : thrombine activée, FT : facteur tissulaire, iNOS : NO synthétase inductible, MP : microparticule, NF-κB : facteur nucléaire kappa B, NO : monoxyde d'azote, PC : protéine C, PCa : protéine C activée, TM : thrombomoduline, TR : récepteur à la thrombine.

Activation plaquettaire

La dysfonction endothéliale participe au recrutement plaquettaire sur le site de l'infection, puis à leur adhésion à l'endothélium lésé. Les plaquettes sont des fragments cytoplasmiques anucléés issus de la fragmentation de mégacaryocytes médullaires. Elles ont une durée de vie de 7 à 10 jours. Grâce aux glycoprotéines qu'elles portent à leur surface, les plaquettes activées adhèrent à l'endothélium lésé formant le clou plaquettaire. Les plaquettes activées sont aussi capables de sécréter le contenu de leurs granules, notamment les facteurs de croissance contenus dans les granules α , qui participe à l'agrégation plaquettaire et entretient l'activation endothéliale, mais contribue aussi aux phénomènes de réparation vasculaire et d'angiogenèse (Yaguchi et al., 2004). Les plaquettes possèdent aussi une fonction immunitaire dans la défense antibactérienne, notamment dans les infections à bacilles gram négatif, par leurs récepteurs de type TLR (TLR 2 et TLR4) (Clark et al., 2007; Semple et al., 2011). Par l'intermédiaire de ces récepteurs, les plaquettes se lient aux bactéries formant un complexe qui sera ensuite adressé aux phagocytes. L'activation plaquettaire contribue également au relargage massif de médiateurs pro-inflammatoires comme IL-1 β , RANTES (*Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted*) ou CD154, aussi appelé CD40-ligand (Semple et al., 2011). Par l'intermédiaire de RANTES, les plaquettes participent au recrutement des leucocytes (Mause et al., 2005). Elles activent aussi directement les cellules immunitaires, PNNs et cellules dendritiques, par formation du complexe CD40-CD154 (Semple et al., 2011) (Figure 5).

Au cours du choc septique, il existe une altération des fonctions plaquettaires. Ainsi, le contenu des granules est altéré par modification du mégacaryocyte par l'inflammation. L'agrégation est diminuée, réduisant leur rôle hémostatique alors que d'autres fonctions comme la réparation des lésions vasculaires sont privilégiées (Yaguchi et al., 2004). Des travaux expérimentaux ont montré que l'activation plaquettaire au cours du choc septique est responsable d'une libération accrue de médiateurs de l'inflammation, notamment du CD40-ligand soluble, dont la concentration plasmatique est corrélée à la mortalité du choc septique (Lorente et al., 2011). Les plaquettes participent ainsi à l'altération de la réponse immunitaire au cours du choc septique (Hamzeh-Cognasse et al., 2013; Lorente et al., 2011).

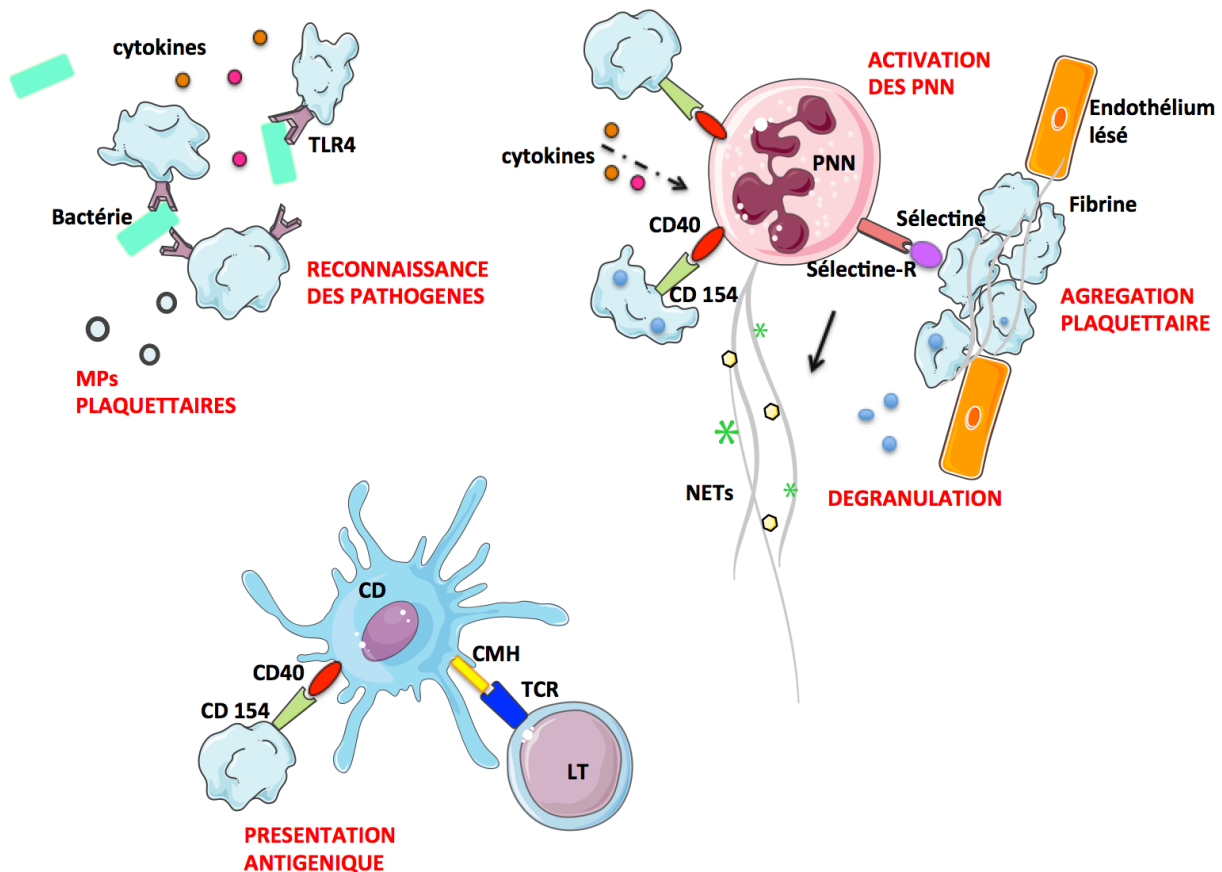


Figure 5: Rôle des plaquettes dans la réponse immunitaire

L'expression de TLRs plaquettaires permet aux plaquettes de se lier aux bactéries. Les plaquettes activées ont ainsi une action destructrice directe et adressent les bactéries aux phagocytes.

Les plaquettes activées interagissent aussi avec les PNNs par l'intermédiaire du CD154. Cette liaison active les PNNs, qui sont alors recrutés sur le site de l'agression et acquièrent la capacité à libérer des NETs.

Les plaquettes activées sont aussi capables d'interagir avec les cellules dendritiques, par l'intermédiaire de la liaison CD 154-CD40. Cette interaction majeure la présentation d'antigènes par la cellule dendritique aux lymphocytes T.

CD : cellule dendritique, CMH : complexe majeur d'histocompatibilité, TCR : récepteur des lymphocytes T, TLR : *Toll Like Receptor*

1.2.3. Activation de la coagulation au cours du choc septique

L'activation cellulaire vasculaire du choc septique est à l'origine de l'acquisition d'un phénotype pro-coagulant des membranes cellulaires qui participe à l'activation pathologique systémique de la coagulation (Fourrier, 2012). Celle-ci s'associe à une inhibition de la fibrinolyse réactionnelle. Ainsi, les membranes cellulaires de l'endothélium et des monocytes expriment des facteurs pro-coagulants, tel le FT (Aird, 2003; Fourrier, 2012). D'autres

facteurs, la thrombine, le FXa (facteur X activé) et le complexe FT- FVIIa, entretiennent les propriétés pro-coagulantes par l'intermédiaire de récepteurs endothéliaux, les récepteurs associés aux protéases (PAR). La thrombine est le ligand de PAR-1, 3 et 4, et le complexe FT-FVIIa de PAR-2. La liaison ligand-PAR active la production de cytokines, et de molécules d'adhésion ce qui entretient le profil membranaire pro-coagulant de l'endothélium.

Dans ce paragraphe, je développerai l'hémostase comme réponse à l'infection et mécanisme de défense contre le pathogène.

L'hémostase comme réponse à l'infection

Initiation

En réponse à la reconnaissance d'un pathogène, les cellules vasculaires extériorisent un phospholipide, la phosphatidylsérine (PhtdSer) (Zwaal and Schroit, 1997). La PhtdSer entre alors en contact avec le FT exposé à la surface des monocytes, des PNNs et de l'endothélium, initiant de la voie extrinsèque par formation de FVIIa. Le complexe FT-FVIIa active les FX et FIX. Une faible quantité de facteur FXa est générée permettant la formation de traces de thrombine. Si la quantité de thrombine ainsi formée est insuffisante pour convertir le fibrinogène en monomères de fibrine, elle permet d'amplifier la réaction par l'activation de cofacteurs (FV et FVIII) et du FXI plaquettaire. Cette amplification aboutit à une génération de thrombine suffisante pour former de la fibrine (Lane et al., 2005).

En plus des modifications des membranes cellulaires induites par les micro-organismes, les bactéries relarguent des polyphosphates de longue taille à forte charge négative (Morrissey, 2012; Morrissey et al., 2012). Ces polyphosphates activent « la phase contact » de l'hémostase (activation du FXII, puis du FXI ou FIX) qui permet la polymérisation des monomères de fibrine en un gel insoluble compact et renforcent l'activation de GPIb-FXI par le FIIa (Choi et al., 2011; Huang and Lord, 2013). Les polyphosphates bactériens seraient aussi impliqués dans l'inhibition réactionnelle de la fibrinolyse qui participe à la CIVD (Figure 6).

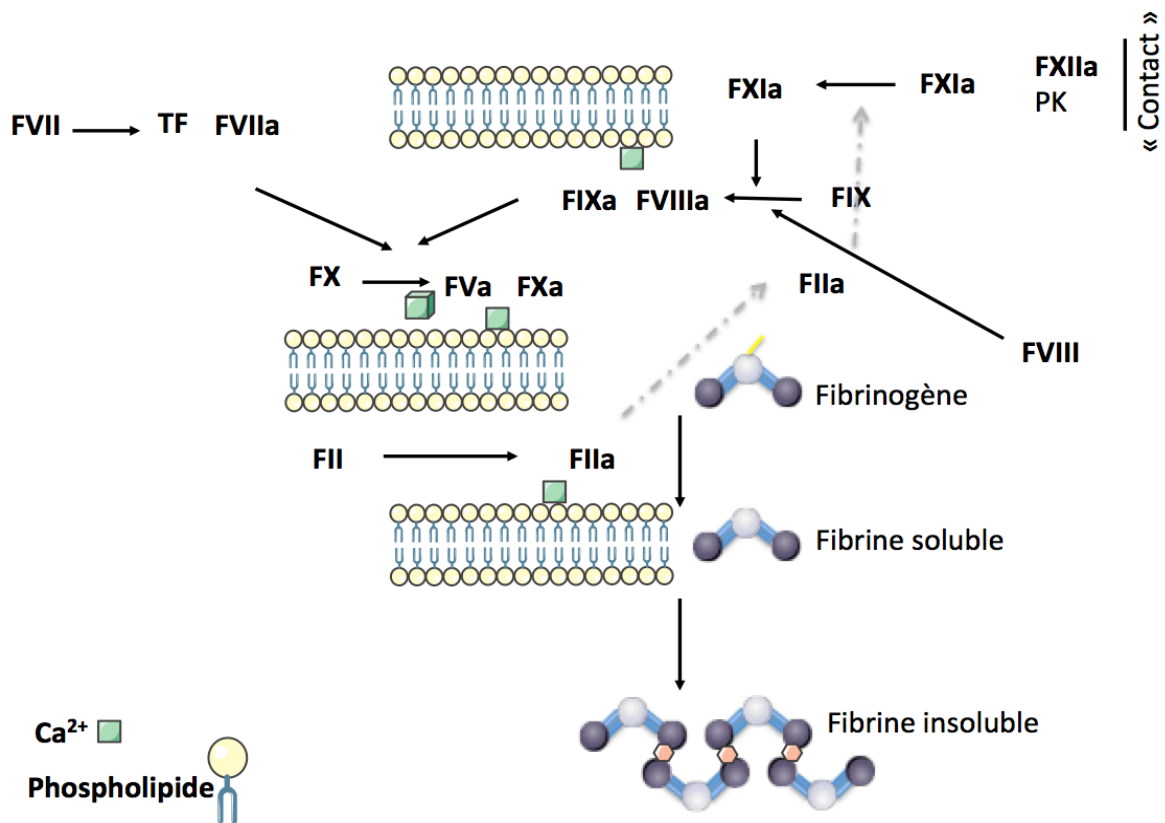


Figure 6: L'activation de la coagulation au cours des états septiques.

La voie extrinsèque est la voie qui permet la génération d'une grande quantité de thrombine (facteur II) à partir du facteur tissulaire.

La voie intrinsèque (aussi appelée voie contact) se fait par contact entre le sang et les structures sous-endothéliales. Les deux voies convergent avec la formation du complexe tenase associant facteur Xa, le cofacteur V, du Calcium et des phospholipides membranaires.

a: forme activée du facteur, F: facteur, FT: facteur tissulaire, PK: pré-kallicréine

Propagation

La propagation fait suite à l'initiation et correspond à l'accélération de celle-ci. Le complexe de surface plaquettaire, $\text{GPIIb}\alpha\text{-FXIa-PhtdSer-Ca}^{2+}$, active le FIX, comme le complexe $\text{FT-FVIIa-PhtSer-Ca}^{2+}$, mais avec un rendement supérieur. Il se forme le complexe « tenase » (FIXa et FVIIIa), ce qui augmente la génération de FXa. De la même façon, FXa et FVa forment le complexe prothrombinase et génèrent de la thrombine, capable de former de la fibrine qui s'agrége en caillots (Lane et al., 2005).

Les voies de la coagulation sont régulées par trois systèmes: l'initiation est inhibée par l'inhibiteur de la voie du TF (TFPI, *tissue factor inhibitor*), la protéine C activée (PCa) régule l'amplification en clivant le FVa, et l'antithrombine (AT) se lie à la thrombine circulante (Okajima, 2001).

Au cours des épisodes infectieux, l'activation de la coagulation est nécessaire à la défense de l'hôte et seule une production excessive de thrombine peut entraîner une dysfonction vasculaire et une CIVD (Delabranche et al., 2012; Perrin et al., 2015).

La coagulation intravasculaire disséminée : un dépassement des systèmes régulateurs

La CIVD est un syndrome clinico-biologique caractérisé par une génération excessive de thrombine avec consommation de facteurs de coagulation et de plaquettes, associée à une faillite des systèmes régulateurs par déplétion en anticoagulants. Ainsi, la concentration en TFPI diminue alors que celle en FT augmente. Ceci s'explique par la production d'enzymes qui dégradent préférentiellement le TFPI par rapport aux facteurs pro-coagulants du fait d'une plus grande affinité (Okajima, 2001). La concentration circulante en protéine S, qui augmente le rendement du TFPI, est abaissée au cours du sepsis. L'endothélium acquiert un profil pro-coagulant : la synthèse de la TM baisse, d'où une diminution de la PCa (Figure 5) et un défaut d'inhibition des cofacteurs (FVa et FVIIIa), régulateurs de la quantité de thrombine générée (Aird, 2007, 2003). En outre, il existe une raréfaction du glycocalix, indispensable à la formation du complexe thrombine-AT en puisqu'il permet la captation de l'AT ; l'inactivation du FIIa est ainsi réduite (Nickel and Renné, 2012). De plus, la synthèse d'AT est réprimée par les cytokines (Aird, 2007). Enfin, la CIVD est caractérisée par une activation de la fibrinolyse par l'augmentation de PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor-1*) plaquettaire et endothélial (Zeerleder et al., 2006). L'inhibition de la fibrinolyse par l'intermédiaire de PAI-1 traduit la dysfonction d'organes et est corrélée avec la mortalité au cours du choc septique et de la CIVD (Hartemink et al., 2010).

Diagnostic de coagulation intravasculaire disséminée

La CIVD est caractérisée par des manifestations cliniques hétérogènes. On distingue deux phases, thrombotique et une hémorragique, qui peuvent coexister ou se succéder (Levi, 2010, 2010). La phase thrombotique est caractérisée par des thromboses de la microcirculation. La clinique est variable : au niveau cutané, les lésions sont purpuriques, millimétriques puis extensives. Elles peuvent évoluer vers l'ischémie et la nécrose. Une forme particulièrement grave est le *purpura fulminans*, défini par une nécrose cutanée hémorragique parfois associée à une hémorragie méningée (Lerolle et al., 2013). Les *microthrombi* sont responsables d'une hypoperfusion tissulaire et de défaillances d'organes. La phase hémorragique associe pétéchies, bulles hémorragiques, saignements en nappe, hématurie ou saignement digestif

(Gando et al., 2016a; Levi and Schultz, 2017). Ces phénomènes hémorragiques sont favorisés par la consommation des facteurs de coagulation et du fibrinogène, ainsi que par la thrombopénie. Ils sont plus rares que les phénomènes thrombotiques et débutent généralement au niveau des points de ponction ou des muqueuses (Gando, 2010). Il n’y a pas de « gold standard » pour diagnostiquer la CIVD (Gando et al., 2016b). Le diagnostic repose sur un faisceau d’arguments et s’aide de deux scores : l’ISTH *overt* (Taylor et al., 2001) et le score JAAM DIC (Iba et al., 2016), décrits dans le tableau 3.

Ces scores sont néanmoins peu utilisés en pratique clinique et le diagnostic de CIVD reste tardif (Gando et al., 2008). Dans un modèle de simulation utilisant les données rétrospectives de 2663 patients, l’équipe de Yamakawa a montré l’importance d’une anticoagulation précoce avant même que le diagnostic de CIVD ne soit posé (Yamakawa et al., 2019). Dans ce contexte, un score simplifié, le SIC (*sepsis-induced coagulopathy*), a récemment été proposé pour évaluer en première intention la coagulopathie du choc septique, permettre le diagnostic de CIVD, et donc proposer un traitement anticoagulant à la phase précoce de la CIVD (Iba et al., 2019a, 2019b).

	ISTH <i>Overt</i> (5/8)	JAAM (2016) (4/8)	SIC
Antithrombine (%)		(0) <70 (1) >70	
Plaquettes (G/L)	(0) >100 (1) 50 à 99 (2) <50	(0) >120 ou -30% (1) 80 – 119 (3) <80 ou – 50%	(1) ≥50, <100 (2) <50
TP (%) / INR	(0) >64 (1) 35 à 64 (2) <35%	(0) >64 (1) <64	(1) >1,2 ≤1,4 (2) >1,4
Fibrinogène (g/L)	(0) >1 (1) <1		
D-dimères (µg/mL)	(0) <0,5 (2) 0,5-4,0 (3) >4,0	(0) <5,0 (1) 5,0 à 15,0 (3) >15,0	
Score SOFA			(1) 1 (2) ≥2

Tableau 3: Les scores diagnostiques de la coagulopathie et de la CIVD du choc septique d’après (Iba et al., 2019b, 2016; Taylor et al., 2001)

ISTH : International Society on Thrombosis and Haemostasis, JAAM : Japanese Association for Acute Medicine, SIRS : systemic inflammatory response syndrome, syndrome inflammatoire de réponse systémique TP : temps de prothrombine

Rôles de la coagulation dans le sepsis

Lors du sepsis, la coagulation est initiée par les éléments bactériens eux-mêmes et par les polyphosphates bactériens qui favorisent l'activation de la phase contact. Les *processi* hémostatiques ainsi initiés font partie des mécanismes de défense de l'hôte au même titre que la réponse immunitaire ou l'activation du complément (Shapiro et al., 2010). En effet, l'activation de la coagulation permet en premier lieu de limiter la croissance et la dissémination du pathogène; *a contrario*, une production excessive de thrombine, un défaut de polymérisation des monomères de fibrine, et une faillite des mécanismes régulateurs entraînent une défaillance multiviscérale, par défaut de perfusion tissulaire (Shapiro et al., 2010). La CIVD se caractérise ainsi par une activation incontrôlée de la coagulation et une fibrinolyse retardée par l'augmentation de PAI-1 (Venugopal, 2014) : le FT est exposé diffusément et en excès, la production thrombine est dérégulée. Les cellules activées libèrent des microparticules (MPs) pro-coagulantes, car porteuses de FT et de GpIba (Satta et al., 1994; Van Der Meijden et al., 2012). Des *thrombi* se forment dans la microcirculation entraînant une hypoxémie tissulaire, et une défaillance viscérale. En *sus* de ces phénomènes microthrombotiques, certains facteurs de coagulation (FT/FVIIaFXa et FIIa) sont directement pro-inflammatoires en stimulant la production endothéliale d'IL-6 impliquée dans l'initiation de la coagulation (van Hinsbergh, 2012) et de molécules d'adhésion telle la E-sélectine endothéliale (Levi, 2010). De plus, l'activation de la coagulation module l'inflammation par l'intermédiaire des récepteurs associés aux protéases (PAR). Les PARs sont activés par des facteurs de coagulation activés, et entraînent la libération de cytokines responsables de lésions tissulaires inflammatoires (Levi, 2010). En *sus* de son activité anticoagulante, la PCa a un rôle majeur dans la modulation de PAR-1 au cours du choc septique, le récepteur devenant déficitaire au cours de la CIVD; il en résulte un entretien mutuel entre inflammation et coagulation. La diminution de la concentration de PCa a également pour conséquence une majoration des phénomènes d'apoptose puisqu'il y a levée de l'inhibition qu'elle induit physiologiquement (Ikezoe, 2015). L'activation de la coagulation est donc largement impliquée dans la physiopathologie du choc septique. De plus, la survenue d'une CIVD au cours du choc septique est précurseur de défaillance multiviscérale et associée à une morbi-mortalité supérieure (Aird, 2007; Fourier, 2012).

Pistes thérapeutiques dans la CIVD

La complexité de l'activation de la coagulation, tantôt bénéfique par son rôle dans défense anti-infectieuse, tantôt délétère lorsqu'elle évolue vers une génération incontrôlée de thrombine, rend toute intervention thérapeutique complexe (Delabranche et al., 2017a). Comme pour son diagnostic, le traitement de la CIVD du choc septique ne fait actuellement pas l'objet d'un *consensus* (Scully and Levi, 2019). Le traitement étiologique, c'est-à-dire le traitement anti-infectieux, est à la base de la prise en charge. Différentes stratégies adjuvantes ont néanmoins été proposées (Levi and van der Poll, 2013).

Une première approche est celle d'une supplémentation par transfusions plaquettaires et/ ou en plasma frais congelé visant à restaurer un potentiel hémostatique. Il n'existe pas d'étude validant cette stratégie thérapeutique, qui est réservée aux patients à haut risque hémorragique (Levi et al., 2009). L'utilisation d'autres molécules substitutives, telles le fibrinogène ou les complexes prothrombotiques, peut être envisagée en cas de syndrome hémorragique incontrôlé.

Une autre approche vise à interrompre la génération excessive de thrombine liée à un dépassement des mécanismes régulateurs par l'administration d'anticoagulants. Ainsi, les dérivés de l'héparine sont couramment utilisés à dose préventive au cours du choc septique et de la CIVD, mais nous ne disposons d'aucune étude sur l'utilisation des dérivés héparinés au cours du choc septique chez l'homme (Delabranche et al., 2017a; Levi et al., 2009). Nous ne disposons pas d'argument pour interrompre un traitement par héparine administré à un patient en choc septique à visée thromboprophylactique s'il développe une CIVD sans syndrome hémorragique.

Comme la CIVD s'accompagne d'une déplétion en anticoagulants naturels, une substitution par PCa et antithrombine (respectivement essais KyberSept et PROWESS-SHOCK) (Ranieri et al., 2012; Warren et al., 2001) a été testée. Ces deux essais, menés chez des patients en choc septique indépendamment de l'activation de leur coagulation, sont négatifs. Des analyses en sous-groupe laissent néanmoins penser qu'il pourrait exister un bénéfice pour les patients en CIVD (Kienast et al., 2006).

Plus récemment, une supplémentation en thrombomoduline a été proposée chez des patients en choc septique développant une activation de la coagulation mesurée par le TP et la

numération plaquettaire. Malgré une intervention thérapeutique plus ciblée, cette étude n'a pas montré de bénéfice (Vincent et al., 2019). Il s'agit du premier essai randomisé chez l'homme ayant cherché à stratifier les malades selon leur niveau d'activation de la coagulation et à envisager une intervention thérapeutique « personnalisée ». L'absence de définition consensuelle de la CIVD rend cette stratification complexe et la question de l'anticoagulation au cours du choc septique reste entière (Meziani et al., 2017; van der Poll and Opal, 2017), rendant le développement de nouveaux biomarqueurs indispensable.

1.2.4. Les microparticules, marqueurs de l'activation cellulaire pro-coagulante du choc septique

L'activation des cellules du compartiment vasculaire est aussi à l'origine d'une déstabilisation des membranes cellulaires qui se traduit par un réarrangement et un bourgeonnement de leurs phospholipides à l'origine de la libération de MPs (Zwaal and Schroit, 1997). Les MPs sont des vésicules submicroniques constituées de membrane cytoplasmique libérées dans l'espace extracellulaire par une cellule en réponse à un stress (Freysinet, 2003). Toute cellule est capable de libérer des MPs en réponse à un stress. Les MPs sont détectables en faible quantité chez l'individu sain, mais les concentrations sont augmentées au cours de la plupart des états d'agressions notamment lors du choc septique (Martinez et al., 2011; Meziani et al., 2010; Soriano et al., 2005).

Le choc septique humain est associé à un relargage massif de MPs endothéliales, monocytaires et plaquettaires. Elles favoriseraient la survenue d'un syndrome de défaillance multiviscérale (Reid and Webster, 2012). Notre équipe a par ailleurs récemment mis en évidence un phénotype de MPs particulier associé à la CIVD au cours du choc septique (Delabranche et al., 2016, 2013). Nous consacrons le paragraphe suivant au rôle des MPs au cours du choc septique.

Généralités à propos des MPs

En réponse à un stress, la membrane plasmique cellulaire fait l'objet d'un réarrangement de ses phospholipides qui permet la libération de MPs ou microvésicules (Hugel et al., 2005). Ce remodelage réduit l'asymétrie des phospholipides membranaires et entraîne l'externalisation de la PhtdSer, (Coleman et al., 2013).

Les MPs expriment à leur surface des antigènes spécifiques de la cellule émettrice ce qui permet de déterminer leur origine et le type de stress impliqué quand celui-ci induit des modifications des protéines membranaires (Baj-Krzyworzeka et al., 2002; Soriano et al., 2005). Les principaux antigènes utilisés pour identifier l'origine cellulaire des MPs sont résumées dans le tableau 4 (McVey et al., 2012).








MP	Cellule parentale		Antigènes membranaires
PMP	Plaquettes		CD31, CD40L, CD41a, CD42a, CD42b, CD61, CD62P, CD63, CD107a, fibrinogène, vWF
MegMP	Mégacaryocyte		CD41, CD184, laminine A
LMP	Lymphocyte		CD3, CD4, CD8, CD11b, CD16, CD19, CD21, CD45, CD66b
MMP	Monocyte		CD14, CD142, CD144, CD162, TLR4
RMP	Érythrocyte		CD31, CD235a, IgG, complément
NMP	Granulocyte neutrophile		CD11a, CD11b, CD15, CD16, CD35, CD49, CD59, CD62L, CD66b, CD142
EMP	Cellule endothéliale		CD31, CD34, CD51, CD54, CD62E, CD63, CD105, CD106, CD142, CD144, CD146

Tableau 4: Marqueurs de surface des MPs spécifiques de la cellule émettrice d'après (McVey et al., 2012)

Les MPs sont des effecteurs cellulaires qui véhiculent des signaux biologiques (cytokines, constituants membranaires, ARN messagers) (Morel et al., 2004). Leur action biologique dépend de la molécule délivrée à la cellule cible, mais aussi du mode de transfert de l'information : soit de façon indirecte par activation des récepteurs spécifiques de façon autocrine, paracrine ou à distance par relargage de médiateurs solubles, soit par transfert direct du matériel par fusion ou internalisation de leur matériel (Chironi et al., 2009; Mause and Weber, 2010).

En plus de leur rôle d'effecteurs intercellulaires, les MPs représentent une surface pro-coagulante du fait de l'exposition sur leur feuillet externe d'un phospholipide anionique, la

PhtdSer, et parfois le FT actif (MPs endothéliales et monocytaires), qui permet l'initiation de la cascade de coagulation (Satta et al., 1997).

Microparticules et choc septique

Au cours du choc septique, les MPs circulantes traduisent l'activation cellulaire vasculaire. Les MPs peuvent participer à l'amplification de la réponse inflammatoire systémique par l'activation de différentes voies de signalisation intracellulaire, notamment par l'intermédiaire des récepteurs de la famille P2X. Ainsi, chez l'animal, l'élévation des concentrations de MPs leucocytaires en réponse au LPS est associée à une augmentation de la sécrétion d'IL-6 (Mesri and Altieri, 1999). Les MPs peuvent également contenir des protéines de l'inflammasome, complexe protéique intracellulaire des cellules granulocytaires activé par des motifs moléculaires à la surface des pathogènes capable de déclencher la réponse immune innée (Wang et al., 2011).

Les MPs forment aussi une vaste surface d'interaction avec les facteurs de coagulation circulants et favorisent le recrutement des cellules vasculaires circulantes sur le site de l'agression. Les MPs possèdent également une capacité pro-coagulante intrinsèque de par l'expression de la PhtdSer à leur surface.

Les MPs sont donc à l'interface entre inflammation et coagulation. Dans une étude récente chez l'homme, notre équipe a par ailleurs mis en évidence le rôle des MPs comme marqueurs de l'activation cellulaire durant le choc septique (Delabranche et al., 2016, 2013). Le relargage de MPs augmente chez les patients en choc septique et est associé à un phénotype particulier. Ainsi, dans une cohorte prospective évaluant le rôle des MPs dans la coagulopathie du choc septique, nous avons montré une forte association entre les activations endothéliale (MPs CD105) et leucocytaire (MPs CD11a) à la phase précoce de la CIVD (Delabranche et al., 2016, 2013). La CIVD apparaît ainsi comme le symptôme d'une maladie inflammatoire systémique vasculaire, dans laquelle les MPs notamment leucocytaires pourraient représenter un nouvelle cible thérapeutique (Fourrier, 2012; Gando, 2010).

Mieux comprendre comment les différentes cellules du compartiment vasculaire s'activent au cours du choc septique est ainsi un élément crucial dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques du choc septique et de la CIVD. Dans la suite de ce travail de thèse, nous envisagerons comment les polynucléaires neutrophiles s'activent en réponse à l'infection.

II. Les polynucléaires neutrophiles dans la réponse de l'hôte à l'infection

2.1. Les polynucléaires neutrophiles dans l'immunité innée

Les PNNs sont avant tout des acteurs de l'immunité innée. Ce sont des cellules très différenciées, maturées dans la moelle osseuse avant d'être libérées dans la circulation sanguine, où elles survivent vingt-quatre heures (Borregaard, 2010). Pendant leur maturation, des compartiments intracellulaires, les granules, se forment et renferment des protéines anti-inflammatoires et antimicrobiennes. Les PNNs sont sensibles aux signaux d'inflammation et d'infection, qui entraînent leur migration intravasculaire, puis au travers des tissus par diapédèse par chimiotactisme (Zarbock and Ley, 2008). Une fois sur le site de l'infection, les PNNs sont doués d'une capacité de phagocytose (Nordenfelt and Tapper, 2011), mais sont aussi capables de relarguer le contenu des granules et des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Nous envisagerons donc d'abord la physiologie des PNNs dans l'immunité innée, puis leurs dysfonctions au cours du choc septique.

2.1.1. Libération médullaire des neutrophiles

Les PNNs sont produits dans la moelle osseuse par granulopoïèse, qui définit le *processus* de formation et de maturation des PNNs et des monocytes (Borregaard, 2010).

Les cellules immatures de la lignée granuleuse, ou myélocytes, expriment des récepteurs aux chémokines (CXCR) différents selon le stade de maturation. Les principaux récepteurs aux chémokines exprimés par les PNNs sont CXCR1 et 2, deux récepteurs à l'IL-8, et CXCR4, récepteur du CXCL12 (Grob et al., 1990). Les neutrophiles les moins différenciés expriment plutôt CXCR4, tandis que les PNNs matures expriment CXCR2 (Lapidot and Kollet, 2002). Le relargage des PNNs est modulé par l'expression des récepteurs aux chémokines (Yipp and Kubes, 2013). D'autres récepteurs, notamment les TLRs, apparaissent lors de la maturation des PNNs. CXCR2 et les TLRs sont des marqueurs de maturité et leur expression est un signal de relargage des PNNs, tandis que CXCR4 est un signal de rétention médullaire (Eash et al., 2010).

2.1.2. Chimiotactisme

La reconnaissance des pathogènes par les TLRs exprimés à la surface des PNNs (précédemment décrite) active des voies de signalisation intracellulaire qui favorisent la migration des PNNs vers le site de l'infection par chimiotactisme ou migration dirigée (Zigmond, 1974). Les molécules à l'origine de cette migration sont de nature variable (peptides antibactériens telle la formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP), chémokines, dont l'IL-8...) et sont reconnus par des récepteurs membranaires des PNNs. La capacité de réponse aux signaux de chimiotactisme est une caractéristique acquise au cours de la maturation des PNNs dans la moelle osseuse, comme le récepteur CXCR2, acquis tardivement, qui reconnaît l'IL-8.

Une fois à proximité du site de l'infection, les PNNs interagissent avec l'endothélium pour atteindre les tissus : c'est le margination, puis le *rolling*, c'est-à-dire une phase d'adhésion labile des PNNs à l'endothélium, qui fait intervenir l'interaction leucocyte-endothélium (Muller, 2003). Cette étape implique des molécules d'adhésion, les sélectines puis les intégrines. Les sélectines permettent le *rolling* des PNNs, les intégrines leur adhésion (González-Amaro and Sánchez-Madrid, 1999).

La dernière étape, régulée par des gradients de chémokines, notamment fMLP, est la migration des PNNs à travers les jonctions inter-cellulaires de l'endothélium.

2.1.3. Phagocytose et dégranulation

Après avoir migré sur le site de l'agression, le neutrophile devient capable de phagocytose. Il s'agit d'un *processus* permettant aux PNNs d'englober, puis de détruire un micro-organisme pathogène (Nauseef, 2007). C'est la principale fonction des neutrophiles. Les PNNs sont incapables de phagocytose dans la circulation sanguine du fait de vitesse du flux sanguin et acquièrent cette fonction lors de leur migration vers le site de l'infection. Ils possèdent deux mécanismes de phagocytose qui coexistent *in vivo*: un mécanisme oxygène-dépendant faisant intervenir la NADPH oxydase (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate) et un mécanisme oxygène-indépendant (Nauseef, 2007). Au cours des épisodes septiques, l'oxygénation tissulaire dépend des apports et des besoins, aboutissant à une modification du métabolisme de phagocytose.

Le mécanisme oxygène-dépendant est médié par les espèces réactives de l'oxygène (ERO). En réponse à la reconnaissance d'un pathogène, le complexe NADPH oxydase s'assemble (Babior, 1999) : des électrons sont transportés vers des accepteurs d'électrons, ce qui permet la génération d'ERO. Ces ERO sont à leur tour métabolisés en produits fortement bactéricides, comme le peroxyde d'hydrogène, et détruisent les pathogènes prisonniers du phagolysosome (Bedard and Krause, 2007). Ces molécules sont naturellement toxiques et capables de détruire les tissus sains par interaction avec les acides nucléiques et les protéines qui les constituent (Segal, 2005).

Au cours du mécanisme oxygène-indépendant, le contenu des granules, notamment les enzymes lysosomales, est relargué dans le phagosome (Borregaard and Cowland, 1997). Le phagosome devient un phagolysosome dont la maturation s'accompagne d'une alcalinisation (pH à 7,8-8,0) permettant l'activation des enzymes. Secondairement, le contenu du phagolysosome s'acidifie (pH aux environs de 7,0) par l'intermédiaire de l'échangeur Na^+/H^+ (Cech and Lehrer, 1984) ce qui permet la digestion des bactéries capturées. Les modifications de pH protègent les tissus sains de la toxicité des enzymes des granules.

2.2. Les polynucléaires neutrophiles dans l'immunité adaptative

A côté de leur rôle dans l'immunité innée, les PNNs sont capables de moduler la réponse immunitaire adaptative, notamment par leur interaction avec les autres cellules du système immunitaire, tels les lymphocytes ou les CPA.

2.2.1. Modulation de l'activité lymphocytaire B par les PNNs

Selon le microenvironnement, les PNNs sont capables de stimuler ou d'inhiber l'activité des lymphocytes B dans les organes lymphoïdes, primaires et secondaires. Les neutrophiles interagissent d'abord avec les lymphocytes B de la zone marginale de la rate, située à proximité des capillaires sinusoides, et dont le rôle est l'initiation rapide d'une réponse immunitaire adaptative T-indépendante en réponse aux pathogènes circulants. L'initiation de la réponse T-indépendante nécessite la présentation des micro-organismes circulants aux lymphocytes B. Les neutrophiles sont les principaux acteurs de la capture des micro-organismes circulants et de leur transport vers la rate au cours des sepsis dans des modèles murins (Balázs et al., 2002). Les PNNs activés expriment la cytokine activatrice des cellules

B (BAFF), et la cytokine BAFF reliée (APRIL), dans la zone marginale splénique et participent de cette façon à l'activation lymphocytaire B T-indépendante (Schwaller et al., 2007). BAFF et APRIL, associées à d'autres cytokines spécifiques des PNNs spléniques activés comme IL-21, sont nécessaires à l'effet B-stimulant (Puga et al., 2011). Cet effet B-stimulant est acquis par contact avec des éléments microbiens dans le microenvironnement splénique et en est spécifique. Les PNNs acquièrent ainsi une fonction « B-helper » et favorisent la survie lymphocytaire B, la production d'anticorps et la commutation de classe d'immunoglobines (Puga et al., 2011). Il existe donc une reprogrammation d'une population de PNNs circulants, qui joue ainsi un rôle dans l'immuno-modulation adaptative B (Figure 7).

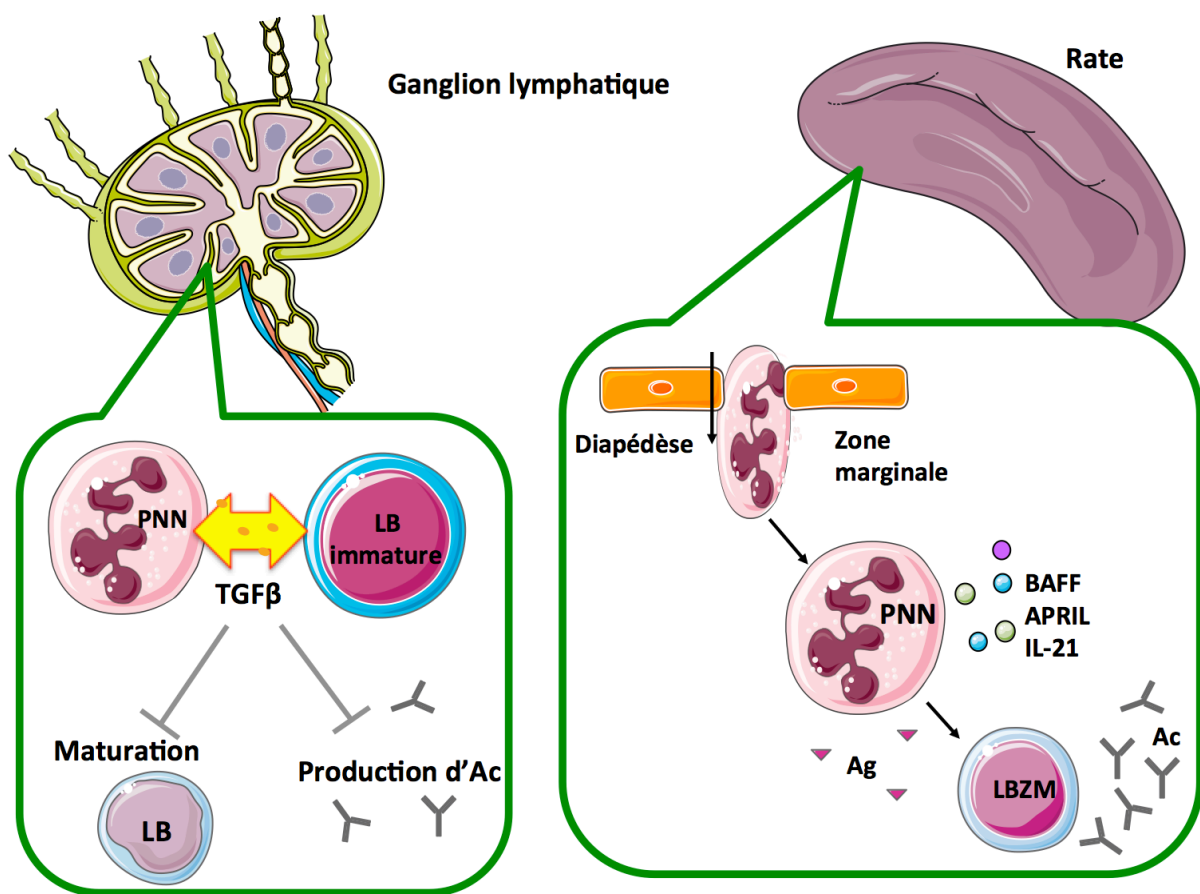


Figure 7: Les polynucléaires modulent l'activité lymphocytaire B d'après (Stiel et al., 2017)

Les polynucléaires neutrophiles interagissent avec les lymphocytes B au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Dans les ganglions lymphatiques, les PNNs ont une activité B-inhibitrice par sécrétion de TGF β notamment. A l'inverse, dans la zone marginale de la rate, les PNNs activés expriment la cytokine activatrice des cellules B, BAFF, et la cytokine BAFF reliée, APRIL, ce qui leur confère un effet B-stimulant. Les PNNs participent de cette façon à l'activation lymphocytaire B T-indépendante. LB : lymphocyte B, LBZM : lymphocyte B de la zone marginale, PNN : polynucléaire neutrophile, TGF β Tumor Growth Factor β

En plus de leur migration dans les organes lymphatiques primaires, les PNNs migrent dans les ganglions lymphatiques, soit par voie sanguine, soit par voie lymphatique (Gorlino et al., 2014). Les PNNs entrent alors en contact avec les lymphocytes B de la zone médullaire et inter-folliculaire des ganglions et inhibent la production d'anticorps par ces cellules. On a donc une action B-inhibitrice.

2.2.2. Modulation de l'activité lymphocytaire T par les PNNs

L'activation lymphocytaire T par les neutrophiles est plus complexe (Figure 8).

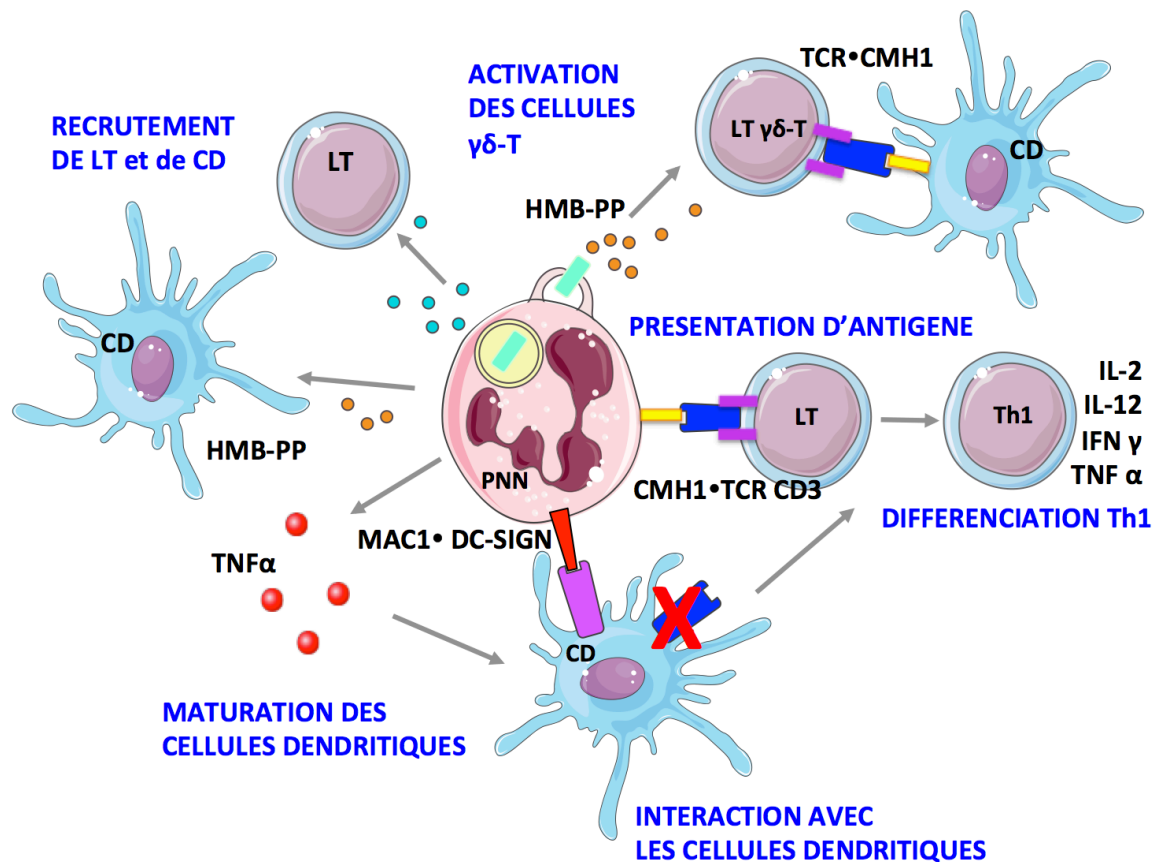


Figure 8: Les polynucléaires neutrophiles modulent l'activité lymphocytaire T et les cellules dendritiques d'après (Stiel et al., 2017)

Les PNNs possèdent une activité T-stimulante par différents mécanismes : les PNNs activent les lymphocytes T par présentation antigénique directe. Cette présentation oriente la différenciation des lymphocytes T vers un phénotype Th1. Ils modulent également la présentation antigénique par les cellules dendritiques. Les lymphocytes T sont alors orientés vers un phénotype Th1. Les neutrophiles libèrent également des produits bactériens (HMB-PP) après ingestion d'un pathogène pour activer les cellules $\gamma\delta$ -T. HMB-PP est aussi à l'origine du recrutement de cellules dendritiques et de lymphocytes T sur le site de l'infection. CD : cellule dendritique, CMH : complexe majeur d'histocompatibilité, DC-SIGN : Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin IL : interleukine ; HMB-PP : (E)-4-Hydroxy-3-méthyl-but-2-enyl pyrophosphate, IFN γ : interféron gamma LT : lymphocyte T, Mac1 : macrophage-1-antigène, PNN : polynucléaire neutrophile, TCR : récepteur aux lymphocytes T, TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha

Simultanément à l'arrivée de neutrophiles et de monocytes sur le site de l'infection, un petit nombre de lymphocytes T est recruté. Ce phénomène est favorisé par le microenvironnement pro-inflammatoire et est notamment observé au cours des infections virales (Chu et al., 2013). Les lymphocytes T, non spécifiques du pathogène, prolifèrent localement et s'activent du fait de l'environnement inflammatoire. Ce phénomène est appelé « bystander response » (Leliefeld et al., 2015). Les neutrophiles participent à la régulation de cette réaction « bystander » qui contribue au recrutement de lymphocytes T mémoire et à la clairance précoce des pathogènes notamment par l'interaction avec d'autres cellules immunitaires. (Burroughs et al., 2006).

Une proportion importante des lymphocytes T recrutés sur le site de l'infection appartiennent à la famille $\gamma\delta$ -T. Ces cellules $\gamma\delta$ -T sont activées par les neutrophiles, soit grâce à la libération de métabolites microbiens tel HMB-PP après phagocytose, soit par contact cellulaire direct (Bonneville et al., 2010). Cette activation cellulaire nécessite en outre la présentation de l'antigène, notamment par les cellules dendritiques (Abadie et al., 2005; Maletto et al., 2006). Les PNNs influencent la quantité d'antigènes disponible, par une clairance précoce du pathogène par phagocytose (Yang et al., 2010), mais aussi par leur rôle de présentation antigénique directe, puisqu'ils expriment les molécules nécessaires à l'apprêtement et à la présentation antigénique par le complexe majeur d'histocompatibilité de type 1 CMH1 (Beauvillain et al., 2007). Les PNNs jouent ainsi le rôle de cellules présentatrices d'antigènes pour les lymphocytes T (Ashtekar and Saha, 2003). Cette fonction est CCR-7 dépendante et intervient notamment au cours des infections virales par présentation antigénique aux lymphocytes T CD8 (Abadie et al., 2005; Beauvillain et al., 2007). C'est notamment le cas lors des infections à *Influenzae virus* où les PNNs infectés sont capables de présenter l'antigène viral grâce au CMH 1 au niveau pulmonaire (Hufford et al., 2012).

Par la présentation d'antigènes aux lymphocytes T, les PNNs modulent la différenciation vers un phénotype Th1, 2 ou 17. Ainsi, la neutrophile élastase (NE), enzyme de la famille des sérine-protéases contenue dans les granules azurophiles, permet une différenciation préférentielle des lymphocytes vers un phénotype Th1 responsable de la libération de cytokines stimulant l'activité microbicide des macrophages et la production d'anticorps.

2.2.3. Modulation de l'activité des cellules présentatrices d'antigènes par les PNNs

Les granulocytes neutrophiles sont capables de moduler indirectement l'immunité adaptative, notamment lymphocytaire, en stimulant ou réprimant la présentation antigénique par les CPA (Figure 8). Les interactions entre les CPA et les PNNs restent mal comprises. On sait néanmoins que les PNNs activés sont à leur tour capables d'activer les cellules dendritiques, et que cette interaction est indispensable au fonctionnement des deux types cellulaires (Bennouna et al., 2003). Chez l'homme, l'interaction entre CPA et PNN fait intervenir les récepteurs DC-SIGN à la surface des cellules dendritiques immatures et Mac-1 exprimés par les PNNs (van Gisbergen et al., 2005). Alors que Mac-1 est une intégrine exprimée par plusieurs types cellulaires, l'interaction avec les cellules dendritiques est spécifique des PNNs du fait d'une glycosylation particulière (van Gisbergen et al., 2005). Par cette interaction directe avec les CPA, les PNNs répriment la présentation antigénique par le CMH de type 1 (Schuster et al., 2013). Ils participent par ce biais à la polarisation des lymphocytes vers un phénotype Th1 (Bennouna and Denkers, 2005). Néanmoins, l'interaction DC-SIGN-Mac1 n'est pas suffisante à la maturation des cellules dendritiques. Celle-ci nécessite en effet la présence de TNF α libéré par les neutrophiles comme signal activateur des cellules dendritiques (Bennouna et al., 2003; Megiovanni et al., 2006). L'interaction DC-SIGN-Mac1 est néanmoins indispensable à la mise en présence des CPA avec le TNF α libéré par les PNNs. D'autres molécules telle la NE répriment quant à elles la présentation antigénique (Maffia et al., 2007).

Ensuite, les PNNs participent au recrutement des cellules dendritiques : certaines alarmines sécrétées par les PNNs (HGBM1) sont chémo-attractantes pour les cellules dendritiques permettant leur accumulation sur le site de l'infection (Schuster et al., 2013). Les alarmines induisent également la production de chémokines telle RANTES qui recrutent à leur tour les CPA (Yang et al., 2009).

Enfin, les cellules dendritiques présentent des antigènes issus de neutrophiles ayant phagocyté des micro-organismes. Cependant, la phagocytose limite le nombre d'antigènes disponibles et limite ainsi leur présentation lymphocytaire (Müller et al., 2009).

2.3. Les polynucléaires neutrophiles dans l'immuno-thrombose

En *sus* des fonctions précédemment décrites, les PNNs activés sont capables de relarguer le contenu de leur noyau et de leurs granules sous forme de NETs (*Neutrophil Extracellular Traps*) (Brinkmann et al., 2004). Les NETs forment un maillage extracellulaire constitué de fragments d'ADN, d'histones et d'enzymes, comme la MPO ou le NE. (Figure 9) Les NETs sont capables de capturer des pathogènes et des cellules sanguines circulantes dans leur filet, ce qui leur confère un rôle important dans la défense de l'hôte (Brinkmann et al., 2004; Brinkmann and Zychlinsky, 2012).

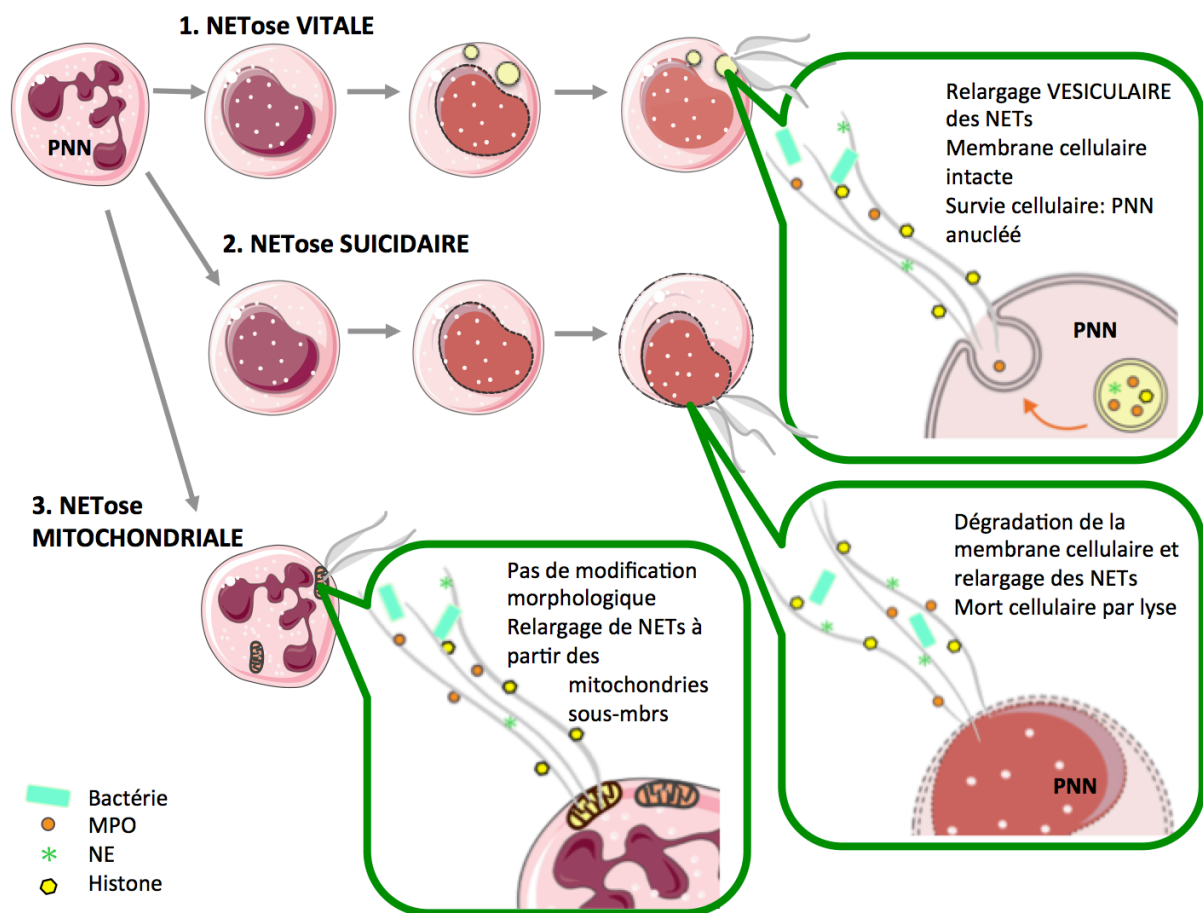


Figure 9: Voies de la NETose d'après (Brinkmann and Zychlinsky, 2012)

Les NETs peuvent être relargués selon 3 mécanismes : **1.** à partir de vésicules **2.** après rupture de la membrane cytoplasmique. **3.** à partir de l'ADN mitochondrial. Les 2 premiers mécanismes sont caractérisés une décondensation chromatinienne et une rupture de la membrane nucléaire.

2.3.1. Mécanismes de la NETose

Deux mécanismes de NETose sont décrits (Figure 9). Le premier aboutit au suicide cellulaire et dure quelques heures, d'où une première description de la NETose comme un mécanisme de mort cellulaire (Brinkmann and Zychlinsky, 2012; Phillipson and Kubes, 2011). L'autre, la NETose « vitale » (Pilszczek et al., 2010), plus rapide permet la survie du PNN sous une forme anucléée apte à la phagocytose, fonction qui ne dépend pas de la synthèse protéique, donc de la présence d'un noyau. L'ADN mitochondrial pourrait également participer au relargage de NETs. La NETose suicidaire dépend de la production de radicaux libres par la NADPH oxydase 2 Nox 2 (Brinkmann and Zychlinsky, 2012). La MPO participe au phénomène de NETose par la génération d'ions halogénés et d'hypochlorite (Metzler et al., 2014). De plus, la MPO et la NE potentialisent la décondensation et la relaxation chromatinienne en s'associant à la chromatine par un mécanisme non enzymatique. Le mécanisme enzymatique le plus important impliqué dans la décondensation de la chromatine correspond à la citrullination des histones par la peptidylarginine-déiminase 4 (PAD4) avec l'arginine comme substrat (Leshner et al., 2012). La voie de la NETose vitale semble jouer un rôle dans les infections à bactéries gram-positives. Ce mécanisme implique la voie de signalisation du TLR-2, qui a pour ligand l'acide lipotéichoïque, ainsi que des phénomènes d'opsonisation par le complément (Pilszczek et al., 2010). Les NETs sont ensuite relargués par l'intermédiaire de vésicules.

Les deux mécanismes de NETose s'accompagnent de modifications morphologiques décrites en microscopie électronique après induction de NETose in-vitro par du phorbol myristate acetate (PMA) (Bergmann and Hammerschmidt, 2007) : d'abord, la chromatine se décondense, le noyau perd ses lobulations, le cytoplasme se dégranule et les NETs sont relargués. Cette induction de NETose in-vitro est assimilable à la NETose suicidaire. Les mécanismes impliqués sont différents des mécanismes de nécrose et d'apoptose et sont indépendants des caspases.

2.3.2. Les NETs participent à la défense antimicrobienne

Les NETs forment un piège extracellulaire entravant physiquement la dissémination des micro-organismes au cours des épisodes infectieux. Leur première fonction est donc antimicrobienne, principalement antibactérienne et antifongique. Ce mécanisme fait partie de

l'immunité innée. Les NETs s'opposent ainsi mécaniquement à la dissémination bactérienne et fongique au cours des épisodes septiques (Urban et al., 2006). *in vivo*, la capture de bactéries notamment de *Klebsiella pneumoniae* a ainsi pu être visualisée dans les poumons de souris septiques (Papayannopoulos et al., 2010). Les NETs ont également une action antimicrobienne grâce aux protéases et à la toxicité des histones (Hirsch, 1958; Miller et al., 1942).

Les histones sont chargées positivement, ce qui leur permet de se fixer aux pathogènes qui présentent une membrane anionique, entraînant soit l'ouverture de canaux membranaires pour divers médiateurs cytotoxiques, soit la lyse microbienne. Dans un travail récent, Abrams *et al.* ont montré l'association entre les histones circulantes après un traumatisme et la survenue d'un syndrome de détresse respiratoire aiguë (Abrams et al., 2013). Ce travail confirme *in vitro* la cytotoxicité des histones et met en évidence *in vivo* leur toxicité dans un modèle animal d'œdème pulmonaire lésionnel. L'administration d'un anticorps anti-histones à la souris prévenait en effet les lésions (Abrams et al., 2013). Les histones sont ainsi impliquées dans la physiopathologie du syndrome de détresse respiratoire aigu (SDRA) et du sepsis (Semeraro et al., 2011; Xu et al., 2015).

2.3.3. Les NETs participent à l'activation de la coagulation

Par l'intermédiaire du phénomène de NETose, le neutrophile semble aussi être un acteur des épisodes thrombotiques et pourrait participer au cross talk inflammation-thrombose (Diaz et al., 2013; Fuchs et al., 2010; Martinod and Wagner, 2014). Ainsi, une deuxième fonction des NETs correspond à l'activation de la coagulation, car ils forment naturellement une surface anionique (principalement sous forme de filaments d'ADN) activant la phase contact de la coagulation -facteur XII- (Iba et al., 2014). Cette activation du système contact participe à l'activation de la coagulation toujours associée au sepsis (Frick et al., 2007). Les NETs sont ainsi à l'origine de la formation de *microthrombi* non-occlusifs, qui participent à la défense de l'hôte au cours des épisodes infectieux en contenant localement le micro-organisme (Engelmann and Massberg, 2013).

La présence de plaquettes activées est indispensable à la formation de NETs (Clark et al., 2007). L'interaction neutrophiles-plaquettes est notamment médiée par l'interaction entre la P-sélectine présente à la surface des PNNs et la P-sélectine plaquettaire (Sreeramkumar et al., 2014). Cette activation mutuelle entre PNNs et plaquettes est à l'origine d'une activation de la

voie extrinsèque de la coagulation, aboutissant à la génération de fibrine (Massberg et al., 2010). Même s'ils ne l'expriment pas constitutivement, les PNNs pourraient ainsi acquérir la capacité d'exprimer le facteur tissulaire à leur surface et d'émettre des MPs qui l'expriment (Maugeri et al., 2006). L'expression de facteur tissulaire au sein des réseaux de NETs favoriserait à son tour l'adhésion plaquettaire et l'amplification de la cascade de coagulation.

De plus, les composants des NETs ont des propriétés pro-coagulantes. Ainsi, l'ADN amplifie l'activité des sérines protéases, la neutrophiles élastase clive et inactive l'inhibiteur du facteur tissulaire, et les histones sont de puissants médiateurs de thrombose in-vitro et inactivent la protéine C activée (Ammollo et al., 2011; Kannemeier et al., 2007; Xu et al., 2009).

Les neutrophiles déploient donc des stratégies de défense extracellulaire afin de protéger l'hôte des dommages induits par l'infection. Les neutrophiles par l'émission de NETs ont une activité antimicrobienne directe et activent la coagulation intravasculaire micro-vasculaire intrinsèque et extrinsèque. Par ce biais, les PNNs favorisent un mécanisme distinct d'immunité intravasculaire nommé immunothrombose (Pfeiler et al., 2016) (Figure 10). L'immunothrombose désigne une réponse immunitaire innée intravasculaire à l'origine de la génération de thrombine et de la formation de thrombi, notamment dans les micro-vaisseaux. (Engelmann and Massberg, 2013). C'est donc un mécanisme de défense indépendant qui permet la reconnaissance des pathogènes, leur endiguement puis leur destruction grâce à l'activation de la coagulation et au recrutement des cellules immunitaires (Engelmann and Massberg, 2013).

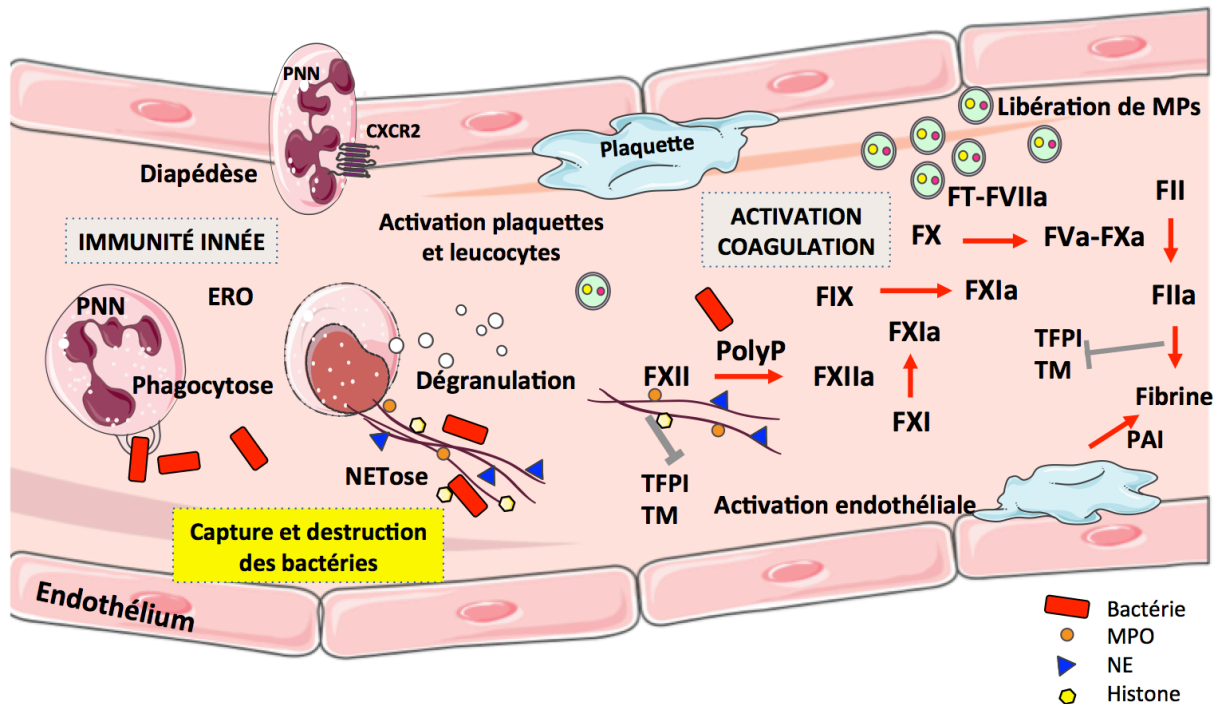


Figure 10: L'immunothrombose, un mécanisme de défense locale en réponse à l'infection d'après (Stiel et al., 2017)

L'immunothrombose est un mécanisme de défense locale contre l'infection. Après l'invasion par un pathogène, les cellules du compartiment vasculaire (PNNs, cellules endothéliales, plaquettes ...) sont activées et sont à l'origine, dans le même temps, de la réponse immunitaire innée et de l'activation de la coagulation. Les PNNs sont ainsi recrutés sur le site de l'infection en réponse à des molécules chimiotactiques comme CXCL2, et libèrent le contenu de leurs granules, des ERO, des MPs, et des NETs. Ces différents éléments participent à l'endiguement du pathogène et au contrôle de l'infection. Les NETs, le FT, les MPs et les polyP contribuent également à l'activation de la coagulation qui limite également la dissémination du pathogène. Les interactions entre coagulation et immunité ont été réunies sous le terme d'immunothrombose.

CXCR : chemokine receptor, CXCL : chemokine ligand, ERO : espèces réactives de l'oxygène, F : facteur de coagulation, Fa : facteur activé, FT : facteur tissulaire, MPO: myéloperoxydase, MPs : microparticules, NE : neutrophile élastase; NETose, libération de NETs neutrophil extracellular traps, PAI : inhibiteur de l'activateur du plasminogène, PNNs, polynucléaires neutrophiles; PolyP : polyphosphates bactériens, TFPI : inhibiteur du facteur tissulaire, TM, thrombomoduline.

Par tous les mécanismes décrits, l'activation du PNN en réponse à l'infection est un mécanisme de défense incontournable et indispensable. Néanmoins, cette activation peut échapper aux mécanismes qui la régulent et devenir délétère pour l'hôte. Ces dysfonctions peuvent intéresser l'ensemble des fonctions du neutrophile.

III. Dysfonction des polynucléaires neutrophiles au cours du choc septique

3.1. Dysfonction immunitaire innée des neutrophiles et sepsis

3.1.1. Relargage de polynucléaires neutrophiles incompétents

La dysfonction des neutrophiles apparaît dès leur production médullaire. Ainsi, le choc septique s'accompagne d'un relargage médullaire accru de PNNs en réponse à l'augmentation des cytokines, notamment du G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor). Ce relargage induit une hyperneutrophilie sanguine. La neutrophilie s'associe à un épuisement médullaire, à l'origine de la libération de myélocytes immatures (Navarini et al., 2009; Pillay et al., 2010). Ainsi, la libération de plus de 10% de formes immatures fait partie de la définition du SIRS (Bone et al., 1992; Cohen, 1993). La libération de PNNs immatures est à l'origine d'une hétérogénéité des myélocytes circulants, et les formes immatures expriment différents récepteurs (PRR) de façon diminuée, d'où une altération de la reconnaissance des pathogènes (Pillay et al., 2010). Leur capacité de phagocytose est également réduite (Taneja et al., 2008). La présence de formes immatures circulantes, mise en évidence sur frottis sanguins, est associée à une surmortalité au cours du choc septique et le pourcentage de myélocytes et métamyélocytes est corrélé au temps jusqu'au décès (Danikas et al., 2008; Mare et al., 2015). Il est possible que les PNNs immatures soient non seulement un marqueur pronostic, mais qu'ils reflètent aussi la dysfonction d'organes (Mare et al., 2015). Ceci s'explique par les propriétés rhéologiques des myélocytes immatures (membrane cellulaire rigide), responsables de leur stagnation dans la microcirculation, particulièrement au niveau pulmonaire. Ainsi, les myélocytes et métamyélocytes participent à l'obstruction des micro-vaisseaux, donc à l'hypoxémie et l'hypoperfusion tissulaire (Pöschl et al., 2005).

Par ailleurs, le choc septique est caractérisé par des PNNs matures au phénotype hétérogène du fait du vieillissement des neutrophiles en circulation, qui peuvent survivre jusqu'à cinq jours (Hidalgo et al., 2009; Simon and Kim, 2010). Les PNNs vieillissants modifient leur répertoire moléculaire et sur-expriment CXCR4 (Uhl et al., 2016). Cette expression cesse d'entraîner le retour des PNNs vers la moelle et favorise leur margination (PNNs capturés

dans les réseaux capillaires) et leur clairance, par l'intermédiaire de chémokines tel CXCL12 (Uhl et al., 2016). Ainsi, dans un modèle de choc endotoxinique chez la souris, les PNNs présents dans les tissus normaux (reins, poumons) augmentent de façon significative (Uhl et al., 2016). C'est l'environnement inflammatoire du choc septique et l'expression de TLR4 à la surface de ces PNNs qui favorisent la modification du pouvoir migratoire des PNNs vieillissants qui ont un rôle prédominant dans l'inflammation aiguë et la phagocytose (Kolaczowska, 2016).

Les PNNs présentent également une altération de la fonction de reconnaissance des pathogènes au cours des épisodes septiques graves. Ceci s'explique par un mimétisme moléculaire entre certains DAMPs, mitochondriaux, et des PAMPs ou MAMPs (Leliefeld et al., 2016; Quintana and Cohen, 2005). Ce mimétisme entraîne un défaut de reconnaissance des signaux de danger permettant la propagation du micro-organisme non reconnu. Le mimétisme moléculaire est aussi responsable de réponses inadaptées « sepsis-like » au cours d'autres agressions, notamment traumatiques (Zhang et al., 2010). Ainsi, les signaux de danger (DAMPs) mitochondriaux sont à l'origine de dommages cellulaires médiés par les PNNs au cours du choc septique par inhibition du chimiotactisme au profit d'une margination à l'origine de lésions diffuses des tissus sains (Zhang et al., 2010).

3.1.2. Une migration mal dirigée

Au cours des épisodes septiques graves, la diminution de l'expression du TLR4, et donc de la reconnaissance des pathogènes, est à l'origine d'une migration moindre des neutrophiles vers le site de l'infection (Reddy and Standiford, 2010): ceci s'explique notamment par un déficit des PNNs en CXCR2 secondaire à la surproduction de monoxyde d'azote NO (Alves-Filho et al., 2008), et à une diminution de la réponse à ses ligands (CXCL1,2, IL-8) pourtant produits en grande quantité (Chishti et al., 2004). L'expression de CXCR1 est conservée (Chishti et al., 2004). *A contrario*, l'expression de la β -intégrine CD11b est augmentée. Cette modification du profil d'expression des récepteurs au chimiotactisme entraîne un défaut qualitatif et quantitatif de migration des neutrophiles, (Trevelin et al., 2012). Le recrutement insuffisant des PNNs est responsable d'un mauvais contrôle local de l'infection et favorise la dissémination bactérienne (Alves-Filho et al., 2008) (Figure 11). Une baisse de la motilité des PNNs induite par les chémokines est également observée dans des modèles expérimentaux d'endotoxémie chez l'homme et l'animal (Wagner and Roth, 1999). Les modifications

d'expression des molécules du chimiotactisme entraînent une réduction de motilité des PNNs et le retour des PNNs matures vers la moelle osseuse (Chishti et al., 2004). La diminution de CXCR2 est associée à la sévérité du choc et est un marqueur pronostic défavorable (Chishti et al., 2004). La modification du chimiotactisme est en effet responsable d'une migration inappropriée de PNNs dans les organes sains notamment les poumons d'où une occlusion de la microcirculation et une déplétion des organes lymphoïdes (Cohen, 2002; Sônego et al., 2016). En plus de la répression de récepteurs normalement exprimés à la surface des PNNs, des récepteurs physiologiquement absents de la surface des neutrophiles, tel que le récepteur aux chémokines CCR2, sont exprimés et impliqués dans la défaillance multiviscérale du choc septique : dans un modèle murin de choc septique par ligature-perforation caecale, l'expression de CCR2 en réponse à une stimulation des TLR-2 et 4 est associée à une infiltration massive des organes vitaux par les PNNs activés (Souto et al., 2011). L'expression de CCR2 participe ainsi à la défaillance multiviscérale en entraînant l'occlusion de la microcirculation par les PNNs d'où une hypoxémie tissulaire. CCR2 est ainsi associé à une surmortalité à la phase précoce du choc septique (Astiz et al., 1995) (Figure 11).

La migration des PNNs est également altérée par les MPs émises par les PNNs. Elles favorisent la survenue d'un syndrome de défaillance multiviscérale par leurs effets modulateurs sur la réponse inflammatoire, et participent notamment au recrutement des PNNs (Meziani et al., 2010; Mortaza et al., 2009; Reid and Webster, 2012; Walenta et al., 2009). Les MPs relarguées par les neutrophiles modulent leur pouvoir migratoire : ainsi, le chimiotactisme des PNNs est augmenté en réponse à l'IL-8 par l'expression de différentes sélectines à leur surface (Nolan et al., 2008). *A contrario*, le chimiotactisme des PNNs est inhibé en réponse à l'IL-1 β par l'expression à la surface des MPs neutrophiliques de la molécule anti-inflammatoire Annexine I (Dalli et al., 2008).

Une fois à proximité du site de l'infection, les PNNs interagissent avec l'endothélium pour rejoindre les tissus. Au cours des états septiques, l'expression des sélectines et des intégrines qui initient cette interaction est modifiée. Ainsi, l'expression de la L-sélectine est diminuée tandis que l'expression de CD11b est augmentée (Brown et al., 2006). L'altération de l'adhésion cellulaire au cours du choc septique est secondaire à la vasoplégie par relargage excessif de NO (Reddy and Standiford, 2010). De plus, la margination des neutrophiles dans la microcirculation pulmonaire notamment est à l'origine d'une dysfonction endothéliale par l'accumulation de cytokines et participe à la défaillance multiviscérale du choc septique (Aird, 2003; Boisramé-Helms et al., 2013).

La modification des propriétés physiques des PNNs, plus rigides, altère leur migration à travers les jonctions serrées endothéliales (Skoutelis et al., 2000). Cet excès de rigidité entraîne une déformabilité réduite proportionnelle à la gravité du sepsis et est à l'origine d'une occlusion capillaire qui participe à la défaillance multiviscérale (Skoutelis et al., 2000).

Au cours du choc septique, l'inflammation elle-même favorise également la séquestration capillaire en activant les PNNs dans la circulation (Mantovani et al., 2011). L'activation des PNNs dans la microcirculation est à l'origine de l'occlusion de la lumière des petits vaisseaux, de la migration des PNNs vers les organes vitaux, et de la libération de substances cytotoxiques (cytokines pro-inflammatoires, enzymes...) impliqués dans les lésions tissulaires et la défaillance multiviscérale du choc septique (Brown et al., 2006; Sônego et al., 2016).

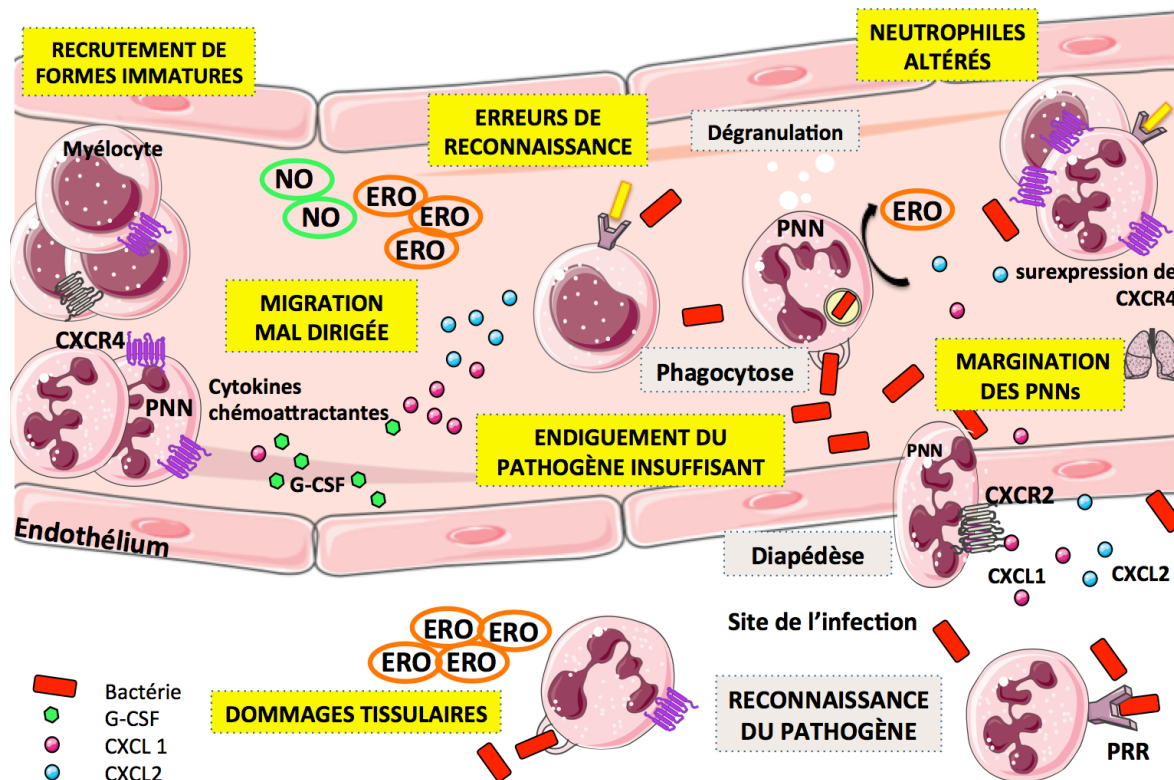


Figure 11: Dysfonction de la réponse immunitaire au cours du choc septique d'après (Stiel et al., 2017)

Au cours du choc septique, la réponse de l'hôte à l'infection est altérée. D'abord, les cellules de l'hôte peuvent exprimer des signaux de dangers qui miment ceux exprimés à la surface des pathogènes. Par ce biais, les PAMPs et les MAMPs peuvent échapper à la reconnaissance par le PRRs. Néanmoins, la reconnaissance du pathogène induit le relargage de cytokines et d'interleukines, dont certaines comme CXCL1 ou G-CSF, aux effets chémoattractants. Certains PNNs recrutés sur le site de l'infection sont immatures et leurs fonctions de phagocytose sont altérées. Ces cellules entraînent aussi un relargage massif d'ERO, favorisent la margination des PNNs, induisent des dommages tissulaires et surexpriment CXCR4. L'ensemble de ces dysfonctions est à l'origine d'une mauvaise reconnaissance du pathogène, un défaut d'endiguement et d'élimination. CXCR : chemokine receptor, CXCL : chemokine ligand, ERO : espèces réactives de l'oxygène, GCS-F : Granulocyte-Colony Stimulating Factor, NO :monoxyde d'azote, PNNs, polynucléaires neutrophiles.

3.1.3. Altération des fonctions de phagocytose

Le choc septique associe un excès d'ERO et un déficit en mécanismes antioxydants protecteurs (glutathion, sélénium...): ces éléments sont à l'origine de lésions tissulaires par les cellules immunitaires, notamment les PNNs, et leurs enzymes cytotoxiques (Aziz et al., 2013; Hoesel et al., 2005; Taylor and Piantadosi, 1995; Wilson and Wu, 2012). L'excès d'ERO libéré par les PNNs contribue ainsi à la dysfonction vasculaire du choc septique et à la fuite vasculaire qui l'accompagne dans les syndromes de détresse respiratoire aiguë d'origine inflammatoire notamment (Fox et al., 2013). La production de d'ERO diminue avec la résolution du choc tandis qu'elle reste élevée chez les patients qui décèdent (Santos et al., 2012). La surproduction d'ERO et la persistance de concentrations élevées est un facteur mauvais pronostic au cours du choc septique (Santos et al., 2012).

La régulation du pH des phagolysosomes est également altérée lors des épisodes septiques graves. Ainsi, chez les grands brûlés présentant des infections à Staphylocoque, l'état d'alcalinisation insuffisante des PNNs explique un défaut d'activation des enzymes microbicides et permet la survie bactérienne (Bjerknes et al., 1989). *A contrario*, dans un modèle de choc septique par ligature-perforation caecale murin, l'acidité des PNNs diminue au cours du choc septique et est associée à une surmortalité (Chiswick et al., 2015).

Cependant, les études évaluant la capacité totale de phagocytose des PNNs à la phase précoce sont contradictoires : certaines concluent à un excès de phagocytose (Martins et al., 2003), alors que d'autres mettent en évidence qu'elle diminue (Taneja et al., 2008). Il est probable que la neutrophilie initiale explique une capacité de phagocytose augmentée, mais que l'altération du phénotype des PNNs explique un pouvoir microbicide moindre et une reconnaissance altérée.

Ainsi, par exemple, les sérines protéases des granules des PNNs sont capables de cliver les récepteurs du complément CR1 et C5aR, qui ont un rôle majeur dans la reconnaissance des éléments opsonisés à phagocyter (Morris et al., 2011). Le déficit en récepteurs du complément observé au cours du choc septique participe à un défaut de phagocytose (Morris et al., 2011).

3.2. Dysfonction immunitaire adaptative au cours du choc septique

Au cours des épisodes septiques, les interactions des PNNs avec les autres cellules du système immunitaire, notamment les lymphocytes, sont dérégulées et participent à l'état inflammatoire du patient et à une forme d'immunodépression adaptative qui apparaît à la phase précoce du choc septique.

Au cours du choc septique, les PNNs sécrètent des médiateurs pro-inflammatoires, comme l'IL12, responsables d'une différenciation des lymphocytes T vers un phénotype Th-1, et l'IL-4, qui oriente vers un phénotype Th2. Les facteurs de transcription et les cytokines responsables des deux phénotypes sont augmentés (Ferguson et al., 1999). Les Th1 libèrent des cytokines (IL-2, IL-12, TNF α , leucotriènes...), qui stimulent l'activité microbicide des macrophages envers les pathogènes intracellulaires et la production d'anticorps ciblant les pathogènes extracellulaires. Les Th2 produisent des cytokines immuno-modulatrices humorales (IL-4, IL-5, IL-9...) et initient la réponse anti-inflammatoire. Néanmoins, la balance entre les différentes cytokines secrétées lors des épisodes septiques est initialement responsable d'un phénotype Th1 (Aziz et al., 2013; Ferguson et al., 1999). Ce phénotype hyper-inflammatoire lymphocytaire participe à l'« orage cytokinique » observé à la phase précoce du choc septique et participe aux lésions tissulaires (Aziz et al., 2013). Cependant, le choc septique est associé à une lymphopénie Th1 et 2, à une diminution de l'activité transcriptionnelle et à une libération de cytokines plus faible qu'au cours de sepsis (Ferguson et al., 1999), illustrant l'immunosuppression présente dès la phase précoce du choc septique.

Les PNNs participent également à l'immunosuppression « adaptative » du choc septique par déplétion lymphocytaire. Ainsi, l'activation des neutrophiles est d'abord à l'origine d'une expression de l'arginase-1 par certains PNNs en interphase (phase du cycle cellulaire pendant laquelle la cellule double l'ensemble de ces éléments). La présence de PNNs en interphase dépend du degré d'inflammation et est corrélée à l'IL-6 circulante (Darcy et al., 2014). L'arginase-1 entraîne la déplétion en L-arginine, acide aminé essentiel indispensable au cycle cellulaire des lymphocytes T (Rodriguez et al., 2007). Le déficit en L-Arginine entraîne une dysfonction lymphocytaire par l'incapacité des lymphocytes T à poursuivre leur cycle cellulaire (blocage au stade G0-G1). Ce blocage est secondaire à une répression de la chaîne ζ de CD3, corécepteur du récepteur des lymphocytes T, indispensable à la transduction

intracellulaire. (Darcy et al., 2014) (Figure 12). L'expression de l'arginase-1 par les PNNs des patients en choc septique est corrélée au nombre de défaillances viscérales (Darcy et al., 2014). Les PNNs immatures et au phénotype modifié (densité diminuée) expriment davantage l'arginase-1. La supplémentation en L-arginine pourrait représenter une piste thérapeutique.

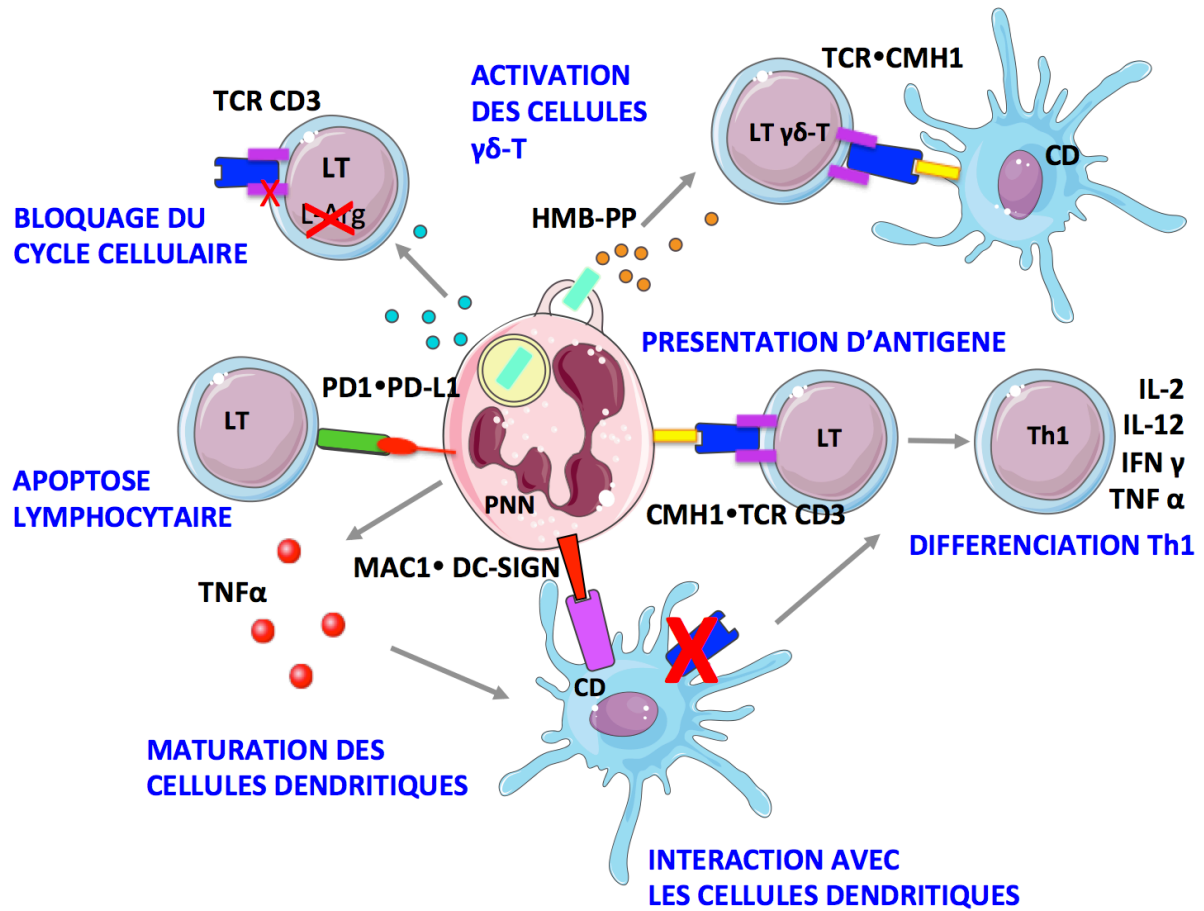


Figure 12: Les polynucléaires neutrophiles modulent l'activité lymphocytaire T et les cellules dendritiques d'après (Stiel et al., 2017)

Les PNNs possèdent une activité T-stimulante par différents mécanismes : les PNN activent les lymphocytes T par présentation antigénique directe. Cette présentation oriente la différenciation des lymphocytes T vers un phénotype Th1. Ils modulent également la présentation antigénique par les cellules dendritiques. Les lymphocytes T sont alors orientés vers un phénotype Th1. Les neutrophiles libèrent également des produits bactériens (HMB-PP) après ingestion d'un pathogène pour activer les cellules $\gamma\delta$ -T. Les PNN établissent également une inhibition des lymphocytes T : les PNNs produisent des ROS et libèrent de l'arginase. Les deux espèces inhibent TCR ζ des lymphocytes T, et arrêtent ainsi la cellule dans la phase G0-G1. Les PNN expriment également PD-L1. La stimulation de ce ligand est associée à une apoptose des lymphocytes T médiée par PD1.

CD : cellule dendritique, CMH : complexe majeur d'histocompatibilité, DC-SIGN : Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin, IL : interleukine ; HMB-PP : (E)-4-Hydroxy-3-méthyl-but-2-enyl pyrophosphate, IFN γ : interféron gamma, LT : lymphocyte T, Mac1 : macrophage-1-antigen, PD : programmed death, PNN : polynucléaire neutrophile, TCR : récepteur aux lymphocytes T, TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha

Les PNNs et monocytes des patients en choc septique expriment également une protéine de surface, *programmed death 1* (PD1), et son ligand PD-L1 (Zhang et al., 2011). La voie intracellulaire PD1-PD-L1 est un des éléments explicatifs de l'apoptose lymphocytaire responsable de l'immunodépression post-septique (Markwart et al., 2014).

Le choc septique est donc associé à une apoptose lymphocytaire accrue (cellules B et T). Cette apoptose entraîne une lymphopénie prolongée à l'origine d'une immunosuppression post-septique, qui explique la susceptibilité aux infections nosocomiales responsable de nombreux décès à moyen terme (Hotchkiss and Nicholson, 2006). La profondeur de la lymphopénie au cours du choc septique est associée au pronostic (Le Tulzo et al., 2002).

De plus, les corps apoptotiques issus des cellules immunitaires innées (cellules dendritiques, PNNs) et adaptatives (lymphocytes) entraînent la libération de cytokines anti-inflammatoire, comme l'IL-10, dès la phase précoce du choc septique. L'augmentation des concentrations d'IL-10 au cours du choc septique est également fortement associée à la mortalité (Gogos et al., 2000).

A l'opposé des lymphocytes, les PNNs ont une survie prolongée au cours des épisodes septiques. En conditions physiologiques, l'apoptose des PNNs est finement régulée par des molécules de mort cellulaire, les caspases et les facteurs de transcription de la famille de Bcl-2 (Geering and Simon, 2011). Au cours des processus infectieux, une survie prolongée des PNNs constitue ainsi un des mécanismes de défense mis en œuvre. Cette apoptose retardée est médiée par des signaux de survie cellulaire, notamment le G-CSF, ainsi que par des cytokines, tel l'interféron γ (Dibbert et al., 1999). Cependant, si l'apoptose retardée des PNNs est bénéfique en permettant la persistance d'une neutrophilie, elle permet aussi la survie des neutrophiles immatures et non totalement fonctionnels, ainsi que des PNNs anormaux par leurs propriétés morphologiques, tels les granulocytes de faible densité (Hotchkiss and Nicholson, 2006). Ceci favorise la persistance de la dysfonction des neutrophiles lors des épisodes septiques graves.

Des publications récentes rapportent un autre processus de mort des neutrophiles : l'autophagie (Geering and Simon, 2011; Mihalache et al., 2011). Il s'agit d'une dégradation autologue des PNNs par leurs propres phagosomes, soit une forme d'auto-phagocytose. L'autophagie des PNNs est un mécanisme de mort cellulaire indépendant des caspases qui a lieu dans un environnement pro-inflammatoire (G-CSF, cytokines inflammatoires). Cet

environnement est à l'origine de l'activation du récepteur de surface CD44 (Mihalache et al., 2011). Ceci active la voie de la PI3K (PhosphoInositide-3-Kinase) habituellement impliquée dans la survie cellulaire. PI3K entraîne la production d'ERO par la NADPH-oxydase qui permet la formation de vacuoles cytoplasmiques exprimant CD44. S'en suit la destruction cellulaire par auto-phagocytose. Au cours des épisodes septiques, ce mécanisme de mort cellulaire prévient la destruction des tissus sains par les ERO (Geering and Simon, 2011), mais son rôle précis notamment dans l'évolution du sepsis grave reste à définir.

3.3. L'activation des neutrophiles au cours du choc septique est responsable d'une dérégulation de l'immuno-thrombose

Au cours du choc septique, les neutrophiles participent à l'activation locale de la coagulation qui facilite la reconnaissance, l'endiguement et la destruction des pathogènes circulants (Engelmann and Massberg, 2013). Les NETs émis après reconnaissance du pathogène permettent l'entrave physique des micro-organismes au sein de réseaux de fibrine et des NETs (Brinkmann et al., 2004). Ensuite, l'immuno-thrombose se traduit par la formation de *thrombi* non occlusifs dans les micro-vaisseaux, notamment dans les capillaires sinusoides du foie, formant une barrière physique à l'invasion tissulaire (Massberg et al., 2010). Les *microthrombi* permettent aussi l'accumulation locale de stratégies antimicrobiennes, physiques et chimiques. Enfin, la fibrine permet le recrutement d'autres cellules immunitaires, qui à leur tour amplifieront la réaction immune (Luo et al., 2011).

Si l'immuno-thrombose et les NETs sont bénéfiques à la défense de l'hôte par ces différents mécanismes, ils peuvent également être délétères et participer à l'apparition de lésions tissulaires ; c'est notamment le cas au cours de la coagulation intravasculaire disséminée du choc septique, où les mécanismes régulateurs de l'immuno-thrombose sont dépassés (Gould et al., 2015; Pfeiler et al., 2014). La CIVD a été identifiée comme un facteur indépendant de mortalité et de défaillance multiviscérale au cours du choc septique (Gando et al., 2016a). Le clinicien doit donc reconnaître les états d'hypercoagulabilité exagérée et les combattre, et non l'immuno-thrombose normale qui est un mécanisme de défense (Meziani et al., 2017). Le monitoring des tests de coagulation est un élément important pour reconnaître les patients les plus graves et pourrait guider l'utilisation des traitements anticoagulants et de futures thérapeutiques en cours de développement (Levi and Schultz, 2017).

Quantifier la NETose pour monitorer l'immuno-thrombose

La quantification des NETs pourrait représenter un autre moyen de mesurer l'immuno-thrombose. Si la détection des NETs in-vitro est possible notamment par microscopie par fluorescence (Hoppenbrouwers et al., 2017), la NETose n'a à ce jour pu être mise en évidence directement *in vivo*. Il existe cependant des marqueurs indirects des NETs, les molécules qui les composent : les composants du noyau, nucléosomes, histones, ADN d'une part, et les protéines spécifiques du neutrophile, MPO et NE d'autre part. Ces marqueurs indirects sont quantifiés par méthode ELISA. L'ADN circulant, les histones et les nucléosomes, ont ainsi été identifiés comme marqueurs de NETose dans le sang de patients au cours de différentes pathologies inflammatoires (Diaz et al., 2013; Kessenbrock et al., 2009; Xu et al., 2009). Néanmoins, ces marqueurs souffrent d'un manque de spécificité. En effet, d'autres mécanismes de mort cellulaire comme l'apoptose ou la nécrose sont également à l'origine de la libération d'ADN et d'histones (Bronkhorst et al., 2015; Masuda et al., 2016). Les autres méthodes proposées, détectant les complexes associant l'ADN à la NE ou à la MPO ne souffrent pas du même biais (Hakkim et al., 2010; Kessenbrock et al., 2009). Même si elle n'est pas standardisée, cette méthode apparaît à l'heure actuelle comme une des plus objectives pour quantifier les NETs (Masuda et al., 2016).

La cytométrie en flux a également été proposée comme outil de détection des NETs. Gavillet et al. ont proposé de détecter les histones H3 citrullinées et la myéloperoxydase à la surface des PNNs en cytométrie en flux et ont montré que ce phénomène traduit la NETose (Gavillet et al., 2015). Puisqu'elle ne détecte que les PNNs NETosant portant des histones citrullinées, cette méthode permet uniquement de reconnaître les NETs libérés en réponse à un mécanisme impliquant PAD4 (Hoppenbrouwers et al., 2017; Masuda et al., 2016). La fluorocytométrie en flux est par ailleurs peu reproductible pour être envisagée comme une technique de routine (Manda-Handzlik et al., 2016).

D'autres équipes ont cherché à se rapprocher des méthodes utilisées pour détecter les NETs in-vitro. Ainsi, Hamaguchi et al. ont pu visualiser des NETs dans des prélèvements respiratoires de malades de réanimation (Hamaguchi et al., 2014). L'équipe de Zhao a quant à elle proposé une méthode combinée associant imagerie et cytométrie en flux qui permet une quantification objective et spécifique des NETs (Zhao et al., 2015). Si cette méthode paraît robuste, sa complexité la rend cependant inapplicable en pratique clinique.

Plus récemment, Abrams et *al.* ont proposé une approche complémentaire visant à mesurer la capacité du plasma de patients de réanimation à générer des NETs après incubation avec des PNNs de donneurs sains (Abrams et al., 2019). Cette méthode, certes fonctionnelle, ne permet néanmoins pas d'appréhender les interactions entre les différentes cellules vasculaires et l'activation neutrophilique elle-même ni d'identifier quelles molécules sont à l'origine de cette capacité à générer des NETs.

L'immuno-thrombose dérégulée contribue aux défaillances d'organes

Plusieurs marqueurs de NETose ont été quantifiés au cours du choc septique. Ainsi, l'équipe de Rhodes a montré que l'augmentation des concentrations en ADN libre circulant libéré par les PNNs est un facteur de mortalité indépendant chez les patients en choc septique (Rhodes et al., 2006). Cette surmortalité semble secondaire à une activation incontrôlée de la coagulation dans les micro-vaisseaux, responsable d'une défaillance microcirculatoire, puis macrocirculatoire. Les nucléosomes et les histones extracellulaires relargués au sein des NETs sont reconnus par l'hôte comme des DAMPs et augmentent la libération de cytokines, le recrutement de cellules immunitaires innées et la formation de microthrombi sur le site de l'infection (Xu et al., 2009). Les histones et l'ADN libre circulants auto-activent également la coagulation de façon indépendante à la cascade de coagulation normale (Barranco-Medina et al., 2013). Cet effet est amplifié par l'action des sérines protéases, notamment la neutrophile élastase qui favorise aussi la fibrino-formation par le clivage des protéines anti-coagulantes régulatrices notamment le TFPI (Massberg et al., 2010). Enfin, s'il active la fibrino-formation, l'ADN libre circulant inhibe la fibrinolyse médiée par la plasmine (Gould et al., 2015). L'ADN libre circulant active ainsi PAI-1 et devient un inhibiteur compétitif de la plasmine lorsque les concentrations augmentent (Komissarov et al., 2011).

De cette façon, les histones et les nucléosomes extracellulaires semblent jouer un rôle majeur dans la physiopathologie des défaillances d'organes au cours des épisodes septiques et pourraient représenter une potentielle cible thérapeutique (anticorps anti-histones, protéine C activée) (Borgel and Vieillard-Baron, 2011; Xu et al., 2009). Ainsi, dans un modèle de choc endotoxémique chez la souris, la présence de NETs dans la circulation, quantifiée par l'ADN libre circulant, est associée à la mise en évidence de NETs *in vivo* dans les sinusoides du foie et les capillaires, veinules et artérioles, pulmonaires (Tanaka et al., 2014). A l'échelle locale, les NETs entrent en contact avec les cellules endothéliales et les plaquettes et sont à l'origine de dommages cellulaires (Saffarzadeh et al., 2012). Ces contacts cellulaires, à l'origine

d'agrégats leucocytaires et plaquettaires, participeraient à l'occlusion des micro-vaisseaux et donc à la défaillance micro-circulatoire chez les souris septiques (Tanaka et al., 2014).

L'immunothrombose dérégulée, une potentielle cible thérapeutique lors de la CIVD?

Dans un modèle murin de choc septique par ligature-perforation caecale, la libération d'ADN libre circulant par les NETs augmente la libération de complexes thrombine-antithrombine et de cytokines pro-inflammatoires notamment l'Il-6 (Mai et al., 2015). L'inhibition du phénomène de NETose par l'administration de DNase de type 1 améliore le devenir des animaux en réduisant la charge bactérienne et les défaillances viscérales (Mai et al., 2015; McDonald et al., 2017). Dans une autre étude de choc septique par ligature perforation caecale chez le rat, l'administration de thrombomoduline réduit l'activation de coagulation et la formation de NETose (Helms et al., 2017). Ces éléments laissent penser que le choc septique s'accompagne d'une dérégulation des phénomènes d'immunothrombose médiée par les neutrophiles qui interagissent avec les autres cellules du compartiment vasculaire notamment les plaquettes et favorisent l'évolution vers un état de coagulation microvasculaire diffuse qui participe à l'hypoperfusion et aux défaillances viscérales (McDonald et al., 2017).

Chez l'homme, le rôle majeur des NETs dans l'hypercoagulabilité du choc septique a été montrée (Yang et al., 2016). Par l'occlusion des réseaux capillaires, la microthrombose étendue des petits vaisseaux participe à une diminution de l'extraction tissulaire en oxygène et contribue à la défaillance multiviscérale du choc septique. L'anticoagulation préventive pourrait avoir un rôle bénéfique dans la prévention des phénomènes thrombotiques au cours du choc septique (Yang et al., 2016). En effet, l'état hyper-inflammatoire à la phase précoce du choc septique pourrait être à l'origine d'une réaction immunitaire innée inappropriée aboutissant à un état pro-coagulant, responsable d'une incidence accrue des thromboses veineuses profondes lors des épisodes septiques graves et de la CIVD (Pfeiler et al., 2016; Yang et al., 2016). Les neutrophiles sont donc capables de promouvoir un état pro-coagulant en émettant des NETs. Déstabiliser les NETs pour contrôler l'activation de la coagulation pourrait représenter une piste thérapeutique dans le traitement adjuvant du choc septique (McDonald et al., 2017). Néanmoins, les molécules proposées chez l'animal (DNases de type 1) restent inutilisables chez l'homme par manque de spécificité. Des études récentes ont par ailleurs montré un bénéfice en terme de survie à anticoaguler de façon préventive par dérivés héparinés les malades septiques (Meziani et al., 2017; Wildhagen et al., 2014).

Les MPs représentent un autre acteur de l'immuno-thrombose. Le choc septique est ainsi associé à un relargage massif de MPs, leucocytaires notamment neutrophiliques, en endothéliales et monocytaires (Delabranche et al., 2013; Walenta et al., 2009). Ainsi, la CIVD est associée à une émission exagérée de MPs leucocytaires et des neutrophiles (Delabranche et al., 2013). Le rôle des MPs dans la physiopathologie de la CIVD du choc septique souligne l'importance de l'interaction entre cellules du compartiment vasculaire.

Par ailleurs, dans un modèle murin de choc endotoxémique utilisant différents pathogènes, les NETs sont indispensables à l'apparition d'une CIVD. L'inhibition du phénomène de NETose (souris PAD4 KO, administration de DNase) améliorait la microcirculation et réduisait la production de thrombine et l'activation plaquettaire (McDonald et al., 2017). La coopération neutrophiles-plaquettes pourrait ainsi être un élément majeur dans la régulation de l'immuno-thrombose et représenter une cible thérapeutique au cours de la CIVD du choc septique (Wang et al., 2014). Dans un modèle murin de choc septique par ligature-perforation caecale, l'importance des neutrophiles dans le recrutement plaquettaire au niveau des réseaux capillaires sinusoïdes du foie a pu être montré. C'est l'agrégation plaquettaire dans les capillaires qui explique le défaut de perfusion hépatique et participe à la défaillance multiviscérale (Singer et al., 2006).

Le dépassement des mécanismes régulateurs de l'immunité et de la coagulation au cours du choc septique et de la CIVD du choc septique semble finalement secondaire à l'accumulation de nombreuses dysfonctions cellulaires vasculaires (Figure 13). Le rôle des NETs et des MPs dans la CIVD du choc septique souligne le rôle de la réponse de l'hôte plus que du pathogène dans l'évolution vers la CIVD (Delabranche et al., 2013; McDonald et al., 2017). Plus qu'une défaillance d'un type cellulaire, c'est l'interaction entre les différents acteurs de l'immunité et de l'hémostase, notamment les polynucléaires neutrophiles, qui semble détourner le phénomène d'immuno-thrombose contre l'hôte lui-même. La présence de l'ensemble des éléments cellulaires et moléculaires nécessaires à la formation de l'*immuno-thrombus* et leur organisation spatiale macromoléculaire est une condition *sine qua none* à l'évolution vers un état d'hypercoagulabilité au cours du choc septique et permet d'envisager de nombreuses cibles thérapeutiques. Les neutrophiles sont les premières cellules recrutées lors des épisodes septiques et thrombotiques (Nathan, 2006; von Brühl et al., 2012); par la précocité de leur action et leur rôle central dans la défense de l'hôte en terme d'immunité que de thrombose, les PNNs semblent représenter une cible cellulaire de choix pour développer de futures thérapeutiques.

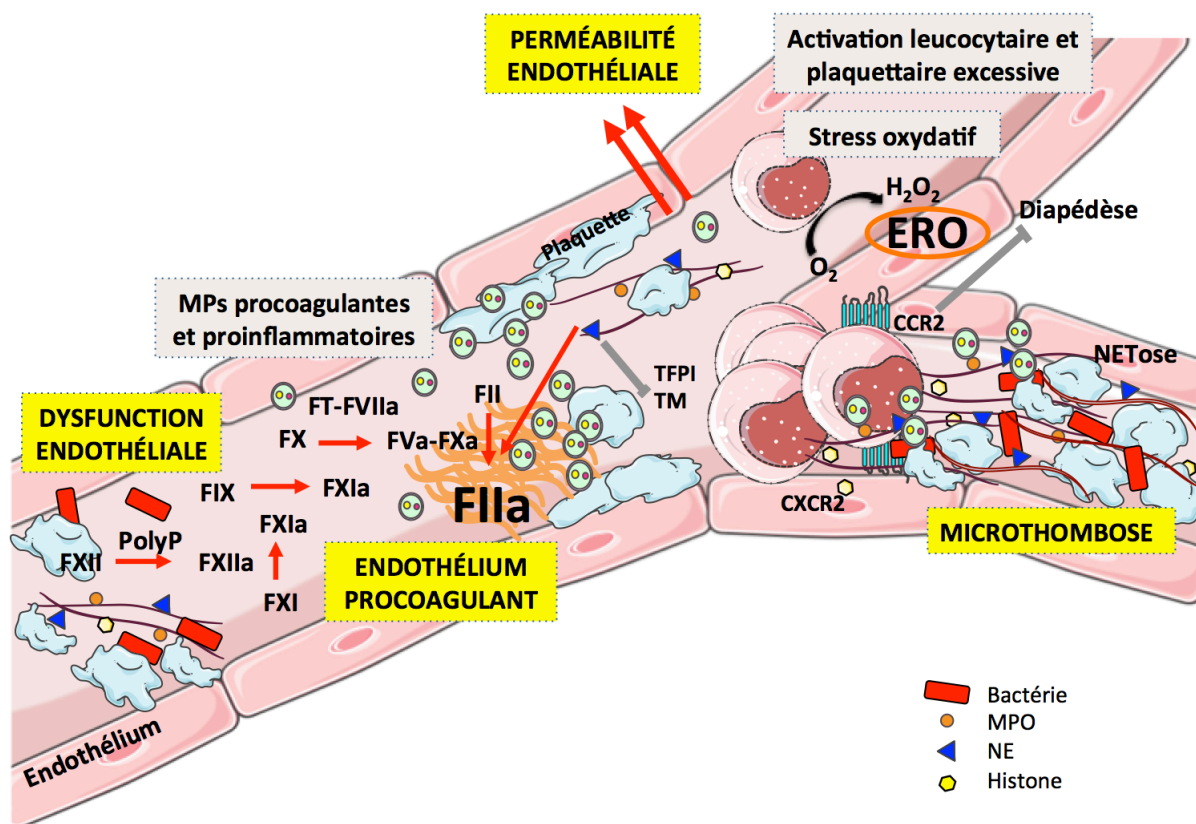


Figure 13: L'immunothrombose dérégulée d'après (Stiel et al., 2017)

Le choc septique s'accompagne d'une dérégulation de l'immunothrombose. L'hyper-activation neutrophilique est responsable d'une dysfonction neutrophile à l'origine d'un état hyperoxydatif. La migration des PNNs est altérée par inhibition de l'expression de CXCR2 et l'expression pathologique de CCR2. Cette dernière est à l'origine d'une accumulation intra-tissulaire des PNNs à l'origine de lésions tissulaires. Les bactéries échappent à la reconnaissance par le système immunitaire et prolifèrent. Les neutrophiles libèrent également des NETs qui participent à la capture et à l'endiguement des pathogènes mais forment également une surface pro-coagulante à l'origine d'occlusions capillaires. Les autres cellules du compartiment vasculaire sont aussi activées. Il en résulte une activation de la coagulation multimodale par les MPs, les NETs, les composants bactériens, et les membranes cellulaires activées. Tous ces éléments aboutissent à la formation de *thrombi* dans les petits vaisseaux, et à une consommation des plaquettes et des facteurs de coagulation circulants qui caractérisent la dérégulation de l'immunothrombose.

CCR2 : C-C récepteur de type 2, CXCR : chemokine récepteur, CXCL : chemokine ligand, ERO : espèces réactives de l'oxygène, F : facteur de coagulation, Fa : facteur activé, FT : facteur tissulaire, MPO: myéloperoxydase, MPs : microparticules, NE : neutrophile élastase; NETose, libération de NETs neutrophil extracellular traps, PAI : inhibiteur de l'activateur du plasminogène, PNNs, polynucléaires neutrophiles; PolyP : polyphosphates bactériens, TFPI : inhibiteur du facteur tissulaire, TM : thrombomoduline.

Objectifs

Le choc septique est une affection grave dont la morbi-mortalité reste élevée, plaçant cette pathologie comme une priorité pour l'Organisation Mondiale de la Santé. Le choc septique est caractérisé par une activation endothéliale et leucocytaire, associée à une activation de la coagulation, pouvant évoluer vers un état pro-coagulant et anti-fibrinolytique incontrôlé, la CIVD, qui aggrave encore le pronostic des malades. Les neutrophiles sont des acteurs majeurs de la réponse de l'hôte à l'infection, et par l'intermédiaire des NETs, leur action se situe à l'interface entre immunité et coagulation. Les neutrophiles apparaissent ainsi comme un élément clef dans la compréhension de la physiopathologie du choc septique.

L'objectif de ce travail de thèse était donc d'étudier les mécanismes associés à l'activation des polynucléaires neutrophiles au cours du choc septique afin de mieux appréhender la dysfonction vasculaire du choc septique et la réponse de l'hôte associant immunité et thrombose, et d'envisager le neutrophile comme une potentielle cible thérapeutique

Le manuscrit s'articule autour de résultats originaux de recherche expérimentale et clinique. Après un premier chapitre présentant le travail de revue de la littérature détaillé ci-dessus, mes travaux seront présentés et organisés selon trois objectifs :

le deuxième chapitre identifie la fluorescence des neutrophiles comme un marqueur diagnostique dans la CIVD du choc septique ;

les deux suivants mettent en évidence un des mécanismes de l'activation des neutrophiles, la NETose ;

le dernier travail a pour objectif d'identifier les protéines associées à l'activation des PNNs, pour déterminer, à terme, les mécanismes intracellulaires sous-jacent et envisager de nouvelles cibles thérapeutiques.

Travaux personnels

Chapitre 1

Neutrophil activation during septic shock

Revue de la littérature

Laure Stiel, Ferhat Meziani, Julie Helms

Shock. 2018 Apr;49(4):371-384.

DOI: 10.1097/SHK.0000000000000980

Review Article

NEUTROPHIL ACTIVATION DURING SEPTIC SHOCK

Laure Stiel,^{*†} Ferhat Meziani,^{*†} and Julie Helms^{*‡}

^{*}Medical Intensive Care Unit, NHC - Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France;

[†]EA 7293 FMTS, University of Strasbourg, Strasbourg, France; and [‡]University of Strasbourg, INSERM, EFS Grand Est, BPPS UMR-S 949, FMTS, Strasbourg, France

Received 6 Jul 2017; first review completed 27 Jul 2017; accepted in final form 16 Aug 2017

ABSTRACT—In addition to their well-known role as the cellular mediators of immunity, key other roles have been identified for neutrophils during septic shock. Importantly, neutrophils indeed play a critical role in the recently described immunothrombosis concept and in septic shock-induced coagulopathy. Septic shock is one of the most severe forms of infection, characterized by an inadequate host response to the pathogenic organism. This host response involves numerous defense mechanisms with an intense cellular activation, including neutrophil activation. Neutrophils are key cells of innate immunity through complex interactions with vascular cells and their activation may participate in systemic tissue damages. Their activation also leads to the emission of neutrophil extracellular traps, which take part in both pathogen circumscription and phagocytosis, but also in coagulation activation. Neutrophils thus stand at the interface between hemostasis and immunity, called immunothrombosis. The present review will develop a cellular approach of septic shock pathophysiology focusing on neutrophils as key players of septic shock-induced vascular cell dysfunction and of the host response, associating immunity and hemostasis. We will therefore first develop the role of neutrophils in the interplay between innate and adaptive immunity, and will then highlight recent advances in our understanding of immunothrombosis septic shock-induced coagulopathy.

KEYWORDS—DIC, immunity, immunothrombosis, neutrophils, septic shock

INTRODUCTION

Polymorphonuclear neutrophils (PMNs) are key players in host defense during bacterial and fungal infections (1). These neutrophils are primarily innate immune cells involved in early response to infection (2). Rapid control of the pathogen follows the medullary release and rapid chemotactic migration of PMNs to the site of infection. Once activated, they acquire the ability to capture the pathogen by phagocytosis and to release the content of their granules (3, 4). PMNs hence participate in microbial clearance but, at the same time, are responsible for a hyperinflammatory state contributing to the appearance of tissue lesions (3).

More recently, it has been shown that PMNs recruited early in response to infection participate in the regulation of the adaptive immune response, in particular by interaction with B-lymphocytes in spleen marginal zone (5).

In addition, neutrophils are also capable of releasing the content of their nucleus in the form of a meshwork of DNA fragments and modified nucleosomes, which supports enzymes such as myeloperoxidase (MPO) and neutrophil elastase (NE). These structures, called neutrophil extracellular traps (NETs), capture and engulf pathogens and circulating blood cells into their web (6). NETs thus participate in the host's immune defense. They also form a large procoagulant surface, by activating the contact phase of coagulation (7). Lastly, cytokines and pro-inflammatory mediators secreted by neutrophils

alter the membrane profile of vascular cells, in particular endothelial cells, thus contributing to cellular dysfunction and septic coagulopathy (3, 8). Through a NETosis phenomenon, PMNs may thus play a fundamental role in the interactions between immunity and thrombosis (9, 10). The term “immunothrombosis” was introduced to describe this interaction (11).

Immunothrombosis refers to an innate intravascular immune response responsible for thrombin generation and thrombi formation, especially in microvessels. It constitutes an independent defense mechanism, which allows the recognition, containment, and subsequent destruction of pathogens, through the activation of coagulation and the recruitment of immune cells. While immunothrombosis is involved in pathogen recognition and host defense, uncontrolled activation during septic shock can be deleterious to the host (12). As a result, there is an excessive formation of thrombin and fibrin in the microcirculation, causing bleeding, thrombosis, and coagulation factor consumption, leading to disseminated intravascular coagulation (DIC) (13, 14).

In the present review, we will first address the role of neutrophils as main actors of innate and adaptive immunity, followed by their role in immunothrombosis. A pathophysiological approach to septic shock will hence be proposed integrating polymorphonuclear neutrophil cells as a keystone of vascular cellular dysfunction during septic shock and of the host response associating immunity and thrombosis.

POLYMORPHONUCLEAR NEUTROPHILS IN INNATE IMMUNITY

The main role of PMNs is innate immunity (5). Neutrophils are highly differentiated cells, maturing in the bone marrow

Address reprint requests to Julie Helms, MD, PhD, Service de Réanimation Médicale—Nouvel Hôpital Civil, 1, place de l'Hôpital, F-67091 Strasbourg Cedex, France. E-mail: julie.helms@chru-strasbourg.fr

The authors report no conflicts of interest.

DOI: 10.1097/SHK.0000000000000980

Copyright © 2017 by the Shock Society

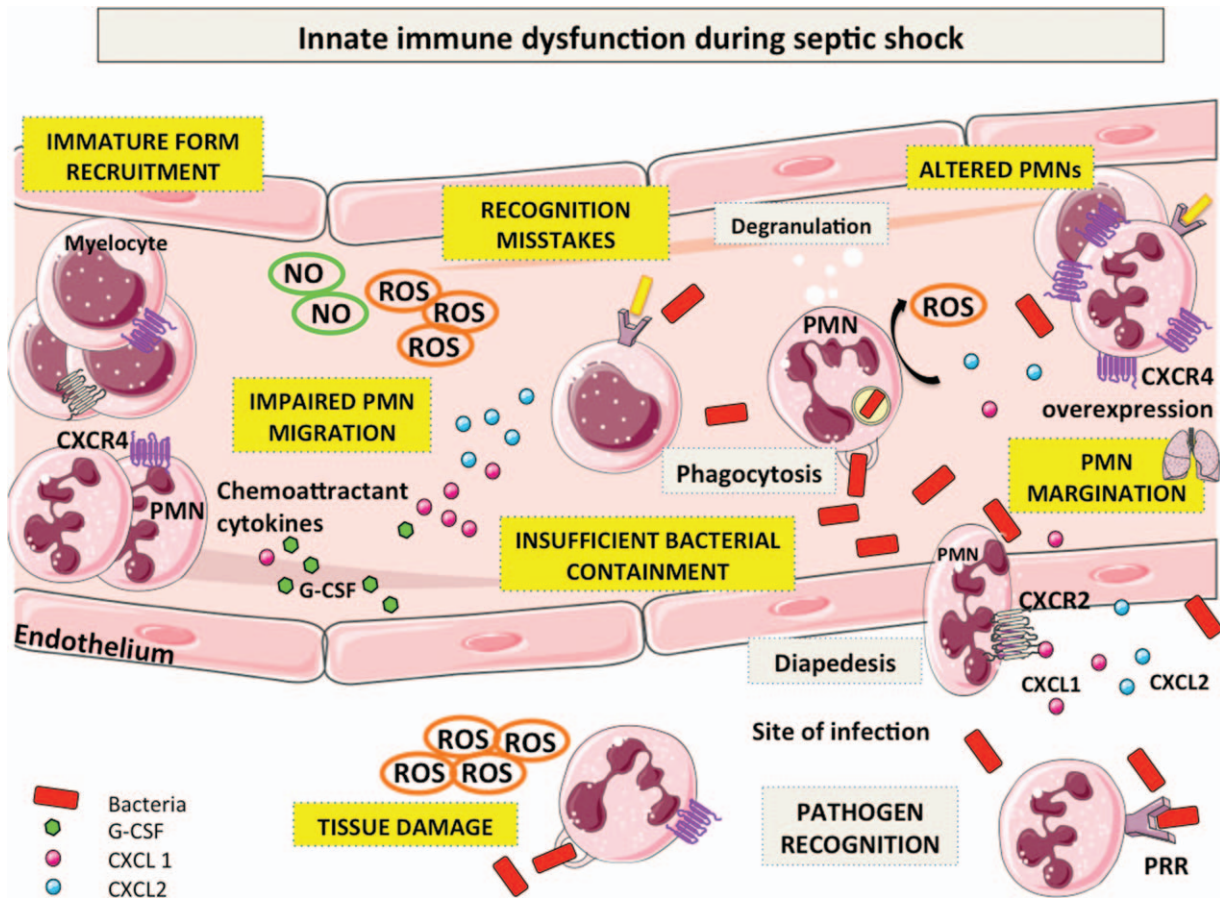


Fig. 1. **Innate immune dysfunction during septic shock.** During septic shock, host response is impaired and host exhibits danger signals sharing molecular patterns with pathogens hindering pathogen recognition. Pathogen recognition also leads to pro-inflammatory molecules release, leading to leukocyte recruitment to the infection site. Immature myelocytes and neutrophils with impaired phagocytosis lead to ROS overproduction, neutrophil margination, tissue damages and survival of altered PMNs overexpressing CXCR4. Altogether, innate immunity dysfunction results in insufficient pathogen recognition and elimination. CXCR indicates chemokine receptor; CXCL, chemokine ligand; G-CSF, granulocyte colony stimulating; NO, nitric oxide; PMN, polymorphonuclear neutrophil; PRR, pattern recognition receptor; ROS, reactive oxygen species.

before being released into the bloodstream, where they survive for 24 h (2). During their maturation, intracellular compartments, the granules, are formed and contain anti-inflammatory and antimicrobial proteins. PMNs are sensitive to inflammation and infection signals, which lead to their intravascular migration and subsequently their transendothelial migration by diapedesis and chemotaxis (15). Upon reaching the infection site, PMNs are capable of phagocytosis (4), but also of releasing the content of granules and reactive oxygen species (ROS). We will first describe the physiology of PMNs in innate immunity, then their dysfunctions during septic shock (Fig. 1).

Neutrophils, actors of innate immunity

Medullary release of neutrophils—PMNs are produced in the bone marrow by granulopoiesis, which defines the process of formation and maturation of PMNs and monocytes (2).

The immature cells of the granular myeloid line, or myelocytes, express different chemokine receptors (CXCR) depending on their stage of maturation. In contrast to the multiple CXC chemokines, only few CXC chemokine receptors have been

shown to mediate the response to CXC chemokines in PMNs: CXCR1 and CXCR2, two receptors for IL-8 (which homolog does not exist in rodents), and CXCR4, a CXCL12 receptor (16, 17). The less differentiated neutrophils preferentially express CXCR4, while mature PMNs express CXCR2 (17, 18). The release of PMNs is modulated by the expression of chemokine receptors. Other receptors, such as the toll-like receptors (TLR), appear during the maturation of PMNs. CXCR2 and TLRs are thus markers of maturity and their expression is a release signal for PMNs, while CXCR4 is a medullary retention signal (18).

Recognition of pathogens in response to acute inflammation—Invasion by a pathogen causes an immediate response of the attacked organism via innate immunity. In 1989, Janeway (19) proposed the recognition of conserved pathogen-associated molecular patterns by host cells, including PMNs. This recognition involves the detection of danger signals, namely pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) or microbe-associated molecular patterns expressed on the surface of pathogens, in particular lipopolysaccharide (LPS), as well as damage-associated molecular patterns (DAMPs), endogenous

signals expressed after contact with the pathogen (20). PAMPs and DAMPs are recognized by specific transmembrane receptors, the pattern recognition receptors (PRRs), including TLRs, expressed on the surface of immune cells such as macrophages, antigen-presenting cells (APCs), or lymphocytes (21). The ensuing formation of the TLR-ligand complex activates various intracellular signaling pathways, responsible for the innate immune response (22). This cascade results in the activation of transcription factors, such as nuclear factor-kappa B (NF- κ B) (23).

NF- κ B activates the transcription of genes coding for pro-inflammatory cytokines, such as interleukin-1 (IL-1) and interleukin-12 (IL-12). NF- κ B is also activated via the LPS-TLR4 pathway and thus leads to the transcription of interferon β genes. Cytokines and interferon β amplify the activation loop (24). The simultaneous activation of several TLRs is necessary for the reprogramming of immune cells to a pro-inflammatory phenotype (25). In response to these transcriptional changes, the immune cells release antimicrobial peptides (interferon β , tumor necrosis factor α TNF α , IL-6, IL-8, IL-1, etc.), activate the complement, and recruit other circulating cells, notably neutrophils, which subsequently migrate by chemotaxis.

Chemotaxis—Subsequent to this pathogen recognition step, the PMNs migrate to the site of infection by chemotaxis or directed migration of leukocytes by means of various molecules (26). These molecules are variable in nature: antibacterial peptides, such as formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP), and chemokines, including IL-8, etc.

The acute phase of septic shock is hence characterized by the release of pro-inflammatory mediators (cytokines, proteases, etc.): this is called the systemic inflammatory response syndrome (SIRS), which is counterbalanced by the secretion of anti-inflammatory cytokines, the compensatory anti-inflammatory response syndrome or CARS (27).

Neutrophils express TLRs capable of recognizing pathogens, in particular TLR-2 and TLR-4. Activation of the TLR pathways, notably the TLR-4 pathway, promotes chemotaxis. The response to chemotactic signals is a property acquired in the bone marrow. Thus, chemokines responsible for chemotaxis have membrane receptors on the surface of PMNs: for example, CXCR2 is the IL-8 receptor. Once in proximity to the site of infection, PMNs interact with the endothelium to reach the tissues: this step is called margination, followed by a rolling phase, i.e., the labile adhesion of PMNs to the endothelium, which requires leukocyte-endothelium interaction (28). This step involves adhesion molecules, selectins, and ultimately integrins (28). The selectins allow the rolling of the PMNs, while integrins facilitate their adhesion.

The final step, regulated by chemokine gradients, in particular fMLP, constitutes the trans-endothelial migration of PMNs through tight junctions.

Phagocytosis and degranulation

After migrating to the site of aggression, the neutrophil is capable of phagocytosis. Phagocytosis is a process that allows PMNs to engulf and subsequently destroy a pathogenic microorganism (29). This constitutes the main function of neutrophils. The compartment in which phagocytosis occurs is the

phagolysosome. PMNs are incapable of phagocytosis in the bloodstream due to the velocity of blood flow and thus acquire this function during their migration to the site of infection. PMNs possess two mechanisms of phagocytosis, which coexist *in vivo*: an oxygen-dependent mechanism involving nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase and an oxygen-independent mechanism (29). During septic episodes, tissue oxygenation is dependent on oxygen supply and demand, resulting in a change in phagocytosis metabolism.

The oxygen-dependent mechanism is mediated by the reactive oxygen species (ROS). In response to the recognition of a pathogen, the NADPH oxidase complex assembles (30): electrons are transported to electron acceptors, which allows the generation of ROS. These ROS are in turn metabolized into highly bactericidal products, such as hydrogen peroxide, and destroy the pathogens trapped in the phagolysosome (31). These molecules are naturally toxic and capable of destroying healthy tissues by interaction with the nucleic acids and proteins they constitute (32).

During the oxygen-independent mechanism, the content of the granules, in particular the lysosomal enzymes, are released into the phagosome (33). The phagosome becomes a phagolysosome whose maturation is accompanied by an alkalization (pH 7.8–8.0) enabling activation of the enzymes. Secondly, the content of the phagolysosome becomes acid (pH at around 7.0) via the Na⁺/H⁺ exchanger (34), which allows digestion of the captured bacteria. These changes in pH protect healthy tissue from the toxicity of granule enzymes.

Innate immune dysfunction of neutrophils and sepsis

During septic shock, all the previously described mechanisms are deficient and participate in organ dysfunction (Fig. 1).

Release of incompetent polymorphonuclear neutrophils—Neutrophil dysfunction can appear as early as during their medullary production. Thus, septic shock is accompanied by an increased medullary release in PMNs, linked to an increase in cytokine production, particularly G-CSF, and responsible for blood neutrophilia. This neutrophilia is associated with medullary depletion, causing the release of immature myelocytes (35, 36). A greater than 10% release of immature forms is an inherent component of the definition of SIRS (37). The release of immature PMNs is responsible for heterogeneity of circulating myelocytes, with the immature forms expressing different receptors (PRRs) in a diminished manner, resulting in an alteration in pathogen recognition (36). Their phagocytic capacity is also reduced (38). The presence of circulating immature forms, evidenced on blood smears, is associated with excess mortality during septic shock and the percentage of myelocytes and metamyelocytes is correlated with time until death (39, 40). Immature PMNs may therefore not only represent a putative prognostic marker, but also reflect organ dysfunction (40). This is explained by the rheological properties of immature myelocytes (rigid cell membrane), responsible for their stagnation in the microcirculation, particularly in the lungs. Thus, myelocytes and metamyelocytes contribute to the obstruction of microvessels, and therefore to hypoxemia and tissue hypoperfusion (41).

In addition, septic shock is characterized by mature PMNs with a heterogeneous phenotype due to the aging of circulating neutrophils, which can survive for up to 5 days (42, 43). The aging PMNs modify their molecular repertoire and overexpress CXCR4 (44). This overexpression causes PMNs to cease their return to the bone marrow, thereby promoting their margination (PMNs captured in the capillary networks) and their clearance via chemokines such as CXCL12 (44). For example, in a mouse endotoxin shock model, PMNs present in normal tissues (kidneys, lungs) increase significantly (44). Both the inflammatory environment of septic shock and the expression of TLR4 on the surface of these PMNs promote the change in the migratory potency of aging PMNs which have a predominant role in acute inflammation and phagocytosis (45).

PMNs also exhibit impairment in pathogen recognition function during severe septic episodes. This is due to molecular mimicry between mitochondrial DAMPs and PAMPs which share similar PRR on the neutrophil (46, 47). This mimicry and the expression of the same receptors lead to a lack of recognition of danger signals allowing the propagation of the unrecognized microorganism. Molecular mimicry is also responsible for inadequate “sepsis-like” responses in other, particularly traumatic, attacks (48). Accordingly, mitochondrial DAMPs are the cause of PMN-mediated cell damage during septic shock by inhibiting chemotaxis in favor of a margination responsible for diffuse lesions in healthy tissues (48).

Impaired neutrophil migration—During severe septic episodes, the decreased expression of TLR4, and hence of pathogen recognition, is responsible for lower neutrophil migration to the site of infection (49): this is notably due to a deficiency in CXCR2 by PMNs as a result of the overproduction of nitric oxide (NO) (50, 51, 50), and to a decrease in the response to its ligands (CXCL1,2, IL-8) which are nonetheless produced in large quantities (52). The expression of CXCR1 is conserved (52). In contrast, the expression of the β -integrin CD11b is increased. The inadequate recruitment of PMNs is responsible for a poor local control of the infection and promotes bacterial spread (50) (Fig. 1). A decrease in chemokine-induced PMN motility is also observed in experimental models of endotoxemia in animals and humans (53). The changes in the expression of chemotactic molecules result in a reduction in both PMN motility and the return of mature PMNs to the bone marrow (52). The decrease in CXCR2 is associated with the severity of shock and is an unfavorable prognostic marker (52). The ensuing modification of chemotaxis is indeed responsible for an inappropriate migration of PMNs in healthy organs including the lungs, resulting in occlusion of the microcirculation and a depletion in lymphoid organs (54, 55). In addition to the repression of receptors normally expressed on the surface of PMNs, receptors physiologically absent from the PMN surface, such as the CCR2 chemokine receptor, are expressed and involved in multiple organ failure in septic shock: in a murine model of septic shock induced by cecal ligation and puncture, CCR2 expression in response to TLR-2 and TLR-4 stimulation was found to be associated with massive infiltration of vital organs by activated PMNs (56). The expression of CCR2 thus contributes to multiple organ failure by causing occlusion of the microcirculation by PMNs, resulting in tissue hypoxemia.

Accordingly, CCR2 is associated with excess mortality in the early phase of septic shock (56) (Fig. 2).

The migration of PMNs is also altered by the release of microparticles (MPs). MPs are plasma membrane submicron fragments with procoagulant properties released by stressed cells and capable of disseminating cytoplasmic and membrane bioactive molecules from parental cells to other cells (57, 58). In both humans and animals, septic shock is associated with an excessive generation of endothelial-, monocyte-, and neutrophil-derived MPs (59–63). They promote the occurrence of a multiple organ failure syndrome by their modulatory effects on the inflammatory response, and notably participate in the recruitment of PMNs (61, 63, 64). Neutrophil-derived MPs modulate their migratory potency: thus, PMN chemotaxis is increased in response to IL-8 by the expression of various selectins at their surface (65). Conversely, PMN chemotaxis is inhibited in response to IL-1 β by the expression of the anti-inflammatory molecule annexin 1 on the surface of neutrophil-derived MPs (66).

Finally, Arraes et al. (67) showed that severe sepsis might alter neutrophil ability to migrate toward chemoattractants. During severe sepsis, overstimulation of circulating neutrophils would induce G protein-coupled receptor kinase (GRK2 and GRK5) expression and receptor desensitization. Subsequent desensitization of circulating neutrophils thus led to reduced neutrophil chemotaxis, because of impaired chemoattractant-induced tyrosine phosphorylation and actin polymerization in response to IL-8 or LTB4 (67).

Once in proximity to the site of infection, PMNs interact with the endothelium to enter the tissues. During septic states, the expression of selectins and integrins that initiate this interaction is altered. The expression of L-selectin is hence decreased while CD11b expression is increased (3). This alteration in cell adhesion during septic shock is secondary to vasoplegia due to excessive NO release (49). In addition, the margination of neutrophils in the pulmonary microcirculation induces an endothelial dysfunction through the accumulation of cytokines and contributes to multiple organ failure associated with septic shock (68, 69).

The change in physical properties of the PMNs, which become more rigid, alters their migration through endothelial tight junctions (70). This excess rigidity leads to reduced deformability that is proportional to the severity of the sepsis and is responsible for capillary occlusion involved in multiple organ failure (70).

During septic shock, inflammation in itself also promotes capillary sequestration by activating circulating PMNs (71). This activation of PMNs in the microcirculation is responsible for luminal occlusion of the small vessels as well as the migration of PMNs to vital organs and the release of cytotoxic substances (pro-inflammatory cytokines, enzymes, etc.) involved in tissue damage and multiple organ failure during septic shock (3, 55).

Alteration of phagocytic functions

Septic shock is characterized by the association of an excessive ROS production and deficient protective antioxidant mechanisms (glutathione, selenium, etc.). These elements trigger

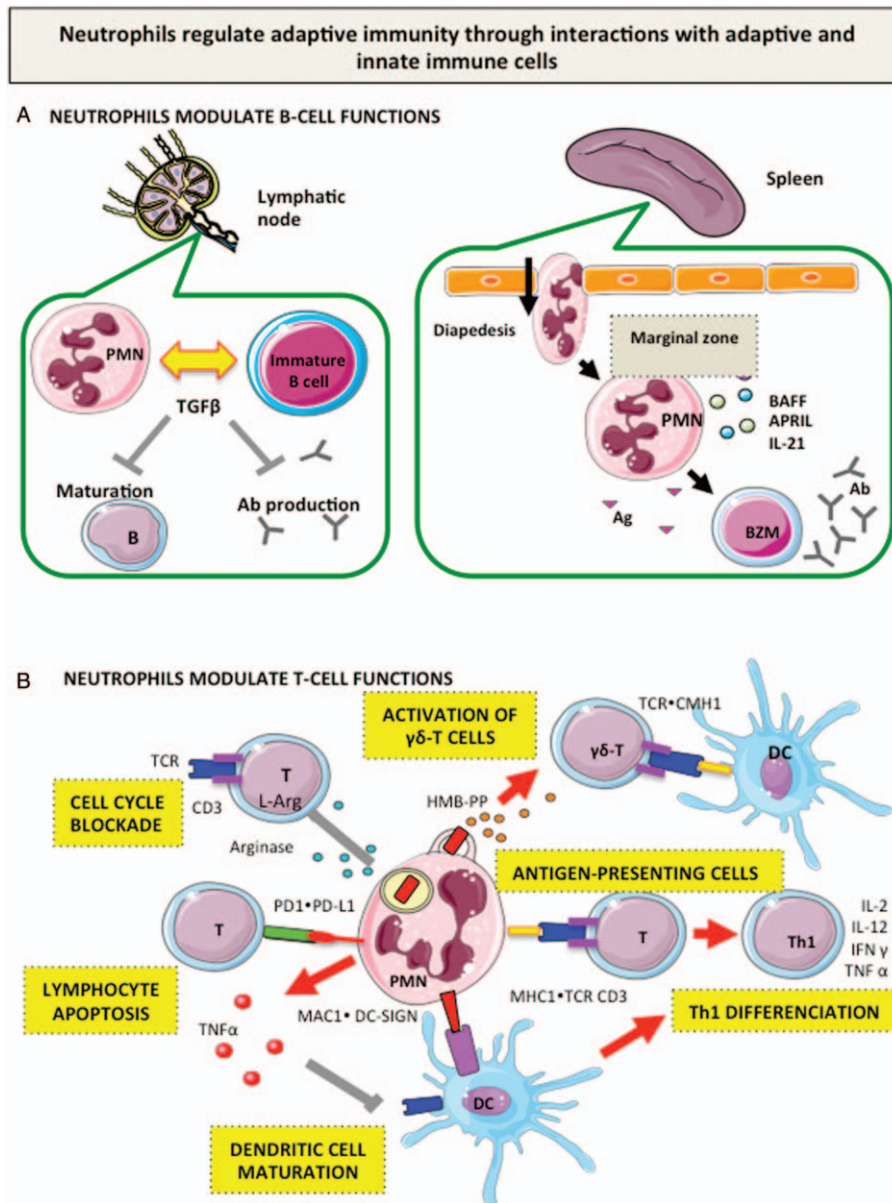


FIG. 2. Neutrophils regulate adaptive immunity. A, Neutrophils modulate B-cell functions. Neutrophils interact with B-lymphocytes in secondary lymphoid organs (lymphatic nodes, spleen). In lymphatic nodes, PMNs have a B-inhibitory function through the anti-inflammatory TGF- β secretion. In contrast, PMNs participate in T-independent B activation in spleen marginal zone: activated PMNs express the activating cytokine of B cells, BAFF, and the linked BAFF cytokine, APRIL. These cytokines are recognized by B-cells and are indispensable for their activation. B, Neutrophils modulate T-cell functions. PMNs exert a T-stimulating function by different mechanisms: PMNs activate T-lymphocytes by direct antigen presentation, triggering the differentiation of T-lymphocytes toward a Th1 phenotype. They modulate the antigen presentation by DCs, involving DC-SIGN receptors on the surface of immature DCs and Mac-1 expressed by the PMNs. Neutrophils release bacterial products (like HMB-PP) after ingestion of a pathogen to activate $\gamma\delta$ -T cells. PMNs inhibit T-lymphocytes, through ROS and arginase release. Both species inhibit TCR ζ borne by T-lymphocytes, and thus stop the cell in the G0-G1 phase. PMNs also express PD-L1. Stimulation of this ligand is associated with PD1-mediated T-cell apoptosis. Ab indicates antibody; Arg, arginine; APRIL, proliferating-inducing ligand; BAFF, B-cell activating factor; DC, dendritic cell; BZM, marginal zone B lymphocyte B; CD, differentiation cluster; DC-SIGN, dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin; HMB-PP, 4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl-pyrophosphate; IL, interleukin; LB, B lymphocyte; LT, T lymphocyte; Mac-1, macrophage 1 antigen; MHC, major histocompatibility complex; PMN, polymorphonuclear neutrophil; PD, programmed death 1; PD-L1, programmed death ligand 1; ROS, reactive oxygen species; TCR, T-cell receptor; TGF β tumor growth factor β ; Th, lymphocyte T-helper; TNF α tumor necrosis factor α .

tissue damage by immune cells, in particular PMNs, and their cytotoxic enzymes (72–74). The excess ROS released by the PMNs thus contributes to the vascular dysfunction during septic shock and to the concomitant vascular leakage in acute respiratory distress syndromes, particularly of inflammatory origin (75). ROS production decreases with resolution of shock, while it remains elevated in non-surviving patients (76). The overproduction of ROS and the persistence of high concentrations are poor prognostic factors during septic shock (76).

The pH regulation of phagolysosomes is also impaired in severe septic episodes. Indeed, in severe burn patients with *Staphylococcus* infections, the insufficient alkalinization state of PMNs explains the lack of activation of microbicidal enzymes thereby allowing bacterial survival (77). In contrast, in a murine cecal ligation and puncture septic shock model, PMN acidity decreased and was associated with increased mortality (78).

However, studies assessing the total phagocytic capacity of PMNs in the early phase are somewhat contradictory: some

conclude to an enhanced phagocytosis (79), while others conversely show a decreased phagocytic activity (38). It is likely that the initial neutrophilia accounts for increased phagocytosis, but that the alteration of the PMN phenotype ultimately results in lower microbicidal potency and impaired pathogen recognition.

Thus, for example, the serine proteases of the PMN granules are able to cleave the complement receptors CR1 and C5aR, which have a major role in the recognition of opsonized elements to be phagocytized (80). Accordingly, the deficiency in complement receptors observed during septic shock is associated with impaired phagocytosis (80).

POLYMORPHONUCLEAR NEUTROPHILS IN ADAPTIVE IMMUNITY

In addition to their role in innate immunity, PMNs are capable of modulating the adaptive immune response, in particular by their interaction with other cells of the immune system, such as lymphocytes or APCs (Fig. 2). In this section, we will address the physiology of PMNs in adaptive immunity, followed by the description of their dysfunctions during septic shock.

Neutrophils and adaptive immunity

Modulation of B lymphocyte activity by PMNs—Depending on the microenvironment, PMNs are capable of stimulating or inhibiting the activity of B-lymphocytes in primary and secondary lymphoid organs. Neutrophils first interact with B-lymphocytes in the marginal zone of the spleen, located near the sinusoidal capillaries, and whose role is the rapid initiation of an adaptive T-independent immune response in response to circulating pathogens. The initiation of the T-independent response requires the presentation of circulating microorganisms to B-lymphocytes. Neutrophils are the main actors in the capture of circulating microorganisms and their transport to the spleen during sepsis in murine models (81). The activated PMNs express the B-cell activating cytokine (BAFF) and the bound BAFF cytokine (APRIL) in the splenic marginal zone and thus participate in T-independent B lymphocyte activation (82). BAFF and APRIL, in combination with other cytokines specific to activated splenic PMNs such as IL-21, are necessary for the B-stimulant effect (83). This effect is acquired by contact with microbial elements in the splenic microenvironment and is specific thereof. PMNs thus acquire a “B-helper” function and promote B lymphocyte survival, antibody production, and immunoglobulin class switching (83). There is therefore a reprogramming of a population of circulating PMNs, thus playing a role in adaptive B-cell immune modulation (Fig. 2A).

In addition to their migration in primary lymph organs, PMNs migrate in the lymph nodes either via the bloodstream or via lymphatic vessels. The PMNs come into contact with the B lymphocytes of the medullary and inter-follicular zone of the lymph nodes and inhibit the production of antibodies by these cells, resulting in a B-inhibitory action (83) (Fig. 2A).

Modulation of T lymphocyte activity by PMNs—T-lymphocyte activation by neutrophils is more complex. Simultaneously

to the arrival of neutrophils and monocytes at the site of infection, a small number of T-lymphocytes are also recruited. This phenomenon is facilitated by the pro-inflammatory microenvironment and is notably observed during viral infections (84). T-lymphocytes, non-specific to the pathogen, proliferate locally and are activated in response to the inflammatory environment. This phenomenon is called “bystander response” (85). Neutrophils participate in the regulation of this “bystander response,” which contributes to the recruitment of memory T-lymphocytes and the early clearance of pathogens, in particular by interaction with other immune cells (86).

A significant proportion of the T-lymphocytes recruited at the site of infection belong to the $\gamma\delta$ -T family. These $\gamma\delta$ -T cells are activated by neutrophils either by the release of microbial metabolites such as HMB-PP after phagocytosis or by direct cell contact (87). This cellular activation also requires antigen presentation, particularly by the dendritic cells (88). PMNs influence the amount of available antigen by the early clearance of the pathogen through phagocytosis (89), but also by their role of direct antigen presentation, since they express the molecules necessary for the cross-priming and presentation of antigens by the major type 1 histocompatibility complex (MHC1) (90). PMNs therefore act as APCs for T-lymphocytes (91). This function is CCR-7-dependent and is particularly involved in viral infections by antigenic presentation to CD8 T-lymphocytes (90). This is notably the case in *Influenzae* virus infections where infected PMNs are able to present the viral antigen via MHC1 at pulmonary level (92).

By serving as antigen-presenting cells to effector T-lymphocytes, neutrophils modulate the differentiation toward a Th1, Th2, or Th17 phenotype. For instance, NE, an enzyme of the serine protease family contained in azurophilic granules, allows the preferential differentiation of lymphocytes toward a Th1 phenotype responsible for the release of cytokines stimulating macrophage microbicidal activity and the production of antibodies (Fig. 2B).

Modulation of antigen-presenting cell activity by PMNs—Neutrophils are indirectly capable of modulating adaptive immunity, especially lymphocytic, by stimulating or repressing antigenic presentation by APCs. Interactions between APCs and PMNs remain poorly understood. It is however known that activated PMNs are capable of activating dendritic cells, and this interaction is indispensable for the functioning of both cell types (93). In humans, the interaction between APCs and PMNs involves DC-SIGN receptors on the surface of immature dendritic cells and Mac-1 expressed by the PMNs (94). While Mac-1 is an integrin expressed by several cell types, the interaction with dendritic cells is specific to PMNs due to a particular glycosylation inherent to these cells (94). Through this direct interaction with APCs, PMNs suppress antigen presentation by MHC type 1, thereby contributing to the polarization of lymphocytes to a Th1 phenotype (95). Nevertheless, this DC-SIGN-Mac1 interaction is not sufficient for the maturation of the dendritic cells. The latter indeed require the presence of TNF α released by neutrophils as an activating signal (93, 96). The DC-SIGN-Mac1 interaction is nonetheless essential for recruiting APCs along with TNF α released by PMNs (94).

PMNs furthermore participate in the recruitment of dendritic cells: some alarmins secreted by the PMNs (HGBM1) are chemoattractant for dendritic cells allowing their accumulation at the site of infection (95). Alarmins also induce the production of chemokines such as RANTES, which in turn recruit APCs (97).

Finally, dendritic cells harbor antigens derived from neutrophils having phagocytized microorganisms. However, phagocytosis limits the number of available antigens and thus limits their lymphocyte presentation (98).

Adaptive immune dysfunction during septic shock

During septic episodes, PMN interactions with other cells of the immune system, including lymphocytes, are deregulated and participate in the patient's inflammatory state, as well as in a form of adaptive immunosuppression that occurs in the early phase of septic shock.

During septic shock, PMNs secrete pro-inflammatory mediators such as IL-12, responsible for T-cell differentiation to a Th-1 phenotype, and IL-4, which directs to a Th2 phenotype. The transcription factors and cytokines responsible for these two phenotypes are increased (99). Th1 lymphocytes release cytokines (IL-2, IL-12, TNF α , leukotrienes, etc.) which stimulate the microbicidal activity of macrophages against the intracellular pathogens, as well as the production of antibodies targeting extracellular pathogens. Th2 lymphocytes produce humoral immunomodulatory cytokines (IL-4, IL-5, IL-9, etc.) and initiate the anti-inflammatory response. Notwithstanding, the balance between the various cytokines secreted during septic episodes is initially responsible for a Th1 phenotype (72, 99). This lymphocytic hyper-inflammatory phenotype participates in the "cytokine storm" in the early phase of septic shock in addition to contributing to tissue damage (72). However, septic shock is associated with Th1 and Th2 lymphopenia, a weaker transcriptional intensity and lower cytokine release than that observed during sepsis (99), indicating that immunosuppression is already present, in the early phase of septic shock (Fig. 2B).

PMNs also participate in the "adaptive immunosuppression" of septic shock through lymphocyte depletion. Indeed, neutrophil activation is initially responsible for the expression of arginase-1 by certain PMNs during interphase (phase of the cell cycle during which the cell doubles all of these elements). The presence of PMNs in interphase is dependent on the degree of inflammation and is correlated with circulating IL-6 (100). Arginase-1 is responsible for the depletion of L-arginine, an amino acid essential in the cell cycling of T lymphocytes (101). This results in lymphocyte dysfunction, since T lymphocytes are unable to continue their cell cycle (blocked at the G0-G1 phase). This blockade is secondary to a repression of the ζ chain of CD3, a coreceptor of the T-cell receptor, essential for intracellular translation (100) (Fig. 2B). The expression of arginase-1 by PMNs in septic shock patients is correlated with the number of organ failures (100). Immature PMNs together with their altered phenotype (decreased density) predominantly express arginase-1. L-arginine supplementation could henceforth represent a therapeutic option.

In septic shock patients, PMNs and monocytes also express a surface protein, called programmed death 1 (PD1), and its ligand PD-L1 (102). The PD1-PD-L1 intracellular pathway is one of the explanatory elements of lymphocytic apoptosis responsible for post-septic immunosuppression (103).

Septic shock is therefore associated with increased lymphocytic apoptosis (B and T cells). This apoptosis results in prolonged lymphopenia leading to post-septic immunosuppression, which explains the host's susceptibility to nosocomial infections that are responsible for numerous deaths in the medium term (104). The extent of lymphopenia during septic shock is moreover associated with prognosis (105).

In addition, apoptotic bodies derived from innate (dendritic cells, PMNs) and adaptive (lymphocytes) immune cells induce the release of anti-inflammatory cytokines, such as IL-10, at the outset of the early phase of septic shock. The increase in IL-10 concentrations during septic shock is strongly associated with fatal outcome (106).

In contrast, PMNs have a prolonged survival during septic episodes. Under physiological conditions, PMN apoptosis is finely regulated by cell death molecules, caspases, and transcription factors of the Bcl-2 family (107). During infectious processes, a prolonged survival of PMNs thus constitutes one of the implemented defense mechanisms. This delayed apoptosis is mediated by cell survival signals, in particular G-CSF, as well as by cytokines such as interferon γ (108). However, while delayed PMN apoptosis is beneficial in allowing neutrophilia to persist, it also allows the survival of immature and non-fully functional neutrophils, as well as that of abnormal PMNs via their morphological properties such as low density granulocytes (104). This prolonged survival fosters the persistence of neutrophil dysfunction in severe septic episodes.

Recent studies report another mechanism of neutrophil death, which is called autophagy (107, 109). The latter features an autologous degradation of PMNs by their own phagosomes, a form of autophagocytosis. PMN autophagy is a caspase-independent cell death mechanism that occurs in a pro-inflammatory environment (G-CSF, inflammatory cytokines). This environment is responsible for the activation of the CD44 surface receptor (109). This in turn activates the phosphoinositide-3-kinase (PI3K) pathway usually involved in cell survival. PI3K leads to the production of ROS by NADPH-oxidase, which allows the formation of cytoplasmic vacuoles expressing CD44. This is followed by cellular destruction by autophagocytosis. During septic episodes, this mechanism of cell death prevents the destruction of healthy tissues by the ROS (107), although its precise role in the evolution of severe sepsis remains to be defined.

POLYMORPHONUCLEAR NEUTROPHILS IN IMMUNOTHROMBOSIS

Immunothrombosis, a concept recently described by Engelmann and Massberg (11), refers to an innate intravascular immune response that causes thrombin generation and thrombi formation, especially in microvessels. Immunothrombosis is therefore an independent defense mechanism that allows the recognition of pathogens, their containment, and ultimately

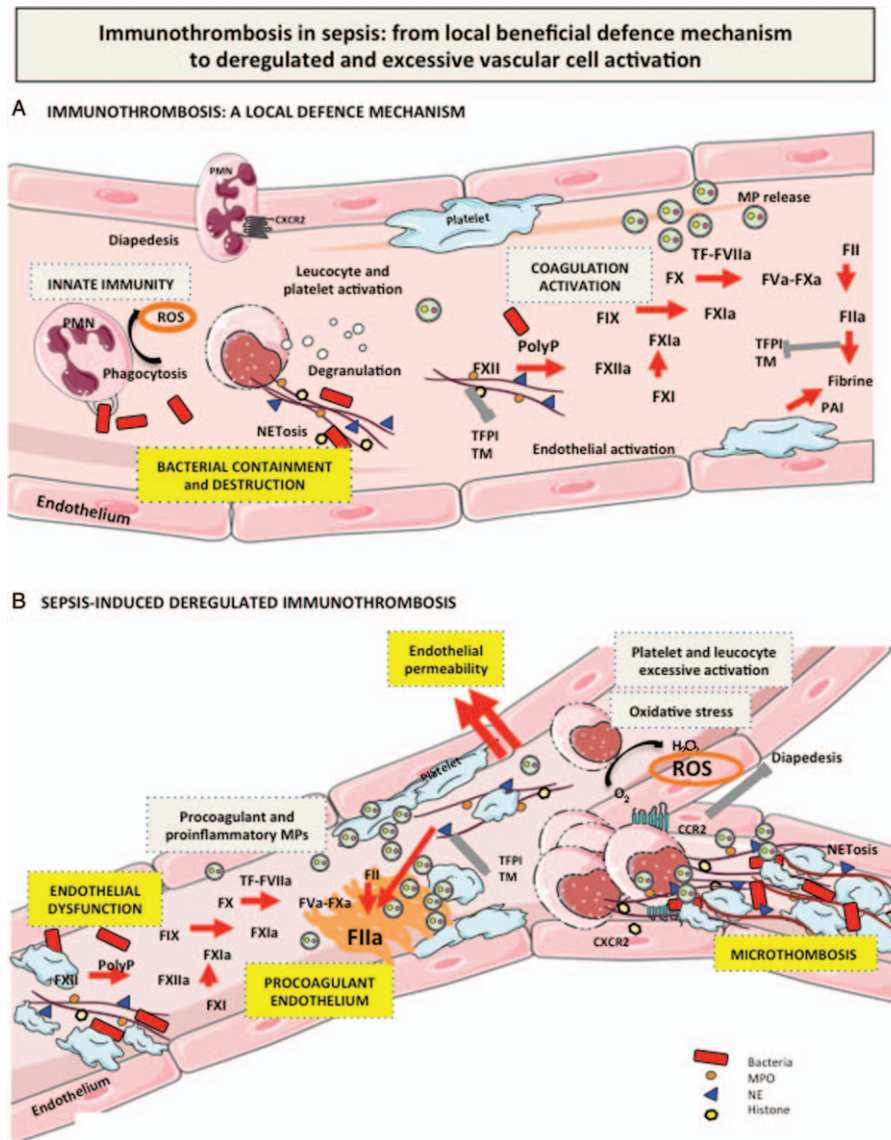


FIG. 3. Immunothrombosis in sepsis: from local beneficial defence mechanism to deregulated and excessive vascular cell activation. A, Immunothrombosis: a local defense mechanism. After host invasion by a pathogen, vascular cells (including neutrophils, platelets, endothelial cells, and immune cells) are activated and trigger both innate immunity and coagulation pathways. PMNs (neutrophils) are thus recruited to the site of infection in response to chemoattractants like CXCL2, and release their granules and reactive oxygen species (ROS), but also microparticles (MPs) and neutrophil extracellular traps (NETs) in order to contain and kill the pathogen. Tissue factor (TF), MPs, neutrophil extracellular traps (NETs), and polyphosphates (PolyP) contribute to the coagulation pathway activation that will ultimately limit pathogen dissemination. The interactions between coagulation and immunity are called immunothrombosis and represent a first line defense against a pathogen. B, Septic shock-induced deregulated immunothrombosis. During septic shock, deregulated innate immunity leads to a hyper-inflammatory and hyper-oxidative state. Subsequent excessive neutrophil activation leads to impaired neutrophil functions, including impaired migration ability to the site of infection through CXCR2 inhibition. Bacterial proliferation and dissemination thus becomes uncontrolled. Toll-like receptors (TLRs) also induce neutrophil CCR2 expression, leading to their accumulation in organs, thus contributing to multiple organ failure. The systemic inflammation also induces an increased and uncontrolled NETosis, participating in capillary occlusions. Endothelial function is consequently impaired, resulting in endothelial dysfunction, leucocyte and platelet adhesion, excessive coagulation activation, and fibrinolysis inhibition. Uncontrolled thrombin formation (FIIa, activated thrombin) leads to disseminated microthrombi, capillary occlusions, and subsequent impaired organ perfusion. Ultimately, this deregulated immunothrombosis can lead to disseminated intravascular coagulation. CCR2 indicates C-C receptor type 2; CXCR, chemokine receptor; CXCL, chemokine ligand; F, factor; Fa, activated factor; H₂O₂, hydrogen peroxide; MPO, myeloperoxidase; NE, neutrophil elastase; O₂, oxygen; NETosis, release of neutrophil extracellular traps; PMNs, polymorphonuclear neutrophil; PRR, pattern recognition receptor; TFP1, tissue factor pathway inhibitor; TM, thrombomodulin.

their destruction through the activation of coagulation and the recruitment of immune cells (11). Neutrophils are key players of the immunothrombosis phenomenon, notably by the release of NETs. We will first outline the physiology of the phenomenon of immunothrombosis (Fig. 3A), which will lead us to its deregulation during severe septic episodes, responsible for both an inadequate immune response and an exaggerated activation of coagulation (Fig. 3B).

Neutrophils, key players of immunothrombosis

In addition to their previously described functions, activated PMNs are capable of releasing NETs that capture and degrade pathogens and circulating blood cells (6, 110).

Two mechanisms of NETosis are described. The first results in cell suicide and lasts a few hours, hence the first description of NETosis as a mechanism of cell death (110, 111). The second mechanism, called “vital NETosis” (112), allows the PMNs to

survive in an anucleated form capable of phagocytosis, a function that is independent of protein synthesis, thus not requiring a nucleus. Mitochondrial DNA can also participate in the release of NETs. "Suicidal NETosis" is dependent on the production of free radicals by NADPH oxidase 2 (110). MPO is involved in the NETosis phenomenon by the generation of halogenated ions and hypochlorite (113). In addition, MPO and NE potentiate chromatin decondensation and relaxation by combining with chromatin through a nonenzymatic mechanism. The most important enzymatic mechanism involved in chromatin decondensation is the citrullination of histones by peptidylarginine deiminase 4 (PAD4) with arginine as substrate (114). The "vital NETosis pathway" also appears to play a role in Gram-positive bacterial infections. This mechanism involves the TLR-2 signaling pathway, with lipoteichoic acid as ligand, as well as complement-induced opsonization phenomena (112). The NETs are subsequently released through vesicles.

Both NETosis mechanisms are accompanied by morphological changes described in electron microscopy after *in vitro* induction of NETosis by phorbol myristate acetate (PMA) (115): the chromatin first decondenses, the nucleus loses its lobules, the cytoplasm degranulates, and the NETs are released. This induction of *in vitro* NETosis can be likened to "suicidal NETosis." The mechanisms involved in this process differ from the mechanisms of necrosis and apoptosis and are independent of caspases.

NETs form an extracellular trap that physically impedes the spread of microorganisms during infectious episodes. Their primary function is therefore antimicrobial (predominantly antibacterial) and antifungal. This mechanism is part of innate immunity. NETs thus mechanically oppose bacterial and fungal dissemination during septic episodes (116). *In vivo*, the capture of bacteria, especially *Klebsiella pneumoniae*, has been visualized in the lungs of septic mice (117). NETs also feature an antimicrobial action due to proteases and histone toxicity (118).

Histones are positively charged, allowing them to bind to pathogens that have an anionic membrane, leading either to the opening of membrane channels for various cytotoxic mediators or to microbial lysis. In a recent study, Abrams et al. showed the association between circulating histones after severe trauma and the occurrence of acute respiratory distress syndrome (119). This work enabled to confirm histone cytotoxicity *in vitro* as well as to demonstrate their toxicity *in vivo* in an animal model of lesional pulmonary edema. The administration of an antihistone antibody to the mice prevented the lesions (119). Histones are accordingly involved in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome (ARDS) and sepsis (120, 121).

Through NETosis, neutrophils also appear to be involved in thrombotic episodes and may participate in inflammation-thrombosis cross-talk (9, 10, 122). Thus, a second function of NETs lies in the activation of coagulation, since they naturally form an anionic surface (mainly in the form of DNA filaments) activating the contact phase of coagulation-factor XII (7). The activation of this contact system contributes to the activation of coagulation inherently associated with sepsis (123). NETs are hence responsible for the formation of nonocclusive microthrombi, which participate in host

defense during infectious episodes by containing the microorganism locally (11).

The presence of activated platelets is essential for the formation of NETs (124). The neutrophil-platelet interaction is notably mediated by the interaction between P-selectin present on the surface of PMNs and platelet P-selectin (125). This mutual activation between PMNs and platelets is responsible for the activation of the extrinsic pathway of coagulation, resulting in the generation of fibrin (126). Although they do not constitutively express tissue factor, PMNs could thus acquire the ability to express the tissue factor on their surface and to release MPs expressing tissue factor (127, 128). The expression of tissue factor within the NET networks would thus favor platelet adhesion and amplification of the coagulation cascade.

In addition, NET components display procoagulant properties. Indeed, DNA amplifies serine protease activity, neutrophil elastase cleaves and inactivates the tissue factor inhibitor, while histones are potent *in vitro* thrombosis mediators and inactivate activated protein C (129).

Neutrophils therefore deploy extracellular defense strategies to protect the host from damages caused by infection. By the emission of NETs, neutrophils have a direct antimicrobial activity and activate intrinsic and extrinsic microvascular intravascular coagulation. In this manner, PMNs propagate a distinct mechanism of intravascular immunity called immunothrombosis (130).

Activation of neutrophils during septic shock is responsible for deregulation of immunothrombosis

During septic shock, neutrophils participate in the local activation of coagulation, which facilitates the recognition, containment, and destruction of circulating pathogens (11). NETs released after pathogen recognition allow the physical entrapment of microorganisms within fibrin and DNA networks (6). Thereafter, immunothrombosis results in the formation of nonocclusive thrombi in the microvessels, particularly in the sinusoidal capillaries of the liver, forming a physical barrier against bacterial invasion into tissue (126). Microthrombi also foster the local accumulation of antimicrobial, physical, and chemical strategies. Thus, fibrin enables the recruitment of other immune cells that, in turn, will enhance the immune response (131).

While immunothrombosis and NETs are beneficial to host defense though these various mechanisms, they can also be deleterious and participate in tissue lesions; this is the case of septic shock-induced DIC, where the regulatory mechanisms of immunothrombosis are exceeded (132, 133). DIC has been identified as an independent factor of mortality and of multiple organ failure during septic shock (134). The clinician must therefore both recognize and counter this state of exaggerated hypercoagulability, while not impeding the normal immunothrombosis which is a defense mechanism (135). The monitoring of coagulation is an important element for recognizing the most severe patients and could guide the use of future therapeutic approaches (136).

During septic shock, the increase in circulating free DNA concentrations released by PMNs is an independent mortality

factor (137). This mortality appears to be secondary to an uncontrolled activation of coagulation in the microvessels, responsible for both microcirculatory followed by macrocirculatory failure. Nucleosomes and extracellular histones released within NETs are recognized by the host as DAMPs and thereby increase the release of cytokines, as well as the recruitment of innate immune cells and the formation of microthrombi at the site of infection (138). Histones and circulating free DNA also self-activate coagulation independently of the normal coagulation cascade (139). This effect is amplified by the action of serine proteases, in particular neutrophil elastase, which also promote fibrinogenesis by the cleavage of regulating anticoagulant proteins, including the tissue factor pathway inhibitor (TFPI) (126). Finally, while free circulating DNA does activate fibrinogenesis, it also conversely inhibits plasmin-mediated fibrinolysis (132). As a result, the free circulating DNA activates inhibitor of plasminogen activator 1 (PAI-1) and becomes a competitive inhibitor of plasmin when its concentration increases (140).

In this manner, histones and extracellular nucleosomes appear to play a major role in the pathophysiology of organ failure during septic shock and may represent a potential therapeutic target (antihistone antibodies, activated protein C) (138). Accordingly, in a mouse model of endotoxemic shock, the presence of NETs in the circulation, quantified by free circulating DNA, was associated with the demonstration of NETs *in vivo* in liver sinusoids and in pulmonary capillaries, venules, and arterioles (141). At the local level, NETs come into contact with endothelial cells and platelets and cause cellular damage (142). These cell contacts, at the source of leukocyte and platelet aggregates, putatively contribute to the occlusion of microvessels and thus to microcirculatory failure observed in septic mice (141).

Moreover, in a murine model of CLP-induced septic shock, the release of circulating free DNA by NETs was shown to increase the release of thrombin-antithrombin complexes and of pro-inflammatory cytokines, especially Il-6 (143). Inhibition of NETosis by deoxyribonuclease 1 (DNase 1) administration improved the outcome of the animals by reducing bacterial load and organ dysfunctions (143, 144). Altogether, these elements suggest that septic shock is accompanied by a deregulation of immunothrombosis phenomena mediated by the neutrophils, which interact with other cells in the vascular compartment, in particular platelets, and promote the evolution toward a diffuse microvascular coagulation state, the latter of which participates in hypoperfusion and organ dysfunctions (144).

In humans, the major role of NETs in the hypercoagulability of septic shock has been demonstrated (145). By the way of occlusion of capillary networks, the extensive microthrombosis of small vessels participates in a decrease in tissue oxygen extraction and contributes to the multiple organ failure during septic shock. Preventive anticoagulation may have a beneficial role in the prevention of thrombotic events during septic shock (145). Indeed, the hyper-inflammatory state observed in the early phase of septic shock could be at the origin of an inappropriate innate immune response leading to a procoagulant state, the latter being responsible for an increased incidence of deep vein thrombosis during severe sepsis and of DIC (130,

145). Neutrophils are thus able to promote a procoagulant state by releasing NETs. The destabilization of NETs aimed at controlling the activation of intravascular coagulation could thus represent a therapeutic option in the adjuvant treatment of septic shock-induced DIC (144). Nevertheless, the molecules proposed in animal models (DNase 1) remain unsuitable in humans due to the lack of specificity. Recent studies have furthermore shown a benefit in terms of survival by preventive anticoagulation of septic patients with heparinized derivatives (135, 146).

Microparticles may stand as major actor of immunothrombosis. Septic shock is indeed associated with a massive release of leukocyte-derived MPs, particularly neutrophil-derived MPs, as well as endothelial- and monocyte-derived MPs (63, 147). Accordingly, DIC is associated with an exaggerated generation of both leukocyte- and neutrophil-derived MPs (62, 148). The role of MPs in the pathophysiology of DIC in septic shock thus emphasizes the importance of interaction between the cells in the vascular compartment.

We have recently highlighted the presence of NETs identified by the MPO-DNA complexes and nucleosomes during septic shock-induced DIC in humans (149). Furthermore, DIC is associated with an increase in neutrophil fluorescence in flow cytometry (62). Given that the fluorescence reflects the degree of nucleic acid condensation, it may be indicative of the phenomenon of NETosis and the increase in transcriptional activity. NETs would hence be involved in overcoming the regulatory mechanisms of coagulation during septic shock-induced DIC (149).

Moreover, in a mouse model of endotoxemic shock using various pathogens, NETs were found to be essential for the appearance of DIC. Inhibition of NETosis (PAD4 KO mice, DNase administration) improved microcirculation and reduced thrombin production and platelet activation (144). This neutrophil-platelet cooperation could thus be a major factor in the regulation of immunothrombosis and represent a therapeutic strategy for the treatment of septic shock-induced DIC (150). In a murine model of CLP-induced septic shock, the importance of neutrophils in platelet recruitment in the sinusoidal capillary networks of the liver has also been demonstrated. Such platelet aggregation in the capillaries would explain the lack of hepatic perfusion and contribute to multiple organ failure (151).

Overcoming the regulatory mechanisms of immunity and coagulation during septic shock and DIC induced-septic shock ultimately appears to be the result of the accumulation of numerous vascular cell dysfunctions. The role of NETs and MPs in septic shock-induced DIC further emphasizes the role of the host rather than the pathogen in the evolution toward DIC (144, 147, 149). More than the failure of a particular cell type, it is the interaction between the various actors of immunity and hemostasis, in particular the neutrophils, which appears to redirect the phenomenon of immunothrombosis against the host itself. The presence of all of the cellular and molecular elements necessary for the formation of the immunothrombus and their respective spatial macromolecular organization is *a sine qua none* condition for the evolution toward a state of hypercoagulability during septic shock and thus allows focusing on a number of therapeutic targets. Neutrophils are the first

cells to be recruited in septic and thrombotic episodes (1, 152). By the precocity of their action and their central role in defending the host both in terms of immunity and of thrombosis, PMNs seemingly represent a cellular target of choice for the development of future therapeutic options.

Altogether future directions in both experimental and clinical research might be to elucidate whether neutrophil intracellular signaling pathways are indeed specifically and excessively activated during septic shock-induced DIC, and which specific pathways are involved in this deregulation. A genome-wide gene expression analysis of circulating neutrophils during septic shock and septic shock-induced DIC could help to answer this question. To date, most of the studies including septic shock patients have focused on all the transcribed mRNAs. Nevertheless, a transcriptomic analysis of the PMNs from six healthy subjects compared with six old and six young septic shock patients to better understand how age might modulated immune response to severe infection, suggested that there was a common genomic signature for the production of inflammatory cytokines and other conventional cell activation markers, although some major molecular pathways may be particularly affected in the elderly during sepsis (153).

CONCLUSION

Cellular activation during septic shock involves neutrophils, as part of an inadequate host response to pathogen aggression. These cells partially lose their direct antimicrobial functions, beginning as early as during their medullary production up to pathogen elimination, and acquire an immunosuppressive action compared with other immune cells, particularly the lymphocytes. Neutrophils also participate in the generation of an intense coagulation activation state that can ultimately evolve into DIC. Neutrophils thus display a functional ambiguity during septic episodes: while their role in host defense is unavoidable and essential for survival, their activation can also become deleterious to the host. The release of NETs promotes the containment and destruction of the pathogen by the association of immune and thrombotic phenomena. This activation can escape regulatory systems with an uncontrolled activation of immune mechanisms and hemostasis that trigger each other. PMNs are thus at the heart of the concept of immunothrombosis and appear to be indubitable players in the pathophysiology of DIC as a manifestation of the vascular dysfunction of septic shock. A better understanding of the mechanisms of neutrophil dysfunction and their interactions with other vascular cells during DIC and septic shock could thus open new therapeutic options.

REFERENCES

- Nathan C: Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 6(3):173–182, 2006.
- Borregaard N: Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity* 33(5):657–670, 2010.
- Brown KA, Brain SD, Pearson JD, Edgeworth JD, Lewis SM, Treacher DF: Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet* 368(9530):157–169, 2006.
- Nordenfelt P, Tapper H: Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J Leukoc Biol* 90(2):271–284, 2011.

- Mócsai A: Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J Exp Med* 210(7):1283–1299, 2013.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A: Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303(5663):1532–1535, 2004.
- Iba T, Miki T, Hashiguchi N, Tabe Y, Nagaoka I: Is the neutrophil a “prima donna” in the procoagulant process during sepsis? *Crit Care* 18(4):230, 2014.
- Fang H, Jiang W, Cheng J, Lu Y, Liu A, Kan L, Dahmen U: Balancing innate immunity and inflammatory state via modulation of neutrophil function: a novel strategy to fight sepsis. *J Immunol Res* 2015:1870048, 2015.
- Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, Wroblewski SK, Wakefield TW, Hartwig JH, Wagner DD: Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci* 107(36):15880–15885, 2010.
- Martinod K, Wagner DD: Thrombosis: tangled up in NETs. *Blood* 123(18):2768–2776, 2014.
- Engelmann B, Massberg S: Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 13(1):34–45, 2013.
- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche J-D, Cooper-Smith CM, et al.: The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315(8):801–810, 2016.
- Fourrier F: Severe sepsis, coagulation, and fibrinolysis: dead end or one way? *Crit Care Med* 40(9):2704–2708, 2012.
- Levi M: The coagulant response in sepsis and inflammation. *Hämostaseologie* 30(1):10–12, 2010.
- Zarbock A, Ley K: Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium. *Am J Pathol* 172(1):1–7, 2008.
- Grob PM, David E, Warren TC, DeLeon RP, Farina PR, Homon CA: Characterization of a receptor for human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor/interleukin-8. *J Biol Chem* 265(14):8311–8316, 1990.
- Luster AD: Chemokines—chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 338(7):436–445, 1998.
- Eash KJ, Greenbaum AM, Gopalan PK, Link DC: CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J Clin Invest* 120(7):2423–2431, 2010.
- Janeway CA Jr: Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54(pt 1):1–13, 1989.
- Tang D, Kang R, Coyne CB, Zeh HJ, Lotze MT: PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev* 249(1):158–175, 2012.
- Kumar H, Bot A: Innate immune recognition mechanisms and translational opportunities. *Int Rev Immunol* 32(2):113–115, 2013.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S: Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21:335–376, 2003.
- Kumar S, Ingle H, Prasad DVR, Kumar H: Recognition of bacterial infection by innate immune sensors. *Crit Rev Microbiol* 39(3):229–246, 2013.
- Gautier G, Humbert M, Deauvieu F, Scuiller M, Hiscott J, Bates EEM, Trinchieri G, Caux C, Garrone P: A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. *J Exp Med* 201(9):1435–1446, 2005.
- Suet Ting Tan R, Lin B, Liu Q, Tucker-Kellogg L, Ho B, Leung BPL, Ling Ding J: The synergy in cytokine production through MyD88-TRIF pathways is co-ordinated with ERK phosphorylation in macrophages. *Immunol Cell Biol* 91(5):377–387, 2013.
- Zigmond SH: Mechanisms of sensing chemical gradients by polymorphonuclear leukocytes. *Nature* 249(456):450–452, 1974.
- Bone RC: Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med* 24(7):1125–1128, 1996.
- Muller WA: Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol* 24(6):327–334, 2003.
- Nauseef WM: How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol Rev* 219:88–102, 2007.
- Babior BM: NADPH oxidase: an update. *Blood* 93(5):1464–1476, 1999.
- Bedard K, Krause KH: The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87(1):245–313, 2007.
- Segal AW: How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* 23:197–223, 2005.
- Borregaard N, Cowland JB: Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 89(10):3503–3521, 1997.
- Cech P, Lehrner RI: Phagolysosomal pH of human neutrophils. *Blood* 63(1):88–95, 1984.
- Navarini AA, Lang KS, Verschoor A, Recher M, Zinkernagel AS, Nizet V, Odermatt B, Hengartner H, Zinkernagel RM: Innate immune-induced depletion of bone marrow neutrophils aggravates systemic bacterial infections. *Proc Natl Acad Sci* 106(17):7107–7112, 2009.

36. Pillay J, Ramakers BP, Kamp VM, Loi ALT, Lam SW, Hietbrink F, Leenen LP, Tool AT, Pickkers P, Koenderman L: Functional heterogeneity and differential priming of circulating neutrophils in human experimental endotoxemia. *J Leukoc Biol* 88(1):211–220, 2010.
37. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ: 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(6):1644–1655, 1992.
38. Taneja R, Sharma AP, Hallett MB, Findlay GP, Morris MR: Immature circulating neutrophils in sepsis have impaired phagocytosis and calcium signaling. *Shock* 30(6):618–622, 2008.
39. Danikas DD, Karakantza M, Theodorou GL, Sakellaropoulos GC, Gogos CA: Prognostic value of phagocytic activity of neutrophils and monocytes in sepsis. Correlation to CD64 and CD14 antigen expression. *Clin Exp Immunol* 154(1):87–97, 2008.
40. Mare TA, Treacher DF, Shankar-Hari M, Beale R, Lewis SM, Chambers DJ, Brown KA: The diagnostic and prognostic significance of monitoring blood levels of immature neutrophils in patients with systemic inflammation. *Crit Care* 19:57, 2015.
41. Pöschl JMB, Ruef P, Linderkamp O: Deformability of passive and activated neutrophils in children with Gram-negative septicemia. *Scand J Clin Lab Invest* 65(4):333–339, 2005.
42. Hidalgo A, Chang J, Jang J-E, Peired AJ, Chiang EY, Frenette PS: Heterotypic interactions enabled by polarized neutrophil microdomains mediate thromboinflammatory injury. *Nat Med* 15(4):384–391, 2009.
43. Simon SI, Kim M-H: A day (or 5) in a neutrophil's life. *Blood* 116(4):511–512, 2010.
44. Uhl B, Vadlauer Y, Zuchtriegel G, Nekolla K, Sharaf K, Gaertner F, Massberg S, Krombach F, Reichel CA: Aged neutrophils contribute to the first line of defense in the acute inflammatory response. *Blood* 128:2327–2337, 2016.
45. Kolaczowska E: The older the faster: aged neutrophils in inflammation. *Blood* 128(19):2280–2282, 2016.
46. Liefeldt PHC, Wessels CM, Leenen LPH, Koenderman L, Pillay J: The role of neutrophils in immune dysfunction during severe inflammation. *Crit Care* 20:73, 2016.
47. Quintana FJ, Cohen IR: Heat shock proteins as endogenous adjuvants in sterile and septic inflammation. *J Immunol* 175(5):2777–2782, 2005.
48. Zhang Q, Raoof M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, Brohi K, Itagaki K, Hauser CJ: Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* 464(7285):104–107, 2010.
49. Reddy RC, Standiford TJ: Effects of sepsis on neutrophil chemotaxis. *Curr Opin Hematol* 17(1):18–24, 2010.
50. Alves-Filho JC, de Freitas A, Spiller F, Souto FO, Cunha FQ: The role of neutrophils in severe sepsis. *Shock* 30(suppl 1):3–9, 2008.
51. Cummings CJ, Martin TR, Frevert CW, Quan JM, Wong VA, Mongovin SM, Hagen TR, Steinberg KP, Goodman RB: Expression and function of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 in sepsis. *J Immunol* 162(4):2341–2346, 1999.
52. Chishti AD, Shenton BK, Kirby JA, Baudouin SV: Neutrophil chemotaxis and receptor expression in clinical septic shock. *Intensive Care Med* 30(4):605–611, 2004.
53. Wagner JG, Roth RA: Neutrophil migration during endotoxemia. *J Leukoc Biol* 66(1):10–24, 1999.
54. Cohen J: The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420(6917):885–891, 2002.
55. Sônego F, Castanheira FVES, Ferreira RG, Kanashiro A, Leite CAVG, Nascimento DC, Colón DF, Borges V, de F, Alves-Filho JC, et al.: Paradoxical roles of the neutrophil in sepsis: protective and deleterious. *Front Immunol* 7:155, 2016.
56. Souto FO, Alves-Filho JC, Turato WM, Auxiliadora-Martins M, Basile-Filho A, Cunha FQ: Essential role of CCR2 in neutrophil tissue infiltration and multiple organ dysfunction in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 183(2):234–242, 2011.
57. Mause SF, Weber C: Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ Res* 107(9):1047–1057, 2010.
58. Meziani F, Tesse A, Andriantsitohaina R: Microparticles are vectors of paradoxical information in vascular cells including the endothelium: role in health and diseases. *Pharmacol Rep PR* 60(1):75–84, 2008.
59. Boisramé-Helms J, Delabranche X, Degirmenci S-E, Zobairi F, Berger A, Meyer G, Burban M, Mostefai HA, Levy B, Toti F, et al.: Pharmacological modulation of procoagulant microparticles improves haemodynamic dysfunction during septic shock in rats. *Thromb Haemost* 111(1):154–164, 2014.
60. Delabranche X, Berger A, Boisramé-Helms J, Meziani F: Microparticles and infectious diseases. *Médecine Mal Infect* 42(8):335–343, 2012.
61. Mortaza S, Martinez MC, Baron-Menguy C, Burban M, de la Bourdonnaye M, Fizanne L, Pierrot M, Calès P, Henrion D, Andriantsitohaina R, et al.: Detrimental hemodynamic and inflammatory effects of microparticles originating from septic rats. *Crit Care Med* 37(6):2045–2050, 2009.
62. Stiel L, Delabranche X, Galois AC, Severac F, Toti F, Mauvieux L, Meziani F, Boisramé-Helms J: Neutrophil fluorescence: a new indicator of cell activation during septic shock-induced disseminated intravascular coagulation. *Crit Care Med* 44(11):e1132–e1136, 2016.
63. Walenta KLH, Link A, Friedrich EB, Böhm M: Circulating microparticles in septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 180(1):100, 2009.
64. Meziani F, Delabranche X, Asfar P, Toti F: Bench-to-bedside review: circulating microparticles—a new player in sepsis? *Crit Care* 14(5):236, 2010.
65. Nolan S, Dixon R, Norman K, Hellewell P, Ridger V: Nitric oxide regulates neutrophil migration through microparticle formation. *Am J Pathol* 172(1):265–273, 2008.
66. Dalli J, Norling LV, Renshaw D, Cooper D, Leung KY, Perretti M: Annexin 1 mediates the rapid anti-inflammatory effects of neutrophil-derived microparticles. *Blood* 112(6):2512–2519, 2008.
67. Arraes SMA, Freitas MS, da Silva SV, de Paula Neto HA, Alves-Filho JC, Auxiliadora Martins M, Basile-Filho A, Tavares-Murta BM, Barja-Fidalgo C, Cunha FQ: Impaired neutrophil chemotaxis in sepsis associates with GRK expression and inhibition of actin assembly and tyrosine phosphorylation. *Blood* 108:2906–2913, 2006.
68. Aird WC: The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood* 101(10):3765–3777, 2003.
69. Boisramé-Helms J, Kremer H, Schini-Kerth V, Meziani F: Endothelial dysfunction in sepsis. *Curr Vasc Pharmacol* 11(2):150–160, 2013.
70. Skoutelis AT, Kaleridis V, Athanassiou GM, Kokkinis KI, Missirlis YF, Bassaris HP: Neutrophil deformability in patients with sepsis, septic shock, and adult respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 28(7):2355–2359, 2000.
71. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S: Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 11(8):519–531, 2011.
72. Aziz M, Jacob A, Yang W-L, Matsuda A, Wang P: Current trends in inflammatory and immunomodulatory mediators in sepsis. *J Leukoc Biol* 93(3):329–342, 2013.
73. Hoessel LM, Neff TA, Neff SB, Younger JG, Olle EW, Gao H, Pianko MJ, Bernacki KD, Sarma JV, Ward PA: Harmful and protective roles of neutrophils in sepsis. *Shock* 24(1):40–47, 2005.
74. Taylor DE, Piantadosi CA: Oxidative metabolism in sepsis and sepsis syndrome. *J Crit Care* 10(3):122–135, 1995.
75. Fox ED, Heffernan DS, Cioffi WG, Reichner JS: Neutrophils from critically ill septic patients mediate profound loss of endothelial barrier integrity. *Crit Care* 17(5):R226, 2013.
76. Santos SS, Brunialti MKC, Rigato O, Machado FR, Silva E, Salomao R: Generation of nitric oxide and reactive oxygen species by neutrophils and monocytes from septic patients and association with outcomes. *Shock* 38(1):18–23, 2012.
77. Bjerknes R, Vindenes H, Pitkänen J, Ninnemann J, Laerum OD, Abyholm F: Altered polymorphonuclear neutrophilic granulocyte functions in patients with large burns. *J Trauma* 29(6):847–855, 1989.
78. Chiswick EL, Mella JR, Bernardo J, Remick DG: Acute-phase deaths from murine polymicrobial sepsis are characterized by innate immune suppression rather than exhaustion. *J Immunol* 195(8):3793–3802, 2015.
79. Martins PS, Kallas EG, Neto MC, Dalboni MA, Blecher S, Salomão R: Upregulation of reactive oxygen species generation and phagocytosis, and increased apoptosis in human neutrophils during severe sepsis and septic shock. *Shock* 20(3):208–212, 2003.
80. Morris AC, Brittan M, Wilkinson TS, McAuley DF, Antonelli J, McCulloch C, Barr LC, McDonald NA, Dhaliwal K, Jones RO, et al.: C5a-mediated neutrophil dysfunction is RhoA-dependent and predicts infection in critically ill patients. *Blood* 117(19):5178–5188, 2011.
81. Balázs M, Martin F, Zhou T, Kearney J: Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. *Immunology* 117(3):341–352, 2002.
82. Schwaller J, Schneider P, Mhawech-Fauceglia P, McKee T, Myit S, Matthes T, Tschopp J, Donze O, Le Gal FA, Huard B: Neutrophil-derived APRIL concentrated in tumor lesions by proteoglycans correlates with human B-cell lymphoma aggressiveness. *Blood* 109(1):331–338, 2007.
83. Puga I, Cols M, Barra CM, He B, Cassis L, Gentile M, Comerma L, Chorny A, Shan M, Xu W, et al.: B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and

- production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat Immunol* 13(2):170–180, 2011.
84. Chu T, Tyznik AJ, Roepke S, Berkley AM, Woodward-Davis A, Pattacini L, Bevan MJ, Zehn D, Prlc M: Bystander-activated memory CD8 T cells control early pathogen load in an innate-like, NKG2D-dependent manner. *Cell Rep* 3(3):701–708, 2013.
 85. Leliefeld PHC, Koenderman L, Pillay J: How neutrophils shape adaptive immune responses. *Front Immunol* 6:471, 2015.
 86. Burroughs NJ, Miguel Paz Mendes de Oliveira B, Adrego Pinto A: Regulatory T cell adjustment of quorum growth thresholds and the control of local immune responses. *J Theor Biol* 241(1):134–141, 2006.
 87. Bonneville M, O'Brien RL, Born WK: Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol* 10(7):467–478, 2010.
 88. Maletto BA, Ropolo AS, Alignani DO, Liscovsky MV, Ranocchia RP, Moron VG, Pistoresi-Palencia MC: Presence of neutrophil-bearing antigen in lymphoid organs of immune mice. *Blood* 108(9):3094–3102, 2006.
 89. Yang C-W, Strong BSI, Miller MJ, Unanue ER: Neutrophils influence the level of antigen presentation during the immune response to protein antigens in adjuvants. *J Immunol* 185(5):2927–2934, 2010.
 90. Beauvillain C, Delneste Y, Scotet M, Peres A, Gascan H, Guermonprez P, Barnaba V, Jeannin P: Neutrophils efficiently cross-prime naive T cells in vivo. *Blood* 110(8):2965–2973, 2007.
 91. Ashtekar AR, Saha B: Poly's plea: membership to the club of APCs. *Trends Immunol* 24(9):485–490, 2003.
 92. Hufford MM, Richardson G, Zhou H, Manicassamy B, García-Sastre A, Enelow RI, Braciale TJ: Influenza-infected neutrophils within the infected lungs act as antigen presenting cells for anti-viral CD8 (+) T cells. *PLoS One* 7(10):e46581, 2012.
 93. Bennouna S, Bliss SK, Curiel TJ, Denkers EY: Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. *J Immunol* 171(11):6052–6058, 2003.
 94. van Gisbergen KPJM, Sanchez-Hernandez M, Geijtenbeek TBH, van Kooyk Y: Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *J Exp Med* 201(10):1281–1292, 2005.
 95. Schuster S, Hurrell B, Tacchini-Cottier F: Crosstalk between neutrophils and dendritic cells: a context-dependent process. *J Leukoc Biol* 94(4):671–675, 2013.
 96. Megiovanni AM, Sanchez F, Robledo-Sarmiento M, Morel C, Gluckman JC, Boudaly S: Polymorphonuclear neutrophils deliver activation signals and antigenic molecules to dendritic cells: a new link between leukocytes upstream of T lymphocytes. *J Leukoc Biol* 79(5):977–988, 2006.
 97. Yang D, de la Rosa G, Tewary P, Oppenheim JJ: Alarmins link neutrophils and dendritic cells. *Trends Immunol* 30(11):531–537, 2009.
 98. Müller I, Munder M, Kropf P, Häslich GM: Polymorphonuclear neutrophils and T lymphocytes: strange bedfellows or brothers in arms? *Trends Immunol* 30(1):522–530, 2009.
 99. Ferguson NR, Galley HF, Webster NR: T helper cell subset ratios in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med* 25(1):106–109, 1999.
 100. Darcy CJ, Minigo G, Piera KA, Davis JS, McNeil YR, Chen Y, Volkheimer AD, Weinberg JB, Anstey NM, Woodberry T: Neutrophils with myeloid derived suppressor function deplete arginine and constrain T cell function in septic shock patients. *Crit Care* 18(4):R163, 2014.
 101. Rodriguez PC, Quiceno DG, Ochoa AC: L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood* 109(4):1568–1573, 2007.
 102. Zhang Y, Li J, Lou J, Zhou Y, Bo L, Zhu J, Zhu K, Wan X, Cai Z, Deng X: Upregulation of programmed death-1 on T cells and programmed death ligand-1 on monocytes in septic shock patients. *Crit Care* 15(1):R70, 2011.
 103. Markwart R, Condotta SA, Requardt RP, Borken F, Schubert K, Weigel C, Bauer M, Griffith TS, Förster M, Brunkhorst FM, et al.: Immunosuppression after sepsis: systemic inflammation and sepsis induce a loss of naive T-cells but no enduring cell-autonomous defects in T-cell function. *PLoS One* 9(12):e115094, 2014.
 104. Hotchkiss RS, Nicholson DW: Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol* 6(11):813–822, 2006.
 105. Le Tulzo Y, Pangault C, Gacouin A, Guilloux V, Tribut O, Amiot L, Tattévin P, Thomas R, Fauchet R, Drénou B: Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. *Shock* 18(6):487–494, 2002.
 106. Gogos CA, Drosou E, Bassaris HP, Skoutelis A: Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J Infect Dis* 181(1):176–180, 2000.
 107. Geering B, Simon HU: Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils. *Cell Death Differ* 18(9):1457–1469, 2011.
 108. Dibbert B, Weber M, Nikolaizik WH, Vogt P, Schöni MH, Blaser K, Simon HU: Cytokine-mediated Bax deficiency and consequent delayed neutrophil apoptosis: a general mechanism to accumulate effector cells in inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(23):13330–13335, 1999.
 109. Mihalache CC, Yousefi S, Conus S, Villiger PM, Schneider EM, Simon HU: Inflammation-associated autophagy-related programmed necrotic death of human neutrophils characterized by organelle fusion events. *J Immunol* 186(11):6532–6542, 2011.
 110. Brinkmann V, Zychlinsky A: Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol* 198(5):773–783, 2012.
 111. Phillipson M, Kubers P: The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med* 17(11):1381–1390, 2011.
 112. Pilszczek FH, Salina D, Poon KKH, Fahey C, Yipp BG, Sibley CD, Robbins SM, Green FHY, Surette MG, Sugai M, et al.: A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol* 185(12):7413–7425, 2010.
 113. Metzler KD, Goosmann C, Lubojemska A, Zychlinsky A, Papayannopoulos V: A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis. *Cell Rep* 8(3):883–896, 2014.
 114. Leshner M, Wang S, Lewis C, Zheng H, Chen XA, Santy L, Wang Y: PAD4 mediated histone hypercitrullination induces heterochromatin decondensation and chromatin unfolding to form neutrophil extracellular trap-like structures. *Front Immunol* 3:307, 2012.
 115. Bergmann S, Hammerschmidt S: Fibrinolysis and host response in bacterial infections. *Thromb Haemost* 98(3):512–520, 2007.
 116. Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A: Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol* 8(4):668–676, 2006.
 117. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A: Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 191(3):677–691, 2010.
 118. Hirsch JG: Bactericidal action of histone. *J Exp Med* 108(6):925–944, 1958.
 119. Abrams ST, Zhang N, Manson J, Liu T, Dart C, Baluwa F, Wang SS, Brohi K, Kipar A, Yu W, et al.: Circulating histones are mediators of trauma-associated lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 187(2):160–169, 2013.
 120. Semeraro F, Ammollo CT, Morrissey JH, Dale GL, Friese P, Esmon NL, Esmon CT: Extracellular histones promote thrombin generation through platelet-dependent mechanisms: involvement of platelet TLR2 and TLR4. *Blood* 118(7):1952–1961, 2011.
 121. Xu Z, Huang Y, Mao P, Zhang J, Li Y: Sepsis and ARDS: the dark side of histones. *Mediators Inflamm* 2015:205054, 2015.
 122. Diaz JA, Fuchs TA, Jackson TO, Kremer Hovinga JA, Lämmle B, Henke PK, Myers DD, Wagner DD, Wakefield TW and for the Michigan Research Venous Group: Plasma DNA is elevated in patients with deep vein thrombosis. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord* 1(4):341–348.e1, 2013.
 123. Frick I-M, Björck L, Herwald H: The dual role of the contact system in bacterial infectious disease. *Thromb Haemost* 98(3):497–502, 2007.
 124. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, Patel KD, Chakrabarti S, McAvoy E, Sinclair GD, et al.: Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* 13(4):463–469, 2007.
 125. Sreeramkumar V, Adrover JM, Ballesteros I, Cuartero MI, Rossaint J, Bilbao I, Nacher M, Pitaval C, Radovanovic I, Fukui Y, et al.: Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. *Science* 346(6214):1234–1238, 2014.
 126. Massberg S, Gahl L, von Bruehl ML, Manukyan D, Pfeiler S, Goosmann C, Brinkmann V, Lorenz M, Bidzhekov K, Khandagale AB, et al.: Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med* 16(8):887–896, 2010.
 127. Maugeri N, Cerletti C, Donati MB, de Gaetano G, Vermeylen J: Neutrophils and sepsis. *Lancet* 368(9542):1153, 2006.
 128. Maugeri N, Brambilla M, Camera M, Carbone A, Tremoli E, Donati MB, de Gaetano G, Cerletti C: Human polymorphonuclear leukocytes produce and express functional tissue factor upon stimulation. *J Thromb Haemost* 4(6):1323–1330, 2006.
 129. Ammollo CT, Semeraro F, Xu J, Esmon NL, Esmon CT: Extracellular histones increase plasma thrombin generation by impairing thrombomodulin-dependent protein C activation. *J Thromb Haemost* 9(9):1795–1803, 2011.
 130. Pfeiler S, Stark K, Massberg S, Engelmann B: Propagation of thrombosis by neutrophils and extracellular nucleosome networks. *Haematologica* 102(2):206–213, 2017.
 131. Luo D, Szaba FM, Kummer LW, Plow EF, Mackman N, Gailani D, Smiley ST: Protective roles for fibrin, tissue factor, plasminogen activator inhibitor-1, and thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, but not factor XI, during defense

- against the gram-negative bacterium *Yersinia enterocolitica*. *J Immunol* 187(4):1866–1876, 2011.
132. Gould TJ, Lysov Z, Liaw PC: Extracellular DNA and histones: double-edged swords in immunothrombosis. *J Thromb Haemost* 13(suppl 1):S82–91, 2015.
 133. Pfeiler S, Massberg S, Engelmann B: Biological basis and pathological relevance of microvascular thrombosis. *Thromb Res* 133(suppl 1):S35–37, 2014.
 134. Gando S, Levi M, Toh C-H: Disseminated intravascular coagulation. *Nat Rev Dis Primer* 2:16037, 2016.
 135. Mezzani F, Gando S, Vincent JL: Should all patients with sepsis receive anticoagulation? Yes. *Intensive Care Med* 43(3):452–454, 2017.
 136. Levi M, Schultz MJ: What do sepsis-induced coagulation test result abnormalities mean to intensivists? *Intensive Care Med* 43(4):581–583, 2017.
 137. Rhodes A, Wort SJ, Thomas H, Collinson P, Bennett ED: Plasma DNA concentration as a predictor of mortality and sepsis in critically ill patients. *Crit Care* 10(2):R60, 2006.
 138. Xu J, Zhang X, Pelayo R, Monestier M, Ammollo CT, Semeraro F, Taylor FB, Esmon NL, Lupu F, Esmon CT: Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med* 15(11):1318–1321, 2009.
 139. Barranco-Medina S, Pozzi N, Vogt AD, Di Cera E: Histone H4 promotes prothrombin autoactivation. *J Biol Chem* 288(50):35749–35757, 2013.
 140. Komissarov AA, Florova G, Idell S: Effects of extracellular DNA on plasminogen activation and fibrinolysis. *J Biol Chem* 286(49):41949–41962, 2011.
 141. Tanaka K, Koike Y, Shimura T, Okigami M, Ide S, Toiyama Y, Okugawa Y, Inoue Y, Araki T, Uchida K, et al.: In vivo characterization of neutrophil extracellular traps in various organs of a murine sepsis model. *PLoS One* 9(11):e111888, 2014.
 142. Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA, Lochnit G, Barreto G, Galuska SP, Lohmeyer J, Preissner KT: Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS One* 7(2):e32366, 2012.
 143. Mai SHC, Khan M, Dwivedi DJ, Ross CA, Zhou J, Gould TJ, Gross PL, Weitz JI, Fox-Robichaud AE, Liaw PC, Canadian Critical Care Translational Biology Group: Delayed but not early treatment with dnase reduces organ damage and improves outcome in a murine model of sepsis. *Shock* 44(2):166–172, 2015.
 144. McDonald B, Davis RP, Kim SJ, Tse M, Esmon CT, Kolaczowska E, Jenne CN: Platelets and neutrophil extracellular traps collaborate to promote intravascular coagulation during sepsis in mice. *Blood* 129(10):1357–1367, 2017.
 145. Yang S, Qi H, Kan K, Quan C, Xie H, Guo X, Zhang L: Neutrophil extracellular traps promote hypercoagulability in patients with sepsis. *Shock* 47(2):132–139, 2017.
 146. Wildhagen KC, García de Frutos P, Reutelingsperger CP, Schrijver R, Aresté C, Ortega-Gómez A, Deckers NM, Hemker HC, Soehnlein O, Nicolaes GA: Nonanticoagulant heparin prevents histone-mediated cytotoxicity in vitro and improves survival in sepsis. *Blood* 123(7):1098–1101, 2014.
 147. Delabranche X, Boisramé-Helms J, Asfar P, Berger A, Mootien Y, Lavigne T, Grunebaum L, Lanza F, Gachet C, Freyssinet J-M, et al.: Microparticles are new biomarkers of septic shock-induced disseminated intravascular coagulopathy. *Intensive Care Med* 39(10):1695–1703, 2013.
 148. Delabranche X, Quenot JP, Lavigne T, Mercier E, François B, Severac F, Grunebaum L, Mehdi M, Zobairi F, Toti F, et al., on behalf to the Clinical Research in Intensive Care and Sepsis Network: Early detection of disseminated intravascular coagulation during septic shock: a multicentre prospective study. *Crit Care Med* 4(10):e930–e939, 2016.
 149. Delabranche X, Stiel L, Severac F, Galois AC, Mauvieux L, Zobairi F, Lavigne T, Toti F, Anglès-Cano E, Mezzani F, et al.: Evidence of NETosis in septic shock-induced disseminated intravascular coagulation. *Shock* 47(3):313–317, 2017.
 150. Wang X, Qin W, Sun B: New strategy for sepsis: targeting a key role of platelet-neutrophil interaction. *Burns Trauma* 2(3):114–120, 2014.
 151. Singer G, Urakami H, Specian RD, Stokes KY, Granger DN: Platelet recruitment in the murine hepatic microvasculature during experimental sepsis: role of neutrophils. *Microcirc* 13(2):89–97, 2006.
 152. von Brühl M-L, Stark K, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, Khandoga A, Tirniceriu A, Coletti R, Köllnberger M, et al.: Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med* 209(4):819–835, 2012.
 153. da Silva Pellegrina DV, Severino P, Barbeiro HV, Andreghetto FM, Velasco IT, de Souza HP, Machado MCC, Reis EM, da Silva FP: Septic shock in advanced age: transcriptome analysis reveals altered molecular signatures in neutrophil granulocytes. *PLoS One* 10(6):e0128341, 2015.



Chapitre 2

Neutrophil Fluorescence: A New Indicator of Cell Activation During Septic Shock–Induced Disseminated Intravascular Coagulation

Laure Stiel, Xavier Delabranche, Anne-Cécile Galois, François Severac,
Florence Toti, Laurent Mauvieux, Ferhat Meziani, Julie Boisramé-Helms

Crit Care Med. 2016 Nov;44(11):e1132-e1136.

DOI: 10.1097/CCM.0000000000001851

Notre équipe, en collaboration avec Professeur Florence Toti et Fatiha Zobaïri, a été à l'origine de plusieurs travaux sur le rôle des microparticules au cours de la CIVD du choc septique. Ces travaux ont mis en évidence les MPs leucocytaires comme marqueurs de l'activation leucocytaire au cours de la CIVD du choc septique, soulignant le rôle de la réponse immune dans la pathogenèse de la CIVD. Ceci a été le point de départ de ce premier travail visant à appréhender l'activation des leucocytes majoritaires, les polynucléaires neutrophiles, au cours du choc septique et de la CIVD. Récemment, la réponse immunitaire à l'infection et l'activation de la coagulation ont été réunies sous le terme d' « immunothrombose ». Par l'émission de MPs et de NETs, les neutrophiles apparaissent comme de potentiels acteurs de l'immunothrombose.

Nous avons réalisé une étude clinique prospective monocentrique ayant inclus cent patients consécutifs admis en réanimation pour choc septique. Des prélèvements sanguins ont été effectués à l'admission. L'activation des neutrophiles a été mesurée à l'aide de deux méthodes : d'une part nous avons quantifié les MPs libérées par les neutrophiles qui expriment le CD66b par test prothrombinase ; ensuite nous avons mesuré la fluorescence latérale à la lumière des PNN (NEUT-SFL) après marquage automatisé par un fluorochrome se liant aux acides nucléiques à l'aide du fluorocytomètre Sysmex[®] XN20 (Sysmex[®] Corporation, Kobe, Japon) utilisé pour la détermination des numérations formule sanguine en routine à l'hôpital.

Selon le score JAAM 2006, le diagnostic de CIVD a été posé chez trente-cinq patients. Le diagnostic de CIVD était associé à une augmentation significative des MPs libérées par les neutrophiles (CD66b) ($p < 0,01$), ce qui traduit une activation des PNNs au cours de la CIVD du choc septique ($p < 0,05$). Une fluorescence des neutrophiles supérieure à 57,3 UA était prédictive de CIVD avec une sensibilité de 91% et une spécificité de 80,60%.

En conclusion, ce travail identifie NEUT-SFL, un paramètre accessible en routine lors de la réalisation d'une numération – formule sanguine, comme un potentiel biomarqueur de l'activation des PNNs au cours de la CIVD. Même s'il s'agit d'une première étude préliminaire, ce paramètre pourrait représenter un marqueur diagnostique intéressant de CIVD.

La publication de ce premier travail dans *Critical Care Medicine* s'est accompagnée du dépôt d'un brevet (BNT220608PC00).

Ce travail a également fait l'objet d'une communication orale courte au congrès de la Société de Réanimation de Langue Française en 2016 ainsi que d'une présentation au congrès de la Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg en avril 2018. Ce travail a également été présenté sous forme de poster au congrès de l'International Society of Thrombosis and Hemostasis à Dublin en juillet 2018.



Neutrophil Fluorescence: A New Indicator of Cell Activation During Septic Shock–Induced Disseminated Intravascular Coagulation

Laure Stiel, MD^{1,2}; Xavier Delabranche, MD, PhD^{1,2}; Anne-Cécile Galois, MD³;
François Severac, MD^{4,5}; Florence Toti, PhD⁶; Laurent Mauvieux, MD, PhD^{3,7};
Ferhat Meziani, MD, PhD^{1,2}; Julie Boisramé-Helms, MD, PhD^{1,2}

Objective: To investigate the contribution of neutrophil activation as innate immune cells during septic shock–induced disseminated intravascular coagulation.

Design: Prospective study.

Setting: One University Hospital ICU.

¹Service de Réanimation Médicale, Nouvel Hôpital Civil, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France.

²EA 7293, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Faculté de médecine, Université de Strasbourg, Strasbourg, France.

³Laboratoire d'hématologie et hémostase, Hôpital de Hautepierre, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France.

⁴Laboratoire de Biostatistique et d'Informatique Médicale, Faculté de Médecine, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France.

⁵Groupe Méthode en Recherche Clinique, Service de Santé Publique, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France.

⁶UMR 7213 CNRS, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, Illkirch, France.

⁷EA 3430, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Faculté de médecine, Université de Strasbourg, Strasbourg, France.

Drs. Stiel and Delabranche contributed equally to this work. Drs. Stiel, Delabranche, Meziani, and Boisramé-Helms had full access to all the study data and take responsibility for their integrity and the accuracy of their analysis. Drs. Stiel, Delabranche, Mauvieux, Meziani, and Boisramé-Helms participated in the study design and obtained funding for the study. Drs. Stiel, Delabranche, Meziani, and Boisramé-Helms collected the data. Drs. Stiel, Delabranche, Galois, Toti, Mauvieux, and Meziani analyzed the data. Drs. Stiel, Delabranche, Galois, and Toti performed biological analyses. Drs. Stiel, Delabranche, Meziani, and Boisramé-Helms drafted the report, and the report was revised for important intellectual content by Drs. Stiel, Delabranche, Galois, Toti, Mauvieux, Meziani, and Boisramé-Helms. All authors read and approved the final article.

Supported, in part, by the Association pour le Développement et la Recherche en Réanimation (ADRER) (Strasbourg, France) and Association D'aide aux Insuffisants Respiratoires d'Alsace-Lorraine (ADIRAL) Association (Strasbourg, France).

The authors have disclosed that they do not have any potential conflicts of interest.

For information regarding this article, E-mail: ferhat.meziani@chru-strasbourg.fr

Copyright © 2016 by the Society of Critical Care Medicine and Wolters Kluwer Health, Inc. All Rights Reserved.

DOI: 10.1097/CCM.0000000000001851

Participants: Hundred patients with septic shock. Thirty-five patients had disseminated intravascular coagulation according to Japanese Association for Acute Medicine 2006 score.

Intervention: None.

Measurements and Main Results: Neutrophil chromatin decondensation was assessed by measuring neutrophil fluorescence (NEUT-side-fluorescence light) labeled by a fluorochrome-based polymethine reagent using a routine automated flow cytometer Sysmex XN20 (Sysmex, Kobe, Japan) and neutrophil-derived CD66b microparticles by prothrombinase assay. Measurements in disseminated intravascular coagulation and no disseminated intravascular coagulation patients showed that a mean value of NEUT-side-fluorescence light above 57.3 arbitrary units had a sensitivity of 90.91% and a specificity of 80.60% for disseminated intravascular coagulation diagnosis. NEUT-side-fluorescence light was correlated to the CD66b microparticles/neutrophil count, a surrogate of neutrophil activation associated with septic shock–induced disseminated intravascular coagulation.

Conclusion: NEUT-side-fluorescence light, routinely available, could prove an accurate biomarker of neutrophil activation. (*Crit Care Med* 2016; 44:e1132–e1136)

Key Words: disseminated intravascular coagulation; fluorescence; microparticles; neutrophils; septic shock

Septic shock is the most severe clinical form of the host response to infectious pathogens. It is characterized by a broad inflammatory response in close association with the activation of the blood coagulation cascade eventually leading to disseminated intravascular coagulation (DIC) (1). In ICUs, DIC remains difficult to assess at bedside. In spite of different scoring scales proposed by international academic societies (2, 3), no gold standard is yet available for DIC diagnosis.

We have recently reported that circulating leukocyte-derived microparticles (CD11a-MPs) are rapidly elevated in the time-course of DIC, and are reliable surrogates of leukocyte activation (4), in line with an eventual contribution of immune

cells to the development of DIC (5). Increasing reports on the interactions between the contact activation pathway of blood coagulation and the response of innate immune cells prompted by pathogens have led to the emerging concept of “immunothrombosis” (6). Among innate immune cells, neutrophils are now recognized as potent actors in immunothrombosis, mostly via the release of neutrophil extracellular traps (NETs). Despite the lack of integrated and concerted approaches through the use of scores, converging data indicate that the assessment of neutrophil morphologic changes could prove helpful in the diagnosis, prognosis, and monitoring of sepsis (7). Neutrophil fluorescence (NEUT-side-fluorescence light [SFL]) and granulation (NEUT-side-scattered light [SSC]) variables are routinely available in hospital laboratories (8), and the NEUT-SFL was recently associated to sepsis (9). We therefore designed the present study to assess neutrophil activation for the diagnosis of early septic shock–induced DIC.

PATIENTS AND METHODS

Patients

One hundred consecutive adult patients referred to our ICU for septic shock were prospectively enrolled. Patients with end-stage chronic diseases or neutropenia were excluded. The Strasbourg University Hospital Ethic Committee approved this study. Informed consent was obtained from the patient or relatives at admission time, and further confirmed by the patient.

Blood Collection and Laboratory Analysis

Sampling on ethylene-diamine-tetraacetic acid (7.2 mg/4 mL) and citrate (0.129 M) anticoagulants was performed at admission. Thin blood smears were stained with May-Grünwald-Giemsa. Poor platelet citrated plasma was obtained after a two-step centrifugation (15 min; 2,500g). Hemostasis was analyzed on STA-R Evolution (Stago, Asnières, France) with standard commercial reagents for prothrombin time, activated partial thromboplastin time, fibrinogen, and D-dimers. For validation purposes, we assessed *ex vivo* neutrophil activation in samples from healthy volunteers stimulated by 4 μ M ionomycin stimulation (Calbiochem; Merk Biodéveloppement, Martillac, France) (4).

Neutrophil Analysis on Sysmex XN20

Blood cell count (CBC) was measured on an automated Sysmex XN20 analyzer equipped with impedance and fluorescence flow cytometry devices and used according to the manufacturer’s recommendation without intervention. The optical system of the XN20 employs a stable red diode laser producing a light beam with a wavelength of 633 nm. Cell permeabilization was performed by treatment with specific lysis reagents allowing the polymethine fluorescent XN-20 basic dye to enter the cells, where it binds to nucleic acids in the cytoplasmic organelles and the nucleus. Three different signals displayed in the white cell differential channel scattergrams were recorded: forward-scattered light (FSC, cell size), SSC (internal cell structure and granularity), and SFL (DNA/RNA content). These variables are produced and supported by a rule-based

work area manager XN-20 software (Sysmex, Kobe, Japan), and values of neutrophil fluorescence (NEUT-SFL) and granulation (NEUT-SSC) were extracted from the research screen of the device (8). NEUT-SFL was recorded as a witness of activation with fragmented DNA and nucleic acids enrichment (Fig. 1A). NEUT-SFL signal is generated by the incorporation of the fluorescent dye that targets unpacked DNA within the permeabilized cell. Because the binding of the fluorescent probe is dependent on the number of binding sites that are unmasked on the DNA strand, NEUT-SFL was recorded as a surrogate of DNA unpacking in the neutrophil.

Microparticle Analysis

Neutrophil-derived CD66b-MPs were measured by prothrombinase assay after capture onto an anti-CD66b biotinylated antibody (Leinco, St Louis, MO). Results were expressed as nanomolar phosphatidylserine equivalents (nM PhtdSer eq.) by reference to a standard curve established with liposomes containing known amounts of phosphatidylserine. To circumvent a possible interference of plasma proteins, MPs were isolated and washed in Tris-buffer-saline containing 3% w/v human serum albumin (LFB, Les Ulis, France) by a double step centrifugation (60 min; 12,000g) before the capture step (4).

DIC Scoring

DIC scores were calculated according to International Society on Thrombosis and Hemostasis 2001 “overt,” “non overt,” and Japanese Association for Acute Medicine (JAAM) 2006 (3, 4). Early DIC was confirmed if JAAM (taking into account the inflammatory response in critically ill patients) score was 4 or higher.

Statistical Analysis

Categorical variables were analyzed using Fisher exact test and continuous variables with the use of Wilcoxon signed rank test. The normality of the distribution was assessed by Shapiro-Wilk test. The “Holm” method was used to compute adjusted *p* values for multiple comparisons. The receiver-operating characteristic (ROC) curve analysis (area under the ROC curve) was performed and the spearman rank correlation coefficient determined. *p* value less than 0.05 was considered statistically significant. Statistical analysis was performed with the Language and Environment for Statistical Computing: R software version 3.1.3 (R Core Team, F foundation for statistical computing, Vienne, Austria, 2012). For data presentation, asymmetrical variables are presented as median values with interquartile range using GraphPad Prism version 6 Software (GraphPad Inc., La Jolla, CA).

RESULTS AND DISCUSSION

Standard Values

According to the manufacturer, the NEUT-SFL mean reference value in normal neutrophils is 46.40 arbitrary units (AU). To validate our approach, we first analyzed on one single day the fluorescence of 1,340 consecutive blood samples from

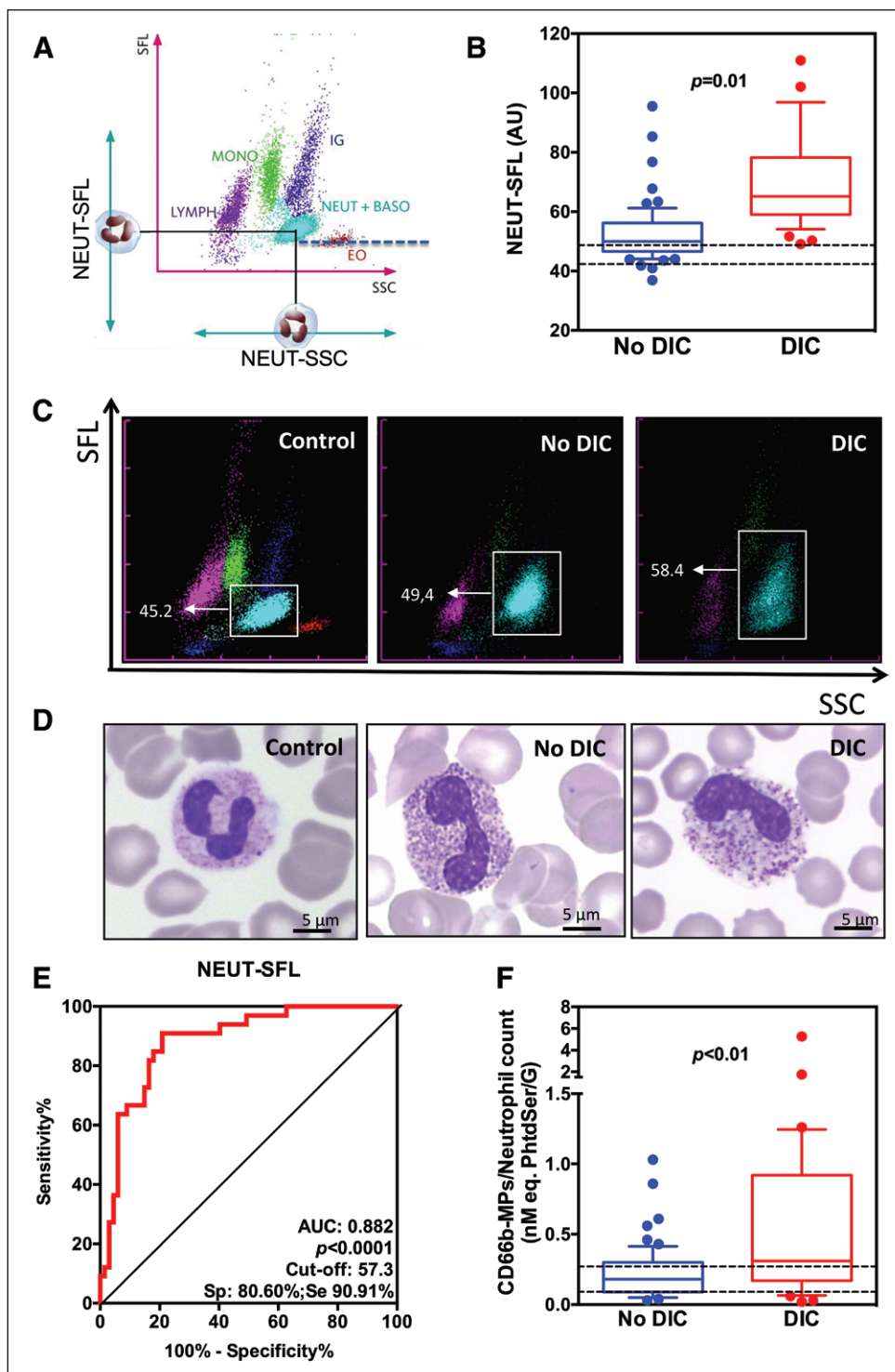


Figure 1. **A**, Normal scattergram with cell distribution. Neutrophils (NEUT) are characterized by fluorescence (NEUT-side-fluorescence light [SFL]) and granulometry (NEUT-side-scattered light [SSC]). **B**, NEUT-SFL in non disseminated intravascular coagulation (DIC; blue) or DIC (red) patients. **C**, Representative scattergrams from healthy control and septic shock patients without and with DIC. Mean NEUT-SFL is slightly increased in the absence of DIC and greatly increased in DIC. **D**, May-Grünwald-Giemsa staining of thin blood smears in healthy donors, septic patient, and DIC patient. Normal neutrophil is characterized by a nucleus with 2–5 lobules and low granule cytoplasm content. Septic neutrophil exhibit a more segmented nucleus and contains more granules. During DIC, neutrophil is characterized by a bilobular nucleus with abnormal distribution of granules. **E**, Receiver-operating characteristic (ROC) curve of NEUT-SFL in septic shock-induced DIC. **F**, CD66b microparticles (CD66b-MPs)/neutrophils count in non DIC (blue) or DIC (red) patients, data are shown in whisker boxes (horizontal line inside box median, upper and lower box limits 25–75 percentiles and T-bars 10–90 percentiles, respectively). Dashed lines correspond to reference values. AUC = area under the curve, BASO = basophiles, EO = eosinophiles, IG = immature granulocytes, MONO = monocytes. Sysmex society kindly provided this analysis diagram of white blood cell populations.

unselected adult patients' samples, sent by any department of our tertiary hospital. NEUT-SFL values in these random patients were: mean, 46.80 AU; SD, 4.382; SE of mean, 0.120; median, 46.40 AU; 10th to 90th percentile, 42.70–50.40 AU. The NEUT-SFL distribution was very narrow in these unselected patients' samples. Only 65 patients (4.9%) had fluorescence above 52 AU. Most of them had aplasia or were recovering after chemotherapy, or were hosted in critical care units. Of note, this present study was designed to assess NEUT-SFL in the context of septic shock, not in other pathologic conditions.

Septic Shock Patients

All the patients fulfilled the septic shock criteria at admission. According to JAAM score, 35 patients (35%) met the DIC criteria. Patients with early septic shock-induced DIC were more severely ill with higher Simplified Acute Physiology Score 2 and Sequential Organ Failure Assessment scores at admission and higher early mortality (Table 1).

Leukocyte and neutrophil counts were significantly lower in patients with DIC at admission, while hemoglobin and sodium were in the same range, excluding any plasma dilution (Table 1 and Fig. 1B). Compared to non-DIC septic patients, NEUT-SFL was significantly increased ($p < 0.01$) in DIC patients and associated with cytologic modifications observed on scattergrams and blood smears, with typical reduction in granularity and a less lobular nucleus (Table 1 and Fig. 1). The area under the ROC curve was 0.882 ($p < 0.0001$) for early DIC diagnosis with a cut-off at 57.3 AU. Sensibility is 90.91%, and specificity is 80.60% (Fig. 1E). Our data are in line with those reported by Park et al (9), who showed a similar range of NEUT-SFL values in septic patients. Furthermore, we

TABLE 1. Patient Characteristics at Baseline

Characteristics	DIC (n = 35)	No DIC (n = 65)	p
Simplified Acute Physiology Score 2	60.4 ± 15.2	52.7 ± 18.0	0.01
Sequential Organ Failure Assessment	12.5 ± 2.6	9.9 ± 3.2	0.01
Mortality day 7, n (%)	7 (20.0)	4 (5.5)	0.01
Norepinephrine, n (%)	35 (100.0)	65 (100.0)	1.00
Dobutamine, n (%)	7 (20.0)	13 (17.8)	1.00
Mechanical ventilation, n (%)	33 (94.3)	61 (93.8)	1.00
Renal replacement therapy, n (%)	16 (45.7)	19 (29.2)	0.13
Japanese Association for Acute Medicine 2006	4.6 ± 2.0	1.9 ± 0.7	0.01
ISTH 2001 "overt"	4.4 ± 1.2	2.9 ± 1.0	0.01
ISTH 2001 "non overt"	4.6 ± 1.3	3.0 ± 1.3	0.05
Platelets (G/L)	94 (54–134)	196 (144–303)	0.01
Prothrombin time (%)	44 (33–62)	64 (51–81)	0.01
D-dimers (µg/L)	7.63 (3.01–20.00)	3.31 (1.89–5.44)	0.01
Fibrinogen (g/L)	5.58 (3.52–9.56)	6.40 (4.67–7.68)	0.03
Leukocytes (G/L)	10.3 (3.6–22.8)	14.3 (11.6–20.1)	0.05
Neutrophil count (G/L) Texte	8.3 (4.0–19.9)	14.0 (10.0–19.8)	0.01
Neutrophil fluorescence (arbitrary units)	66.6 (59.3–80.4)	50.0 (46.6–56.2)	0.01
Platelet count (G/L)	80 (45–132)	179 (140–190)	0.05
Hemoglobin (g/dL)	10.5 (9.1–12.4)	10.3 (9.6–12.1)	0.35
Proteins (g/L)	52 (40–56)	56 (48–64)	0.43
Sodium (mmol/L)	136 (133–138)	136 (132–140)	1.00
C-reactive protein (mg/L)	214 (84–282)	173 (65–278)	0.29

DIC = disseminated intravascular coagulation, ISTH = International Society on Thrombosis and Haemostasis.

could verify in vitro that ionomycin-induced NETosis in blood samples from healthy subjects led to increased NEUT-SFL values in a range identical to that observed in septic patients (data not shown). Interestingly, NEUT-FSC and NEUT-SSC recorded by the flow cytometer were not significantly different (data not shown).

Neutrophil activation is an important process during infection but remains difficult to assess. Herein, we report a significant elevation of CD66b-MP plasma levels in DIC patients, reflecting neutrophil stimulation and consecutive MP release (**Fig. 1F**). Furthermore, there was a correlation between the ratio CD66b-MPs/neutrophil and NEUT-SFL ($r = 0.53$; $p < 0.01$).

The description of NETs in response to bacteria infection renewed the interest in neutrophil biology, and there is growing evidence that NETosis is a keystone in host defense and immunothrombosis. Because neutrophil isolation is a source of artifactual activation, vital NETosis is still difficult to detect in blood samples. NEUT-SFL reflects the degree of chromatin condensation and could prove a reliable indicator of vital NETosis. Furthermore, activated platelets are potent inducers of neutrophil activation via P-selectin and could contribute to NETosis in sepsis. Indeed, we have previously reported a

significant elevation of the ratio of soluble P-selectin-to-platelet count in DIC patients (4), reflecting major platelet activation and possibly contributing to the on-going immunothrombosis.

To our knowledge, our prospective study is the first to investigate the association between NEUT-SFL and DIC during septic shock. Our data highlight the NEUT-SFL signal as a potential indicator of neutrophil activation during septic shock-induced DIC. Assessment of NEUT-SFL could routinely be available and performed on automated CBC. Validation in a large population and in other types of DIC is now needed.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the ADIRAL Association for a partial financial support. We are grateful to Fatiha Zobairi for sample preparation and MP measurements and Lélia Grunebaum for hemostasis routine tests.

REFERENCES

- Fourrier F: Severe sepsis, coagulation, and fibrinolysis: Dead end or one way? *Crit Care Med* 2012; 40:2704–2708

2. Gando S, Iba T, Eguchi Y, et al; Japanese Association for Acute Medicine Disseminated Intravascular Coagulation (JAAM DIC) Study Group: A multicenter, prospective validation of disseminated intravascular coagulation diagnostic criteria for critically ill patients: Comparing current criteria. *Crit Care Med* 2006; 34:625–631
3. Taylor FB Jr, Toh CH, Hoots WK, et al; Scientific Subcommittee on Disseminated Intravascular Coagulation (DIC) of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH): Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost* 2001; 86:1327–1330
4. Delabranche X, Quenot JP, Lavigne T, et al; on behalf to the Clinical Research in Intensive Care and Sepsis Network: Early detection of disseminated intravascular coagulation during septic shock: A multicentre prospective study. *Crit Care Med* 2016 Jun 17. [Epub ahead of print]
5. Chung S, Kim JE, Park S, et al: Neutrophil and monocyte activation markers have prognostic impact in disseminated intravascular coagulation: In vitro effect of thrombin on monocyte CD163 shedding. *Thromb Res* 2011; 127:450–456
6. Engelmann B, Massberg S: Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2013; 13:34–45
7. Zonneveld R, Molema G, Plotz FB: Analyzing neutrophil morphology, mechanics, and motility in sepsis: Options and challenges for novel bedside technologies. *Crit Care Med* 2016; 44:218–228
8. Matsumoto H: The technology of reagents in the automated hematology analyzers Sysmex XE-2100™ - Red fluorescence technology. *Sysmex J Int* 1999; 9:179–185
9. Park SH, Park CJ, Lee BR, et al: Sepsis affects most routine and cell population data (CPD) obtained using the Sysmex XN-2000 blood cell analyzer: Neutrophil-related CPD NE-SFL and NE-WY provide useful information for detecting sepsis. *Int J Lab Hematol* 2015; 37:190–198

Étude de confirmation (données non publiées) :

La fluorescence des neutrophiles reflète le degré de condensation des acides nucléiques. Afin de confirmer la pertinence de la fluorescence des neutrophiles comme biomarqueur de CIVD, nous avons voulu valider ces résultats sur une autre cohorte et avec d'autres fluorochromes.

1. Patients et méthodes

1.1. Patients

Soixante patients majeurs admis dans les unités de réanimation médicale du Nouvel Hôpital Civil à Strasbourg ont été prospectivement inclus pour choc septique selon la troisième définition internationale du choc septique (Singer et al., 2016). Les femmes enceintes, les patients sous protection juridique et les patients pour lesquels une décision de limitation thérapeutique avait été prise du fait d'une pathologie préexistante (cancer en phase terminale, insuffisance cardiaque au stade IV de la NYHA sans possibilité thérapeutique...) ont été exclus. Cette étude a été approuvée par le comité d'éthique et le comité de protection des personnes des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg. Le consentement éclairé a été obtenu auprès du patient ou de sa personne de confiance si celui-ci n'était pas en état de le donner au moment de l'admission, puis confirmé par écrit par le patient dans ce dernier cas. Afin d'évaluer in-vitro la NETose dans un modèle de stimulation, des prélèvements sanguins ont été réalisés chez trois volontaires sains. Des prélèvements sanguins ont également été réalisés chez cinq volontaires sains afin de valider la norme des paramètres de fluorescence pour laquelle elle était inconnue (NCT 02391792).

1.2. Déroulement de l'étude

Il s'agit d'une étude observationnelle non interventionnelle. Les soins ont été administrés conformément aux recommandations actuelles des sociétés savantes nationales et internationales. Les prélèvements ont été couplés aux autres analyses sanguines effectuées en routine chez soixante patients en choc septique. Les données obtenues ont été corrélées aux données cliniques, hémodynamiques et aux différentes explorations réalisées en fonction de la

présentation clinique. L'ensemble de ces données a ainsi permis de corréler les paramètres mesurés au diagnostic de CIVD et à la gravité notamment.

1.3. Prélèvements sanguins

Cinq millilitres de sang ont été prélevés sur tube EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique) et sur tube sec (Vacutainer™, Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France). Les prélèvements sanguins ont été effectués après mise en place d'un cathéter artériel destiné à la surveillance invasive de la pression artérielle et aux multiples prélèvements sanguins rendus nécessaires par l'état du patient et n'ont pas entraîné de ponction supplémentaire. Les tubes étaient immédiatement acheminés à température ambiante au laboratoire d'hématologie des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg où les tubes étaient immédiatement traités. Les volontaires sains ont été prélevés par ponction veineuse périphérique.

1.4. Numérations et formules sanguines, détermination de NEUT-SFL

Les numérations et les formules sanguines ont été effectuées par fluoro-cytométrie en flux automatisée à l'aide de l'automate Sysmex® XN20 (Sysmex® Corporation, Kobe Japon) après acheminement des tubes de sang au laboratoire d'hématologie, selon le circuit hospitalier interne habituel de traitement des bilans. Les différents leucocytes sont ensuite séparés en fonction de trois différents signaux à une longueur d'onde de 633nm: la taille de la cellule (forward-scattered light, NEUT-FSC), la granulométrie (NEUT-SSC), la fluorescence latérale à la lumière (NEUT-SFL). Ces données sont produites et présentées par le logiciel XN-20 Software (Sysmex® Corporation, Kobe, Japon) et les données sont extraites de l'écran de recherche du logiciel. Le canal permettant la réalisation des formules utilise deux réactifs (description selon Sysmex® Corporation): le premier réactif lyse les globules rouges et agit sur la membrane des leucocytes en la perméabilisant. C'est une étape de fixation. Ensuite, un second réactif lié à un fluorochrome à base de polyméthine (nature du réactif non divulguée par Sysmex) se lie aux acides nucléiques. Il s'agit donc d'un agent non perméant utilisé après fixation ce qui permet sa diffusion intra-cellulaire. Plus la cellule est riche en acides nucléiques ou plus son ADN est accessible (cellule immature, activation cellulaire...), plus l'intensité de la fluorescence latérale à la lumière est élevée. La fluorescence reflète donc le degré de condensation de la chromatine. Dans un précédent travail, la norme du paramètre a été établie à partir de 1340 bilans, soit à partir de l'ensemble des patients majeurs ayant eu un

bilan biologique pendant une période de 24 heures au Hôpitaux Universitaires de Strasbourg sur les deux sites hospitaliers regroupant l'ensemble des spécialités médicales et chirurgicales adultes. Pour valider notre approche sur la mesure de la fluorescence des neutrophiles en réanimation médicale et sa spécificité dans le diagnostic de la CIVD, ce paramètre a été recueilli rétrospectivement chez 349 patients consécutifs admis en réanimation médicale au Nouvel Hôpital Civil de Strasbourg du premier mars au trente et un mai 2018 quel que soit le motif d'admission.

1.5. Marquage des acides nucléiques au Syto 40 en cytométrie en flux

La fluorescence des neutrophiles humains après marquage par un fluorochrome spécifique des acides nucléiques, ADN et ARN, le Syto 40 (Thermo Scientific, Rockford, IL) a été mesurée en cytométrie en flux. Le Syto40 est un fluorochrome qui pénètre la cellule après perméabilisation et se lie aux acides nucléiques dans le cytoplasme et dans le noyau. A partir d'échantillons de sang total prélevé sur tube EDTA (Vacutainer™, Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France), les polynucléaires neutrophiles sont identifiés à l'aide d'une combinaison d'anticorps fluorescents : anti-leucocytes CD45-FITC (pan-leucocytaire), anti-polynucléaires éosinophiles CD49d-PE, et anti-monocytes CD14-APC (BioCytex®, Marseille, France). Ce co-marquage est suivi d'une lyse érythrocytaire (slow lyse, BioCytex®, Marseille, France). Immédiatement après l'ajout du fluorochrome d'intérêt, une acquisition d'une durée de 5 minutes est réalisée à l'aide d'un cytomètre en flux conventionnel (FacsCanto II, BD Biosciences). La norme de ce paramètre a été établie à partir de prélèvements sanguins réalisés auprès de cinq volontaires sains.

1.6. Statistique

Les variables catégorielles sont représentées par des effectifs (pourcentages). Les variables continues asymétriques sont exprimées par des médianes +/- les quartiles [Q1; Q3]. Les variables qualitatives ont été analysées en utilisant le test exact de Fisher et les variables continues ont été analysées à l'aide du test de Wilcoxon. Le test de Shapiro-Wilk a été utilisé pour évaluer la normalité de la distribution. Le test de Bootstrap a été utilisé pour la comparaison de deux courbes ROC. La correction de « Holm » a été appliquée afin de contrôler l'inflation du risque alpha due aux comparaisons multiples. Une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative. L'analyse statistique a été effectuée à

l'aide du logiciel R version 3.1.3 (T Core Team, F foundation for statistical computing, Vienne, Autriche). Les représentations graphiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 6 Software (GraphPad Inc, La Jolla, CA).

2. Résultats

Soixante patients consécutifs ont été inclus. Tous les patients remplissaient les critères de choc septique à l'admission. Selon le score JAAM-DIC 2016 (16), vingt-sept patients présentent une CIVD définie par un score ≥ 4 à J1 ou à J2. Les caractéristiques des patients sont résumées dans le tableau 5. Les patients présentant une CIVD avaient des scores de gravité SOFA et une mortalité statistiquement plus élevée dans le groupe de patients présentant une CIVD (40,7% dans le groupe CIVD *versus* 6% dans le groupe non CIVD, $p < 0,01$). Les numérations plaquettaires sont significativement inférieures chez les patients présentant une CIVD (113G/L [54-172] dans le groupe CIVD *versus* 232G/L [182-268] dans le groupe non CIVD, $p < 0,01$) alors que les numérations leucocytaire et neutrophilique ne sont pas différentes.

Caractéristiques	CIVD (n=27)	Pas de CIVD (n=33)	<i>p</i>
Score SOFA	15 [9,5-17]	9 [8-17]]	<0,01
Mortalité, J7, n(%)	11(40,7)	2 (6)	<0,01
Noradrénaline, n(%)	27 (100,0)	33 (100,0)	1
Score JAAM-DIC 2016	5 [3-6]	2 [1-2]	<0,01
Plaquettes (G/L)	113 [54-172]	232 [182-268]	<0,01
Leucocytes (G/L)	14,7 [9,3-20,6]	16,1 [11,4-24,4]	0,81
Neutrophiles (G/L)	11,5 [7,6-16,8]	14,0 [9,5-20,8]	0,79
NEUT-SFL (unités arbitraires)	63,2 [58,08-69,4]	54,6 [47,9-58,1]	<0,01
Syto 40 (unités arbitraires)	671,5 [520,5-761,8]	456,5 [394,8-544,3]	<0,01

Tableau 5 : Caractéristiques des patients à l'admission

SOFA : Sepsis-related Organ Failure Assessment

La fluorescence des neutrophiles NEUT-SFL est significativement augmentée chez les patients en choc septique 54,6 [47,9-58,1] UA comparée à un échantillon de sujets sains : 47,2 [43,6-47,3] UA ($p < 0,01$). La fluorescence des PNN est significativement augmentée chez les patients présentant une CIVD précoce comparée au groupe sans CIVD (63,2 [58,08-69,4] UA *vs.* 54,6 [47,9-58,1] UA, $p < 0,01$) –Figure 14A-. Une courbe ROC (*receiver-operating characteristic*) a permis d'établir une aire sous la courbe de 0,792 ($p < 0,01$) pour le diagnostic

de CIVD, avec un cut-off à 57,7 UA, au-delà duquel l'augmentation de la fluorescence est prédictive d'une CIVD avec une sensibilité de 78,8% et une spécificité de 77,8% (Figure 14B).

En utilisant un autre fluorochrome, le Syto40 en cytométrie conventionnelle, la fluorescence des neutrophiles est significativement augmentée chez les patients en choc septique : 456,5 [394,8-544,3] UA comparée aux sujets sains: 241,0 [214,0-265,0] UA ($p<0,01$). La fluorescence des PNN est significativement augmentée chez les patients présentant une CIVD par rapport au groupe sans CIVD (671,5 [520,5-761,8] UA vs. 456,5 [394,8-544,3] UA, $p<0,01$) – Figure 14C-. Une courbe ROC a permis d'établir une aire sous la courbe de 0,792 ($p<0,01$) pour le diagnostic de CIVD, avec un *cut-off* à 553,0 UA, au-delà duquel l'augmentation de la fluorescence est prédictive d'une CIVD avec une sensibilité de 72,7% et une spécificité de 81,5% (Figure 14D).

La comparaison des aires sous la courbe des deux courbes ROC ne montre pas de différence ($p=0,99$) entre les performances des deux fluorochromes comme biomarqueur diagnostique de CIVD au cours du choc septique.

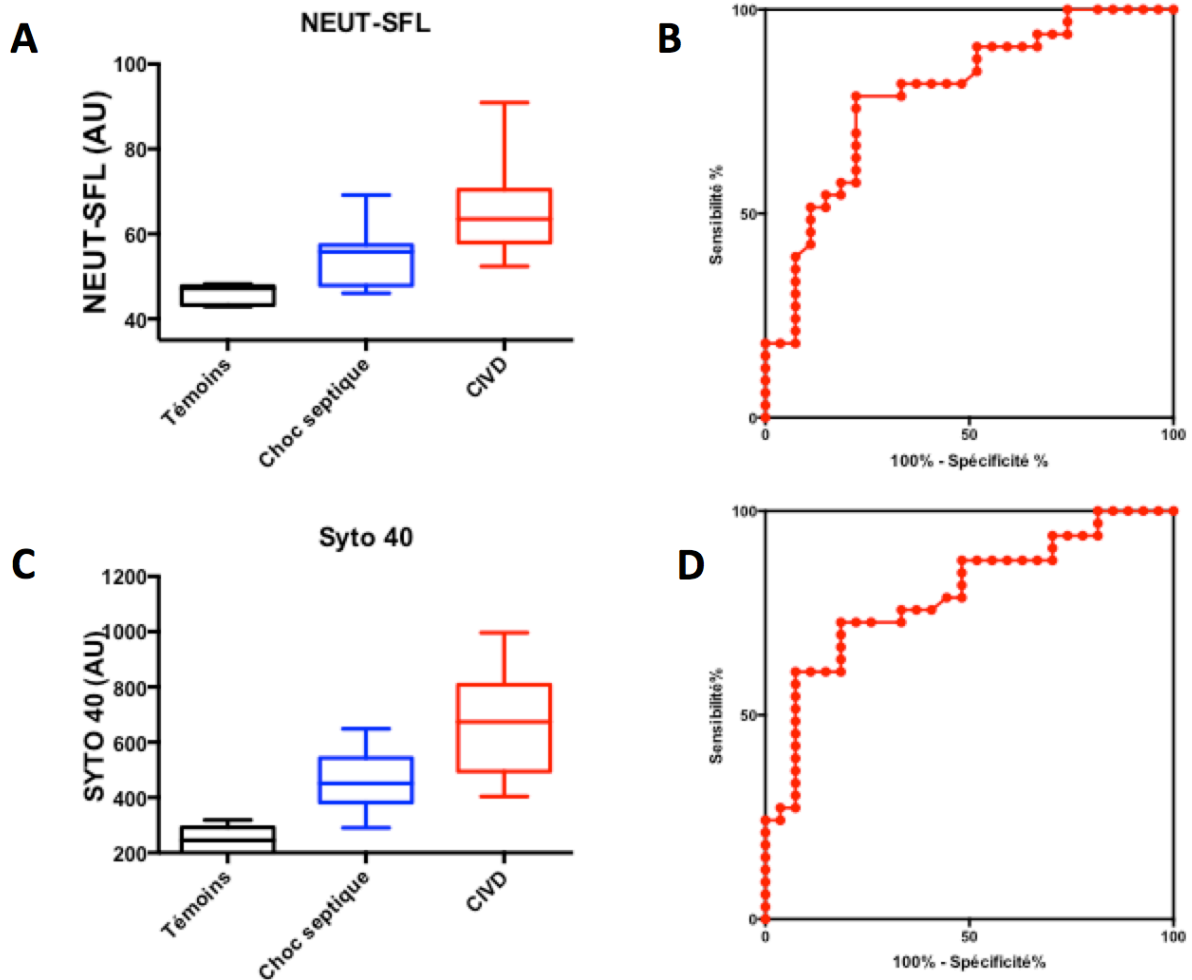


Figure 14: La CIVD est associée à une augmentation de la fluorescence des PNN quel que soit le fluorochrome utilisé.

Les résultats sont représentés par des boîtes à moustaches rouges (CIVD) ou bleues (absence de CIVD). La ligne horizontale dans la boîte correspond à la médiane. La limite supérieure et inférieure de la boîte correspondent respectivement aux 25^{ème} et 75^{ème} percentiles et les barres supérieure et inférieure aux 10^{ème} et 90^{ème} percentiles. **A.** La fluorescence des neutrophiles NEUT-SFL chez les témoins sains (noir), les patients en choc septique (bleu) et en choc septique avec CIVD (rouge) **B.** Courbe ROC de NEUT-SFL chez les patients en choc septique avec CIVD. **C.** La fluorescence des neutrophiles après marquage au Syto40 chez les témoins sains (noir), les patients en choc septique (bleu) et en choc septique avec CIVD (rouge). **D.** Courbe ROC de la fluorescence du Syto40 chez les patients en choc septique avec CIVD.

Nous avons confirmé en parallèle la spécificité de NEUT-SFL après analyse de la fluorescence des neutrophiles chez 301 patients consécutifs admis en réanimation médicale tous motifs d'admission confondus sur deux mois. 86 patients présentaient un choc septique. La fluorescence des neutrophiles en cytométrie en flux automatisée est significativement augmentée chez les patients en choc septique : 54,1 [50,7-56,6] UA comparée aux sujets admis en réanimation pour un autre motif : 48,0 [46,1-50,5] UA ($p < 0,001$). La fluorescence des PNN est significativement augmentée chez les patients présentant une CIVD par rapport au groupe sans CIVD (61,7 [58,0-69,4] UA vs. 54,1 [50,7-56,6] UA, $p < 0,001$). Ces résultats sont représentés figure 15.

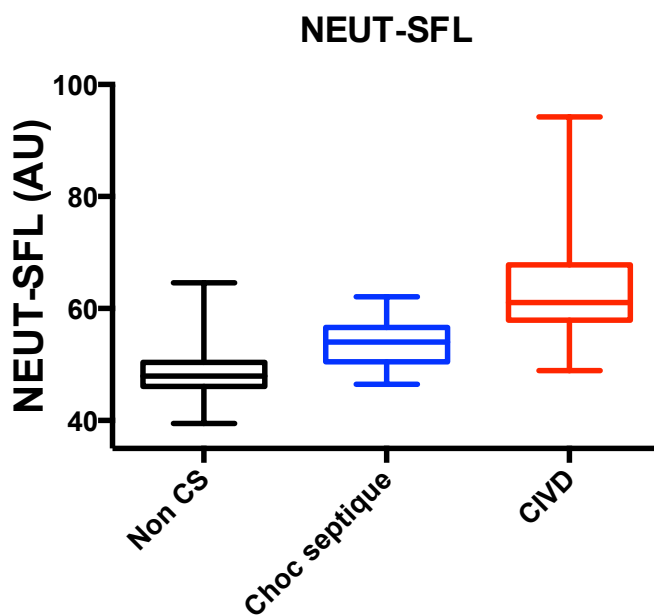


Figure 15: L'augmentation de la fluorescence des neutrophiles NEUT-SFL est spécifique de la CIVD du choc septique chez les patients de réanimation.

Les résultats sont représentés par des boîtes à moustaches noires (patients non septiques) rouges (CIVD) ou bleues (absence de CIVD). La ligne horizontale dans la boîte correspond à la médiane. La limite supérieure et inférieure de la boîte correspondent respectivement aux 25^{ème} et 75^{ème} percentiles et les barres supérieure et inférieure aux 10^{ème} et 90^{ème} percentiles. La fluorescence des neutrophiles NEUT-SFL chez les patients de réanimation hors choc septique (noir), les patients en choc septique (bleu) et en choc septique avec CIVD (rouge)

3. Conclusion

Dans ce travail, nous confirmons que la fluorescence des neutrophiles NEUT-SFL constitue un marqueur diagnostique de CIVD chez les patients en choc septique. Nous montrons que la fluorescence du Syto40, un autre marqueur de l'ADN et de l'ARN, est également augmentée significativement au cours de la CIVD et que les performances de ce fluorochrome ne sont pas différentes de celles de NEUT-SFL.

Ainsi, par cette étude de confirmation, nous montrons que les performances de la fluorescence des neutrophiles comme test diagnostique de la CIVD du choc septique ne sont pas différentes selon l'automate (cytomètre en flux automatisé ou conventionnel) ou le fluorochrome utilisé (fluorochrome Sysmex ou Syto 40). Ainsi, nous validons la spécificité de NEUT-SFL comme biomarqueur diagnostique robuste de CIVD au cours du choc septique. Ce paramètre est accessible immédiatement en routine lors de la réalisation d'une formule sanguine sur cytomètre. Il ne demande pas d'examen supplémentaire et n'engendre donc pas de surcoût. Par ailleurs, par son automatisation, il est opérateur-indépendant. Comme l'augmentation de la fluorescence des neutrophiles est en lien avec une décondensation chromatinienne, nous avons formulé l'hypothèse que ce paramètre pourrait traduire le phénomène de NETose.

Chapitre 3

Evidence of NETosis in septic shock-induced disseminated intravascular coagulation

Xavier Delabranche*, **Laure Stiel***, François Séverac, Anne-Cécile Galois,
Laurent Mauvieux, Fatiha Zobairi, Thierry Lavigne, Florence Toti, Eduardo
Anglès-Cano, Ferhat Meziani, and Julie Boisramé-Helms

* co premier auteur

Shock. 2017 Mar;47(3):313-317

DOI: 10.1097/SHK.0000000000000719

Par l'intermédiaire des NETs, les neutrophiles pourraient avoir un rôle à la fois dans la défense immunitaire et dans l'activation de la coagulation. Dans le précédent travail, nous avons identifié la fluorescence des neutrophiles comme potentiel biomarqueur de CIVD au cours du choc septique. Comme la fluorescence augmente avec la décondensation chromatinienne, nous avons formulé l'hypothèse que ce paramètre pourrait traduire le phénomène de NETose. C'est dans ce contexte que nous avons élaboré ce deuxième travail sous forme d'une étude pilote visant à mettre en évidence des marqueurs de NETose circulants chez des patients en choc septique compliqué de CIVD.

Vingt patients admis dans le service de réanimation médicale du Nouvel Hôpital Civil à Strasbourg pour choc septique ont été prospectivement inclus. Nous avons réalisé des prélèvements sanguins à l'admission, puis à J3 et à J7. A chaque temps, l'activation vasculaire a été mesurée par le phénotypage et la quantification des MPs par test prothrombinase. La NETose a été explorée de deux façons : d'une part par la décondensation de la chromatine mesurée par la fluorescence des neutrophiles, d'autre part par les concentrations sériques de marqueurs indirects de NETose quantifiées par méthode ELISA, les complexes ADN-MPO et les nucléosomes.

Dans ce travail : nous montrons que la CIVD du choc septique est associée : *i.* à des concentrations augmentées en nucléosomes circulants ($p<0,05$), *ii.* à des concentrations augmentées en complexes ADN-MPO ($p<0,05$). Ces éléments mettent en évidence la NETose au cours de la CIVD du choc septique. De plus, *iii.* nous confirmons l'augmentation fluorescence des neutrophiles au cours de la CIVD (70,0 [66,4-81,8] vs. 50.7 [46,3-53,8] AU, $p<0,05$), ainsi que *iv.* la place des MPs comme marqueur diagnostique de la CIVD au cours choc septique et témoins de l'activation endothéliale et leucocytaire.

En conclusion, ce travail met pour la première fois en évidence la présence de NETs à la phase précoce de la CIVD du choc septique chez l'homme. Les NETs pourraient ainsi représenter une cible thérapeutique et un moyen de monitorer l'immuno-thrombose lors du choc septique.

En plus de la publication dans la revue Shock, ce travail a fait l'objet d'une communication orale courte (flash communication) au congrès de la Société de Réanimation de Langue Française 2016.

Les résultats des deux premiers travaux ont également été présentés de façon plus exhaustive en anglais au troisième séminaire scientifique international de Sysmex, Dubaï, le 6 décembre 2018.

EVIDENCE OF NETOSIS IN SEPTIC SHOCK-INDUCED DISSEMINATED INTRAVASCULAR COAGULATION

Xavier Delabranche,^{*†} Laure Stiel,^{*†} François Severac,^{‡§} Anne-Cécile Galois,^{||} Laurent Mauvieux,^{||¶} Fatiha Zobairi,[†] Thierry Lavigne,[#] Florence Toti,^{**} Eduardo Anglès-Cano,^{††‡‡} Ferhat Meziani,^{*†} and Julie Boisramé-Helms^{*†}

^{*}Medical Intensive Care Unit, NHC - Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France; [†]EA 7293 FMTS, University of Strasbourg, Strasbourg, France; [‡]Laboratory of Medical Biostatistics and Informatics, University of Strasbourg, Strasbourg, France; [§]Group Method in Clinical Research, Public Health Unit, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France; ^{||}Hematology and hemostasis laboratory, Haute-pierre - Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France; [¶]EA 3430 FMTS, University of Strasbourg, Strasbourg, France; [#]EA 7290, University of Strasbourg, Strasbourg, France; ^{**}CNRS UMR 7213, University of Strasbourg, Illkirch, France; ^{††}Paris Descartes University, Sorbonne, Paris, France; and ^{‡‡}INSERM UMR S1140, Paris, France

Received 27 May 2016; first review completed 16 Jun 2016; first review completed 26 Jun 2016; accepted in final form 26 Jul 2016

ABSTRACT—Introduction: Neutrophils extracellular traps (NETs) have recently emerged as a new potential link between inflammation, immunity, and thrombosis and could play a key role in septic shock-induced disseminated intravascular coagulation (DIC) pathogenesis. The objective of our study was to investigate a potential link between NETosis and septic shock-induced DIC. **Methods:** Twenty patients with septic shock (10 without and 10 with DIC according to JAAM 2006 score) were prospectively included in our study. Vascular cell activation was assessed by microparticle (MP) measurement. NETosis was investigated at days 1, 3, and 7 using two different approaches: probing and measurement of neutrophil DNA decompaction by neutrophil-side fluorescence light (NEUT-SFL) as recorded by an automated blood cell cytometer and the assessment of nucleosomes and NETs (DNA-bound myeloperoxidase, DNA-MPO). **Results:** Endothelial-derived CD105⁺-MPs, leucocyte-derived CD11a⁺-MPs/leucocyte, and neutrophil-derived CD66b⁺-MPs/neutrophil count ratios significantly increased in DIC compared with non-DIC patients, indicating on-going cell activation ($P < 0.05$). NEUT-SFL, indicating DNA decompaction, was significantly higher in DIC patients. Circulating nucleosomes and DNA-MPO were increased in DIC patients ($P < 0.05$). There were significant correlations between: nucleosomes and NETs ($r^2 = 0.397$, $P = 0.004$), NEUT-SFL and nucleosomes ($r^2 = 0.243$, $P = 0.032$), NEUT-SFL and DNA-MPO ($r^2 = 0.266$, $P = 0.024$). **Conclusion:** NEUT-SFL, NETs, and elevated nucleosome concentrations were all correlated to DIC ($P < 0.05$). We have shown that NETosis is significantly correlated to septic shock-induced DIC.

KEYWORDS—Disseminated intravascular coagulation (DIC), fluorescence, microparticles, NETs, neutrophils, septic shock

INTRODUCTION

Septic shock is defined as a “life-threatening organ dysfunction due to a dysregulated host response to infection (1).” The deregulated host response is responsible for an acute systemic inflammatory syndrome. This specific inflammatory response is closely linked to coagulation activation enabling not only bacterial containment, but also thrombotic microangiopathy through uncontrolled thrombin and fibrin generation, which may result in disseminated intravascular coagulation (DIC) (2). DIC may contribute to organ failure and its correlation to mortality is still debated (3). Blood coagulation is

therefore considered a potential therapeutic target in septic shock (4, 5).

DIC is characterized by vascular cell activation (6–8). Circulating procoagulant microparticles (MPs), released after membrane remodeling and shedding, are surrogates of on-going cell activation (6, 9). We have recently reported the kinetics of their generation during septic shock and evidenced elevated circulating CD11a⁺-microparticles (CD11a⁺-MPs) as the signature of leucocyte activation in septic shock-induced DIC (6, 10).

Besides their well-known role in phagocytosis, neutrophils would also take part in the well-orchestrated response combining innate immunity and haemostasis now termed “immunothrombosis,” possibly deregulated in DIC (11–13). After stimulation by platelets and bacteria, neutrophils release their nuclear content consisting of decompacted chromatin (DNA and citrullinated histones), and spread DNA strands harboring cytoplasmic granular proteins like myeloperoxidase (MPO) and neutrophil elastase (NE) (14, 15). These neutrophil extracellular traps (NETs) sequester pathogens and blood cells in their meshes and promote thrombin and fibrin generation (16). NETs are associated with thrombotic, infectious, or autoimmune diseases (12). Moreover, high levels of NET

Address reprint requests to Julie Boisramé-Helms, MD, PhD, Medical Intensive Care Unit/Service de Réanimation Médicale, Hôpital Européen Georges Pompidou, 20 rue Leblanc, 75015 Paris. E-mail: julie.helms@libertysurf.fr

XD and LS contributed equally to this work.

This work was supported by the Association for Research Development in Intensive Care (Association pour le Développement de la Recherche En Réanimation, ADREAR), ADIRAL-Assistance, Strasbourg, France and GIRCI-Est (Appel à projet Jeunes Chercheurs).

Clinicaltrials.gov identifier: NCT #02391792.

The authors report no conflicts of interest.

DOI: 10.1097/SHK.0000000000000719

Copyright © 2016 by the Shock Society

components, including MPO and nucleosomes, were reported during disseminated microvascular thrombosis and ischaemic organ damage (17, 18). Thus, NETs have emerged as a major link between inflammation, immunity, and thrombosis (19). The aim of our prospective study was therefore to investigate whether NETosis could be involved in septic shock-induced disseminated intravascular coagulation.

PATIENTS AND METHODS

Patients and healthy subjects

Adult patients (18–85 years old) admitted to the medical intensive care unit for septic shock were enrolled in a prospective cohort (interaction haemostasis/inflammation in septic shock, NCT #02391792). End-stage heart or liver diseases, evolving cancer, and/or drug-induced neutropenia were excluded. Ten consecutive patients with early DIC (diagnosed during the first 24 h after admission) according to JAAM 2006 score (20) and 10 patients without DIC were included. Care was provided according to international guidelines (21). The Strasbourg University Hospital Ethics Committee approved this study. Informed consent was obtained from the patient or relatives at admission and confirmed by the patient as soon as possible.

Control subjects for NETosis assessment by NEUT-SFL were six healthy volunteers (3 females, 3 males; 52 ± 15 years old) with a normal complete blood cell count.

Blood collection

Blood was collected on D1, D3, and D7 in citrate anticoagulant tubes (Vacutainer, Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) after arterial catheter insertion in spray-coated silica and. Platelet poor plasma was obtained after two centrifugations at $2,500 \times g$ for 15 min and samples were immediately frozen at -80°C .

Microparticle analysis

Procoagulant MPs were measured by prothrombinase assay after capture onto biotinylated annexin-5 (total MPs) or insolubilized antibodies anti-CD11a (leucocytes; Leinco Technologies, St Louis, Mo), anti-CD66 (neutrophils; BD Pharmingen, Le Pont de Claix, France—only at D1) and anti-CD105 (stimulated endothelial cells; R&D Systems, Minneapolis, Minn). Results were expressed as nanomolar phosphatidylserine equivalents (nM eq. PhtdSer) by reference to a calibration curve (22, 23). Microparticle normal range (CD105-MP, CD11a-MP, CD66b-MP) was previously established in our laboratory (10).

Neutrophil extracellular trap (NET) and nucleosome detection

NETs were measured in patients' plasma using a homemade capture-based ELISA according to Kessenbrock (24). Briefly, $10 \mu\text{g/mL}$ biotinylated anti-MPO monoclonal antibody (Bio-Rad, Hercules, Calif) were added per well on streptavidin covalently coated 96-well plates (Roche, Paris, France). After three washes, plasma ($40 \mu\text{L/well}$) was added together with the horseradish peroxidase-labeled anti-DNA monoclonal antibody (kit Cell Death Detection ELISA^{PLUS}). After 3 h incubation at room temperature on a shaking device the plaque was washed (three times) and the peroxidase substrate was added. After 30 min incubation, the absorbance was measured at 405 nm wavelength using a spectrophotometer device (VersaMax Molecular Devices, Sunnyvale, Calif). Absorbance readings were proportional to the amount of bound horseradish peroxidase-labeled anti-DNA monoclonal antibody.

Cell-free circulating DNA (nucleosome) was measured by Cell Death Detection ELISA^{PLUS} kit (Roche, France) according to the manufacturer's instructions. Results are expressed in arbitrary units (AU).

Blood cell count and neutrophil fluorescence

Complete blood cell count was measured daily by an automated Sysmex XN20 analyser (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) according to the manufacturer's recommendations. The analyzer allows measurement of neutrophil fluorescence by impedance and by fluorescence flow cytometry at 633 nm. Cell membrane permeabilization was achieved using a lysis reagent provided by the manufacturer to favor entering of the nucleic acid polymethine-based fluorescent probe into the cell. Three different signals were recorded: forward-scattered light (FSC, cell size), side-scattered light (SSC, internal cell structure,

and granularity), and side-fluorescence light (NEUT-SFL). Spreading of unpacked chromatin after neutrophil activation was assessed by NEUT-SFL that measures the fluorescent probe incorporation into the unpacked DNA. A NEUT-SFL value of 46.40 AU is the operating landmark value for normal resting neutrophils using the Sysmex XN20 analyzer (25).

Statistical analysis

Categorical variables are represented as headcounts (percentages). Asymmetric continuous variables are expressed as median \pm interquartile range. Categorical variables were analyzed using Fisher exact test and continuous variables with the use of Wilcoxon rank sum test. Repeated measures were analyzed with general linear mixed models with γ -distribution. Goodness of fit for γ -distribution was assessed graphically. The "Holm" method was used to compute adjusted *P* values for multiple comparisons. $P < 0.05$ was considered statistically significant. Statistical analysis was performed with R software version 3.1.3 (R Core Team, F foundation for statistical computing, Vienne, Austria, 2012).

RESULTS

Patients

Twenty patients were enrolled, 10 in each group. All patients fulfilled septic shock criteria at admission (Table 1). Haemostasis parameters and procalcitonin levels are provided in Table 1. According to JAAM score, 10 patients fulfilled DIC diagnosis within the first 24 h. The worst JAAM score was 5.00 [4.75–6.00] in DIC patients versus 2.00 [1.75–3.00] in non-DIC patients, $P < 0.001$.

In vivo assessment of cellular activation

Cell activation was detected by measuring circulating microparticles of endothelial and leukocyte origin. The statistical analysis confirmed that DIC was associated with a specific cell activation pattern, i.e., endothelial and leucocyte activation reflected by the significant overall increase in endothelial CD105⁺-MPs ($P < 0.05$) and in CD11a⁺-MPs to leucocyte count ratio in DIC compared to non-DIC patients ($P < 0.05$) (Fig. 1) were observed. Moreover, CD66b⁺-MPs to neutrophil count ratios were significantly different at day 1 in patients with DIC and without DIC (0.16 ± 0.06 vs. 0.06 ± 0.04 nM eq. PhtdSer/G), witnessing early neutrophil activation.

In vivo NETosis assessment in septic shock patients

NETs and nucleosomes—NETs were detected by measuring DNA-bound MPO using an ELISA capture assay as described in Patients and Methods. NETs were significantly increased in DIC compared with non-DIC patients ($P < 0.05$) (Fig. 2A). Circulating nucleosomes were also significantly increased in septic shock-induced DIC patients compared with non-DIC patients ($P < 0.05$) (Fig. 2B).

Interestingly, there were correlations between: nucleosomes and NETs ($r^2 = 0.397$, $P < 0.01$), NEUT-SFL and nucleosomes ($r^2 = 0.243$, $P = 0.03$), NEUT-SFL and NETs ($r^2 = 0.266$, $P = 0.02$).

Neutrophil fluorescence—Neutrophil fluorescence (NEUT-SFL) reflecting chromatin decompaction in whole blood samples was significantly higher in DIC compared with non-DIC patients (70.0 [66.4–81.8] vs. 50.7 [46.3–53.8] AU, $P < 0.05$), and compared with normal range values: 44.8 [43.5–46.9] AU established in healthy volunteers, $P < 0.05$ (Fig. 2C).

TABLE 1. Characteristics of patients on admission

	No DIC (n = 10)	DIC (n = 10)
Characteristics (mean ± SD)		
Male sex (n)	6	5
Age (years)	68 ± 8	65 ± 17
SAPS II	57 ± 19	56 ± 16
SOFA at admission	10.1 ± 3.2	12.3 ± 3.3
Mortality at day 7 (n)	1	2
Therapy (n)		
Mechanical ventilation	9	10
Renal replacement therapy	1	5
Norepinephrine	10	10
Epinephrine	3	4
Dobutamine	0	4
Fresh frozen plasma	1	2
Platelet concentrate	None	1
Fibrinogen	None	None
Clotting factors	None	None
Heparin	10	10
Biology (median [Q1–Q3])		
Procalcitonin (mg/L)	8.9 [2.6–15.3]	62.5 [29.5–193.0]*
pH	7.34 [7.25–7.45]	7.19 [7.15–7.27]*
Leucocytes (G/L)	13.7 [9.7–19.8]	10.0 [4.9–26.5]
Neutrophils (G/L)	11.6 [10.5–16.8]	9.4 [5.6–20.9]
Lymphocytes (G/L)	0.67 [0.44–1.4]	0.42 [0.31–0.88]
Monocytes (G/L)	0.67 [0.52–1.1]	0.31 [0.13–0.73]
Hemoglobin (g/dL)	10.3 [8.5–13.3]	11.4 [10.0–12.8]
Platelets (G/L)	188 [129–492]	157 [124–252]
Prothrombin Time (%)	50 [41–83]	43 [33–71]
D-dimers (mg/L)	2.9 [1.3–4.4]	9.5 [3.2–18.3]*
Antithrombin (%)	61 [40–83]	55 [40–76]
Fibrinogen (g/L)	5.6 [5.0–7.9]	4.5 [3.2–7.0]

* $P < 0.05$.

DIC indicates disseminated intravascular coagulation.

DISCUSSION

DIC is a life-threatening disorder that remains difficult to assess despite several available biological scores (2). The critical role of endothelial cells and leucocytes, including neutrophils and monocytes, in DIC pathogenesis has emerged. We have indeed recently described a cell-based activation concept and shown that leucocyte and endothelial cell activation occurs early in septic shock-induced DIC (6, 10) and that soluble P-selectin (sCD62P) to platelet count ratio is also increased (6). Interestingly, CD62P is required for platelet–leucocyte interactions (26) and its role was recently reported in mice NETosis (27). In humans, activated platelets induce NETs (28). In the present study, patients with DIC showed elevated levels of circulating endothelial-derived CD105⁺-MPs, leucocyte-derived CD11a⁺-MPs to leucocyte count ratio, and neutrophil-derived CD66b⁺-MPs at D1, confirming early cell activation and on-going DIC. Microparticles reflect the acute vascular cell activation characterizing septic shock-induced vascular dysfunction. We have indeed recently identified leucocyte-derived microparticles (CD11a⁺-MPs) as early markers of septic shock-induced disseminated intravascular coagulation (6) and shown that CD11a⁺-MPs and neutrophil-derived microparticles (CD66b⁺-MPs) are reliable surrogates of respectively leucocyte and neutrophil activations associated with septic shock-induced disseminated intravascular coagulation (6, 8). Leucocytes, and more specifically

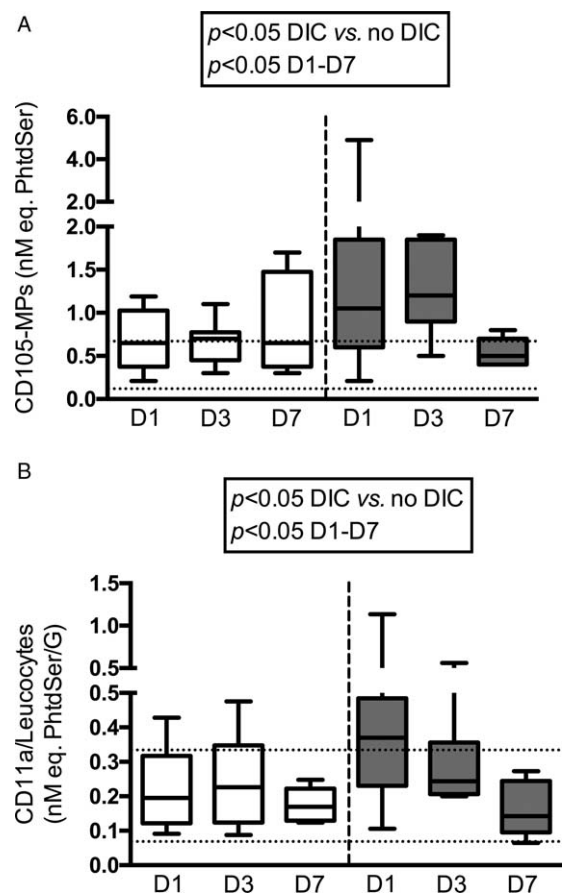


Fig. 1. Kinetics of endothelial cell and leucocyte activation in DIC and non-DIC patients (D1–D7). Cell activation was detected by measuring circulating microparticles of endothelial and leucocyte origin. (A) Endothelial cell-derived CD105⁺-MPs. (B) Leucocyte-derived CD11a⁺-MPs to leucocyte count ratio. Box and whisker plots of CD105 (A) and CD11a (B) microparticles in DIC patients (white boxes) compared with non-DIC patients (gray boxes). The bar inside each box represents the median, the upper and lower box limits the 25 to 75 percentiles and T-bars the 10 to 90 percentiles, respectively. Dashed lines represent reference values in healthy individuals. Statistical analyses show differences of repeated measurements (D1, D3, D7) between patients with DIC vs. non-DIC patients ($P < 0.05$ DIC vs. no DIC), as well as variations in microparticle kinetics between D1 and D7 in DIC and non-DIC patients ($P < 0.05$ D1–D7, $P < 0.05$). DIC indicates disseminated intravascular coagulation.

neutrophils, are key actors of innate immune host response to pathogen invasion, and have been shown to interact with the contact activation pathway of blood coagulation, referred to as the “immunothrombosis” concept (12). Activated neutrophils would mainly take part in immunothrombosis process through the release of NETs.

These data support the hypothesis that NETosis may play a critical role in DIC onset. To the best of our knowledge, this correlation between NETosis and DIC has not been assessed to date. Until now, indirect characterization of NETosis has been performed by blood quantification of histones, cell-free DNA (15). As most of NETs and nuclear-deprived neutrophils are trapped in thrombi and are not circulating, they cannot be imaged in clinical settings. Circulating markers of cell injury like MPs can be detected in peripheral blood. Nucleosomes and DNA-associated MPO have been used to evidence NETosis in human and animals *in vivo* in different infectious diseases,

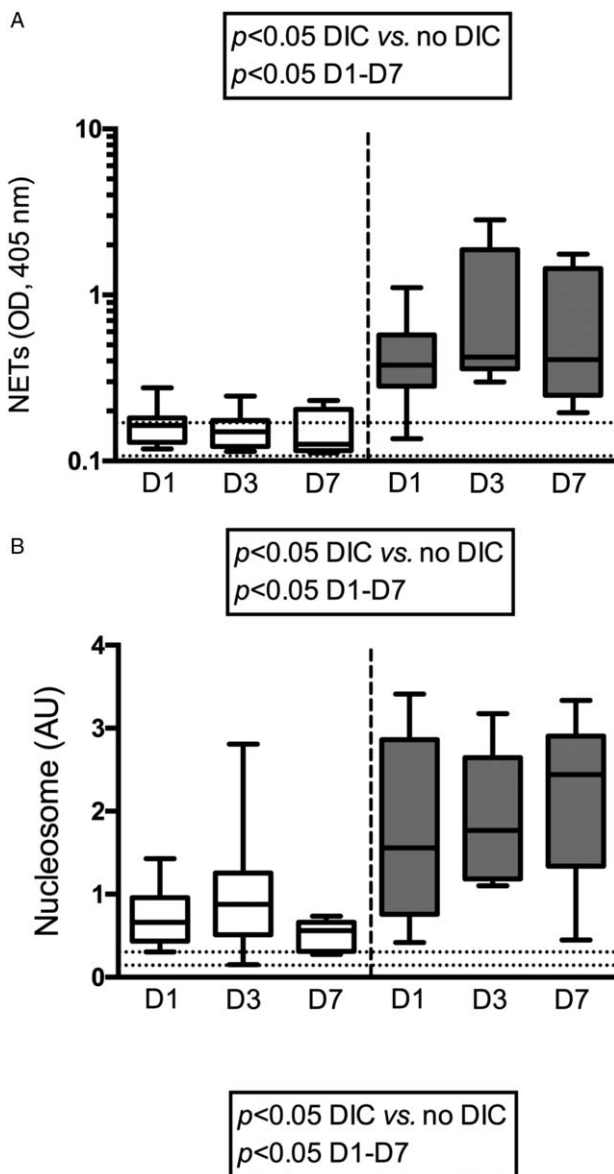


Fig. 2. In vivo assessment of NETosis in DIC and non-DIC patients. NETosis was assessed by measurements of (A) DNA-associated MPO in plasma (NETs), (B) Nucleosomes and (C) neutrophil-associated NEUT-SFL fluorescence signal in whole blood. Box and whisker plots of DNA-associated MPO in plasma (A), nucleosomes (B), and NEUT-SFL (C) in DIC patients (white boxes) compared with non-DIC patients (gray boxes). The bar inside each box represents the median, the upper and lower box limits the 25 to 75 percentiles and T-bars the 10 to 90 percentiles, respectively. Dashed lines correspond to reference values in healthy individuals. Statistical analyses show differences of repeated measurements (D1, D3, D7) between patients with DIC vs. non-DIC patients ($P < 0.05$ DIC vs. no DIC), as well as variations in the indicated parameter kinetics between D1 and D7 in DIC and non-DIC patients ($P < 0.05$ D1–D7, $P < 0.05$). DIC indicates disseminated intravascular coagulation; MPO, myeloperoxidase.

thrombotic events, transfusion-related acute lung injury, or autoimmune diseases (24, 28–30). Nucleosomes alone cannot be considered specific indicators of NETosis, because histones and cell-free DNA are also released by other cellular processes, like apoptosis (31). Conversely, DNA-associated MPO measured through MPO-specific capture and DNA-specific detection are real indicators of NETs.

In the present study, we have shown for the first time that circulating DNA-associated MPO were significantly increased in septic shock-induced DIC compared with non-DIC patients, constituting evidence that NETosis occurs in early DIC patients. Moreover, we have shown that NEUT-SFL, which is currently considered a marker of leucocyte activation, was correlated with the circulating concentration of NETs (8). Furthermore, these data were strengthened by the measurement of similar variations in NEUT-SFL after *ex vivo* ionomycin-induced NETosis in whole blood samples from healthy individuals (8).

The role of NETosis in the pathophysiology of various diseases remains a matter of debate. It would indeed play a critical role during sepsis in host defence by extracellular pathogen trapping (14) and may therefore be pivotal in deciphering sepsis-induced immunothrombosis. First, the extreme polyanionic nature of NET DNA provides a new catalytic surface for the coagulation cascade that may explain NET involvement in coagulation disorders like thrombotic microangiopathy, small-vessel vasculitis, or deep vein thrombosis (17, 24, 30). NETs may locally modulate the pro-/anticoagulant balance. They indeed directly activate both contact pathway (factor XII), through histone and DNA polyanionic meshes (32), and platelets through von Willebrand factor (33), while enzymes contained in NETs may cleave anticoagulant factors, like factor pathway inhibitor TFPI (11). Furthermore, although histones have potent antimicrobial properties when targeting bacteria, they may also induce endothelial cell damage and neutrophil activation with NET formation and MPO release (34). Citrullinated histone H3, a characteristic feature of NETs, may have potential pathogenic mechanisms in critically ill patients possible through NETs driven endothelial cell death (35–37). Indeed, high levels of circulating histones have been evidenced in septic shock and trauma shock (29), highlighting the potential major role of NETs and their components in septic shock pathophysiology. In our cell-based coagulation concept, DIC would be a late manifestation of an inflammatory vascular disease with NETs playing a key and early role in host defence.

Although this preliminary study included a limited number of patients, our data evidence an association between septic shock-induced DIC and NETosis.

In conclusion, this study demonstrates the early presence of NETs at DIC onset that may provide a scaffold for excessive and unbalanced thrombin generation. NETs may therefore be of diagnosis value in early DIC detection and, ultimately, a therapeutic target against coagulopathy during septic shock.

REFERENCES

- Singer M, Deuschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM, et al.: The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315(8):801–810, 2016.
- Gando S, Meziani F, Levi M: What's new in the diagnostic criteria of disseminated intravascular coagulation? *Intensive Care Med* 42:1062–1064, 2016.
- Gando S, Levi M, Toh CH: Disseminated intravascular coagulation. *Nat Rev Dis Primers* 2:16037, 2016.
- Levi M: Recombinant soluble thrombomodulin: coagulation takes another chance to reduce sepsis mortality. *J Thromb Haemost* 13(4):505–507, 2015.

5. Yamakawa K, Aihara M, Ogura H, Yuhara H, Hamasaki T, Shimazu T: Recombinant human soluble thrombomodulin in severe sepsis: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost* 13(4):508–519, 2015.
6. Delabranche X, Boisrame-Helms J, Asfar P, Berger A, Mootien Y, Lavigne T, Grunebaum L, Lanza F, Gachet C, Freyssinet JM, et al.: Microparticles are new biomarkers of septic shock-induced disseminated intravascular coagulopathy. *Intensive Care Med* 39(10):1695–1703, 2013.
7. Boisrame-Helms J, Kremer H, Schini-Kerth V, Meziani F: Endothelial dysfunction in sepsis. *Curr Vasc Pharmacol* 11(2):150–160, 2013.
8. Stiel L, Delabranche X, Galois AC, Severac F, Toti F, Mauvieux L, Meziani F, Boisramé-Helms J: Neutrophil fluorescence: a new signal during septic shock-induced disseminated intravascular coagulation. *Crit Care Med* 44(11):e1132–e1136, 2016.
9. Boisrame-Helms J, Delabranche X, Degirmenci SE, Zobairi F, Berger A, Meyer G, Burbann M, Mostefai HA, Levy B, Toti F, et al.: Pharmacological modulation of procoagulant microparticles improves haemodynamic dysfunction during septic shock in rats. *Thromb Haemost* 111(1):154–164, 2014.
10. Delabranche X, Quenot JP, Lavigne T, Mercier E, François B, Severac F, Grunebaum L, Lorenz M, Bidzhekov K, Khandagale AB, et al.: Early detection of disseminated intravascular coagulation during septic shock: a multicentre prospective study. *Crit Care Med* 44(10):e930–e939, 2016.
11. Massberg S, Grahl L, von Bruehl ML, Manukyan D, Pfeiler S, Goosmann C, Brinkmann V, Lorenz M, Bidzhekov K, Khandagale AB, et al.: Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med* 16(8):887–896, 2010.
12. Engelmann B, Massberg S: Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 13(1):34–45, 2013.
13. Gould TJ, Lysov Z, Liaw PC: Extracellular DNA and histones: double-edged swords in immunothrombosis. *J Thromb Haemost* 13(suppl 1):S82–S91, 2015.
14. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A: Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303(5663):1532–1535, 2004.
15. Yipp BG, Kubes P: NETosis: how vital is it? *Blood* 122(16):2784–2794, 2013.
16. Brinkmann V, Zychlinsky A: Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol* 198(5):773–783, 2012.
17. Fuchs TA, Brill A, Wagner DD: Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32(8):1777–1783, 2012.
18. Jimenez-Alcazar M, Napirei M, Panda R, Kohler EC, Kremer Hovinga JA, Mannherz HG, Peine S, Renne T, Lammle B, Fuchs TA: Impaired DNase1-mediated degradation of neutrophil extracellular traps is associated with acute thrombotic microangiopathies. *J Thromb Haemost* 13(5):732–742, 2015.
19. Savchenko AS, Martinod K, Seidman MA, Wong SL, Borissoff JI, Piazza G, Libby P, Goldhaber SZ, Mitchell RN, Wagner DD: Neutrophil extracellular traps form predominantly during the organizing stage of human venous thromboembolism development. *J Thromb Haemost* 12(6):860–870, 2014.
20. Gando S, Iba T, Eguchi Y, Ohtomo Y, Okamoto K, Koseki K, Mayumi T, Murata A, Ikeda T, Ishikura H, et al.: A multicenter, prospective validation of disseminated intravascular coagulation diagnostic criteria for critically ill patients: comparing current criteria. *Crit Care Med* 34(3):625–631, 2006.
21. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, Sevransky JE, Sprung CL, Douglas IS, Jaeschke R, et al.: Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive Care Med* 39(2):165–228, 2013.
22. Aupeix K, Hugel B, Martin T, Bischoff P, Lill H, Pasquali JL, Freyssinet JM: The significance of shed membrane particles during programmed cell death in vitro, and in vivo, in HIV-1 infection. *J Clin Invest* 99(7):1546–1554, 1997.
23. Hugel B, Zobairi F, Freyssinet JM: Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* 2:1846–1847, 2004.
24. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schonermarck U, Back W, Gross WL, Werb Z, Grone HJ, Brinkmann V, Jenne DE: Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med* 15(6):623–625, 2009.
25. Matsumoto H: The technology of reagents in the automated hematology analyzers Sysmex XE-2100-Red fluorescence technology. *Sysmex J Int* 9:179–185, 1999.
26. Jenne CN, Kubes P: Platelets in inflammation and infection. *Platelets* 26(4):286–292, 2015.
27. Etulain J, Martinod K, Wong SL, Cifuni SM, Schattner M, Wagner DD: P-selectin promotes neutrophil extracellular trap formation in mice. *Blood* 122(2):242–246, 2015.
28. Caudrillier A, Kessenbrock K, Gilliss BM, Nguyen JX, Marques MB, Monestier M, Toy P, Werb Z, Looney MR: Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest* 122(7):2661–2671, 2012.
29. Abrams ST, Zhang N, Manson J, Liu T, Dart C, Baluwa F, Wang SS, Brohi K, Kipar A, Yu W, et al.: Circulating histones are mediators of trauma-associated lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 187(2):160–169, 2013.
30. Thomas GM, Carbo C, Curtis BR, Martinod K, Mazo IB, Schatzberg D, Cifuni SM, Fuchs TA, von Andrian UH, Hartwig JH, et al.: Extracellular DNA traps are associated with the pathogenesis of TRALI in humans and mice. *Blood* 119(26):6335–6343, 2012.
31. Swarup V, Rajeswari MR: Circulating (cell-free) nucleic acids—a promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases. *FEBS Lett* 581(5):795–799, 2007.
32. von Bruhl ML, Stark K, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, Khandoga A, Tirniceriu A, Coletti R, Kollnberger M, et al.: Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med* 209(4):819–835, 2012.
33. Semple JW, Italiano JE Jr, Freedman J: Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol* 11(4):264–274, 2011.
34. Miller BF, Abrams R, Dorfman A, Klein M: Antibacterial properties of protamine and histone. *Science* 96(2497):428–430, 1942.
35. Li Y, Liu Z, Liu B, Zhao T, Chong W, Wang Y, Alam HB: Citrullinated histone H3: a novel target for the treatment of sepsis. *Surgery* 156(2):229–234, 2014.
36. Hirose T, Hamaguchi S, Matsumoto N, Irisawa T, Seki M, Tasaki O, Hosotsubo H, Yamamoto N, Yamamoto K, Akeda Y, et al.: Presence of neutrophil extracellular traps and citrullinated histone H3 in the bloodstream of critically ill patients. *PLoS One* 9(11):e111755, 2014.
37. Saffarzadeh M, Juennemann C, Queisser MA, Lochnit G, Barreto G, Galuska SP, Lohmeyer J, Preissner KT: Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS One* 7(2):e32366, 2012.



Chapitre 4

First visualization of circulating Neutrophil Extracellular Traps using cell fluorescence during human septic shock-induced Disseminated Intravascular Coagulation

Laure Stiel, Caroline Mayeur-Rousse, Julie Helms, Ferhat Meziani, Laurent Mauvieux.

Soumis à Thrombosis Research

Accepté le 17.09.2019

L'implication des NETs dans la CIVD reste débattue et plusieurs équipes proposent des résultats opposés. Ces contradictions sont principalement imputables à l'absence de méthode standardisée pour détecter les NETs. Ainsi, comme discuté par les experts au congrès de l'ISTH en juillet 2018, l'absence de mise en évidence formelle des NETs par visualisation directe ne permet pas de conclure sur leur impact pathogénique. Postulant que le rôle des NETs représente un enjeu diagnostique et thérapeutique majeur dans la CIVD, nous avons élaboré un travail expérimental visant à visualiser directement les NETs dans le sang de patients en choc septique.

Des échantillons sanguins ont été prélevés chez 3 patients en choc septique sans CIVD et chez 3 patients en choc septique avec CIVD ainsi que chez 3 volontaires sains. Nous avons purifié des PNNs par sélection immuno-magnétique négative avant de les déposer sur lame après cyto centrifugation lente. Nous avons mis au point une méthode d'immunomarquage des neutrophiles sur lame à l'aide d'un anticorps anti-myéloperoxidase et de DAPI. Les NETs étaient identifiés comme des fibres d'ADN extracellulaire associées à la MPO en immunofluorescence. Nous avons utilisé un modèle de NETose induite in-vitro par stimulation à la ionomycine comme contrôle positif. Les PNNs isolés et déposés dans les mêmes conditions ont également été observés en microscopie optique après coloration au May-Grünwald-Giemsa (MGG).

A l'aide de cette méthode, les NETs n'ont été visualisés en microscopie par fluorescence que dans le sang des patients en choc septique avec CIVD. Les images de NETs étaient également associées à des expansions cytoplasmiques visualisées en microscopie optique après coloration en MGG. Ces modifications morphologiques traduisent également l'activation des PNNs au cours de la CIVD du choc septique.

En conclusion, ce travail démontre pour la première fois la présence de NETs dans le sang de patients en choc septique avec CIVD, confirmant la relevance de ce phénomène *in vivo*.

Ce travail est actuellement en cours de révision dans la revue *Thrombosis Research*. Il a également fait l'objet d'une communication sous forme de poster au congrès de la Société Française de Réanimation en 2019.

Research

Manuscript Draft

Manuscript Number: TR-D-19-00232R3

Title: First visualization of circulating Neutrophil Extracellular Traps using cell fluorescence during human septic shock-induced Disseminated Intravascular Coagulation

Article Type: Full Length Article

Section/Category: Platelets and Cell Biology

Corresponding Author: Professor Laurent Mauvieux, M.D. Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Hopital Hautepierre

First Author: Laure STIEL, MD

Order of Authors: Laure STIEL, MD; Caroline Mayeur-Rousse, MD; Julie Helms, MD, PhD; Fehrat Meziani, MD, PhD; Laurent Mauvieux, MD, PhD

Abstract: Disseminated intravascular coagulation (DIC) is a severe complication of septic shock. Polymorphonuclear neutrophils (PMNs) may play a key role in septic shock-induced DIC via the release of neutrophils extracellular traps (NETs). NETs capture invading pathogens, but also acts as a pro-coagulant surface at the interface between immunity and thrombosis. During septic shock-induced DIC, neutrophil activation may result in excessive NET formation. Herein, we originally report the presence of circulating NETs in human blood during septic shock-induced DIC.

To investigate NET formation during shock-induced DIC neutrophils were isolated from patients in septic shock associated with (n=3) or without (n=3) DIC. Neutrophils from healthy donors (n=3) were stimulated in vitro with ionomycin as NET formation positive controls. PMNs smears were stained with mouse anti-human FITC anti-myeloperoxidase antibody and the blue-fluorescent DAPI nucleic acid stain. NETs were identified as elongated extracellular DNA fibers associated to myeloperoxidase detected by immunofluorescence.

NETs were unambiguously observed in PMNs from septic shock patients with DIC but not from patients without DIC. NETs features in DIC+ patients were undistinguishable from those observed in ionomycin-induced PMNs from healthy donors. Fluorescence images of NETs were associated to extracellular cytoplasmic expansions.

Our data report for the first time the direct visualization of circulating NETs in patients with septic shock-induced DIC. The in vivo relevance of previously reported indirect markers of NETosis (neutrophil side fluorescence) is confirmed.

Dear Editor,

Please find enclosed the revised version 3 of our manuscript entitled "First visualization of circulating Neutrophil Extracellular Traps using cell fluorescence during human septic shock-induced Disseminated Intravascular Coagulation".

We followed all reviewer #1 recommendations.

In the Material and Methods section, the use of ionomycin in PMNs stimulation, antibody dilution, calculation of NETs formation were added or clarified.

The statistical signification of NETs formation, established in a limited number of patients, was removed.

The table 1 and the figure 3 were modified: number identification of patients was removed in table 1 and the mean bar is now clearly visible in figure 3. The caption of this figure was modified accordingly, as well as Figure 2A caption.

Grammar and syntax were reviewed in order to fulfill publication quality requirements.

Also, a reference to a recent study was added in the discussion (ref 42).

As requested, a detailed point-by-point "response to the reviewers" is provided in a specific document.

We hope that this new version of the manuscript may be acceptable for publication in the Thrombosis Research journal. If this is the case, we will be pleased to provide a graphical abstract and a file image in the Virtual Microscope feature.

Sincerely,

Laurent Mauvieux & Laure Stiel

Abstract

Disseminated intravascular coagulation (DIC) is a severe complication of septic shock. Polymorphonuclear neutrophils (PMNs) may play a key role in septic shock-induced DIC *via* the release of neutrophils extracellular traps (NETs). NETs capture invading pathogens, but also represent a pro-coagulant surface at the interface between immunity and thrombosis. During septic shock-induced DIC, neutrophil activation may result in excessive NET formation. Herein, we originally report the presence of circulating NETs in human blood during septic shock-induced DIC.

Blood samples were obtained from healthy human volunteers (n=3), patients with septic shock without DIC (n=3) and with DIC (n=3). Neutrophils were purified and PMNs smears were obtained. Positive controls for NET formation were obtained using PMNs from healthy volunteers stimulated *in-vitro* with ionomycin. PMNs were stained with FITC anti-myeloperoxidase antibody and the blue-fluorescent DAPI nucleic acid stain. NETs were identified as elongated extracellular DNA fibers associated to myeloperoxidase detected by immunofluorescence.

NETs were unambiguously visualized in PMNs of septic shock patients with DIC but not in patients without DIC, nor in unstimulated PMNs from healthy donors. NETs features in DIC+ patients were undistinguishable from those observed in ionomycin-induced PMNs. Fluorescence images of NETs were associated to extracellular cytoplasmic expansions detected with May-Grünwald-Giemsa staining.

Our data report for the first time the direct visualization of circulating NETs in patients with septic shock-induced DIC. The *in vivo* relevance of the indirect markers of NETosis is confirmed.

Keywords:

NETosis
Septic shock
Disseminated intravascular coagulation (DIC)
Cell fluorescence

Highlights:

- Netosis features can be detected in blood PMNs using simple fluorescence microscopy
- PMNs purified from patients with DIC-induced septic shock display NETosis features
- Morphological analysis of PMNs can distinguish septic shock patients with DIC

First visualization of circulating Neutrophil Extracellular Traps using cell fluorescence during human septic shock-induced Disseminated Intravascular Coagulation

Laure Stiel^{1,2}, Caroline Mayeur-Rousse³, Julie Helms^{1,4}, Ferhat Meziani^{1,2}, Laurent Mauvieux^{3,5}

1. Université de Strasbourg (UNISTRA), Faculté de Médecine; Hôpitaux universitaires de Strasbourg, Nouvel Hôpital Civil, Service de Médecine Intensive Réanimation, Strasbourg, France

2. UMR 1260, Regenerative Nano Medecine, INSERM, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Université de Strasbourg, Strasbourg, France

3. Laboratoire d'hématologie cellulaire, Hôpitaux universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

4. ImmunoRhumatologie Moléculaire, INSERM UMR_S1109, LabEx TRANSPLANTEX, Centre de Recherche d'Immunologie et d'Hématologie, Faculté de Médecine, Fédération Hospitalo-Universitaire (FHU) OMICARE, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Université de Strasbourg, Strasbourg, France.

5. INSERM UMR 1113 : Interface Recherche Fondamentale et Appliquée en Cancérologie (IRFAC), Strasbourg, France

Corresponding author:

Pr. Laurent Mauvieux,
Laboratoire d'hématologie, Hôpital Hautepierre
Avenue Molière, Strasbourg, France
E-mail : Laurent.MAUVIEUX@chru-strasbourg.fr
Phone : +33 (0)388127527

Funding statement: Association D'Aide aux Insuffisants Respiratoires d'Alsace-Lorraine (ADIRAL, Strasbourg, France)

Conflicts of Interest: Pr. Meziani's institution received funding from Stago.

The remaining authors have disclosed that they do not have any potential conflicts of interest.

Trial Registration: Clinicaltrial.gov identifier: NCT #02391792.

Acknowledgments

We wish to acknowledge Association D'Aide aux Insuffisants Respiratoires d'Alsace-Lorraine for financial support. We also acknowledge Dr. Carine Gervais for precious technical assistance and Delphine Rolland for her careful and critical reading of the manuscript

Abstract

Disseminated intravascular coagulation (DIC) is a severe complication of septic shock. Polymorphonuclear neutrophils (PMNs) may play a key role in septic shock-induced DIC *via* the release of neutrophils extracellular traps (NETs). NETs capture invading pathogens, but also acts as a pro-coagulant surface at the interface between immunity and thrombosis. During septic shock-induced DIC, neutrophil activation may result in excessive NET formation. Herein, we originally report the presence of circulating NETs in human blood during septic shock-induced DIC.

To investigate NET formation during shock-induced DIC neutrophils were isolated from patients in septic shock associated with (n=3) or without (n=3) DIC. Neutrophils from healthy donors (n=3) were stimulated *in vitro* with ionomycin as NET formation positive controls. PMNs smears were stained with mouse anti-human FITC anti-myeloperoxidase antibody and the blue-fluorescent DAPI nucleic acid stain. NETs were identified as elongated extracellular DNA fibers associated to myeloperoxidase detected by immunofluorescence.

NETs were unambiguously observed in PMNs from septic shock patients with DIC but not from patients without DIC. NETs features in DIC+ patients were undistinguishable from those observed in ionomycin-induced PMNs from healthy donors. Fluorescence images of NETs were associated to extracellular cytoplasmic expansions.

Our data report for the first time the direct visualization of circulating NETs in patients with septic shock-induced DIC. The *in vivo* relevance of previously reported indirect markers of NETosis (neutrophil side fluorescence) is confirmed.

Keywords:

NETosis
Septic shock
Disseminated intravascular coagulation (DIC)
Cell fluorescence

Introduction

Septic shock is the most severe form of infection, defined as a subset of sepsis in which circulatory, cellular and metabolic abnormalities are profound (1), and responsible for multiple organ failure and a high mortality-rate (2). Septic shock is characterized by a broad inflammatory response and coagulation activation that both contribute to bacterial containment, but also leads to microangiopathy through uncontrolled thrombin and fibrin generation, potentially evolving towards disseminated intravascular coagulation (DIC) (3–6). During septic shock, DIC exacerbates multiple organ failure and increase the risk of death, underlining the relevance of blood coagulation processes as therapeutic target of interest (7,8). However, DIC pathophysiological mechanisms are not fully understood (3,9). Polymorphonuclear neutrophils (PMNs or neutrophils) have recently been identified as potential players in the response to infection by releasing their content, including DNA, histones and granules enzymes (10). These structures, called neutrophils extracellular traps (NETs), form a large net-like structure in which the pathogens get trapped (10). NETs are thus involved in host defense against the invading pathogens. NETs also form a large procoagulant surface and activate the contact phase of coagulation (11,12). Indeed, NET components along with platelets, red blood cells and fibrin promote thrombus formation especially in microvessels (13–16) and contribute to subsequent mortality. Furthermore, cytokines released by neutrophils contribute to alter the membrane profile of vascular cells, especially endothelial cells, thus participating to septic shock-induced endothelial dysfunction and coagulation activation (17,18). Thus, neutrophils may play a major role in immunothrombosis, defined by interactions between innate immunity, inflammation and thrombosis leading to thrombin generation, especially in microvessels (19–21). Nevertheless, the pathophysiological role of neutrophils as modulators of the interactions between

coagulation and immunity during infectious and thrombotic diseases, and their interaction with other blood cells remain a matter of debate (22). During septic shock-induced DIC, neutrophil activation is deregulated and might result in excessive NET formation (20,23,24). Herein, we report an original proof of concept, highlighting circulating NETs in human blood during septic shock-induced DIC.

Material and methods

Patients and blood collection

Patients in septic shock with DIC (n=3) and without DIC (n=3) were enrolled in this study, as well as 3 healthy donors. Septic shock was assessed according to the third international consensus definition (1), and DIC was diagnosed if the JAAM (*Japanese Association for Acute Medicine*)-DIC 2016 score was at least equal to 4 during the first 24 hours of septic shock (25). At the admission, 5ml of blood were drawn on EDTA containing tubes (BD Vacutainer Plus Blood Collection Tubes, Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) that contain K₂EDTA ethylene-diamine-tetracetic acid dipotassium dihydrate (EDTA-2K) anticoagulant which is spray-dried to the walls of the tube (final concentration 7.2mg/5mL). The Strasbourg University Hospital Ethics Committee approved this study. Informed consent was obtained from the patient or relatives at admission and confirmed by the patient as soon as possible.

Neutrophil isolation

Neutrophils were immediately purified after blood collection using negative immunomagnetic sorting method (EasySep®, Stemcell Technologies, Canada) (26). A total of 5×10^4 cells purified PMNS were subsequently spotted on Thermo Scientific™ SuperFrost™

Microscope Slides (Fisher Scientific, Illkirch, France) using cytocentrifugation at 35 g for 5 minutes, which preserved cell integrity and morphology.

Positive Controls

NET formation was induced *in vitro* by stimulation of purified PNNs from healthy donors (n=3) with 4 μ M ionomycin (Calbio-chem, Merk Biodevelopment, France) for 4 hours at 37°C.

Neutrophil staining and observation

PMNs were fixed on slides using 4% paraformaldehyde for 30 minutes and stained after three washes with phosphate-buffer saline (PBS, Gibco, Saint Aubin, France). In brief, after permeabilization with 0.2% Tween-20 during 15 minutes, antigenic sites of PMNs were blocked with 10% fetal bovine serum (FBS) in PBS without EDTA for 30 minutes. After three more washes, cells were incubated with 125 ng of green FITC anti-myeloperoxidase antibody (mouse anti-human clone 5B8, BD Biosciences™, USA, 1/10 dilution) for 30 minutes at room temperature in dark. Smears were then washed with PBS and counterstained with the Vectashield mounting medium® containing 1.5 μ g/ml of blue-fluorescent DAPI (Vector Laboratories, Burlingame™, USA) that preferentially stains dsDNA. All procedures were performed at room temperature. Immunofluorescence microscopy was performed on Zeiss™ imager.Z2 (Marly Le Roi, France) using Metasystems™ Isis fluorescence software analysis© (Cannes, France). NETs were identified as elongated extracellular DAPI stained DNA fibers associated to myeloperoxidase, as described by Brinkman et al. (10).

Quantification was performed by blinded assessment of extracellular DNA release using fluorescent microscopy (20X magnification). Degree of NETs was quantified as the percentage of neutrophils forming NETs divided by the total number of neutrophils X 100.

Samples were categorized into 5 groups: absence of NETs (0% neutrophils forming NETs per microscopic field), scarce number of neutrophils forming NETs (1-25%), moderate NETs (26% to 50%), strong NETs (50% to 75%), and very strong NETs (76% to 100%).

PMNs spots were also stained by standard May-Grünwald-Giemsa for patients, normal PMNs and PMNs after induction of NETosis with ionomycin. Three independent operators reviewed blindly the morphology in at least one hundred neutrophils for each condition. A differential count was established between neutrophils harboring a normal morphology and those harboring morphology similar to PMNs after ionomycin induced NETosis. NETosis-associated morphology in these conditions consisted in nuclear decondensation, cytoplasmic vacuolization and the presence of cytoplasmic membrane expansions visible on more than 1/3 of the cell circumference or the presence of one or more membrane prolongation larger than 1/3 of the cell size. These modifications reflect neutrophil activation.

Blood cell count and neutrophil analysis on Sysmex XN

Complete blood cell count was measured on an automated Sysmex™ XN20® analyzer (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) according to the manufacturer without intervention. Cell permeabilization was performed by treatment with proprietary lysis reagents allowing the polymethine fluorescent XN-20 basic dye to enter the cells, where it binds to nucleic acids in the cytoplasmic organelles and the nucleus. NEUT-SFL reflects leukocyte activation and is correlated to NETosis (24,27). NEUT-SFL values were extracted from the research screen of the analyzer software as previously described.

Results

Baseline characteristics, outcome and infection features are summarized in table 1. Despite the limited number of enrolled that patients, no obvious bias concerning gender, age, comorbidities or type of infection was observed between patients with or without DIC. As expected, patients with DIC had a lower platelet and neutrophil count than non-DIC patients.

PMNs from healthy donors stimulated by ionomycin released NETs visualized using fluorescence microscopy as double-stained DAPI-positive chromatin structures decorated with antimicrobial granule MPO in the extracellular space (figure 1B, upper panel).

NET structures similar to those observed after ionomycin stimulation were unambiguously visualized in PMNs from septic shock patients with DIC (Fig 1D, upper panel), but neither in PMNs from septic shock patients without DIC (figure 1C, upper panel), nor in unstimulated PMNs from healthy donors (Figure 1A, upper panel).

All DIC patients and ionomycin-stimulated PMNs were stratified into “strong NETs formation” (>50 % of PMNs displaying DNA release) and “very strong NET formation” (>75 % of PMNs displaying DNA release) groups (Figure 2A). Conversely, no-DIC patients and unstimulated normal PMNs were stratified into “scarce” or “absence” NET categories.

Ionomycin-stimulated PMNs stained with May-Grünwald-Giemsa harbored chromatin decondensation and vacuolization of the cytoplasm (Figure 1B, lower panel), features associated to neutrophil activation. NETosis is one of the phenomenon that participates to this activation (28). These features were absent in unstimulated PMNs (figure 1A, lower panel). In addition, villous surface projections (also called pseudopods) were detected on the circumference of ionomycin-stimulated PMNs. These modifications were characterized by

cytoplasmic membrane expansions visible on more than 1/3 of the cell circumference or the presence of one or more membrane prolongation larger than 1/3 of the cell size (figure 1B, lower panel). The percentage of PMNs harboring a NETosis-associated morphology reviewed by three blinded-operators were strongly elevated in PMNs from DIC patients (figure 1D, lower panel and Figure 2B) but not in no-DIC patients (figure 1C, lower panel and Figure 2B).

Accordingly, the side-fluorescence of PMNs (NEUT-SFL), a Sysmex™ CBC analyzers parameter previously associated to NETosis modifications (24) was increased in normal PMNs stimulated with ionomycin and DIC patients compared to patients without DIC and normal unstimulated normal PMNs (Figure 3AB).

Discussion

The present report highlights the first direct visualization of circulating NETs in the blood of patients diagnosed with DIC during a septic shock. In this pilot study, PMNs from DIC patients displayed typical NETs structures, that were not observed in PNs from no-DIC patients.

The degree of NETs formation observed in all DIC patients using immunofluorescence microscopy was strong, comparable to the one observed in ionomycin-stimulated PMNs from healthy volunteers.

In previous studies, NETosis was mainly correlated to DIC and thrombosis by serum assays or flow cytometry (24,29,30). It still remains unclear whether NETs are associated or not to DIC during septic shock (9,21). We have recently reported that indirect markers of NETosis (MPO-DNA complexes) are elevated in septic shock-induced DIC patients compared to no-DIC patients (24), but this observation was not confirmed by Maruchi and *al.* (30). These

apparently conflicting results may be explained by the use of different NET measurement methods, the characteristics of the patient studied or the anticoagulation therapy administered for DIC.

Surrogate markers of NETosis such as cfDNA and DNase have been associated to sepsis. These factors reflect cell injury and are elevated in other conditions like thrombotic events, autoimmune diseases or cancer (31–35).

Flow cytometry assays were also proposed to identify and quantify NETs in blood samples (29,36). Although this method is more specific than serum markers, the gating of NETs or NETotic PMNs population using side scatter/forward scatter is difficult and may cause measurement variability and interpretation biases (37). Taken together, flow cytometry may detect only the earliest stage of NETs release (before plasma membrane perforation and cell lysis) and serum markers the components released after NETosis (9,29).

The immunofluorescence methodology used in this study, limited to MPO-DNA complexes visualization, may overpass the limitations of indirect methodologies. It provides a “snapshot” of circulating PMNs at the time of sampling. The staining of citrullinated histones may represent an additional evidence of the occurrence of NETosis in PMNs, but the technical simplicity of the approach used here may facilitate repeated measures during the evolution of the patient in further studies.

The cytological modifications observed in PMNs from DIC patients also need to be further explored, and the different mechanisms of neutrophil activation that cause these changes have to be deciphered with additional markers. However, if the morphological modifications observed in such patients is not entirely explained by NETosis occurrence, chromatin decondensation associated to the modifications of plasma membrane may indicate that NET formation occurs by a “vital NETosis” mechanism, as depicted by de Buhr *et al.* (28).

Nevertheless, our data support the *in vivo* existence and relevance of NETs in humans. For the first time, evidence of the presence of circulating NETs in the blood of patients with septic shock-induced DIC was provided, in accordance with the observation of McDonald *et al.* who showed that NETs promote intravascular coagulation in mice (38).

Intravascular NETs may induce platelet trapping and microvascular occlusion leading to multi-organ failure. Accordingly, destruction of NETs *via* DNase treatment was associated to the impairment of intravascular coagulation, suggesting that the integrity of NETs is critical for coagulation activation (38). New treatments targeting NET formation such as DNase or Peptidyl arginine deiminase-4 (PAD4) enzyme that mediates histone citrullination may represent an interesting therapeutic approach during septic shock (10,39). Indeed, DNase or PAD-4 inhibitors improved organ perfusion and survival in animal models of sepsis (38–42). NET components, especially histones, also stand out as potential therapeutic targets (43). For instance, anti-histone antibody infusion reduced neutrophil-induced cell damages and lung congestion in sepsis mice model (43).

Most of the treatments administered to DIC patients exhibits anti-coagulant activity that increase the risk of bleeding. Standardization of the evaluation of NETs may help identify patients at different levels of risk in future randomized controlled trials. Multispectral imaging flow cytometry proposed by Zhao *et al.* is a promising sophisticated method to identify NETs (44), but is not routinely available in clinical practice. If confirmed, observation of the morphology of PMNs after cytocentrifugation and evaluation of their chromatin decondensation level using neutrophil side fluorescence (e.g. NEUT-SFL, (27)) may represent interesting tools.

Conclusions

In this pilot study, we have shown for the first-time direct evidence of circulating NETs in peripheral blood of patients with septic shock-induced DIC using immunofluorescence. These NETs are undistinguishable from NET features observed following in-vitro ionomycin stimulation of normal PMNs. NET images were furthermore associated to modifications of PMNs morphology observed with May-Grünwald-Giemsa staining. These features may of great interest for the stratification of patients undergoing future treatment protocols targeting NETs.

References

1. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016 23;315(8):801–10.
2. Esteban A, Frutos-Vivar F, Ferguson ND, Peñuelas O, Lorente JA, Gordo F, et al. Sepsis incidence and outcome: contrasting the intensive care unit with the hospital ward. *Crit Care Med*. 2007;35(5):1284–9.
3. Gando S, Levi M, Toh C-H. Disseminated intravascular coagulation. *Nat Rev Dis Primer*. 2016;2:16037.
4. Delabranche X, Berger A, Boissramé-Helms J, Meziani F. Microparticles and infectious diseases. *Médecine Mal Infect*. 2012;42(8):335–43.
5. Delabranche X, Helms J, Meziani F. Immunohaemostasis: a new view on haemostasis during sepsis. *Ann Intensive Care*. 2017 2;7(1):117.
6. Fourrier F. Severe sepsis, coagulation, and fibrinolysis: dead end or one way? *Crit Care Med*. 2012;40(9):2704–8.
7. Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 2013 ;369(21):2063.
8. Gando S. Microvascular thrombosis and multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med*. 2010;38(2 Suppl):S35–42.
9. Alhamdi Y, Toh C-H. Recent advances in pathophysiology of disseminated intravascular coagulation: the role of circulating histones and neutrophil extracellular traps. *F1000Research*. 2017;6:2143.
10. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1532–5.
11. Iba T, Miki T, Hashiguchi N, Tabe Y, Nagaoka I. Is the neutrophil a “prima donna” in the procoagulant process during sepsis? *Crit Care Lond Engl*. 2014;18(4):230.
12. Gould TJ, Vu TT, Swystun LL, Dwivedi DJ, Mai SHC, Weitz JI, et al. Neutrophil extracellular traps promote thrombin generation through platelet-dependent and platelet-independent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(9):1977–84.
13. Diaz JA, Fuchs TA, Jackson TO, Kremer Hovinga JA, Lämmle B, Henke PK, et al. Plasma DNA is Elevated in Patients with Deep Vein Thrombosis. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord*. 2013 ;1(4).
14. Gould TJ, Vu TT, Stafford AR, Dwivedi DJ, Kim PY, Fox-Robichaud AE, et al. Cell-Free DNA Modulates Clot Structure and Impairs Fibrinolysis in Sepsis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(12):2544–53.
15. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 ;107(36):15880–5.
16. Massberg S, Grahl L, von Bruehl M-L, Manukyan D, Pfeiler S, Goosmann C, et al. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med*. 2010;16(8):887–96.
17. Brown KA, Brain SD, Pearson JD, Edgeworth JD, Lewis SM, Treacher DF. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet Lond Engl*. 2006;368(9530):157–69.
18. Fang H, Jiang W, Cheng J, Lu Y, Liu A, Kan L, et al. Balancing Innate Immunity and Inflammatory State via Modulation of Neutrophil Function: A Novel Strategy to Fight Sepsis. *J Immunol Res*. 2015;2015:187048.

19. Engemann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(1):34–45.
20. Gould TJ, Lysov Z, Liaw PC. Extracellular DNA and histones: double-edged swords in immunothrombosis. *J Thromb Haemost JTH.* 2015;13 Suppl 1:S82-91.
21. Stiel L, Meziani F, Helms J. Neutrophil activation during septic shock. *Shock.* 2018;49(4):371-384
22. Kapoor S, Opneja A, Nayak L. The role of neutrophils in thrombosis. *Thromb Res.* 2018;170:87–96.
23. Pfeiler S, Massberg S, Engemann B. Biological basis and pathological relevance of microvascular thrombosis. *Thromb Res.* 2014;133 Suppl 1:S35-37.
24. Delabranche X, Stiel L, Severac F, Galois A-C, Mauvieux L, Zobairi F, et al. Evidence of Netosis in Septic Shock-Induced Disseminated Intravascular Coagulation. *Shock Augusta Ga.* 2017;47(3):313–7.
25. Iba T, Di Nisio M, Thachil J, Wada H, Asakura H, Sato K, et al. Revision of the Japanese Association for Acute Medicine (JAAM) disseminated intravascular coagulation (DIC) diagnostic criteria using antithrombin activity. *Crit Care Lond Engl.* 2016;20:287.
26. Peters CE, Woodside SM, Eaves AC. Isolation of subsets of immune cells. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2005;302:95–116.
27. Stiel L, Delabranche X, Galois A-C, Severac F, Toti F, Mauvieux L, et al. Neutrophil Fluorescence: A New Indicator of Cell Activation During Septic Shock-Induced Disseminated Intravascular Coagulation. *Crit Care Med.* 2016;44(11):e1132–6.
28. de Buhr N, von Köckritz-Blickwede M. How Neutrophil Extracellular Traps Become Visible. *J Immunol Res.* 2016;2016:4604713.
29. Lee KH, Cavanaugh L, Leung H, Yan F, Ahmadi Z, Chong BH, et al. Quantification of NETs-associated markers by flow cytometry and serum assays in patients with thrombosis and sepsis. *Int J Lab Hematol.* 2018;40(4):392–9.
30. Maruchi Y, Tsuda M, Mori H, Takenaka N, Gocho T, Huq MA, et al. Plasma myeloperoxidase-conjugated DNA level predicts outcomes and organ dysfunction in patients with septic shock. *Crit Care Lond Engl.* 2018;22(1):176.
31. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönemarker U, Back W, Gross WL, Werb Z, et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med.* 2009;15(6):623–5.
32. Swarup V, Rajeswari MR. Circulating (cell-free) nucleic acids--a promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases. *FEBS Lett.* 2007;581(5):795–9.
33. van der Vaart M, Pretorius PJ. Circulating DNA. Its origin and fluctuation. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1137:18–26.
34. Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(6):426–37.
35. Vallés J, Lago A, Santos MT, Latorre AM, Tembl JI, Salom JB, et al. Neutrophil extracellular traps are increased in patients with acute ischemic stroke: prognostic significance. *Thromb Haemost.* 2017 05;117(10):1919–29.
36. Gavillet M, Martinod K, Renella R, Harris C, Shapiro NI, Wagner DD, et al. Flow cytometric assay for direct quantification of neutrophil extracellular traps in blood samples. [Am J Hematol.](#) 2015;90(12):1155-8.
37. Manda-Handzlik A, Ostafin M, Bystrzycka W, Siczewska S, Moskalik A, Demkow U, et al. Flow cytometric quantification of neutrophil extracellular traps: Limitations of the methodological approach. *Am J Hematol.* 2016;91(3):E9-10.
38. McDonald B, Davis RP, Kim S-J, Tse M, Esmon CT, Kolaczowska E, et al. Platelets and neutrophil extracellular traps collaborate to promote intravascular coagulation during sepsis in mice. *Blood.* 2017 09;129(10):1357–67.
39. Branzk N, Papayannopoulos V. Molecular mechanisms regulating NETosis in

infection and disease. *Semin Immunopathol.* 2013;35(4):513–30.

40. Czaikoski PG, Mota JM, Nascimento DC, Sônego F, Castanheira FV e S, Melo PH, et al. Neutrophil Extracellular Traps Induce Organ Damage during Experimental and Clinical Sepsis. *PloS One.* 2016;11(2):e0148142.

41. McDonald B, Urrutia R, Yipp BG, Jenne CN, Kubes P. Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. *Cell Host Microbe.* 2012;12(3):324–33.

42. Colón DF, Wanderley CW, Franchin M, Silva CM, Hiroki CH, Castanheira FVS, et al. Neutrophil extracellular traps (NETs) exacerbate severity of infant sepsis. *Crit Care.* 2019 ;23(1):113–26.

43. Abrams ST, Zhang N, Manson J, Liu T, Dart C, Baluwa F, et al. Circulating histones are mediators of trauma-associated lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;187(2):160–9.

44. Zhao W, Fogg DK, Kaplan MJ. A novel image-based quantitative method for the characterization of NETosis. *J Immunol Methods.* 2015;423:104–10.

Table 1

	female	male	male	female	male	male
Gender						
Age (years)	30	32	81	64	67	71
Comorbidities						
DIC	+	+	+	-	-	-
DVT	-	-	+	-	-	-
Arterial thrombosis	-	-	-	+	-	-
Immunosuppression	+	-	-	-	-	-
Chronic heart failure	-	-	-	+	+	-
Cirrhosis	-	-	-	-	-	-
Chronic renal failure	-	-	-	+	-	-
Chronic respiratory failure	-	-	-	+	+	-
Organ failure						
Norepinephrine support	+	+	+	+	+	+
Mechanical Ventilation	+	+	+	+	+	+
Extrarenal epuration	-	-	-	+	-	-
SOFA score	13	7	9	9	12	14
Mortality						
Death at day 7	+	-	-	-	-	-
Death at day 28		-	-	-	-	-
CBC						
Leucocytes(G/L) [4.10-10.50]	2.7	21.47	14.77	28.26	30.93	25.2
Neutrophils (G/L) [1.80-7.70]	1.81	20.34	11.5	19.37	26.19	23.18
Platelets (G/L) [150-400]	16	39	169	371	138	306
Hemoglobin (g/dL) [13.0-18.0]	12.5	8.2	9.9	11.9	9.3	10.2
Infection						
Community-acquired	+	-	+	+	-	+
Nococomial	-	+	-	-	+	-
Site of infection	lung	abdomen	urinary system	urinary system	abdomen	lung
Microorganism	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	polymicrobial	<i>Escherichia Coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Blood-culture	+	+	+	-	-	+
PMNS imaging						
Elongated extracellular DAPI stained DNA fibers associated to myeloperoxidase	+	+	+	-	-	-
Villous PMNS (%)	70%	82%	79%	2%	5%	3%
PMNS fluorescence*	58,1	62,8	55,8	46,5	53,2	57

Table 1 Legend

Table1. Description of Patient Characteristics at Baseline

All patients suffered from septic shock. DIC: Disseminated intravascular coagulation; DVT: Deep Venous Thrombosis; CBC: Complete Blood Cell Count, *: Side fluorescence (Sysmex NEUT-SFL parameter). Normal values of CBC parameters are enclosed in square brackets

Figure Legends

Figure 1: Representative images of immunofluorescence and May-Grünwald-Giemsa staining showing NETs in purified peripheral blood polymorphonuclear neutrophils (PMNs)

Observations were reproduced at least 3 times in each condition in different donors and patients.

Upper panel: PMNs stained with a FITC-conjugated anti-myeloperoxidase antibody (green) and counterstained using DAPI (blue), X20 and X100 original magnification. NETs were identified as elongated extracellular DNA fibers (blue), associated to myeloperoxidase (green).

Lower panel: neutrophils from the same samples stained with May-Grünwald-Giemsa (X60 original magnification), showing extracellular cytoplasmic extensions associated with NET images

A: unstimulated PMNs from healthy donors

B: NETs induced in healthy donors PMNs exposed to ionomycin for 4h

C: PMNs isolated from patients with septic shock without disseminated intravascular coagulation (DIC)

D: PMNs isolated from patients with septic shock with DIC

Figure 2: Quantification of NETS and cytological modifications

A. NETs quantification using immunofluorescence microscopy (% neutrophils forming NETs per microscopic field, X20 magnification)

B. Representation of cells harboring cytoplasmic expansions, expressed in percentage of PMNs, determined blindly by 3 different cytologists in all samples

Figure 3: Neutrophil Side Fluorescence Light (NEUT-SFL) measured on Sysmex XN20

A. NEUT-SFL in no-DIC patients and DIC patients

B. NEUT-SFL in healthy donors without stimulation and after ionomycin stimulation.

The floating bars represent minimum to maximum values and the black bar their mean

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

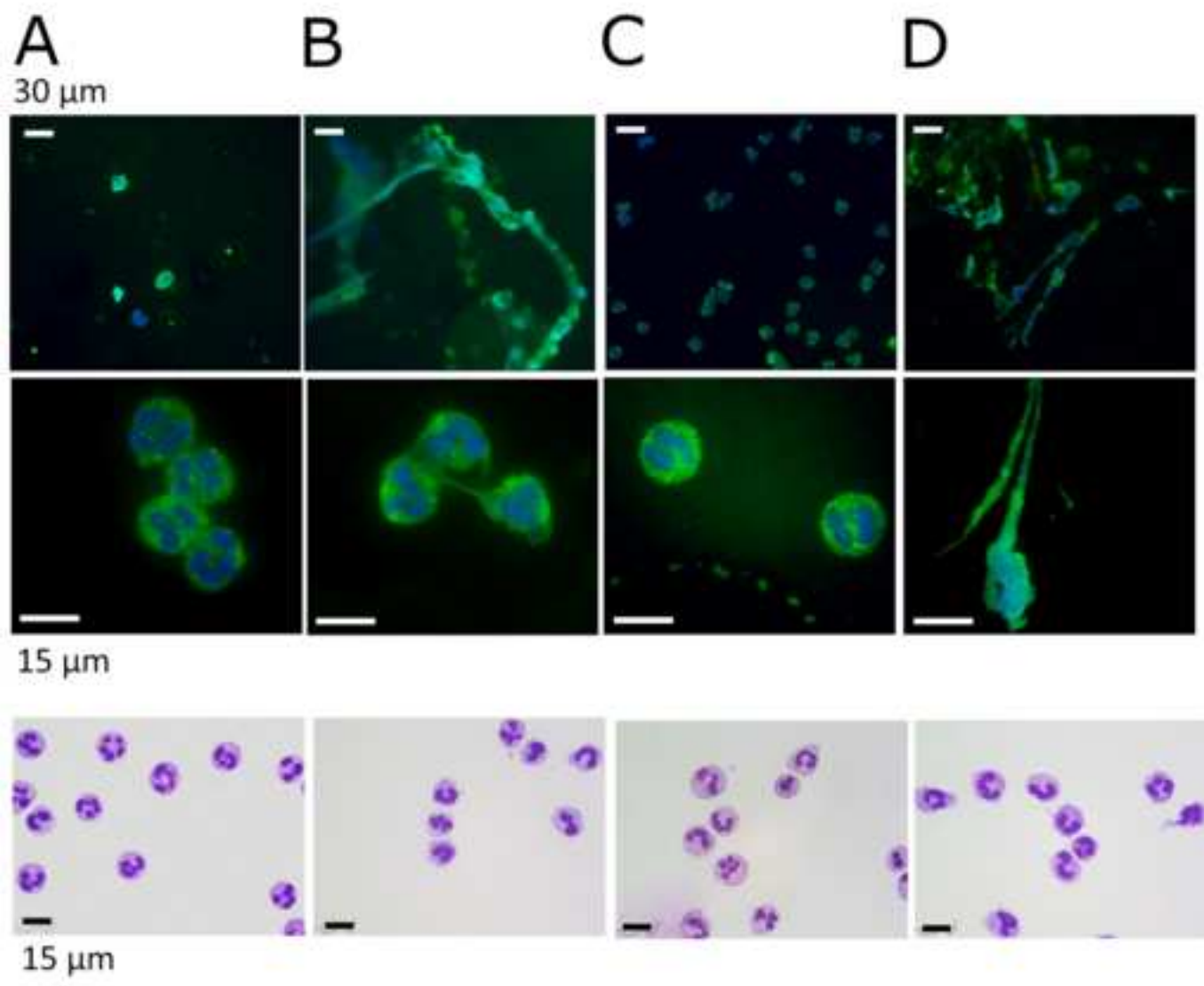
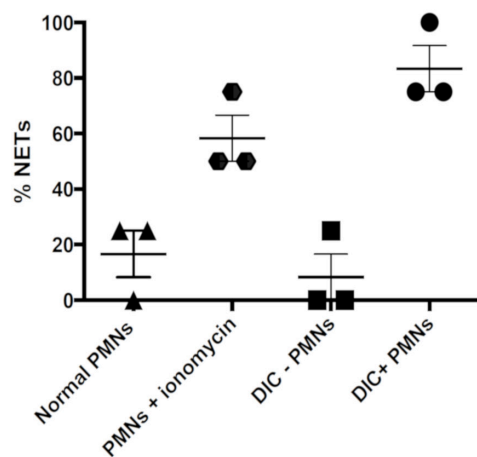


FIGURE 2

A



B

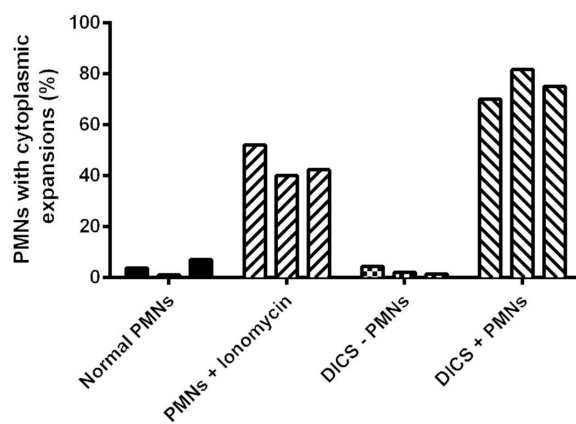
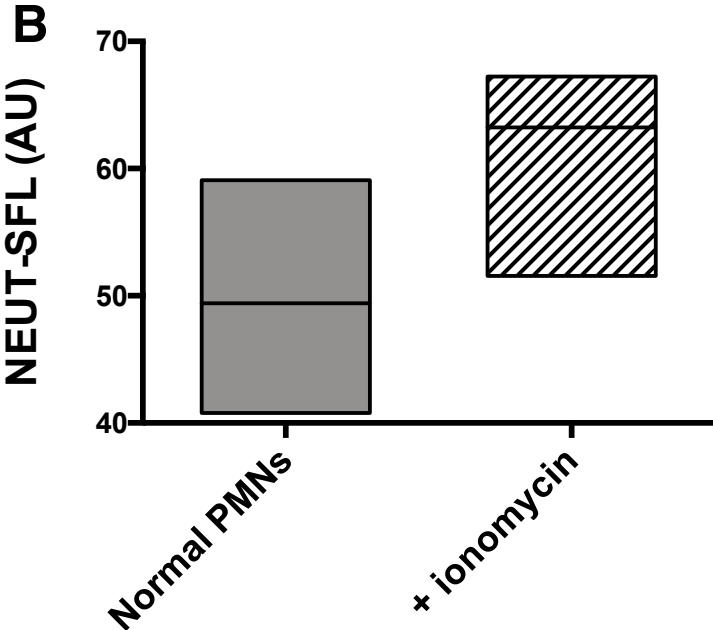
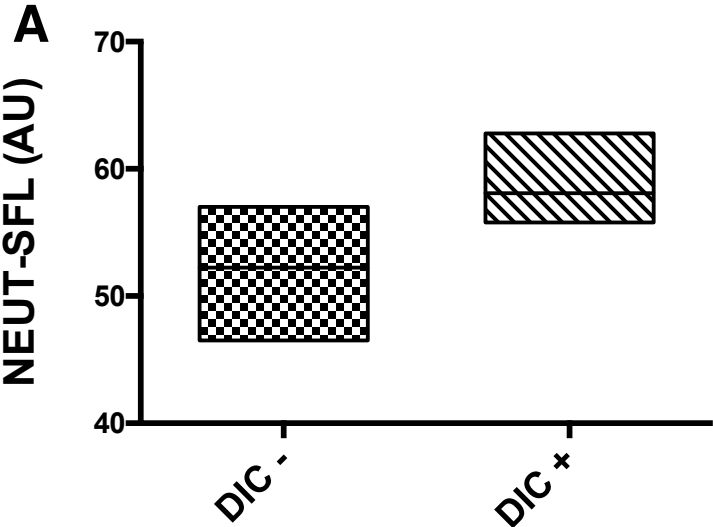


FIGURE 3



Chapitre 5

DIComics: une étude protéomique

En collaboration avec Dr. Delphine Rolland, Dr. Christine Carapito, Aurélie Hirschler et Pr. Sarah Cianferani, Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique (LSMBO), IPHC, Université de Strasbourg, CNRS UMR 7178 Strasbourg, France

Travail expérimental réalisé au LSMBO avec l'aide d'Aurélie Hirschler

Interprétation des données avec l'aide de Delphine Rolland

Travaux actuellement en cours ; publication envisagée fin 2019 - début 2020

L'ensemble des travaux précédents souligne l'importance du neutrophile activé dans la dysfonction vasculaire du choc septique et de la CIVD. Ainsi, nous avons identifié la fluorescence des PNNs comme un biomarqueur diagnostique robuste de CIVD, accessible à partir d'un examen biologique de routine, automatisé et sans surcoût. NEUT-SFL pourrait peut-être ainsi permettre une prise en charge plus rapide de ces patients, sous réserve qu'un traitement efficace soit développé. Par ailleurs, nous mettons en évidence directement les NETs circulants chez des patients en choc septique présentant une CIVD, plaçant le phénomène de NETose intravasculaire comme un nouvel acteur potentiel de la dysfonction vasculaire au cours de la CIVD du choc septique.

Ce travail ouvre des perspectives thérapeutiques, plaçant les NETs et leurs composants comme cibles potentielles. Comme la fluorescence des neutrophiles traduit le degré de décondensation de la chromatine, il pourrait refléter le phénomène de NETose. Cependant, les fluorochromes utilisés se lient aussi à l'ARN. L'activation des neutrophiles pourrait également être liée à une activation transcriptionnelle. La compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation du neutrophile au cours du choc septique et de la CIVD pouvant ainsi apparaître comme un préalable indispensable au développement de nouvelles thérapeutiques. L'objectif de ce dernier travail est d'identifier les protéines et les ARN du neutrophile e au cours de la CIVD du choc septique. Pour répondre à cette question, nous avons élaboré une étude originale protéomique et transcriptomique des PNNs au cours du choc septique avec et sans CIVD.

Ce projet étant actuellement en cours, je ne rapporterai que les résultats de l'analyse protéomique.

1. Patients et méthodes

1.1. Patients

Vingt patients majeurs admis consécutivement dans les unités de réanimation médicale du Nouvel Hôpital Civil à Strasbourg pour choc septique selon la troisième définition internationale du choc septique, dix présentant une CIVD selon le score JAAM 2016 et 10 sans CIVD (Iba et al., 2016), ont été prospectivement inclus (Singer et al., 2016). Les femmes enceintes, les patients sous protection juridique et les patients pour lesquels une décision de limitation thérapeutique avait été prise du fait d'une pathologie préexistante

(cancer en phase terminale, insuffisance cardiaque au stade IV de la NYHA sans possibilité thérapeutique...) ont été exclus. Les patients présentant une agranulocytose ($PNNs < 0,5G/L$) étaient exclus. Cette étude a été approuvée par le comité d'éthique et le comité de protection des personnes des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (NCT 02391792). Le consentement éclairé a été obtenu auprès du patient ou de sa personne de confiance si celui-ci n'était pas en état de le donner au moment de l'admission, puis confirmé par écrit par le patient dans ce dernier cas.

Des prélèvements sanguins ont également été réalisés chez dix volontaires sains (donneurs de sang de l'établissement français du sang dans le cadre d'une convention inter-établissement) afin de déterminer une bibliothèque de protéines et d'ARN de référence.

1.2. Déroulement de l'étude

Il s'agit d'une étude observationnelle non interventionnelle. Les soins ont été administrés conformément aux recommandations actuelles des sociétés savantes nationales et internationales. Les prélèvements ont été couplés aux autres analyses sanguines effectuées en routine. Les données obtenues ont été corrélées aux données cliniques, hémodynamiques et aux différentes explorations réalisées en fonction de la présentation clinique. L'ensemble de ces données a ainsi permis de corrélérer les paramètres mesurés au diagnostic de CIVD et à la gravité notamment.

1.3. Prélèvements sanguins

Dix millilitres de sang ont été prélevés sur tube EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique) et cinq millilitres sur tube citrate (Vacutainer™, Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France). Les prélèvements sanguins ont été effectués après mise en place d'un cathéter artériel, destiné à la surveillance invasive de la pression artérielle et aux multiples prélèvements sanguins rendus nécessaires par l'état du patient. Les tubes citrate étaient immédiatement acheminés à température ambiante au laboratoire d'hématologie cellulaire et d'hémostase des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg pour permettre la réalisation des analyses d'hémostase de routine permettant le diagnostic de CIVD selon le score JAAM DIC 2016 (Iba et al., 2016). Les tubes EDTA étaient immédiatement traités sur place pour isolement des neutrophiles. Les prélèvements étaient réalisés à l'admission, dans les douze heures suivant le diagnostic de choc septique, et répétés à J3 et à J7.

Les volontaires sains ont été prélevés par ponction veineuse périphérique.

1.4. Isolement des polynucléaires neutrophiles

A chaque temps, 2 tubes EDTA ont été utilisés pour isoler les polynucléaires neutrophiles par sélection immunomagnétique négative à l'aide d'un kit commercial (EasySep®, Stemcell Technologies, Canada). Le sang du patient a été placé dans un tube en polystyrène. Des billes paramagnétiques couplées à des anticorps anti-protéines de surface spécifiques (marqueurs CD) de toutes les cellules hématopoiétiques circulantes (sous-populations leucocytaires, plaquettes, et érythrocytes) sauf des PNNs ont été ajoutés. Le tube était ensuite placé dans un aimant qui permet la séparation magnétique des cellules marquées. La fraction cellulaire dépourvue de particules magnétiques a été récupérée par renversement sans sortir le tube de l'aimant, tandis que la fraction cellulaire couplée aux particules magnétiques restait accolée aux parois du tube. Cette opération a été répétée deux fois (déplétion séquentielle) puis un rinçage au PBS a été effectué. Nous avons ainsi obtenu une fraction négative correspondant aux PNNs et une fraction positive comprenant l'ensemble des autres cellules circulantes, marquées par les billes paramagnétiques. Afin d'éliminer les protéines plasmatiques, les PNNs ont ensuite été lavés à l'aide de PBS à deux reprises. Après comptage cellulaire en fluorocytométrie automatisé, 1.10^6 PNNs ont été aliquotés en culots secs dans des eppendorfs dédiés puis congelés à -80°C .

La pureté des PNNs ainsi obtenus a été contrôlée par réalisation d'une formule par fluorocytométrie automatisée (Sysmex™ XN20® analyzer, Sysmex Corporation, Kobe, Japan) et par décompte manuel sur lame (cytospin coloré en May-Grünwald Giemsa). Celle-ci était en moyenne de $96,55\% \pm 0,6003$.

1.5. Préparation des échantillons pour la spectrométrie de masse : digestion en gel

L'extraction et la solubilisation des protéines à partir des culots de PNNs congelés ont été réalisées dans un tampon de type Laemmli (10 mM Tris-HCL pH6,8 ; 1mM EDTA ; 5% β -mercaptoéthanol, 5% SDS, 10% glycérol) suivi d'une sonication de 10 secondes, amplitude 10%. Les protéines ont été quantifiées selon la méthode de Lowry en utilisant le kit RC-DC *Protein Assay* (Bio-Rad) selon les instructions du fabricant. Pour chaque échantillon et après ajout de bleu de bromophénol pour visualiser le front de migration, 7,5 μg de protéines ont été

concentrées dans une bande de stacking d'un gel 1D SDS-PAGE (Figure 16) (Rosenfeld et al., 1992). Après fixation des protéines dans un bain d'éthanol/acide phosphorique, 3 lavages à l'eau et coloration au bleu colloïdal de Coomassie (*Silver blue staining*), les bandes de gel contenant l'ensemble des protéines ont été découpées puis lavées 4 fois avec un mélange d'ammonium bicarbonate (NH_4HCO_3 , 25mM) et d'acétonitrile (ACN) (50/50, v/v). Après déshydratation à l'ACN, les cystéines ont été réduites par l'ajout d'une solution de dithiothréol (10 mM, 30 minutes à 60°C puis 30 minutes à température ambiante) puis alkylées par l'ajout d'une solution d'iodoacétamide (55mM, 20 minutes, température ambiante, dans le noir). Après une nouvelle étape de lavage par alternance d'ammonium bicarbonate (25mM) et d'ACN, les gels ont été déshydratés par l'ajout d'ACN. Les protéines ont ensuite été digérées par l'ajout d'une solution de trypsine (Promega) pendant 15 heures à 37°C (1/26 wt/wt). Les peptides ainsi générés ont ensuite été extraits séquentiellement sous agitation, d'abord avec un mélange d'ACN (60%) et d'acide formique (AF) (0,1%, v/v) et d'ACN (40/60, v/v) pendant 2 heures puis dans de l'ACN pur pendant 1 heure. L'ACN a ensuite été évaporé sous pression réduite et les peptides ont été solubilisés dans une solution d'ACN 2 % / AF 0,1% avant l'analyse LC-MS/MS.

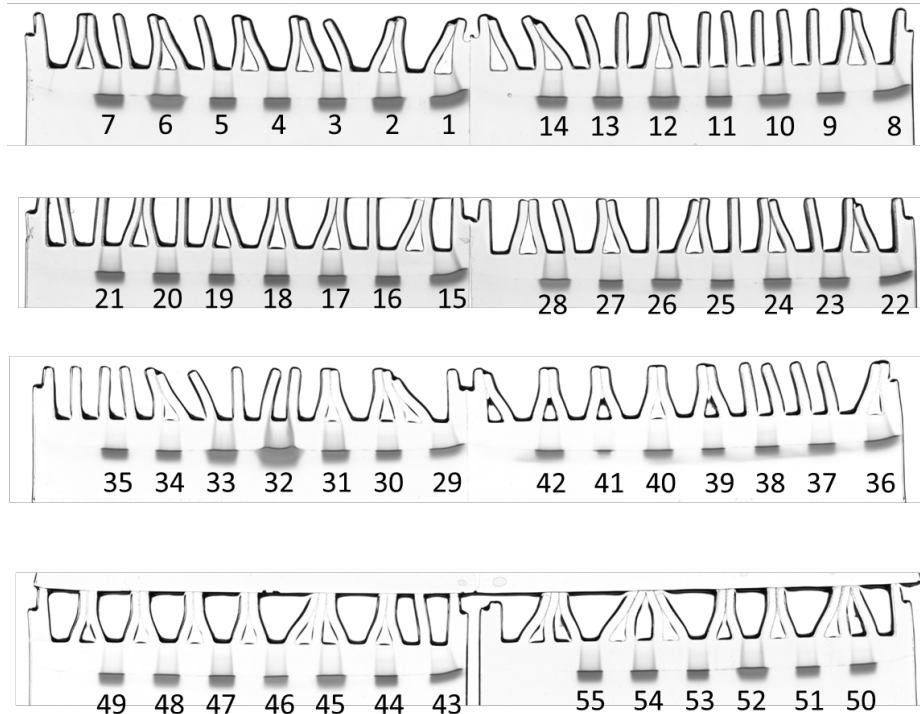


Figure 16: Préparation des échantillons pour analyse protéomique (in gel stacking)

1.6. Analyse LC-MS/MS

Les analyses NanoLC-MS/MS ont été réalisées sur un couplage d'une chromatographie liquide haute pression de type nanoACQUITY Ultra-Performance_{LC}-system (Waters Corporation, Milford, USA) avec un spectromètre de masse de type orbitrap Q-Exactive Plus Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) équipé d'une source d'ionisation nanoelectrospray. La phase stationnaire utilisée est une colonne ACQUITY UPLS BEH130C18 (200 mm x 75 µm, taille des particules 1,7 µm; Waters). La phase mobile est composée de deux solvants : le solvant A (AF 0,1% dans de l'eau) et de solvant B (0,1% AF dans de l'ACN). Chaque échantillon (l'équivalent de 1 µg de protéines initiales) a été préalablement chargé sur une pré-colonne Symmetry C18 (0,18 x 20 mm, taille de particules 5 µm; Waters) dans un 1% de solution B à un débit de 5µL/min pendant 3 minutes.

Les peptides ont ensuite été séparés en chromatographie liquide en phase inversée sur colonne ACQUITY UPLC BEH130C18 avec un gradient de 1 à 35% d'un mélange binaire de solvant A et de solvant B à un débit de 450 nL/min pendant 120 minutes. La spectrométrie de masse a été effectuée en mode data-dépendant avec passage automatique du mode MS (intervalle de 300 à 1800 en rapport masse/charge $-m/z-$, avec une résolution de 70K à $m/z=200$, un contrôle automatique de gain (AGC) fixé à 3×10^6 ions et un temps d'injection maximal de 50ms), au mode MS/MS (premier m/z fixé à 100 avec une résolution de 17,5K, un AGC fixé à 1.10^5 ions et un temps d'injection maximal de 100 ms). Les dix ions les plus abondants de chaque spectre MS ayant une charge ≥ 2 ont été sélectionnés pour être analysés par MS/MS. Les ions ont été fragmentés dans une cellule HCD (*Higher-energy Collisional Dissociation*) par dissociation induite par collision avec une énergie de collision normalisée fixée à 27. Le temps d'exclusion dynamique a été fixé à 60 secondes pour chaque ion sélectionné. L'ordre d'injection des échantillons a été randomisé. Pour éviter une contamination entre deux échantillons successifs, un échantillon « blanc » sans peptide a été injecté entre chaque échantillon. Un contrôle qualité (CQ) a été effectué par injection régulière d'échantillons peptidiques provenant de 14 échantillons et a démontré la stabilité du système puisque des protéines quantifiées au sein des 4 CQ (1138/1182) ont des coefficients de variation inférieurs à 20%.

1.7. Analyse des données

Les données brutes ont été analysées à l'aide de l'algorithme de recherche Andromeda (Cox et al., 2011) du logiciel MaxQuant (MaxPlanck Institute of Biochemistry, Martinsried, Allemagne, v. 1.6.0.16) à partir de la base de données de protéines humaines UniprotKB (20194 séquences au 08-01-2018). Les paramètres MaxQuant ont été définis comme suit: la longueur minimum de chaque peptide a été fixée à 7 acides aminés ; un maximum de deux clivages manquants était toléré ; la tolérance MS était définie à 20 ppm (*parts per million*) pour la première recherche et à 5 ppm pour la recherche principale ; la tolérance MS/MS était définie à 40 ppm ; la carbamidométhylation des cystéines était définie comme modification fixe (induite par le processus de préparation des échantillons), l'acétylation des acides aminés N-terminaux et l'oxydation des méthionines (M) étaient définies en tant que modifications variables ; les taux de faux positifs lors de l'identification (FDR, *False Discovery Rate*) étaient définis à 1% aux niveaux peptidique et protéique et obtenus à partir d'une banque de donnée « decoy » (base de donnée contenant les principaux contaminants et les séquences inversées, ce qui permet de réduire le nombre de faux positifs); la quantification relative des protéines a été réalisée sans marquage isotopique (LFQ : *label free quantification*) sur un modèle de normalisation multi-niveaux des intensités brutes intégré à MaxQuant; les autres paramètres étaient réglés par défaut.

L'analyse différentielle des données a été réalisée à l'aide du logiciel Perseus, version 1.6.2.3 (Tyanova et al., 2016) à partir des fichiers « proteinGroups.txt » extraits de MaxQuant. Les protéines quantifiées dans au moins 70% des échantillons d'un groupe ont été analysées. Après transformation logarithmique des LFQ une analyse statistique basée sur un t-test bilatéral suivi de 250 permutations aléatoires ont permis de mettre en évidence les protéines différentiellement exprimées avec un $FDR < 0.05$. L'analyse par regroupement hiérarchique a été réalisée sur la base des distances euclidiennes avec une analyse de couplage basée sur les moyennes.

L'analyse en GO termes (*gene ontology*) a été réalisée à l'aide du logiciel ProeRE en décrivant les produits des gènes selon trois niveaux d'analyse (processus biologique, fonction moléculaire et compartiment cellulaire). Les protéines du neutrophile mises en évidence chez les témoins a servi de liste de référence. Les autres paramètres étaient réglés par défaut.

L'analyse des réseaux protéiques a été effectuée à l'aide du logiciel STRING version 11.0. Le score minimal d'interaction était fixé à 0,700.

2. Résultats et discussion préliminaires

Seuls les résultats de l'analyse protéomique des PNNs à l'admission (J1) seront présentés ici.

2.1. Caractéristiques des patients

Vingt patients ont été inclus. Tous les patients remplissaient les critères de choc septique à l'admission. Selon le score JAAM-DIC 2016 (Iba et al., 2016), dix patients présentent une CIVD définie par un score ≥ 4 à J1 ou à J2. Les caractéristiques des patients sont résumées dans le tableau 5. Les numérations plaquettaires sont significativement inférieures chez les patients présentant une CIVD ($133,1 \text{ G/L} \pm 21,65$ dans le groupe CIVD *versus* $360,0 \text{ G/L} \pm 43,10$ dans le groupe non CIVD, $p < 0,01$) alors que les numérations leucocytaire et neutrophilique ne sont pas différentes. Il n'y a pas de différence démographique ni de différence liée au type d'infection entre les deux groupes.

	CIVD -	CIVD +	<i>p</i>
SEXE			
Sexe (n, hommes/femmes)	5/5	5/5	<i>1</i>
AGE			
Age (années)	$71,70 \pm 1,862$	$65,40 \pm 3,661$	<i>0,1425</i>
COMORBIDITES			
Antécédent de thrombose veineuse	1 (10%)	0 (0%)	<i>0,3306</i>
Cancer évolutif	0 (0%)	0 (0%)	<i>1</i>
Immunosuppression	1 (10%)	0 (0%)	<i>0,3306</i>
Cardiopathie	6 (60%)	6 (60%)	<i>1</i>
Cirrhose	0 (0%)	0 (0%)	<i>1</i>
Insuffisance rénale chronique	3 (30%)	1 (10%)	<i>0,2878</i>
Insuffisance respiratoire chronique	4 (40%)	1 (10%)	<i>0,1346</i>
DEFAILLANCE D'ORGANE			
JAAM 2016 J1	$1,800 \pm 0,2000$	$4,700 \pm 0,6155$	<i>0,0003</i>
JAAM 2016 J2	$1,778 \pm 0,2778$	$4,556 \pm 0,7093$	<i>0,0022</i>
Noradrénaline	10 (10%)	10 (10%)	<i>1</i>
Ventilation mécanique	10 (10%)	9 (90%)	<i>0,3306</i>
Epuration extra-rénale	4 (40%)	6 (60%)	<i>0,3979</i>
SOFA score	$12,00 \pm 1,033$	$14,30 \pm 1,248$	<i>0,1727</i>
MORTALITE			
A J7	3 (30%)	3 (30%)	<i>1</i>
A J28	3 (30%)	3 (30%)	<i>1</i>

BIOLOGIE			
Leucocytes (G/L)	22,31 ± 2,964	15,95 ± 4,104	0,2252
Neutrophiles (G/L)	19,15 ± 2,469	13,68 ± 3,937	0,2541
Plaquettes (G/L)	360,0 ± 43,10	133,1 ± 21,65	0,0002
Hémoglobine (g/dL)	11,40 ± 0,4088	10,79 ± 0,8197	0,5139
Taux de prothrombine (TP, %)	44,50 ± 5,396	46,60 ± 4,969	0,7779
D-dimères (ng/mL)	5478 ± 1269	10406 ± 2673	0,0817
Antithrombine (%)	68,10 ± 6,744	45,70 ± 5,875	0,0221
NEUT-SFL (UA)	54,02 ± 3,103	68,53 ± 5,632	0,0367
TYPE D'INFECTION			
Nosocomiale	3 (30%)	4 (40%)	0,6601
Infection pulmonaire	4 (40%)	4 (40%)	1
Infection intra-abdominale	3 (30%)	1 (10%)	0,2878
Infection cutanée	1 (10%)	2 (20%)	0,556
Infection uro-génitale	2 (20%)	0 (0%)	0,151
Infection neuro-méningée	0 (0%)	2 (20%)	0,151
Microorganisme identifié	8 (80%)	9 (90%)	0,556
Bacilles gram négatif	6 (60%)	2 (20%)	0,0739
Cocci gram +	3 (30%)	4 (40%)	0,6601
Levure	1 (10%)	1 (10%)	1
Parasite	0 (0%)	2 (20%)	0,151
Virus	1 (10%)	0 (0%)	0,3306
Bactériémie	1 (10%)	4 (40%)	0,1346

Tableau 6: Caractéristiques des patients

Les caractéristiques hématologiques des patients sont résumées dans la figure 17

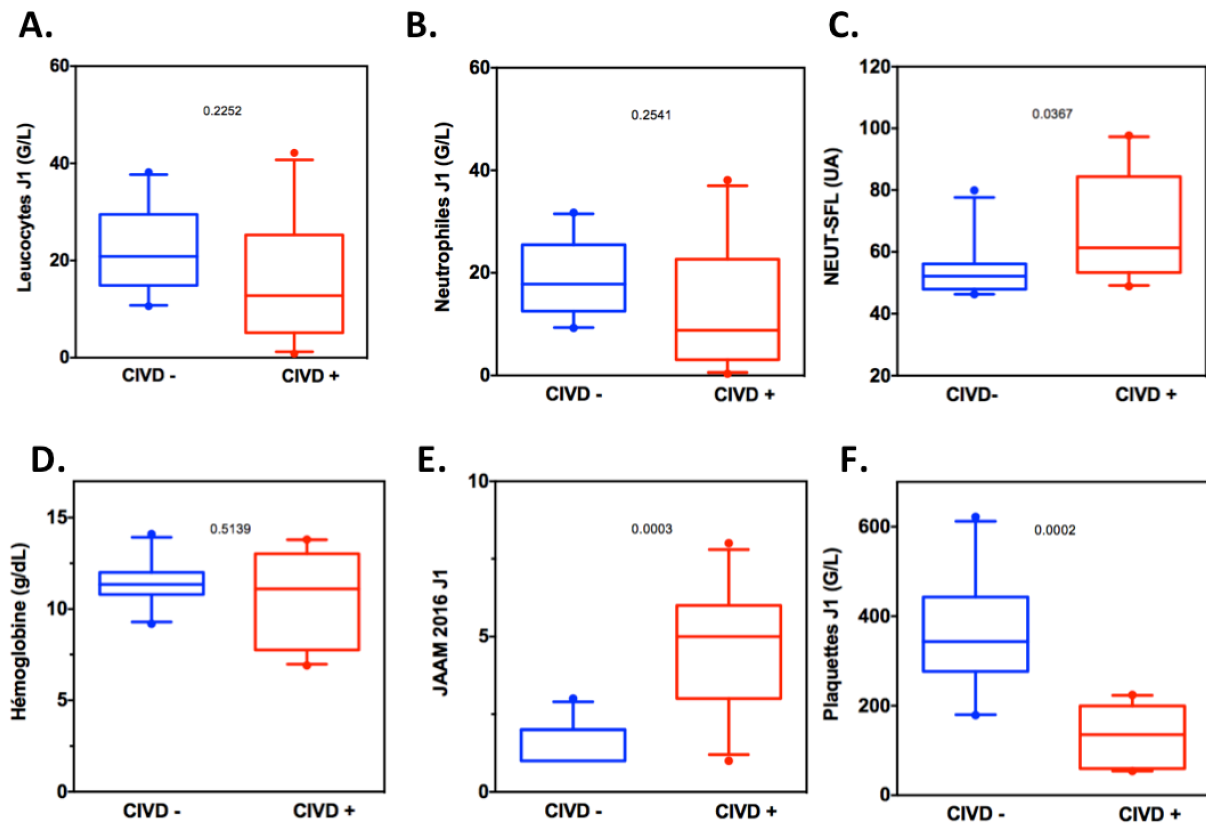


Figure 17:Caractéristiques hématologiques des patients

Les résultats sont représentés par des boîtes à moustaches noires (patients non septiques) rouges (CVID) ou bleues (absence de CVID). La ligne horizontale dans la boîte correspond à la médiane. La limite supérieure et inférieure de la boîte correspondent respectivement aux 25^{ème} et 75^{ème} percentiles et les barres supérieure et inférieure aux 10^{ème} et 90^{ème} percentiles. A. Leucocytes B. Polynucléaires neutrophiles C. NEUT-SFL D. Hémoglobine E. Score JAAM à J1 F. Plaquettes

2.2. Analyse protéomique quantitative sans marquage (label-free quantification)

L'analyse protéomique combinée des 20 échantillons de patients en choc septique et des 10 témoins a permis l'identification de 2610 protéines différentes. Parmi ces protéines, 1721 protéines étaient quantifiées dans au moins 70% des échantillons. Ce nombre est en accord avec les données de la littérature concernant le protéome du neutrophile (Liu et al., 2019; Wang et al., 2018).

2.2.1. Analyse par regroupement hiérarchique non supervisé

A partir des 1721 protéines identifiées et quantifiées, nous avons réalisé une première analyse par regroupement hiérarchique non supervisé (Figure 18).

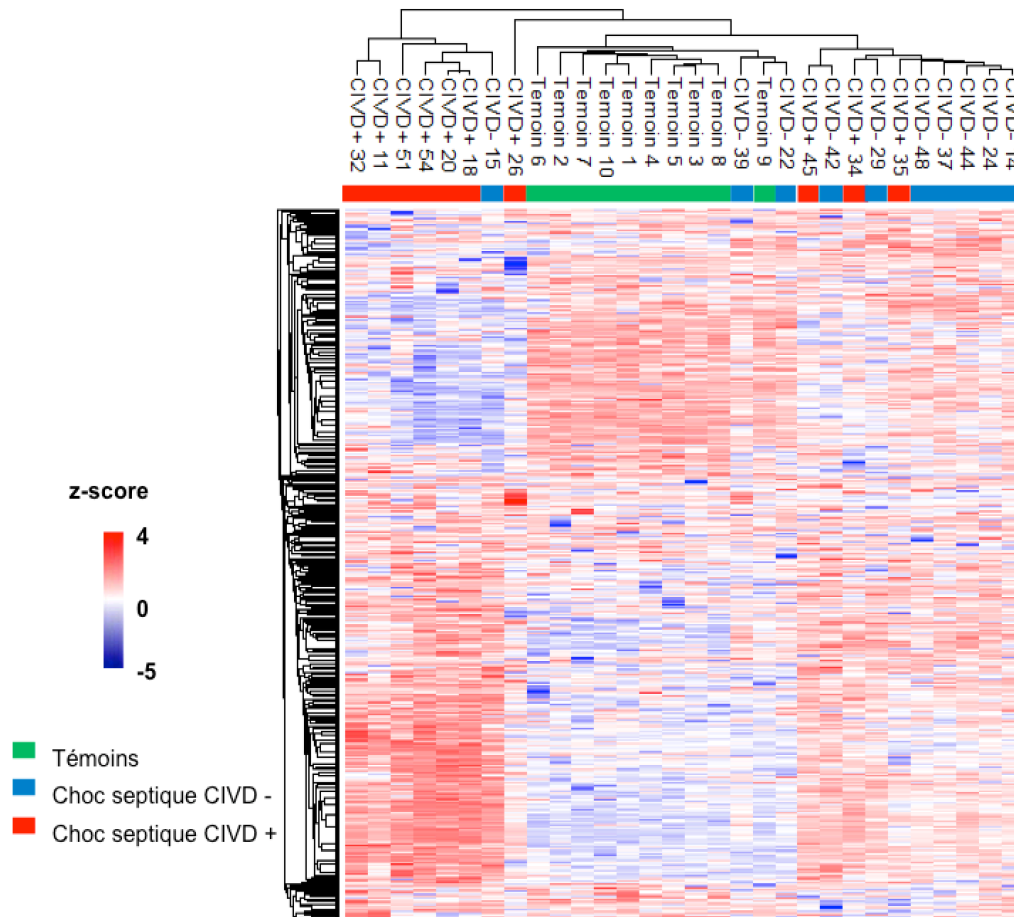


Figure 18: Analyse par regroupement hiérarchique non supervisé sur la base des 1721 protéines présentes dans 70% des échantillons

L'échelle de saturation des couleurs va d'un z-score de -5 en bleu à un z-score de +4 en rouge.

L'analyse non supervisée permet de discriminer 3 groupes d'échantillons en fonction de leur profil d'expression protéique. Les 3 groupes ainsi formés sans *a priori* correspondent globalement aux 3 groupes de notre étude : choc septique sans CIVD, choc septique avec CIVD et témoins. Cette première analyse confirme qu'il existe un profil d'expression protéique du neutrophile différent dans les trois conditions caractérisant les patients étudiés. Deux des trois patients CIVD (échantillon N° 35 et 45) présentant un profil protéique correspondant au groupe « non CIVD » avaient un score JAAM 2016 <4 à J1 et ont développé une CIVD à J2. Néanmoins, le faible effectif de notre étude ne permet pas

d'identifier de facteur prédictif d'un profil d'expression protéique.

2.2.2. Analyse supervisée par regroupement hiérarchique

Nous avons ensuite comparé les groupes d'échantillons deux à deux. 611 protéines (35,5%) étaient exprimées différemment chez les patients en choc septique sans CIVD par rapport aux témoins. (figure 19).

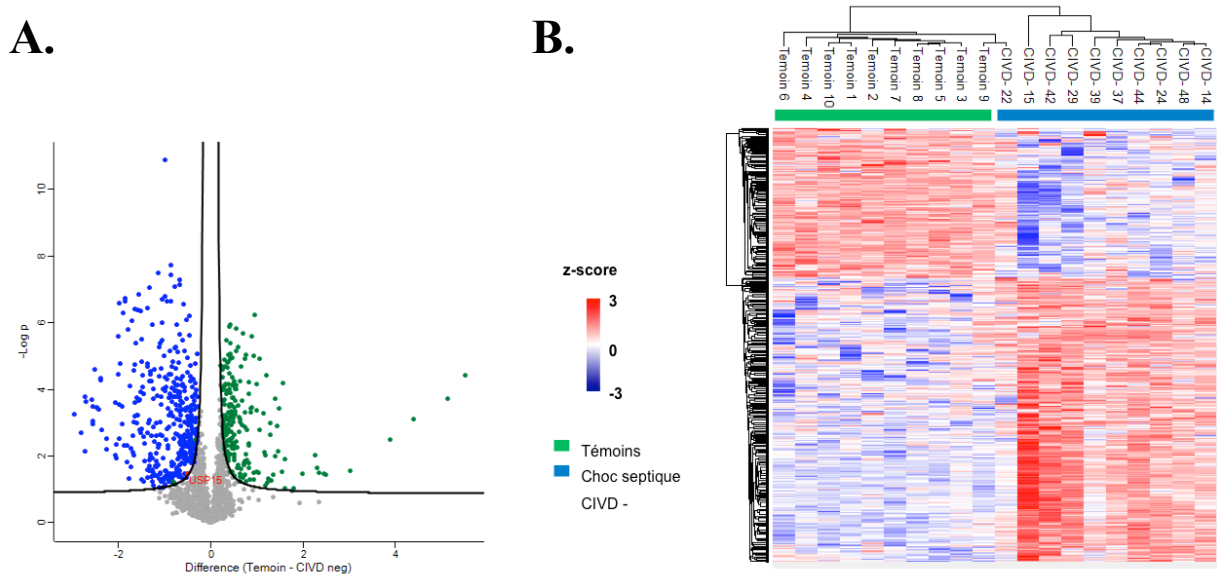


Figure 19 : Analyses bioinformatiques des protéines exprimées différemment chez les patients en choc septique sans CIVD par rapport aux témoins

A. *Volcano plot* **B.** *Clustering* supervisé réalisé sur basé sur 611 protéines différentielles identifiées par l'analyse protéomique. Les protéines représentées en rouge étaient surexprimées et les protéines représentées en bleu étaient sous-exprimées. L'échelle de saturation des couleurs va d'un z-score de -3 en bleu à un z-score de +3 en rouge.

De la même façon, 1067 protéines (62,0%) étaient exprimées différemment chez les patients en choc septique avec CIVD par rapport aux témoins (figure 20). Un différentiel concernant plus de 50 % des protéines identifiées est inhabituel en protéomique quantitative relative (LFQ). Ces résultats sont cependant en accord avec les données de transcriptomique des leucocytes au cours du choc septique qui montrent une reprogrammation de >71% du génome leucocytaire (Cazalis et al., 2014).

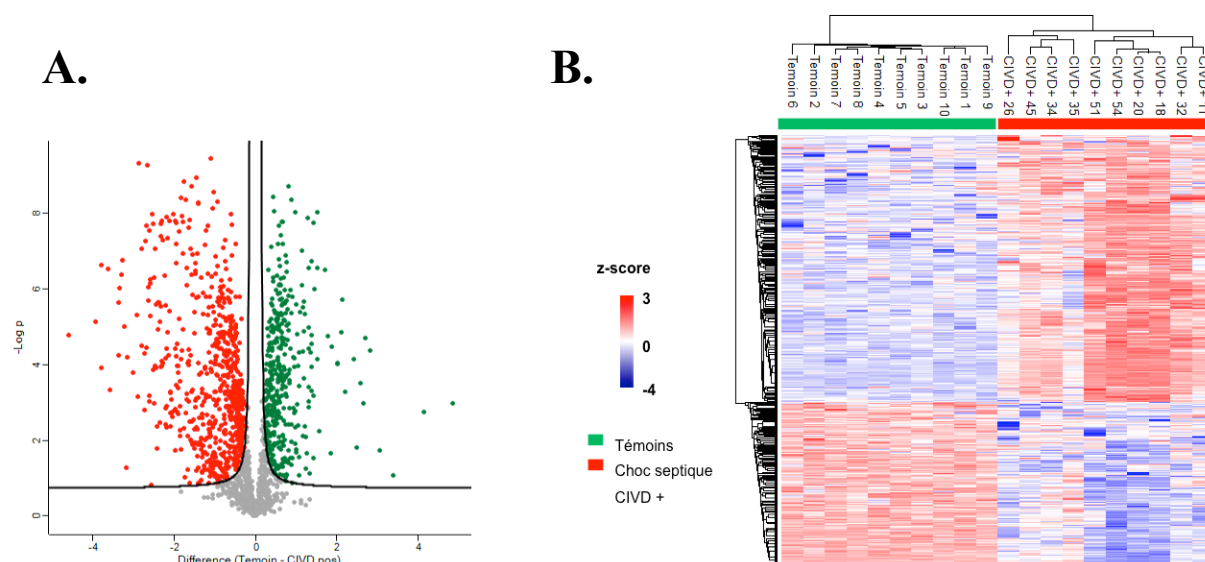


Figure 20 : Analyses bioinformatiques des protéines différentiellement exprimées chez les patients en choc septique avec CIVD par rapport aux témoins

A. *Volcano plot* **B.** *Clustering* supervisé réalisé sur basé sur 1067 protéines différentielles identifiées par l'analyse protéomique. Les protéines représentées en rouge étaient surexprimées et les protéines représentées en bleu étaient sous-exprimées. L'échelle de saturation des couleurs va d'un z-score de -4 en bleu à un z-score de +3 en rouge.

Enfin, nous avons comparé les profils d'expression des patients en choc septique avec CIVD par rapport aux patients en choc septique sans CIVD. Cent onze protéines étaient différentiellement exprimées entre les deux groupes (Figure 21). Parmi les protéines différentielles, 21 étaient sous-exprimées, et 90 surexprimées chez les patients en CIVD.

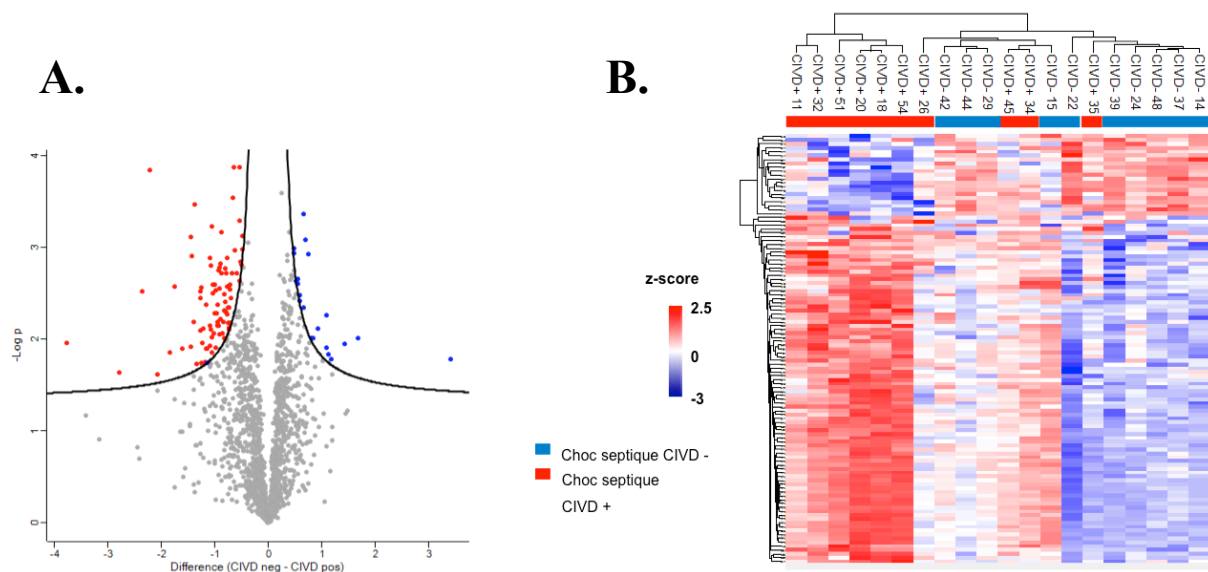


Figure 21: Analyses bioinformatiques des protéines différemment exprimées chez les patients en choc septique avec CVID par rapport aux patients en choc septique sans CVID.

A. *Volcano plot* **B.** *Clustering* supervisé réalisé sur basé sur 111 protéines différentielles identifiées par l'analyse protéomique. Les protéines représentées en rouge étaient surexprimées et les protéines représentées en bleu étaient sous-exprimées. L'échelle de saturation des couleurs va d'un z-score de -3 en bleu à un z-score de +2,5 en rouge.

L'objectif de la présente étude étant d'identifier les protéines du neutrophile exprimées de façon différentielle au cours de la CVID du choc septique, nous nous concentrons sur l'analyse des 111 protéines identifiées par cette dernière comparaison.

De façon surprenante, ce *clustering* supervisé identifie 3 groupes de patients : un premier groupe comprenant 6 patients en CVID, un deuxième, bien distinct, comprenant 7 patients dont 6 sans CVID, et un profil intermédiaire comprenant 3 patients en CVID et 4 sans CVID. Les 3 échantillons de patients en CVID qui présentent ce profil intermédiaire sont les mêmes que ceux qui étaient classés dans le groupe des non CVID lors de l'analyse non supervisée. Aucun critère clinique ou paraclinique recueilli n'est significativement différent entre ces 3 groupes. Les marqueurs de gravité (scores SOFA et IGSII, mortalité) ne sont notamment pas différents. La limite majeure de cette analyse est bien sûr l'effectif réduit de notre cohorte. On note cependant que les patients développant une CVID selon le score JAAM 2016 à J2 ne présentent par le profil majoritairement observé dans le groupe CVID. Ceci suggère que le profil d'expression protéique à l'admission en réanimation est insuffisant pour appréhender les mécanismes régulant la réponse du neutrophile dans l'immuno-thrombose, et qu'une

analyse de l'intensité et de la durée des modifications observées est indispensable. Ceci confirme les résultats de l'équipe de Cazalis qui a montré que les patients en choc septique les plus graves ne présentent pas une activation transcriptomique supérieure aux patients moins graves (Cazalis et al., 2014). C'est la régulation précoce des réponses inflammatoires et son intensité qui semblent donc un élément prédictif majeur dans l'évolution du choc septique. La cinétique des réponses génomique et protéomique reste néanmoins complexe à interpréter chez l'homme chez qui le début de l'infection est impossible à dater contrairement aux modèles animaux. L'analyse des profils protéiques à J3 et à J7 des patients de notre cohorte devrait apporter un premier éclairage la régulation de la réponse neutrophilique.

2.3. Comparaison des profils d'expression protéiques des patients en CIVD vs. sans CIVD

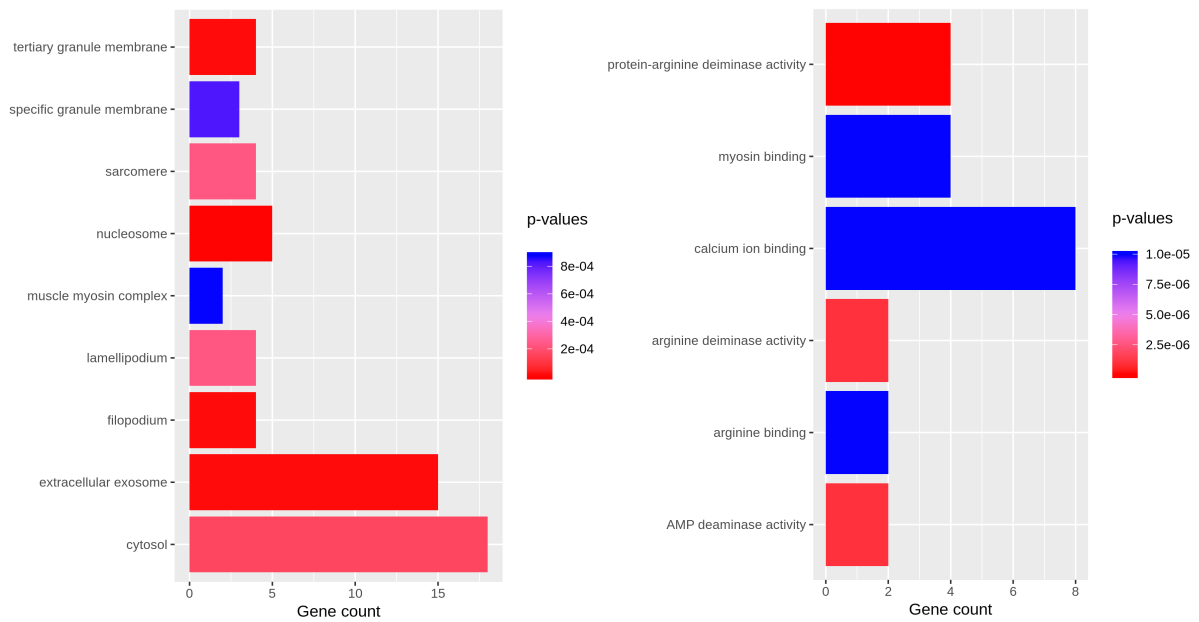
En raison du caractère confidentiel des résultats obtenus à ce jour, et de leur caractère préliminaire, et à la demande de mon encadrement, je ne divulguerai pas dans ce manuscrit les protéines identifiées.

2.3.1. Analyse des GO termes

Une analyse bio-informatique des protéines différentielles a été réalisée à partir de la base d'ontologie génique (GO) à l'aide du logiciel ProteoRE. Nous avons ainsi pu déterminer l'organelle intra-cellulaire de chacune des protéines différentiellement exprimées. Nous avons également analysé leur fonction moléculaire et les *processi* biologiques dans lesquels elles interviennent.

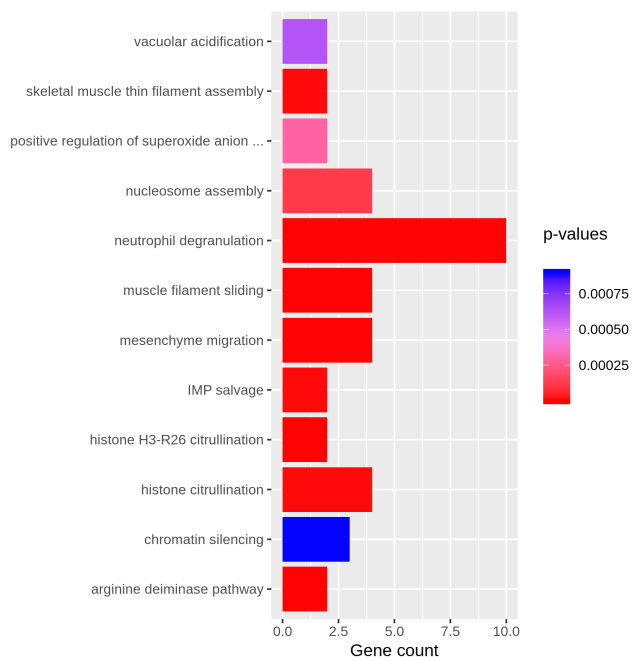
Protéines sous-exprimées au cours de la CIVD

Les protéines des PNNs sous-exprimées chez les patients en CIVD sont des protéines cytosolique, exosomiques et contenues dans les granules. Ce sont des protéines dont les 3 principales fonctions sont la liaison aux ions calciques, la modification post-transcriptionnelle des histones, et la liaison à la myosine. Ces fonctions participent à plusieurs *processi* biologiques du neutrophile, en premier lieu la dégranulation mais aussi les modifications des histones (Figure 22).



A.

B.



C.

Figure 22: Analyse en GO termes des protéines de neutrophile sous-exprimées au cours de la CIVD.

A. Composants cellulaires **B.** Fonctions moléculaires **C.** *Processi* biologiques

Protéines surexprimées au cours de la CIVD

Les protéines surexprimées au cours de la CIVD du choc septique sont essentiellement situées dans le cytosol et au niveau membranaire. Leurs principales fonctions sont la liaison à l'ARN et à l'ATP ainsi que la liaison aux cadhérines. Les protéines surexprimées au cours de la

CIVD sont ainsi principalement impliquées dans les *processi* d'assemblage du ribosome (6 protéines impliquées dans l'assemblage de la grande sous-unité, 6 de la petite), la traduction, le repliement protéique et la réponse au stress endoplasmique (16 protéines) (Figure 23).

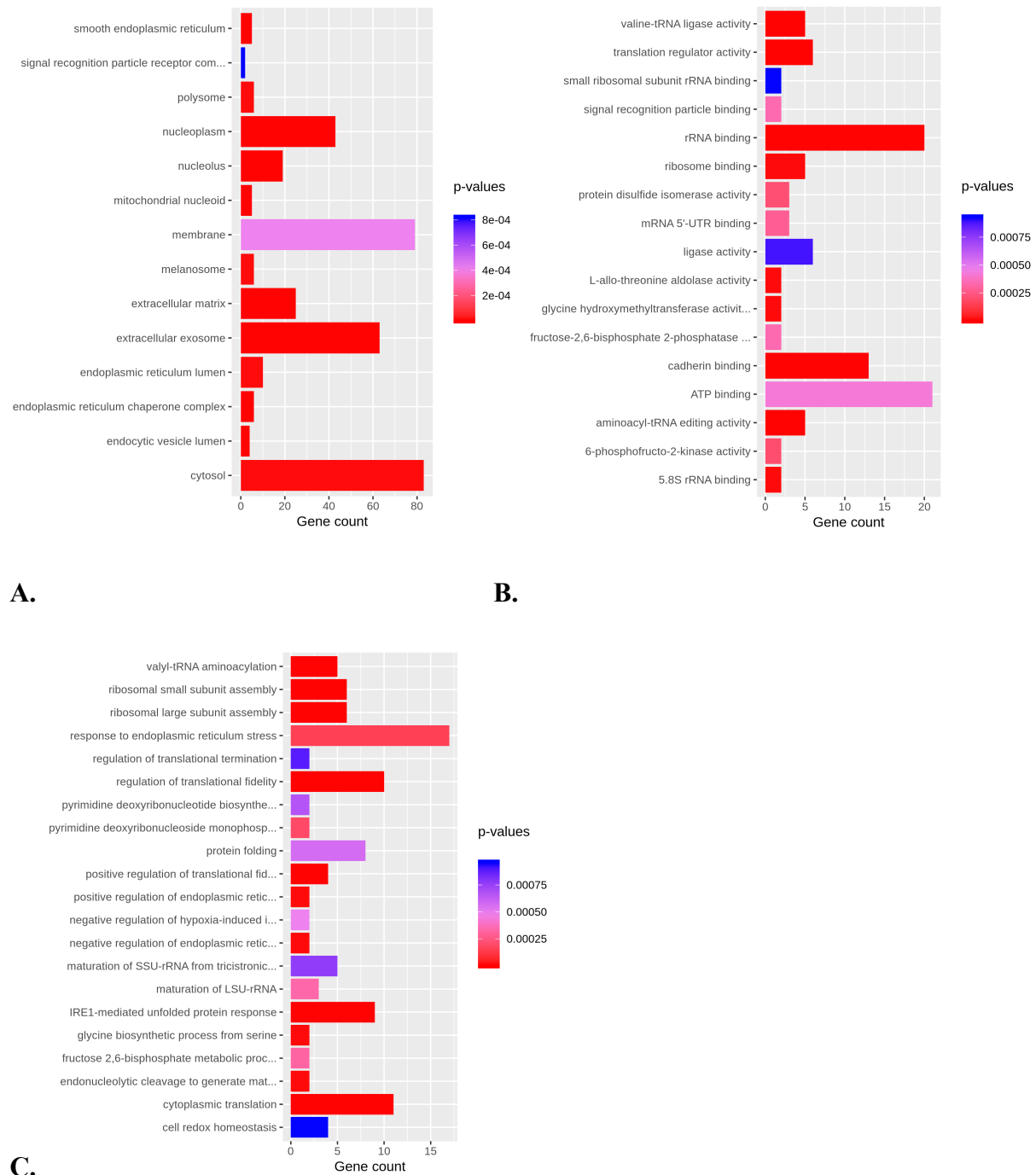


Figure 23: Analyse en GO termes des protéines de neutrophile surexprimées au cours de la CIVD.

A. Composants cellulaires **B.** Fonctions moléculaires **C.** *Processi* biologiques
 Cette analyse a été effectuée à l'aide du logiciel ProteoRE.

2.3.2. Analyse des réseaux protéiques

Ces protéines sont largement interconnectées en réseaux, identifiées à l'aide du logiciel STRING v11 (Szkarczyk et al., 2019) réunissant les informations de plusieurs bases de données.

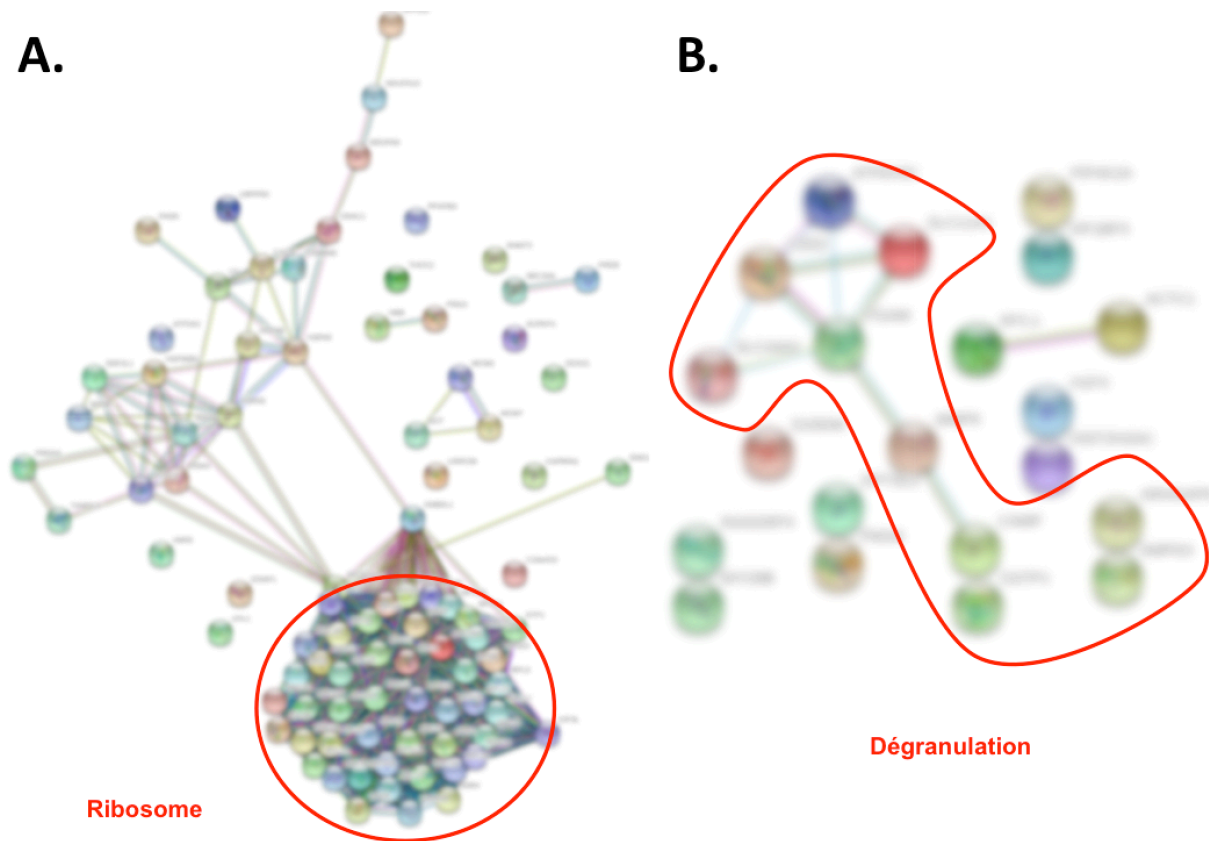


Figure 24: Représentation des réseaux d'association fonctionnelle des protéines différemment exprimées

A. Protéines surexprimées au cours de la CIVD du choc septique. **B.** Protéines sous-exprimées au cours de la CIVD du choc septique.

Analyse réalisée à l'aide du logiciel STRING.

Image volontairement floutée pour ne pas permettre l'identification des protéines

Protéines sous-exprimées dans la CIVD

Comme dans l'analyse en GO termes, les protéines de la dégranulation du neutrophile sont largement sous exprimées. Ainsi, 10 protéines impliquées dans la dégranulation du neutrophile sont sous-exprimées chez les patients présentant une CIVD. Un des mécanismes de dysfonction neutrophilique qui en résulte est une dérégulation du pH des compartiments intracellulaires. Ainsi, une diminution de l'acidité des PNNs au cours du choc septique est associée à une surmortalité (Chiswick et al., 2015).

Parmi les autres protéines sous-exprimées au cours de la CIVD, 5 protéines sont impliquées dans la motilité cellulaire, donc dans la migration sur le site de l'infection.

Protéines surexprimées dans la CIVD

Comme dans l'analyse en GO termes, les protéines du ribosome sont largement surexprimées chez les patients en CIVD. Ceci suggère que l'activation des neutrophiles au cours de la CIVD du choc est responsable d'une augmentation de la transcription, de la traduction, du repliement protéique, et de la dégradation protéique en lien avec le métabolisme cellulaire.

3. Conclusion

Cette étude propose une nouvelle approche dans l'étude de l'activation du PNN au cours du choc septique. Nous avons pu montrer que de nombreuses protéines du neutrophile sont exprimées de façon différentielle entre les patients développant ou non une CIVD au cours du choc septique. Le nombre de *processi* biologiques impliqués illustre la complexité de la réponse du neutrophile au cours de la CIVD. Identifier les mécanismes de la dysfonction du neutrophile au cours de la CIVD de façon formelle, notamment les voies de la NETose, par validation par une méthode orthogonale pourrait permettre d'envisager de nouvelles pistes thérapeutiques

L'étude de la cinétique de l'expression de ces différentes protéines à J3 (soit 48 heures après un traitement étiologique et symptomatique) et à J7 ou le jour de la sortie de réanimation (soit après résolution de l'état de choc) est essentielle pour déterminer l'impact pronostic réel des différentes modifications d'expression protéique dans l'évolution du choc septique.

Discussion

Le choc septique est caractérisé par une intense activation cellulaire du compartiment vasculaire notamment leucocytaire (Delabranche et al., 2016). Ainsi, les PNNs sont des acteurs précoces de la réponse immunitaire innée de l'hôte à l'infection (Borregaard, 2010) ; quand ils sont activés, ils participent à la clairance microbienne *via* les *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs) (Brinkmann et al., 2004) et forment aussi une vaste surface pro-coagulante, en activant la phase contact de la coagulation (Iba et al., 2014). Les PNNs sont aussi capables de modifier le profil membranaire des cellules vasculaires, notamment endothéliales, par la sécrétion de cytokines et de médiateurs pro-inflammatoires. Ils contribuent ainsi à la dysfonction cellulaire vasculaire du choc septique et à la coagulopathie (Brown et al., 2006; Fang et al., 2015).

Dans ce travail de thèse qui a porté sur l'analyse de l'activation des polynucléaires neutrophiles au cours du choc septique, nous avons montré que cette activation, mesurée par la fluorescence des PNNs et les MPs CD66b, pourrait représenter un marqueur diagnostique intéressant au cours de la CIVD. Nous avons ensuite mis en évidence de façon originale la NETose et avons cherché à identifier les mécanismes intracellulaires impliqués, afin d'envisager le PNN comme potentielle cible thérapeutique.

La CIVD est une affection fréquente qui concerne un tiers des patients en choc septique. Malgré le développement de scores diagnostiques, elle reste difficile à appréhender au lit du malade (Iba et al., 2016; Taylor et al., 2001). La CIVD du choc septique est caractérisée par une intense activation des cellules du compartiment vasculaire, plaquettes, cellules endothéliales et leucocytes (Fourrier, 2012). En tant que témoin du remodelage membranaire secondaire à cette activation et par leur spécificité (type cellulaire et réponse à un stress donné), les MPs apparaissent comme un outil intéressant dans la compréhension de la physiopathologie du choc septique et de la CIVD (Meziani et al., 2010, 2008).

Notre équipe a ainsi récemment objectivé que l'augmentation des MPs endothéliales CD105 et leucocytaires CD11a circulantes est associée à la CIVD du choc septique et reflète ainsi une activation cellulaire précoce et persistante (Delabranche et al., 2016, 2013). Dans la première partie de ce travail de thèse, nous mettons en évidence les MPs CD66b comme marqueur d'activation du neutrophile au cours de la CIVD du choc septique avec un *ratio* MPs CD66b/neutrophiles significativement augmenté comparé aux patients ne présentant pas de CIVD (Stiel et al., 2016).

Les MPs circulantes ont en effet été identifiées par le passé comme des effecteurs vasculaires intervenant dans les *processi* d'activation cellulaire vasculaire, qui fait suite à l'orage cytokinique de la phase initiale du choc septique (Hotchkiss et al., 2001; Soriano et al., 2005).

Les MPs participent aussi à la modulation de la réponse inflammatoire elle-même par l'induction d'une extravasation de lymphocytes T sur le site de l'infection (Qu and Dubyak, 2009). En véhiculant des protéines de l'inflammation, notamment celles constituant l'inflammasome, elles participent d'une part à la reconnaissance du pathogène et à son endiguement, mais aussi à la propagation inappropriée de l'état hyper-inflammatoire et des lésions tissulaires qui l'accompagnent (Wang et al., 2011). Les MPs leucocytaires impactent aussi la réactivité vasculaire par induction de la synthèse de iNOS (Mortaza et al., 2009; Tesse et al., 2005) à l'origine d'une surproduction d'ERO et de dérivés du NO responsables d'une diminution de la contraction vasculaire, donc d'une vasodilatation et d'une hypotension artérielle (Mortaza et al., 2009; Mostefai et al., 2008; Souza et al., 2015). Plus récemment, Prakash et *al.* ont montré que la majorité des MPs libérées sur le site de l'infection sont émises par les PNNs (Prakash et al., 2012). Elles participeraient à la dysfonction immunitaire du sepsis par l'activation de la phagocytose et la réduction de l'effet bystander (Prakash et al., 2012). Dans un travail expérimental chez la souris, Johnson et *al.* ont confirmé le rôle des MPs neutrophiliques dans la dysfonction immunitaire : ainsi, l'injection de MPs CD66b à des souris septiques diminue la migration des PNNs sur le site de l'infection ce qui entraîne une augmentation de la charge bactérienne à l'origine d'une surmortalité dans un modèle de choc septique par ligature-perforation caecale (Johnson et al., 2017). Les MPs pourraient également participer à la dysfonction circulatoire et à la défaillance multiviscérale du choc septique, notamment par l'amplification des réponses pro-inflammatoires et pro-coagulantes (Meziani et al., 2010; Mortaza et al., 2009). Les MPs pourraient ainsi permettre de mesurer la réponse immunitaire à l'infection et aider au diagnostic précoce et à la stratification des patients en choc septique évoluant vers une CIVD, mais aussi représenter une potentielle cible thérapeutique par l'intermédiaires des systèmes qui régulent leur libération (Zafrani et al., 2012). Dans notre étude, la mise en évidence d'une augmentation du *ratio* MPs CD66b/neutrophiles au cours de la CIVD du choc septique laisse supposer que les MPs neutrophiliques pourraient, comme chez l'animal, jouer un rôle dans la réponse inadaptée de l'hôte à l'infection à l'interaction entre immunité et coagulation.

Nous avons également identifié la fluorescence des PNNs comme marqueur de leur activation au cours du choc septique (Stiel et al., 2016). Le diagnostic précoce de choc septique est essentiel pour optimiser la prise en charge et réduire la morbi-mortalité (Kumar et al., 2006). Pour améliorer la prise en charge des patients en choc septique, la mise à disposition de nouveaux marqueurs diagnostiques et pronostiques pourrait être utile. Différents biomarqueurs, notamment des cytokines comme la C protéine réactive et la procalcitonine, mais aussi des marqueurs leucocytaires (numération leucocytaire ou neutrophilique) et des marqueurs d'hypoperfusion tissulaire tel le lactate sont utilisés pour orienter le clinicien. L'usage combiné de ces marqueurs a été proposé pour améliorer le diagnostic de gravité des patients septiques (Faix, 2013), mais leur utilisation se montre décevante (Karon et al., 2017).

Des données de la littérature suggèrent que différents paramètres leucocytaires pourraient être utilisés comme des marqueurs diagnostiques et pronostiques au cours des états septiques (Lavoignet et al., 2019). Ainsi, la présence de granulocytes immatures circulants, mise en évidence sur frottis sanguins, est associée à une surmortalité au cours du choc septique et le pourcentage de myélocytes et métamyélocytes circulant serait corrélé au temps jusqu'au décès (Danikas et al., 2008; Mare et al., 2015). Plus récemment, des paramètres extraits des automates d'hématologie (*cell population data*, CPD) utilisés en pratique clinique pour déterminer les numérations et formules sanguines ont également été proposés comme marqueurs de la réponse à l'infection. Ces paramètres correspondent à des données numériques (moyenne, dispersion...) caractérisant les propriétés des populations cellulaires : taille, granularité, volume... Les modifications de ces paramètres numériques traduisent les modifications morphologiques et fonctionnelles des différentes populations cellulaires en réponse à l'agression (Linssen et al., 2008). Les variations des CPD ont ainsi été proposées comme outil diagnostique et pronostique au cours des états septiques (Buoro et al., 2018; Mammen et al., 2018) : ainsi, un score comprenant différents paramètres notamment NEUT-SFL, le score ICIS (*intensive care infection score*) a été développé chez les patients de réanimation pour prédire la survenue d'un sepsis (Nierhaus et al., 2012; van der Geest et al., 2016). Une autre équipe a proposé un score associant des paramètres neutrophiliques et monocytaires, c'est-à-dire mesurant l'activation des premières cellules de l'immunité recrutées en réponse à l'infection, comme marqueur diagnostique de sepsis (Urrechaga et al., 2018). Pour notre part, nous proposons la fluorescence des PNNs comme un marqueur d'activation du neutrophile reflétant le degré de condensation de la chromatine. Nos résultats sont en accord avec les données obtenues par d'autres équipes, notamment celle de Park (Park

et al., 2015), montrant une association entre le sepsis et une fluorescence des neutrophiles mesurée en fluorocytométrie automatisée augmentée, avec un *cut-off* du même ordre que celui que nous avons établi (>51,6 UA). Buoro et al. ont confirmé ce résultat et montré une corrélation entre l'intensité de la fluorescence des neutrophiles et la gravité du tableau clinique mesurée par le score SOFA (Buoro et al., 2018), rejoignant nos résultats concernant l'association de ce marqueur à la CIVD du choc septique. Ainsi, la fluorescence des neutrophiles apparaît comme un potentiel biomarqueur diagnostique de CIVD au cours du choc septique sur deux études distinctes utilisant des fluorochromes et des cytomètres différents.

Chez les patients en choc septique, le diagnostic de CIVD reste difficile à appréhender au lit du malade et est souvent retardé. Notre travail propose NEUT-SFL comme un nouveau biomarqueur de CIVD au cours du choc septique. NEUT-SFL pourrait constituer un marqueur de sévérité et permettra d'identifier précocement les patients en choc septique les plus à risque d'évolution défavorable sans nécessiter le calcul d'un score. NEUT-SFL est reproductible et accessible immédiatement en routine lors de la réalisation d'une formule sanguine sur cytomètre en flux. Il ne demande pas de prélèvement ou d'examen supplémentaire, n'engendre donc pas de surcoût et est indépendant de l'opérateur. La fluorescence des neutrophiles apparaît ainsi comme un biomarqueur diagnostique prometteur et facile d'accès.

Comme l'augmentation de la fluorescence des neutrophiles est en lien avec une décondensation chromatinienne, nous avons formulé l'hypothèse que ce paramètre pourrait traduire le phénomène de NETose. Cette hypothèse s'appuie également sur de précédents résultats de notre équipe : ainsi, nous avons montré que le *ratio* P-sélectine soluble (sCD62P)/numération plaquettaire est augmenté au cours de la CIVD (Delabranche et al., 2016). La P-sélectine est impliquée dans les interactions entre les leucocytes et les plaquettes ; son rôle a récemment été mis en évidence au cours de la NETose dans un modèle murin de sepsis (Etulain et al., 2015; Jenne and Kubes, 2015). Ainsi, les polynucléaires neutrophiles de souris surexprimant la P-selectine produisent davantage de NETs après stimulation in-vitro par du PMA ou de la ionomycine. Il a également été montré que des PNNs humains d'individus sains mis en présence de plaquettes activées produisent des NETs en quantité significative (Caudrillier et al., 2012), alors que les PNNs isolés dans les mêmes conditions sont incapables d'en libérer en présence de plaquettes inactives.

Eu égard à ces éléments, nous avons cherché à mettre en évidence le phénomène de NETose au cours de la CIVD. Dans une première étude, nous avons mis en évidence des NETs dans le sang de malades en choc septique avec CIVD à l'aide de marqueurs sériques indirects, les complexes ADN-MPO et les nucléosomes (Delabranche et al., 2017b). Cette méthode de détection indirecte des NETs a été utilisée dans plusieurs publications pour mettre en évidence les NETs au cours de différents phénomènes pathologiques, notamment thrombotiques et auto-immuns (Abrams et al., 2013; Kessenbrock et al., 2009). Si le dosage des nucléosomes n'est pas spécifique de la NETose, puisque des taux d'ADN libre, d'histones ou de nucléosomes circulants élevés sont non seulement associés à la NETose mais aussi à d'autres formes de mort cellulaire telles l'apoptose ou la nécrose (Masuda et al., 2016), la méthode de dosage des complexes ADN-MPO modifiée que nous avons choisie, décrite par Kessenbrock et al. (Kessenbrock et al., 2009) constitue un véritable outil de détection des NETs ; les NETs sont capturés par l'Ac anti-MPO, la MPO étant spécifique du type cellulaire « polynucléaire neutrophile », et la détection se fait par un Ac anti-ADN. Ainsi, seuls les filets extracellulaires émis par les PNNs sont détectés (Caudrillier et al., 2012; Kessenbrock et al., 2009). Les nucléosomes sont un moyen de confirmer le résultat ainsi obtenu. Néanmoins, la détection indirecte de ces marqueurs par une technique ELISA souffre de plusieurs inconvénients majeurs : ils ne sont d'abord pas accessibles en routine et difficilement adaptables à une utilisation clinique (Alhamdi and Toh, 2017). Ensuite, les taux mesurés d'une étude à l'autre diffèrent, illustrant les limites méthodologiques des techniques proposées (Ekaney et al., 2014; Gao et al., 2016). Au delà de l'aspect technique, ces discordances illustrent l'instabilité des concentrations circulantes des composants des NETs liée à leur dégradation par différentes enzymes (Abrams et al., 2013; Fuchs et al., 2010; von Köckritz-Blickwede et al., 2009). Malgré la relevance clinique que semblent démontrer les marqueurs indirects de NETose chez les malades de réanimation (McIlroy et al., 2014; Thomas et al., 2012), les limites méthodologiques expliquent peut-être les résultats de l'équipe de Maruchi qui ne confirme pas l'association entre CIVD et NETs au cours du choc septique (Maruchi et al., 2018). En plus de la méthode de détection des NETs, les résultats contradictoires entre cette étude et la nôtre s'expliquent potentiellement par les différences dans la population d'étude et les traitements anticoagulants utilisés dans le cadre de la CIVD. Par ailleurs, l'impossibilité de connaître le moment de l'infection par le pathogène chez l'homme et donc le délai entre l'infection et le diagnostic de choc septique est également une donnée impossible à maîtriser.

La quantification des NETs circulants par marquage des histones H3 citrullinées et de la MPO en cytométrie en flux a également été proposée comme outil de détection des NETs (Gavillet et al., 2015; Lee et al., 2018). Si cette méthode est plus spécifique que le dosage des biomarqueurs sériques, le fenêtrage en taille/structure reste complexe et opérateur dépendant (Manda-Handzlik et al., 2016). Ensuite, comme la cytométrie en flux détecte les cellules dont la membrane cytoplasmique est intacte, elle détecte les PNNs NETosant à un stade précoce alors que les marqueurs sériques quantifient les NETs après relargage (Alhamdi and Toh, 2017; Lee et al., 2018). Par ailleurs, la présence d'histones citrullinées est dépendante de l'activation de PAD4, qui ne serait impliquée que dans certains mécanismes de NETose. Plus de 25 inducteurs de NETose ont en effet été décrits à ce jour ce qui suggère qu'il pourrait exister des NEToses plutôt qu'une NETose (Hoppenbrouwers et al., 2017). Pour d'autres, les biais méthodologiques dans la détection des NETs peuvent laisser penser que la NETose ne serait qu'un phénomène induit *in-vitro*, et que seule une détection multimodale ou une visualisation directe pourrait permettre de confirmer la significativité biologique de ce phénomène *in vivo* (Yipp and Kubes, 2013).

Eu égard à ces éléments, nous avons cherché à confirmer la place des NETs par leur visualisation directe. Dans la suite de ce travail de thèse, nous avons ainsi pu visualiser les NETs circulants dans le sang de patients en choc septique avec CIVD en immunofluorescence. A ce jour, peu d'équipes ont pu visualiser des NETs circulants chez l'humain ou l'animal ; l'équipe d'Hirose a visualisé directement les NETs en microscopie par fluorescence sur des frottis sanguins de patients de réanimation mais n'a pu les corrélés à la gravité du tableau clinique (Hirose et al., 2014). En 2014, dans un modèle de sepsis murin, l'équipe de Tanaka a caractérisé deux formes de NETs *in vivo*: des NETs « ancrés » qui interagissent avec les plaquettes et l'endothélium, et des NETs libres circulants (Tanaka et al., 2014). Dans notre étude, l'existence de NETs au cours du choc septique est associée au diagnostic de CIVD. À l'instar d'autres équipes, nous avons montré que les mêmes images sont observées dans un modèle d'induction de NETose *in-vitro* par la ionomycine (Hoppenbrouwers et al., 2017). En plus de la visualisation des NETs en immunofluorescence, nous mettons en évidence des modifications morphologiques des PNN sur des cytopins colorés en MGG. Ces modifications sont facilement identifiables à l'aide de cette coloration utilisée en routine dans les laboratoires d'hématologie cellulaire et leur identification est reproductible d'un observateur à l'autre. Cette observation nécessitera des explorations

complémentaires pour comprendre quels mécanismes d'activation du neutrophile peuvent expliquer ces modifications.

L'association des NETs circulant au cours de la CIVD illustre le possible rôle des NETs dans la dérégulation pathologique de l'immuno-thrombose du choc septique. En effet, les NETs forment une vaste surface anionique à l'origine d'une activation de la cascade de la coagulation qui peut devenir excessive notamment dans la microcirculation (Stiel et al., 2017). Les composants des NETs sont eux-mêmes de puissants activateurs de la coagulation : l'ADN active la voie contact de la coagulation par sa charge négative, les enzymes du PNN clivent les facteurs anticoagulants (Massberg et al., 2010), les histones et l'ADN participent à l'activation plaquettaire (von Brühl et al., 2012). Cependant, si tous ces éléments permettent l'endiguement des pathogènes, ils participent également aux lésions tissulaires observées au cours de la CIVD : les histones participent ainsi à la dysfonction endothéliale (Saffarzadeh et al., 2012) et une augmentation des histones circulantes a été rapportée au cours du choc septique mais aussi du polytraumatisme (Abrams et al., 2013). La présence de NETs circulants chez les patients en choc septique ayant développé une CIVD et non chez les patients sans CIVD illustre le rôle potentiellement central que pourraient avoir les NETs dans la maladie inflammatoire vasculaire diffuse qui caractérise la CIVD du choc septique, comme dans les atteintes vasculaires auto-immunes systémiques (Kessenbrock et al., 2009). Les mécanismes par lesquels les NETs participent à la défaillance multiviscérale au cours de la CIVD ont récemment fait l'objet d'une revue de la littérature qui les place au coeur de la physiopathologie de la CIVD (Alhamdi and Toh, 2017; Stiel et al., 2017). La NETose pourrait ainsi représenter un moyen de défense locale, peut-être sous la forme de NETs « ancrés » tels que décrits chez l'animal, qui peut devenir délétère quand le phénomène devient diffus et incontrôlé (Tanaka et al., 2014). L'apparition des NETs circulant au cours du choc septique pourrait refléter l'atteinte microcirculatoire et l'évolution vers la CIVD. Cette hypothèse tend à confirmer l'importance d'une introduction précoce d'un traitement anticoagulant chez les patients présentant une activation pathologique de la coagulation au cours du choc septique (Yamakawa et al., 2019). Néanmoins, les mécanismes à l'origine de la dérégulation des phénomènes de NETose et les voies par lesquelles les NETs interagissent avec les autres cellules du compartiment vasculaire restent inconnues et illustrent la limite des modèles d'induction de NETose in-vitro.

Plus récemment, Abrams et al. ont proposé une approche complémentaire en proposant un test visant à mesurer la capacité du plasma de patients de réanimation à générer des NETs

après incubation avec des PNNs de donneurs sains (Abrams et al., 2019). Dans cette étude, la capacité à générer des NETs était associée à l'apparition d'une CIVD et à la mortalité (Abrams et al., 2019). Ces résultats confortent les résultats de Yang et *al.* qui a montré que le plasma de malades en choc septique peut induire la formation de NETs in-vitro (Yang et al., 2016). Néanmoins, ce test ne reflète pas les interactions entre les différentes cellules vasculaires et donc les mécanismes de génération des NETs *in vivo*, et ne traduit notamment pas le rôle des plaquettes pourtant bien établi dans la génération de NETs (Clark et al., 2007; Massberg et al., 2010; Sreeramkumar et al., 2014)

Tous ces éléments placent le neutrophile comme une cible thérapeutique potentielle pour le traitement de la CIVD du choc septique. Les histones ou les NETs apparaissent comme des candidats intéressants. Néanmoins, les molécules neutralisant ces éléments, respectivement les Ac anti-histones (Abrams et al., 2013) ou l'héparine (Wildhagen et al., 2014) et l'antithrombine (Duburcq et al., 2018) d'une part, et les DNAses (Brinkmann et al., 2004) ou les thérapies anti-PAD 4 (Kolaczowska et al., 2015) de l'autre, possèdent toutes des propriétés anticoagulantes rendant leur utilisation délicate chez des patients en CIVD. Une meilleure compréhension des mécanismes intracellulaires mis en jeu est ainsi une condition *sine qua none* pour optimiser le ciblage thérapeutique expérimental.

Ainsi, dans la dernière partie de ce travail de thèse, nous avons cherché à identifier les protéines impliquées dans la genèse de l'activation du PNN au cours de la CIVD du choc septique, pouvant constituer de potentielles cibles pharmacologiques. Cette étude a permis de valider une méthode d'isolement des neutrophiles permettant une extraction reproductible des protéines sans contamination par les protéines plasmatiques. Nous avons pu montrer qu'il existe des profils d'expression protéique différents entre les patients en choc septique développant une CIVD et ceux qui n'en développent pas. Les protéines différentielles sont impliquées dans de nombreux *processi* biologiques et illustrent la complexité de la réponse neutrophilique à l'infection. Différentes protéines identifiées comme potentiels médiateurs de NETose ont pu être identifiées à la fois dans le groupe des molécules réprimées et surexprimées. Ainsi, la libération de NETs au cours de la CIVD du choc septique dans notre cohorte n'est pas dépendante de PAD4. En effet, cette protéine est sous-exprimée chez les malades en CIVD. Ce résultat confirme ceux d'autres équipes ayant montré que la citrullination des histones n'est pas indispensable à la formation de NETs en réponse à l'infection chez la souris (Claushuis et al., 2018). L'étude de McDonald et *al.* avait quant à elle montré l'absence d'association entre les taux d'histones circulants, la production de NETs

et les interactions NETs – plaquettes, suggérant ainsi que la coagulopathie septique serait médiée par un mécanisme indépendant de PAD4 (McDonald et al., 2017). En effet, plusieurs protéines associées à différents *processi* biologiques faisant intervenir la voie des MAP-K sont surexprimées au cours de la CIVD du choc septique.

L'étude cinétique du profil protéique des PNNs au cours de la CIVD du choc septique en cours est indispensable à cette première analyse pour mieux comprendre la régulation de la NETose et ses mécanismes, la succession de plusieurs mécanismes de relargage de NETs ne pouvant être exclue.

L'étude des protéines exprimées de façon différentielle entre les deux groupes de patients ouvre de potentielles perspectives dans le traitement de la CIVD. Le diagnostic précoce de la coagulopathie, possiblement à l'aide du score SIC récemment proposé, reste une condition *sine qua non* pour envisager une stratification et donc un traitement plus précoce (Iba et al., 2019a).

Conclusion et perspectives

Le choc septique est caractérisé par une réponse inadaptée de l'hôte à l'invasion par un pathogène. Cette réponse est à l'origine d'une intense activation cellulaire vasculaire impliquant notamment les polynucléaires neutrophiles. Au cours du choc septique, les PNNs perdent ainsi une partie de leurs fonctions antimicrobiennes directes, depuis leur production médullaire jusqu'à l'élimination du pathogène, et acquièrent une action immunosuppressive par rapport aux autres cellules immunitaires notamment les lymphocytes. Les neutrophiles participent aussi à la génération d'un état d'intense activation de la coagulation pouvant évoluer vers la CIVD. Il existe donc une ambivalence fonctionnelle des neutrophiles au cours des épisodes septiques graves: leur rôle dans la défense de l'hôte est incontournable et indispensable à la survie, mais leur activation peut devenir délétère pour l'hôte. L'émission des NETs favorise ainsi l'endiguement et la destruction du pathogène par l'association de phénomènes immunitaires et thrombotiques. Cette activation peut échapper aux systèmes régulateurs avec une activation incontrôlée des mécanismes immunitaires et d'hémostase qui s'entraînent mutuellement. Les PNNs sont ainsi au cœur du concept d'immuno-thrombose et semblent être des acteurs incontournables dans la physiopathologie de la CIVD comme manifestation de la dysfonction vasculaire du choc septique. Mieux comprendre les mécanismes de la dysfonction des neutrophiles et de leurs interactions avec les autres cellules vasculaires au cours de la CIVD et du choc septique pourrait ainsi ouvrir de nouvelles pistes diagnostiques et thérapeutiques.

Dans ce contexte, nos travaux ont permis de déterminer l'intérêt de la fluorescence des neutrophiles (NEUT-SFL) et des MPs CD66b comme marqueurs de la dysfonction des PNNs au cours du choc septique et de la CIVD. La fluorescence a aussi été identifiée comme un biomarqueur diagnostique précoce de la CIVD du choc septique chez l'homme. Ce paramètre apparaît comme un outil d'exploration des mécanismes physiopathologiques de l'activation du PNN au cours du choc septique.

Comme la fluorescence augmente avec la décondensation chromatinienne, nous avons formulé l'hypothèse qu'elle pourrait notamment refléter le phénomène de NETose. Dans une étude prospective, nous avons mis en évidence la NETose mesurée par les complexes ADN-MPO au cours de la CIVD du choc septique. La NETose pourrait ainsi participer à l'augmentation de fluorescence des PNNs. Nous avons confirmé ce résultat et visualisé pour la première fois des NETs circulant dans le sang de patients en choc septique.

Ce travail place les NETs et leurs composants comme potentielles cibles thérapeutiques. Néanmoins, l'activation des PNNs mesurée par la fluorescence des neutrophiles traduit le degré de condensation de la chromatine, ADN et ARN, et ne se limite donc pas au seul phénomène de NETose. Afin d'identifier les mécanismes moléculaires de l'activation des PNNs et de la NETose, nous avons développé une étude transcriptomique et protéomique des PNNs au cours du choc septique. L'étude protéomique des neutrophiles à la phase précoce du choc septique (J1) a permis d'identifier de potentielles cibles pharmacologiques.

Les perspectives de ce travail sont nombreuses. Tout d'abord, nous compléterons l'analyse des résultats par une étude cinétique des profils d'expression protéique (J3 et J7) et la corrélons à l'évolution clinique des patients. Nous définirons ensuite quelques protéines d'intérêt, notamment les protéines impliquées dans le phénomène de NETose et validerons nos résultats par quantification de ces molécules à l'aide d'une méthode orthogonale (test ELISA, Western Blot ...) sur une nouvelle prospective. Cette étude s'accompagnera également d'une analyse transcriptomique des PNNs. L'analyse conjointe des profils génomique et protéomique propose une approche innovante et globale de la réponse de l'hôte à l'infection et des mécanismes qui la régule. Cette approche pourrait permettre d'identifier une « signature génomique » spécifique aux patients les plus graves. Nous espérons que notre étude permettra d'identifier des protéines ou des gènes clef dans la régulation de la réponse inflammatoire du neutrophile à l'infection, pouvant représenter de potentielles cibles thérapeutiques. Par ailleurs, cette étude pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes de la NETose au cours de l'évolution des épisodes septiques, et faciliter le développement de méthodes de détection adaptées.

Au total, ce travail propose une approche physiopathologique de l'activation du neutrophile qui le place comme élément incontournable de la dérégulation de l'immuno-thrombose. L'ambivalence de l'activation des PNNs, tantôt bénéfique, tantôt délétère, nous laisse penser que seule une stratification précoce des malades par l'évaluation de leur réponse cellulaire vasculaire pourrait permettre une amélioration et une personnalisation de la prise en charge des patients en choc septique. L'échec des essais randomisés évaluant différents traitements anticoagulants dans le choc septique *versus placebo* chez l'homme illustre cette nécessité ; l'administration des différents traitements indépendamment de la réponse individuelle n'a en effet pas permis d'améliorer le pronostic des malades, voire l'a aggravé.

À l'heure actuelle, le diagnostic de CIVD au cours des épisodes septiques graves reste trop tardif. Une approche multifactorielle a été proposée par l'utilisation de scores diagnostiques de CIVD (JAAM 2016, ISTH *overt*). Nous pensons qu'une utilisation plus large de ces scores, mais aussi le développement de scores se voulant plus précoces tel le SIC, pourrait guider le clinicien. Néanmoins, une évaluation rapide et conjointe de l'activation immunitaire *via* le PNN et de la coagulation pourrait compléter cette approche. C'est ce que nous proposons avec l'utilisation de la fluorescence des neutrophiles comme marqueur de la CIVD du choc septique chez l'homme. Nous envisageons également de valider ce paramètre dans le cadre d'une étude multicentrique au cours des états de choc septique et dans d'autres états d'agression responsables d'une activation pathologique de la coagulation, notamment chez les patients cirrhotiques.

Enfin, notre équipe maîtrise un modèle animal de choc septique qui pourrait permettre, à plus long terme, de tester des molécules ciblant les protéines du neutrophile que nous avons identifiées comme potentielles cibles thérapeutiques.

Bibliographie

Abadie, V., Badell, E., Douillard, P., Ensergueix, D., Leenen, P.J.M., Tanguy, M., Fiette, L., Saeland, S., Gicquel, B., Winter, N., 2005. Neutrophils rapidly migrate via lymphatics after *Mycobacterium bovis* BCG intradermal vaccination and shuttle live bacilli to the draining lymph nodes. *Blood* 106, 1843–1850. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-03-1281>

Abrams, S.T., Morton, B., Alhamdi, Y., Alsabani, M., Lane, S., Welters, I.D., Wang, G., Toh, C.-H., 2019. A Novel Assay for Neutrophil Extracellular Traps (NETs) Formation Independently Predicts Disseminated Intravascular Coagulation and Mortality in Critically Ill Patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* <https://doi.org/10.1164/rccm.201811-2111OC>

Abrams, S.T., Zhang, N., Manson, J., Liu, T., Dart, C., Baluwa, F., Wang, S.S., Brohi, K., Kipar, A., Yu, W., Wang, G., Toh, C.-H., 2013. Circulating histones are mediators of trauma-associated lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 187, 160–169. <https://doi.org/10.1164/rccm.201206-1037OC>

Adib-Conquy, M., Cavaillon, J.-M., 2009. Compensatory anti-inflammatory response syndrome. *Thromb. Haemost.* 101, 36–47.

Aird, W.C., 2007. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ. Res.* 100, 158–173. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000255691.76142.4a>

Aird, W.C., 2003. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood* 101, 3765–3777. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-06-1887>

Alhamdi, Y., Toh, C.-H., 2017. Recent advances in pathophysiology of disseminated intravascular coagulation: the role of circulating histones and neutrophil extracellular traps. *F1000Research* 6, 2143. <https://doi.org/10.12688/f1000research.12498.1>

Alves-Filho, J.C., de Freitas, A., Spiller, F., Souto, F.O., Cunha, F.Q., 2008. The role of neutrophils in severe sepsis. *Shock Augusta Ga* 30 Suppl 1, 3–9. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e3181818466>

Ammollo, C.T., Semeraro, F., Xu, J., Esmon, N.L., Esmon, C.T., 2011. Extracellular histones increase plasma thrombin generation by impairing thrombomodulin-dependent protein C activation. *J. Thromb. Haemost. JTH* 9, 1795–1803. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04422.x>

Angus, D.C., van der Poll, T., 2013. Severe sepsis and septic shock. *N. Engl. J. Med.* 369, 2063. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1312359>

Annane, D., Bellissant, E., Cavaillon, J.-M., 2005. Septic shock. *Lancet Lond. Engl.* 365, 63–78. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17667-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17667-8)

Ashtekar, A.R., Saha, B., 2003. Poly's plea: membership to the club of APCs. *Trends Immunol.* 24, 485–490.

Astiz, M.E., DeGent, G.E., Lin, R.Y., Rackow, E.C., 1995. Microvascular function and rheologic changes in hyperdynamic sepsis. *Crit. Care Med.* 23, 265–271.

Aziz, M., Jacob, A., Yang, W.-L., Matsuda, A., Wang, P., 2013. Current trends in inflammatory and immunomodulatory mediators in sepsis. *J. Leukoc. Biol.* 93, 329–342. <https://doi.org/10.1189/jlb.0912437>

Babior, B.M., 1999. NADPH oxidase: an update. *Blood* 93, 1464–1476.

Baj-Krzyworzeka, M., Majka, M., Pratico, D., Ratajczak, J., Vilaire, G., Kijowski, J., Reca, R., Janowska-Wieczorek, A., Ratajczak, M.Z., 2002. Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. *Exp. Hematol.* 30, 450–459.

Balázs, M., Martin, F., Zhou, T., Kearney, J., 2002. Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. *Immunity* 17, 341–352.

Barbato, J.E., Tzeng, E., 2004. Nitric oxide and arterial disease. *J. Vasc. Surg.* 40, 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2004.03.043>

Barranco-Medina, S., Pozzi, N., Vogt, A.D., Di Cera, E., 2013. Histone H4 promotes prothrombin autoactivation. *J. Biol. Chem.* 288, 35749–35757. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.509786>

Beauvillain, C., Delneste, Y., Scotet, M., Peres, A., Gascan, H., Guermonprez, P., Barnaba, V., Jeannin, P., 2007. Neutrophils efficiently cross-prime naive T cells in vivo. *Blood* 110, 2965–2973. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-12-063826>

Bedard, K., Krause, K.-H., 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 87, 245–313. <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2005>

Bennouna, S., Bliss, S.K., Curiel, T.J., Denkers, E.Y., 2003. Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 171, 6052–6058.

Bennouna, S., Denkers, E.Y., 2005. Microbial antigen triggers rapid mobilization of TNF-alpha to the surface of mouse neutrophils transforming them into inducers of high-level dendritic cell TNF-alpha production. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 174, 4845–4851.

Beqja-Lika, A., Bulo-Kasneçi, A., Refatllari, E., Heta-Alliu, N., Rucaj-Barbullushi, A., Mone, I., Mitre, A., 2013. Serum Procalcitonine Levels as an Early Diagnostic Indicator of Sepsis. *Mater. Socio-Medica* 25, 23–25. <https://doi.org/10.5455/msm.2013.25.23-25>

Bergmann, S., Hammerschmidt, S., 2007. Fibrinolysis and host response in bacterial infections. *Thromb. Haemost.* 98, 512–520.

Bjerknes, R., Vindenes, H., Pitkänen, J., Ninnemann, J., Laerum, O.D., Abyholm, F., 1989. Altered polymorphonuclear neutrophilic granulocyte functions in patients with large burns. *J. Trauma* 29, 847–855.

Boisramé-Helms, J., Kremer, H., Schini-Kerth, V., Meziani, F., 2013. Endothelial dysfunction in sepsis. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 11, 150–160.

Bone, R.C., 1996. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit. Care Med.* 24, 1125–1128.

Bone, R.C., Balk, R.A., Cerra, F.B., Dellinger, R.P., Fein, A.M., Knaus, W.A., Schein, R.M., Sibbald, W.J., 1992. 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.

Bonneville, M., O’Brien, R.L., Born, W.K., 2010. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 467–478. <https://doi.org/10.1038/nri2781>

Borgel, D., Vieillard-Baron, A., 2011. [Activated protein C, a protein at the crossroads between coagulation and inflammation]. *Med. Sci. MS* 27, 501–507. <https://doi.org/10.1051/medsci/2011275015>

Borregaard, N., 2010. Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity* 33, 657–670. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.11.011>

Borregaard, N., Cowland, J.B., 1997. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 89, 3503–3521.

Bosmann, M., Ward, P.A., 2013. The inflammatory response in sepsis. *Trends Immunol.* 34, 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.09.004>

Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y., Zychlinsky, A., 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303, 1532–1535. <https://doi.org/10.1126/science.1092385>

Brinkmann, V., Zychlinsky, A., 2012. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J. Cell Biol.* 198, 773–783. <https://doi.org/10.1083/jcb.201203170>

Bronkhorst, A.J., Aucamp, J., Pretorius, P.J., 2015. Cell-free DNA: Preanalytical variables. *Clin. Chim. Acta* 450, 243–253. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.08.028>

Brown, K.A., Brain, S.D., Pearson, J.D., Edgeworth, J.D., Lewis, S.M., Treacher, D.F., 2006. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet Lond. Engl.* 368, 157–169. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69005-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69005-3)

Buoro, S., Manenti, B., Seghezzi, M., Dominoni, P., Barbui, T., Ghirardi, A., Carobbio, A., Marchesi, G., Riva, I., Nasi, A., Ottomano, C., Lippi, G., 2018. Innovative haematological parameters for early diagnosis of sepsis in adult patients admitted in intensive care unit. *J. Clin. Pathol.* 71, 330–335. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2017-204643>

Burroughs, N.J., Miguel Paz Mendes de Oliveira, B., Adrego Pinto, A., 2006. Regulatory T cell adjustment of quorum growth thresholds and the control of local immune responses. *J. Theor. Biol.* 241, 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2005.11.010>

Casserly, B., Phillips, G.S., Schorr, C., Dellinger, R.P., Townsend, S.R., Osborn, T.M., Reinhart, K., Selvakumar, N., Levy, M.M., 2015. Lactate measurements in sepsis-induced tissue hypoperfusion: results from the Surviving Sepsis Campaign database. *Crit. Care Med.* 43, 567–573. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000000742>

Caudrillier, A., Kessenbrock, K., Gilliss, B.M., Nguyen, J.X., Marques, M.B., Monestier, M., Toy, P., Werb, Z., Looney, M.R., 2012. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *J. Clin. Invest.* 122, 2661–2671. <https://doi.org/10.1172/JCI61303>

Cauwels, A., 2007. Nitric oxide in shock. *Kidney Int.* 72, 557–565. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002340>

Cazalis, M.-A., Lepape, A., Venet, F., Frager, F., Mouglin, B., Vallin, H., Paye, M., Pachot, A., Monneret, G., 2014. Early and dynamic changes in gene expression in septic shock patients: a genome-wide approach. *Intensive Care Med. Exp.* 2, 20. <https://doi.org/10.1186/s40635-014-0020-3>

Cech, P., Lehrer, R.I., 1984. Phagolysosomal pH of human neutrophils. *Blood* 63, 88–95.

Chironi, G.N., Boulanger, C.M., Simon, A., Dignat-George, F., Freyssinet, J.-M., Tedgui, A., 2009. Endothelial microparticles in diseases. *Cell Tissue Res.* 335, 143–151. <https://doi.org/10.1007/s00441-008-0710-9>

Chishti, A.D., Shenton, B.K., Kirby, J.A., Baudouin, S.V., 2004. Neutrophil chemotaxis and receptor expression in clinical septic shock. *Intensive Care Med.* 30, 605–611. <https://doi.org/10.1007/s00134-004-2175-y>

Chiswick, E.L., Mella, J.R., Bernardo, J., Remick, D.G., 2015. Acute-Phase Deaths from Murine Polymicrobial Sepsis Are Characterized by Innate Immune Suppression Rather Than Exhaustion. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 195, 3793–3802. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500874>

Choi, S.H., Smith, S.A., Morrissey, J.H., 2011. Polyphosphate is a cofactor for the activation of factor XI by thrombin. *Blood* 118, 6963–6970. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-368811>

Chu, T., Tyznik, A.J., Roepke, S., Berkley, A.M., Woodward-Davis, A., Pattacini, L., Bevan, M.J., Zehn, D., Prlic, M., 2013. Bystander-activated memory CD8 T cells control early pathogen load in an innate-like, NKG2D-dependent manner. *Cell Rep.* 3, 701–708. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.02.020>

Clark, S.R., Ma, A.C., Tavener, S.A., McDonald, B., Goodarzi, Z., Kelly, M.M., Patel, K.D., Chakrabarti, S., McAvoy, E., Sinclair, G.D., Keys, E.M., Allen-Vercoe, E., Devinney, R., Doig, C.J., Green, F.H.Y., Kubes, P., 2007. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat. Med.* 13, 463–469. <https://doi.org/10.1038/nm1565>

Claushuis, T.A.M., van der Donk, L.E.H., Luitse, A.L., van Veen, H.A., van der Wel, N.N., van Vught, L.A., Roelofs, J.J.T.H., de Boer, O.J., Lankelma, J.M., Boon, L., de Vos, A.F., van 't Veer, C., van der Poll, T., 2018. Role of Peptidylarginine Deiminase 4 in Neutrophil Extracellular Trap Formation and Host Defense during *Klebsiella pneumoniae*-Induced Pneumonia-Derived Sepsis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 201, 1241–1252. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800314>

Cohen, I.L., 1993. Definitions for sepsis and organ failure. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee Report. *Chest* 103, 656.

Cohen, J., 2002. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420, 885–891. <https://doi.org/10.1038/nature01326>

Coleman, J.A., Quazi, F., Molday, R.S., 2013. Mammalian P4-ATPases and ABC transporters and their role in phospholipid transport. *Biochim. Biophys. Acta* 1831, 555–574. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2012.10.006>

Cox, J., Neuhauser, N., Michalski, A., Scheltema, R.A., Olsen, J.V., Mann, M., 2011. Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *J. Proteome Res.* 10, 1794–1805. <https://doi.org/10.1021/pr101065j>

Cummings, C.J., Martin, T.R., Frevert, C.W., Quan, J.M., Wong, V.A., Mongovin, S.M., Hagen, T.R., Steinberg, K.P., Goodman, R.B., 1999. Expression and function of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 in sepsis. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 162, 2341–2346.

Dalli, J., Norling, L.V., Renshaw, D., Cooper, D., Leung, K.-Y., Perretti, M., 2008. Annexin 1 mediates the rapid anti-inflammatory effects of neutrophil-derived microparticles. *Blood* 112, 2512–2519. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-140533>

Danikas, D.D., Karakantza, M., Theodorou, G.L., Sakellaropoulos, G.C., Gogos, C.A., 2008. Prognostic value of phagocytic activity of neutrophils and monocytes in sepsis. Correlation to CD64 and CD14 antigen expression. *Clin. Exp. Immunol.* 154, 87–97. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03737.x>

Darcy, C.J., Minigo, G., Piera, K.A., Davis, J.S., McNeil, Y.R., Chen, Y., Volkheimer, A.D., Weinberg, J.B., Anstey, N.M., Woodberry, T., 2014. Neutrophils with myeloid derived suppressor function deplete arginine and constrain T cell function in septic shock patients. *Crit. Care Lond. Engl.* 18, R163. <https://doi.org/10.1186/cc14003>

Delabranche, X., Berger, A., Boisramé-Helms, J., Meziani, F., 2012. Microparticles and infectious diseases. *Médecine Mal. Infect.* 42, 335–343. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2012.05.011>

Delabranche, X., Boisramé-Helms, J., Asfar, P., Berger, A., Mootien, Y., Lavigne, T., Grunebaum, L., Lanza, F., Gachet, C., Freyssinet, J.-M., Toti, F., Meziani, F., 2013. Microparticles are new biomarkers of septic shock-induced disseminated intravascular coagulopathy. *Intensive Care Med.* 39, 1695–1703. <https://doi.org/10.1007/s00134-013-2993>

Delabranche, X., Helms, J., Meziani, F., 2017a. Immunohaemostasis: a new view on haemostasis during sepsis. *Ann. Intensive Care* 7, 117. <https://doi.org/10.1186/s13613-017-0339-5>

Delabranche, X., Quenot, J.-P., Lavigne, T., Mercier, E., François, B., Severac, F., Grunebaum, L., Mehdi, M., Zobairi, F., Toti, F., Meziani, F., Boisramé-Helms, J., on behalf to the Clinical Research in Intensive Care and Sepsis Network, 2016. Early Detection of Disseminated Intravascular Coagulation During Septic Shock: A Multicentre Prospective Study. *Crit. Care Med.* <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000001836>

Delabranche, X., Stiel, L., Severac, F., Galois, A.-C., Mauvieux, L., Zobairi, F., Lavigne, T., Toti, F., Anglès-Cano, E., Meziani, F., Boisramé-Helms, J., 2017b. Evidence of Netosis in Septic Shock-Induced Disseminated Intravascular Coagulation. *Shock* Augusta Ga 47, 313–317. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000719>

Diaz, J.A., Fuchs, T.A., Jackson, T.O., Kremer Hovinga, J.A., Lämmle, B., Henke, P.K., Myers, D.D., Wagner, D.D., Wakefield, T.W., for the Michigan Research Venous Group*, 2013. Plasma DNA is Elevated in Patients with Deep Vein Thrombosis. *J. Vasc. Surg. Venous Lymphat. Disord.* 1. <https://doi.org/10.1016/j.jvsv.2012.12.002>

Dibbert, B., Weber, M., Nikolaizik, W.H., Vogt, P., Schöni, M.H., Blaser, K., Simon, H.U., 1999. Cytokine-mediated Bax deficiency and consequent delayed neutrophil apoptosis: a general mechanism to accumulate effector cells in inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 13330–13335.

Ding, A.H., Nathan, C.F., Stuehr, D.J., 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 141, 2407–2412.

Duburcq, T., Durand, A., Tournoys, A., Gnemmi, V., Bonner, C., Gmyr, V., Hubert, T., Pattou, F., Jourdain, M., 2018. Single Low Dose of Human Recombinant Antithrombin (Atryn®) Has no Impact on Endotoxin-induced Disseminated Intravascular Coagulation: An Experimental Randomized Open Label Controlled Study. *Shock* Augusta Ga. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001274>

Eash, K.J., Greenbaum, A.M., Gopalan, P.K., Link, D.C., 2010. CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J. Clin. Invest.* 120, 2423–2431. <https://doi.org/10.1172/JCI41649>

Ekaney, M.L., Otto, G.P., Sossdorf, M., Sponholz, C., Boehringer, M., Loesche, W., Rittirsch, D., Wilharm, A., Kurzai, O., Bauer, M., Claus, R.A., 2014. Impact of plasma histones in human sepsis and their contribution to cellular injury and inflammation. *Crit. Care Lond. Engl.* 18, 543. <https://doi.org/10.1186/s13054-014-0543-8>

Engelmann, B., Massberg, S., 2013. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 34–45. <https://doi.org/10.1038/nri3345>

Etulain, J., Martinod, K., Wong, S.L., Cifuni, S.M., Schattner, M., Wagner, D.D., 2015. P-selectin promotes neutrophil extracellular trap formation in mice. *Blood* 126, 242–246. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-01-624023>

Faix, J.D., 2013. Biomarkers of sepsis. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 50, 23–36. <https://doi.org/10.3109/10408363.2013.764490>

Fang, H., Jiang, W., Cheng, J., Lu, Y., Liu, A., Kan, L., Dahmen, U., 2015. Balancing Innate Immunity and Inflammatory State via Modulation of Neutrophil Function: A Novel Strategy to Fight Sepsis. *J. Immunol. Res.* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/187048>

Ferguson, N.R., Galley, H.F., Webster, N.R., 1999. T helper cell subset ratios in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med.* 25, 106–109.

Fleischmann, C., Scherag, A., Adhikari, N.K.J., Hartog, C.S., Tsaganos, T., Schlattmann, P., Angus, D.C., Reinhart, K., International Forum of Acute Care Trialists, 2016. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 193, 259–272. <https://doi.org/10.1164/rccm.201504-0781OC>

Fourrier, F., 2012. Severe sepsis, coagulation, and fibrinolysis: dead end or one way? *Crit. Care Med.* 40, 2704–2708. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318258ff30>

Fox, E.D., Heffernan, D.S., Cioffi, W.G., Reichner, J.S., 2013. Neutrophils from critically ill septic patients mediate profound loss of endothelial barrier integrity. *Crit. Care Lond. Engl.* 17, R226. <https://doi.org/10.1186/cc13049>

Freyssinet, J.-M., 2003. Cellular microparticles: what are they bad or good for? *J. Thromb. Haemost. JTH* 1, 1655–1662.

Frick, I.-M., Björck, L., Herwald, H., 2007. The dual role of the contact system in bacterial infectious disease. *Thromb. Haemost.* 98, 497–502.

Fuchs, T.A., Brill, A., Duerschmied, D., Schatzberg, D., Monestier, M., Myers, D.D., Wroblewski, S.K., Wakefield, T.W., Hartwig, J.H., Wagner, D.D., 2010. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 15880–15885. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005743107>

Funk, D.J., Parrillo, J.E., Kumar, A., 2009. Sepsis and septic shock: a history. *Crit. Care Clin.* 25, 83–101, viii. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2008.12.003>

Gaieski, D.F., Edwards, J.M., Kallan, M.J., Carr, B.G., 2013. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. *Crit. Care Med.* 41, 1167–1174. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31827c09f8>

Gando, S., 2010. Microvascular thrombosis and multiple organ dysfunction syndrome. *Crit. Care Med.* 38, S35-42. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181c9e31d>

Gando, S., Levi, M., Toh, C.-H., 2016a. Disseminated intravascular coagulation. *Nat. Rev. Dis. Primer* 2, 16037. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.37>

Gando, S., Meziani, F., Levi, M., 2016b. What's new in the diagnostic criteria of disseminated intravascular coagulation? *Intensive Care Med.* 42, 1062–1064. <https://doi.org/10.1007/s00134-016-4257-z>

Gando, S., Saitoh, D., Ogura, H., Mayumi, T., Koseki, K., Ikeda, T., Ishikura, H., Iba, T., Ueyama, M., Eguchi, Y., Ohtomo, Y., Okamoto, K., Kushimoto, S., Endo, S., Shimazaki, S., Japanese Association for Acute Medicine Disseminated Intravascular Coagulation (JAAM DIC) Study Group, 2008. Natural history of disseminated intravascular coagulation diagnosed based on the newly established diagnostic criteria for critically ill patients: results of a multicenter, prospective survey. *Crit. Care Med.* 36, 145–150. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000295317.97245.2D>

Gao, H., Zhang, N., Lu, F., Yu, X., Zhu, L., Mo, X., Wang, W., 2016. Circulating histones for predicting prognosis after cardiac surgery: a prospective study. *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* 23, 681–687. <https://doi.org/10.1093/icvts/ivw198>

Gautier, G., Humbert, M., Deauevieu, F., Sculler, M., Hiscott, J., Bates, E.E.M., Trinchieri, G., Caux, C., Garrone, P., 2005. A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. *J. Exp. Med.* 201, 1435–1446. <https://doi.org/10.1084/jem.20041964>

Gavillet, M., Martinod, K., Renella, R., Harris, C., Shapiro, N.I., Wagner, D.D., Williams, D.A., 2015. Flow cytometric assay for direct quantification of neutrophil extracellular traps in blood samples. *Am. J. Hematol.* <https://doi.org/10.1002/ajh.24185>

Geering, B., Simon, H.-U., 2011. Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils. *Cell Death Differ.* 18, 1457–1469. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.75>

Gentile, L.F., Cuenca, A.G., Efron, P.A., Ang, D., Bihorac, A., McKinley, B.A., Moldawer, L.L., Moore, F.A., 2012. Persistent inflammation and immunosuppression: a common syndrome and new horizon for surgical intensive care. *J. Trauma Acute Care Surg.* 72, 1491–1501. <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e318256e000>

Gogos, C.A., Drosou, E., Bassaris, H.P., Skoutelis, A., 2000. Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J. Infect. Dis.* 181, 176–180. <https://doi.org/10.1086/315214>

González-Amaro, R., Sánchez-Madrid, F., 1999. Cell adhesion molecules: selectins and integrins. *Crit. Rev. Immunol.* 19, 389–429.

Gorlino, C.V., Ranocchia, R.P., Harman, M.F., García, I.A., Crespo, M.I., Morón, G., Maletto, B.A., Pistoresi-Palencia, M.C., 2014. Neutrophils exhibit differential requirements for homing molecules in their lymphatic and blood trafficking into draining lymph nodes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 193, 1966–1974. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301791>

Gould, T.J., Lysov, Z., Liaw, P.C., 2015. Extracellular DNA and histones: double-edged swords in immunothrombosis. *J. Thromb. Haemost. JTH* 13 Suppl 1, S82-91. <https://doi.org/10.1111/jth.12977>

Grob, P.M., David, E., Warren, T.C., DeLeon, R.P., Farina, P.R., Homon, C.A., 1990. Characterization of a receptor for human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor/interleukin-8. *J. Biol. Chem.* 265, 8311–8316.

Guha, M., Mackman, N., 2001. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell. Signal.* 13, 85–94.

Hakkim, A., Fürnrohr, B.G., Amann, K., Laube, B., Abed, U.A., Brinkmann, V., Herrmann, M., Voll, R.E., Zychlinsky, A., 2010. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 9813–9818. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909927107>

Hamaguchi, S., Hirose, T., Matsumoto, N., Akeda, Y., Irisawa, T., Seki, M., Hosotsubo, H., Yamamoto, K., Tasaki, O., Oishi, K., Shimazu, T., Tomono, K., 2014. Neutrophil extracellular traps in bronchial aspirates: a quantitative analysis. *Eur. Respir. J.* 43, 1709–1718. <https://doi.org/10.1183/09031936.00139813>

Hamzeh-Cognasse, H., Damien, P., Nguyen, K.A., Zeni, F., Pozzetto, B., Cognasse, F., Garraud, O., 2013. Contribution of activated platelets to plasma IL-27 levels. *Crit. Care Lond. Engl.* 17, 411. <https://doi.org/10.1186/cc11925>

Hartemink, K.J., Hack, C.E., Groeneveld, A.B.J., 2010. Relation between coagulation/fibrinolysis and lactate in the course of human septic shock. *J. Clin. Pathol.* 63, 1021–1026. <https://doi.org/10.1136/jcp.2010.079707>

Helms, J., Clere-Jehl, R., Bianchini, E., Le Borgne, P., Burban, M., Zobairi, F., Diehl, J.-L., Grunebaum, L., Toti, F., Meziani, F., Borgel, D., 2017. Thrombomodulin favors leukocyte microvesicle fibrinolytic activity, reduces NETosis and prevents septic shock-induced coagulopathy in rats. *Ann. Intensive Care* 7, 118. <https://doi.org/10.1186/s13613-017-0340-z>

Hidalgo, A., Chang, J., Jang, J.-E., Peired, A.J., Chiang, E.Y., Frenette, P.S., 2009. Heterotypic interactions enabled by polarized neutrophil microdomains mediate thromboinflammatory injury. *Nat. Med.* 15, 384–391. <https://doi.org/10.1038/nm.1939>

Hirose, T., Hamaguchi, S., Matsumoto, N., Irisawa, T., Seki, M., Tasaki, O., Hosotsubo, H., Yamamoto, N., Yamamoto, K., Akeda, Y., Oishi, K., Tomono, K., Shimazu, T., 2014. Presence of neutrophil extracellular traps and citrullinated histone H3 in the bloodstream of critically ill patients. *PLoS One* 9, e111755. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111755>

Hirsch, J.G., 1958. Bactericidal action of histone. *J. Exp. Med.* 108, 925–944.

Hoesel, L.M., Neff, T.A., Neff, S.B., Younger, J.G., Olle, E.W., Gao, H., Pianko, M.J., Bernacki, K.D., Sarma, J.V., Ward, P.A., 2005. Harmful and protective roles of neutrophils in sepsis. *Shock Augusta Ga* 24, 40–47.

Hoppenbrouwers, T., Autar, A.S.A., Sultan, A.R., Abraham, T.E., Cappellen, W.A. van, Houtsmuller, A.B., Wamel, W.J.B. van, Beusekom, H.M.M. van, Neck, J.W. van, Maat, M.P.M. de, 2017. In vitro induction of NETosis: Comprehensive live imaging comparison and systematic review. *PLOS ONE* 12, e0176472. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176472>

Horowitz, A., Menice, C.B., Laporte, R., Morgan, K.G., 1996. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol. Rev.* 76, 967–1003.

Hotchkiss, R.S., Monneret, G., Payen, D., 2013. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 862–874. <https://doi.org/10.1038/nri3552>

Hotchkiss, R.S., Nicholson, D.W., 2006. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 813–822. <https://doi.org/10.1038/nri1943>

Hotchkiss, R.S., Tinsley, K.W., Swanson, P.E., Schmiege, R.E., Hui, J.J., Chang, K.C., Osborne, D.F., Freeman, B.D., Cobb, J.P., Buchman, T.G., Karl, I.E., 2001. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4⁺ T lymphocytes in humans. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 166, 6952–6963.

Huang, L., Lord, S.T., 2013. The isolation of fibrinogen monomer dramatically influences fibrin polymerization. *Thromb. Res.* 131, e258–263. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2013.02.003>

Hufford, M.M., Richardson, G., Zhou, H., Manicassamy, B., García-Sastre, A., Enelow, R.I., Braciale, T.J., 2012. Influenza-infected neutrophils within the infected lungs act as antigen presenting cells for anti-viral CD8(+) T cells. *PloS One* 7, e46581. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046581>

Hugel, B., Martínez, M.C., Kunzelmann, C., Freyssinet, J.-M., 2005. Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiol. Bethesda Md* 20, 22–27. <https://doi.org/10.1152/physiol.00029.2004>

Iba, T., Di Nisio, M., Thachil, J., Wada, H., Asakura, H., Sato, K., Kitamura, N., Saitoh, D., 2016. Revision of the Japanese Association for Acute Medicine (JAAM) disseminated intravascular coagulation (DIC) diagnostic criteria using antithrombin activity. *Crit. Care Lond. Engl.* 20, 287. <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1468-1>

Iba, T., Levy, J.H., Raj, A., Warkentin, T.E., 2019a. Advance in the Management of Sepsis-Induced Coagulopathy and Disseminated Intravascular Coagulation. *J. Clin. Med.* 8. <https://doi.org/10.3390/jcm8050728>

Iba, T., Levy, J.H., Yamakawa, K., Thachil, J., Warkentin, T.E., Levi, M., Scientific and Standardization Committee on DIC of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, 2019b. Proposal of a two-step process for the diagnosis of sepsis-induced disseminated intravascular coagulation. *J. Thromb. Haemost. JTH*. <https://doi.org/10.1111/jth.14482>

Iba, T., Miki, T., Hashiguchi, N., Tabe, Y., Nagaoka, I., 2014. Is the neutrophil a “prima donna” in the procoagulant process during sepsis? *Crit. Care Lond. Engl.* 18, 230. <https://doi.org/10.1186/cc13983>

Ikezoe, T., 2015. Thrombomodulin/activated protein C system in septic disseminated intravascular coagulation. *J. Intensive Care* 3, 1. <https://doi.org/10.1186/s40560-014-0050-7>

Jenne, C.N., Kubes, P., 2015. Platelets in inflammation and infection. *Platelets* 26, 286–292. <https://doi.org/10.3109/09537104.2015.1010441>

Johnson, B.L., Midura, E.F., Prakash, P.S., Rice, T.C., Kunz, N., Kalies, K., Caldwell, C.C., 2017. Neutrophil derived microparticles increase mortality and the counter-inflammatory response in a murine model of sepsis. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 1863, 2554–2563. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.01.012>

Kannemeier, C., Shibamiya, A., Nakazawa, F., Trusheim, H., Ruppert, C., Markart, P., Song, Y., Tzima, E., Kennerknecht, E., Niepmann, M., von Bruehl, M.-L., Sedding, D., Massberg, S., Günther, A., Engelmann, B., Preissner, K.T., 2007. Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 6388–6393. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608647104>

Karon, B.S., Tolan, N.V., Wockenfus, A.M., Block, D.R., Baumann, N.A., Bryant, S.C., Clements, C.M., 2017. Evaluation of lactate, white blood cell count, neutrophil count, procalcitonin and immature granulocyte count as biomarkers for sepsis in emergency department patients. *Clin. Biochem.* 50, 956–958. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2017.05.014>

Kessenbrock, K., Krumbholz, M., Schönemarker, U., Back, W., Gross, W.L., Werb, Z., Gröne, H.-J., Brinkmann, V., Jenne, D.E., 2009. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat. Med.* 15, 623–625. <https://doi.org/10.1038/nm.1959>

Kienast, J., Juers, M., Wiedermann, C.J., Hoffmann, J.N., Ostermann, H., Strauss, R., Keinecke, H.-O., Warren, B.L., Opal, S.M., KyberSept investigators, 2006. Treatment effects of high-dose antithrombin without concomitant heparin in patients with severe sepsis with or without disseminated intravascular coagulation. *J. Thromb. Haemost. JTH* 4, 90–97. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01697.x>

Kolaczkowska, E., 2016. The older the faster: aged neutrophils in inflammation. *Blood* 128, 2280–2282. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-09-739680>

Kolaczkowska, E., Jenne, C.N., Surewaard, B.G.J., Thanabalasuriar, A., Lee, W.-Y., Sanz, M.-J., Mowen, K., Opdenakker, G., Kubes, P., 2015. Molecular mechanisms of NET formation and degradation revealed by intravital imaging in the liver vasculature. *Nat. Commun.* 6, 6673. <https://doi.org/10.1038/ncomms7673>

Komissarov, A.A., Florova, G., Idell, S., 2011. Effects of Extracellular DNA on Plasminogen Activation and Fibrinolysis. *J. Biol. Chem.* 286, 41949. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.301218>

Kraut, J.A., Madias, N.E., 2014. Lactic acidosis. *N. Engl. J. Med.* 371, 2309–2319. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1309483>

Kumar, A., Roberts, D., Wood, K.E., Light, B., Parrillo, J.E., Sharma, S., Suppes, R., Feinstein, D., Zanotti, S., Taiberg, L., Gurka, D., Kumar, A., Cheang, M., 2006. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit. Care Med.* 34, 1589–1596. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000217961.75225.E9>

Kumar, H., Bot, A., 2013. Innate immune recognition mechanisms and translational opportunities. *Int. Rev. Immunol.* 32, 113–115. <https://doi.org/10.3109/08830185.2013.775803>

Kumar, S., Ingle, H., Prasad, D.V.R., Kumar, H., 2013. Recognition of bacterial infection by innate immune sensors. *Crit. Rev. Microbiol.* 39, 229–246. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.706249>

Lane, D.A., Philippou, H., Huntington, J.A., 2005. Directing thrombin. *Blood* 106, 2605–2612. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-04-1710>

Lapidot, T., Kollet, O., 2002. The essential roles of the chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in human stem cell homing and repopulation of transplanted immune-deficient NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice. *Leukemia* 16, 1992–2003. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402684>

Lavoignet, C.-E., Le Borgne, P., Chabrier, S., Bidoire, J., Slimani, H., Chevrolet-Lavoignet, J., Lefebvre, F., Jebri, R., Sengler, L., Bilbault, P., and the CREMS network, 2019. White blood cell count and eosinopenia as valuable tools for the diagnosis of bacterial infections in the ED. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03583-2>

Le Tulzo, Y., Pangault, C., Gacouin, A., Guilloux, V., Tribut, O., Amiot, L., Tattevin, P., Thomas, R., Fauchet, R., Drénou, B., 2002. Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. *Shock* Augusta Ga 18, 487–494.

Lee, K.H., Cavanaugh, L., Leung, H., Yan, F., Ahmadi, Z., Chong, B.H., Passam, F., 2018. Quantification of NETs-associated markers by flow cytometry and serum assays in patients with thrombosis and sepsis. *Int. J. Lab. Hematol.* 40, 392–399. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12800>

Leliefeld, P.H.C., Koenderman, L., Pillay, J., 2015. How Neutrophils Shape Adaptive Immune Responses. *Front. Immunol.* 6, 471. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00471>

Leliefeld, P.H.C., Wessels, C.M., Leenen, L.P.H., Koenderman, L., Pillay, J., 2016. The role of neutrophils in immune dysfunction during severe inflammation. *Crit. Care Lond. Engl.* 20, 73. <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1250-4>

Lerolle, N., Carlotti, A., Melican, K., Aubey, F., Pierrot, M., Diehl, J.-L., Caille, V., Hékimian, G., Gandrille, S., Mandet, C., Bruneval, P., Dumenil, G., Borgel, D., 2013. Assessment of the interplay between blood and skin vascular abnormalities in adult purpura fulminans. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 188, 684–692. <https://doi.org/10.1164/rccm.201302-0228OC>

Leshner, M., Wang, S., Lewis, C., Zheng, H., Chen, X.A., Santy, L., Wang, Y., 2012. PAD4 mediated histone hypercitrullination induces heterochromatin decondensation and chromatin unfolding to form neutrophil extracellular trap-like structures. *Front. Immunol.* 3, 307. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00307>

Levi, M., 2010. The coagulant response in sepsis and inflammation. *Hämostaseologie* 30, 10–12, 14–16.

Levi, M., Schultz, M.J., 2017. What do sepsis-induced coagulation test result abnormalities mean to intensivists? *Intensive Care Med.* <https://doi.org/10.1007/s00134-017-4725-0>

Levi, M., Toh, C.H., Thachil, J., Watson, H.G., 2009. Guidelines for the diagnosis and management of disseminated intravascular coagulation. British Committee for Standards in Haematology. *Br. J. Haematol.* 145, 24–33. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.07600.x>

Levi, M., van der Poll, T., 2013. Disseminated intravascular coagulation: a review for the internist. *Intern. Emerg. Med.* 8, 23–32. <https://doi.org/10.1007/s11739-012-0859-9>

Linssen, J., Aderhold, S., Nierhaus, A., Frings, D., Kaltschmidt, C., Zänker, K., 2008. Automation and validation of a rapid method to assess neutrophil and monocyte activation by routine fluorescence flow cytometry in vitro. *Cytometry B Clin. Cytom.* 74, 295–309. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.20422>

Liu, C., Oveissi, S., Downs, R., Kirby, J., Nedeva, C., Puthalakath, H., Faou, P., Duan, M., Chen, W., 2019. Semiquantitative Proteomics Enables Mapping of Murine Neutrophil Dynamics following Lethal Influenza Virus Infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900337>

Lorente, L., Martín, M.M., Varo, N., Borreguero-León, J.M., Solé-Violán, J., Blanquer, J., Labarta, L., Díaz, C., Jiménez, A., Pastor, E., Belmonte, F., Orbe, J., Rodríguez, J.A., Gómez-Melini, E., Ferrer-Agüero, J.M., Ferreres, J., Llimiñana, M.C., Páramo, J.A., 2011. Association between serum soluble CD40 ligand levels and mortality in patients with severe sepsis. *Crit. Care Lond. Engl.* 15, R97. <https://doi.org/10.1186/cc10104>

Lorenz, E., Mira, J.P., Frees, K.L., Schwartz, D.A., 2002. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch. Intern. Med.* 162, 1028–1032.

Luo, D., Szaba, F.M., Kummer, L.W., Plow, E.F., Mackman, N., Gailani, D., Smiley, S.T., 2011. Protective roles for fibrin, tissue factor, plasminogen activator inhibitor-1, and thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, but not factor XI, during defense against the gram-negative bacterium *Yersinia enterocolitica*. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 187, 1866–1876. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101094>

Maffia, P.C., Zittermann, S.E., Scimone, M.L., Tateosian, N., Amiano, N., Guerrieri, D., Lutzky, V., Rosso, D., Romeo, H.E., Garcia, V.E., Issekutz, A.C., Chuluyan, H.E., 2007. Neutrophil elastase converts human immature dendritic cells into transforming growth factor-beta1-secreting cells and reduces allostimulatory ability. *Am. J. Pathol.* 171, 928–937. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.061043>

Mai, S.H.C., Khan, M., Dwivedi, D.J., Ross, C.A., Zhou, J., Gould, T.J., Gross, P.L., Weitz, J.I., Fox-Robichaud, A.E., Liaw, P.C., Canadian Critical Care Translational Biology Group, 2015. Delayed but not Early Treatment with DNase Reduces Organ Damage and Improves Outcome in a Murine Model of Sepsis. *Shock Augusta Ga* 44, 166–172. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000396>

Maletto, B.A., Ropolo, A.S., Alignani, D.O., Liscovsky, M.V., Ranocchia, R.P., Moron, V.G., Pistoressi-Palencia, M.C., 2006. Presence of neutrophil-bearing antigen in lymphoid organs of immune mice. *Blood* 108, 3094–3102. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-016659>

Mammen, J., Choudhuri, J., Paul, J., Sudarsan, T.I., Josephine, T., Mahasamphat, G., Jeyaseelan, V., Nair, S.C., Peter, J.V., 2018. Cytomorphometric Neutrophil and Monocyte Markers May Strengthen the Diagnosis of Sepsis. *J. Intensive Care Med.* 33, 656–662. <https://doi.org/10.1177/0885066616682940>

Manda-Handzlik, A., Ostafin, M., Bystrzycka, W., Sieczkowska, S., Moskalik, A., Demkow, U., Ciepiela, O., 2016. Flow cytometric quantification of neutrophil extracellular traps:

Limitations of the methodological approach. *Am. J. Hematol.* 91, E9-10. <https://doi.org/10.1002/ajh.24257>

Mantovani, A., Cassatella, M.A., Costantini, C., Jaillon, S., 2011. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 519–531. <https://doi.org/10.1038/nri3024>

Mare, T.A., Treacher, D.F., Shankar-Hari, M., Beale, R., Lewis, S.M., Chambers, D.J., Brown, K.A., 2015. The diagnostic and prognostic significance of monitoring blood levels of immature neutrophils in patients with systemic inflammation. *Crit. Care Lond. Engl.* 19, 57. <https://doi.org/10.1186/s13054-015-0778-z>

Markwart, R., Condotta, S.A., Requardt, R.P., Borcken, F., Schubert, K., Weigel, C., Bauer, M., Griffith, T.S., Förster, M., Brunkhorst, F.M., Badovinac, V.P., Rubio, I., 2014. Immunosuppression after sepsis: systemic inflammation and sepsis induce a loss of naïve T-cells but no enduring cell-autonomous defects in T-cell function. *PloS One* 9, e115094. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115094>

Martinez, M.C., Tual-Chalot, S., Leonetti, D., Andriantsitohaina, R., 2011. Microparticles: targets and tools in cardiovascular disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 32, 659–665. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2011.06.005>

Martinod, K., Wagner, D.D., 2014. Thrombosis: tangled up in NETs. *Blood* 123, 2768–2776. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-10-463646>

Martins, P.S., Kallas, E.G., Neto, M.C., Dalboni, M.A., Blecher, S., Salomão, R., 2003. Upregulation of reactive oxygen species generation and phagocytosis, and increased apoptosis in human neutrophils during severe sepsis and septic shock. *Shock Augusta Ga* 20, 208–212. <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000079425.52617.db>

Maruchi, Y., Tsuda, M., Mori, H., Takenaka, N., Gocho, T., Huq, M.A., Takeyama, N., 2018. Plasma myeloperoxidase-conjugated DNA level predicts outcomes and organ dysfunction in patients with septic shock. *Crit. Care Lond. Engl.* 22, 176. <https://doi.org/10.1186/s13054-018-2109-7>

Massberg, S., Grahl, L., von Bruehl, M.-L., Manukyan, D., Pfeiler, S., Goosmann, C., Brinkmann, V., Lorenz, M., Bidzhekov, K., Khandagale, A.B., Konrad, I., Kennerknecht, E., Reges, K., Holdenrieder, S., Braun, S., Reinhardt, C., Spannagl, M., Preissner, K.T., Engelmann, B., 2010. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat. Med.* 16, 887–896. <https://doi.org/10.1038/nm.2184>

Masuda, S., Nakazawa, D., Shida, H., Miyoshi, A., Kusunoki, Y., Tomaru, U., Ishizu, A., 2016. NETosis markers: Quest for specific, objective, and quantitative markers. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 459, 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2016.05.029>

Maugeri, N., Brambilla, M., Camera, M., Carbone, A., Tremoli, E., Donati, M.B., de Gaetano, G., Cerletti, C., 2006. Human polymorphonuclear leukocytes produce and express functional tissue factor upon stimulation. *J. Thromb. Haemost. JTH* 4, 1323–1330. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.01968.x>

Mause, S.F., von Hundelshausen, P., Zerneck, A., Koenen, R.R., Weber, C., 2005. Platelet microparticles: a transcellular delivery system for RANTES promoting monocyte recruitment on endothelium. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 1512–1518. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000170133.43608.37>

Mause, S.F., Weber, C., 2010. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ. Res.* 107, 1047–1057. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.226456>

McDonald, B., Davis, R.P., Kim, S.-J., Tse, M., Esmon, C.T., Kolaczowska, E., Jenne, C.N., 2017. Platelets and neutrophil extracellular traps collaborate to promote intravascular coagulation during sepsis in mice. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-09-741298>

McIlroy, D.J., Jarnicki, A.G., Au, G.G., Lott, N., Smith, D.W., Hansbro, P.M., Balogh, Z.J., 2014. Mitochondrial DNA neutrophil extracellular traps are formed after trauma and subsequent surgery. *J. Crit. Care* 29, 1133.e1-5. <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2014.07.013>

McVey, M., Tabuchi, A., Kuebler, W.M., 2012. Microparticles and acute lung injury. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 303, L364–381. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00354.2011>
Megiovanni, A.M., Sanchez, F., Robledo-Sarmiento, M., Morel, C., Gluckman, J.C., Boudaly, S., 2006. Polymorphonuclear neutrophils deliver activation signals and antigenic molecules to dendritic cells: a new link between leukocytes upstream of T lymphocytes. *J. Leukoc. Biol.* 79, 977–988. <https://doi.org/10.1189/jlb.0905526>

Mesri, M., Altieri, D.C., 1999. Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 274, 23111–23118.

Metzler, K.D., Goosmann, C., Lubojemska, A., Zychlinsky, A., Papayannopoulos, V., 2014. A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis. *Cell Rep.* 8, 883–896. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.06.044>
Meziani, F., Delabranche, X., Asfar, P., Toti, F., 2010. Bench-to-bedside review: circulating microparticles--a new player in sepsis? *Crit. Care Lond. Engl.* 14, 236. <https://doi.org/10.1186/cc9231>

Meziani, F., Gando, S., Vincent, J.-L., 2017. Should all patients with sepsis receive anticoagulation? Yes. *Intensive Care Med.* 43, 452–454. <https://doi.org/10.1007/s00134-016-4621-z>

Meziani, F., Tesse, A., Andriantsitohaina, R., 2008. Microparticles are vectors of paradoxical information in vascular cells including the endothelium: role in health and diseases. *Pharmacol. Rep.* PR 60, 75–84.

Mihalache, C.C., Yousefi, S., Conus, S., Villiger, P.M., Schneider, E.M., Simon, H.-U., 2011. Inflammation-associated autophagy-related programmed necrotic death of human neutrophils characterized by organelle fusion events. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 186, 6532–6542. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1004055>

Miller, B.F., Abrams, R., Dorfman, A., Klein, M., 1942. ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF PROTAMINE AND HISTONE. *Science* 96, 428–430. <https://doi.org/10.1126/science.96.2497.428>

Mócsai, A., 2013. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J. Exp. Med.* 210, 1283–1299. <https://doi.org/10.1084/jem.20122220>

Morel, O., Toti, F., Hugel, B., Freyssinet, J.-M., 2004. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. *Curr. Opin. Hematol.* 11, 156–164.

Morris, A.C., Brittan, M., Wilkinson, T.S., McAuley, D.F., Antonelli, J., McCulloch, C., Barr, L.C., McDonald, N.A., Dhaliwal, K., Jones, R.O., Mackellar, A., Haslett, C., Hay, A.W., Swann, D.G., Anderson, N., Laurensen, I.F., Davidson, D.J., Rossi, A.G., Walsh, T.S., Simpson, A.J., 2011. C5a-mediated neutrophil dysfunction is RhoA-dependent and predicts infection in critically ill patients. *Blood* 117, 5178–5188. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-08-304667>

Morrissey, J.H., 2012. Polyphosphate: a link between platelets, coagulation and inflammation. *Int. J. Hematol.* 95, 346–352. <https://doi.org/10.1007/s12185-012-1054-5>

Morrissey, J.H., Choi, S.H., Smith, S.A., 2012. Polyphosphate: an ancient molecule that links platelets, coagulation, and inflammation. *Blood* 119, 5972–5979. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-03-306605>

Mortaza, S., Martinez, M.C., Baron-Menguy, C., Burban, M., de la Bourdonnaye, M., Fizanne, L., Pierrot, M., Calès, P., Henrion, D., Andriantsitohaina, R., Mercat, A., Asfar, P., Meziani, F., 2009. Detrimental hemodynamic and inflammatory effects of microparticles originating from septic rats. *Crit. Care Med.* 37, 2045–2050. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181a00629>

Mostefai, H.A., Meziani, F., Mastronardi, M.L., Agouni, A., Heymes, C., Sargentini, C., Asfar, P., Martinez, M.C., Andriantsitohaina, R., 2008. Circulating microparticles from patients with septic shock exert protective role in vascular function. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 178, 1148–1155. <https://doi.org/10.1164/rccm.200712-1835OC>

Müller, I., Munder, M., Kropf, P., Hänsch, G.M., 2009. Polymorphonuclear neutrophils and T lymphocytes: strange bedfellows or brothers in arms? *Trends Immunol.* 30, 522–530. <https://doi.org/10.1016/j.it.2009.07.007>

Muller, W.A., 2003. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol.* 24, 327–334.

Munford, R.S., Pugin, J., 2001. Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163, 316–321. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.163.2.2007102>

Nathan, C., 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 173–182. <https://doi.org/10.1038/nri1785>

Nauseef, W.M., 2007. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol. Rev.* 219, 88–102. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2007.00550.x>

Navarini, A.A., Lang, K.S., Verschoor, A., Recher, M., Zinkernagel, A.S., Nizet, V., Odermatt, B., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M., 2009. Innate immune-induced depletion of bone marrow neutrophils aggravates systemic bacterial infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 7107–7112. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901162106>

Nickel, K.F., Renné, T., 2012. Crosstalk of the plasma contact system with bacteria. *Thromb. Res.* 130 Suppl 1, S78-83. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2012.08.284>

Nierhaus, A., Linssen, J., Wichmann, D., Braune, S., Kluge, S., 2012. Use of a weighted, automated analysis of the differential blood count to differentiate sepsis from non-infectious systemic inflammation: the intensive care infection score (ICIS). *Inflamm. Allergy Drug Targets* 11, 109–115.

Nolan, S., Dixon, R., Norman, K., Hellewell, P., Ridger, V., 2008. Nitric oxide regulates neutrophil migration through microparticle formation. *Am. J. Pathol.* 172, 265–273. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070069>

Nordenfelt, P., Tapper, H., 2011. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 90, 271–284. <https://doi.org/10.1189/jlb.0810457>

Okajima, K., 2001. Regulation of inflammatory responses by natural anticoagulants. *Immunol. Rev.* 184, 258–274.

Papayannopoulos, V., Metzler, K.D., Hakkim, A., Zychlinsky, A., 2010. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 191, 677–691. <https://doi.org/10.1083/jcb.201006052>

Park, B.S., Song, D.H., Kim, H.M., Choi, B.-S., Lee, H., Lee, J.-O., 2009. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 458, 1191–1195. <https://doi.org/10.1038/nature07830>

Park, S.H., Park, C.-J., Lee, B.-R., Nam, K.-S., Kim, M.-J., Han, M.-Y., Kim, Y.J., Cho, Y.-U., Jang, S., 2015. Sepsis affects most routine and cell population data (CPD) obtained using the Sysmex XN-2000 blood cell analyzer: neutrophil-related CPD NE-SFL and NE-WY provide useful information for detecting sepsis. *Int. J. Lab. Hematol.* 37, 190–198. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12261>

Parrillo, J.E., 1993. Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N. Engl. J. Med.* 328, 1471–1477. <https://doi.org/10.1056/NEJM199305203282008>

Perrin, J., Charron, C., François, J.-H., Cramer-Bordé, E., Lévy, B., Borgel, D., Vieillard-Baron, A., 2015. Coagulation phenotypes in septic shock as evaluated by calibrated automated thrombography. *Shock* Augusta Ga 43, 74–79. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000271>

Pfeiler, S., Massberg, S., Engelmann, B., 2014. Biological basis and pathological relevance of microvascular thrombosis. *Thromb. Res.* 133 Suppl 1, S35-37. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2014.03.016>

Pfeiler, S., Stark, K., Massberg, S., Engelmann, B., 2016. Propagation of thrombosis by neutrophils and extracellular nucleosome networks. *Haematologica.* <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.142471>

Phillipson, M., Kubes, P., 2011. The neutrophil in vascular inflammation. *Nat. Med.* 17, 1381–1390. <https://doi.org/10.1038/nm.2514>

Pillay, J., Ramakers, B.P., Kamp, V.M., Loi, A.L.T., Lam, S.W., Hietbrink, F., Leenen, L.P., Tool, A.T., Pickkers, P., Koenderman, L., 2010. Functional heterogeneity and differential priming of circulating neutrophils in human experimental endotoxemia. *J. Leukoc. Biol.* 88, 211–220. <https://doi.org/10.1189/jlb.1209793>

Pilsczek, F.H., Salina, D., Poon, K.K.H., Fahey, C., Yipp, B.G., Sibley, C.D., Robbins, S.M., Green, F.H.Y., Surette, M.G., Sugai, M., Bowden, M.G., Hussain, M., Zhang, K., Kubes, P., 2010. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 185, 7413–7425. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000675>

Pöschl, J.M.B., Ruef, P., Linderkamp, O., 2005. Deformability of passive and activated neutrophils in children with Gram-negative septicemia. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 65, 333–339. <https://doi.org/10.1080/00365510510013884>

Prakash, P.S., Caldwell, C.C., Lentsch, A.B., Pritts, T.A., Robinson, B.R.H., 2012. Human microparticles generated during sepsis in patients with critical illness are neutrophil-derived

and modulate the immune response. *J. Trauma Acute Care Surg.* 73, 401-406-407. <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e31825a776d>

Puga, I., Cols, M., Barra, C.M., He, B., Cassis, L., Gentile, M., Comerma, L., Chorny, A., Shan, M., Xu, W., Magri, G., Knowles, D.M., Tam, W., Chiu, A., Bussel, J.B., Serrano, S., Lorente, J.A., Bellosillo, B., Lloreta, J., Juanpere, N., Alameda, F., Baró, T., de Heredia, C.D., Torán, N., Català, A., Torreadell, M., Fortuny, C., Cusí, V., Carreras, C., Diaz, G.A., Blander, J.M., Farber, C.-M., Silvestri, G., Cunningham-Rundles, C., Calvillo, M., Dufour, C., Notarangelo, L.D., Lougaris, V., Plebani, A., Casanova, J.-L., Ganal, S.C., Diefenbach, A., Aróstegui, J.I., Juan, M., Yagüe, J., Mahlaoui, N., Donadieu, J., Chen, K., Cerutti, A., 2011. B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat. Immunol.* 13, 170–180. <https://doi.org/10.1038/ni.2194>

Qu, Y., Dubyak, G.R., 2009. P2X7 receptors regulate multiple types of membrane trafficking responses and non-classical secretion pathways. *Purinergic Signal.* 5, 163–173. <https://doi.org/10.1007/s11302-009-9132-8>

Quenot, J.-P., Binquet, C., Kara, F., Martinet, O., Ganster, F., Navellou, J.-C., Castelain, V., Barraud, D., Cousson, J., Louis, G., Perez, P., Kuteifan, K., Noirot, A., Badie, J., Mezher, C., Lessire, H., Pavon, A., 2013. The epidemiology of septic shock in French intensive care units: the prospective multicenter cohort EPISS study. *Crit. Care Lond. Engl.* 17, R65. <https://doi.org/10.1186/cc12598>

Quintana, F.J., Cohen, I.R., 2005. Heat shock proteins as endogenous adjuvants in sterile and septic inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 175, 2777–2782.

Ranieri, V.M., Thompson, B.T., Barie, P.S., Dhainaut, J.-F., Douglas, I.S., Finfer, S., Gårdlund, B., Marshall, J.C., Rhodes, A., Artigas, A., Payen, D., Tenhunen, J., Al-Khalidi, H.R., Thompson, V., Janes, J., Macias, W.L., Vangerow, B., Williams, M.D., PROWESS-SHOCK Study Group, 2012. Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock. *N. Engl. J. Med.* 366, 2055–2064. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1202290>

Reddy, R.C., Standiford, T.J., 2010. Effects of sepsis on neutrophil chemotaxis. *Curr. Opin. Hematol.* 17, 18–24. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e32833338f3>

Reid, V.L., Webster, N.R., 2012. Role of microparticles in sepsis. *Br. J. Anaesth.* 109, 503–513. <https://doi.org/10.1093/bja/aes321>

Reinhart, K., Daniels, R., Kisoorn, N., Machado, F.R., Schachter, R.D., Finfer, S., 2017. Recognizing Sepsis as a Global Health Priority - A WHO Resolution. *N. Engl. J. Med.* 377, 414–417. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1707170>

Rhodes, A., Wort, S.J., Thomas, H., Collinson, P., Bennett, E.D., 2006. Plasma DNA concentration as a predictor of mortality and sepsis in critically ill patients. *Crit. Care Lond. Engl.* 10, R60. <https://doi.org/10.1186/cc4894>

Rodriguez, P.C., Quiceno, D.G., Ochoa, A.C., 2007. L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood* 109, 1568–1573. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-06-031856>

Rosenfeld, J., Capdevielle, J., Guillemot, J.C., Ferrara, P., 1992. In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 203, 173–179.

Saffarzadeh, M., Juenemann, C., Queisser, M.A., Lochnit, G., Barreto, G., Galuska, S.P., Lohmeyer, J., Preissner, K.T., 2012. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PloS One* 7, e32366. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032366>

Santos, S.S., Brunialti, M.K.C., Rigato, O., Machado, F.R., Silva, E., Salomao, R., 2012. Generation of nitric oxide and reactive oxygen species by neutrophils and monocytes from septic patients and association with outcomes. *Shock Augusta Ga* 38, 18–23. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e318257114e>

Satta, N., Freyssinet, J.M., Toti, F., 1997. The significance of human monocyte thrombomodulin during membrane vesiculation and after stimulation by lipopolysaccharide. *Br. J. Haematol.* 96, 534–542.

Satta, N., Toti, F., Feugeas, O., Bohbot, A., Dachary-Prigent, J., Eschwège, V., Hedman, H., Freyssinet, J.M., 1994. Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 153, 3245–3255.

Schouten, M., Wiersinga, W.J., Levi, M., van der Poll, T., 2008. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J. Leukoc. Biol.* 83, 536–545. <https://doi.org/10.1189/jlb.0607373>

Schuster, S., Hurrell, B., Tacchini-Cottier, F., 2013. Crosstalk between neutrophils and dendritic cells: a context-dependent process. *J. Leukoc. Biol.* 94, 671–675. <https://doi.org/10.1189/jlb.1012540>

Schwaller, J., Schneider, P., Mhawech-Fauceglia, P., McKee, T., Myit, S., Matthes, T., Tschopp, J., Donze, O., Le Gal, F.-A., Huard, B., 2007. Neutrophil-derived APRIL concentrated in tumor lesions by proteoglycans correlates with human B-cell lymphoma aggressiveness. *Blood* 109, 331–338. <https://doi.org/10.1073/blood-2006-02-001800>

Scully, M., Levi, M., 2019. How we manage haemostasis during sepsis. *Br. J. Haematol.* 185, 209–218. <https://doi.org/10.1111/bjh.15821>

Segal, A.W., 2005. How neutrophils kill microbes. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 197–223. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115653>

Semeraro, F., Ammollo, C.T., Morrissey, J.H., Dale, G.L., Friese, P., Esmon, N.L., Esmon, C.T., 2011. Extracellular histones promote thrombin generation through platelet-dependent mechanisms: involvement of platelet TLR2 and TLR4. *Blood* 118, 1952–1961. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-03-343061>

Semple, J.W., Italiano, J.E., Freedman, J., 2011. Platelets and the immune continuum. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 264–274. <https://doi.org/10.1038/nri2956>

Seymour, C.W., Liu, V.X., Iwashyna, T.J., Brunkhorst, F.M., Rea, T.D., Scherag, A., Rubenfeld, G., Kahn, J.M., Shankar-Hari, M., Singer, M., Deutschman, C.S., Escobar, G.J., Angus, D.C., 2016. Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315, 762–774. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0288>

Shankar-Hari, M., Phillips, G.S., Levy, M.L., Seymour, C.W., Liu, V.X., Deutschman, C.S., Angus, D.C., Rubenfeld, G.D., Singer, M., Sepsis Definitions Task Force, 2016. 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. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0289>

Shapiro, N.I., Schuetz, P., Yano, K., Sorasaki, M., Parikh, S.M., Jones, A.E., Trzeciak, S., Ngo, L., Aird, W.C., 2010. The association of endothelial cell signaling, severity of illness, and organ dysfunction in sepsis. *Crit. Care Lond. Engl.* 14, R182. <https://doi.org/10.1186/cc9290>

Simon, S.I., Kim, M.-H., 2010. A day (or 5) in a neutrophil's life. *Blood* 116, 511–512. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-05-283184>

Singer, G., Urakami, H., Specian, R.D., Stokes, K.Y., Granger, D.N., 2006. Platelet recruitment in the murine hepatic microvasculature during experimental sepsis: role of neutrophils. *Microcirc. N. Y. N* 1994 13, 89–97. <https://doi.org/10.1080/10739680500466343>

Singer, M., Deutschman, C.S., Seymour, C.W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G.R., Chiche, J.-D., Coopersmith, C.M., Hotchkiss, R.S., Levy, M.M., Marshall, J.C., Martin, G.S., Opal, S.M., Rubenfeld, G.D., van der Poll, T., Vincent, J.-L., Angus, D.C., 2016. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315, 801–810. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287>

Skoutelis, A.T., Kaleridis, V., Athanassiou, G.M., Kokkinis, K.I., Missirlis, Y.F., Bassaris, H.P., 2000. Neutrophil deformability in patients with sepsis, septic shock, and adult respiratory distress syndrome. *Crit. Care Med.* 28, 2355–2359.

Sônego, F., Castanheira, F.V.E.S., Ferreira, R.G., Kanashiro, A., Leite, C.A.V.G., Nascimento, D.C., Colón, D.F., Borges, V. de F., Alves-Filho, J.C., Cunha, F.Q., 2016. Paradoxical Roles of the Neutrophil in Sepsis: Protective and Deleterious. *Front. Immunol.* 7, 155. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00155>

Soriano, A.O., Jy, W., Chirinos, J.A., Valdivia, M.A., Velasquez, H.S., Jimenez, J.J., Horstman, L.L., Kett, D.H., Schein, R.M.H., Ahn, Y.S., 2005. Levels of endothelial and platelet microparticles and their interactions with leukocytes negatively correlate with organ dysfunction and predict mortality in severe sepsis. *Crit. Care Med.* 33, 2540–2546.

Souto, F.O., Alves-Filho, J.C., Turato, W.M., Auxiliadora-Martins, M., Basile-Filho, A., Cunha, F.Q., 2011. Essential role of CCR2 in neutrophil tissue infiltration and multiple organ dysfunction in sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 183, 234–242. <https://doi.org/10.1164/rccm.201003-0416OC>

Souza, A.C.P., Yuen, P.S.T., Star, R.A., 2015. Microparticles: markers and mediators of sepsis-induced microvascular dysfunction, immunosuppression, and AKI. *Kidney Int.* 87, 1100–1108. <https://doi.org/10.1038/ki.2015.26>

Sreeramkumar, V., Adrover, J.M., Ballesteros, I., Cuartero, M.I., Rossaint, J., Bilbao, I., Náchér, M., Pitaval, C., Radovanovic, I., Fukui, Y., McEver, R.P., Filippi, M.-D., Lizasoain, I., Ruiz-Cabello, J., Zarbock, A., Moro, M.A., Hidalgo, A., 2014. Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. *Science* 346, 1234–1238. <https://doi.org/10.1126/science.1256478>

Stiel, L., Delabranche, X., Galoisy, A.-C., Severac, F., Toti, F., Mauvieux, L., Meziani, F., Boisramé-Helms, J., 2016. Neutrophil Fluorescence: A New Indicator of Cell Activation During Septic Shock-Induced Disseminated Intravascular Coagulation. *Crit. Care Med.* 44, e1132–e1136. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000001851>

Stiel, L., Meziani, F., Helms, J., 2017. Neutrophil activation during septic shock. *Shock Augusta Ga.* <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000980>

Suet Ting Tan, R., Lin, B., Liu, Q., Tucker-Kellogg, L., Ho, B., Leung, B.P.L., Ling Ding, J., 2013. The synergy in cytokine production through MyD88-TRIF pathways is co-ordinated with ERK phosphorylation in macrophages. *Immunol. Cell Biol.* 91, 377–387. <https://doi.org/10.1038/icb.2013.13>

Szklarczyk, D., Gable, A.L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N.T., Morris, J.H., Bork, P., Jensen, L.J., Mering, C. von, 2019. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* 47, D607–D613. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>

- Takeda, K., Kaisho, T., Akira, S., 2003. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 335–376. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141126>
- Tanaka, K., Koike, Y., Shimura, T., Okigami, M., Ide, S., Toiyama, Y., Okugawa, Y., Inoue, Y., Araki, T., Uchida, K., Mohri, Y., Mizoguchi, A., Kusunoki, M., 2014. In Vivo Characterization of Neutrophil Extracellular Traps in Various Organs of a Murine Sepsis Model. *PLoS ONE* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111888>
- Taneja, R., Sharma, A.P., Hallett, M.B., Findlay, G.P., Morris, M.R., 2008. Immature circulating neutrophils in sepsis have impaired phagocytosis and calcium signaling. *Shock Augusta Ga* 30, 618–622. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e318173ef9c>
- Tang, D., Kang, R., Coyne, C.B., Zeh, H.J., Lotze, M.T., 2012. PAMPs and DAMPs: Signal 0s that Spur Autophagy and Immunity. *Immunol. Rev.* 249, 158–175. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01146.x>
- Taylor, D.E., Piantadosi, C.A., 1995. Oxidative metabolism in sepsis and sepsis syndrome. *J. Crit. Care* 10, 122–135.
- Taylor, F.B., Toh, C.H., Hoots, W.K., Wada, H., Levi, M., Scientific Subcommittee on Disseminated Intravascular Coagulation (DIC) of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH), 2001. Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation. *Thromb. Haemost.* 86, 1327–1330.
- Tesse, A., Martínez, M.C., Hugel, B., Chalupsky, K., Muller, C.D., Meziani, F., Mitolo-Chieppa, D., Freyssinet, J.-M., Andriantsitohaina, R., 2005. Upregulation of proinflammatory proteins through NF-kappaB pathway by shed membrane microparticles results in vascular hyporeactivity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 2522–2527. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000189298.62240.5d>
- Thomas, G.M., Carbo, C., Curtis, B.R., Martinod, K., Mazo, I.B., Schatzberg, D., Cifuni, S.M., Fuchs, T.A., von Andrian, U.H., Hartwig, J.H., Aster, R.H., Wagner, D.D., 2012. Extracellular DNA traps are associated with the pathogenesis of TRALI in humans and mice. *Blood* 119, 6335–6343. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-405183>
- Thomas, L., 1972. *Germes. N. Engl. J. Med.* 287, 553–555. <https://doi.org/10.1056/NEJM197209142871109>
- Trevelin, S.C., Alves-Filho, J.C., Sônego, F., Turato, W., Nascimento, D.C., Souto, F.O., Cunha, T.M., Gazzinelli, R.T., Cunha, F.Q., 2012. Toll-like receptor 9 activation in neutrophils impairs chemotaxis and reduces sepsis outcome. *Crit. Care Med.* 40, 2631–2637. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318258fb70>

Trzeciak, S., Cinel, I., Phillip Dellinger, R., Shapiro, N.I., Arnold, R.C., Parrillo, J.E., Hollenberg, S.M., Microcirculatory Alterations in Resuscitation and Shock (MARS) Investigators, 2008. Resuscitating the microcirculation in sepsis: the central role of nitric oxide, emerging concepts for novel therapies, and challenges for clinical trials. *Acad. Emerg. Med. Off. J. Soc. Acad. Emerg. Med.* 15, 399–413. <https://doi.org/10.1111/j.1553-2712.2008.00109.x>

Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M.Y., Geiger, T., Mann, M., Cox, J., 2016. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat. Methods* 13, 731–740. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3901>

Tymł, K., Wang, X., Lidington, D., Ouellette, Y., 2001. Lipopolysaccharide reduces intercellular coupling in vitro and arteriolar conducted response in vivo. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 281, H1397-1406. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.281.3.H1397>

Uhl, B., Vadlau, Y., Zuchtriegel, G., Nekolla, K., Sharaf, K., Gaertner, F., Massberg, S., Krombach, F., Reichel, C.A., 2016. Aged neutrophils contribute to the first line of defense in the acute inflammatory response. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-05-718999>

Urban, C.F., Reichard, U., Brinkmann, V., Zychlinsky, A., 2006. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell. Microbiol.* 8, 668–676. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00659.x>

Urrechaga, E., Bóveda, O., Aguirre, U., 2018. Role of leucocytes cell population data in the early detection of sepsis. *J. Clin. Pathol.* 71, 259–266. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2017-204524>

Vallet, B., 2003. Bench-to-bedside review: endothelial cell dysfunction in severe sepsis: a role in organ dysfunction? *Crit. Care Lond. Engl.* 7, 130–138.

van der Geest, P.J., Mohseni, M., Linszen, J., Duran, S., de Jonge, R., Groeneveld, A.B.J., 2016. The intensive care infection score - a novel marker for the prediction of infection and its severity. *Crit. Care Lond. Engl.* 20, 180. <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1366-6>

Van Der Meijden, P.E.J., Van Schilfgaarde, M., Van Oerle, R., Renné, T., ten Cate, H., Spronk, H.M.H., 2012. Platelet- and erythrocyte-derived microparticles trigger thrombin generation via factor XIIa. *J. Thromb. Haemost. JTH* 10, 1355–1362. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2012.04758.x>

van der Poll, T., Opal, S.M., 2017. Should all septic patients be given systemic anticoagulation? No. *Intensive Care Med.* 43, 455–457. <https://doi.org/10.1007/s00134-016-4607-x>

van Gisbergen, K.P.J.M., Sanchez-Hernandez, M., Geijtenbeek, T.B.H., van Kooyk, Y., 2005. Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent

interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *J. Exp. Med.* 201, 1281–1292. <https://doi.org/10.1084/jem.20041276>

van Hinsbergh, V.W.M., 2012. Endothelium—role in regulation of coagulation and inflammation. *Semin. Immunopathol.* 34, 93–106. <https://doi.org/10.1007/s00281-011-0285-5>

Venugopal, A., 2014. Disseminated intravascular coagulation. *Indian J. Anaesth.* 58, 603–608. <https://doi.org/10.4103/0019-5049.144666>

Verbist, K.C., Wang, R., Green, D.R., 2012. T cell metabolism and the immune response. *Semin. Immunol.* 24, 399–404. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2012.12.006>

Vincent, J.-L., De Backer, D., 2005. Microvascular dysfunction as a cause of organ dysfunction in severe sepsis. *Crit. Care Lond. Engl.* 9 Suppl 4, S9-12. <https://doi.org/10.1186/cc3748>

Vincent, J.L., De Backer, D., 2001. Inotrope/vasopressor support in sepsis-induced organ hypoperfusion. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 22, 61–74. <https://doi.org/10.1055/s-2001-13841>

Vincent, J.-L., Francois, B., Zabolotskikh, I., Daga, M.K., Lascarrou, J.-B., Kirov, M.Y., Pettilä, V., Wittebole, X., Meziani, F., Mercier, E., Lobo, S.M., Barie, P.S., Crowther, M., Esmon, C.T., Fareed, J., Gando, S., Gorelick, K.J., Levi, M., Mira, J.-P., Opal, S.M., Parrillo, J., Russell, J.A., Saito, H., Tsuruta, K., Sakai, T., Fineberg, D., SCARLET Trial Group, 2019. Effect of a Recombinant Human Soluble Thrombomodulin on Mortality in Patients With Sepsis-Associated Coagulopathy: The SCARLET Randomized Clinical Trial. *JAMA* 321, 1993–2002. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.5358>

Vincent, J.L., Moreno, R., Takala, J., Willatts, S., De Mendonça, A., Bruining, H., Reinhart, C.K., Suter, P.M., Thijs, L.G., 1996. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med.* 22, 707–710.

Voll, R.E., Herrmann, M., Roth, E.A., Stach, C., Kalden, J.R., Girkontaite, I., 1997. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 390, 350–351. <https://doi.org/10.1038/37022>

von Brühl, M.-L., Stark, K., Steinhart, A., Chandraratne, S., Konrad, I., Lorenz, M., Khandoga, A., Tirniceriu, A., Coletti, R., Köllnberger, M., Byrne, R.A., Laitinen, I., Walch, A., Brill, A., Pfeiler, S., Manukyan, D., Braun, S., Lange, P., Riegger, J., Ware, J., Eckart, A., Haidari, S., Rudelius, M., Schulz, C., Ehtler, K., Brinkmann, V., Schwaiger, M., Preissner, K.T., Wagner, D.D., Mackman, N., Engelmann, B., Massberg, S., 2012. Monocytes,

neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J. Exp. Med.* 209, 819–835. <https://doi.org/10.1084/jem.20112322>

von Köckritz-Blickwede, M., Chow, O.A., Nizet, V., 2009. Fetal calf serum contains heat-stable nucleases that degrade neutrophil extracellular traps. *Blood* 114, 5245–5246. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-08-240713>

Wagner, J.G., Roth, R.A., 1999. Neutrophil migration during endotoxemia. *J. Leukoc. Biol.* 66, 10–24.

Walenta, K.L.H., Link, A., Friedrich, E.B., Böhm, M., 2009. Circulating microparticles in septic shock. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 180, 100; author reply 100-101. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.180.1.100>

Walford, G., Loscalzo, J., 2003. Nitric oxide in vascular biology. *J. Thromb. Haemost. JTH* 1, 2112–2118.

Wang, J.-G., Williams, J.C., Davis, B.K., Jacobson, K., Doerschuk, C.M., Ting, J.P.-Y., Mackman, N., 2011. Monocytic microparticles activate endothelial cells in an IL-1 β -dependent manner. *Blood* 118, 2366–2374. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-330878>

Wang, X., Qin, W., Sun, B., 2014. New strategy for sepsis: Targeting a key role of platelet-neutrophil interaction. *Burns Trauma* 2, 114. <https://doi.org/10.4103/2321-3868.135487>

Wang, X., Zhao, J., Cai, C., Tang, X., Fu, L., Zhang, A., Han, L., 2018. A Label-Free Quantitative Proteomic Analysis of Mouse Neutrophil Extracellular Trap Formation Induced by *Streptococcus suis* or Phorbol Myristate Acetate (PMA). *Front. Immunol.* 9, 2615. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02615>

Warren, B.L., Eid, A., Singer, P., Pillay, S.S., Carl, P., Novak, I., Chalupa, P., Atherstone, A., Péntzes, I., Kübler, A., Knaub, S., Keinecke, H.O., Heinrichs, H., Schindel, F., Juers, M., Bone, R.C., Opal, S.M., KyberSept Trial Study Group, 2001. Caring for the critically ill patient. High-dose antithrombin III in severe sepsis: a randomized controlled trial. *JAMA* 286, 1869–1878. <https://doi.org/10.1001/jama.286.15.1869>

Weaver, C.T., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Harrington, L.E., 2007. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 821–852. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141557>

Wildhagen, K.C.A.A., García de Frutos, P., Reutelingsperger, C.P., Schrijver, R., Aresté, C., Ortega-Gómez, A., Deckers, N.M., Hemker, H.C., Soehnlein, O., Nicolaes, G.A.F., 2014. Nonanticoagulant heparin prevents histone-mediated cytotoxicity in vitro and improves survival in sepsis. *Blood* 123, 1098–1101. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-07-514984>

Wilson, J.X., Wu, F., 2012. Vitamin C in sepsis. *Subcell. Biochem.* 56, 67–83. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2199-9_5

- Wu, F., Cepinskas, G., Wilson, J.X., Tyml, K., 2001. Nitric oxide attenuates but superoxide enhances iNOS expression in endotoxin- and IFN γ -stimulated skeletal muscle endothelial cells. *Microcirc.* N. Y. N 1994 8, 415–425. <https://doi.org/10.1038/sj/mn/7800113>
- Xu, J., Zhang, X., Pelayo, R., Monestier, M., Ammollo, C.T., Semeraro, F., Taylor, F.B., Esmon, N.L., Lupu, F., Esmon, C.T., 2009. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat. Med.* 15, 1318–1321. <https://doi.org/10.1038/nm.2053>
- Xu, Z., Huang, Y., Mao, P., Zhang, J., Li, Y., 2015. Sepsis and ARDS: The Dark Side of Histones. *Mediators Inflamm.* 2015, 205054. <https://doi.org/10.1155/2015/205054>
- Yaguchi, A., Lobo, F.L.M., Vincent, J.-L., Pradier, O., 2004. Platelet function in sepsis. *J. Thromb. Haemost. JTH* 2, 2096–2102. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2004.01009.x>
- Yamakawa, K., Umemura, Y., Murao, S., Hayakawa, M., Fujimi, S., 2019. Optimal Timing and Early Intervention With Anticoagulant Therapy for Sepsis-Induced Disseminated Intravascular Coagulation. *Clin. Appl. Thromb. Off. J. Int. Acad. Clin. Appl. Thromb.* 25, 1076029619835055. <https://doi.org/10.1177/1076029619835055>
- Yang, C.-W., Strong, B.S.I., Miller, M.J., Unanue, E.R., 2010. Neutrophils influence the level of antigen presentation during the immune response to protein antigens in adjuvants. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 185, 2927–2934. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001289>
- Yang, D., de la Rosa, G., Tewary, P., Oppenheim, J.J., 2009. Alarmins link neutrophils and dendritic cells. *Trends Immunol.* 30, 531–537. <https://doi.org/10.1016/j.it.2009.07.004>
- Yang, S., Qi, H., Kan, K., Quan, C., Xie, H., Guo, X., Zhang, L., 2016. Neutrophil Extracellular Traps Promote Hypercoagulability in Patients with Sepsis. *Shock* Augusta Ga. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000741>
- Yipp, B.G., Kubes, P., 2013. NETosis: how vital is it? *Blood* 122, 2784–2794. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-04-457671>
- Zafrani, L., Gerotziafas, G., Byrnes, C., Hu, X., Perez, J., Lévi, C., Placier, S., Letavernier, E., Leelahavanichkul, A., Haymann, J., Elalamy, I., Miller, J.L., Star, R.A., Yuen, P.S.T., Baud, L., 2012. Calpastatin controls polymicrobial sepsis by limiting procoagulant microparticle release. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 185, 744–755. <https://doi.org/10.1164/rccm.201109-1686OC>
- Zarbock, A., Ley, K., 2008. Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium. *Am. J. Pathol.* 172, 1–7. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070502>
- Zeerleder, S., Schroeder, V., Hack, C.E., Kohler, H.P., Wuillemin, W.A., 2006. TAFI and PAI-1 levels in human sepsis. *Thromb. Res.* 118, 205–212. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2005.06.007>

Zhang, Q., Raoof, M., Chen, Y., Sumi, Y., Sursal, T., Junger, W., Brohi, K., Itagaki, K., Hauser, C.J., 2010. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* 464, 104–107. <https://doi.org/10.1038/nature08780>

Zhang, Y., Li, J., Lou, J., Zhou, Y., Bo, L., Zhu, J., Zhu, K., Wan, X., Cai, Z., Deng, X., 2011. Upregulation of programmed death-1 on T cells and programmed death ligand-1 on monocytes in septic shock patients. *Crit. Care Lond. Engl.* 15, R70. <https://doi.org/10.1186/cc10059>

Zhao, W., Fogg, D.K., Kaplan, M.J., 2015. A novel image-based quantitative method for the characterization of NETosis. *J. Immunol. Methods* 423, 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2015.04.027>

Zigmond, S.H., 1974. Mechanisms of sensing chemical gradients by polymorphonuclear leukocytes. *Nature* 249, 450–452.

Zwaal, R.F., Schroit, A.J., 1997. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* 89, 1121–1132.

Résumé

Ce travail visait à étudier l'activation des polynucléaires neutrophiles (PNNs) au cours du choc septique. Après une introduction sur la physiopathologie du choc septique, de la coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) et des PNNs, nous rapportons différents résultats expérimentaux et cliniques. Dans une étude prospective sur 100 patients, nous avons montré que l'activation des PNNs, mesurée par leur fluorescence en cytométrie en flux pourrait représenter un marqueur diagnostique original de la CIVD du choc septique. Ensuite, nous avons mis en évidence un des mécanismes de l'activation des PNNs, la NETose, à l'aide de marqueurs sériques. Afin de confirmer la relevance de ce phénomène, nous avons visualisé les NETs spécifiquement dans le sang de patients en choc septique avec CIVD en immunofluorescence. Enfin, nous avons identifié des protéines associées à l'activation du PNN dans la CIVD du choc septique par une étude protéomique, afin d'en envisager les mécanismes. Le PNN pourrait ainsi être un acteur incontournable de la dérégulation de l'immuno-thrombose au cours de la CIVD, et être envisagé comme cible thérapeutique.

Mots clefs : polynucléaire neutrophile, NETose, choc septique, coagulation intravasculaire disséminée, inflammation, activation cellulaire, biomarqueur, protéomique.

Résumé en anglais

This PhD thesis focused on the activation of polymorphonuclear granulocytes (PMNs) during septic shock. After an introduction including an overview on pathophysiology of septic shock, disseminated intravascular coagulation (DIC) and PMNs, original experimental and clinical data are reported. In a prospective study, we enrolled 100 patients and showed that neutrophils' activation measured by neutrophil fluorescence using flow cytometry could represent an original biomarker of septic shock-induced DIC. Furthermore, we highlighted a mechanism of neutrophil's activation: NETosis, through assessment of indirect serum's markers associated specifically to DIC during septic shock. In order to confirm the relevance of this result, we reported a direct visualization of circulating NETs in blood of DIC-patients using immunofluorescence. Finally, we performed a proteomic study and identified some proteins involved in neutrophils' activation during septic shock-induced DIC. Thus, PMN could represent an important actor of *immuno-thrombosis*' deregulation during DIC, and could be considered as a potential therapeutic target.

Key words: polymorphonuclear granulocyte, NETosis, septic shock, disseminated intravascular coagulation, inflammation, cellular activation, biomarker, proteomic analysis.