



HAL
open science

Etude de l 'expression du stress du reticulum endoplasmique au cours de l'inflammation systémique aigue chez l'homme

Thomas Clavier

► **To cite this version:**

Thomas Clavier. Etude de l 'expression du stress du reticulum endoplasmique au cours de l'inflammation systémique aigue chez l'homme. Immunologie. Normandie Université, 2020. Français. NNT : 2020NORMR015 . tel-03189281

HAL Id: tel-03189281

<https://theses.hal.science/tel-03189281>

Submitted on 3 Apr 2021

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.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Sciences de la Vie et de la Santé

Préparée au sein de l'Université de Rouen

Étude de l'expression du stress du réticulum endoplasmique au cours de l'inflammation systémique aiguë chez l'Homme

**Présentée et soutenue par
Thomas CLAVIER**

**Thèse soutenue publiquement le 02 Avril 2020
devant le jury composé de**

Mme. le Pr. Carole ICHAI	PU-PH / Université de Nice	Rapporteur
M. le Pr. Emmanuel LORNE	PU-PH / Université d'Amiens	Rapporteur
Mme. le Pr. Fabienne TAMION	PU-PH / Université de Rouen	Directeur de thèse
M. le Pr. Benoît VEBER	PU-PH / Université de Rouen	Codirecteur de thèse
M. le Pr. Vincent RICHARD	PU-PH / Université de Rouen	Membre invité

Thèse dirigée par Mme. le Pr. Fabienne TAMION (INSERM 1096) et codirigée par M. le Pr. Benoît VEBER (EA 2656)



TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES.....	1
REMERCIEMENTS.....	5
INDEX DES TABLES ET FIGURES.....	11
LISTE DES ABRÉVIATIONS	12
RÉSUMÉ.....	15
ABSTRACT	16
INTRODUCTION GÉNÉRALE	17
I- L'inflammation systémique	19
1. Les réponses inflammatoires systémiques septique et aseptique	19
1. Le concept de syndrome de réponse inflammatoire systémique.....	19
2. Inflammation systémique infectieuse : le sepsis	20
3. Inflammation systémique aseptique : l'exemple de la chirurgie cardiaque sous circulation extra- corporelle	24
2. Initiation et physiopathologie de la réponse inflammatoire systémique.....	27
1. Reconnaissance de l'agression.....	27
2. Réponse pro-inflammatoire.....	28
i. Activation leucocytaire.....	28
ii. Synthèse cytokinique	29
iii. Espèces réactives de l'oxygène	30
3. Activation du complément.....	31
4. Activation de la coagulation.....	32
5. Immunosuppression et réponse anti-inflammatoire	33
6. Rôle des cellules circulantes non-leucocytaires dans la réponse inflammatoire systémique aigüe..	36
3. Physiopathologie de la dysfonction vasculaire lors d'une réponse inflammatoire systémique	37
1. Rappels de physiologie endothéliale	37
i. L'endothélium	37

ii.	Les jonctions intercellulaires	39
iii.	Le glycocalyx.....	40
iv.	Les cellules musculaires lisses	40
2.	Effets de l'inflammation systémique sur l'endothélium	41
i.	Adhésion leucocytaire	41
ii.	Dérégulation de la physiologie du NO.....	42
iii.	Dégradation du glycocalyx	42
iv.	Lésions directes des cellules endothéliales	43
3.	Impact clinique de la dysfonction endothéliale lors de l'inflammation systémique aigüe	43
i.	Vasoplégie et dysfonction vasculaire	43
ii.	Liens entre dysfonction endothéliale induite par le SIRS et morbi-mortalité chez l'Homme	44
iii.	Dysfonction endothéliale liée au SIRS : quelle thérapeutique ?	46
II-	Le stress du réticulum endoplasmique	47
1.	Physiologie du réticulum endoplasmique dans la maturation protéique	47
2.	Mécanismes moléculaires du stress du réticulum endoplasmique	49
1.	Stress du réticulum endoplasmique et <i>Unfolded Protein Response</i>	49
2.	Voies de signalisation de l' <i>Unfolded Protein Response</i>	49
i.	La voie Inositol-Requiring Protein-1 alpha	51
ii.	La voie Protein Kinase RNA (PKR)-like ER Kinase.....	51
iii.	La voie Activating Transcription Factor 6	52
iv.	Fonctions communes des voies de l'UPR	53
3.	Stress du réticulum endoplasmique et dysfonction endothéliale	53
3.	Stress du réticulum endoplasmique et pathologies inflammatoire aigües	54
1.	Dans des modèles animaux.....	54
2.	Chez l'Homme	56
4.	Stress du réticulum endoplasmique et protéine tyrosine phosphatase 1B.....	56
1.	La protéine tyrosine phosphatase 1B	56
i.	Phylogénie et localisation cellulaire	56
ii.	Régulation de l'activité.....	57
2.	Protéine tyrosine phosphatase 1B et pathologies	58
i.	Pathologies métaboliques	58
ii.	Pathologies cardiovasculaires et inflammatoires.....	59
3.	Liens entre protéine tyrosine phosphatase 1B et stress du réticulum endoplasmique	60
	OBJECTIF DE LA THESE	63
	RÉSULTATS	65

I- Cinétique et expression des voies de l' <i>Unfolded Protein Response</i> au cours du SIRS septique	66
II- Cinétique et expression des voies de l' <i>Unfolded Protein Response</i> au cours du SIRS aseptique (chirurgie cardiaque sous CEC)	77
DISCUSSION GENERALE ET SYNTHESE	103
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	109
COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES	113
I- Publications	113
1. Publications dans des périodiques à comité de lecture	113
1. Articles originaux	113
2. Revues de la littérature	116
3. Lettres à la rédaction, mini-revues et case reports.....	116
2. Ouvrages	117
3. Actes de congrès.....	118
II- Communications affichées en 1 ^{er} auteur	118
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	121

REMERCIEMENTS

A mon jury de thèse,

Je remercie tout d'abord Mme le Pr. Fabienne Tamion, ma directrice de thèse, de m'avoir permis de mener à bien ce travail. Vous avez accepté de m'encadrer et de m'accompagner au cours de ces années de thèse, un énorme merci pour votre bienveillance, vos conseils et vos encouragements. Merci pour votre enthousiasme, votre bonne humeur et pour nos discussions scientifiques.

Je remercie M. le Pr. Benoît Veber qui m'a fait l'honneur de co-encadrer ce travail. Merci pour vos conseils, votre suivi depuis maintenant 10 ans et votre implication dans ma formation. Si je passe cette thèse aujourd'hui, c'est en grande partie grâce à vous.

Je remercie Mme le Pr. Carole Ichaï et M. le Pr Emmanuel Lorne de m'avoir fait l'honneur de relire cette thèse et d'apporter leur expérience et leur expertise reconnue sur ce travail. Soyez assurés de mon profond respect et de ma sincère gratitude.

Je remercie M. le Pr. Vincent Richard qui m'a accueilli au sein de son laboratoire et accordé sa confiance dans le cadre de ce travail. Merci pour vos conseils méthodologiques et pour votre point de vue rigoureux sur notre travail transversal. Mon année dans votre unité m'a permis de renforcer ma culture scientifique et de découvrir des thématiques de recherche passionnantes.

Je tiens également à remercier les institutions qui ont permis la réalisation de ce travail, tant sur le plan financier que logistique : le CHU de Rouen, l'école doctorale NBISE et l'INSERM.

Je remercie infiniment l'**ensemble des membres de l'équipe INSERM U1096**. Vous m'avez tous accueilli chaleureusement et pris le temps de répondre à mes (innombrables !) questions.

Je remercie particulièrement :

Zoé, ma M2 binôme de STRECH. Tu m'as aidé pour une grande partie des manip de la 2^e partie de thèse, les discussions avec toi ont été passionnantes et je suis content de voir que la recherche transversale t'inspire autant que moi. Au plaisir de vite retravailler ensemble sur de futurs projets !

Nico, mon ami et le wikipedia du labo, merci pour tes nombreuses explications, pour les Western et, surtout, pour tout le reste.

Sylvanie qui m'a tout appris de la bio mol (en tout cas tout ce que je devais savoir !), un énorme merci pour tes explications, ton aide et tes démonstrations ces trois dernières années.

Khedi, la super secrétaire du 1096, qui est capable d'expliquer de façon compréhensible les bons de commandes ou les conventions. Merci pour ton aide et ta gentillesse !

Sylvain, pour ses explications sur l'interprétation des qPCR, le design des amorces et pour ses blagues et sa bonne humeur !

Paul, Ebba, Antoine, Jérémy, Dominique, Anaïs, Jean-Paul, Marine, pour votre bonne humeur et pour les discussions scientifiques lors des réunions du lundi.

Julie et Bérénice, mes voisines de bureau pour les séances de ragots et de fou-rires. Merci à toi Bébert pour les conseils d'écriture / mise en forme de la thèse !

Mes co-thésards : Mathieu S et Mathieu L, Marie, Déborah, Mouad et Marianne qui participent à la bonne ambiance du labo ! Merci à vous tous pour votre accueil durant mon année d'immersion au laboratoire.

David, Eugénie et Pierre-Alain, partis avant mon arrivée mais dont les travaux ont inspiré l'essence même de cette thèse !

Je remercie aussi sincèrement **mes collègues du CHU** et tout particulièrement :

M. le Pr. Bertrand Dureuil, merci de la qualité de la formation que j'ai reçu à Rouen et de vos précieux conseils tout au long de mon parcours pour m'aider à affiner et concrétiser

mon projet professionnel. Merci de m'avoir proposé un poste à l'issue de mon clinicat et de me permettre de m'épanouir professionnellement.

Vincent Compère, merci pour ton compagnonnage toutes ces années, pour tes conseils et pour ta bienveillance. Merci de m'avoir poussé à me poser les bonnes questions et de m'avoir aidé à chercher les bonnes réponses.

Manu, mon binôme, mon frère d'arme « U ». Merci pour les discussions, les fou-rires, les congrès / voyages ensemble (San-Francisco, Berlin, ...), pour le taff et pour le reste. Bref, merci pour ces moments d'amitié.

Djinn Slim, dernier anesth arrivé dans la team « je passe mes week-ends à écrire ma thèse et à me faire jeter par les reviewers », c'est un plaisir de bosser avec toi.

La team réa chir : Philippe, Emilie, PG, Samia, Mathilde, Edgar et les petits jeunes Antoine, Andréa, Thomas et Anaïs. Merci pour votre accueil et pour la bonne ambiance de travail au quotidien, c'est une chance de se lever le matin et d'aller travailler avec vous ! Merci à ceux d'entre vous qui m'ont formé quand j'étais plus jeune et qui m'ont donné envie de faire ce que je fais aujourd'hui.

La team chir card sans qui la deuxième partie de ce travail n'aurait pas pu exister : Véro, Etienne, Roland, Victor, Elisabeth, Nath', Scheche, Gioia, Geoffrey, Arnaud.

Tous les MAR du CHU de Rouen : Lydian, Maaar, Christelle, Sébastien, Anne, Alex G et Alex B, Yannick, David T, David B, Gaele, Stéph', Véro F, Véro G, Pauline, Antoine, Nancy, Vanessa, Jean G, Eric, Sylvie, Marie-Claire, Jean-François, Violaine, Hélène, Jean-Baptiste, Claire, Jérôme, José, Greg, Aliénor, Véronique VS, Camille, Céline, Juliette, Lucie, Fred, Gerem, Arnaud, Yann, Vincent, Marie-Melody, Cédric, David G, et tous ceux que j'oublie ! Merci de m'avoir appris (et de m'apprendre encore !) pleins de choses, et merci pour le travail ensemble.

La team réa med sans qui la première partie de cette thèse n'aurait pas été possible : Dorothee, Steven, Gaëtan, Christophe, merci à vous d'avoir participé à ma formation de réanimateur dans la joie et la bonne humeur !

Enfin, je remercie tous **mes proches**, qui me soutiennent (et me supportent, dans tous les sens du terme) au quotidien :

A mes parents, qui m'ont donné l'envie de faire un métier qui me comble. Merci de m'avoir poussé, encouragé, soutenu, d'avoir toujours été à mes côtés dans mes réussites comme dans mes échecs et d'avoir été des exemples pour moi, du berceau jusqu'à la thèse... et encore après !

A ma sœur Hélène, dont la capacité à gérer simultanément 7653 choses reste, encore et toujours, un mystère insondable. Et grâce à toi on a accueilli Edouard, le best beau-frère *ever*. Merci pour ton sens de la famille, pour ta bonne humeur, pour ton courage et pour le soutien sans faille que tu apportes à tes proches !

A mon frère Jean-Baptiste, qui arrive être directeur financier sans savoir-faire de virement bancaire... tu as autant de paradoxes que de compétences ! Ta façon d'aborder la vie avec tant de recul et de relativisme est un sacré exemple pour un impatient comme moi... bravo frangin !

A Momo, Marie, Nico, Vinciane, Poggy et Fatna, l'urocentric group. Merci d'être là les mekameks et mekameufs !

Merci à Helga, Joël, Peccy et Nathalie, belle-famille de rêve, c'est un plaisir de partager des moments avec vous.

Enfin, un merci tout particulier à Marion. C'est toi qui supportes jour après jour, semaine après semaine et année après année mon investissement et mes activités professionnelles qui me font passer souvent trop de temps à travailler alors que je devrais être avec toi. Si cette thèse existe aujourd'hui c'est grâce à ton aide et ton soutien au quotidien. Merci pour ta patience, ta compréhension et ta bienveillance, vivre à tes côtés est un bonheur. Et merci de nous avoir donné Paul, notre plus belle réalisation. A côté de lui et de toi, bien peu de choses sont réellement importantes.

INDEX DES TABLES ET FIGURES

Tableau 1: Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score	21
Figure 1: Console de circulation extra-corporelle (CEC).....	24
Figure 2: Activation du facteur de transcription NF-κB par le récepteur du lipopolysaccharide	30
Figure 3: Représentation schématique (A) et au cours du temps (B) de l'équilibre de la réponse inflammatoire systémique.....	34
Figure 4: Réaction de synthèse du NO	38
Figure 5: Localisation intracellulaire et structure du réticulum endoplasmique.....	47
Figure 6: Mécanisme du repliement canonique dépendant des HSP70s	48
Figure 7: Voies de signalisation de l'Unfolded Protein Response	50
Figure 8: Effet de l'induction du SRE sur la fonction endothéliale chez des souris KO pour le gène codant la PTP1B	54
Figure 9: Implication de la PTP1B dans l'insulinorésistance liée au sepsis	58
Figure 10: Impact de l'inactivation génétique de la PTP1B sur l'expression des marqueurs vasculaires du stress du RE au cours du sepsis.....	61

LISTE DES ABRÉVIATIONS

4BPA: Acide 4-Phenylbutirique

ADN: Acide Désoxyribonucléique

ARN: Acide Ribonucléique

ARNm: ARN messenger

ATF: *Activating Transcription Factor*

BiP: *Binding Protein*

CARS: *Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome*

CEC: Circulation Extra-Corporelle

CHOP: *C/EBP Homologous Protein*

CIVD: Coagulation Intra-Vasculaire Disséminée

CLP: *Cecal Ligation and Puncture*

CLRs: *C-Type Lectin Receptors*

CMLV: Cellules Musculaires Lisses Vasculaires

DAMPs: *Damage-Associated Molecular Patterns*

eIF2 α : *α -subunit of Eukaryotic translation Initiation Factor 2*

eNOS: NOS endothéliale

ERAD: *ER-Associated Degradation*

ET-1: Endothéline 1

FEVG : Fraction d'Ejection Ventriculaire Gauche

GADD34: *Growth Arrest and DNA Damage-inducible protein 34;*

GLUT4: *Glucose Transporter 4*

GMPC: Guanosine Monophosphate cyclique

GP: Glycoprotéine

GRP78: *Glucose Related Protein 78 kDa*

HMGP1: *High–Mobility Group Box 1*

HOMA-IR: *Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance*

HSPA5: *Heat Shock 70 kDa Protein 5*

HSPs 70: *Heat Shock Protein 70 kDa*

ICAM-1: *Inter-Cellular Adhesion Molecule 1*

IFABP: *Intestinal Fatty Acid Binding Protein*

IKK: *Inhibitor of Kappa B Kinase*

IL: Interleukine

IL-1Ra: Antagoniste au récepteur de l'IL-1

iNOS: NOS inductible

IRE1 α : *Inositol-Requiring Protein-1 alpha*

IRS-1: *Insulin Receptor Substrate-1*

I κ B α : *Inhibitor of Kappa B α ;*

KDIGO: *Kidney Disease Improving Global Outcomes*

LPS: Lipopolysaccharides

MyD88: *Myeloid Differentiation primary response gene 88;*

NADPH: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduite

NET: *Neutrophil Extracellular Trap*

NF- κ B: *Nuclear factor-kappa B*

nNOS: NOS neuronale

NO: Monoxyde d'azote

NOS: NO Synthase

NLRs: *Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-Like Receptors*

PA: *Plasminogen Activator*

PAI: *Plasminogen Activator Inhibitor*

PAM: Pression Artérielle Moyenne

PAMPs: *Pathogen-Associated Molecular Patterns*

PARs: *Protease Activated Receptors*

PERK: *Protein Kinase RNA (PKR)-like ER Kinase*

PPR: *Pattern Pathogen Receptors*

PTP: *Protein Tyrosine Phosphatases*

PTP1B: *Protein Tyrosine Phosphatase 1B*

RE: Réticulum Endoplasmique

RIDD: *Regulated IRE1 Dependant Decay*

RLRs: *Retinoic Acid Inducible Gene 1-Like Receptors*

RNase: Endoribonuclease;

RNS: *Reactive Nitrogen Species*

ROS: *Reactive Oxygen Species*

S1(2)P: *site-1(2) protease;*

SDRA: Syndrome de Détresse Respiratoire Aigüe

SIRS: *Systemic Inflammatory Response Syndrome*

SOFA: *Sequential Organ Failure Assessment*

SRAS: Syndrome Respiratoire Aigu Sévère

SRE: Stress du Réticulum Endoplasmique

sXBP1: *spliced XBP1*

TLR: *Toll-Like Receptors*

TNF- α : *Tumor Necrosis Factor- α*

UPR: *Unfolded Protein Response*

VCAM-1: *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*

XBP1: *X-box Binding Protein 1*

RÉSUMÉ

Le syndrome de réponse inflammatoire systémique est une entité fréquente en réanimation. Ses causes sont nombreuses et parfois intriquées : sepsis, traumatisme, chirurgie lourde, circulation extra-corporelle (CEC), ischémie-reperfusion, ... Sa physiopathologie repose sur la synthèse de cytokines, l'activation des cellules immunitaires et de la coagulation et l'altération de la fonction endothéliale. Ces anomalies induisent une dysfonction vasculaire pouvant être responsable d'un état de choc et d'un syndrome de défaillance d'organes (Syndrome de Détresse Respiratoire Aigüe, insuffisance rénale, syndromes confusionnels, ...).

Des données récentes ont montré qu'un mécanisme cellulaire adaptatif, le stress du réticulum endoplasmique (SRE), est impliqué dans la dysfonction endothéliale et les défaillances d'organes induites par l'inflammation systémique. Le SRE correspond à l'accumulation de protéines non repliées au sein du réticulum endoplasmique, accumulation pouvant altérer le fonctionnement cellulaire et aller jusqu'à induire l'apoptose. L'*Unfolded Protein Response* (UPR) est un mécanisme de réponse au SRE qui permet de replier ces protéines, en particulier *via* la synthèse de protéines chaperonnes. L'UPR permet donc la résolution du SRE. Des travaux pré-cliniques ont montré que l'inhibition du SRE au cours du sepsis ou de l'inflammation stérile *via* des chaperonnes chimiques diminuait la défaillance d'organe et améliorait la survie. Il n'existe cependant aucune description de cette réponse lors de l'inflammation systémique aigüe chez l'Homme.

Nous montrons dans ce travail que les trois voies de l'UPR sont activées au cours du sepsis et de l'inflammation induite par la CEC. Au cours du sepsis l'expression d'une voie de l'UPR était associée au score de défaillances d'organes SOFA. Chez les patients bénéficiant d'une chirurgie cardiaque sous CEC, une réponse UPR relativement faible et une moindre synthèse de chaperonnes étaient associées à une défaillance d'organe post-opératoire. Nos données confirment donc que l'UPR est activée chez l'Homme lors d'une inflammation systémique et que l'intensité de son expression semble associée à la défaillance d'organe.

Mots clés : inflammation, stress du réticulum endoplasmique, endothélium, sepsis, circulation extra-corporelle

ABSTRACT

Systemic inflammatory response syndrome is a common phenomenon in intensive care unit. Its origins are multiple and sometimes intricate: sepsis, trauma, major surgery, cardiopulmonary bypass (CPB), ischemia-reperfusion, acute pancreatitis, ... Its physiopathology is based on cytokine synthesis, activation of immune cells and coagulation, and alteration of endothelial function (in particular nitrogen monoxide synthesis). These abnormalities induce vascular dysfunction which may be responsible for a shock and multiple organ failure syndrome (Acute Respiratory Distress Syndrome, renal failure, confusional syndromes, ...).

Recent data have shown that endoplasmic reticulum stress (ERS), is involved in endothelial dysfunction and organ failure induced by systemic inflammation. ERS corresponds to the accumulation of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum, accumulation that can alter cell function and even induce apoptosis. The Unfolded Protein Response (UPR) is a response to ERS that allows the proteins to be folded, in particular through the synthesis of chaperone proteins and therefore allows the ERS resolution. Pre-clinical studies have shown that ERS inhibition during sepsis or sterile inflammation *via* chemical chaperones reduces organ failure and improves survival. However, there is no description of UPR during systemic inflammation in humans.

We show in this work that all the three UPR pathways are activated during sepsis and CPB-induced inflammation. During sepsis the expression of one UPR pathway was associated with the SOFA organ failure score. In patients undergoing cardiac surgery with CPB, a relatively low UPR response and a decreased chaperone synthesis were associated with post-operative organ failure. Our data therefore confirm that UPR is activated in humans during systemic inflammation and that the intensity of its expression appears to be associated with organ failure.

Keywords: inflammation, endoplasmic reticulum stress, endothelium, sepsis, cardiopulmonary bypass

INTRODUCTION GÉNÉRALE

I- L'inflammation systémique

1. Les réponses inflammatoires systémiques septique et aseptique

1. Le concept de syndrome de réponse inflammatoire systémique

L'inflammation est un processus de réponse stéréotypé de l'organisme à une agression externe ou interne. On peut distinguer les situations d'inflammation aiguë et celles d'inflammation chronique, par exemple dans les situations de néoplasie ou d'athérosclérose. Bien que la base physiopathologique soit commune à ces deux types d'inflammation, leurs étiologies, leur intensité ou les voies de signalisation en jeu sont souvent différentes.

L'inflammation aiguë localisée est liée à la libération locale de médiateurs inflammatoires (histamine, bradykinines, médiateurs lipidiques ...) conduisant à un œdème avec infiltration leucocytaire secondaire, réalisant le classique tableau « rougeur-chaueur-douleur ». Au-delà de cette inflammation localisée qui est fréquemment rencontrée dans les situations d'infection locale ou de traumatismes légers, certaines situations pathologiques vont conduire à des tableaux d'inflammation aiguë « généralisée » avec atteinte de plusieurs organes. Un syndrome clinique attestant d'une réponse inflammatoire systémique a ainsi été décrit dès 1992 : il s'agit du Syndrome de Réponse Inflammatoire Systémique (*Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS)) [1]. Celui-ci associe plusieurs éléments dont la présence d'au moins deux d'entre eux définit un SIRS :

- Température corporelle > 38,3 °C ou < 36 °C
- Fréquence cardiaque > 90/min
- Fréquence respiratoire > 20/min ou hyperventilation avec PaCO₂ < 32 mmHg en air ambiant
- Leucocytose > 12.000/mm³ ou < 4.000/mm³ ou > 10 % de cellules immatures

Sur le plan clinique, de très nombreuses situations peuvent conduire au tableau de SIRS : infection microbienne, polytraumatisme, pancréatite aiguë, circulation extra-corporelle, ischémie de membre, arrêt cardiaque récupéré, choc hémorragique, etc. Sur le plan nosologique, il est classique de distinguer le SIRS septique du SIRS aseptique dont les *triggers* et voies de signalisation mises en jeu à la phase initiale sont sensiblement différents.

2. Inflammation systémique infectieuse : le sepsis

La toute première définition du SIRS vient d'une conférence de consensus cherchant à mieux définir les critères de sepsis [1]. Jusqu'à récemment, le sepsis était un SIRS d'origine infectieuse: le sepsis sévère associait sepsis et hypotension artérielle répondant au remplissage vasculaire (et/ou associé à la dysfonction d'au moins un organe) et le choc septique correspondait à un sepsis avec une inadéquation entre le besoin tissulaire et l'apport effectif en oxygène [1]. Depuis 2016, ces définitions ont été modifiées afin de simplifier l'identification et permettre une prise en charge plus précoce. Ainsi, la définition du sepsis est maintenant l'association d'une infection avec un score SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment* ; cf. Tableau 1) supérieur ou égal à 2 points (ou une augmentation du score supérieure ou égale à 2 points s'il existait une dysfonction d'organe avant l'infection) [2]. Le concept de sepsis sévère a disparu et le choc septique est maintenant défini par les trois éléments suivants :

- Présence d'un sepsis (infection + SOFA score ≥ 2) ;
- Hypotension artérielle persistante nécessitant des vasopresseurs pour maintenir une pression artérielle moyenne (PAM) ≥ 65 mm Hg ;
- Taux sérique de lactate > 2 mmol/L malgré une expansion volumique « adéquate ».

Le sepsis est un problème de santé publique avec une incidence en constante augmentation qui représente maintenant 10 à 20 % des admissions en réanimation [3,4]. Il reste une cause majeure de morbi-mortalité avec, selon les études, un taux de mortalité oscillant de 20 à 50% pour le choc septique [4–6]. Enfin, l'impact économique du sepsis est lourd avec un coût hospitalier oscillant de 23 000 à 34 000 euros par patient septique admis en réanimation dans un pays occidental [7]. Malgré une meilleure connaissance de sa physiopathologie, des traitements dits « spécifiques » font toujours défaut, ce qui a conduit l'Organisation Mondiale de la Santé à déclarer en 2017 le sepsis comme devant être une priorité sanitaire mondiale [8].

Tableau 1: Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score

Le SOFA score est utilisé en soins intensifs et en réanimation pour déterminer et suivre l'état d'un patient avec une défaillance d'organe.

Score	0	1	2	3	4
Respiratoire PaO ₂ /FiO ₂ (mmHg)	> 400	< 400	<300	<200	<100
Coagulation Plaquettes (G/mm ³)	> 150	< 150	< 100	< 50	< 20
Foie Bilirubine (µmol/l)	< 20	20-32	33-101	102-204	> 204
Cardiovasculaire Hypotension artérielle	PAM ≥ 70 mmHg	PAM < 70 mmHg	Dopamine < 5 µg/kg/min ou Dobutamine	Dopamine 5-15 µg/kg/min ou Noradrénaline ≤ 0,1 µg/kg/min	Dopamine > 15 µg/kg/min ou Noradrénaline > 0,1 µg/kg/min
Neurologique Score de Glasgow	15	13-14	10-12	6-9	< 6
Rein Créatinine (µmol/l) ou Diurèse	< 110	110-170	171-299	300-440 et/ou < 500 ml/jr	> 440 et/ou < 200 ml/jr

Le choc septique se caractérise par la présence d'une défaillance d'organe. Toutes les fonctions vitales peuvent être atteintes dans ce contexte :

- L'atteinte myocardique : au-delà de la dysfonction endothéliale et vasculaire (*cf. infra*), il existe fréquemment une atteinte myocardique impliquée dans la majoration de la défaillance hémodynamique. Cette dysfonction concerne environ 50% des patients, dans sa forme la plus grave elle peut prendre la forme d'un choc cardiogénique septique avec altération de la fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG) [9]. Les données sur les liens entre dysfonction diastolique ou ventriculaire droite sont contradictoires bien qu'il semble

qu'une altération de ces deux fonctions soit associée à la morbi-mortalité en réanimation [10]. La noradrénaline fait partie du traitement symptomatique du choc septique mais la correction rapide de la vasoplégie peut parfois, en majorant brutalement la postcharge, décompenser une cardiopathie septique avec apparition d'une altération de la FEVG induite par cette postcharge [11]. La physiopathologie de cette défaillance n'est pas totalement élucidée et implique probablement plusieurs mécanismes aspécifiques: œdème myocardique, altération de la microcirculation du réseau coronarien, libération de radicaux libres cardiomyocytaires, lésion directes induites par les endotoxines, dysfonction mitochondriale, anomalies des flux calciques [10].

- L'atteinte pulmonaire : le Syndrome de Détresse Respiratoire Aigüe (SDRA, caractérisé par un rapport $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300$ mmHg) est une complication bien décrite du sepsis qui est sa principale étiologie [12]. Sa survenue au cours du choc septique augmente le risque de mortalité de 25 à 60% [12,13]. Dans un travail mené chez 703 patients septiques, l'existence d'un variant génotypique du gène codant l'angiopoïétine 2 (un marqueur de perméabilité endothéliale) et les niveaux circulants d'angiopoïétine 2 étaient tous les deux associés à la survenue d'un SDRA [14]. Ces données suggèrent un effet direct de la dysfonction endothéliale dans la survenue du SDRA septique. L'activation de la cascade de la coagulation, elle aussi induite par une dysfonction endothéliale systémique, est à l'origine d'une atteinte pulmonaire avec l'apparition de micro-thrombi pulmonaires et l'activation de l'endothélium pulmonaire qui devient ainsi perméable [15]. Enfin, l'action toxique directe des cytokines et des endotoxines sur l'endothélium pulmonaire est une autre cause bien admise de survenue d'un SDRA au cours du sepsis [16]. Si les stratégies de ventilation protectrice ont montré leur efficacité dans la réduction de la mortalité liée au SDRA, il n'existe aucun traitement pharmacologique préventif ou curatif ciblé sur ces lésions.

- L'atteinte rénale : l'*Acute Kidney Injury* septique des anglo-saxons correspond à une atteinte multifactorielle de la fonction rénale. Il est aujourd'hui catégorisé suivant la classification *Kidney Disease Improving Global Outcomes* (KDIGO) en fonction des chiffres de créatinine et de diurèse. Son incidence oscille de 22 à 53% selon les études récentes [17–19]. Chez le patient septique, l'*Acute Kidney Injury* est associé à une augmentation de la durée de séjour et à une surmortalité [19]. Il peut se développer y compris si le débit cardiaque et la macro-circulation sont maintenus, suggérant des atteintes liées au sepsis, indépendantes de

la perfusion rénale. Une dysfonction de l'endothélium rénal avec la perte de l'adéquation entre tonus des artérioles glomérulaires afférentes et efférentes pourrait aboutir à une diminution de la pression de filtration glomérulaire indépendamment du débit cardiaque [19,20]. De plus, l'épuration des cytokines et endotoxines est suspectée d'être une pourvoyeuse de lésions tubulaires par effet toxique direct [21]. De nombreuses questions restent en suspens concernant la prise en charge de l'*Acute Kidney Injury* septique : quel biomarqueur pour le détecter précocement ? Quand initier l'épuration extra-rénale ? Quel soluté d'expansion volémique privilégier pour limiter son incidence ?

- L'atteinte neurologique : l'atteinte du système nerveux central concerne environ 70% des patients septiques et peut aller de la simple confusion au tableau de coma [22]. Bien que sa physiopathologie soit insuffisamment comprise, ses étiologies semblent multiples : bas débit cérébral lié à l'état de choc, stress induit par les espèces réactives de l'oxygène au niveau neuronal, altération des neurotransmissions cholinergique et dopaminergique [16]. Certains auteurs suggèrent, à partir de données pré-cliniques, que l'altération endothéliale de la barrière hémato-encéphalique, responsable d'une hyperperméabilité vasculaire, pourrait induire un œdème cérébral significatif d'autant plus symptomatique que survenant dans un organe situé dans une cavité inextensible [23]. Le fait que la perte de l'auto-régulation cérébrale, témoin de l'altération vasculaire locale, soit associée au *delirium* chez le patient septique semble être en faveur de cette hypothèse sur le lien entre dysfonction endothéliale et défaillance neurologique septique [24].

- L'atteinte hépatique: le foie, qui synthétise une grande partie des protéines de la réponse inflammatoire aigüe (fibrinogène, C-reactive protein, cytokines...), est un organe central dans la réaction de l'organisme à l'infection [25]. Plusieurs éléments rendent l'évaluation de l'incidence de la défaillance hépatique septique difficile : absence d'une définition clairement établie, organe longtemps asymptomatique jusqu'à une défaillance terminale, nombreux facteurs pouvant biaiser l'interprétation des paramètres biologiques hépatiques (baisse du TP et coagulopathie, perturbations des transaminases et syndrome de lyse, hyperbilirubinémie fréquemment induite par les bêtalactamines, etc.). Selon la définition retenue, son incidence semble osciller de 1 à 34% [16,26]. Dans un travail s'intéressant à l'incidence de l'hépatite hypoxique à l'admission en réanimation (transaminases > 5N sans autre cause retrouvée), les auteurs ont retrouvé une incidence de 4% d'hépatite dont 30%

étaient liées à un sepsis [27]. Le foie est un organe relativement résistant à l'hypoxie ce qui explique probablement sa moindre défaillance lors du sepsis. Du fait des limites liées à sa définition et à de nombreux facteurs confondants, il existe peu de données sur l'impact de la défaillance hépatique sur la morbi-mortalité au cours du choc septique bien que l'importance de la cytolyse semble associée à la mortalité en réanimation [27,28].

3. Inflammation systémique aseptique : l'exemple de la chirurgie cardiaque sous circulation extra-corporelle

La circulation extra-corporelle (CEC) est un dispositif qui permet les manipulations chirurgicales à cœur arrêté en shuntant le cœur et les poumons par dérivation de la circulation sanguine en dehors du corps (Figure 1).

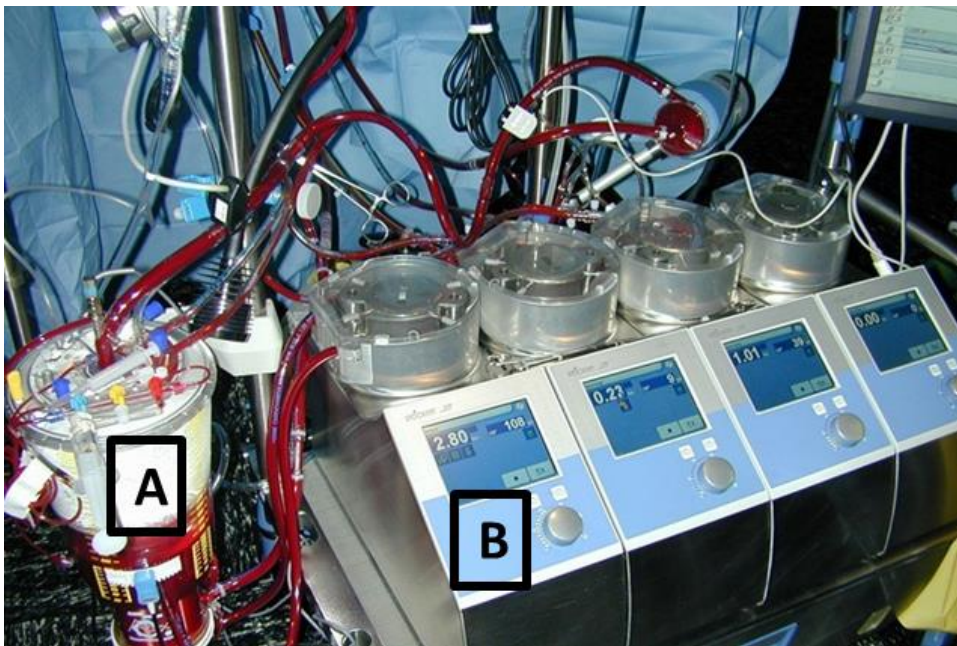


Figure 1: Console de circulation extra-corporelle (CEC)

Le sang veineux est recueilli passivement dans le récupérateur (A) puis est oxygéné, décarboxylé et réinjecté *via* la canule artérielle à un débit fixé par le perfusionniste sur la console de CEC (B).

Au cours de la CEC, le cœur est arrêté grâce à la perfusion d'une solution de cardioplégie au sang, contenant du potassium et des bêtabloquants, ou au Custodiol® (solution commerciale). L'objectif de la CEC est de maintenir la perfusion systémique, d'assurer les échanges gazeux et de régler la température. Dans le circuit, le sang du patient est en contact direct avec l'air et avec les surfaces synthétiques avec une biocompatibilité imparfaite des matériaux. De plus, la température corporelle et les conditions de flux artériel (flux dépulsé) sont modifiées. A cela s'ajoute un phénomène d'ischémie-reperfusion lié au clampage aortique. Ces différents facteurs réunis vont induire un SIRS qui implique à la fois des interactions cellulaires et humorales [29,30]. Les éléments humoraux sont représentés par le système du complément et les cytokines inflammatoires. Ils activent les cellules endothéliales et les polynucléaires neutrophiles, ces derniers étant à l'origine de la libération d'enzymes lytiques et de dérivés réactifs de l'oxygène, acteurs de lésions tissulaires (*cf. infra*). La sécrétion de cytokines inflammatoires est amplifiée par l'activation des neutrophiles, menant à une véritable boucle inflammatoire auto-entretenu. On observe en parallèle une activation des cascades de la coagulation [31]. Se surajoute au SIRS induit par la CEC le SIRS lié au traumatisme chirurgical direct. Une étude récente menée sur 3660 patients s'est intéressée à l'impact de la présence d'un SIRS après une chirurgie cardiaque [32]. Dans cette cohorte, 96% des patients présentaient au moins deux critères de SIRS dans les 24 premières heures post-opératoires et le nombre de critères de SIRS était corrélé à la mortalité avec un taux de mortalité de l'ordre de 10% chez les patients présentant les quatre critères. La présence d'au moins deux critères de SIRS durant au moins six heures consécutives était prédictive d'une défaillance d'organe post-opératoire, d'un séjour prolongé en réanimation et d'une surmortalité.

Cet état inflammatoire systémique, à l'origine de lésions endothéliales diffuses et d'un syndrome de fuite capillaire, a pour conséquence une atteinte multi-viscérale menant aux défaillances d'organes post-CEC :

- La dysfonction myocardique : la CEC diminue l'activité des récepteurs β_1 myocardiques de 30 à 50%, et augmente proportionnellement celle des récepteurs α dans la réponse sympathique aux catécholamines [33]. En conséquence, la fonction systolique et la fonction

diastolique baissent progressivement pour atteindre leur nadir vers 5-6 heures après la fin de CEC; la récupération prend 8 à 24 heures [34]. Cette dysfonction est d'autant plus sévère que l'atteinte myocardique est préexistante et que la chirurgie est prolongée et complexe. La mortalité atteint 9,7% en cas de dysfonction ventriculaire gauche isolée, et jusqu'à 40% lorsqu'elle est associée à une dysfonction ventriculaire droite [35].

- L'atteinte pulmonaire : les conséquences respiratoires vont d'une augmentation modérée de l'eau pulmonaire extravasculaire au SDRA. Ce dernier est décrit jusque dans 20% des cas et est associé à une franche augmentation de la mortalité, jusqu'à 80%, dans ce contexte [36]. L'atteinte pulmonaire est multifactorielle, non seulement liée à la réaction inflammatoire post-CEC avec activation du complément et séquestration de polynucléaires pulmonaires qui produisent des substances oxygénées activées et libèrent des enzymes lysosomiales, mais aussi à une élévation des pressions capillaires pulmonaires pouvant être observée dans le cadre d'une dysfonction myocardique gauche.

- L'atteinte rénale : son incidence varie de 5 à 43% selon les séries et est associée de manière indépendante à une morbi-mortalité accrue [37,38]. La chirurgie cardiaque sous CEC est la seconde cause de dysfonction rénale après le sepsis. Plusieurs mécanismes physiopathologiques ont été décrits, faisant de la dysfonction rénale post chirurgie cardiaque une pathologie elle aussi multifactorielle. On identifie ainsi la vasoconstriction induite par l'hypoperfusion, l'hémolyse, l'inflammation et le stress oxydant qui provoquent une réduction du débit de perfusion rénale. En parallèle, on observe des lésions cellulaires parenchymateuses rénales dues aux phénomènes d'ischémie-reperfusion. Enfin, des facteurs mécaniques tels que la survenue d'emboles crurales ou de cholestérol, ainsi que les prédispositions individuelles comme la présence d'une réserve fonctionnelle rénale préalablement altérée peuvent participer à l'agression [39]. Dans 1 à 5% des cas, le recours à l'épuration extra-rénale s'avère nécessaire, grevant alors le pronostic rénal et individuel à court comme à long terme [40].

- L'atteinte neurologique : les conséquences neurologiques de la CEC sont difficiles à appréhender en raison de la difficulté à réaliser des tests psychométriques en post-opératoire immédiat et de la participation vasculaire aux accidents ischémiques post-CEC chez des sujets souvent poly-athéromateux. Leur prévalence varie beaucoup en fonction de la manière dont on les identifie (jusqu'à 22,5% de troubles cognitifs décrits deux mois après pontage coronaire) [41]. Ce risque neurologique, longtemps attribué à la CEC seule est en fait d'origine

multifactorielle : des études récentes tendent à montrer que les facteurs de risque liés au patient (athéromatose, anamnèse d'accident vasculaire cérébral, troubles cognitifs préopératoires) sont plus importants que ceux liés à l'intervention (durée de CEC, micro-embolies...) [42]. Les troubles neurologiques postopératoires sont classés en deux catégories : le type I comprend les lésions focales (accident vasculaire cérébral, accident ischémique transitoire) et l'encéphalopathie anoxique (coma) ; le type II consiste en séquelles neuropsychologiques diffuses (détérioration des fonctions intellectuelles, troubles de la mémoire, délire, convulsions) sans signe de localisation [43,44].

- L'atteinte splanchnique : les conséquences splanchniques (hépatiques et mésentériques) de la CEC ont été très étudiées en raison de la libération d'endotoxine à travers la muqueuse intestinale ischémique caractérisant la translocation bactérienne. Une étude récente a montré qu'une durée prolongée de CEC était associée à l'augmentation d'un marqueur d'ischémie-reperfusion intestinal (*Intestinal Fatty Acid Binding Protein* (IFABP)) et à la circulation d'endotoxines [45]. Au niveau hépatique, la dysfonction transitoire post CEC est associée à la durée de la CEC et aux phénomènes d'ischémie-reperfusion responsables d'une congestion veineuse au sevrage de la CEC [46,47]. Ces lésions, principalement observées lors des CEC réalisées en hypothermie, seraient liées en grande partie à l'augmentation du métabolisme et de l'extraction splanchnique d'oxygène durant le réchauffement [48].

2. Initiation et physiopathologie de la réponse inflammatoire systémique

1. Reconnaissance de l'agression

Sur le plan physiopathologique, le SIRS peut évoluer vers une réaction inappropriée et excessive de l'organisme avec un « orage inflammatoire » [2]. La reconnaissance des éléments pathogènes infectieux est initiée par les *Pattern Pathogen Receptors* (PPRs) qui sont présents sur toutes les cellules immunitaires et catégorisés en quatre classes : les *Toll-Like Receptors* (TLRs), les *C-Type Lectin Receptors* (CLRs), les *Retinoic Acid Inducible Gene 1-Like Receptors* (RLRs) et les *Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-Like Receptors* (NLRs) [3]. Ces PPRs vont reconnaître les *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs) qui sont les motifs moléculaires caractéristiques des micro-organismes : lipopolysaccharides (LPS), peptidoglycanes, flagelline, mannanes, acides nucléiques bactériens et viraux, etc. [49]. De

plus, les lésions tissulaires de l'hôte entraînent la libération de biomolécules qui peuvent elles aussi initialiser et perpétuer une réponse inflammatoire à la suite de dégâts cellulaires (traumatisme, brûlure, ischémie, etc.) : ce sont les *Damage-Associated Molecular Patterns* (DAMPs : *High-Mobility Group Box 1* (HMGP1), ADN et acide ribonucléique (ARN) extracellulaires, protéine S100, histones, fragments d'acide hyaluronique) [3]. La reconnaissance de PAMPs et DAMPs par les PPRs va initier la réponse à l'agression selon plusieurs axes :

- Activation leucocytaire et réponse pro-inflammatoire ;
- Immunosuppression et déclenchement d'une réponse anti-inflammatoire ;
- Activation du complément ;
- Activation de la coagulation.

Cette réponse de l'hôte va être à l'origine des défaillances d'organes observées.

2. Réponse pro-inflammatoire

i. Activation leucocytaire

L'activation cellulaire par les PAMPs / DAMPs va conduire à l'expression de molécules d'adhésion (sélectines) à la surface des cellules phagocytaires et endothéliales. Les monocytes et polynucléaires neutrophiles vont adhérer par *rolling* à la paroi endothéliale et migrer à l'intérieur des tissus pour aller exercer leur activité bactéricide et phagocytaire (mécanisme de diapédèse). Les polynucléaires neutrophiles activés peuvent également émettre lors de leur apoptose des « filets » (*Neutrophil Extracellular Trap*, NET) composés d'acide désoxyribonucléique (ADN) et de protéines diverses (histones et élastase) afin de piéger les germes intratissulaires [50]. Les NET sont chargés négativement (ADN) et positivement (histones) et présentent un effet attractif sur les plaquettes, le facteur Willebrand et le facteur tissulaire [51]. Des données récentes indiquent que ces NET ont un effet pro-agrégant plaquettaire et induisent la formation de thrombine, participant donc à la survenue d'une coagulation intra-vasculaire disséminée (CIVD) inflammatoire [52,53]. Il arrive également que les leucocytes stagnent dans la lumière vasculaire sans circuler (troubles de la perfusion locale, bas débit, clampage). Cette agglutination va induire leur activation et la libération de radicaux

libres (*cf. infra*) et d'enzymes lytiques qui vont induire localement des lésions tissulaires. Lors de la phase de recirculation / reperfusion (correction hémodynamique, déclampage), la libération dans la circulation systémique des radicaux libres va entraîner des dommages cellulaires à distance [54]. Enfin, l'activation leucocytaire va déclencher la synthèse et la sécrétion de cytokines pro- et anti-inflammatoires. Cette sécrétion est majoritairement assurée par les monocytes et les lymphocytes B et T et va auto-activer les leucocytes, déclenchant une réaction en chaîne de l'inflammation [55].

ii. Synthèse cytokinique

La reconnaissance d'un élément pathogène ou d'un dommage tissulaire va déclencher la synthèse cytokinique pro-inflammatoire *via* les PPR. A titre d'exemple, l'un des PAMPs bactériens le plus étudié et le plus puissant est le LPS des bactéries à Gram négatif. Le PPR de l'endotoxine (TLR-4) est capable d'activer la voie du facteur de transcription *Nuclear Factor Kappa-B* (NF- κ B; *cf.* Figure 2) [56]. Cette activation dans les lymphocytes, les monocytes, les macrophages et/ou les cellules endothéliales entraîne la production de cytokines inflammatoires dont les interleukines 1 β et 6 (IL-1 β , IL-6) et le *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) [57]. Le taux de ces cytokines est inversement corrélé à la production de monoxyde d'azote qui est un des principaux agents responsables de la vasoplégie des patients (*cf. infra*) [58]. De plus, leur production excessive va entraîner des altérations de la microcirculation se caractérisant par une hétérogénéité spatiale et temporelle des débits sanguins dans les capillaires et la formation de microthrombi, responsables d'une hypoxie tissulaire aiguë (*cf. infra*) [59]. Ainsi, la sécrétion cytokinique induite lors du sepsis, reflet de la réaction hôte-pathogène, est l'un des principaux déterminants des défaillances d'organes observées en pratique clinique. Au décours d'une chirurgie cardiaque, des taux post-opératoires de cytokines élevés sont également associés à la morbi-mortalité post-opératoire [31,60].

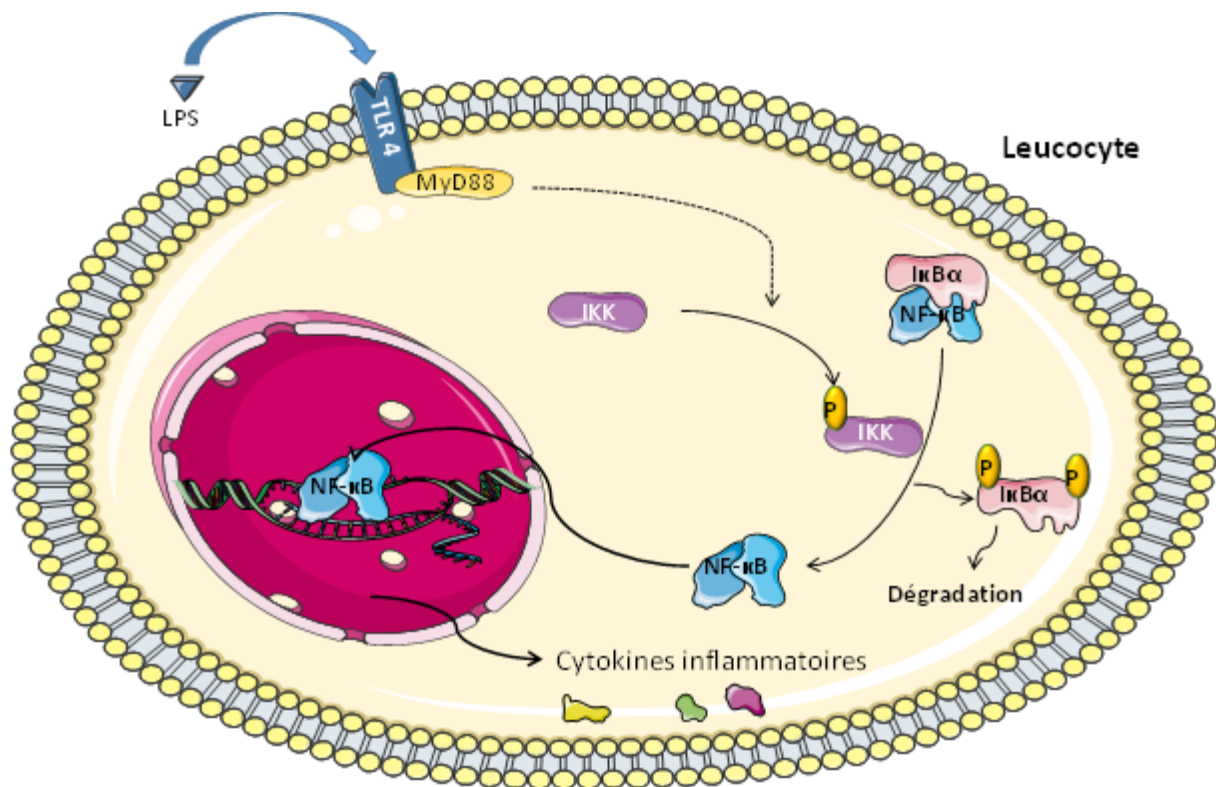


Figure 2: Activation du facteur de transcription NF-κB par le récepteur du lipopolysaccharide

L'activation du Toll-Like Receptor entraîne le recrutement de la protéine MyD88. Cette activation conduit, après une chaîne complexe de phosphorylations protéiques, à l'activation du complexe IKK. IKK activé phosphoryle alors IκBα, l'inhibiteur de NF-κB, qui est dégradé par la voie du protéasome. NF-κB ainsi libéré dans le cytoplasme migre dans le noyau et active la transcription des cytokines pro-inflammatoires. IKK : Inhibitor of Kappa B Kinase; IκBα : Inhibitor of Kappa B α; LPS : Lipopolysaccharide; MyD88 : Myeloid Differentiation primary response gene 88; NF-κB : Nuclear factor-kappa B; TLR-4 : Toll-Like Receptor 4.

iii. Espèces réactives de l'oxygène

Une fois activés dans les tissus, les neutrophiles et les macrophages vont synthétiser et activer plusieurs enzymes (xanthine oxydase, nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduite (NADPH) oxydase, nitric oxide synthase) à l'origine de la production d'espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species* : ROS) et de l'azote (*Reactive Nitrogen Species* : RNS) : peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), radical hydroxyle (HO•), monoxyde d'azote

(NO•), ion peroxy-nitrite (ONOO•) [54,61]. Ces ROS / RNS, induisent des lésions chimiques (en particulier oxydatives) sur de nombreux composés cellulaires comme les protéines, les lipides, ou les acides nucléiques [61]. Ces lésions peuvent induire une toxicité cellulaire et participer au dysfonctionnement des organes.

3. Activation du complément

Le système du complément est un groupe de protéines circulantes faisant partie de l'immunité innée qui est directement impliqué dans les mécanismes d'élimination des pathogènes. Trois voies de signalisation peuvent l'activer : la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines. Ces trois voies activatrices aboutissent à la formation d'une C3-Convertase, point de départ de la voie effectrice commune qui détruit la cible en formant un canal transmembranaire, permettant l'entrée de molécules d'eau dans la cellule. Les fragments C3a et C5a sont des molécules appelées « anaphylatoxines » car elles entraînent la libération d'histamine. De plus C5a a une activité chimiotactique importante, active la voie des lipoxigénases et augmente l'adhésion leucocytaire.

Dans les situations d'infection, le complément est fortement activé et exerce une activité pro-inflammatoire. Au cours de la chirurgie cardiaque, le complément est activé directement par le contact du sang avec l'air ou les matériaux du circuit de CEC et par les complexes héparine-protamine issus de la neutralisation de l'anticoagulation [31]. C5a exerce une activité délétère sur l'immunité innée *via* l'inhibition de la phagocytose et du chimiotactisme ou *via* l'activation de l'apoptose des monocytes et polynucléaires [62]. De plus C5a stimule la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les monocytes [62]. Plusieurs travaux menés dans des modèles de sepsis par ligature-ponction caecale (*Cecal Ligation and Puncture*, CLP) ont montré que l'inhibition pharmacologique de C5a ou l'antagonisation de ses récepteurs, avaient un effet bénéfique en terme de défaillance d'organe et de mortalité [62–64]. Dans des modèles de CEC, l'inhibition du complément diminue la dysfonction endothéliale et améliore la défaillance hémodynamique [65,66].

4. Activation de la coagulation

Au cours d'une infection localisée, il est suggéré par certains auteurs que la thrombose microvasculaire induite par l'inflammation locale pourrait être un mécanisme prévenant la diffusion hématogène des germes [67]. Néanmoins, dans les situations d'inflammation généralisée, l'extension systémique des mécanismes pro-coagulants participe à l'installation d'un syndrome de défaillance multi-viscérale. Ainsi, le choc septique s'associe quasi-systématiquement à un phénotype pro-coagulant pouvant même évoluer vers une CIVD chez 35% des patients [68]. Les monocytes activés vont exprimer à leur surface du facteur tissulaire (VIIa) qui va activer la cascade de la coagulation par la voie extrinsèque avec formation de thrombine (IIa). Au cours d'une chirurgie cardiaque, l'activation de la coagulation passe par la voie intrinsèque (*via* l'activation du facteur XII secondaire aux interfaces sang-air et sang-circuit de la CEC) et par la voie extrinsèque (*via* la libération de facteur tissulaire et l'activation du facteur VII liée au traumatisme chirurgical) [31]. Les cytokines inflammatoires vont aussi stimuler la synthèse de facteurs de coagulation et de fibrinogène, entretenant ainsi la cascade pro-coagulante. Les plaquettes circulantes sont activées directement par les cytokines pro-inflammatoires et par la formation de thrombine induite par le facteur tissulaire. La consommation de plaquettes liée à la CIVD et la diminution du nombre de mégacaryocytes secondaire à une hémophagocytose, entraînent fréquemment une thrombopénie inflammatoire (*cf.* SOFA score Tableau 1). En parallèle, les mécanismes anticoagulants sont affaiblis avec une diminution de la synthèse et une augmentation de la dégradation de la protéine C, de l'antithrombine et de l'inhibiteur du facteur tissulaire [68]. Enfin, une fois la cascade de la coagulation activée, il existe une inhibition marquée de la fibrinolyse empêchant la dégradation des thrombi disséminés liés à cette coagulopathie inflammatoire. Ainsi, après une libération initiale d'activateurs du plasminogène (*Plasminogen Activator* (PA) de type tissulaire (t-PA) ou de type urokinase (u-PA)) par les cellules endothéliales au cours de l'inflammation, l'activation du plasminogène est fortement inhibée par une augmentation soutenue de la production du *Plasminogen Activator Inhibitor, type 1* (PAI-1) conduisant à un blocage de la fibrinolyse.

L'inflammation a un effet direct sur les mécanismes de coagulation mais les protéines impliquées dans la coagulation peuvent elles aussi agir sur l'inflammation. Les facteurs de

coagulation régulent l'inflammation en se liant aux *Protease Activated Receptors* (PARs). Les PARs sont des récepteurs transmembranaires couplés aux protéines G et 4 types différents (PAR 1 à 4) ont été décrits [69]. Une de leur particularité est qu'ils se servent de ligand à eux même : la protéolyse d'un PAR par un facteur de coagulation activé entraîne l'exposition d'une partie du récepteur qui est capable de s'auto-activer [68]. Les PARs 1, 3 et 4 sont activés par la thrombine (IIa), le PAR-2 est activé par le facteur tissulaire (VIIa) et le facteur Xa [68]. De plus, l'antithrombine et la protéine C ont une activité anti-inflammatoire en inhibant la synthèse cytokinique par action directe sur les monocytes / macrophages [68]. Ces effets ont conduit à proposer la protéine C activée et l'antithrombine comme traitement du sepsis mais, malgré d'évidentes améliorations de la coagulopathie, aucune de ces deux molécules n'a montré d'impact sur la mortalité dans de grandes cohortes de patients septiques et la protéine C activée a fini par être retirée du marché [70,71].

5. Immunosuppression et réponse anti-inflammatoire

En parallèle de la réponse pro-inflammatoire, il existe une immuno-modulation liée à la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires conduisant à un équilibre entre cytokines pro- et anti-inflammatoires. Cette phase anti-inflammatoire suivant l'apparition du SIRS est classiquement dénommée *Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome* (CARS, cf. Figure 3) [72]. Le CARS est une phase anti-inflammatoire voire d'immunosuppression. En effet, des cytokines à visée anti-inflammatoire sont produites, principalement l'IL-10 mais aussi les formes solubles du récepteur au TNF- α , l'antagoniste au récepteur de l'IL-1 (IL-1Ra) et l'IL-4 [73]. L'IL-10 possède une activité anti-inflammatoire en inhibant la sécrétion macrophagique de TNF- α , d'IL-1 β et d'IL-6 [73]. Elle est sécrétée par les monocytes et, dans une moindre mesure, par les lymphocytes. Elle possède une activité anti-inflammatoire à divers niveaux *via* l'inhibition du facteur de transcription NF- κ B, l'inhibition de la synthèse de protéines liées à l'inflammation et la réorientation de la réponse inflammatoire Th1 vers une réponse Th2 [74]. L'IL-7, une interleukine impliquée dans la survie, le développement et l'homéostasie des lymphocytes, joue également un rôle anti-inflammatoire [75]. Au cours du sepsis, elle exerce un rôle anti-apoptotique et l'administration d'IL-7 recombinante a montré une amélioration de la survie associée à une meilleure fonction leucocytaire dans un modèle murin de sepsis

induit par CLP [75]. Un taux circulant d'ARNm de l'IL-7 bas était également associé de façon indépendante à la mortalité à 28 jours dans une cohorte de patients septiques de réanimation [76]. Chez l'Homme, une étude pilote évaluant l'administration de l'IL-7 au cours du sepsis a montré son efficacité pour maintenir un niveau de lymphocytes T circulants, avec des taux 3 à 4 fois supérieurs en comparaison du placebo [77].

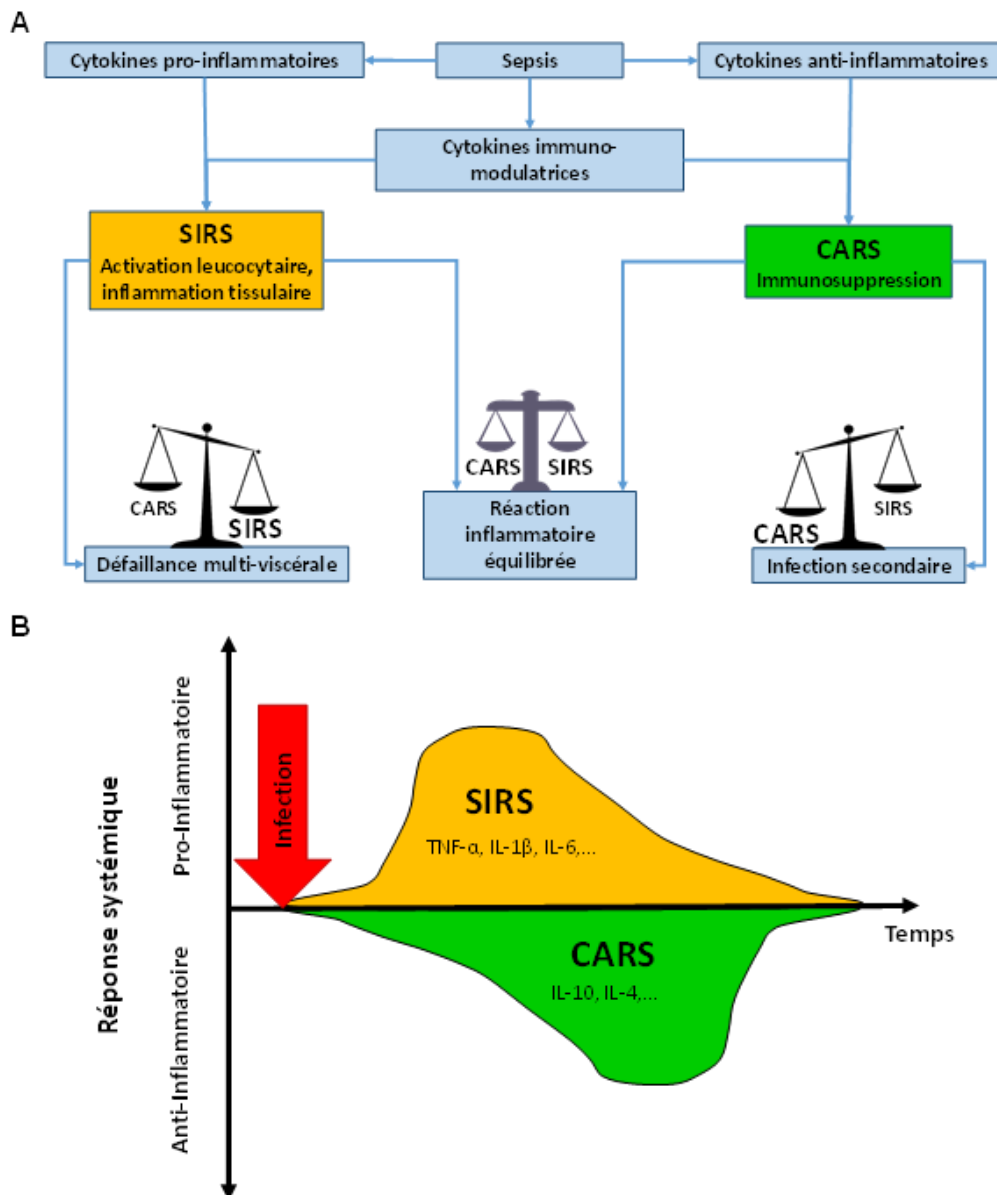


Figure 3: Représentation schématique (A) et au cours du temps (B) de l'équilibre de la réponse inflammatoire systémique

Au cours des infections, la survenue simultanée des réponses pro- et anti-inflammatoires permet de moduler l'intensité du sepsis et de limiter la survenue des défaillances viscérales. CARS: Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome; IL: Interleukine; SIRS: Systemic Inflammatory Response Syndrome; TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α .

D'autres mécanismes, non cytokiniques, participent à la réponse anti-inflammatoire. Ainsi, l'étude du lien entre système nerveux central et système immunitaire a fait découvrir de nouveaux mécanismes de contrôle de l'inflammation. Le réflexe neuro-inflammatoire, médié par le nerf vague, conduit à l'activation du nerf splénique dans le plexus cœliaque qui va libérer de la noradrénaline dans la rate. La noradrénaline va induire la sécrétion d'acétylcholine par un sous type de lymphocytes T CD4 qui va aller se fixer sur les récepteurs cholinergiques α_7nACh des macrophages, bloquant ainsi leur sécrétion de cytokines pro-inflammatoires [78,79]. Enfin, l'activation des voies pro-apoptotiques intrinsèque et extrinsèque des cellules immunitaires (lymphocytes B et T en particulier) va également jouer un rôle direct dans l'immunosuppression cellulaire et humorale induite par le sepsis [80]. Il existe une altération fonctionnelle leucocytaire et une apoptose intra-splénique des lymphocytes B et T CD4 au cours du sepsis [81–83]. Cette dégradation explique en partie les lymphopénies fréquemment observées chez les patients septiques et dont la persistance au cours du séjour, reflet d'une immunosuppression prolongée, est indépendamment associée à une surmortalité [84].

Malgré un nécessaire effet « d'équilibration » de la réponse inflammatoire septique, la réponse anti-inflammatoire est elle-même pourvoyeuse de complications secondaires. Ainsi, il a été montré que les patients avec une immunosuppression post-sepsis marquée (évaluée par analyse transcriptomique de la glycolyse leucocytaire) présentaient plus d'infections secondaires en réanimation [85]. Par ailleurs, dans ce même travail, les infections secondaires acquises en réanimation étaient plus fréquentes chez les patients septiques les plus graves à l'admission, suggérant ainsi un lien entre intensité de la réponse inflammatoire initiale et degré d'immunosuppression secondaire [85]. Dans l'objectif de mimer une réponse anti-inflammatoire et de contrôler la réponse de l'organisme au pathogène, plusieurs études randomisées menées chez l'Homme se sont intéressées à l'impact d'inhibiteurs de IL-1 β et TNF- α au cours du sepsis mais aucune n'a montré d'amélioration de la mortalité [86–88]. Un essai randomisé évaluant l'intérêt d'un antagoniste du TLR-4 s'est également avéré négatif chez des patients septiques [89].

6. Rôle des cellules circulantes non-leucocytaires dans la réponse inflammatoire systémique aigüe

Si les leucocytes sont, de par leur fonction de synthèse cytokinique et de clairance bactérienne, les cellules impliquées en première ligne dans la réponse pro- et anti-inflammatoire du SIRS, d'autres types cellulaires ont un rôle important dans ce contexte. Les plaquettes jouent par exemple un rôle clé dans la physiopathologie du sepsis. La thrombopénie septique est bien décrite et multifactorielle (CIVD, sidération ou toxicité médullaire, *trapping* dans les NET, dilution par le remplissage, voire syndrome d'activation macrophagique). Elle est associée à la mortalité en réanimation [90]. Cette thrombopénie septique est d'ailleurs intégrée au score SOFA décrivant les défaillances d'organe septiques (*cf.* Tableau 1). Mais les plaquettes jouent également un rôle de trigger de la réponse inflammatoire systémique vasculaire. Les plaquettes vont reconnaître certains PAMPs qui vont les activer. Les altérations endothéliales induites par le sepsis (*cf. infra*) vont également exposer le facteur Willebrand et le collagène qui vont activer les plaquettes *via* les glycoprotéines (GP) GPIb-V-IX et GPVI [91]. Cette activation plaquettaire induit la libération de facteur d'auto-activation (adenosine diphosphate, thromboxane A2) entretenant le phénotype pro-agrégant. L'activation plaquettaire joue donc un rôle clé dans la cascade pro-coagulante induite par le SIRS. Enfin les plaquettes activées peuvent également sécréter directement des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β et participer à l'activation leucocytaire *via* des interactions directes impliquant l'interaction entre P-selectine plaquettaire et son récepteur leucocytaire, le *P-selectin glycoprotein ligand-1* [92]. Bien que le rôle des plaquettes ait été essentiellement étudié dans le SIRS septique, plusieurs travaux montrent un impact délétère de la CEC sur la fonction plaquettaire. La CEC induit une dysfonction plaquettaire associée au saignement post-opératoire [93]. Cette dysfonction est liée, au moins en partie, à l'activation des voies de l'apoptose au sein des plaquettes, à un changement du transcriptome des micro-ARN plaquettaires et à une diminution de l'expression des récepteurs d'adhésion plaquettaire [94–96]. A la différence du sepsis, le phénotype plaquettaire induit par la CEC semble donc être plutôt anti-coagulant. Si la CEC a un impact bien décrit sur la physiologie plaquettaire, il n'existe actuellement pas de données claires établissant l'implication des plaquettes dans la physiopathologie du SIRS induit par la CEC.

De nombreux travaux traitent du rôle des leucocytes et des plaquettes dans le SIRS mais les données concernant les érythrocytes sont plus disparates. Le sepsis induit une modification du phénotype érythrocytaire avec des globules rouges qui perdent leur déformabilité, augmentent leur affinité pour l'oxygène et participent directement à la clairance bactérienne intra-vasculaire [97,98]. L'érythrocyte activé va également synthétiser des ROS, participant ainsi aux défaillances cellulaires induites par le sepsis (*cf. supra*) [97]. La CEC induit également une perte de déformabilité des globules rouges et une augmentation de l'agrégation des érythrocytes entre eux [99]. Au total, l'altération des fonctions érythrocytaires participe directement à la défaillance micro-circulatoire (en particulier à cause des modifications rhéologiques) et à l'hypoxie tissulaire.

Au-delà des leucocytes, érythrocytes et plaquettes, un autre élément impliqué dans la circulation sanguine est central et déterminant dans la physiopathologie du SIRS septique et aseptique : la cellule endothéliale.

3. Physiopathologie de la dysfonction vasculaire lors d'une réponse inflammatoire systémique

1. Rappels de physiologie endothéliale

i. L'endothélium

L'endothélium est une monocouche cellulaire recouvrant la totalité des systèmes vasculaires. Il représente une interface entre les tissus et les cellules circulantes et est responsable du contrôle de la vasomotricité et de la coagulation. Au niveau des capillaires tissulaires, l'endothélium est perméable aux petites molécules (eau, ions, oxygène, glucose etc.), permettant ainsi l'approvisionnement des tissus en nutriments. Dans les conditions physiologiques, il régule de façon majeure le tonus vasomoteur et ainsi la pression artérielle, mais aussi la croissance des cellules musculaires lisses, le système de coagulation, l'agrégation plaquettaire, la diapédèse et enfin la perméabilité vasculaire. L'endothélium assure la plupart de ces fonctions biologiques grâce à sa structure intrinsèque particulière et la production de substances biologiquement actives, dont le NO [100]. Au niveau vasculaire, le NO est une molécule endogène libérée par les cellules endothéliales. Il est synthétisé naturellement à

partir de la L-arginine (oxydée en L-citrulline + NO) par plusieurs enzymes dites NO synthases (NOS ; cf. Figure 4). Il existe trois formes de NOS: la forme neuronale (nNOS), la forme inductible (iNOS) et la forme endothéliale (eNOS).

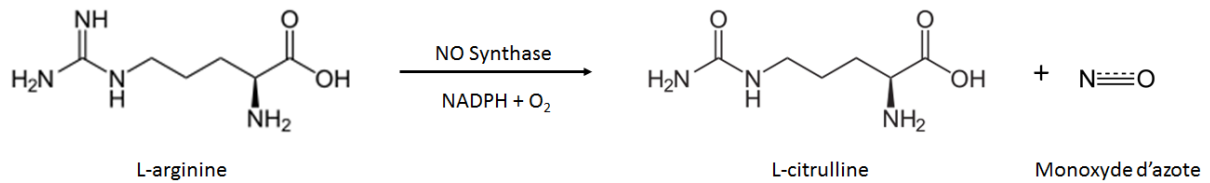


Figure 4: Réaction de synthèse du NO

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

La nNOS est constitutive et soluble dans le cytosol des cellules neuronales et des astrocytes du système nerveux central. Le NO y joue un rôle de neurotransmetteur et de neuromodulateur (plasticité des synapses). Il joue également un rôle dans le développement des neurones [101]. La iNOS est, elle aussi, principalement soluble au niveau du cytosol. Initialement décrite dans les macrophages, elle est en réalité ubiquitaire et retrouvée dans de nombreux types cellulaires : hépatocytes, cardiomyocytes, cellules musculaires lisses, astrocytes, neurones [102]. En contexte physiologique, sa concentration cellulaire est très faible voire indétectable. Mais, lors d'une situation d'inflammation, la production de cytokines active l'expression de iNOS conduisant à une synthèse dérégulée et excessive de NO [101]. La eNOS est constitutionnelle, essentiellement membranaire et finement régulée par les forces de cisaillement liées au flux sanguin, ainsi que par l'acétylcholine, les bradykinines ou l'histamine [103]. Elle produit en permanence du NO en très faible quantité (de l'ordre du picomolaire) [31].

Le NO a un effet protecteur de l'endothélium et induit une vasodilatation médiée par production de guanosine monophosphate cyclique intracellulaire (GMPc) qui entraîne la relaxation de la tunique musculaire lisse des vaisseaux. Les cellules endothéliales sont plates et polarisées : le pôle apical ou sanguin en contact avec la lumière du vaisseau et le pôle basal

ou vasculaire fixé sur la membrane basale riche en collagène et en glycoprotéines. Les pôles sanguins et vasculaires des cellules endothéliales se distinguent par leur structure, leurs récepteurs et leurs activités enzymatique et sécrétoire [100].

ii. Les jonctions intercellulaires

Les jonctions intercellulaires assurent la fonction de barrière de l'endothélium [104]. Elles représentent des structures permettant la transmission de signaux qui régulent des phénomènes tels que la perméabilité vasculaire, l'inhibition de contact ou l'apoptose. Elles sont aussi impliquées dans la signalisation intracellulaire grâce aux interactions avec des facteurs de transcription, des récepteurs de facteurs de croissance ou des protéines de signalisation. Il existe différents types de jonctions endothéliales : les jonctions communicantes, les jonctions serrées, et les jonctions adhérentes :

- Les jonctions communicantes permettent une communication directe entre deux cellules endothéliales adjacentes en formant des conduits à travers lesquels il y a échanges d'ions, de métabolites ou d'autres molécules dont la masse est inférieure à 1 kDa [105] ;
- Les jonctions serrées sont formées par différentes protéines transmembranaires que sont l'occludine, les claudines et les molécules d'adhérence. C'est en s'associant à des protéines cytosoliques telles que la *Zonula Occludens 1* que ces protéines transmembranaires vont former les jonctions serrées. Les jonctions serrées sont fortement impliquées dans la régulation de la perméabilité vasculaire [106]. Elles maintiennent une polarisation cellulaire, en délimitant le domaine apical du domaine basolatéral des cellules, limitant ainsi la diffusion latérale de protéines membranaires particulières ;
- Les jonctions adhérentes sont présentes dans tout le système vasculaire. Elles sont principalement constituées par la VE-cadhérine qui élabore des jonctions solides et cohésives en se liant à des structures cytoplasmiques qui la maintiennent au cytosquelette. L'ouverture des jonctions adhérentes est finement régulée et permet à l'endothélium de jouer pleinement son rôle de barrière perméable [107].

iii. Le glycocalyx

Le glycocalyx est une structure membranaire riche en hydrates de carbone, connectée à l'endothélium. La composition du glycocalyx comprend des protéoglycanes, des glycosaminoglycanes, des glycoprotéines et des éléments solubles venus du plasma [108]. Les glycosaminoglycanes sont porteurs de charges négatives repoussant de l'endothélium les protéines chargées négativement et les éléments figurés du sang. Ceci permet de maintenir un gradient oncotique, limitant la fuite capillaire, mais également de limiter les interactions entre les éléments figurés du sang et l'endothélium. En fixant différentes protéines anticoagulantes comme l'antithrombine III, l'héparine cofacteur II, la thrombomoduline et l'inhibiteur de facteur tissulaire, le glycocalyx confère ses propriétés anticoagulantes à l'endothélium. Aussi, par sa structure et sa localisation, le glycocalyx endothélial s'est imposé comme un candidat de choix pour l'intégration du signal de mécanotransduction. En effet, il a été démontré qu'un traitement par des enzymes glycolytiques (héparinase ou hyaluronidase) diminue la production de NO en réponse au flux. De plus, un rétrocontrôle positif semble exister puisque l'exposition à un *shear stress* de cellules endothéliales humaines provenant de veines ombilicales double l'incorporation d'acide hyaluronique dans le glycocalyx [109]. Ces études impliquent les différents composants du glycocalyx dans le phénomène de mécanotransduction. Récemment, Harrison *et al.* ont montré que les principales protéines d'ancrage du glycocalyx, comme le glypicane, seraient responsables de la transmission des signaux mécaniques permettant la production de NO et la réorganisation du cytosquelette [110]. Dans le même temps, ce signal mécanique pourrait être transmis à d'autres régions de la cellule endothéliale, comme les jonctions intercellulaires et les structures d'adhésion basale capables de détecter les forces de cisaillements, même en l'absence de glycocalyx. Le glycocalyx est présent non seulement du côté luminal de la cellule endothéliale, mais également au niveau des jonctions entre les cellules endothéliales jouant ainsi un rôle important dans la régulation de la perméabilité vasculaire.

iv. Les cellules musculaires lisses

Les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) sont présentes dans la couche intermédiaire de la paroi vasculaire, la media. Les CMLV sont les acteurs du phénomène de

contraction/relaxation du vaisseau. L'état de contraction des CMLV dépend entièrement de la concentration de calcium (Ca^{2+}) cytoplasmique et de la sensibilité de l'appareil contractile au Ca^{2+} . À l'état basal, il existe un gradient de concentration du Ca^{2+} : la concentration intracellulaire de Ca^{2+} est plus faible que la concentration extracellulaire de Ca^{2+} . Le Ca^{2+} intracellulaire est principalement stocké dans le réticulum sarcoplasmique et l'échange de Ca^{2+} entre les deux milieux est très faible, car les canaux calciques voltage-dépendants sont fermés et la diffusion passive est négligeable. Ainsi, le gradient calcique est maintenu. De nombreux stimuli, qu'ils soient vasoconstricteurs ou vasodilatateurs, vont aboutir à une modification du gradient de concentration du Ca^{2+} dans la CMLV et modifier la vasoréactivité.

2. Effets de l'inflammation systémique sur l'endothélium

La cellule endothéliale est activée par les DAMPs / PAMPs et par les cytokines pro-inflammatoires. Elle permet le recrutement des leucocytes eux-mêmes responsables de l'auto-entretien de l'inflammation. L'endothélium acquiert alors un phénotype pathologique responsable de la dysfonction endothéliale impliquée dans la dysfonction d'organe. L'activation par les cytokines pro-inflammatoires (IL- 1β et TNF- α en particulier) de la voie de signalisation NF- κB au niveau des cellules endothéliales est le principal élément aboutissant à ce phénotype [31].

i. Adhésion leucocytaire

L'expression de protéines d'adhésion à la surface des cellules endothéliales permet d'assurer le *rolling* et la fixation leucocytaire (*InterCellular Adhesion Molecule 1* (ICAM-1), *Vascular Cell Adhesion Molecule 1* (VCAM-1), P- et E-selectine). Les monocytes et les polynucléaires neutrophiles vont alors adhérer à la surface endothéliale et, dans un second temps, migrer dans le tissu inflammatoire. Cette migration cellulaire peut participer à l'apparition d'œdème endothélial pouvant être responsable d'une aggravation de l'hypoxie tissulaire, en particulier via une obstruction mécanique de la microcirculation [111].

ii. Dérégulation de la physiologie du NO

Au cours de l'inflammation systémique septique ou aseptique, les cytokines inflammatoires vont également inhiber l'activité des eNOS et induire, *via* la voie NF- κ B, la synthèse de iNOS qui vont produire du NO de façon dérégulée, induisant ainsi une vasodilatation importante qui participe à la défaillance hémodynamique inflammatoire [31,112]. Le NO, produit en grande quantité, va également avoir, comme les autres ROS, un effet cytotoxique direct. Indépendamment de l'inflammation, le caractère dépulsé de la circulation sanguine en CEC lors d'une chirurgie cardiaque entraîne une diminution du *shear stress* qui conduit à une baisse de la synthèse constitutionnelle de NO avec dysfonction microcirculatoire locale [31,113]. Globalement, la baisse de production de la eNOS et l'expression hétérogène de la iNOS va créer une hétérogénéité de perfusion et des shunts intra-tissulaires responsables d'une hypoxie tissulaire [63].

iii. Dégradation du glycocalyx

Le glycocalyx va subir des lésions directes durant le processus inflammatoire [114,115]. Les ROS sont les principaux médiateurs de la dégradation du glycocalyx [116]. La perte du glycocalyx a pour conséquence une perte de la transmission du signal de *shear stress* à la cellule endothéliale, conduisant localement à une inadaptation du tonus vasculaire au flux du vaisseau et à des hétérogénéités de perfusion intra-tissulaire [116]. Le glycocalyx prévient les interactions et l'adhésion non nécessaires entre cellules. Sa destruction est suivie d'une synthèse de molécules d'adhésion telles que la E-sélectine et ICAM-1. Une fois exposées à la surface cellulaire, ces molécules induisent le recrutement de leucocytes permettant leur diapédèse intra-tissulaire. Le glycocalyx étant également un élément central dans le maintien des compartiments fonctionnels du secteur vasculaire, son altération va induire de nombreuses perturbations physiologiques et en particulier une augmentation de la perméabilité endothéliale [117,118]. Sa dégradation participe donc au syndrome œdémateux inflammatoire et à la balance hydro-sodée positive dont le rôle délétère est bien décrit au cours du sepsis ou des assistances circulatoires [119,120]. Enfin, la dégradation du glycocalyx aboutit à la disparition de ses propriétés anti-coagulantes (perte des protéines

anticoagulantes qui y sont ancrées) et participe à l'acquisition du phénotype endothélial pro-coagulant induit par le SIRS.

iv. Lésions directes des cellules endothéliales

Au-delà des altérations fonctionnelles de l'endothélium induites par le SIRS, il existe une altération physique directe de la cellule endothéliale. Dans les heures suivant l'induction d'un sepsis, il apparaît un détachement des cellules endothéliales de la membrane basale (« dénudation endothéliale ») qui deviennent circulantes dans la circulation systémique [121,122]. Il y a également un phénomène d'apoptose des cellules endothéliales induit par les cytokines pro-inflammatoires [123]. Leur dégradation apoptotique va libérer à son tour des radicaux libres et conduire à l'extériorisation de phospholipides pro-coagulants, aggravant ainsi la réponse inflammatoire locale et systémique [124]. La dissémination de microparticules endothéliales (vésicules membranaires pro-thrombogènes issues de l'apoptose endothéliale) à cette occasion va également être à l'origine de la dissémination de la dysfonction endothéliale et de l'entretien de la CIVD [125]. L'ensemble de ces altérations physiques directe de l'endothélium participe à l'augmentation de la perméabilité vasculaire induite par les phénomènes de SIRS.

3. Impact clinique de la dysfonction endothéliale lors de l'inflammation systémique aigüe

i. Vasoplégie et dysfonction vasculaire

La réponse inflammatoire et le dysfonctionnement endothélial ont un retentissement fonctionnel sur les vaisseaux, en particulier sur leur capacité à réguler les débits sanguins et à les adapter aux besoins tissulaires en oxygène. On distingue classiquement altération macrocirculatoire et altération microcirculatoire, bien qu'elles soient fréquemment entremêlées.

Altération vasculaire macrocirculatoire

Le choc vasoplégique, constitutif de la définition du choc septique, concerne également jusqu'à 45% des patients en post-opératoire de chirurgie cardiaque [126]. La vasoplégie est à l'origine d'une baisse du transport artériel en oxygène et donc d'une diminution de l'apport tissulaire en oxygène. Le traitement de référence est la noradrénaline, catécholamine avec un effet α -adrénergique prédominant qui permet la restauration d'un tonus vasculaire satisfaisant.

Altération vasculaire microcirculatoire

La défaillance microcirculatoire (diamètre des vaisseaux $< 100 \mu\text{m}$) peut également s'installer au cours de l'inflammation aiguë. Cette défaillance conduit à une diminution de l'oxygénation tissulaire et participe à l'apparition des dysfonctions d'organes. Les causes de l'atteinte microcirculatoire sont multiples et entremêlées :

- Dérégulation de la synthèse du NO (*cf. supra*) ;
- Dysfonction endothéliale (*cf. supra*) ;
- Perte de la sensibilité des cellules musculaires lisses aux stimuli adrénériques [127] ;
- Activation diffuse de la coagulation (*cf. supra*) ;
- Diminution de la déformabilité des globules rouges et de leurs capacités vasodilatatrices [128,129].

Au total, on constate une diminution du nombre de capillaires perfusés avec des hétérogénéités de perfusion et une augmentation de la distance entre capillaires fonctionnels et cellules. Ce phénomène est majoré par l'apparition et l'entretien d'un œdème interstitiel qui éloigne encore plus les cellules des capillaires.

ii. Liens entre dysfonction endothéliale induite par le SIRS et morbi-mortalité chez l'Homme

Au cours du sepsis, plusieurs travaux ont montré un lien clair entre atteinte endothéliale et morbi-mortalité. Ainsi, les niveaux circulants d'ICAM-1 et de VCAM-1 sont associés au développement d'un syndrome de défaillance multi-viscérale et à la mortalité

hospitalière au cours du sepsis [130,131]. De même, les niveaux circulants d'endothéline-1 (ET-1), peptide vasoconstricteur sécrété par l'endothélium vasculaire, sont corrélés à l'atteinte endothéliale lors du sepsis et associés à la gravité et à la mortalité [132,133]. Chez les patients septiques, le nombre de cellules endothéliales circulantes issues de la dénudation endothéliale sont plus élevés chez les patients décédés à 28 jours que chez les patients survivants [134]. Le lien entre mortalité au cours du sepsis et présence d'une altération de la microcirculation est également bien documenté. La perte de la réactivité microcirculatoire à l'hyperémie, témoin de cette altération, est corrélée à l'importance des défaillances d'organes [135]. L'amélioration de la microcirculation au cours de la prise en charge initiale est également associée à la réduction des défaillances d'organes à 24h (indépendamment de l'état macrocirculatoire) [136]. Enfin, l'intensité des lésions endothéliales septiques sont associés à la survenue d'une CIVD, elle-même associée avec la mortalité en réanimation [137].

Au décours d'une chirurgie cardiaque, la dysfonction endothéliale est majorée après un pontage sous CEC en comparaison d'un pontage sans CEC [138]. Les marqueurs de dégradation du glycocalyx sont corrélés à l'intensité de la dysfonction micro-circulatoire qui persiste plusieurs jours après la CEC, témoignant de l'importance de l'altération initiale de la fonction endothéliale [139,140]. De plus, la dysfonction endothéliale post-CEC est logiquement corrélée à l'augmentation de la perméabilité vasculaire [141]. Il existe un lien clair entre dysfonction d'organe post-opératoire et altération endothéliale après une chirurgie cardiaque sous CEC. Ainsi, l'augmentation des niveaux d'ICAM-1 et VCAM-1 en post opératoire de chirurgie cardiaque est inversement corrélée au rapport PaO₂/FiO₂ post-opératoire, témoignant d'une atteinte pulmonaire plus importante chez les patients avec une atteinte endothéliale marquée [142,143]. Une élévation des niveaux d'angiopoïétine 1 et 2, marqueurs de perméabilité endothéliale, est également associée à la survenue d'un *Acute Kidney Injury* en post CEC [144]. Enfin, les marqueurs de dysfonction endothéliale (P-Selectine, ICAM-1, VCAM-1) et la perte de la vasodilatation artérielle au flux (témoin d'un endothélium dysfonctionnel) sont étroitement associés à la survenue d'une défaillance hémodynamique post-opératoire : syndrome vasoplégique et nécessité d'un support par inotrope ou vasopresseurs en post-CEC [145–147].

iii. Dysfonction endothéliale liée au SIRS : quelle thérapeutique ?

Il est clair que le SIRS, septique ou aseptique, est à l'origine d'une dysfonction endothéliale et que cette dernière est étroitement corrélée aux dysfonctions d'organes et au pronostic des patients.

Au cours du sepsis, de nombreuses études thérapeutiques se sont intéressées à la modulation de la réponse inflammatoire et de la dysfonction endothéliale. Plusieurs traitements ont été évalués dans ces indications : immunoglobulines polyclonales, anti-TNF- α ou anti IL-1 β , inhibiteurs du TLR4, anticorps anti-LPS, cytokines anti-inflammatoires (IL-1Ra), antagonistes du facteur d'activation plaquettaire, corticoïdes, protéines anti-coagulantes (antithrombine III, thrombomoduline, protéine C activée), statines, etc. Aucune de ces études prospectives randomisées n'a montré d'efficacité clinique [148]. La vitamine C exerce un effet bénéfique sur l'endothélium : réduction de l'expression d'iNOS, effet anti-oxydant contrant l'impact des radicaux libres, diminution des lésions endothéliales. Certaines études suggèrent un effet bénéfique de cette vitamine sur la mortalité et les défaillances d'organe au cours du sepsis et des travaux randomisés sont en cours pour évaluer cette molécule chez les patients septiques [149].

L'administration de NO en per- et post-opératoire de chirurgie cardiaque semble diminuer la survenue d'*Acute Kidney Injury* post-opératoire. Un travail randomisé est en cours pour confirmer l'intérêt de ce traitement chez des patients ayant une atteinte endothéliale [150,151]. Néanmoins, plusieurs traitement qui apparaissaient prometteurs pour moduler le SIRS et lutter contre la dysfonction endothéliale induite par la CEC se sont montrés inefficaces sur des critères cliniques de morbi-mortalité dans des études randomisées: méthylprednisolone, aminophylline, immunoglobulines G, statines [152–156]

Il n'existe donc à ce jour aucun traitement dit « spécifique » destiné à corriger la dysfonction endothéliale et les défaillances d'organes dans ce contexte inflammatoire. Il apparait nécessaire de poursuivre et développer les voies de recherche avec l'objectif de moduler cette dysfonction largement impliquée dans le devenir des patients. Depuis quelques années, un mécanisme de réponse cellulaire au stress a été décrit comme ayant un rôle central dans la dysfonction endothéliale aigüe ou chronique : le stress du réticulum endoplasmique.

II- Le stress du réticulum endoplasmique

1. Physiologie du réticulum endoplasmique dans la maturation protéique

Le réticulum endoplasmique (RE) est un organite intracellulaire des cellules eucaryotes essentiel à de nombreuses fonctions cellulaires (*cf.* Figure 5). Il est en continuité avec l'enveloppe nucléaire et est séparé en deux zones fonctionnelles : le RE rugueux et le RE lisse. Le RE rugueux est, avec ses ribosomes associés, le lieu de synthèse des protéines secrétées à l'extérieur de la cellule ou constituant les membranes des organites cellulaires (appareil de Golgi, lysosomes, mitochondries, noyau, ribosomes, vésicules, ...). Il participe à la maturation et au repliement post traductionnel des protéines qui viennent d'être synthétisées et occupe ainsi une place centrale dans le maintien de l'homéostasie cellulaire [157]. Le RE lisse participe au métabolisme cellulaire en synthétisant des lipides et en stockant le calcium.

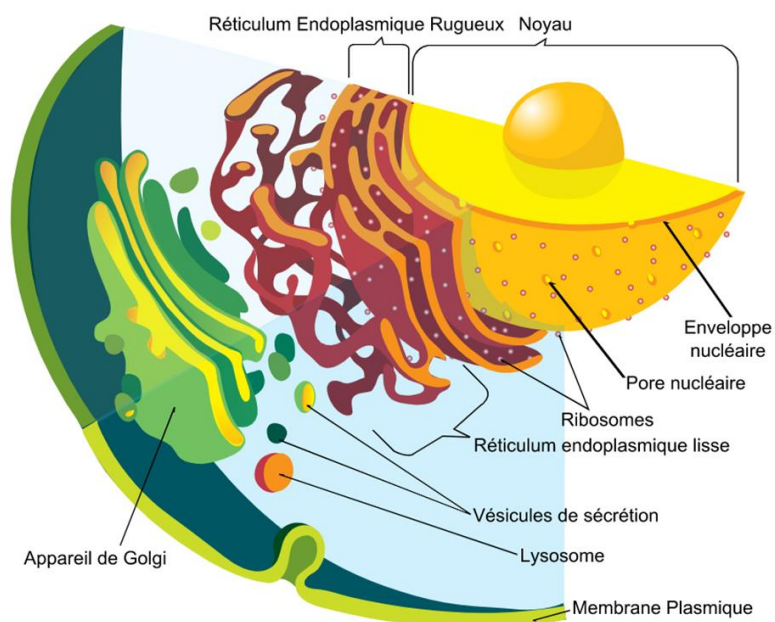


Figure 5: Localisation intracellulaire et structure du réticulum endoplasmique

Image libre de droit, créée par Mariana Ruiz pour l'encyclopédie Wikipédia.

Au cours de la traduction, environ un tiers des protéines immatures est orienté vers la lumière du RE rugueux et va subir des modifications nécessaires à l'acquisition de leur structure tertiaire et de leur fonction : N-glycosylation, ajout de pont disulfures,

oligomérisation, phosphorylation, etc. [157]. Cette maturation requiert la participation d'un ensemble spécifique de protéines chaperonnes dont la *Glucose Related Protein 78 kDa* (GRP78, également appelée *Binding Protein* (BiP)) qui appartient à la famille des *Heat Shock Protein 70 kDa* (HSP70s ; cf. Figure 6) [158]. Les HSP70s fonctionnent en tandem avec des protéines adaptatrices appelées protéines à domaine J (cf. Figure 6). En condition physiologique, le nombre de protéines chaperonnes du RE est supérieur à celui des protéines immatures afin d'éviter leur agrégation et de permettre une maturation satisfaisante du flux protéique cheminant dans le RE [157]. En cas d'échec de maturation, les protéines mal repliées sont exportées vers le cytoplasme *via* des systèmes d'export localisés à la membrane du RE comme le complexe de dégradation associé au réticulum (*ER-Associated Degradation* : ERAD), et dégradées par la voie du protéasome [159,160].

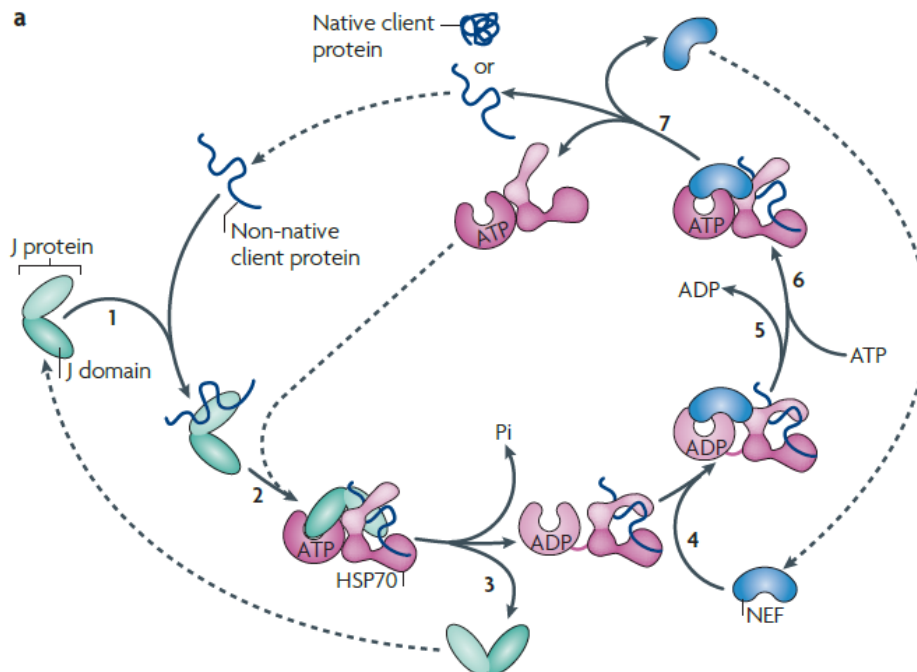


Figure 6: Mécanisme du repliement canonique dépendant des HSP70s

(1) Les protéines à domaine J se lient aux protéines clientes (non repliées). (2) Le complexe protéine J/cliente recrute la chaperonne HSP70. (3) L'hydrolyse de l'ATP permet un changement de conformation de la protéine HSP70 qui enserre la protéine cliente et la stabilise. (4) Recrutement du facteur d'échange nucléotidique (NEF). (5) Dissociation de l'ADP et (6) recrutement d'une nouvelle molécule d'ATP. (7) Dissociation du complexe HSP70/protéine cliente/NEF. La protéine cliente a alors une probabilité de trouver une conformation native lors de la dissociation. Sinon, un nouveau cycle sera débuté jusqu'à l'obtention d'une conformation native ou ciblage au protéasome.

Figure tirée de la thèse du Dr Pierre-Alain Thiebaut et adaptée de Kampinga *et al.* 2010 *Nature Reviews* [161].

2. Mécanismes moléculaires du stress du réticulum endoplasmique

1. Stress du réticulum endoplasmique et *Unfolded Protein Response*

La capacité de synthèse protéique est très variable parmi les différents types cellulaires et elle semble directement liée à la taille du RE, notamment pour les cellules spécialisées dans la sécrétion de protéines extracellulaires où le RE est particulièrement développé. Cependant, quelle que soit la taille du RE, les mécanismes de synthèse protéique fonctionnent à quasi saturation, assurant ainsi un *turnover* rapide du pool protéique mais imposant une charge protéique sur le RE et un fonctionnement à flux tendu. Le dépassement des capacités de repliement du RE entraîne alors une accumulation de peptides non ou insuffisamment repliés, rompant l'homéostasie cellulaire protéique et définissant un état appelé stress du RE (SRE).

Le SRE entraîne une réponse cellulaire adaptatrice appelée *Unfolded Protein Response* (UPR) qui vise à rétablir l'homéostasie selon trois axes : l'augmentation de la synthèse des protéines chaperonnes, la limitation de la traduction protéique globale et l'activation des voies de dégradation protéique [162]. L'UPR repose sur trois voies de signalisation impliquant des protéines transmembranaires du RE :

- La voie *Inositol-Requiring Protein-1 alpha* ;
- La voie *Protein Kinase RNA (PKR)-like ER Kinase* ;
- La voie *Activating Transcription Factor 6*.

En condition physiologique, ces trois protéines transmembranaires sont maintenues sous forme inactive à la membrane par interaction avec la GRP78. En situation de SRE, la GRP78 est réquisitionnée dans la lumière du RE pour le repliement des protéines immatures accumulées et se dissocie de ces protéines effectrices. Cette dissociation permet leur activation.

2. Voies de signalisation de l'*Unfolded Protein Response*

L'UPR repose sur trois voies dont l'activation va mener, en fonction de l'intensité et de la durée du stress, à la résolution du SRE ou à une évolution défavorable vers l'apoptose. Les voies de l'UPR sont schématisées et résumées dans la Figure 7.

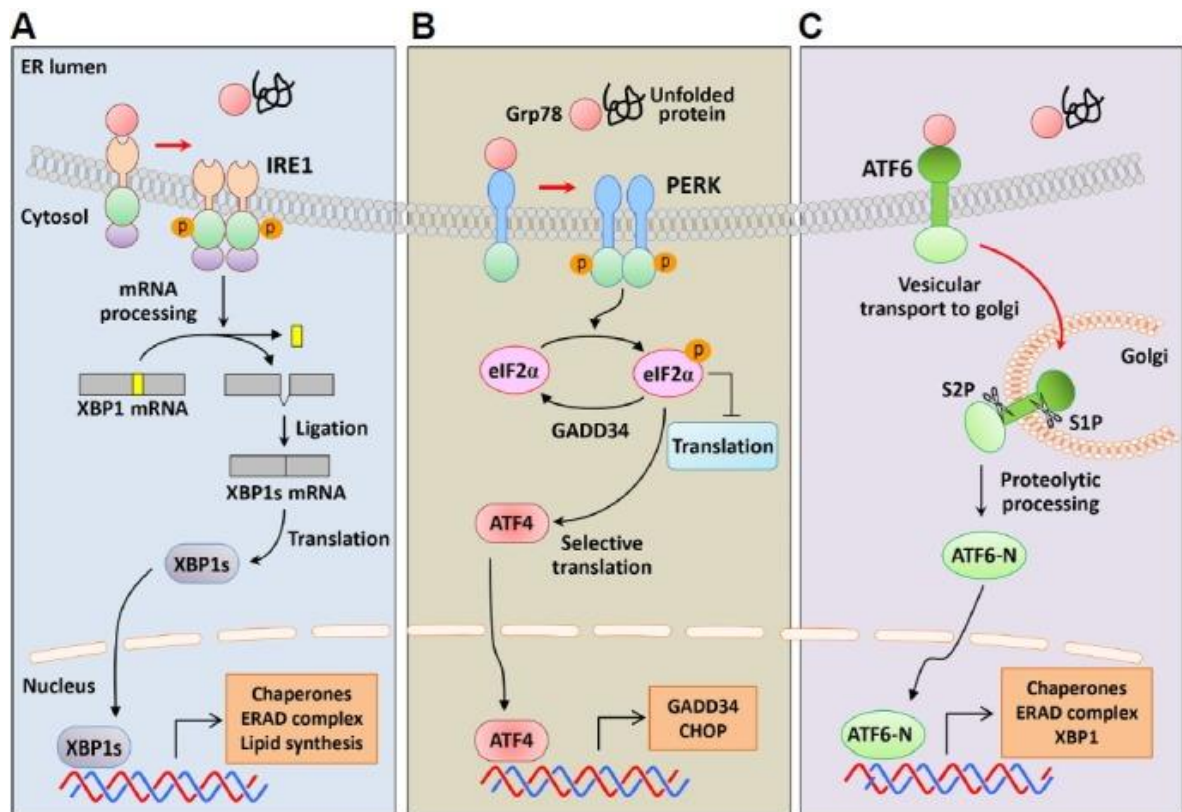


Figure 7: Voies de signalisation de l'Unfolded Protein Response

Les protéines IRE1 α , PERK et ATF6 sont intégrées dans la membrane du RE et peuvent activer des voies de transduction du RE vers le cytosol. Dans des conditions normales, la GRP78 se lie aux domaines luminaux de ces protéines détectrices et inhibe leur activation. En situation de stress du réticulum endoplasmique (SRE), la GRP78 se dissocie de IRE1 α , PERK et ATF6 et se lie aux protéines non repliées. Cette dissociation entraîne l'activation des protéines détectrices. Figure adaptée de So, 2018 *Mol Cells*. [163].

(A) Voie IRE1 α : IRE1 α possède un domaine kinase et RNase dans sa région cytoplasmique, le SRE induit sa dimérisation et son autophosphorylation. Le domaine RNase d'IRE1 α est ainsi activé et effectue un épissage de l'ARNm de XBP1. L'ARNm XBP1 tronqué code pour XBP1s, qui active la transcription des gènes liés à l'UPR.

(B) Voie PERK : PERK est une protéine kinase qui subit une dimérisation et une autophosphorylation lors du SRE. PERK activé phosphoryle eIF2 α qui va entraîner une inhibition générale de la traduction des protéines. eIF2 α phosphorylé augmente cependant sélectivement la transcription d'ATF4, qui active la transcription de CHOP qui transcrit à son tour GADD34. GADD34 exerce un rétrocontrôle négatif en déphosphorylant eIF2 α pour rétablir la synthèse des protéines après régression du SRE.

(C) Voie ATF6 : le SRE induit une translocation d'ATF6 du RE vers l'appareil de Golgi. Il est ensuite clivé par des protéases (S1P et S2P) libérant l'extrémité N-terminale d'ATF6 (ATF6-N), qui migre vers le noyau et induit la transcription des gènes cibles codant pour les chaperonnes ER, les composants ERAD et XBP1.

ATF4/6, activating transcription factor 4/6; CHOP, C/EBP homologous protein; eIF2 α , α -subunit of eukaryotic translation initiation factor 2; ERAD, ER-Associated Degradation; GADD34, growth arrest and DNA damage-inducible protein 34; RNase, endoribonuclease; S1(2)P, site-1(2) protease; XBP1, X-box binding protein 1.

i. La voie Inositol-Requiring Protein-1 alpha

Inositol-Requiring Protein-1 alpha (IRE1 α) est une protéine transmembranaire de type I possédant une double activité kinase et RNase. La partie intraluminaire d'IRE1 α participe à la détection des protéines non repliées, tandis que la partie intracytoplasmique possède les domaines kinase et RNase. En conditions basales, lorsque le niveau de chaperonnes est adapté à la demande en repliement protéique, IRE1 α est associée à GRP78 qui exerce alors un rôle inhibiteur sur l'activité kinase et RNase d'IRE1 α . L'accumulation de protéines non repliées au sein de la lumière du RE va entraîner une titration de GRP78, libérant ainsi IRE1 α et favorisant sa dimérisation [164]. Une fois dissociée de la GRP78, elle se dimérise et s'active par autophosphorylation puis épisse l'ARN messager (ARNm) codant *X-box Binding Protein-1* (XBP1) pour générer XBP1 épissé (*spliced-XBP1*, sXBP1) qui agit comme un facteur de transcription augmentant la synthèse de protéines adaptatives du SRE, du NF- κ B et des facteurs de l'inflammation et de l'apoptose.

Indépendamment du clivage de XBP1, IRE1 α possède également un rôle de dégradation d'autres ARNm. C'est la « dégradation régulée dépendante d'IRE1 α » (*Regulated IRE1 Dependant Decay* ou RIDD) qui permet la dégradation rapide d'ARNm, inhibant ainsi la traduction et limitant donc l'accumulation de protéines au sein de la lumière du réticulum [165]. Lors d'un stress de faible intensité, les dimères d'IRE1 α épissent l'ARNm d'XBP1 mais il n'y a qu'une faible activation de RIDD. Cette réponse permet la synthèse du facteur adaptatif sXBP1 et la résolution du stress. En revanche, lors d'un stress intense et/ou prolongé, les monomères d'IRE1 α s'associent en oligomères de haut poids moléculaire, créant un site RNase de plus grande taille et activant la voie RIDD, nécessaire à l'apoptose [166]. Les mécanismes de l'induction de l'apoptose induite par la voie RIDD sont complexes et sont en partie liés aux modifications engendrées par la baisse des niveaux d'ARNm de certains facteurs anti-apoptotiques.

ii. La voie Protein Kinase RNA (PKR)-like ER Kinase

La *Protein Kinase RNA (PKR)-like ER Kinase* (PERK) est, comme IRE1 α , une protéine transmembranaire du RE de type I à activité kinase. PERK et IRE1 α partagent une phylogénie commune et possèdent des domaines intraluminaux de fixation à la GRP78 similaires [164]. Leurs mécanismes d'activation sont donc logiquement similaires et reposent sur la titration

en GRP78 lors d'un afflux massif de protéines au sein du RE. Une fois dissociée de la GRP78, PERK s'active par dimérisation et autophosphorylation puis phosphoryle la sous unité alpha d'*Eukaryotic Initiation Factor 2* (eIF2 α). eIF2 α phosphorylé se dimérise avec eIF2 β , produisant alors un complexe responsable d'une diminution de la transcription protéique globale. En cas de stress prolongé, cette voie augmente la traduction de l'ARNm de *Activated Transcription Factor 4* (ATF4), facteur de transcription de gènes impliqués dans l'autophagie, le stress oxydatif et l'apoptose. ATF4 va ainsi activer la synthèse d'un autre facteur de transcription : *C/EBP-homologous protein* (CHOP). CHOP possède une activité dépendante de l'intensité et de la durée du SRE. A la phase initiale, l'augmentation de CHOP, issue de la voie de transcription PERK, conduit à la synthèse de nouvelles chaperonnes. CHOP va également conduire à la synthèse de la *Growth Arrest and DNA Damage-inducible protein* (GADD34), un facteur déphosphorylant eIF2 α afin de terminer l'UPR lorsque le SRE se corrige [167]. Mais son expression prolongée active les voies de l'apoptose en diminuant la transcription de l'ARNm de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 [168].

iii. La voie *Activating Transcription Factor 6*

L'*Activating Transcription Factor 6* (ATF 6) est une protéine transmembranaire du RE de type II à activité kinase. Une fois dissociée de la GRP78, elle est transloquée dans l'appareil de Golgi et clivée par des protéases [169]. Le fragment clivé agit directement comme un facteur de transcription et induit l'expression de protéines nécessaires au repliement : chaperonne, protéine disulfure isomérase (permettant la synthèse de ponts disulfures, indispensables à la configuration tertiaire des protéines), protéine de contrôle qualité et de dégradation, etc. [170]. Il semble que la voie ATF6, de par l'effet direct de la portion clivée comme facteur de transcription, soit la voie la plus précocement active lors de la mise en place de l'UPR. Ainsi, si la synthèse de GRP78 issue de l'activation d'ATF6 est suffisante avec résolution rapide du SRE, les autres voies de l'UPR ne s'activent pas (absence d'épissage de XBP1 par exemple) [171,172].

iv. Fonctions communes des voies de l'UPR

Au final, les voies IRE1 α , PERK et ATF6 tendent à la restauration de l'homéostasie du RE et à la survie cellulaire (en particulier *via* la synthèse de GRP78) en cas de stress léger à modéré, ou induisent l'apoptose en cas de stress majeur et prolongé [173]. Ces 3 voies sont bien distinctes avec des effets spécifiques de sXBP1, d'ATF4 ou d'ATF6 sur certains gènes. Il est cependant important de noter que leur phénotype et leur *trigger* d'activation (réquisition de la GRP78 dans la lumière du RE) sont communs et qu'elles ont, en partie, des effets similaires : synthèse de chaperonnes, mise en jeu des voies pro-apoptotiques en cas d'activation prolongée, etc. Par exemple, si la synthèse du facteur de transcription CHOP est classiquement décrite dans la voie PERK, les voies IRE1 α et ATF6 peuvent également induire sa production [171]. Il apparaît donc probablement plus légitime de considérer l'UPR comme une réponse globale impliquant ces trois voies entremêlées plutôt que comme l'addition de trois voies séparées sur le plan fonctionnel.

3. Stress du réticulum endoplasmique et dysfonction endothéliale

Il y a un lien clair entre SRE et dysfonction endothéliale. L'induction pharmacologique d'un SRE par tunicamycine dans les cellules endothéliales coronaires humaines induit l'expression de la *p38 mitogen-activated protein kinase* (protéine pro-inflammatoire également impliquée dans l'initiation de l'apoptose), la majoration du stress oxydatif et la diminution de l'activité de la eNOS [174]. Il a été montré que l'incubation d'artères de souris avec la tunicamycine induisait une dysfonction endothéliale avec perte de la vasodilatation endothélium-dépendante [175]. Dans ce même travail, un traitement de souris hypertendues par l'acide 4-phenylbutirique (4BPA, une chaperonne chimique inhibitrice du SRE) a permis d'augmenter l'activité de la eNOS et d'améliorer la relaxation endothélium-dépendante, témoin d'un endothélium fonctionnel [175]. De plus, il a été montré qu'un traitement par 4BPA permet de reverser partiellement la baisse de eNOS dans des cultures de cellules endothéliales humaines de patients diabétiques suggérant une amélioration directe de la fonction endothéliale chez l'Homme [176]. Des données récentes de notre équipe INSERM, issues de la thèse du Dr Pierre-Alain Thiebaut, confirment ces précédents travaux en montrant

que des animaux traités par tunicamycine présentent une altération de la dilatation artérielle médiée par le flux (Figure 8) [177].

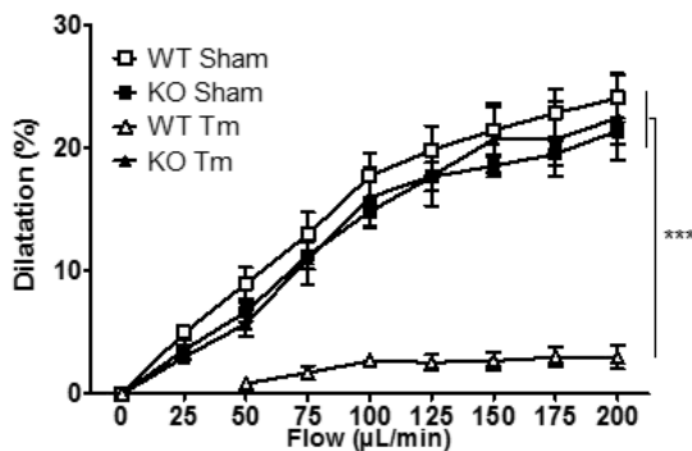


Figure 8: Effet de l'induction du SRE sur la fonction endothéliale chez des souris KO pour le gène codant la protéine tyrosine phosphatase 1B

La tunicamycine a été injectée à la dose de 1µg/g dans la cavité intrapéritonéale des animaux WT et KO pour la protéine tyrosine phosphatase 1B. Après 48h, la fonction vasculaire a été analysée par artériographe d'Halpern en réponse à l'augmentation du flux sanguin, n=6-8/groupe, ANOVA 2 facteurs, *** : p<0.001.

Données issues de la thèse du Dr Pierre-Alain Thiebaut et tirés de Thiebaut *et al.*, 2018 [177].

Enfin, *in vivo* chez l'Homme, la prise d'acide tauroursodeoxycholique, un inhibiteur du SRE, a permis de corriger la perte de vasodilatation médiée par le flux induite par une dose de charge orale de glucose [178]. Ce travail a ainsi suggéré l'efficacité de cibler le SRE pour prévenir la dysfonction endothéliale chez l'Homme.

3. Stress du réticulum endoplasmique et pathologies inflammatoires aiguës

1. Dans des modèles animaux

i. Modèles animaux d'inflammation aiguë septique

Plusieurs travaux récents mettent en évidence que l'inflammation aiguë et le SIRS sont associés à l'activation des voies du SRE. Au niveau pulmonaire, il existe une activation des

voies du SRE après administration de LPS bactérien et l'inactivation de CHOP conduit à une amélioration de la survie dans des modèles de sepsis par administration de LPS et/ou par CLP par une possible réduction des mécanismes pro-apoptotiques [179–181]. Dans un modèle de sepsis endotoxinique, l'administration de LPS conduit à une augmentation de l'expression des marqueurs du SRE au niveau du poumon [182]. L'utilisation de 4BPA a montré son efficacité dans des modèles pré-cliniques pour réduire la dysfonction d'organe induite par le LPS bactérien. Ainsi, il diminue les niveaux d'expression tissulaire de cytokines inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , ICAM-1) et l'activation du système NF- κ B, chez des animaux traités par LPS [182]. Enfin, le 4BPA a montré une diminution de la mortalité dans un modèle de sepsis murin par CLP avec une amélioration de la perfusion d'organe et de l'oxygénation tissulaire, du débit cardiaque et une réduction de l'inflammation et du stress oxydatif systémique [183]. Un autre inhibiteur du SRE, l'acide tauroursodeoxycholique, a également montré un effet similaire au 4BPA avec une réduction de la mortalité et une augmentation de la synthèse de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 dans un modèle murin de sepsis mixte (péritonite fécale + pneumonie) [184].

ii. Modèles animaux d'inflammation aigüe aseptique

Ces données encourageantes sur l'utilisation d'inhibiteurs du SRE dans des modèles septiques sont également retrouvées dans des modèles aseptiques. Ainsi, le 4BPA diminue les défaillances d'organes, l'apoptose intestinale et pancréatique et l'inflammation systémique dans des modèles murins de pancréatite aigüe [185–187]. Plusieurs travaux ont aussi montré un effet protecteur du 4BPA sur les lésions induites par l'ischémie-reperfusion. Le 4BPA améliore par exemple la survie neuronale et réduit le déficit neurologique clinique après ischémie médullaire chirurgicale chez le lapin [188]. De même, dans un modèle d'ischémie-reperfusion coronaire, l'administration de 4BPA réduit la taille de l'infarctus, diminue l'apoptose des cardiomyocytes et améliore les fonctions systolique et diastolique à long terme après l'infarctus [189,190]. Il n'existe actuellement aucune étude pré-clinique s'intéressant à l'inhibition du SRE au cours de la CEC.

2. Chez l'Homme

Le SRE et l'UPR ont été bien décrits en cancérologie, en diabétologie ou dans le cadre des maladies neuro-dégénératives et auto-immunes, mais il n'y a que très peu d'études les analysant au cours des situations d'inflammation aiguë chez l'Homme. Il a été montré que le SRE était nettement activé dans les cellules mononuclées de huit patients atteints d'un *Acute Lung Injury* comparativement à six volontaires sains [182]. D'autres travaux ont montré qu'un dommage tissulaire (biopsie graisseuse sous-cutanée ou biopsie musculaire) s'accompagnait d'une activation locale des voies de l'UPR, prouvant ainsi qu'un dommage tissulaire aseptique pouvait induire une réaction de SRE [191,192].

Enfin, il convient de noter que le 4BPA et l'acide tauroursodeoxycholique sont en cours d'évaluation chez l'Homme pour moduler le SRE chez des patients diabétiques ou obèses (www.clinicaltrials.gov, NCT00771901). Cela montre l'intérêt actuel que suscite l'inhibition du SRE chez l'Homme et la possibilité de, peut-être un jour, pouvoir envisager cette thérapeutique en pratique clinique.

4. Stress du réticulum endoplasmique et protéine tyrosine phosphatase

1B

1. La protéine tyrosine phosphatase 1B

i. Phylogénie et localisation cellulaire

Les phosphatases sont des enzymes spécialisées dans la déphosphorylation de protéines. Au sein de cette classe enzymatique, il existe plusieurs familles classées selon leurs spécificités de substrats. Ainsi, les phosphatases spécifiques des résidus tyrosine phosphorylés, ou *Protein Tyrosine Phosphatases* (PTPs), sont impliquées dans la régulation de voies de signalisation intracellulaires [193]. Elles s'opposent à l'action des Protéines Tyrosine Kinase, dont le rôle est de phosphoryler les résidus tyrosine cibles. Les PTPs sont divisées en trois différentes sous-classes (I, II et III). La classe I des PTPs comprend les phosphatases spécifiques uniquement des résidus tyrosine phosphorylés. La protéine tyrosine phosphatase

1B (PTP1B) est une protéine essentiellement ancrée à la membrane du RE via son domaine C-terminal [194]. Cette localisation centrale dans la cellule est particulièrement adaptée à la régulation fine de nombreux processus physiologiques intracellulaires. La fixation d'un ligand sur les récepteurs à tyrosine kinase mène à leur autophosphorylation activatrice puis à leur endocytose dans des endosomes spécialisés. Ce processus rapproche les récepteurs activés de leurs cibles moléculaires mais également de leur régulateurs comme la PTP1B qui, en les déphosphorylant, bloque la transduction du signal [195]. La PTP1B est par exemple impliquée dans la régulation négative de nombreuses voies de signalisation cellulaire telles que la réponse à l'insuline, à la leptine, à certains facteurs de croissance et à la production endothéliale de monoxyde d'azote [194,196].

ii. Régulation de l'activité

L'inflammation active la transcription de *PTPN1*, le gène codant la PTP1B, en particulier *via* TNF- α qui induit la synthèse de NF- κ B qui à son tour agit directement comme promoteur de la transcription de *PTPN1* [197]. Paradoxalement, alors que la PTP1B est impliquée dans l'insulinorésistance (*cf. infra*), l'hyperglycémie va induire une augmentation de sa transcription (*via* le facteur de transcription *Specificity Protein-1*), aggravant le cercle vicieux hyperglycémie / insulinorésistance [198].

Il existe également une régulation post-transcriptionnelle de la PTP1B faisant intervenir plusieurs éléments dont :

- les micro-ARN 210 et 122 qui inhibent la synthèse de PTP1B [199,200] ;
- les espèces réactives de l'oxygène qui inactivent transitoirement ou définitivement la fonction de la PTP1B *via* une oxydation plus ou moins intense de sa cystéine 215 [201];
- Le monoxyde d'azote qui a un effet inhibiteur temporaire *via* une nitrosylation inhibitrice transitoire de la cystéine 215 [202] ;
- la phosphorylation inhibitrice de la PTP1B par la protéine Akt (protéine kinase B) sur sa sérine 50 [203].

La régulation de la synthèse et de l'activité de la PTP1B est donc complexe et intervient à plusieurs niveaux.

2. Protéine tyrosine phosphatase 1B et pathologies

i. Pathologies métaboliques

La PTP1B a essentiellement été étudiée dans les pathologies métaboliques et elle participe directement à la régulation du métabolisme insulinique. Le récepteur à l'insuline est un récepteur à tyrosine kinase et la PTP1B est connue pour exercer un rétrocontrôle négatif dans sa voie de signalisation en déphosphorylant le résidu tyrosine du récepteur à l'insuline (cf. figure 9) [204].

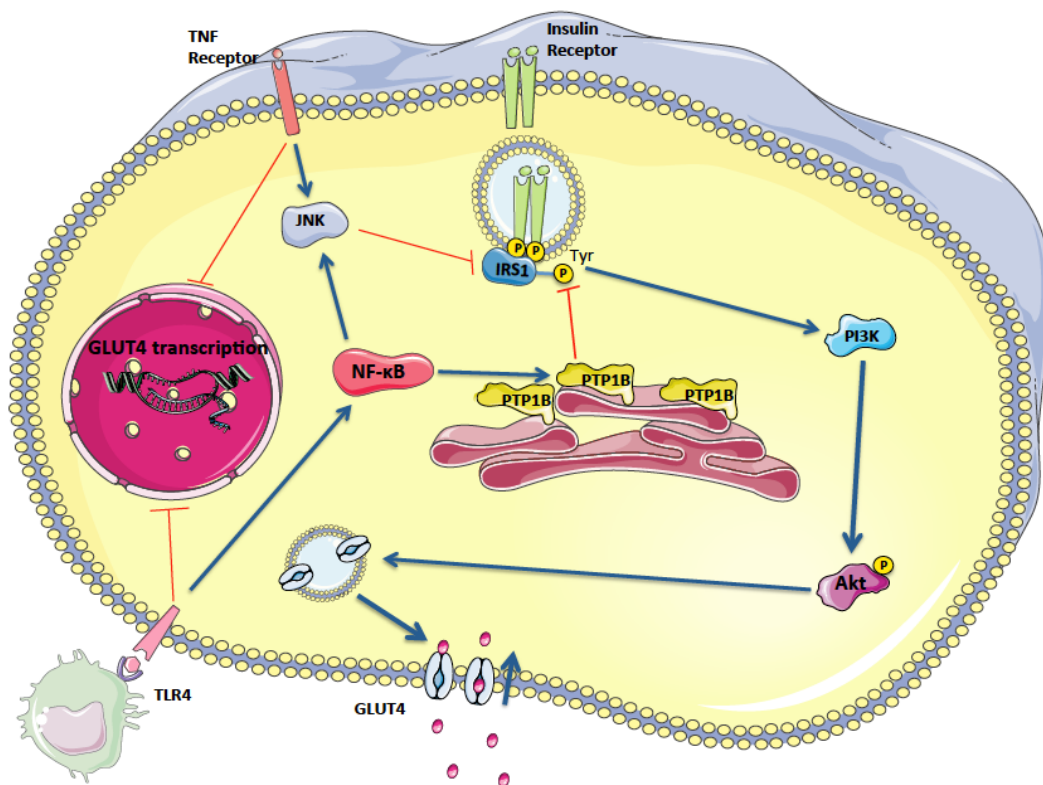


Figure 9: Implication de la PTP1B dans l'insulinorésistance liée au sepsis

Les cytokines pro-inflammatoires et les endotoxines bactériennes activent les voies de l'inflammation résultant en une inhibition du récepteur à l'insuline par phosphorylation du résidu sérine de l'*insulin receptor substrate-1* (IRS-1) et en une inhibition de la transcription des transporteurs du glucose Glucose Transporter 4 (GLUT4). La PTP1B, surexprimée en période inflammatoire, inhibe la phosphorylation du résidu tyrosine d'IRS-1, conduisant à l'inhibition de la voie PI3K/Akt, responsable de l'inhibition de la translocation des transporteurs GLUT-4 vers la membrane cellulaire. Les conséquences sont donc une moindre absorption de glucose par la cellule.

Le rôle de la PTP1B dans les voies de signalisation de l'insuline a été mis en évidence par une étude montrant que la délétion du gène de la PTP1B chez des souris permettait d'augmenter leur sensibilité à l'insuline et de prévenir l'obésité liée à un régime riche en graisses. Ce travail a donc suggéré l'action inhibitrice de cette protéine dans la signalisation de l'insuline [205]. Plusieurs autres travaux ont confirmé le rôle inhibiteur des protéines tyrosines phosphatases, et notamment de la PTP1B dans l'assimilation du glucose conduisant aux phénomènes d'insulinorésistance constatés dans l'obésité ou le diabète [206,207]. De plus, la PTP1B exerce un rétrocontrôle négatif sur la voie de signalisation médiée par la protéine Janus kinase. Cette protéine fait partie des voies de signalisation impliquées à la fois dans les pathologies métaboliques et inflammatoires [204]. Récemment, l'impact de la délétion du gène codant la PTP1B a été étudiée dans un modèle murin de sepsis induit par CLP. Elle a permis d'améliorer la sensibilité du récepteur à l'insuline, de restaurer l'expression et l'activité des *Glucose Transporter 4* (GLUT4) et de réduire l'inflammation et la dysfonction endothéliale induite par le sepsis [208]. La PTP1B joue donc probablement un rôle clé entre le métabolisme insulinique et la réponse inflammatoire.

ii. Pathologies cardiovasculaires et inflammatoires

En effet, la PTP1B, dont l'expression est favorisée par l'inflammation, joue également un rôle dans la modulation de la réponse inflammatoire des cellules circulantes [209]. Des travaux récents mettent en exergue le lien entre l'expression tissulaire de la PTP1B, l'activation du processus inflammatoire et la survenue de défaillance d'organe. De fait, dans une étude murine sur l'inflammation induite par l'obésité, la surexpression de la PTP1B semblait être secondaire à une activation de la voie pro-inflammatoire orchestrée par NF- κ B et était directement corrélée aux taux circulants de TNF- α [209]. En parallèle, la PTP1B joue également un rôle important dans la dysfonction endothéliale septique. La PTP1B est présente dans la cellule endothéliale et son inhibition ou la délétion du gène codant la PTP1B a un effet protecteur sur la dysfonction endothéliale constatée dans les maladies cardiovasculaires [210,211] ou dans le sepsis [212]. De la même manière chez la souris, la délétion du gène de la PTP1B a permis de réduire la survenue des manifestations cardiovasculaires dues à un choc endotoxinique [212].

Enfin, le rôle délétère de la PTP1B est aussi suggéré dans le myocarde. Son expression est augmentée dans le cœur en cas de dysfonction du cardiomyocyte [213]. Dans des modèles murins d'insuffisance cardiaque chronique, son inhibition pharmacologique permet de rétablir une dilatation médiée par le flux des artères périphériques, traduisant une restauration de la dysfonction endothéliale associée [210]. Enfin, l'inhibition génétique de la PTP1B sélectivement au niveau de la cellule endothéliale prévient la survenue de dysfonction myocardique et d'altération endothéliale dans ce même modèle d'insuffisance cardiaque [214].

3. Liens entre protéine tyrosine phosphatase 1B et stress du réticulum endoplasmique

De par leur localisation au niveau de la membrane du RE, il existe un lien fonctionnel entre PTP1B et SRE. Il y a une proximité physique de la PTP1B avec PERK et IRE1 α et l'inactivation génétique de la PTP1B induit une activation des voies PERK et IRE1 α , ce qui suggère un effet inhibiteur de la PTP1B sur l'UPR [215]. D'autres études montrent cependant que l'inactivation génétique de la PTP1B diminue l'activation de PERK ou d'IRE1 α [216,217]. Ces travaux contradictoires ont été menés *in vitro* sur des cultures de tissus de nature différentes et il est donc possible que le PTP1B ait une action différente sur le SRE en fonction du tissu ou du contexte pathologique. Dans des modèles animaux, il semble cependant qu'expressions de PTP1B et SRE soient positivement associées. Ainsi, dans un travail mené chez des souris ayant un régime gras, l'expression de PTP1B était diminuée après traitement par un inhibiteur du SRE, l'acide tauroursodeoxycholique [218]. A l'inverse, dans ce même travail, un traitement de tissus musculaires par un inducteur de SRE, la tunicamycine, induisait une augmentation de l'expression de la PTP1B, témoignant de l'induction de la PTP1B par le SRE [218]. Dans une autre étude, la défaillance myocardique induite par le SRE dans un modèle murin était atténuée chez les souris KO pour le gène codant la PTP1B [219].

Dans sa thèse, le Dr Pierre-Alain Thiebaut a ciblé le lien entre PTP1B et SRE dans l'endothélium. Il a montré que, chez les souris KO pour le gène codant la PTP1B, la tunicamycine (inductrice de SRE) n'induisait pas de dysfonction endothéliale, confirmant les travaux précédents sur l'effet protecteur de la délétion en PTP1B sur le SRE endothélial induit

in vivo (cf. Figure 10) [177]. Dans ce même travail, les animaux KO pour le gène codant la PTP1B présentaient des niveaux basals d'ATF6, CHOP et EIF2 α supérieurs aux animaux contrôle mais sans augmentation de la GRP78, suggérant un impact de la présence de la PTP1B sur le niveau basal de l'UPR et un possible effet inhibiteur de la PTP1B sur les voies PERK et ATF6 [177]. Dans des données non publiées de sa thèse, le Dr Thiebaut a également montré qu'après injection de LPS, les animaux KO-PTP1B ne présentaient pas d'augmentation des niveaux d'ATF6, d'EIF2 α et de GRP78 dans les artères périphériques (cf. figure 10). L'ensemble de ces données suggèrent que la délétion en PTP1B n'inhibe pas les voies de l'UPR mais prévient la survenue du SRE endothélial, prévenant ainsi la dysfonction endothéliale septique.

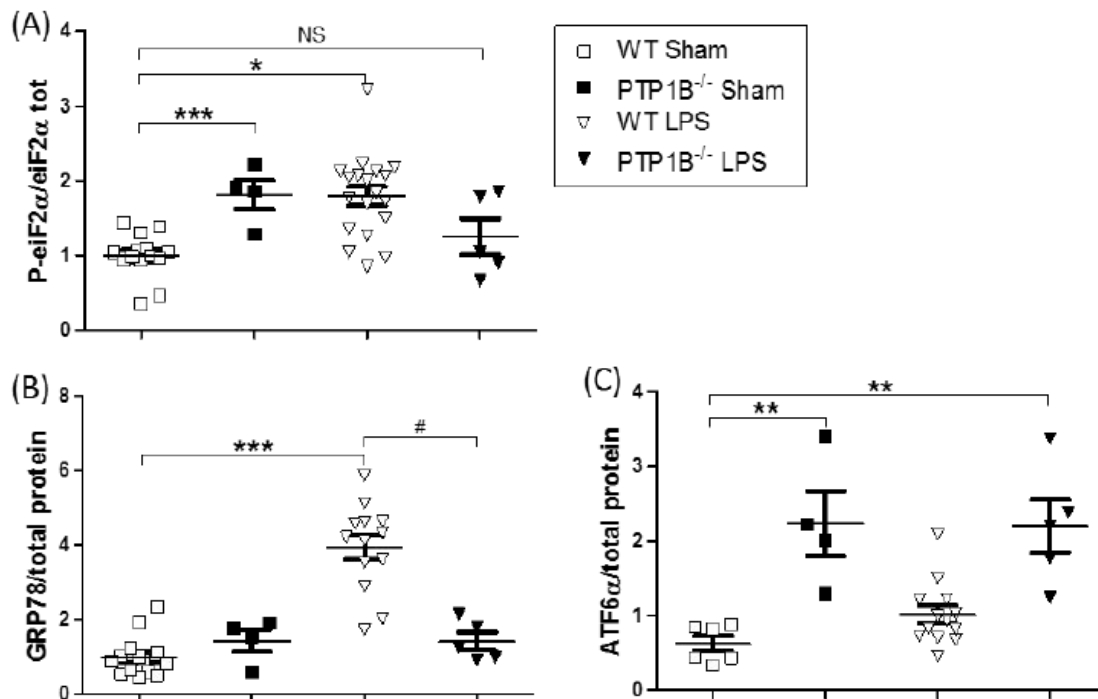


Figure 10: Impact de l'inactivation génétique de la PTP1B sur l'expression des marqueurs vasculaires du stress du RE au cours du sepsis

Les artères murines de souris WT ou PTP1B^{-/-} soumises à une injection intrapéritonéale de LPS ont été analysées en Western-Blot pour les principaux marqueurs du stress du RE (A-C). Kruskal-Wallis, * : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001).

Données issues de la thèse du Dr Pierre-Alain Thiebaut.

OBJECTIF DE LA THESE

Malgré de nombreuses descriptions du SRE et de l'UPR *in vitro* et dans des modèles animaux, il n'existe qu'une seule description de l'expression du SRE au cours de l'*Acute Lung Injury* chez l'Homme [182]. Kim *et al.* avaient montré une augmentation de la synthèse de GRP78 et CHOP dans les cellules mononucléées (monocytes et lymphocytes) des patients ayant un *Acute Lung Injury* en comparaison de volontaires sains, témoignant d'une activation du SRE chez ces patients [182]. Aucun travail ne s'est intéressé à la cinétique de l'UPR à la phase aigüe d'un SIRS et à son lien avec la dysfonction endothéliale *in vivo* chez l'Homme.

L'objectif de cette thèse était d'explorer la cinétique et l'intensité de l'expression des voies de l'UPR au cours des situations d'inflammation systémique chez l'Homme. Nous avons fait l'hypothèse qu'un stress inflammatoire induisait les trois voies de l'UPR et que l'activation de ces voies était proportionnelle à l'intensité des lésions endothéliales et des défaillances d'organe observées. Nous avons également exploré le lien entre expression de l'UPR et expression de la PTP1B au cours du sepsis (objectif secondaire).

Nous avons étudié deux situations d'inflammation systémique : le SIRS septique et le SIRS aseptique. Nous avons choisi la chirurgie cardiaque sous CEC comme modèle de SIRS aseptique. Le fait de connaître avec précision le début du stress inflammatoire lié à la chirurgie nous permettait d'analyser avec précision la cinétique de l'UPR dans ce modèle.

Les résultats de cette thèse sont donc organisés en deux parties qui correspondent à l'étude du SRE lors du choc septique et lors de la chirurgie cardiaque sous CEC.

RÉSULTATS

I- Cinétique et expression des voies de l'*Unfolded Protein Response* au cours du SIRS septique

Dans des modèles animaux, la PTP1B et le SRE sont impliqués dans l'inflammation septique et la PTP1B joue un rôle important dans l'insulinorésistance induite par le sepsis. Dans des modèles murins de sepsis, leur inhibition est associée à une diminution des défaillances d'organes et à une amélioration de la survie. L'objectif de notre étude était 1) d'évaluer la relation entre l'expression des gènes codant la PTP1B, les protéines clés des voies de signalisation de l'UPR, et les défaillances d'organes lors d'un choc septique chez l'Homme et 2) de décrire leur cinétique dans les cinq premiers jours du choc septique.

Nous avons mené une étude incluant des patients admis en réanimation pour un choc septique. Des échantillons de sang total ont été prélevés les 1er, 3e et 5e jour d'hospitalisation (J1, J3 et J5) sur des tubes PaxGen® permettant de collecter les ARN circulants. La PCR quantitative, réalisée à partir de sang total, a ainsi évalué l'expression des gènes codant pour PTP1B (*PTPN1*), pour des éléments clés du SRE (*GRP78*, *ATF6*, *CHOP*) et pour des marqueurs liés au dysfonctionnement endothélial (*ICAM-1* et *ET-1*). Le critère d'évaluation principal était la corrélation entre les variations de *PTPN1* et les variations du score SOFA.

Après inclusion de 44 patients, nous avons montré une diminution significative des expressions du *PTPN1* et d'*ATF6*. Les cinétiques de *GRP78* et *CHOP* sont apparues également décroissantes bien que ces variations ne soient pas statistiquement significatives. Les variations d'expression de *PTPN1* et *ATF6* étaient corrélées avec la variation du score SOFA. Il n'y avait pas de corrélation entre l'expression de *PTPN1* et l'insulinorésistance ou les différents paramètres glycémiques. Entre J1 et J5, les variations d'expressions d'*ATF6* et de *PTPN1* ont été corrélées avec celle de *ET1*. Nos données indiquent donc que les expressions d'*ATF6* et de *PTPN1* sont plus importantes en cas de défaillances d'organes persistantes, et que les variations de leur expression est corrélée à celle d'un marqueur de dysfonction endothéliale. Nous montrons pour la première fois chez l'Homme un lien entre défaillance d'organe induite par le sepsis et expression du SRE.



Gene Expression of Protein Tyrosine Phosphatase 1B and Endoplasmic Reticulum Stress During Septic Shock

OPEN ACCESS

Edited by:

Andrey V. Kozlov,
Institute for Experimental and Clinical
Traumatology (LBG), Austria

Reviewed by:

Johanna Catharina Duvigneau,
Veterinärmedizinische Universität
Wien, Austria

Reviewed by:

Longxiang Su,
Peking Union Medical College
Hospital (CAMS), China

Eizo Watanabe,
Chiba University Graduate School of
Medicine, Japan

*Correspondence:

Thomas Clavier
thomasclavier76@gmail.com

†ORCID:

Thomas Clavier
orcid.org/0000-0001-8630-7537

Specialty section:

This article was submitted to
Intensive Care Medicine and
Anesthesiology,
a section of the journal
Frontiers in Medicine

Received: 08 July 2019

Accepted: 14 October 2019

Published: 01 November 2019

Citation:

Clavier T, Grangé S,
Pressat-Laffouilhère T, Besnier E,
Renet S, Fraineau S, Thiebaut P-A,
Richard V, Veber B and Tamion F
(2019) Gene Expression of Protein
Tyrosine Phosphatase 1B and
Endoplasmic Reticulum Stress During
Septic Shock. *Front. Med.* 6:240.
doi: 10.3389/fmed.2019.00240

Thomas Clavier^{1,2,3*†}, Steven Grangé³, Thibaut Pressat-Laffouilhère⁴,
Emmanuel Besnier^{1,2}, Sylvanie Renet², Sylvain Fraineau², Pierre-Alain Thiebaut²,
Vincent Richard², Benoit Veber¹ and Fabienne Tamion^{2,3}

¹ Department of Anesthesiology and Critical Care, Rouen University Hospital, Rouen, France, ² Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1096, FHU REMOD-VHF, Rouen, France, ³ Department of Medical Critical Care, Rouen University Hospital, Rouen, France, ⁴ Department of Biostatistics, Rouen University Hospital, Rouen, France

Introduction: Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) and endoplasmic reticulum stress (ERS) are involved in the septic inflammatory response. Their inhibition is associated with improved survival in murine models of sepsis. The objective was to describe PTP1B and ERS expression during septic shock in human.

Material and Methods: Prospective study including patients admitted to intensive care unit (ICU) for septic shock. Blood samples were collected on days 1 (D1), 3 and 5 (D5). Quantitative PCR (performed from whole blood) evaluated the expression of genes coding for PTP1B (*PTPN1*) and key elements of ERS (GRP78, ATF6, CHOP) or for endothelial dysfunction-related markers (ICAM1 and ET1). We analyzed gene variation between D5 and D1, collected glycemic parameters, insulin resistance and organ failure was evaluated by Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score.

Results: We included 44 patients with a mean SAPS II 50 ± 16 and a mortality rate of 13.6%. Between D1 and D5, there was a significant decrease of *PTPN1* ($p < 0.001$) and *ATF6* ($p < 0.001$) expressions. Their variations of expression were correlated with SOFA variation (*PTPN1*, $r = 0.35$, CI 95% [0.05; 0.54], $p = 0.03$ and *ATF6*, $r = 0.45$ CI 95% [0.20; 0.65], $p < 0.001$). We did not find any correlation between *PTPN1* expression and insulin resistance or glycemic parameters. Between D1 and D5, *ATF6* and *PTPN1* expressions were correlated with that of *ET1*.

Conclusions: Our study has evaluated for the first time the expression of PTP1B and ERS in patients with septic shock, revealing that gene expression variation of *PTPN1* and *ATF6* are partly correlated with the evolution of septic organ failure and with endothelial dysfunction markers expression.

Keywords: protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1/metabolism, endoplasmic reticulum stress, sepsis, shock, endothelium, inflammation

INTRODUCTION

Sepsis-caused multiple organ dysfunction syndrome (MODS) remains a major cause of morbidity and mortality in intensive care units (ICU) (1). Endothelial injury plays a major role in the pathogenesis of organ dysfunction during sepsis: endothelial dysfunction leads to the breakdown of the microvascular barrier resulting in increased extravascular fluid, tissue edema and organ failure (2, 3).

Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B), a phosphatase localized on the cytoplasmic side of the endoplasmic reticulum (ER), is involved in the negative regulation of many cell pathways such as response to insulin or endothelial nitric oxide (NO) production (4). Our team and others recently showed that pharmacological or genetic inhibition of PTP1B restores vascular relaxation and endothelial NO synthase phosphorylation in septic models, protects against cardiac inflammation and dysfunction, and reduces mortality, suggesting its potential interest for the development of sepsis therapies that target endothelial injury (5, 6). The septic inflammatory process also causes serious disturbances in the insulin signaling pathway (7, 8). We previously demonstrated that PTP1B gene (*Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 1 (PTPNI)*) deletion significantly limits cecal ligation and puncture (CLP) -induced insulin resistance, improves insulin receptor signal transduction and reduces sepsis-induced endothelial dysfunction/impaired NO production (9). Multiple disturbances observed during sepsis can result in a dysfunction of the ER, leading to the accumulation of unfolded proteins within the lumen of the ER, known as ER stress (ERS) (10). Recent studies indicated that PTP1B and ERS are closely interlinked: ERS induces and activates PTP1B in skeletal muscle *via* the NF- κ B pathway and PTP1B inhibition protects against ERS-induced cardiac dysfunction (11, 12). PTP1B plays a major role in the regulation of ERS in endothelial cell, and genetic or pharmacological inhibition of PTP1B improves endothelial dysfunction induced by ERS (13).

The defense against ERS mainly involves the unfolded protein response (UPR). UPR is initiated by chaperone [such as the 78 kDa Glucose Related Protein (GRP78)] binding to unfolded peptides, which relieves the basal inhibitory signal of signaling pathways of UPR including Protein Kinase RNA-like ER kinase [PERK, involving CCAAT/enhancer binding protein

homologous protein (CHOP)] and Activating Transcription Factor 6 (ATF6) pathways (10, 14). Systemic inflammation is associated with the activation of ERS pathways which are strongly activated in murine models of sepsis (15–17). Treatment with 4-phenylbutyric acid (4BPA; an ERS inhibitor) decreased the tissue expression level of inflammatory cytokines, NF- κ B activation and reduced organ dysfunction induced by bacterial lipopolysaccharide (LPS) (16). 4BPA also improved the mortality rate in a murine CLP model (18). In human, ERS is activated in the mononuclear cells of patients with acute lung injury and is involved in acute kidney injury (16, 19). Finally, it has been shown that ERS is associated with endothelial dysfunction and its inhibition improves endothelium-dependent relaxing function (13). Thus, modulation of ER stress *via* PTP1B inhibitors may be a promising approach to protect the endothelium in sepsis but to our knowledge no study has evaluated their expression in severe infections in humans.

The objectives of our study were therefore to explore the relationship between PTP1B and ERS gene expression and organ failure during septic shock in humans, and to describe their kinetics.

MATERIALS AND METHODS

Patient Population

This prospective pilot study was carried out in the medical ICU of a tertiary care University Hospital. The study, conducted between December 2015 and April 2016 (N°2014-A00959-38), was approved by the ethics committee of Rouen University Hospital (n° CPP 02/017/2014) in accordance with the ethical standards of the Declaration of Helsinki and its later amendments. Written consent was provided prospectively by the authorized representatives and/or retrospectively by the patient.

Patients admitted to medical ICU with septic shock as defined by the 2013 surviving sepsis campaign guidelines were included (20). Exclusion criteria were age under 18 years or patient under tutorship, pregnancy/ breastfeeding, obesity defined by a body mass index ≥ 30 kg/m², diabetes mellitus treated by oral and/or insulin therapy, and patient refusal. Each patient included in the protocol had a specific follow-up for the study during the first 5 days of their ICU stay (D1 to D5). The following parameters were evaluated: demographic characteristics [sex, age, Simplified Acute Physiology Score II (SAPS II)], insulin resistance measurement using the Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance score (HOMA-IR) on the first day (with insulin dosage at D1), daily maximal or minimal capillary glycemia, daily physiologic parameters, sepsis origin, daily Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score, daily diuresis, cumulative daily dose of norepinephrine and biological parameters (lactate, procalcitonin (PCT), glycemia) at the time of each sample.

Objectives

The main objective of this study was to search for a relationship between whole blood *PTPNI* gene (coding for PTP1B) expression and SOFA score, by comparing the variation in *PTPNI* gene expression and the variation in SOFA score calculated between

Abbreviations: 4BPA, 4-phenylbutyric acid; ATF6, Activating Transcription Factor 6; CHOP, CCAAT/enhancer binding protein homologous protein; CLP, Cecal ligation and puncture; Ct, Cycle threshold; CHOP, DNA Damage Inducible Transcript 3 (gene coding for CHOP); DNA, Deoxyribonucleic acid; ET1, Endothelin 1; ER, Endoplasmic reticulum; ERS, Endoplasmic reticulum stress; GRP78, 78 kDa Glucose Related Protein; HOMA-IR, Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance; GRP78, Heat Shock 70 kDa Protein 5; ICAM1, Inter-cellular adhesion molecule 1; ICU, Intensive care units; IRE1, Inositol-Requiring Enzyme 1 alpha; LPS, Lipopolysaccharide; MODS, Multiple organ failure; NF- κ B, Nuclear Factor-Kappa B; NO, nitric oxide; PCR, Polymerase chain reaction; PCT, Procalcitonin; PERK, Protein Kinase RNA-like ER kinase; PTP1B, Protein Tyrosine Phosphatase 1B; PTPNI, Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 1 (gene coding for PTP1B); RNA, Ribonucleic acid; SAPS II, Simplified Acute Physiology Score II; SDHA, Succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A; SOFA, Sequential Organ Failure Assessment; UPR, Unfolded protein response.

D1 and D5 (presented as a delta-SOFA score: SOFA D5-SOFA D1).

Secondary objectives were to study:

- The link between daily *PTPN1* expression and insulin resistance assessment (HOMA score) at D1, and the link between daily *PTPN1* expression and daily cumulative dose of insulin administered, daily blood glucose variability (evaluated via blood glucose meter), and venous glycemia at the time of sampling at D1, D3, and D5;
- The correlation between the expression of genes involved in UPR (*ATF6*, *CHOP*, *GRP78*, and the variation in SOFA score);
- The kinetics of *PTPN1* and UPR gene expression in patients between D1 and D5;
- The correlation between *PTPN1* and UPR gene expression and clinical or biological markers of sepsis severity: survival, norepinephrine infusion doses, daily diuresis, and SAPS II at D1;
- The correlation between *PTPN1* and UPR gene expression and the expression of the genes involved in endothelial dysfunction *ICAM1* (coding for Inter-Cellular Adhesion Molecule 1) and *ET1* (coding for Endothelin 1).

Sample Collection and Analysis

In addition to the usual daily morning blood sample, a 2.5 ml sample was drawn using PAXgene tube (Quiagen, Hilden, Germany) in the morning at 8:00 a.m. at D1, D3, and D5. Blood samples were kept for a maximum of 72 h in the refrigerators of the ICU at -20°C and then were stored at -80°C until analysis. PAXgene sampling was stopped after ICU discharge (if occurring before D5).

Ribonucleic Acid Extraction, Reverse Transcription, and Quantitative Polymerase Chain Reaction

Briefly, ribonucleic acid (RNA) extraction was performed using the commercial kit PAXgene[®] Blood RNA System kit (Quiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. Before RNA elution, residual genomic deoxyribonucleic acid (DNA) was digested using RNase-Free DNase set (Quiagen, Hilden, Germany). The integrity and quantity of the total RNA were assessed with a Nanodrop 2000 device (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MS, USA). Total RNAs were reverse transcribed into cDNA using M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to manufacturer's instructions.

A quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was performed for:

- The mRNA of genes coding for PTP1B (*PTPN1* gene) and for proteins involved in UPR: *ATF6*, *CHOP*, *GRP78*;
- The mRNA of genes coding for proteins associated with septic endothelial dysfunction: *ICAM1* and *ET1*;
- The mRNA of the gene coding for succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A (*SDHA*). As *SDHA* has been described as a pertinent housekeeping gene in humans with sepsis and as its cycle threshold (Ct) is close to the Ct of PTP1B

and UPR genes in qPCR, it appeared as the best housekeeping gene for our work (21).

The genes that were amplified and the primers that were used are listed in **Table 1**. PCR reactions were performed on a LightCycler 480 instrument using the Fast-StartDNA Master SYBR Green I real-time PCR kit according to the manufacturer's instructions (Roche Molecular Biochemicals, Bâle, Switzerland). Thermocycling was performed in a final volume of 10 μl (including 2.5 μl of cDNA sample at $1.67 \cdot 10^{-3}$ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ diluted at 1:10) containing 0.5 μl of each required primers at a concentration of 10 μM . PCR was performed with an initial denaturation step of 10 min at 95°C , followed by 40 cycles of a touch-down PCR protocol (40 cycles at 95°C for 10 s, 60°C for 10 s, 72°C for 12 s and 1 melting cycle). Ct values were used for quantifying target gene expression relative to the housekeeping gene using the $2^{-\Delta\text{Ct}}$ method. Variation in gene expression was defined as the ratio of gene expression between D5 and D1 (D5/D1), e.g., resulting in a ratio of 2 if the expression doubled or a ratio of 0.5 if the expression halved at D5.

Statistical Analysis

Quantitative values are expressed as mean with standard deviation (for demographic data) and confidence interval at 95% (for SOFA score and gene expression). Qualitative values are presented with absolute values and percentages. Gene expression comparisons between D1 and D5 and correlations were carried out after logarithmic transformation and are therefore described in this manner in the figures. The initial (D1) and the final (D5) levels of log transformed gene expression were compared with a Paired Student test. Among patients with a significant change in gene expression between D1 and D5, correlations between variations in log transformed gene expression were

TABLE 1 | Primers used for quantitative PCR.

Gene name	Sense	Sequence (5'-3')
<i>SDHA</i>	Forward	GAGATGTGGTGTCTCGGTCCAT
	Reverse	GCTGTCTCTGAAATGCCAGGCA
<i>PTP1B</i>	Forward	TGTCTGGCTGATACCTGCCTCT
	Reverse	ATCAGCCCCATCCGAACTTCC
<i>CHOP</i>	Forward	TCGCOGAGCTCTGATTGAC
	Reverse	CCCTGCGTATGTGGGATTGAG
<i>ATF6</i>	Forward	CCGAGAAGGGGAGACACA
	Reverse	TCGGAGGTAAGGAGGAACTGACG
<i>GRP78</i>	Forward	CGAGGAGGAGGACAAGAAGG
	Reverse	CACCTTGAACGGCAAGAACT
<i>ET1</i>	Forward	GCCCTCCAGAGAGCGTTATG
	Reverse	AGACAGCCCCGAAGGTCT
<i>ICAM1</i>	Forward	GGCCGGCCAGCTTATACAC
	Reverse	TAGACACTTGAGCTCGGGCA

ATF6, Activating Transcription Factor 6; *CHOP*, DNA Damage Inducible Transcript 3; *ET1*, Endothelin 1; *GRP78*, Heat Shock 70 kDa Protein 5; *ICAM1*, Inter-Cellular Adhesion Molecule 1; *PTPN1*, Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 1; *SDHA*, succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A.

computed with the Pearson method, 95% confidence intervals were calculated with the Bootstrap method. Missing data were managed for the correlation analysis, the last-observation-carried-forward method was used when needed (when D5 values were missing, D3 values replaced it). The significance level was 0.05 for all the tests performed. All calculations and statistical analyses were conducted on R 3.4.2 statistical software.

RESULTS

Clinical and Demographic Characteristics of Population

Forty-four patients with septic shock were included in this study. Diagnoses at admission were: pneumonia ($n = 26, 59\%$), urinary-tract infection ($n = 10, 23\%$), intra-abdominal infection ($n = 4, 9\%$), other ($n = 4, 9\%$). Due to technical problems (RNA extraction difficulties) or lack of genetic material after extraction, some samples could not be analyzed. Four patients had no sample measurement on D1 and therefore could not be analyzed in regard to the main objective. In addition, some patients were discharged from ICU before D3 or before D5. Thus, of the 40 patients remaining on whom the analysis was conducted, 30 had all measurements at D1, D3, and D5, 4 had a measurement at D1 and D5 only and 6 had a measurement at D1 and D3 only.

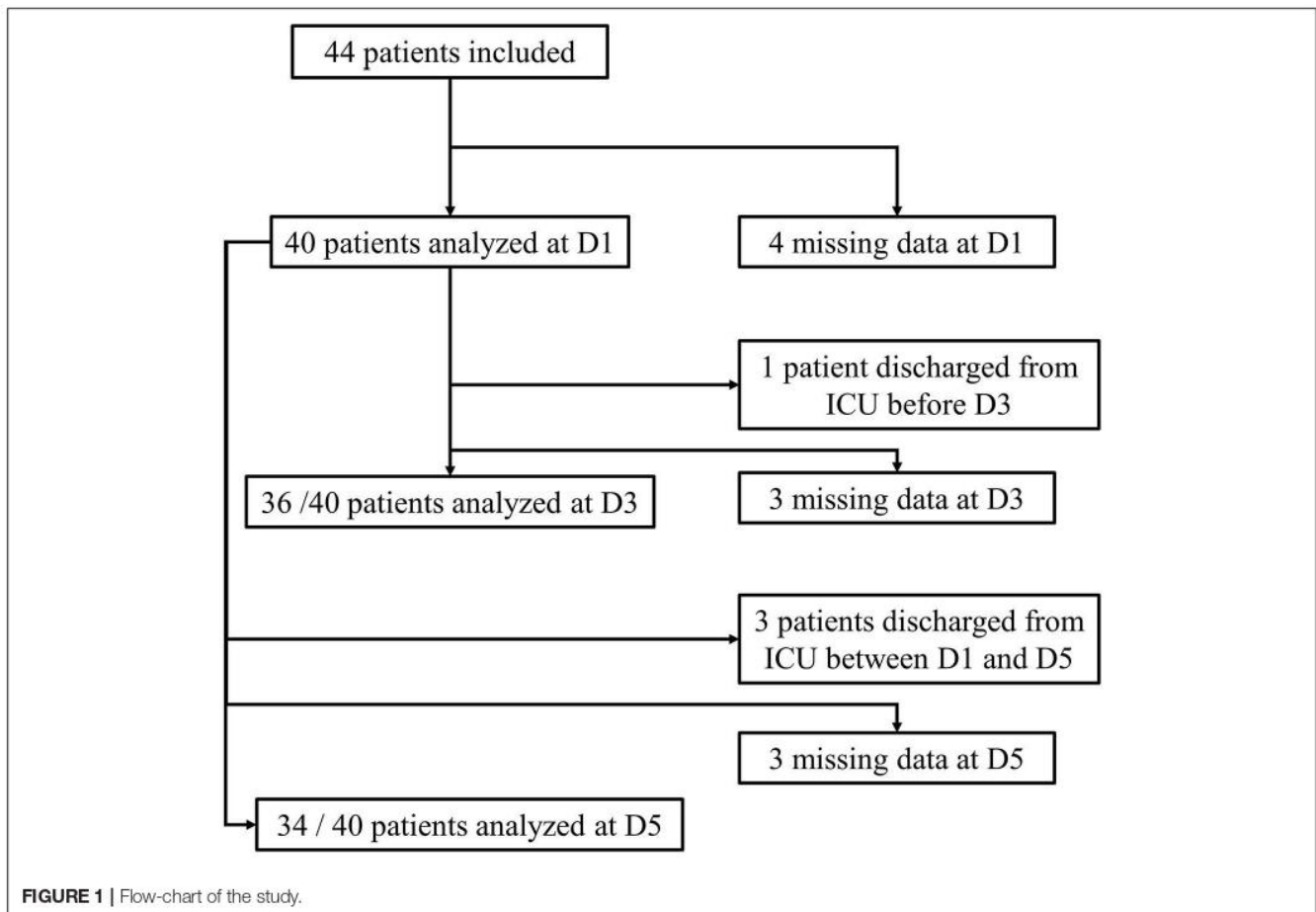
The study flow chart is presented in **Figure 1**. Between D1 and D5, there was a significant decrease in SOFA score (*cf.* **Figure 2**). The main demographic and clinical characteristics of patients are summarized in **Table 2**, the leucocyte cell count at each sampling time are summarized in **Table 3**.

PTP1B Gene Expression

There was a statistically significant decrease in *PTPN1* expression between D1 and D5 (*cf.* **Figure 3A**). Concerning glycemic function, we did not find any statistically significant correlation between HOMA-IR and *PTPN1* expression at D1, or any correlation between *PTPN1* expression and daily dose of insulin, daily blood glucose variability and maximum daily blood glucose peak from D1 to D5 (*cf.* **Table 4**). No statistically significant correlation was observed between *PTPN1* expression and diuresis or cumulative daily dose of norepinephrine. There was no significant difference in *PTPN1* D1-D5 expression variations between deceased and surviving patients (*cf.* **Table 5**).

Endothelial Dysfunction Markers and UPR Gene Expression Kinetics

Between D1 and D5, there was a significant decrease in *ET1* expression (*cf.* **Figure 3B**), and the expression of *ICAMI* appeared to decrease gradually although no significant difference



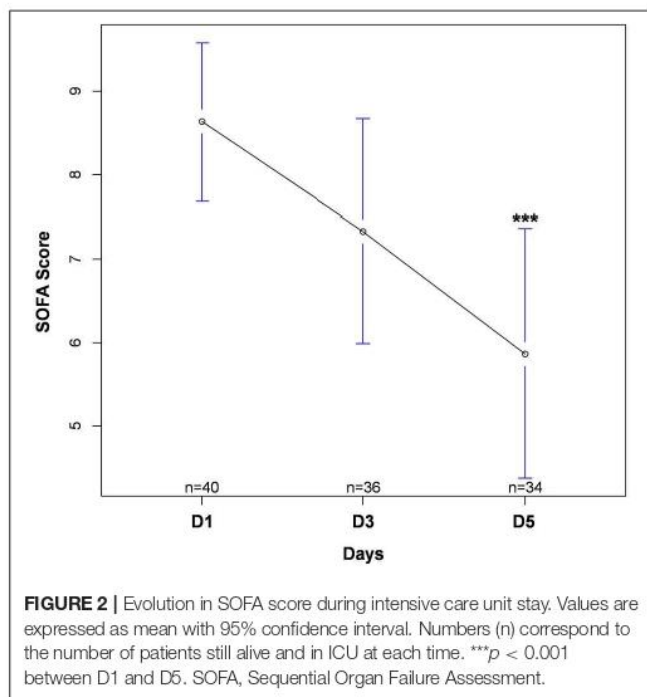


TABLE 2 | Main demographic and clinical characteristics of included patients.

Age (years)	65 ± 15
Sex-ratio (M/F)	2.7 (32/12)
SAPS II	50 ± 16
Length of stay in ICU (days)	11 ± 9
Mechanical ventilation	24 (54.5%)
Mortality at D28	6 (13.6%)

Data are presented as mean with standard deviation or absolute value and percentage [n (%)]. SAPS II, Simplified Acute Physiology Score II.

was found (cf. Figure 3C). Between D1 and D5, there was a significant decrease in *ATF6* expression (cf. Figure 3D), *GRP78* expression appeared to decrease gradually although no significant difference was found (cf. Figure 3E) and *CHOP* expression was stable over time (cf. Figure 3F).

No statistically significant correlation was observed between *ATF6* expression and daily diuresis or cumulative daily dose of norepinephrine. There was no significant difference in *ATF6* and *ET1* D1-D5 expression variations between deceased and surviving patients (cf. Table 5).

Correlation Between *PTPN1* and *ATF6* Expressions and SOFA Score or Survival

Between D1 and D5, variations in *PTPN1* expression and SOFA score were positively correlated ($r = 0.35$, CI 95% [0.05; 0.54]; $p = 0.03$; cf. Figure 4); *PTPN1* expression increased by 7% (CI 95% [1%; 14%]) per point of SOFA. *PTPN1* expression ratio was correlated with *ET1* ($r = 0.31$ CI 95% [0.09; 0.52], $p = 0.008$; cf. Figure 5).

TABLE 3 | Leucocyte cell count at each sampling time.

	Day 1	Day 3	Day 5
Leucocytes (G/l)	19.7 ± 12.3	15.2 ± 9.0	12.5 ± 11.5
Neutrophils granulocytes (G/l)	17.6 ± 11.6 (89.2%)	13.4 ± 8.2 (88.0%)	10.2 ± 8.8 (81.8%)
Eosinophils granulocytes (G/l)	0.1 ± 0.1 (0.5%)	0.1 ± 0.2 (0.7%)	0.2 ± 0.2 (1.3%)
Basophils granulocytes (G/l)	0.0 ± 0.0 (0%)	0.0 ± 0.0 (0%)	0.0 ± 0.0 (0%)
Lymphocytes (G/l)	1.1 ± 0.9 (5.6%)	0.9 ± 0.9 (6.0%)	1.1 ± 0.7 (8.6%)
Monocytes (G/l)	0.9 ± 0.7 (4.7%)	0.8 ± 0.5 (5.3%)	1.0 ± 0.9 (8.3%)

Data are presented as mean with standard deviation, in brackets are the proportions of each population to the total number of leucocytes.

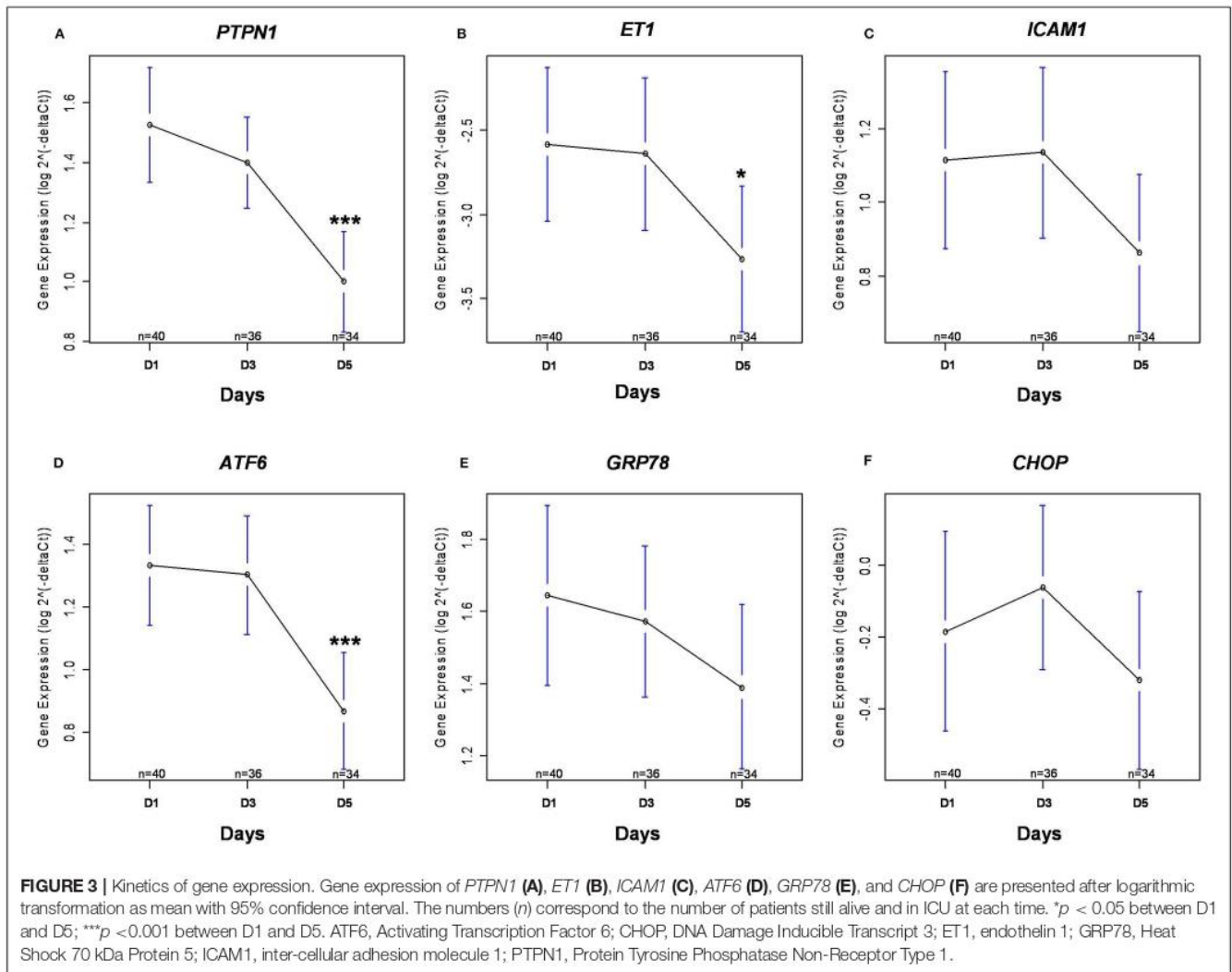
Between D1 and D5, variations in *ATF6* expression and SOFA score were positively correlated ($r = 0.45$ CI 95% [0.20; 0.65], $p < 0.001$); *ATF6* expression increased by 9% (CI 95% [3%; 15%]) per point of SOFA. Between D1 and D5, *ATF6* expression was also positively correlated with *ET1* ($r = 0.45$ CI 95% [0.19; 0.65], $p < 0.001$) and with *PTPN1* ($r = 0.37$ CI 95% [0.07; 0.62], $p = 0.02$; cf. Figure 5).

DISCUSSION

In regard to recent literature, our finding that *PTPN1* and UPR genes are expressed in the plasma of patients with septic shock and that their expression shows significant variations suggests that these components may be involved in the pathophysiology of sepsis. To our knowledge, PTP1B and UPR have never been studied in patients with septic shock. We found that the variation in *PTPN1* expression between D1 and D5 was significantly positively correlated with the variation in SOFA score (as was *ATF6* expression). Additionally, *PTPN1* and *ATF6* expressions were correlated with *ET1* which codes for a protein associated with septic endothelial dysfunction.

PTP1B Gene Expression

PTP1B is implicated in a wide range of cellular functions. PTP1B has a prominent role in the metabolism, through the regulation of insulin signaling, leading to the development of PTP1B inhibitors for the treatment of type 2 diabetes or obesity. However, the role of PTP1B in regulating immune signaling is also emerging in infectious diseases (22). Recently, it has been demonstrated that, in a *P. aeruginosa* infection model, PTP1B-deficient mice displayed enhanced bacterial clearance and reduced disease scores, suggesting that PTP1B might have a deleterious role in the host defense against bacterial infections (23). Moreover, it has been shown that, in a rat model of sepsis, PTP1B induced brain mitochondrial dysfunction associated with overproduction of reactive oxygen species (24). In animal models, genetic or pharmacological inhibition of PTP1B enhanced endothelial cell proliferation and NO production, and could also reverse septic endothelial dysfunction (5, 6, 9, 25). We have shown a correlation between variations in SOFA score and *PTPN1* expression. However, the design of our work does not allow us



to establish a causal link between organ failure assessed by SOFA score and *PTPN1* expression. We did not find any link between markers of initial severity (SAPS II) and *PTPN1* expression at D1. It is possible that, in view of the delay between gene expression and effective protein synthesis, organ failure at one time may be related to the expression of *PTPN1* in the previous hours, which would explain the correlation found for the global variation in organ failure but not for failure at a given time.

Inflammation can directly contribute to insulin resistance by disrupting the insulin signaling pathway, in part *via* PTP1B activation. In a previous experimental study, we demonstrated that PTP1B gene deletion significantly limited CLP-induced insulin resistance, improved AMP-activated protein kinase signaling pathway and Glucose Transporter 4 translocation, and decreased inflammation (9). In the present work, we did not find any link between *PTPN1* levels and HOMA-IR index, glycemia, glycemia variation or insulin consumption. A previous work described a strong correlation between insulin resistance evaluated through HOMA-IR index and plasma PTP1B level in a population of patients with polycystic ovarian syndrome (26).

Moreover, PTP1B inhibition significantly decreased HOMA-IR index in obese and diabetic mice suggesting a direct link between PTP1B level and HOMA-IR (27). There are two reports on the use of HOMA-IR index in ICU patients but both studies have limitations with great variance and the use of HOMA-IR is controversial in ICU (28, 29). In our work, the conditions for measuring insulin levels using HOMA-IR were not standardized for insulin treatment at the time of sampling. In regard to this strong bias, to the results of previous study on the link between PTP1B and insulin resistance, and to controversies on the efficiency of HOMA-IR to assess insulin resistance in ICU patients, we should be cautious and not conclude the absence of a link between PTP1B levels and insulin resistance in septic patients.

UPR Gene Expression

We have shown a correlation between variations in SOFA score and *ATF6* expression. *ATF6* upregulates many protective genes and downregulates many potentially damaging genes (30, 31). Previous studies have shown that *ATF6* activation

TABLE 4 | Insulin resistance score, glycemic parameters, and their correlation with *PTPN1* expression during ICU stay.

	Day 1	Day 3	Day 5
HOMA-IR	4.7 ± 4.5 [0.03 (-0.32; 0.46)]	ND	ND
Daily dose of insulin (UI/day)	7.5 ± 21.6 [0.18 (-0.10; 0.39)]	13.4 ± 27.9 [0.06 (-0.14; 0.33)]	14.1 ± 25.0 [0.13 (-0.15; 0.32)]
Daily blood glucose variability (blood glucose meters; max-min) (mmol/l)	3.9 ± 3.4 [0.23 (-0.09; 0.50)]	2.6 ± 1.9 [-0.02 (-0.36; 0.32)]	2.7 ± 2.8 [0.24 (-0.15; 0.47)]
Venous glycemia at the time of sampling (mmol/l)	8.0 ± 3.1 [0.07 (-0.20; 0.34)]	7.8 ± 2.0 [-0.11 (-0.40; 0.19)]	6.9 ± 2.1 [0.20 (-0.16; 0.51)]

Data are presented as mean with standard deviation. In brackets are the correlation coefficients of each value with *PTPN1* expression of the corresponding day and its 95% confidence interval. HOMA-IR: homeostasis model assessment of insulin resistance score; ND, not done; *PTPN1*, Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 1.

TABLE 5 | Comparison of gene expression variations between deceased and surviving patients.

	Surviving patients (n = 35)	Deceased patients (n = 6)	p
SAPS II	48 ± 15	64 ± 7	0.01
Age (years)	65 ± 15	61 ± 14	0.41
Delta-SOFA score	-3.2 ± 3	-1.8 ± 4	0.56
<i>PTPN1</i> expression variation	-0.49 ± 0.70	-0.36 ± 0.49	0.42
<i>ET1</i> expression variation	-0.67 ± 1.5	0.21 ± 1.9	0.36
<i>ATF6</i> expression variation	-0.46 ± 0.60	-0.14 ± 0.65	0.25

Only genes that had a significant variation of expression between D1 and D5 are presented. Data are presented as mean with standard deviation. Gene expression variations are presented after logarithmic transformation ($\log(\text{ratioD5/D1})$) and variations in SOFA are presented as a delta-SOFA score (= SOFA D5-SOFA D1). *ATF6*, Activating Transcription Factor 6; *ET1*, endothelin 1; *PTPN1*, Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 1; SAPS II, Simplified Acute Physiology Score II; SOFA, Sequential Organ Failure Assessment.

in cardiac myocytes protects the heart from ischemic damage, while inhibiting *ATF6* has the opposite effect (32). Since *ATF6* is activated by ischemia but inactivated upon reperfusion, we could consider that organ ischemia related to the disequilibrium of the oxygen consumption/supply balance during sepsis is associated with the expression of *ATF6* (32). The improvement in organ dysfunction could be associated with a decrease in *ATF6* linked to organ reperfusion. We did not show any significant variation in the other two UPR genes studied. *GRP78* seemed to decrease during the first 5 days and it is possible that a lack of power prevented us from showing a significant decrease. It is also possible that, among UPR pathways, *ATF6* is the most intensely involved pathway during sepsis but additional experiments should be carried out to study this hypothesis before

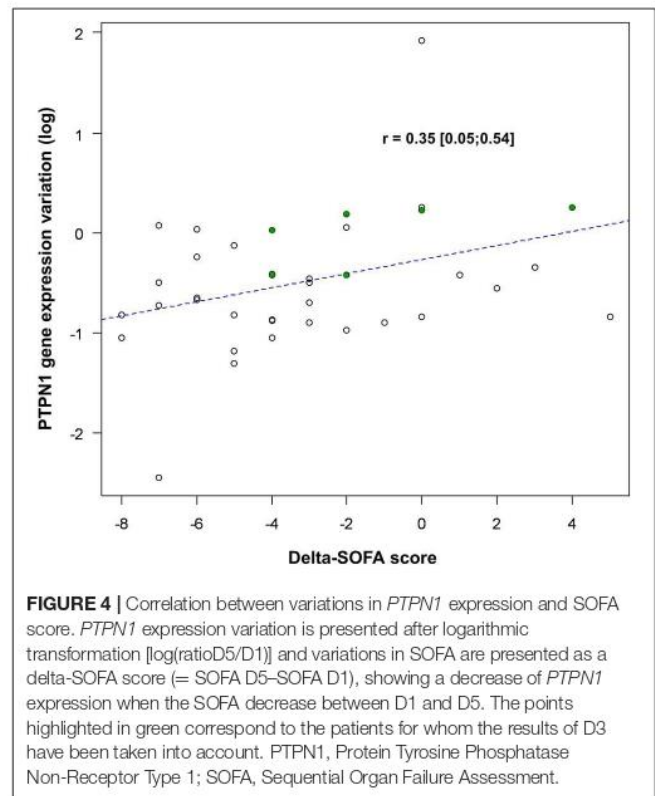
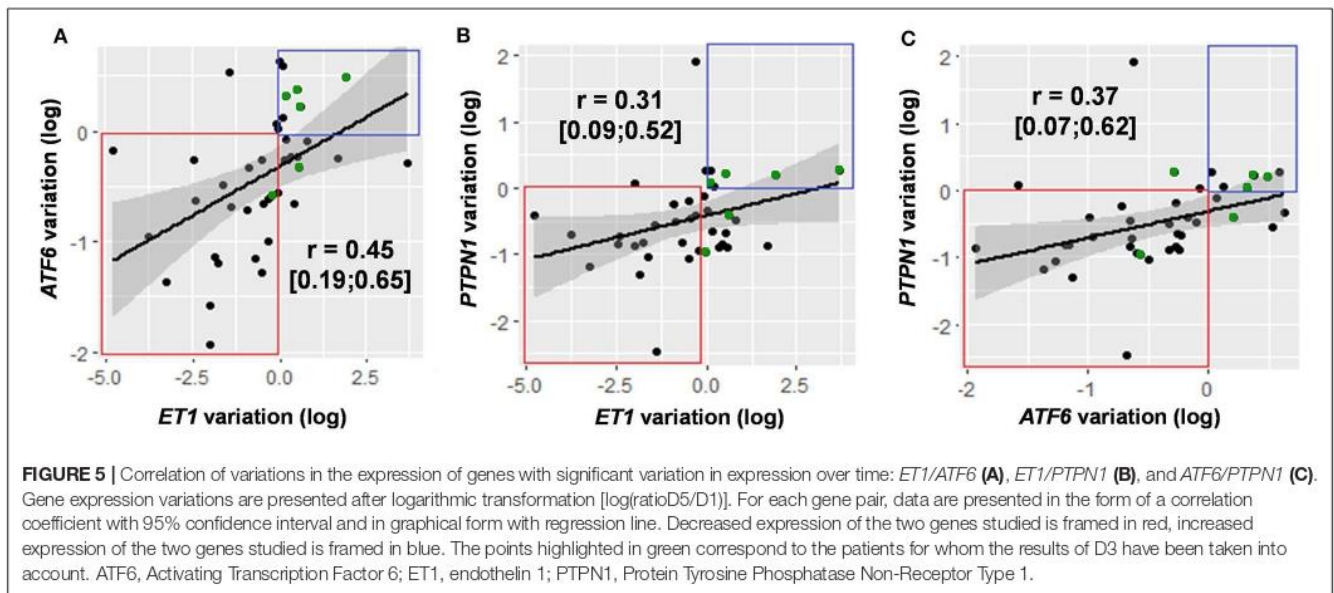


FIGURE 4 | Correlation between variations in *PTPN1* expression and SOFA score. *PTPN1* expression variation is presented after logarithmic transformation [$\log(\text{ratioD5/D1})$] and variations in SOFA are presented as a delta-SOFA score (= SOFA D5-SOFA D1), showing a decrease of *PTPN1* expression when the SOFA decrease between D1 and D5. The points highlighted in green correspond to the patients for whom the results of D3 have been taken into account. *PTPN1*, Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 1; SOFA, Sequential Organ Failure Assessment.

drawing any conclusion. Previous studies have shown a beneficial effect of ERS inhibition on survival and MODS, which suggest the involvement of ERS in critical illness-induced MODS (16, 18, 33). Finally, expression of *ATF6*, *PTPN1*, and *ET1* tended to decrease more in surviving patients than in deceased patients (although this variation did not appear significant). However, this work was not designed to reveal a difference in mortality according to gene expression variations, but future work should analyze this point.

PTP1B/UPR Gene Expression and Endothelial Dysfunction

Endothelial dysfunction is considered as a precursor of tissue damage and end-organ dysfunction (34, 35). It has been shown that *ET1* levels are significantly higher in non-survivors than in survivors and are correlated with organ dysfunction and mortality (2, 36, 37). We found that a variation in *PTPN1* expression was correlated with a variation in *ET1* expression. *PTP1B* is involved in endothelial dysfunction and it is known that *PTP1B* inhibition reduces sepsis-induced endothelial dysfunction and impaired NO production (9). There is no work studying the link between *ET1* and *PTP1B* but, more than a direct link between these two markers, since *ET1* is a marker of septic endothelial lesion, it is likely that the observed correlation could reflect the relationship between *PTPN1* expression and septic endothelial dysfunction. As it has been demonstrated that LPS-induced *ET1* expression occurs via an NF- κ B-dependent pathway and, as ERS induces NF- κ B, we can hypothesize that the correlation between *ATF6* and



ET1 expression involves, at least in part, the NF- κ B pathway (16, 38). ERS induces endothelial dysfunction *in vivo* and we found that the variation in *ATF6* expression was correlated with the variation in endothelial dysfunction marker. We can thus hypothesize that ERS may be one of the numerous triggering factors of endothelial dysfunction during sepsis in human (13, 39). Finally, we found no significant difference for *ATF6*, *ET1*, and *PTPN1* variations between surviving and deceased groups. However, given the very small size of our cohort with only 6 deaths, it seems difficult to definitely conclude that there is no association between mortality and expression of these genes.

Limitations

Our work has several major limitations. It is a pilot physiologic study with a limited number of patients without a control group. We included patients with several infectious sources while related animal studies were conducted in standardized models. It is thus possible that *PTPN1* and UPR genes have different expressions and kinetics depending on the kind of infection but, given the limited number of patients, it did not appear reasonable to compare patients according to their infectious source. We used the criteria of the 2013 surviving sepsis campaign to include patients. This work was designed before the change in sepsis diagnostic criteria, which explains why SEPSIS-3 criteria were not used here. Our mortality rate was quite low for a cohort of septic shock patients but it remained within the low mortality rates described in some recent works (15–20%) (40, 41). In addition, we have included many urinary sepsis whose prognosis is much better than sepsis from other sources (42). These combined factors probably explain the low mortality rate observed.

Our work focused on gene expression in the whole blood but we did not perform a direct protein assay. It is known that, in human muscle, *PTPN1* expression is related to PTP1B protein level and that the increase in *ATF6* mRNA in peripheral blood mononuclear cells is correlated with ATF6 protein synthesis

(43, 44). These data suggest that, for PTP1B and ATF6, gene expression is a good indicator of protein synthesis in humans. This work was conducted in ICU patients with a limited access to tissue, and with the logistical necessity of taking samples during several days (including weekends and/or on-call periods). As most of the proteins studied in our work cannot be measured in blood without complex cell isolation techniques, RNA quantification appeared to be the best compromise. However, it seems important to consider a future work measuring ERS proteins and ERS gene expression at the same time points in septic patients to better specify their correlation in this specific population. As the RNA expression on whole blood measured using the Paxgen tubes is strongly correlated with the RNA expression in circulating leucocytes, we can assume that we detected variations in leucocyte gene expression (45). As it is known that UPR play a crucial role in immune cells, including differentiation, immune activation, antibody production and cytokine expression, it seemed relevant to study the leucocyte expression of UPR genes (46, 47). However, we may have missed a potentially greater variation in gene expression in tissues and organs, as observed in animal models (16, 18, 33). It is also important to note that several studies have focused on the interest of a genomic approach to classify sepsis according to its severity or prognosis (48–50). These genotypic studies have so far failed to adequately discriminate sepsis from non-septic inflammatory syndrome and have shown no link between organ failure or clinical evolution and genomic expression profile. Recent data suggest that, at the level of leucocyte transcriptome, alterations in the expression of classical inflammatory and anti-inflammatory as well as adaptive immunity genes occur simultaneously, not sequentially after severe injury (49). Thus, variations of many genes during septic shock shifts in a same manner over time (up- or down-regulation), and it appears difficult to analyze the impact of a specific gene expression variation independently of others. The genomic study during sepsis therefore remains an

analysis with clear limitations, limiting the final interpretation of our results. Given the existence of several open genomic datasets performed in whole blood of septic patients which come from genome wide association studies, it also appears interesting to consider a future work on these database to analyze all the genes involved in endothelial dysfunction, PTP1B regulation and ERS (48).

CONCLUSION

We have described for the first time PTP1B and ERS expression in patients with septic shock. We have shown that PTP1B and ATF6 might be correlated with organ failure (SOFA score) and endothelial dysfunction (*ET1* expression). The recent identification of PTP1B as a novel negative regulator of host defense against sepsis may have potential therapeutic implications. However, further studies are needed to better understand PTP1B and ERS implication during sepsis in humans.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this manuscript will be made available by the authors, without undue reservation, to any qualified researcher.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by ethics committee of Rouen University Hospital (n° CPP 02/017/2014). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

REFERENCES

- Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med.* (2013) 369:840–51. doi: 10.1056/NEJMra1208623
- Hein OV, Misterek K, Tessmann J-P, van Dossow V, Krimphove M, Spies C. Time course of endothelial damage in septic shock: prediction of outcome. *Crit Care Lond Engl.* (2005) 9:R323–30. doi: 10.1186/cc3532
- Nedeva C, Menassa J, Puthalakath H. Sepsis: inflammation is a necessary evil. *Front Cell Dev Biol.* (2019) 7:108. doi: 10.3389/fcell.2019.00108
- Thiebaut P-A, Besnier M, Gomez E, Richard V. Role of protein tyrosine phosphatase 1B in cardiovascular diseases. *J Mol Cell Cardiol.* (2016) 101:50–7. doi: 10.1016/j.yjmcc.2016.09.002
- Zabolotny JM, Kim Y-B, Welsh LA, Kershaw EE, Neel BG, Kahn BB. Protein-tyrosine phosphatase 1B expression is induced by inflammation *in vivo*. *J Biol Chem.* (2008) 283:14230–41. doi: 10.1074/jbc.M800061200
- Coquerel D, Neviere R, Delile E, Mulder P, Marechal X, Montaigne D, et al. Gene deletion of protein tyrosine phosphatase 1B protects against sepsis-induced cardiovascular dysfunction and mortality. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2014) 34:1032–44. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.303450
- Hagiwara S, Iwasaka H, Hasegawa A, Asai N, Noguchi T. Hyperglycemia contributes to cardiac dysfunction in a lipopolysaccharide-induced systemic inflammation model. *Crit Care Med.* (2009) 37:2223–7. doi: 10.1097/CCM.0b013e3181a007c6
- Bar-Or D, Rael LT, Madayag RM, Banton KL, Tanner AI, Acuna DL, et al. Stress Hyperglycemia in critically ill patients: insight into possible molecular pathways. *Front Med.* (2019) 6:54. doi: 10.3389/fmed.2019.00054
- Delile E, Neviere R, Thiebaut P-A, Maupoint J, Mulder P, Coquerel D, et al. Reduced insulin resistance contributes to the beneficial effect of protein

AUTHOR CONTRIBUTIONS

TC was involved in acquisition of data, in analysis and interpretation of data, and in manuscript draft. SG was involved in acquisition of data, in study design, and in interpretation of data. TP-L was involved in statistical analysis, in interpretation of data, and in manuscript draft. EB was involved in the study conception and design, in acquisition of data, and in manuscript revision. SR was involved in acquisition of data and in analysis and interpretation of data. SF and P-AT were involved in analysis and interpretation of data and in manuscript revision. VR, BV, and FT were involved in the study conception and design, in analysis and interpretation of data, and in manuscript revision. All authors contributed to manuscript revision, read, and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by Normandie Rouen University, Inserm, and Rouen University Hospital. The funding sources had no role in the design and conduct of the study; collection, management, analysis, or interpretation of the data; preparation, review, or approval of the manuscript; and decision to submit the manuscript for publication.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Nikki Sabourin-Gibbs, Rouen University Hospital, for her help in editing the manuscript and for English proofreading. We thank Marion Beuzelin, Dorothée Carpentier, Gaëtan Beduneau, and Christophe Girault for their help in including patients.

- tyrosine phosphatase-1B deletion in a mouse model of sepsis. *Shock.* (2017) 48:355–63. doi: 10.1097/SHK.0000000000000853
- Khan MM, Yang W-L, Wang P. Endoplasmic reticulum stress in sepsis. *Shock.* (2015) 44:294–304. doi: 10.1097/SHK.0000000000000425
- Panzhinskiy E, Hua Y, Culver B, Ren J, Nair S. Endoplasmic reticulum stress upregulates protein tyrosine phosphatase 1B and impairs glucose uptake in cultured myotubes. *Diabetologia.* (2013) 56:598–607. doi: 10.1007/s00125-012-2782-z
- Wang S, Chen X, Nair S, Sun D, Wang X, Ren J. Deletion of protein tyrosine phosphatase 1B obliterates endoplasmic reticulum stress-induced myocardial dysfunction through regulation of autophagy. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* (2017) 1863:3060–74. doi: 10.1016/j.bbdis.2017.09.015
- Thiebaut P-A, Delile E, Coquerel D, Brunel J-M, Renet S, Tamion F, et al. Protein tyrosine phosphatase 1B regulates endothelial endoplasmic reticulum stress; role in endothelial dysfunction. *Vascul Pharmacol.* (2018) 109:36–44. doi: 10.1016/j.vph.2018.05.011
- Hu H, Tian M, Ding C, Yu S. The C/EBP Homologous Protein (CHOP) transcription factor functions in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and microbial infection. *Front Immunol.* (2019) 9:83. doi: 10.3389/fimmu.2018.03083
- Ma T, Han L, Gao Y, Li L, Shang X, Hu W, et al. The endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis signal pathway is involved in sepsis-induced abnormal lymphocyte apoptosis. *Eur Surg Res Eur Chir Forsch Rech Chir Eur.* (2008) 41:219–25. doi: 10.1159/000135631
- Kim HJ, Jeong JS, Kim SR, Park SY, Chae HJ, Lee YC. Inhibition of endoplasmic reticulum stress alleviates lipopolysaccharide-induced lung inflammation through modulation of NF- κ B/HIF-1 α signaling pathway. *Sci Rep.* (2013) 3:1142. doi: 10.1038/srep01142

17. Grootjans J, Kaser A, Kaufman RJ, Blumberg RS. The unfolded protein response in immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol*. (2016) 16:469–84. doi: 10.1038/nri.2016.62
18. Liu L, Wu H, Zang J, Yang G, Zhu Y, Wu Y, et al. 4-phenylbutyric acid reveals good beneficial effects on vital organ function via anti-endoplasmic reticulum stress in septic rats. *Crit Care Med*. (2016) 44:e689–701. doi: 10.1097/CCM.0000000000001662
19. Yan M, Shu S, Guo C, Tang C, Dong Z. Endoplasmic reticulum stress in ischemic and nephrotoxic acute kidney injury. *Ann Med*. (2018) 50:381–90. doi: 10.1080/07853890.2018.1489142
20. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive Care Med*. (2013) 39:165–228. doi: 10.1007/s00134-012-2769-8
21. Cummings M, Sarveswaran J, Homer-Vanniasinkam S, Burke D, Orsi NM. Glyceroldehyde-3-phosphate dehydrogenase is an inappropriate housekeeping gene for normalising gene expression in sepsis. *Inflammation*. (2014) 37:1889–94. doi: 10.1007/s10753-014-9920-3
22. Feldhammer M, Uetani N, Miranda-Saavedra D, Tremblay ML. PTP1B: a simple enzyme for a complex world. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. (2013) 48:430–45. doi: 10.3109/10409238.2013.819830
23. Yue L, Xie Z, Li H, Pang Z, Junkins RD, Tremblay ML, et al. Protein tyrosine phosphatase-1B negatively impacts host defense against *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Am J Pathol*. (2016) 186:1234–44. doi: 10.1016/j.ajpath.2016.01.005
24. Lyu J, Zheng G, Chen Z, Wang B, Tao S, Xiang D, et al. Sepsis-induced brain mitochondrial dysfunction is associated with altered mitochondrial Src and PTP1B levels. *Brain Res*. (2015) 1620:130–8. doi: 10.1016/j.brainres.2015.04.062
25. Wang Y, Yan F, Zhang W, Pang S, Jiang F. Inhibiting protein tyrosine phosphatase 1B to improve regenerative functions of endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol*. (2018) 71:59–64. doi: 10.1097/FJC.0000000000000530
26. Shao X, Li J, Wang Y, Liang Q, Song S. Expression and its correlation with metabolic syndrome of protein tyrosine phosphatase 1B in serum of polycystic ovary syndrome patients. *Biomed Res*. (2017) 28:6. Available online at: <https://www.semanticscholar.org/paper/Expression-and-its-correlation-with-metabolic-of-1B-Shao-Li/39ad25bb06652bb4420340bd5ea0d694f401739e>
27. Zhang X, Tian J, Li J, Huang L, Wu S, Liang W, et al. A novel protein tyrosine phosphatase 1B inhibitor with therapeutic potential for insulin resistance. *Br J Pharmacol*. (2016) 173:1939–49. doi: 10.1111/bph.13483
28. Koch A, Gressner OA, Sanson E, Tacke F, Trautwein C. Serum resistin levels in critically ill patients are associated with inflammation, organ dysfunction and metabolism and may predict survival of non-septic patients. *Crit Care Lond Engl*. (2009) 13:R95. doi: 10.1186/cc7925
29. von Loeffelholz C, Thomas-Rüddel D, Bauer M, Birkenfeld A. Effect of magnesium loading dose on insulin resistance in patients with stress-induced hyperglycemia: a randomized clinical trial. *J Intensive Care Med*. (2018). doi: 10.1177/0885066618803866. [Epub ahead of print].
30. Egawa N, Yamamoto K, Inoue H, Hikawa R, Nishi K, Mori K, et al. The endoplasmic reticulum stress sensor, ATF6 α , protects against neurotoxin-induced dopaminergic neuronal death. *J Biol Chem*. (2011) 286:7947–57. doi: 10.1074/jbc.M110.156430
31. Wu J, Rutkowski DT, Dubois M, Swathirajan J, Saunders T, Wang J, et al. ATF6 α optimizes long-term endoplasmic reticulum function to protect cells from chronic stress. *Dev Cell*. (2007) 13:351–64. doi: 10.1016/j.devcel.2007.07.005
32. Doroudgar S, Thuerauf DJ, Marcinko MC, Belmont PJ, Glembotski CC. Ischemia activates the ATF6 branch of the endoplasmic reticulum stress response. *J Biol Chem*. (2009) 284:29735–45. doi: 10.1074/jbc.M109.018036
33. Diao L, Marshall AH, Dai X, Bogdanovic E, Abdullahi A, Amini-Nik S, et al. Burn plus lipopolysaccharide augments endoplasmic reticulum stress and NLRP3 inflammasome activation and reduces PGC-1 α in liver. *Shock*. (2014) 41:138–44. doi: 10.1097/SHK.0000000000000075
34. Shapiro NI, Schuetz P, Yano K, Sorasaki M, Parikh SM, Jones AE, et al. The association of endothelial cell signaling, severity of illness, and organ dysfunction in sepsis. *Crit Care Lond Engl*. (2010) 14:R182. doi: 10.1186/cc9290
35. Skibsted S, Jones AE, Puskarich MA, Arnold R, Sherwin R, Trzeciak S, et al. Biomarkers of endothelial cell activation in early sepsis. *Shock*. (2013) 39:427–32. doi: 10.1097/SHK.0b013e3182903f0d
36. Lundberg OHM, Bergenzaun L, Rydén J, Rosenqvist M, Melander O, Chew MS. Adrenomedullin and endothelin-1 are associated with myocardial injury and death in septic shock patients. *Crit Care Lond Engl*. (2016) 20:178. doi: 10.1186/s13054-016-1361-y
37. Rivers EP, Kruse JA, Jacobsen G, Shah K, Loomba M, Otero R, et al. The influence of early hemodynamic optimization on biomarker patterns of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med*. (2007) 35:2016–24. doi: 10.1097/01.CCM.0000281637.08984.6E
38. McKenna S, Gossling M, Bugarini A, Hill E, Anderson AL, Rancourt RC, et al. Endotoxemia induces I κ B β /NF- κ B-dependent endothelin-1 expression in hepatic macrophages. *J Immunol Baltim Md 1950*. (2015) 195:3866–79. doi: 10.4049/jimmunol.1501017
39. Luo Y, Li S-J, Yang J, Qiu Y-Z, Chen F-P. HMGB1 induces an inflammatory response in endothelial cells via the RAGE-dependent endoplasmic reticulum stress pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. (2013) 438:732–8. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.07.098
40. Vincent J-L, Jones G, David S, Olariu E, Cadwell KK. Frequency and mortality of septic shock in Europe and North America: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care Lond Engl*. (2019) 23:196. doi: 10.1186/s13054-019-2478-6
41. Stevenson EK, Rubenstein AR, Radin GT, Wiener RS, Walkey AJ. Two decades of mortality trends among patients with severe sepsis: a comparative meta-analysis*. *Crit Care Med*. (2014) 42:625–31. doi: 10.1097/CCM.0000000000000026
42. Qiang X-H, Yu T-O, Li Y-N, Zhou L-X. Prognosis risk of urosepsis in critical care medicine: a prospective observational study. *BioMed Res Int*. (2016) 2016:9028924. doi: 10.1155/2016/9028924
43. Tampakakis E, Tabit CE, Holbrook M, Linder EA, Berk BD, Frame AA, et al. Intravenous lipid infusion induces endoplasmic reticulum stress in endothelial cells and blood mononuclear cells of healthy adults. *J Am Heart Assoc*. (2016) 5:e002574. doi: 10.1161/JAHA.115.002574
44. Stull AJ, Wang ZQ, Zhang XH, Yu Y, Johnson WD, Cefalu WT. Skeletal muscle protein tyrosine phosphatase 1B regulates insulin sensitivity in African Americans. *Diabetes*. (2012) 61:1415–22. doi: 10.2337/db11-0744
45. Feezor RJ, Baker HV, Mindrinos M, Hayden D, Tannahill CL, Brownstein BH, et al. Whole blood and leucocyte RNA isolation for gene expression analyses. *Physiol Genomics*. (2004) 19:247–54. doi: 10.1152/physiolgenomics.00020.2004
46. So JS. Roles of endoplasmic reticulum stress in immune responses. *Mol Cells*. (2018) 41:705–16. doi: 10.14348/molcells.2018.0241
47. Ma Y, Shimizu Y, Mann MJ, Jin Y, Hendershot LM. Plasma cell differentiation initiates a limited ER stress response by specifically suppressing the PERK-dependent branch of the unfolded protein response. *Cell Stress Chaperones*. (2010) 15:281–93. doi: 10.1007/s12192-009-0142-9
48. Sweeney TE, Khatri P. Benchmarking sepsis gene expression diagnostics using public data*. *Crit Care Med*. (2017) 45:1–10. doi: 10.1097/CCM.0000000000002021
49. Xiao W, Mindrinos MN, Seok J, Cuschieri J, Cuenca AG, Gao H, et al. A genomic storm in critically injured humans. *J Exp Med*. (2011) 208:2581–90. doi: 10.1084/jem.20111354
50. Scicluna BP, van Vught LA, Zwinderman AH, Wiewel MA, Davenport EE, Burnham KL, et al. Classification of patients with sepsis according to blood genomic endotype: a prospective cohort study. *Lancet Respir Med*. (2017) 5:816–26. doi: 10.1016/S2213-2600(17)30294-1

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Clavier, Grangé, Pressat-Laffouilhère, Besnier, Renet, Fraineau, Thiebaut, Richard, Veber and Tamion. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

II- Cinétique et expression des voies de l'*Unfolded Protein Response* au cours du SIRS aseptique (chirurgie cardiaque sous CEC)

Après étude du SRE et de l'UPR au cours du sepsis, nous avons souhaité analyser la cinétique du SRE à l'aide d'un modèle permettant de dater le *trigger* du stress inflammatoire : la chirurgie cardiaque sous CEC. L'objectif principal de ce travail était d'analyser les taux circulants de GRP78, chaperonne effectrice finale et produit de l'UPR, en post-opératoire de chirurgie cardiaque.

Nous avons mené une étude prospective incluant des patients bénéficiant d'une chirurgie cardiaque sous CEC. Les échantillons sanguins ont été prélevés avant la CEC, 2h et 24h après la CEC. Nous avons combiné une analyse de l'expression des ARNm circulants codant pour les gènes clés de l'UPR (*ATF6*, *CHOP*, *HSPA5* [*heat shock 70 kDa protein 5*, codant la GRP78], *sXBP1*, *ATF4*) et un dosage ELISA de la GRP78, et de marqueurs de dysfonction endothéliale (Syndecan-1 et VCAM1) ou d'inflammation (IL-6). Le critère d'évaluation principal était la variation de la GRP78 dans les 24h post-CEC.

Après inclusion de 46 patients, nous avons montré que les taux plasmatiques de GRP78 diminuaient significativement à H2 pour revenir à leurs niveaux de base à H24. En parallèle, tous les gènes impliqués dans l'UPR voyaient leur expression significativement augmentée à H2 et à H24 (sauf *ATF4* donc l'expression redescendait à H24). Il n'existait pas de corrélation entre variation de la GRP78 et variations des marqueurs de dysfonction endothéliale et d'inflammation. Pour les patients sans défaillance d'organe à H24, les taux de GRP78 revenaient à leurs taux pré-opératoires, alors que les taux de GRP78 restaient inférieurs à leurs niveaux de base pour les patients présentant une défaillance d'organe à H24 (toujours ventilé et/ou sous catécholamines et/ou ayant une insuffisance rénale aigüe). De même, les patients avec défaillance persistante avaient une expression moindre des gènes *ATF6* et *CHOP* à H24 comparativement aux patients sans défaillance. Nos données suggèrent donc qu'une réponse UPR « forte » (expression génique importante) et efficace (synthèse de GRP78) est associée à l'absence de défaillance d'organe au cours du SIRS post chirurgie cardiaque sous CEC. Il ne s'agit bien entendu que d'une association et d'autres études sont nécessaires pour mieux comprendre l'implication du SRE dans la défaillance aigüe d'organe chez l'Homme.

Expression of endoplasmic reticulum stress in patients undergoing cardiac surgery with cardiopulmonary bypass

Thomas Clavier, MD^{1,2*}; Zoé Demailly, MD^{1,2}; Xavier Semaille, MD¹; Caroline Thill³; Emmanuel Besnier, MD^{1,2}; Jean Selim, MD^{1,2}; Fabien Doguet, MD, PhD^{2,4}; Vincent Richard, MD, PhD²; Benoit Veber, MD, PhD¹; Fabienne Tamion, MD, PhD^{2,5}

¹ Rouen University Hospital, Department of Anesthesiology and Critical Care, Rouen, F-76031, France

² Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1096, FHU REMOD-VHF, Rouen, France

³ Rouen University Hospital, Department of Biostatistics, Rouen, F-76031, France

⁴ Rouen University Hospital, Department of Cardiac Surgery, Rouen, F-76031, France

⁵ Rouen University Hospital, Department of Medical Critical Care, Rouen, F-76031, France

*Corresponding author: Dr Thomas Clavier, Department of Anesthesiology and Critical Care, Rouen University Hospital, 1 Rue de Germont, Rouen, F-76031, France. E-mail address: thomasclavier76@gmail.com; ORCID ID: 0000-0001-8630-7537.

Running head

Endoplasmic reticulum stress during cardiac surgery

Abstract

Introduction: Endoplasmic reticulum stress (ERS) is involved in septic response/organ failure but is not described in aseptic acute inflammation in human. The objective was to describe ERS expression and kinetics during cardiac surgery with cardiopulmonary bypass (CPB).

Material and Methods: Prospective study including patients benefiting of cardiac surgery with CPB. Samples were taken before (Pre-CPB) or 2h (H2-CPB) and 24h (H24-CPB) after CPB. Plasma Syndecan-1, Vascular-Cell Adhesion Protein-1 (VCAM-1), interleukin (IL)-6 and 78-kDa Glucose-Related Protein (GRP78, final effector of ERS), were evaluated by ELISA. The expression of genes coding for key elements of ERS (*HSPA5*, *ATF6*, *ATF4*, *sXBP1*, *CHOP*) was evaluated by quantitative PCR. The main objective was to study the variation of GRP78.

Results: We included 46 patients, GRP78 significantly decreased at H2-CPB (1328[878-1730] ng/ml vs. 2348[1655-3730] ng/ml before CPB; $p < 0.001$) but returned to basal levels at H24-CPB (2068[1436-3005] ng/ml). Plasma GRP78 levels in patients with persistent organ failure (OF) at H24-CPB ($n=10$) remained significantly below Pre-CPB levels (-27.6[-51.5;-24.2]%) compared to patients without OF ($n=36$) in whom GRP78 levels returned to basal levels (0.6[-28.0;26.6]%; $p < 0.01$). H24-CPB *ATF6* and *CHOP* relative expressions were lower in patients with persistent OF than in patients without OF (2.3 [1.3-3.1] vs. 3.0 [2.7-3.7], $p < 0.05$ and 1.3 [0.9-2.0] vs. 2.2 [1.7-2.9], $p < 0.05$, respectively). There was no correlation between GRP78 variation and Syndecan-1, VCAM-1, or IL-6 variations. All the genes involved in ERS increased their expression at H2 and H24 (except for *ATF4* which returned to basal expression at H24).

Conclusions: We describe that the plasma GRP78 decreased at the initial phase of CPB-induced inflammation and that low relative GRP78 levels and UPR's genes expression appeared associated with persistent postoperative OF. Further studies are needed to understand ERS implication during acute organ failure in humans.

Keywords: Bypass, Cardiopulmonary; Thoracic Surgery; Endoplasmic Reticulum Stress; Endothelium; Inflammation; GRP78 protein, human.

Introduction

Cardio-pulmonary bypass (CPB) is routinely used throughout the world during open-heart surgery. This procedure induces a sterile systemic inflammatory response syndrome (SIRS) associated with post-operative morbidity [1–3]. Numerous inflammatory molecules (such as interleukin (IL)-6, IL-8, or tumor necrosis factor (TNF)- α) are released and activate cellular response leading to systemic inflammation, increased vascular permeability and thrombosis [4]. When severe, this phenomenon might lead to systemic hypotension and organ dysfunction, a situation referred to as “post-pump syndrome” [5]. Given the association between elevated pro-inflammatory cytokine levels and adverse clinical outcomes (post-operative acute kidney injury (AKI), decreased systemic vascular resistance and reduced lung function), it has been postulated that modulation of inflammatory processes could improve outcomes [2,6]. Despite a better knowledge of CPB-induced SIRS pathophysiology, specific therapeutics are still lacking.

Endoplasmic reticulum (ER) stress and its adaptive response, the unfolded protein response (UPR), represent an archetypal example of the adaptive stress responses. The ER plays a crucial role in protein folding and maturation. This folding process is finely regulated, notably by specific proteins known as chaperones, such as the 78 kDa Glucose-Related Protein (GRP78, a heat-shock protein), which stimulates the correct folding of polypeptide to functional protein complexes [7]. Multiple disturbances observed during inflammation can result in a dysfunction of the ER, leading to the accumulation of unfolded proteins within the lumen of the ER, known as ER stress (ERS) [7,8]. The defense against ERS mainly involves the unfolded protein response (UPR) which relies on three signaling pathways: Inositol-Requiring Protein-1 alpha pathway (IRE1 α , involving the spliced ribonucleic acid (RNA) of X-box binding protein 1 (sXBP1)), Protein Kinase RNA-like ER kinase pathway (PERK, involving CCAAT/enhancer binding protein homologous protein (CHOP) and Activating Transcription Factor 4 (ATF4)) and Activating Transcription Factor 6 (ATF6) pathway [7]. One of the roles of the UPR is to lead the synthesis of new chaperones to allow protein folding (*e.g.* GRP78, a final effector of UPR). However, if the ERS is severe and prolonged, UPR can lead to cell death by apoptosis [9].

Cellular dysfunction, hallmarked by ERS, is increasingly recognized as an important contributor to the development of organ failure in critical illness, and in particular during

systemic inflammation [7,10]. ERS is associated with endothelial dysfunction and its inhibition improves endothelium-dependent relaxing function [11]. In experimental sepsis, a treatment with 4-phenylbutyric acid (4BPA; a chemical chaperone which inhibits ERS) decreases the tissue expression level of inflammatory cytokines, reduces organ dysfunction and improves mortality [12,13]. In human, ERS is activated in the mononuclear cells of patients with septic acute lung injury, is involved in AKI and its expression is partly correlated with organ failure in patients with septic shock [10,12,14]. A recent work has shown the feasibility of the non-invasive detection of the ER stress response in urine in patients undergoing cardiac surgery under CPB and indicates that an early and robust adaptive UPR is critical for endogenous protection to acute renal failure [15].

Inhibition of ERS has already been investigated in humans and recent work has shown that its inhibition decreases glucose-induced endothelial dysfunction, however data describing UPR pathways after cardiac surgery and CPB are lacking [16–18]. We designed this study to describe the kinetic of UPR markers and to evaluate the link between UPR expression and organ failure in patients that underwent elective cardiac surgery with CPB

Material and Methods

Study design

This prospective pilot study took place in the cardiac surgery ICU of a tertiary care University Hospital. The study, conducted between July 2018 and April 2019 (N°2017/179/HP), was approved by the ethics committee *Sud-Méditerranée II* (n° CPP 2017-A03375-48) and was performed in accordance with french laws and with the ethical standards laid down in the Declaration of Helsinki and its later amendments [19].

Inclusion and exclusion criteria

Adult patients who underwent cardiac surgery with an estimated duration of CPB greater than one hour were eligible to enter the study. Eligible patients were approached, and written informed consent was obtained prior to inclusion.

Exclusion criteria were: age under 18 y/o or patient under tutorship, pregnancy/breastfeeding, urgent surgery, predictable CPB of less than one hour (single or double coronary artery bypass grafting (CABG) or aortic valve replacement (VR)), surgery without sternotomy, a history of altered left ventricular systolic function (LVEF < 30%), chronic autoimmune inflammatory disease, neoplasia and patient refusal.

Objectives

Primary outcome

The main objective was to study the variation of GRP78 between before CPB (Pre-CPB) and 2 and 24 hours after the end of CPB (H2-CPB and H24-CPB, respectively) by quantitative polymerase chain reaction (PCR) and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).

Secondary outcomes

The secondary objectives were to study:

- the kinetics of UPR's pathways' genes (*ATF6*, *ATF4*, *CHOP* and *sXBP1*) expressions in circulating cells after CPB;

- the associations of GRP78 level variations and endothelial dysfunction markers (Syndecan-1, Vascular Cell Adhesion Protein 1 (VCAM-1)), or inflammatory cytokine (IL-6) variations;

- the association between plasma GRP78 variations or UPR's genes' expression and persistent organ failure at H24-CPB (defined as presence at H24-CPB of: invasive mechanical ventilation and/or acute renal failure (Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) score ≥ 1) and/or hemodynamic failure requiring catecholamines);

Sample collection and analysis

Surgical procedure

Anesthetic induction included an intravenous (IV) hypnotic (propofol or etomidate), an IV opioid (sufentanil or remifentanil) and an IV curare (cisatracrium) for orotracheal intubation. Administration of ketamine and corticosteroids was at the discretion of the anesthesiologist. After induction, the anesthesia was maintained with propofol and continuous infusion of opioids. CPB was initiated with a heparinized solution after sternotomy, pericardotomy, and drainage of the right atrium through one or two cannulas. Oxygenated blood was re-injected into the arterial circulation through a cannula inserted into the aorta downstream of aortic clamping. The heart was stopped by infusion of a cold, potassium-rich cardioplegia solution (potassium and beta-blockers cardioplegia or Custodiol© cardioplegia). The CPB circuit, typically included filters, a thermal device to maintain blood temperature at the desired level (36 to 37°C) and an oxygenator. During surgery, mean blood pressure was maintained between 55 and 70 mmHg. At the end of the procedure, the heart chambers were purged, the aorta was declamped and the heart reperfused. Once an effective spontaneous heart rhythm was obtained, the CPB was stopped and the cannulas were removed. Circulating heparin was neutralized with protamine. Vasoconstrictors or inotropic agents, fluids and transfusion products were administered at the discretion of the anesthesiologist based on clinical, echocardiographic and biological findings. Patients were transferred to post-operative cardiac ICU and monitored hourly for the first 24 hours and then every 3 hours for the remaining period of the ICU stay.

For each patient, baseline pre-operative characteristics were evaluated (sex, age, body mass index). The data relevant to the undertaken surgical procedure (type of surgery, surgery/CPB length) and the ICU stay (Simplified Acute Physiology Score (SAPS) II, use of catecholamine, length of mechanical ventilation, ICU length of stay) were collected.

Blood sampling

All samples were collected using standard hygiene precautions from patients' arterial line. The Pre-CPB sample was taken after induction and before incision, just after the arterial catheter was placed, the H2-CPB and H24-CPB samples were taken 2 and 24 hours after the end of CPB, respectively. At each timing, one PAXgene® tube (allowing the conservation of circulating blood cells ribonucleic acid (RNA); Quiagen, Hilden, Germany; 2.5 ml of blood) and one EDTA tube (4 ml of blood) were collected. The EDTA tube was immediately centrifuged at 3000g for 15 min and plasma was aliquoted in microtubes. Samples were kept for a maximum of 7 days in the freezer of the ICU at -20°C and then were stored at -80°C until final analysis.

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Plasma GRP78 concentrations were determined using the commercial kit GRP78/BiP ADI-900-214 (Enzo Life Sciences, France) according to the manufacturer's protocol. After preliminary analyses, a dilution of our samples to 1:10 was chosen for optimized results. Other proteins concentrations were determined using the Thermo Fisher Scientific (MA, USA) commercial kits IL-6 (ref. EH2IL6), Syndecan-1 (ref. EHSDC1) and VCAM-1 (ref. KHT0601) according to the manufacturer's protocol.

Ribonucleic acid extraction, reverse transcription and quantitative polymerase chain reaction

Briefly, RNA extraction was performed using the commercial kit PAXgene® Blood RNA System kit (Quiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. Before

RNA elution, residual genomic deoxyribonucleic acid (DNA) was digested using RNase-Free DNase set (Quiagen, Hilden, Germany). The integrity and quantity of the total RNA were assessed with a Nanodrop 2000 device (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MS, USA). Total RNAs were reverse transcribed into cDNA using M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to manufacturer's instructions.

A quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was performed for:

- The mRNA of genes coding for proteins involved in UPR: *HSPA5*, *ATF6*, *ATF4*, *sXBP1*, *CHOP*;
- The mRNA of the gene coding for succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A (*SDHA*). As *SDHA* has been described as a pertinent housekeeping gene in humans with inflammation and as its cycle threshold (Ct) is close to the Ct of *PTP1B* and UPR genes in qPCR, it appeared as the best housekeeping gene for our work [20].

The genes that were amplified and the primers that were used are listed in Table 1. Quantitative PCR was performed using the Quantstudio 12K Flex system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The 384-well PCR plates were prepared with 1.2 μL of cDNA (16.7 ng/ μL) diluted at 1:10 and 3.81 μL of reaction mix. The reaction mix contained the sense and antisense primers at a concentration of 300nM (0.02 μL x2), Fast Sybr Master mix (2.50 μL) and water DNase and RNase free (1.27 μL). The final volume was 5 μL per well. Samples were deposited using the Bravo Automated Liquid Handling Platform pipetting robot (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The analysis included a first activation step for 20 seconds and then 40 amplification cycles consisting of a new activation phase at 95°C for 1 second followed by an elongation phase at 60°C for 20 sec. Ct values were used for quantifying target gene expression relative to the housekeeping gene using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method.

Table 1: Primers used for quantitative PCR.

Gene name	Sense	Sequence (5'-3')
<i>SDHA</i>	Forward	GAGATGTGGTGTCTCGGTCCAT
	Reverse	GCTGTCTCTGAAATGCCAGGCA
<i>ATF4</i>	Forward	GTTCTCCAGCGACAAGGCTA
	Reverse	ATCCTGCTTGCTGTTGTTGG
<i>CHOP</i>	Forward	TCGCCGAGCTCTGATTGAC
	Reverse	CCCTGCGTATGTGGGATTGAG
<i>sXBP1</i>	Forward	TGCTGAGTCCGCAGCAGGTG
	Reverse	GCTGGCAGGCTCTGGGGAAG
<i>ATF6</i>	Forward	CCGCAGAAGGGGAGACACA
	Reverse	TCGGAGGTAAGGAGGAACTGACG
<i>HSPA5</i>	Forward	CGAGGAGGAGGACAAGAAGG
	Reverse	CACCTTGAACGGCAAGAACT

ATF4/6: Activating Transcription Factor 4/6; CHOP : CCAAT/enhancer binding protein homologous protein; HSPA5: Heat Shock 70kDa Protein 5; PTPN1, Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 1; SDHA: succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A ; sXBP1 : spliced X-box binding protein 1.

Statistical analysis

In view of a previous work studying ERS expression during septic SIRS, we considered that it was necessary to include at least 45 patients to find a variation in GRP78 plasma level after CPB [10]. Comparisons between distributions of quantitative criteria between two samples were made using the nonparametric Wilcoxon test for matched series, with each subject taken as its own control. For groups comparison, the quantitative variables were compared using a Mann-Whitney test or a Student's test depending on the distribution of the data. The Pearson correlation test was used to assess the association between two variables. Quantitative values are expressed as median with interquartile range, qualitative values are presented as absolute

values with percentages. All tests were two-sided, the significance level was 0.05 for all the tests performed. All calculations and statistical analyses were conducted on R 3.4.2 statistical software.

Results

Clinical and demographic characteristics of population

Forty-six patients were enrolled between July 2018 and April 2019, Baseline and peri-operative characteristics of included patients are detailed in Table 2. No patients had died at D28.

Table 2: Main demographic and clinical characteristics of patients.

Demographic characteristics	
Number of patients	46
Age (years)	70.5 [63.5-75.7]
Sex-ratio (M/F)	3.6 (36/10)
Body Mass Index (kg/m ²)	28.1 [25.7-30.5]
Length of stay in hospital (days)	13 [9-17]
Surgical characteristics	
Type of surgery:	9 (19.6 %)
- coronary artery bypass grafting	26 (56.5 %)
- valve surgery	11 (23.9 %)
- combined surgery (valve surgery + CABG)	
Length of surgery (min)	221 [186-254]
Length of CPB (min)	117 [92-139]
ICU stay characteristics	
SAPS II	33 [30-40]
Length of mechanical ventilation (hours)	6 [4-8]
Length of stay in ICU (days)	3 [2-5]

Data are presented as median with interquartile range or absolute value and percentage (n(%)). CABG, coronary artery bypass grafting; CPB, Cardiopulmonary Bypass; ICU, Intensive Care Unit; SAPS II, Simplified Acute Physiology Score II.

Primary outcome

The plasma level of GRP78 significantly decreased at H2-CPB but there was no difference between Pre-CPB and H24-CPB GRP78 level (Figure 1A). Relative changes in GRP78 level at H2-CPB and H24-CPB (compared to GRP78 level before CPB) are shown in Figure 2. The expression of *HSPA5* (coding for GRP78) increased significantly at H2-CPB and

H24-CPB (Figure 3). There was no correlation between relative changes in GRP78 plasma levels and *HSPA5* expression variation at H2-CPB ($r=0.00$ [-0.37;0.37]; $p=1.0$) and H24-CPB ($r=-0.01$ [-0.37;0.34]; $p=0.94$). There was no correlation between relative changes in GRP78 plasma levels variation at H24-CPB and CPB length during surgery ($r=-0.19$ [-0.45;0.11]; $p=0.22$).

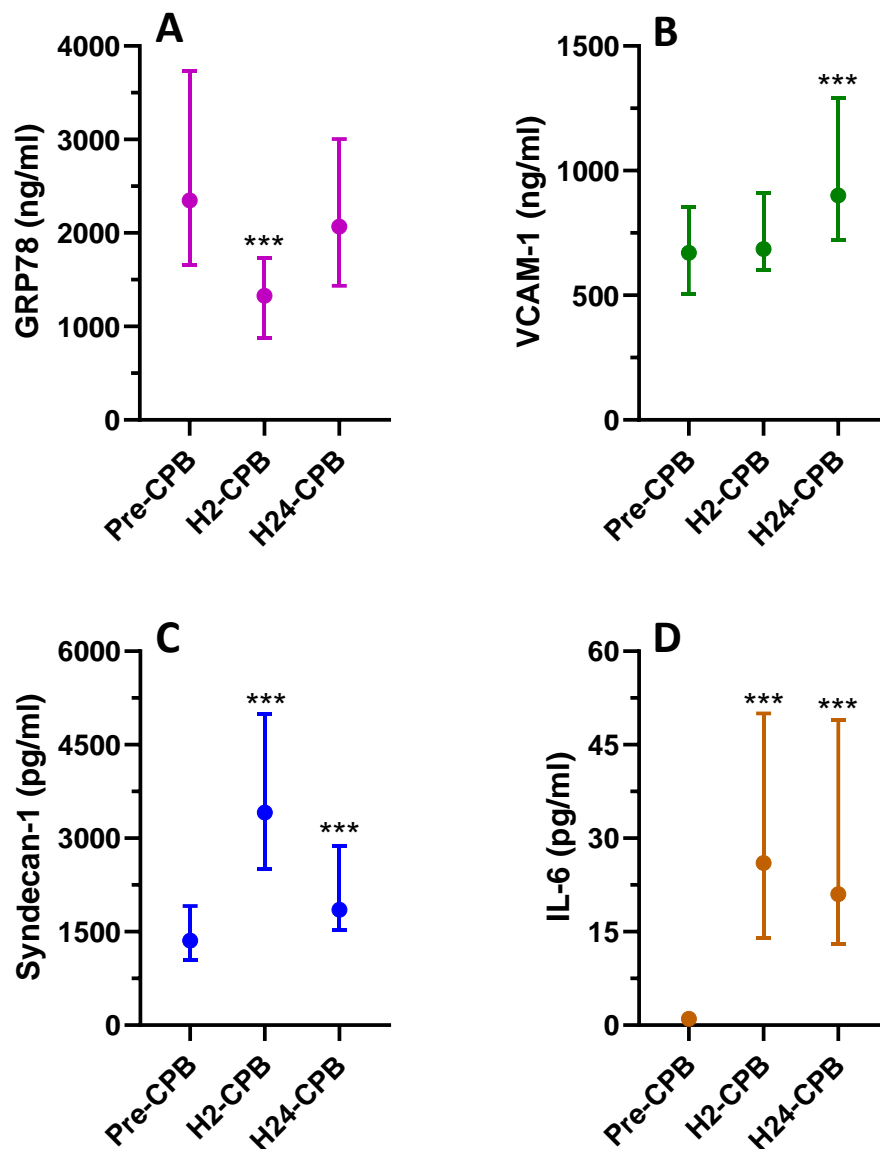


Figure 1: Plasma level of GRP78 (A), VCAM-1 (B), Syndecan-1 (C) and IL-6 (D) before (Pre-CPB) and 2 (H2-CPB) or 24 (H24-CPB) hours after cardiopulmonary bypass (CPB). Values are presented as median with interquartile range. *, $p < 0.001$ in comparison with Pre-CPB level. GRP78, 78 kDa Glucose Related Protein; IL-6, Interleukin 6; VCAM-1, Vascular Cell Adhesion Protein 1.**

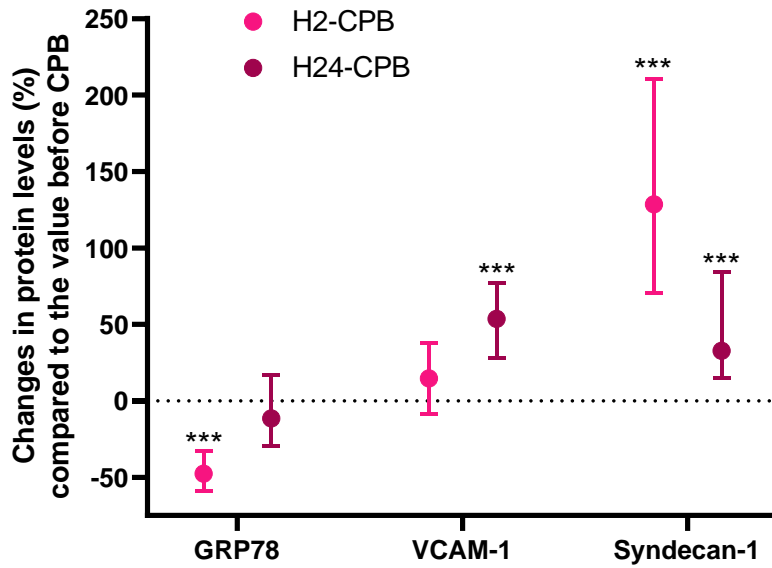


Figure 2: Relative levels of studied protein 2 (H2-CPB) or 24 (H24-CPB) hours after cardiopulmonary bypass (CPB). Values are presented as median with interquartile range. ***, $p < 0.001$ in comparison with Pre-CPB level. GRP78, 78 kDa Glucose Related Protein; VCAM-1, Vascular Cell Adhesion Protein 1.

Secondary outcomes

Syndecan-1, VCAM-1 and IL-6 plasma level

The plasma level of VCAM-1 did not show any modification at H2-CPB but significantly increased at H24-CPB (Figure 1B) while syndecan-1 and IL-6 levels increased at H2-CPB and H24-CPB (Figure 1C and 1D). Relative changes in studied protein levels at H2-CPB and H24-CPB (compared to the value before CPB) are shown in Figure 2 (as Pre-CPB IL-6 level were undetectable, it was not possible to achieve a relative analysis for this cytokine). At H24-CPB, there was no correlation between GRP78 plasma level variations and VCAM-1 ($r=0.04$ [-0.33;0.25]; $p=0.79$) and Syndecan-1 (-0.29 [-0.53;0.00]; $p=0.05$) plasma level variations or IL-6 absolute values ($r=0.12$ [-0.18;0.40]; $p=0.43$).

Other Unfolded Protein Response's gene expression

The expression of *CHOP* and *sXBP1* increased at H2-CPB and remained stable at H24-CPB. *ATF4* showed a little increase in its H2-CPB expression but there was no difference between Pre-CPB and H24-CPB expressions (Figure 3). The expression of *ATF6* increased at H2-CPB and kept growing at H24-CPB (Figure 3).

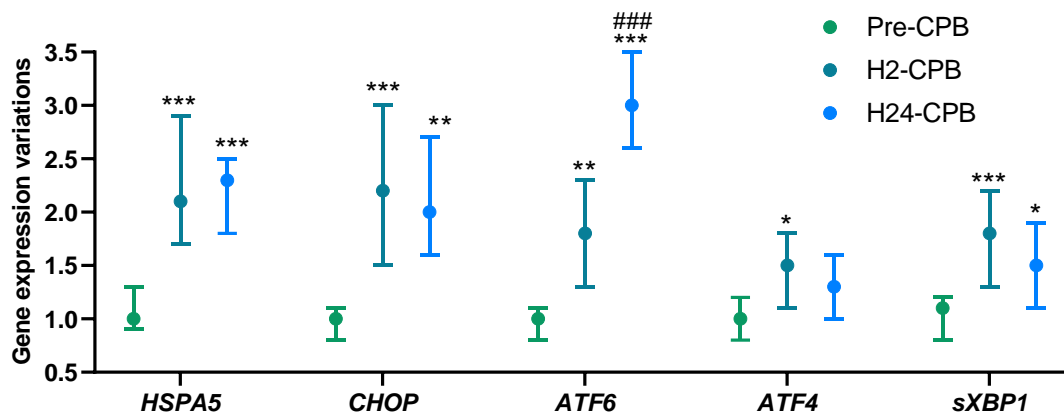


Figure 3: Relative changes in Unfolded Protein Response genes expression after cardiac surgery with cardiopulmonary bypass (CPB). Gene expressions prior to PBC (Pre-CPB) were averaged to 1 for each gene. For each patient, the expressions 2 hours (H2-CPB) and 24 hours (H24-CPB) after CPB were expressed as relative expression to Pre-CPB. Values are presented as median with interquartile range. Differences expressed in comparison with Pre-CPB gene expressions: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. Differences expressed in comparison with H2-CPB gene expressions: ###, $p < 0.001$. ATF, Activating Transcription Factor; CHOP, CCAAT/enhancer binding protein homologous protein; HSPA5, Heat Shock 70kDa Protein 5; sXBP1, spliced RNA of X-box binding protein 1.

Correlation between UPR and clinical outcome

Of the 46 patients, 10 had persistent organ failure at H24-CPB (9 treated with catecholamines, 4 mechanically ventilated and 4 with acute renal failure). Plasma GRP78 levels in patients with persistent organ failure remained significantly below Pre-CPB levels compared to patients without organ failure in whom GRP78 levels returned to basal levels (Figure 4). To evaluate the potential bias induced by hemodilution on GRP78 levels according to the presence or absence of organ failure, we analyzed the variations in total protein levels between patients with and without organ failure and found no significant differences between groups (Figure 4). *ATF6* and *CHOP* expressions were significantly higher at H24-CPB in patients without organ failure while there was no difference concerning *HSPA5*, *sXBP1* and *ATF4* H24-CPB expression between patients with or without organ failure (Figure 5).

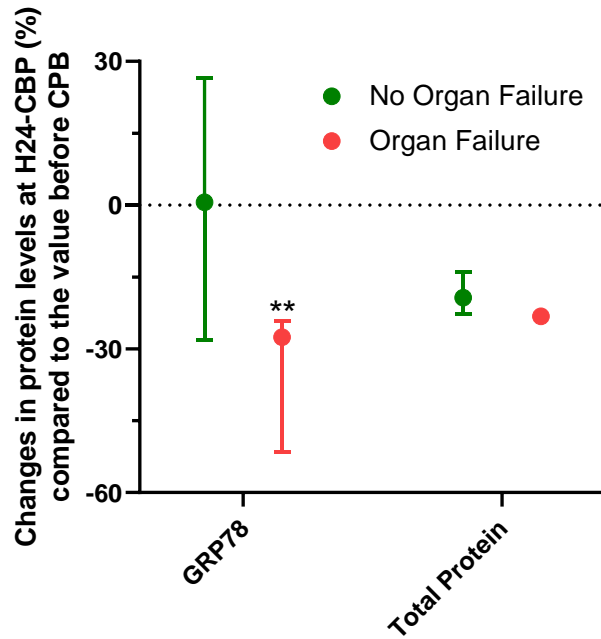


Figure 4: Relative changes (%) in GRP78 levels at 24 hours (H24-CPB) in patients with or without persistent organ failure. Values are presented as median with interquartile range. **, $p < 0.01$ between groups. GRP78, 78 kDa Glucose Related Protein.

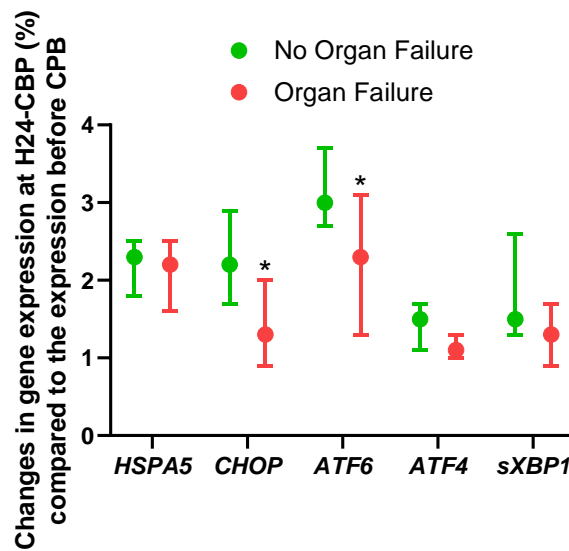


Figure 5: Relative changes in Unfolded Protein Response genes expression at 24 hours in patients with or without persistent organ failure. Values are presented as median with interquartile range. *, $p < 0.05$ between groups. 24 hours after CPB were expressed as relative expression to Pre-CPB. ATF, Activating Transcription Factor; CHOP, CCAAT/enhancer binding protein homologous protein; HSPA5, Heat Shock 70kDa Protein 5; sXBP1, spliced RNA of X-box binding protein 1.

Discussion

To our knowledge, we describe for the first time the kinetic of all UPR pathways in patients undergoing elective cardiac surgery with CPB. We found that the level of GRP78, one of the final effectors of the UPR, decreases at the initial phase of CPB-induced SIRS and that a prolonged decrease in GRP78 levels is associated with postoperative organ failure.

Kinetic of Unfolded Protein Response

The present study demonstrated that CPB stimulated UPR, as reflected by increased genes expression of the three UPR pathways. However, we observed a temporary decrease in GRP78 circulating levels at H2-CPB and a return to baseline level at H24-CPB. It is known that heat-shock protein can be secreted extracellularly by many cells (dendritic cells, hepatocytes, myocytes, gut cells, lymphocytes,...) through several regulated ways: lysosome-endosome pathway, secretory-like granules, extracellular vesicles [21]. A previous work reported that extracellular GRP78 originates mostly by an active release from intact cells and does not result solely from the leakage of proteins from dead cells [22]. It is therefore likely that the decrease in plasma GRP78 is the result of an adaptive cellular mechanism.

Several studies have shown an increase in plasma GRP78 in patients with chronic systemic inflammation (cancer, obesity, atherosclerosis) [23–25]. However, in a situation of acute systemic inflammation, the rising demand for intracellular GRP78 is immediate to resolve the ERS [7]. This may explain the observed early decrease of extracellular plasma GRP78 which is associated with a rapid activation of UPR's genes transcription at H2-CPB, allowing a return of GRP78 to basal level at H24-CPB. Our results showed that the three pathways of UPR are activated during sterile systemic inflammation in humans. However, the kinetics of these pathways appeared to be different. The IRE1 α (explored by *sXBP1*) and PERK (explored by *ATF4* and *CHOP*) pathways seemed to have a stable level of expression between H2-CPB and H24-CPB but *ATF6* expression increased at H2-CPB and kept growing at H24-CPB. In ERS condition, ATF6 pathway is the first to be initiated and, due to its rapid activation (proteolytic cleavage and direct action on the genome as a transcription factor), it has the most reactive kinetics of the three UPR pathways [26,27]. ATF6 upregulates many protective genes and downregulates many potentially damaging genes, and previous studies have shown that

ATF6 activation in cardiac myocytes protects the heart from ischemic damage, while inhibiting ATF6 has the opposite effect [28–30]. Given our results and as previously suggested, it is possible that among UPR pathways, ATF6 is the most intensely involved pathway during acute SIRS (which could explain why its activation continues to increase at H24-CPB) [10]. Most of the work on UPR have focused on chronic inflammation and ERS and the activation kinetics of the three UPR's pathways in humans during the early phase of acute inflammation situations is unknown. Thus, it appears difficult to know whether these differential expressions exist *in-vivo* in other acute inflammation situations. These three pathways have, in part, common effects to resolve ERS: chaperone synthesis, activation of ER associated degradation, activation of Nuclear Factor-Kappa B,... [7,9]. It is therefore also difficult to propose a hypothesis on the clinical consequences of differential activation of the three pathways of UPR over time. Future works studying the activation kinetics of the UPR pathways in humans are in any case necessary to confirm or invalidate our results and to analyze more precisely the activation/return to normal delays after acute inflammation.

Unfolded Protein Response and organ failure

Circulating GRP78 levels returned to levels comparable to baseline at H24-CPB except in patients with persistent organ failure who maintained GRP78 levels below their initial baseline. They also had an UPR gene expression that was lower than that of patients without organ failure. A previous work studying the expression of UPR mRNA in urine after cardiac surgery has shown that patients with a high increase in urine sXBP1 mRNAs (reflecting kidney UPR) had less AKI [15]. These data suggested that a robust post-operative activation of the ERS response after CPB is critical for protecting against tissue damage (and, in this work, against AKI). Moreover, pre-clinical data showed that the resolution of the ERS *via* chemical chaperones (*e.g.* 4BPA) can correct organ failure induced by a septic SIRS [12,13]. In our study, patients with a relatively high UPR response (that probably allowed ERS resolution) returned to their basal chaperones levels and had no organ failure, while patients with a lower UPR response failed to return to their basal chaperones levels and had persistent organ failure. Our results are therefore consistent with previous human and pre-clinical data. But, as previously stated, the prognostic value of the markers of the ERS response may change with the duration of adaptive responses, which also reflect the length of the stress [15]. While a strong UPR appears necessary in the acute stress phase, excessively prolonged ERS responses promote cell

death as a result of an imbalance in favor of proapoptotic pathways rather than antiapoptotic pathways [9].

Extracellular GRP78 is known to have anti-inflammatory properties by inducing the endocytosis of the Toll-Like Receptor 4, reducing the production of inflammatory cytokines and increasing the synthesis of anti-inflammatory cytokines [31,32]. It would therefore be possible that patients returning to pre-operative levels of GRP78 may also benefit from its immunomodulatory effect and thus be less likely to develop persistent organ failure than patients remaining at relatively low levels of extracellular GRP78. Nevertheless, our work does not establish a causal link between organ failure after CPB and the level of GRP78, and further works are therefore necessary to confirm or invalidate our observations.

Syndecan-1, VCAM-1 and IL-6 plasma level

It has been shown that ERS is implicated in endothelial dysfunction and that its inhibition in humans improves endothelial dysfunction induced by glucose ingestion [11,18]. Moreover, in a previous study conducted in septic patients, we have shown an association between *ATF6* and *ET1* (coding for endothelin-1 which is associated with endothelial dysfunction in this context) expressions [10]. We therefore felt it necessary to study markers of endothelial damage (VCAM-1 and Syndecan-1) and inflammation (IL-6). However, we did not find a link between VCAM-1, Syndecan-1 or IL-6 and GRP78 levels, but the kinetics of GRP78 variation is unknown and it is therefore difficult to know whether the search for a correlation between these markers, taken at the same time, is relevant. In regard to this fact and to the results of previous study on the link between endothelial dysfunction and ERS, we should be cautious and not conclude the absence of a link between ERS and endothelial dysfunction in patients undergoing cardiac surgery with CPB.

Limitations

Our work has several limitations. First, it is a pilot physiologic study with a limited number of patients. We included patients with several type of surgery (valve and/or CABG) which could lead to population heterogeneity. Given our limited patient population, it did not seem appropriate to consider subgroup analyses by type of surgery. Second, our work involved

gene expression in the whole blood. As some of the proteins studied in our work cannot be measured in blood without complex cell isolation techniques, RNA quantification appeared to be the best compromise. RNA expression on whole blood measured using the Paxgen tubes is strongly correlated with the RNA expression in circulating leucocytes, we can thus assume that we detected variations in leucocyte gene expression [33]. As it is known that UPR play a crucial role in immune cells, including differentiation, immune activation, antibody production and cytokine expression, it seemed relevant to study the leucocyte expression of UPR genes [34,35]. However, we may have missed a potentially greater variation in gene expression in tissues and organs, as observed in animal models [12,13,36]. Third, we took our samples at only two post-operative timepoints and it is possible that we could not highlight the real UPR's pathways peak of expression. Moreover, our data showed that gene expression of several genes involved in UPR remain over-expressed compared to their baseline expression at H24-CPB. Our work did not allow us to conclude when the genes involved return to basal expression. Fourth, we only studied patients with cardiac pathologies, some of which are associated with ERS-inducing pathologies: diabetes, atherosclerosis, obesity, metabolic syndrome [37]. It is therefore not certain that GRP78 and UPR kinetics are identical in a population without pathologies. However, it should be noted that the plasma GRP78 levels found at H0 and H24 are very close to those recently described in a group of healthy volunteers, which probably makes our results quite extrapolable to other populations [38].

Conclusion

We describe for the first time the kinetic of all UPR pathways during acute sterile systemic inflammation. We found that the plasma level of GRP78 decreased at the initial phase of CPB-induced SIRS and that low relative GRP78 levels appeared associated with persistent postoperative organ failure. However, further studies are needed to better understand ERS implication during systemic inflammation and acute organ failure in humans.

Acknowledgement

The authors are grateful to Nikki Sabourin-Gibbs, Rouen University Hospital, for her help in editing the manuscript and for english proofreading. We thank Vincent Scherrer, Gioia Gastaldi, Elisabeth Surlemont, Nathalie Rey, Geoffrey Kouadri, Véronique Wurtz, Julien Abily (Cardiac Anesthesia, Rouen University Hospital) for their help in including patients. We also thank Assia Ferrane, Cécile Pourcher (Direction of Clinical Research, Rouen University Hospital), and Sylvanie Renet (INSERM U1096) for their logistic support. Finally, we thank David Vaudry and Caroline Theresine (PRIMACEN platform, Rouen University), for their help in quantitative PCR.

Author Contributions Statement

TC was involved in the study conception and design, in acquisition of data, in analysis and interpretation of data and in manuscript draft

ZD was involved in acquisition of data, in analysis and interpretation of data and in manuscript draft

XS was involved in acquisition and in interpretation of data.

CT was involved in statistical analysis and in interpretation of data

EB, JS, FD were involved in the study conception and design, in interpretation of data and in manuscript revision.

VR, BV and FT were involved in the study conception and design, in analysis and interpretation of data and in manuscript revision.

All authors contributed to manuscript revision, read and approved the submitted version.

Conflicts of Interest and Source of Funding

The authors declare that they have no conflicts of interest.

This work was supported Normandie Rouen University, Inserm, and Rouen University Hospital. The funding sources had no role in the design and conduct of the study; collection, management, analysis, or interpretation of the data; preparation, review, or approval of the manuscript; and decision to submit the manuscript for publication.

Data availability statement

The raw data supporting the conclusions of this manuscript can be made available on request by the authors to any qualified researcher.

References

1. Benjamin EJ, Virani SS, Callaway CW, Chamberlain AM, Chang AR, Cheng S, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2018 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2018;137:e67–492.
2. Bronicki RA, Hall M. Cardiopulmonary Bypass-Induced Inflammatory Response: Pathophysiology and Treatment. *Pediatr Crit Care Med J Soc Crit Care Med World Fed Pediatr Intensive Crit Care Soc*. 2016;17:S272-278.
3. Clive Landis R, Murkin JM, Stump DA, Baker RA, Arrowsmith JE, De Somer F, et al. Consensus statement: minimal criteria for reporting the systemic inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Heart Surg Forum*. 2010;13:E116-123.
4. Paparella D, Yau TM, Young E. Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update. *Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg*. 2002;21:232–44.
5. Day JRS, Taylor KM. The systemic inflammatory response syndrome and cardiopulmonary bypass. *Int J Surg Lond Engl*. 2005;3:129–40.
6. Shaefi S, Mittel A, Klick J, Evans A, Ivascu NS, Gutsche J, et al. Vasoplegia After Cardiovascular Procedures-Pathophysiology and Targeted Therapy. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2018;32:1013–22.
7. Khan MM, Yang W-L, Wang P. ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS IN SEPSIS. *Shock Augusta Ga*. 2015;44:294–304.
8. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8:519–29.
9. Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*. 2011;334:1081–6.
10. Clavier T, Grangé S, Pressat-Laffouilhère T, Besnier E, Renet S, Fraigneau S, et al. Gene Expression of Protein Tyrosine Phosphatase 1B and Endoplasmic Reticulum Stress During Septic Shock. *Front Med*. 2019;6:240.
11. Thiebaut P-A, Delile E, Coquerel D, Brunel J-M, Renet S, Tamion F, et al. Protein tyrosine phosphatase 1B regulates endothelial endoplasmic reticulum stress; role in endothelial dysfunction. *Vascul Pharmacol*. 2018;
12. Kim HJ, Jeong JS, Kim SR, Park SY, Chae HJ, Lee YC. Inhibition of endoplasmic reticulum stress alleviates lipopolysaccharide-induced lung inflammation through modulation of NF- κ B/HIF-1 α signaling pathway. *Sci Rep*. 2013;3:1142.
13. Liu L, Wu H, Zang J, Yang G, Zhu Y, Wu Y, et al. 4-Phenylbutyric Acid Reveals Good Beneficial Effects on Vital Organ Function via Anti-Endoplasmic Reticulum Stress in Septic Rats. *Crit Care Med*. 2016;44:e689-701.

14. Yan M, Shu S, Guo C, Tang C, Dong Z. Endoplasmic reticulum stress in ischemic and nephrotoxic acute kidney injury. *Ann Med*. 2018;50:381–90.
15. Fohlen B, Tavernier Q, Huynh T-M, Caradeuc C, Le Corre D, Bertho G, et al. Real-Time and Non-invasive Monitoring of the Activation of the IRE1 α -XBP1 Pathway in Individuals with Hemodynamic Impairment. *EBioMedicine*. 2018;27:284–92.
16. Mily A, Rekha RS, Kamal SMM, Arifuzzaman ASM, Rahim Z, Khan L, et al. Significant Effects of Oral Phenylbutyrate and Vitamin D3 Adjunctive Therapy in Pulmonary Tuberculosis: A Randomized Controlled Trial. *PloS One*. 2015;10:e0138340.
17. Elia AE, Lalli S, Monsurrò MR, Sagnelli A, Taiello AC, Reggiori B, et al. Tauroursodeoxycholic acid in the treatment of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurol*. 2016;23:45–52.
18. Walsh LK, Restaino RM, Neuringer M, Manrique C, Padilla J. Administration of tauroursodeoxycholic acid prevents endothelial dysfunction caused by an oral glucose load. *Clin Sci Lond Engl 1979*. 2016;130:1881–8.
19. Toulouse E, Massequin C, Lafont B, McGurk G, Harbonn A, A Roberts J, et al. French legal approach to clinical research. *Anaesth Crit Care Pain Med*. 2018;37:607–14.
20. Cummings M, Sarveswaran J, Homer-Vanniasinkam S, Burke D, Orsi NM. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is an inappropriate housekeeping gene for normalising gene expression in sepsis. *Inflammation*. 2014;37:1889–94.
21. De Maio A, Vazquez D. EXTRACELLULAR HEAT SHOCK PROTEINS: A NEW LOCATION, A NEW FUNCTION. *Shock Augusta Ga*. 2013;40:239–46.
22. Delpino A, Castelli M. The 78 kDa glucose-regulated protein (GRP78/BIP) is expressed on the cell membrane, is released into cell culture medium and is also present in human peripheral circulation. *Biosci Rep*. 2002;22:407–20.
23. Khadir A, Kavalakatt S, Abubaker J, Cherian P, Madhu D, Al-Khairi I, et al. Physical exercise alleviates ER stress in obese humans through reduction in the expression and release of GRP78 chaperone. *Metabolism*. 2016;65:1409–20.
24. Ciortea R, Berceanu C, Măluțan AM, Mocan R, Iuhas C, Bucuri CE, et al. Intraperitoneal Fat through GRP78: A Risk Factor for Endometrial Cancer. *Anal Cell Pathol Amst*. 2016;2016:3496538.
25. Girona J, Rodríguez-Borjabad C, Ibarretxe D, Vallvé J-C, Ferré R, Heras M, et al. The Circulating GRP78/BiP Is a Marker of Metabolic Diseases and Atherosclerosis: Bringing Endoplasmic Reticulum Stress into the Clinical Scenario. *J Clin Med*. 2019;8.
26. Okada T, Yoshida H, Akazawa R, Negishi M, Mori K. Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. *Biochem J*. 2002;366:585–94.
27. Yoshida H, Matsui T, Hosokawa N, Kaufman RJ, Nagata K, Mori K. A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. *Dev Cell*. 2003;4:265–71.

28. Egawa N, Yamamoto K, Inoue H, Hikawa R, Nishi K, Mori K, et al. The endoplasmic reticulum stress sensor, ATF6 α , protects against neurotoxin-induced dopaminergic neuronal death. *J Biol Chem*. 2011;286:7947–57.
29. Wu J, Rutkowski DT, Dubois M, Swathirajan J, Saunders T, Wang J, et al. ATF6 α optimizes long-term endoplasmic reticulum function to protect cells from chronic stress. *Dev Cell*. 2007;13:351–64.
30. Doroudgar S, Thuerlauf DJ, Marcinko MC, Belmont PJ, Glembotski CC. Ischemia activates the ATF6 branch of the endoplasmic reticulum stress response. *J Biol Chem*. 2009;284:29735–45.
31. Tang Y, Jiang Q, Ou Y, Zhang F, Qing K, Sun Y, et al. BIP induces mice CD19(hi) regulatory B cells producing IL-10 and highly expressing PD-L1, FasL. *Mol Immunol*. 2016;69:44–51.
32. Qin K, Ma S, Li H, Wu M, Sun Y, Fu M, et al. GRP78 Impairs Production of Lipopolysaccharide-Induced Cytokines by Interaction with CD14. *Front Immunol* [Internet]. 2017 [cited 2019 Dec 27];8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5440525/>
33. Feezor RJ, Baker HV, Mindrinos M, Hayden D, Tannahill CL, Brownstein BH, et al. Whole blood and leukocyte RNA isolation for gene expression analyses. *Physiol Genomics*. 2004;19:247–54.
34. So J-S. Roles of Endoplasmic Reticulum Stress in Immune Responses. *Mol Cells*. 2018;41:705–16.
35. Ma Y, Shimizu Y, Mann MJ, Jin Y, Hendershot LM. Plasma cell differentiation initiates a limited ER stress response by specifically suppressing the PERK-dependent branch of the unfolded protein response. *Cell Stress Chaperones*. 2010;15:281–93.
36. Diao L, Marshall AH, Dai X, Bogdanovic E, Abdullahi A, Amini-Nik S, et al. Burn plus lipopolysaccharide augments endoplasmic reticulum stress and NLRP3 inflammasome activation and reduces PGC-1 α in liver. *Shock* Augusta Ga. 2014;41:138–44.
37. Mohan S, R PRM, Brown L, Ayyappan P, G RK. Endoplasmic reticulum stress: A master regulator of metabolic syndrome. *Eur J Pharmacol*. 2019;860:172553.
38. Baek J-H, Mamula D, Tingstam B, Pereira M, He Y, Svenningsson P. GRP78 Level Is Altered in the Brain, but Not in Plasma or Cerebrospinal Fluid in Parkinson's Disease Patients. *Front Neurosci* [Internet]. 2019 [cited 2019 Dec 27];13. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6624451/>

DISCUSSION GENERALE ET SYNTHESE

Nous avons exploré dans ce travail les trois voies de l'UPR au cours des situations de SIRS septique ou aseptique.

Dans la première partie nous avons mis en évidence :

1) L'existence d'un lien entre défaillance d'organe liée au choc septique et activation prolongée de l'UPR. Nous avons vu que les variations de l'expression d'*ATF6* au cours des cinq premiers jours d'hospitalisation pour choc septique sont corrélées aux variations du score SOFA. Le lien entre défaillances d'organes septique et existence du SRE a bien été décrit chez l'animal, tout comme l'effet bénéfique du 4BPA, chaperonne chimique permettant de résoudre ce SRE [182,183]. Par définition la persistance d'une UPR (comme celle observée chez nos patients avec défaillance d'organe) signe l'existence d'un SRE résiduel. Nos données sur le lien entre défaillance d'organe et UPR soutenue sont donc logiques au vu de la littérature sur le SRE au cours du sepsis qui montre le lien entre résolution de l'UPR et régression de la défaillance d'organe.

2) L'existence d'un lien entre expression d'un biomarqueur d'atteinte endothéliale (*ET-1*) et activation prolongée de l'UPR. Plusieurs travaux ont montré que le SRE jouait un rôle central dans la survenue d'une dysfonction endothéliale [174,175,177]. La résolution du SRE par le 4BPA permet d'augmenter l'activité de la eNOS et d'améliorer la relaxation dite endothélium-dépendante (témoin d'un endothélium fonctionnel) [175]. Nos résultats, montrant une corrélation entre l'expression d'*ATF6* et l'expression d'*ET-1* sont compatibles avec un rôle du SRE dans la dysfonction endothéliale septique.

3) La corrélation des variations d'expression d'*ATF6* et de *PTPN1*. Des travaux avaient déjà suggéré l'existence d'une association entre PTP1B et SRE. Ainsi, dans un travail mené chez des souris ayant un régime gras, un traitement par inhibiteur du SRE (acide tauroursodeoxycholique) de souris obèses a conduit à la diminution de l'expression de la PTP1B [218]. A l'inverse, l'induction *in vitro* sur myocytes murins de SRE par la tunicamycine a

induit une augmentation de l'expression de la PTP1B [218]. Dans une autre étude, la défaillance myocardique induite par le SRE dans un modèle murin était atténuée chez les souris KO pour le gène codant la PTP1B [219]. Enfin, chez les souris KO pour le gène codant la PTP1B, la tunicamycine n'induisait pas de dysfonction endothéliale, témoignant de l'importance de la PTP1B dans la genèse de la dysfonction endothéliale induite par le SRE [177]. Nos données, qui décrivent pour la première fois un lien entre SRE et PTP1B *in vivo* chez l'Homme, confortent donc ces données expérimentales.

4) La cinétique de l'UPR globalement décroissante au fur et à mesure de l'évolution de la pathologie septique. Il est impossible d'avoir un prélèvement avant l'apparition du SIRS chez des patients admis pour choc septique. Néanmoins, le fait que l'UPR semble progressivement décroître sur les cinq premiers jours d'hospitalisation (de façon significative pour *ATF6* et non significative pour *CHOP* et *HSPA5/GRP78*) témoigne d'une activation importante de cette réponse à la phase précoce du sepsis. Il n'existe pas de travaux décrivant la cinétique des voies de l'UPR à la phase aigüe du sepsis, il est donc difficile de comparer ces résultats à d'autres travaux. Ces données confortent le fait que l'inflammation, situation de stress induisant une augmentation de la synthèse protéique, induit un SRE. La cinétique de l'UPR (témoignant de la persistance de ce SRE) est donc logiquement dépendante de la résolution ou non du tableau inflammatoire. L'évolution du sepsis pris en charge en réanimation va le plus souvent vers la résolution de l'inflammation, ce qui explique probablement la tendance globale de décroissance de l'UPR au cours du temps.

5) L'absence de lien entre insulino-résistance et expression de *PTPN1*, gène codant la PTP1B. Un travail mené dans notre laboratoire sur des modèles de CLP murins a montré que l'inhibition génétique de la PTP1B avait un effet bénéfique sur l'insulino-résistance septique [208]. Nous ne retrouvons pas de lien dans notre travail entre un score d'insulino-résistance, le score HOMA-IR (pour *Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance*), et l'expression de *PTPN1*. Il existe deux travaux décrivant l'utilisation de l'HOMA-IR chez les patients de réanimation, mais les deux études présentent des limites méthodologiques et l'utilisation de l'indice HOMA-IR est controversée chez les patients de réanimation [220,221]. Dans notre travail, les conditions de mesure des niveaux d'insuline à l'aide de l'indice HOMA-IR n'étaient pas normalisées pour le traitement à l'insuline au moment du prélèvement. Cela induit donc un biais majeur car l'insulinémie est incluse dans le calcul du score HOMA-IR. Au vu de la

littérature importante sur le lien entre PTP1B et insulino-résistance et les limites sur le calcul même de cette insulino-résistance dans notre travail, nous devons être prudents et ne pas conclure à l'absence de lien entre l'expression de PTP1B et l'insulinorésistance chez les patients septiques.

Dans la deuxième partie de cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'expression de l'UPR au décours de la CEC et à son lien potentiel avec l'existence de défaillances d'organes persistantes. Les principaux éléments que nous pouvons souligner dans ce travail sont :

1) La confirmation qu'un stimulus inflammatoire active très précocement (dès H2 post-CEC) et de manière prolongée (au-delà de 24h) les trois voies de l'UPR. Ce constat corrobore les conclusions de notre première étude qui avait montré une activation de l'UPR prolongée (plusieurs jours) lors du SIRS septique. Au vu du caractère transitoire du SIRS induit par la CEC nous aurions pu penser que l'UPR commencerait à décroître (voire reviendrait à son expression de base) à H24. Ce n'est pas le constat que nous avons fait, l'UPR semblant persister de façon soutenue y compris 24h après la fin du stimulus inflammatoire. Cela traduit probablement que, malgré l'apparente résolution clinique du SIRS, il persiste une activation des mécanismes de contrôle de la dysfonction cellulaire. Il a été démontré qu'après un SIRS aigu sévère, il pouvait persister un tableau d'inflammation chronique responsable de complications à long terme : immunodépression, cancer, pathologies métaboliques, *etc.* [222,223]. Par analogie, il pourrait être intéressant de voir si certains patients ont une réponse UPR persistante (témoin d'un SRE « chronicisé ») à distance du trigger inflammatoire et si cette UPR persistante est associée à des complications à long terme.

2) Le fait que les patients ayant une défaillance d'organe persistante (hémodynamique et/ou ventilatoire et/ou rénale) ont des taux de GRP78 circulants qui restent inférieurs à leurs niveaux de bases et une réponse UPR globalement plus faible (expression génique moindre) que les patients sans défaillance. Comme évoqué plus haut, la résolution du SRE *via* des chaperonnes chimiques améliore la défaillance d'organe lors des SIRS septique et aseptique [182,183,185,186]. Il semble donc logique que les patients ne revenant pas à leurs niveaux pré-CEC de chaperonnes aient plus de difficultés à corriger leurs défaillances d'organe. Cette moindre synthèse de chaperonnes pourrait être liée à la moindre réponse UPR constatée avec

nos analyses d'expression génique. Ces données sont concordantes avec le travail de Folhen *et al.* qui a montré que l'expression relativement forte d'ARNm de l'UPR (*sXBP1* dans leur étude) dans les urines des patients en post-CEC (témoin d'une réponse UPR rénale forte) était associée à une moindre survenue d'*Acute Kidney Injury* post-opératoire [224]. Nos données, issues d'analyses menées sur du plasma (ELISA) et du sang total (ARNm), sont donc concordantes avec ces précédents travaux. Enfin, nous décrivons pour la première fois l'association entre expression faible de l'UPR et niveaux circulants de GRP78 restant inférieurs au niveau de base. Il serait intéressant de confirmer ce résultat dans un autre modèle de SIRS.

3) L'absence de lien retrouvé entre marqueurs circulants de dysfonction endothéliale (Syndecan-1, VCAM-1) et les niveaux circulants de GRP78. Ces données sont en discordance avec la littérature sur dysfonction endothéliale et SRE et avec les résultats de notre premier travail [174,175,177]. Ces résultats contradictoires s'expliquent probablement par la cinétique différente des marqueurs étudiés (la concentration de GRP78 est diminuée dès H2 post-CEC tandis que les niveaux de VCAM-1 ne varient pas significativement) et par une puissance statistique insuffisante pour trouver un résultat significatif sur ce critère secondaire (la corrélation des variations de GRP78 et de Syndecan-1 a retrouvé par exemple un petit p à 0,053). Ces limites font qu'il est probablement prudent de ne pas conclure à l'absence de lien entre dysfonction endothéliale et SRE *in vivo* lors du SIRS aseptique chez l'Homme. De futurs travaux analysant l'endothélium sous un angle fonctionnel (dilatation médiée au flux, analyse du glycocalyx *in vivo* par GlycoCheck®) pourraient permettre de trouver un lien entre dysfonction endothéliale et intensité de l'UPR.

Les résultats de nos travaux indiquent qu'une réponse UPR forte, permettant la synthèse de chaperonnes, est associée à une moindre défaillance d'organe (en post-CEC) mais qu'une réponse UPR prolongée est, elle, associée à un score de défaillance d'organe qui reste élevé (lors du sepsis). Bien qu'apparemment contradictoires, ces résultats peuvent être en partie expliqués par la physiologie de l'UPR induite par le SRE. En effet, comme décrit dans la partie introductive, l'objectif de l'UPR à la phase aiguë est de résoudre le SRE induit par le processus inflammatoire en activant principalement trois leviers : diminution de la synthèse protéique, augmentation de la dégradation protéique et synthèse de chaperonnes pour le

repliement des protéines trappées dans le RE [162,173]. Mais, en cas d'UPR prolongée (donc de SRE persistant), il existe une activation des voies pro-apoptotiques avec dégradation cellulaire [162,173]. Cette double fonction de l'UPR, liée à l'intensité et à la durée du SRE, peut donc expliquer pourquoi lors d'une phase d'inflammation aiguë (quelques heures), l'UPR semble associée à la moindre défaillance d'organe tandis que cette situation s'inverse en cas de SRE prolongé (plusieurs jours).

Notre travail décrit pour la première fois la cinétique de l'UPR lors du SIRS chez l'Homme et le lien entre défaillance d'organe et intensité de cette UPR. Malgré des résultats intéressants sur le plan physiopathologique, ces études présentent plusieurs limites communes dont il faut tenir compte pour interpréter honnêtement nos résultats :

1) Il s'agit d'études observationnelles physiologiques avec un nombre très limité de patients. Nous avons inclus à chaque fois une population hétérogène : plusieurs types de foyers infectieux dans l'étude 1, plusieurs types de chirurgie (valve et/ou pontage aorto-coronarien) dans l'étude 2. Ceci pourrait être à l'origine de biais liés à une intensité de SRE variable selon le type d'infection ou de chirurgie. En dehors des études prospectives randomisées, il est extrêmement difficile d'établir des liens de causalité chez l'Homme. Ainsi, malgré la concordance de nos observations avec les données obtenues dans des modèles pré-cliniques d'inflammation, nous ne pouvons établir un lien de causalité entre intensité de l'UPR et existence d'une défaillance d'organe chez l'Homme.

2) Nos deux études ont utilisé une technique de PCR quantitative analysant l'expression des gènes sur sang total. Comme certaines des protéines étudiées dans notre travail ne peuvent être mesurées dans le sang sans techniques complexes d'isolement cellulaire, la quantification de l'ARN est apparue comme le meilleur compromis. L'expression de l'ARN sur sang total mesurée à l'aide des tubes Paxgen® est fortement corrélée à l'expression de l'ARN dans les leucocytes circulants, nous pouvons donc conclure que nous avons détecté des variations dans l'expression des gènes des leucocytes [225]. Il est établi que l'UPR joue un rôle crucial dans les cellules immunitaires, notamment sur la différenciation, l'activation leucocytaire, la production d'anticorps et l'expression des cytokines. Il nous a donc semblé pertinent d'étudier l'expression leucocytaire des gènes clés de l'UPR [226,227].

Cependant, nous avons peut-être manqué une variation potentiellement plus importante de l'expression des gènes dans les tissus et organes, comme observée dans les modèles animaux [228–230].

3) Nos protocoles ont analysés l'expression de l'UPR sur 5 jours (étude 1) et sur 24 heures (étude 2). Dans notre premier travail, il est impossible de savoir si les niveaux d'expression observées à J5 (phase finalement encore précoce lors d'un choc septique) correspondent aux niveaux d'expression basals. De même dans le travail 2, on constate que les niveaux d'expression à H24 post-CEC restent très supérieurs aux niveaux d'expression initiaux (voire continuent de croître, *cf. ATF6*). Dans ces deux études, il manque une analyse plus tardive pour étudier le moment où l'UPR revient à son niveau d'expression basal. Notre analyse cinétique des voies de l'UPR, qui était un des objectifs de cette thèse, est donc incomplète et devra être poursuivie dans de futurs travaux étudiant une période de temps plus large.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, malgré des limites méthodologiques réelles, nos résultats montrent une activation des trois voies de l'UPR lors des situations d'inflammation aigüe septique et aseptique et suggèrent un lien entre défaillance d'organe et intensité de l'UPR. L'inhibition du SRE *in vivo* est réalisée *via* des chaperonnes chimiques qui favorisent sa résolution en repliant les protéines : 4BPA ou acide tauroursodeoxycholique. Nous avons rapporté dans la partie introductive que plusieurs travaux concordants menés dans des modèles murins ont montré un lien clair entre inhibition du SRE et pronostic au cours du SIRS septique ou aseptique: augmentation de la perfusion d'organe et de l'oxygénation tissulaire, diminution de l'inflammation et de l'apoptose tissulaire, diminution des défaillances d'organes (à court et long terme), et amélioration de la survie [179–190]. L'ensemble de ces données suggèrent qu'il pourrait être intéressant d'envisager l'inhibition du SRE au cours des situations de SIRS aigus chez l'Homme afin d'améliorer le pronostic de nos patients de réanimation.

Plusieurs travaux ont évalué chez l'Homme l'impact de l'inhibition d'un processus physiopathologique au cours du sepsis : blocage de la réponse inflammatoire (anticorps anti-TNF- α ou anti IL-1 β , anti-TLR4), blocage de la réponse anti-inflammatoire (anticorps anti-IL-1Ra) ou blocage de l'activation endothéliale (antagonistes du facteur d'activation plaquettaire, protéine C activée). Aucune de ces études n'a montré d'efficacité clinique, suggérant qu'il était probablement réducteur d'envisager que l'inhibition d'une voie de signalisation au cours du SIRS pouvait permettre d'améliorer le pronostic des patients [148]. Notre approche consistant à vouloir inhiber une réponse cellulaire au stress pourrait donc sembler en décalage avec la vision moderne de la recherche thérapeutique dans le sepsis. Il est important de noter à ce stade que le terme d'inhibiteur du SRE est parfois à l'origine de confusion car il peut être compris comme étant un traitement bloquant l'UPR et inhibant une fonction physiologique. En fait, les chaperonnes chimiques « inhibitrices du SRE » sont des molécules permettant aux protéines de se replier et sont donc finalement une forme d'UPR « artificielle ». Les « inhibiteurs » du SRE ne sont donc pas des traitements inhibant un

processus physiologique adaptatif (comme pouvaient l'être par exemple les anti-TNF- α) mais des traitements qui miment la réponse physiologique de l'organisme à une situation de stress (ici, la synthèse de chaperonnes). Plutôt qu'inhibiteurs, ces traitements sont finalement plutôt des « résolveurs » du SRE.

Le 4BPA et l'acide tauroursodeoxycholique ont déjà été testés chez l'Homme dans plusieurs indications avec des résultats globalement positifs : amélioration des scores neurologiques des patients ayant une sclérose latérale amyotrophique, plus grande efficacité des traitements antituberculeux, amélioration des fonctions ciliaires des patients ayant une mucoviscidose, diminution de l'encéphalopathie hépatique des patients cirrhotiques [231–234]. Dans l'objectif d'inhiber le SRE, l'acide tauroursodeoxycholique a été testé chez des patients obèses et a montré une diminution significative de l'insulino-résistance de l'ordre de 30% dans le groupe traité [235]. Un travail a également montré qu'il permettait de réduire la dysfonction endothéliale induite par une dose de charge de glucose chez l'Homme [178]. De ces deux molécules, le 4BPA est la seule qui soit déjà utilisée en pratique courante chez l'Homme dans les situations d'hyper-ammoniémie induites par des désordres de cycles de l'urée chez l'enfant. Il possède l'Autorisation de Mise sur le Marché dans cette indication en France.

Plusieurs protocoles de recherches s'intéressant à l'efficacité des inhibiteurs du SRE dans différentes indications (mucoviscidose, asthme, maladie de Parkinson, maladie d'Alzheimer, diabète, amylose cardiaque, ...) sont recensés dans [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov/) (<https://clinicaltrials.gov/>). Il n'existe cependant aucun travail en cours destiné à les évaluer au cours des situations d'inflammation aiguë. Il est actuellement impossible de savoir quelle population de patients inflammatoires pourrait en bénéficier : patients avec défaillance d'organe ? patients avec dysfonction endothéliale marquée ? De plus, des questions se posent sur les modalités d'administration : quelle dose ? à quelle fréquence ? Enfin, sur le plan éthique, il est discutable d'envisager d'emblée l'administration d'une molécule au sein d'une population de patients fragiles admis pour une pathologie engageant le pronostic vital à très court terme.

Pour s'affranchir des limites évoquées au paragraphe précédent, l'alternative à une étude clinique chez le patient pourrait être l'analyse de l'effet du 4BPA dans un modèle de

volontaire sain recevant du LPS. Cette procédure, qui consiste à induire une endotoxémie humaine, est déjà utilisée par des équipes européennes et américaines. Ce modèle consiste en l'injection de quantité infinitésimale de LPS en intra-veineux (de l'ordre du nanogramme : 0,5 à 4-5 ng/kg). Il est le seul qui permet d'étudier une inflammation standardisée chez l'Homme [236–238]. Il est sûr et bien décrit dans la littérature, son utilisation est d'ailleurs croissante [239–241]. Il semble donc pertinent de mettre en place un travail comparant l'administration de 4BPA ou de placebo chez des volontaires sains recevant de l'endotoxine et d'analyser les effets du 4BPA, chaperonne chimique résolvant le SRE, sur plusieurs paramètres : marqueurs de dysfonction endothéliale (VCAM-1, Syndecan-1), vitalité du glycocalyx in vivo par GlycoCheck®, fonction de l'endothélium par analyse de la vasodilatation médiée au flux, fonction cardiaque en échographie transthoracique, cytokines inflammatoires (IL-1 β , TNF- α , IL-6) et anti-inflammatoires (IL-10, IL-4), symptômes cliniques (fièvre, frissons, fréquence cardiaque, pression artérielle, diurèse) et marqueurs biologiques d'intensité du SIRS (lactates, leucocytes, C-reactive protein, créatinine). Si les résultats de ce travail sont encourageants, nous pourrions peut-être envisager un jour le 4BPA comme traitement curatif de la dysfonction d'organe induite par le SIRS.

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

I- Publications

Score SIGAPS au 1^{er} février 2020 : 406.

7 articles originaux en premier ou dernier auteur dans des revues avec Impact Factor > 3 au moment de la publication.

1. Publications dans des périodiques à comité de lecture

1. Articles originaux

Besnier E, Perdrix A, Gillibert A, Selim J, Froëmer B, Ghemired A, Berby B, Rives N, Dureuil B, **Clavier T**, Compère V. Postoperative hunger after outpatient surgery in patients anesthetized with propofol vs sevoflurane: a randomized-controlled trial. *Can J Anaesth* 2020 Jan 29; PMID:31997087

Demailly Z, Brulard G, Selim J, Compère V, Besnier E, **Clavier T**. Gender differences in professional social media use among anaesthesia researchers. *Br J Anaesth* 2020 Jan 24; PMID:31987471

Dépret F, Hoffmann C, Daoud L, Thieffry C, Monplaisir L, Creveaux J, Annane D, Parmentier E, Mathieu D, Wiramus S, Demeure Dlt Latte D, Kpodji A, Textoris J, Robin F, Klouche K, Pontis E, Schnell G, Barbier F, Constantin J-M, **Clavier T**, du Cheyron D, Terzi N, Sauneuf B, Guerot E, Lafon T, Herbland A, Megarbane B, Leclerc T, Mallet V, Pirracchio R, Legrand M. Association between hydroxocobalamin administration and acute kidney injury after smoke inhalation: a multicenter retrospective study. *Crit Care* 2019 Dec 23;23(1):421. PMID:31870461

Clavier T, Grangé S, Pressat-Laffouilhère T, Besnier E, Renet S, Fraineau S, Thiebaut P-A, Richard V, Veber B, Tamion F. Gene Expression of Protein Tyrosine Phosphatase 1B and Endoplasmic Reticulum Stress During Septic Shock. *Front Med* **2019**;6:240. PMID:31737637

Clavier T, Besnier E, Maucotel J, Arabo A, Desrues L, Amki ME, Perzo N, Richard V, Tamion F, Gandolfo P, Dubois M, Castel H, Compère V. Urantide Improves Cardiac Function, Modulates Systemic Cytokine Response and Increases Survival in a Murine Model of Endotoxic Shock. *Shock* **2019** Sep 17; PMID:31568223

Billoir P, **Clavier T**, Guilbert A, Barbay V, Chrétien MH, Fresel M, Abriou C, Girault C, Le Cam Duchez V. Is citrate theophylline adenosine dipyridamole (CTAD) better than citrate to survey unfractionated heparin treatment? Has delayed centrifugation a real impact on this survey? *J Thromb Thrombolysis* **2019** Aug;48(2):277–283. PMID:31098816

Clavier T, Franchina S, Lefevre-Scelles A, Gouin P, Besnier E, Veber B. A Protocol to Set Up Needle-Free Connector with Positive Displacement on Central Venous Catheter in Intensive Care Unit. *J Vis Exp* **2019** Jul 13;(149). PMID:31355799

Besnier E, Boubèche S, **Clavier T**, Popoff B, Dureuil B, Doguet F, Gay A, Veber B, Tamion F, Compère V. Early Positive Fluid Balance is Associated with Mortality In Patients Treated with Venous-Arterial Extra Corporeal Membrane Oxygenation For Cardiogenic Shock: A Retrospective Cohort Study. *Shock* **2019** May 20; PMID:31135704

Clavier T, Ramen J, Dureuil B, Veber B, Hanouz J-L, Dupont H, Lebuffe G, Besnier E, Compère V. Use of the Smartphone App WhatsApp as an E-Learning Method for Medical Residents: Multicenter Controlled Randomized Trial. *JMIR MHealth UHealth* **2019** 09;7(4):e12825. PMID:30964435

Clavier T, Mutel A, Desrues L, Lefevre-Scelles A, Gastaldi G, Amki ME, Dubois M, Melot A, Wurtz V, Curey S, Gérardin E, Proust F, Compère V, Castel H. Association between vasoactive peptide urotensin II in plasma and cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a potential therapeutic target. *J Neurosurg* **2018** Oct 1;1(aop):1–11. [doi: 10.3171/2018.4.JNS172313]

Clavier T, Ferguen M, Gouin P, Gillibert A, Dusenne M, Merle V, Veber B. Impact of MaxZero™ needle-free connector on the incidence of central venous catheter-related infections in surgical intensive care unit. *Aust Crit Care* **2018** Apr 10; PMID:29653801

Besnier E, **Clavier T**, Tonon MC, Pelletier G, Dureuil B, Castel H, Compère V. Anesthetic drugs modulate feeding behavior and hypothalamic expression of the POMC polypeptide precursor and the NPY neuropeptide. *BMC Anesthesiol* **2018** 27;18(1):96. PMID:30053804

Besnier E, **Clavier T**, Tonon M-C, Selim J, Lefevre-Scelles A, Morin F, Tamion F, Dureuil B, Castel H, Compère V. Ketamine and Etomidate Down-regulate the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in an Endotoxemic Mouse Model. *Anesthesiology* **2017** Aug;127(2):347–354. PMID:28542000

Enser M, Moriceau J, Abily J, Damm C, Occhiali E, Besnier E, **Clavier T**, Lefevre-Scelles A, Dureuil B, Compère V. Background noise lowers the performance of anaesthesiology residents' clinical reasoning when measured by script concordance: A randomised crossover volunteer study. *Eur J Anaesthesiol* **2017** Jul;34(7):464–470. PMID:28394819

El Amki M, Dubois M, Lefevre-Scelles A, Magne N, Roussel M, **Clavier T**, Guichet P-O, Gérardin E, Compère V, Castel H. Long-Lasting Cerebral Vasospasm, Microthrombosis, Apoptosis and Paravascular Alterations Associated with Neurological Deficits in a Mouse Model of Subarachnoid Hemorrhage. *Mol Neurobiol* **2017** Apr 28; PMID:28455691

Clavier T, Besnier E, Lefevre-Scelles A, Lanfray D, Masmoudi O, Pelletier G, Castel H, Tonon M-C, Compère V. Increased Hypothalamic Levels of Endozepines, Endogenous Ligands of Benzodiazepine Receptors, in a Rat Model of Sepsis. *Shock* **2016** Jan 8; PMID:26796573

Clavier T, Tonon M-C, Foutel A, Besnier E, Lefevre-Scelles A, Morin F, Gandolfo P, Tuech J-J, Quillard M, Veber B, Dureuil B, Castel H, Compère V. Increased plasma levels of endozepines, endogenous ligands of benzodiazepine receptors, during systemic inflammation: a prospective observational study. *Crit Care* **2014**;18(6):633. PMID:25407756

Clavier T, Gouin P, Frebourg N, Rey N, Royon V, Bergis A, Hobeika S, Dureuil B, Veber B. Incidence of anaerobic bacteria in patients with suspected pneumonia in surgical intensive care unit. *Minerva Anesthesiol* **2014** Jan 29; PMID:24472750

Royon V, Guitard P-G, Abriou C, Frebourg N, Menard J-F, **Clavier T**, Dureuil B, Veber B. L'hypothermie à l'admission augmente le risque d'infection des contusions pulmonaires chez les patients polytraumatisés sous ventilation invasive. *Ann Fr Anesth Réanimation* 2012 Nov;31(11):870–875. [doi: 10.1016/j.annfar.2012.08.014]

2. Revues de la littérature

Besnier E, **Clavier T**, Compere V. The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and Anesthetics: A Review. *Anesth Analg* 2017;124(4):1181–1189. PMID:27984246

El Amki M, **Clavier T**, Perzo N, Bernard R, Guichet P-O, Castel H. Hypothalamic, thalamic and hippocampal lesions in the mouse MCAO model: Potential involvement of deep cerebral arteries? *J Neurosci Methods* 2015 Oct 30;254:80–85. PMID:26213218

Besnier E, **Clavier T**, Castel H, Gandolfo P, Morin F, Tonon M-C, Marguerite C, Veber B, Dureuil B, Compère V. Modulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien par l'utilisation des agents hypnotiques dans le contexte chirurgical. *Ann Fr Anesth Réanimation* 2014 Apr;33(4):256–265. [doi: 10.1016/j.annfar.2014.01.022]

3. Lettres à la rédaction, mini-revues et case reports

Leprêtre P, **Clavier T**, Ménard A-L, Grange S, Girault C, Boyer D. Rescue stem cell allograft in intensive care unit patients during septic shock with multi-organ failure. *J Crit Care* 2019 Jul 2;54:122–124. PMID:31442841

Elie T, **Clavier T**, Huet E, Bejar S, Veber B. Emphysème sous-cutané compliquant un pneumopéritoine post-traumatique : rare et trompeur. *Presse Medicale* 2018 May;47(5):482–483. PMID:29580907

Gilard V, **Clavier T**, Proust F, Fréger P, Derrey S. Une cause rare d'épanchement pleural. *Rev Med Interne* 2016 Apr;37(4):298–299. PMID:26948270

Clavier T, Hardy J-B, Devellenne C, Wood G, Dureuil B, Veber B. Anomalous origin of the left coronary artery from the pulmonary artery presenting as sudden death in a young woman. *Am J Respir Crit Care Med* 2013 Jun 15;187(12):1394–1395. PMID:23767909

Bouwyn J-P, **Clavier T**, Eraldi J-P, Bougerol F, Rigaud J-P, Auriant I, Devos N. Diffuse digestive bezoar: a rare and severe complication of enteral nutrition in the intensive care unit (ICU). *Intensive Care Med* 2012 Apr;38(4):730–731. PMID:22147115

Clavier T, Compère V, Hibon R, Hamou-Plotkine L, Dureuil B. Hypertrophie de la base de langue et intubation difficile non prévue en urgence. *Ann Fr Anesth Réanimation* 2011 Apr;30(4):375–376. [doi: 10.1016/j.annfar.2011.01.005]

2. Ouvrages

Clavier T, Delile E, Coquerel D, Besnier E, Tamion F. Endothélium vasculaire : un nouvel organe. Traité de Réanimation, 4^e édition. Editions Elsevier. [Texte envoyé à l'éditeur, édition en cours]

Clavier T, Devos N, Veber B. « Physiopathologie de la ventilation mécanique », in Martin C, Riou B, Vallet B (dir.), *Traité de physiologie humaine appliquée*. Editions Arnette. Paris, 2017, p281-286.

Clavier T, Veber B. « Abscès et empyèmes cérébraux », « Pneumopathie aigüe communautaire », « Pneumopathie acquise sous ventilation mécanique », « Infections liées aux cathéters », « Péritonites communautaires et post-opératoires », « Infections urinaires », in A. Bouglé, J. Duranteau, J.P. Mira (dir.), *Le livre de l'interne en réanimation*. Médecine-Sciences Publications, Lavoisier. Cachan, 2014, p 105-137.

Clavier T, Gouin P, Veber B. « Péritonites communautaires », in Charbonneau P, Wolff M (dir.), *Infectiologie en réanimation*. Springer-Verlag France, Paris, 2013, p 169-184.

3. Actes de congrès

Clavier T, Lefevre-Scelles A, Veber B. Pneumopathie acquise en réanimation: que faut-il chercher et traiter en dehors de l'infection bactérienne ? *Communications Scientifiques MAPAR 2015*. Editions MAPAR-Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre (Val-de-Marne), 2015, p 267-276.

Clavier T, Lefevre-Scelles A, Veber B. Infections à levures. Conférence d'actualisation SFAR présentée en septembre 2014 lors du congrès de la Société Française d'Anesthésie-Réanimation (SFAR).

Lefevre-Scelles A, **Clavier T**, Veber B. Evaluation et prophylaxie anti-infectieuses en chirurgie prothétique. *Communications Scientifiques MAPAR 2014*. Editions MAPAR-Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre (Val-de-Marne), 2014, p 109-118.

Rey N, **Clavier T**, Veber B. Infections du site opératoire : une prévention multidisciplinaire, le rôle de l'anesthésiste. *Communications Scientifiques MAPAR 2011*. Editions MAPAR-Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre (Val-de-Marne), 2011, p 463-472.

II- Communications affichées en 1^{er} auteur

Clavier T, Popoff B, Dureuil B, Besnier E, Veber B. (**Septembre 2019**) Impact of hyperoxemia on mortality during septic shock: retrospective study on the MIMIC-III database. Congrès annuel de la *European Society of Intensive Care Medicine* (ESICM), Berlin, Allemagne.

Clavier T, Grangé S, Pressat-Laffouilhère T, Thiebaut PA, Besnier E, Renet S, Richard V, Veber B, Tamion F. (**Septembre 2019**) Expression génique de la protéine tyrosine phosphatase 1B au cours du choc septique chez l'homme. Congrès annuel de la *Société Française d'Anesthésie-Réanimation* (SFAR), Paris, France.

Clavier T, Thiebaut P.A, Renet S, Pressat-Laffouilhère T, Grangé S, Richard V, Veber B Tamion F. (**Janvier 2019**) Expression des gènes du Stress du Réticulum Endoplasmique au cours du choc septique. Congrès annuel de la *Société de Réanimation de Langue Française* (SRLF) Paris, France.

Clavier T, Cheurfa C, Hedjoudje A, Compère V, Dureuil B, Veber B. (**Octobre 2018**) Antibiotic Therapy without Beta-Lactams is Associated with Increased Mortality during Septic Shock. Congrès annuel de l'*American Society of Anesthesiology (ASA)*, San Francisco, USA.

Clavier T, Thiebaut PA, Renet S, Pressat-Laffouilhère T, Grangé S; Richard V, Tamion F, Veber B. (**Septembre 2018**) Expression des gènes du Stress du Réticulum Endoplasmique au cours du choc septique chez l'Homme. Congrès annuel de la *Société Française d'Anesthésie-Réanimation (SFAR)*, Paris, France.

Clavier T, Ferguen M, Dusenne M, Gilibert A, Gouin P, Merle V, Dureuil B, Veber B. (**Septembre 2017**) Effets de l'utilisation de valves MaxZero® sur l'incidence des infections de cathéters veineux centraux en réanimation. Congrès annuel de la *Société Française d'Anesthésie-Réanimation (SFAR)*, Paris, France.

Clavier T, Desrues L, Gastaldi G, Dubois M, Compère V, Castel H. (**Juin 2017**). Vasoactive peptide urotensin II in plasma is associated with cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage and constitutes a potential therapeutic target. Congrès annuel de l'*European Society of Anesthesiology (ESA)*, Genève, Suisse.

Clavier T, Besnier E, Desrues L, Compère V, Tamion F, Castel H. (**Juin 2017**). Urotensin II system as a potential therapeutic target in septic shock: Human and experimental studies. *Congrès annuel de l'European Society of Anesthesiology (ESA)*, Genève, Suisse.

Clavier T, Desrues L, Cerdan A, El Amki M, Besnier E, Tamion F, Dureuil B, Veber B, Compère V, Castel H. (**Septembre 2014**). Cinétique du taux plasmatique d'urotensine II chez des patients en choc septique. Congrès annuel de la *Société Française d'Anesthésie-Réanimation (SFAR)*, Paris, France.

Clavier T, El Amki M, Desrues L, Perzo N, Guichet P-O, Tonon M-C, Gandolfo P, Morin F, Dureuil B, Veber B, Compère V, Castel H (**Juin 2014**). Etude du rôle du système urotensinergique au cours du sepsis. 3^{ème} journée scientifique de l'*Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale (IRIB)*, Caugé, France.

Clavier T, P. Gouin, J. Glenisson, N. Rey, N. Frebourg, B. Dureuil, B. Veber (**Septembre 2012**). Incidence des bactéries anaérobies dans les prélèvements bronchiques distaux protégés chez

les patients de réanimation chirurgicale suspects de pneumopathie. Congrès annuel de la *Société Française d'Anesthésie-Réanimation* (SFAR), Paris, France.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. DEfinitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. the accp/sccm consensus conference committee. american college of chest physicians/society of critical care medicine. *Chest* 1992;101:1644–55. <https://doi.org/10.1378/chest.101.6.1644>.
- [2] 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;315:801–10. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287>.
- [3] Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2013;369:840–51. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1208623>.
- [4] Vincent J-L, Jones G, David S, Olariu E, Cadwell KK. Frequency and mortality of septic shock in Europe and North America: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care Lond Engl* 2019;23:196. <https://doi.org/10.1186/s13054-019-2478-6>.
- [5] Stevenson EK, Rubenstein AR, Radin GT, Wiener RS, Walkey AJ. Two decades of mortality trends among patients with severe sepsis: a comparative meta-analysis*. *Crit Care Med* 2014;42:625–31. <https://doi.org/10.1097/CCM.000000000000026>.
- [6] Shankar-Hari M, Harrison DA, Rubenfeld GD, Rowan K. Epidemiology of sepsis and septic shock in critical care units: comparison between sepsis-2 and sepsis-3 populations using a national critical care database. *Br J Anaesth* 2017;119:626–36. <https://doi.org/10.1093/bja/aex234>.
- [7] Burchardi H, Schneider H. Economic aspects of severe sepsis: a review of intensive care unit costs, cost of illness and cost effectiveness of therapy. *Pharmacoeconomics* 2004;22:793–813. <https://doi.org/10.2165/00019053-200422120-00003>.
- [8] Reinhart K, Daniels R, Kisson N, Machado FR, Schachter RD, Finfer S. Recognizing Sepsis as a Global Health Priority - A WHO Resolution. *N Engl J Med* 2017;377:414–7. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1707170>.
- [9] Huang SJ, Nalos M, McLean AS. Is early ventricular dysfunction or dilatation associated with lower mortality rate in adult severe sepsis and septic shock? A meta-analysis. *Crit Care Lond Engl* 2013;17:R96. <https://doi.org/10.1186/cc12741>.
- [10] Ehrman RR, Sullivan AN, Favot MJ, Sherwin RL, Reynolds CA, Abidov A, et al. Pathophysiology, echocardiographic evaluation, biomarker findings, and prognostic implications of septic cardiomyopathy: a review of the literature. *Crit Care Lond Engl* 2018;22:112. <https://doi.org/10.1186/s13054-018-2043-8>.

- [11] Boissier F, Razazi K, Seemann A, Bedet A, Thille AW, de Prost N, et al. Left ventricular systolic dysfunction during septic shock: the role of loading conditions. *Intensive Care Med* 2017;43:633–42. <https://doi.org/10.1007/s00134-017-4698-z>.
- [12] Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, Weaver J, Martin DP, Neff M, et al. Incidence and outcomes of acute lung injury. *N Engl J Med* 2005;353:1685–93. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa050333>.
- [13] Sheu C-C, Gong MN, Zhai R, Chen F, Bajwa EK, Clardy PF, et al. Clinical characteristics and outcomes of sepsis-related vs non-sepsis-related ARDS. *Chest* 2010;138:559–67. <https://doi.org/10.1378/chest.09-2933>.
- [14] Reilly JP, Wang F, Jones TK, Palakshappa JA, Anderson BJ, Shashaty MGS, et al. Plasma angiopoietin-2 as a potential causal marker in sepsis-associated ARDS development: evidence from Mendelian randomization and mediation analysis. *Intensive Care Med* 2018;44:1849–58. <https://doi.org/10.1007/s00134-018-5328-0>.
- [15] Bastarache JA, Ware LB, Bernard GR. The role of the coagulation cascade in the continuum of sepsis and acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Semin Respir Crit Care Med* 2006;27:365–76. <https://doi.org/10.1055/s-2006-948290>.
- [16] Caraballo C, Jaimes F. Organ Dysfunction in Sepsis: An Ominous Trajectory From Infection To Death. *Yale J Biol Med* 2019;92:629–40.
- [17] Poukkanen M, Vaara ST, Pettilä V, Kaukonen K-M, Korhonen A-M, Hovilehto S, et al. Acute kidney injury in patients with severe sepsis in Finnish Intensive Care Units. *Acta Anaesthesiol Scand* 2013;57:863–72. <https://doi.org/10.1111/aas.12133>.
- [18] Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001;29:1303–10. <https://doi.org/10.1097/00003246-200107000-00002>.
- [19] Bellomo R, Kellum JA, Ronco C, Wald R, Martensson J, Maiden M, et al. Acute kidney injury in sepsis. *Intensive Care Med* 2017;43:816–28. <https://doi.org/10.1007/s00134-017-4755-7>.
- [20] Prowle JR, Molan MP, Hornsey E, Bellomo R. Measurement of renal blood flow by phase-contrast magnetic resonance imaging during septic acute kidney injury: a pilot investigation. *Crit Care Med* 2012;40:1768–76. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318246bd85>.
- [21] Dellepiane S, Marengo M, Cantaluppi V. Detrimental cross-talk between sepsis and acute kidney injury: new pathogenic mechanisms, early biomarkers and targeted therapies. *Crit Care Lond Engl* 2016;20:61. <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1219-3>.
- [22] Gofton TE, Young GB. Sepsis-associated encephalopathy. *Nat Rev Neurol* 2012;8:557–66. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.183>.

- [23] Papadopoulos MC, Lamb FJ, Moss RF, Davies DC, Tighe D, Bennett ED. Faecal peritonitis causes oedema and neuronal injury in pig cerebral cortex. *Clin Sci Lond Engl* 1979;96:461–6.
- [24] Pfister D, Siegemund M, Dell-Kuster S, Smielewski P, Rüegg S, Strebel SP, et al. Cerebral perfusion in sepsis-associated delirium. *Crit Care Lond Engl* 2008;12:R63. <https://doi.org/10.1186/cc6891>.
- [25] Woźnica EA, Inglot M, Woźnica RK, Łysenko L. Liver dysfunction in sepsis. *Adv Clin Exp Med Off Organ Wroclaw Med Univ* 2018;27:547–51. <https://doi.org/10.17219/acem/68363>.
- [26] Kobashi H, Toshimori J, Yamamoto K. Sepsis-associated liver injury: Incidence, classification and the clinical significance. *Hepatol Res Off J Jpn Soc Hepatol* 2013;43:255–66. <https://doi.org/10.1111/j.1872-034X.2012.01069.x>.
- [27] Van den Broecke A, Van Coile L, Decruyenaere A, Colpaert K, Benoit D, Van Vlierberghe H, et al. Epidemiology, causes, evolution and outcome in a single-center cohort of 1116 critically ill patients with hypoxic hepatitis. *Ann Intensive Care* 2018;8:15. <https://doi.org/10.1186/s13613-018-0356-z>.
- [28] Jaffee W, Hodgins S, McGee WT. Tissue Edema, Fluid Balance, and Patient Outcomes in Severe Sepsis: An Organ Systems Review. *J Intensive Care Med* 2018;33:502–9. <https://doi.org/10.1177/0885066617742832>.
- [29] Paparella D, Yau TM, Young E. Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update. *Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg* 2002;21:232–44. [https://doi.org/10.1016/s1010-7940\(01\)01099-5](https://doi.org/10.1016/s1010-7940(01)01099-5).
- [30] Esper SA, Subramaniam K, Tanaka KA. Pathophysiology of Cardiopulmonary Bypass: Current Strategies for the Prevention and Treatment of Anemia, Coagulopathy, and Organ Dysfunction. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth* 2014;18:161–76. <https://doi.org/10.1177/1089253214532375>.
- [31] Laffey JG, Boylan JF, Cheng DCH. The systemic inflammatory response to cardiac surgery: implications for the anesthesiologist. *Anesthesiology* 2002;97:215–52. <https://doi.org/10.1097/00000542-200207000-00030>.
- [32] MacCallum NS, Finney SJ, Gordon SE, Quinlan GJ, Evans TW. Modified criteria for the systemic inflammatory response syndrome improves their utility following cardiac surgery. *Chest* 2014;145:1197–203. <https://doi.org/10.1378/chest.13-1023>.
- [33] Smiley RM, Vulliemoz Y. Cardiac surgery causes desensitization of the beta-adrenergic receptor system of human lymphocytes. *Anesth Analg* 1992;74:212–8. <https://doi.org/10.1213/00000539-199202000-00007>.
- [34] Royster RL. Myocardial dysfunction following cardiopulmonary bypass: recovery patterns, predictors of inotropic need, theoretical concepts of inotropic administration. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1993;7:19–25. [https://doi.org/10.1016/1053-0770\(93\)90093-z](https://doi.org/10.1016/1053-0770(93)90093-z).

- [35] Maslow AD, Regan MM, Panzica P, Heindel S, Mashikian J, Comunale ME. Precardiopulmonary bypass right ventricular function is associated with poor outcome after coronary artery bypass grafting in patients with severe left ventricular systolic dysfunction. *Anesth Analg* 2002;95:1507–18, table of contents. <https://doi.org/10.1097/00000539-200212000-00009>.
- [36] Stephens RS, Shah AS, Whitman GJR. Lung injury and acute respiratory distress syndrome after cardiac surgery. *Ann Thorac Surg* 2013;95:1122–9. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2012.10.024>.
- [37] Hobson CE, Yavas S, Segal MS, Schold JD, Tribble CG, Layon AJ, et al. Acute kidney injury is associated with increased long-term mortality after cardiothoracic surgery. *Circulation* 2009;119:2444–53. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.800011>.
- [38] Vives M, Wijeyesundera D, Marczin N, Monedero P, Rao V. Cardiac surgery-associated acute kidney injury. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2014;18:637–45. <https://doi.org/10.1093/icvts/ivu014>.
- [39] Wang Y, Bellomo R. Cardiac surgery-associated acute kidney injury: risk factors, pathophysiology and treatment. *Nat Rev Nephrol* 2017;13:697–711. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2017.119>.
- [40] Ortega-Loubon C, Fernández-Molina M, Carrascal-Hinojal Y, Fulquet-Carreras E. Cardiac surgery-associated acute kidney injury. *Ann Card Anaesth* 2016;19:687–98. <https://doi.org/10.4103/0971-9784.191578>.
- [41] van Dijk D, Keizer AM, Diephuis JC, Durand C, Vos LJ, Hijman R. Neurocognitive dysfunction after coronary artery bypass surgery: a systematic review. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000;120:632–9. <https://doi.org/10.1067/mtc.2000.108901>.
- [42] Selnes OA, Gottesman RF, Grega MA, Baumgartner WA, Zeger SL, McKhann GM. Cognitive and neurologic outcomes after coronary-artery bypass surgery. *N Engl J Med* 2012;366:250–7. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1100109>.
- [43] Hogue CW, Sundt T, Barzilai B, Schecthman KB, Dávila-Román VG. Cardiac and neurologic complications identify risks for mortality for both men and women undergoing coronary artery bypass graft surgery. *Anesthesiology* 2001;95:1074–8. <https://doi.org/10.1097/00000542-200111000-00008>.
- [44] Tarakji KG, Sabik JF, Bhudia SK, Batizy LH, Blackstone EH. Temporal onset, risk factors, and outcomes associated with stroke after coronary artery bypass grafting. *JAMA* 2011;305:381–90. <https://doi.org/10.1001/jama.2011.37>.
- [45] Adamik B, Kübler A, Gozdzik A, Gozdzik W. Prolonged Cardiopulmonary Bypass is a Risk Factor for Intestinal Ischaemic Damage and Endotoxaemia. *Heart Lung Circ* 2017;26:717–23. <https://doi.org/10.1016/j.hlc.2016.10.012>.
- [46] Sabzi F, Faraji R. Liver Function Tests Following Open Cardiac Surgery. *J Cardiovasc Thorac Res* 2015;7:49–54. <https://doi.org/10.15171/jcvtr.2015.11>.

- [47] An Y, Xiao Y-B, Zhong Q-J. Hyperbilirubinemia after extracorporeal circulation surgery: a recent and prospective study. *World J Gastroenterol* 2006;12:6722–6. <https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i41.6722>.
- [48] Thorén A, Elam M, Ricksten SE. Jejunal mucosal perfusion is well maintained during mild hypothermic cardiopulmonary bypass in humans. *Anesth Analg* 2001;92:5–11. <https://doi.org/10.1097/0000539-200101000-00003>.
- [49] Delano MJ, Ward PA. The immune system's role in sepsis progression, resolution, and long-term outcome. *Immunol Rev* 2016;274:330–53. <https://doi.org/10.1111/imr.12499>.
- [50] Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol* 2018;18:134–47. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.105>.
- [51] Zucoloto AZ, Jenne CN. Platelet-Neutrophil Interplay: Insights Into Neutrophil Extracellular Trap (NET)-Driven Coagulation in Infection. *Front Cardiovasc Med* 2019;6:85. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00085>.
- [52] 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;129:1357–67. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-09-741298>.
- [53] Wang Y, Luo L, Braun OÖ, Westman J, Madhi R, Herwald H, et al. Neutrophil extracellular trap-microparticle complexes enhance thrombin generation via the intrinsic pathway of coagulation in mice. *Sci Rep* 2018;8:4020. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22156-5>.
- [54] Granger DN, Kvietys PR. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol* 2015;6:524–51. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.020>.
- [55] Schulte W, Bernhagen J, rgen, Bucala R. Cytokines in Sepsis: Potent Immunoregulators and Potential Therapeutic Targets—An Updated View. *Mediators Inflamm* 2013;2013. <https://doi.org/10.1155/2013/165974>.
- [56] Liu SF, Malik AB. NF-kappa B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;290:L622–45. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00477.2005>.
- [57] Blackwell TS, Christman JW. Sepsis and cytokines: current status. *Br J Anaesth* 1996;77:110–7.
- [58] Groeneveld PH, Kwappenberg KM, Langermans JA, Nibbering PH, Curtis L. Relation between pro- and anti-inflammatory cytokines and the production of nitric oxide (NO) in severe sepsis. *Cytokine* 1997;9:138–42. <https://doi.org/10.1006/cyto.1996.0147>.
- [59] Backer DD, Donadello K, Taccone FS, Ospina-Tascon G, Salgado D, Vincent J-L. Microcirculatory alterations: potential mechanisms and implications for therapy. *Ann Intensive Care* 2011;1:27. <https://doi.org/10.1186/2110-5820-1-27>.

- [60] Hauser GJ, Ben-Ari J, Colvin MP, Dalton HJ, Hertzog JH, Bearb M, et al. Interleukin-6 levels in serum and lung lavage fluid of children undergoing open heart surgery correlate with postoperative morbidity. *Intensive Care Med* 1998;24:481–6.
- [61] Bosmann M, Ward PA. The inflammatory response in sepsis. *Trends Immunol* 2013;34:129–36. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.09.004>.
- [62] Ward PA. The harmful role of c5a on innate immunity in sepsis. *J Innate Immun* 2010;2:439–45. <https://doi.org/10.1159/000317194>.
- [63] Huber-Lang MS, Riedeman NC, Sarma JV, Younkin EM, McGuire SR, Laudes IJ, et al. Protection of innate immunity by C5aR antagonist in septic mice. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2002;16:1567–74. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0209com>.
- [64] Huber-Lang MS, Sarma JV, McGuire SR, Lu KT, Guo RF, Padgaonkar VA, et al. Protective effects of anti-C5a peptide antibodies in experimental sepsis. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2001;15:568–70. <https://doi.org/10.1096/fj.00-0653fje>.
- [65] Chai PJ, Nassar R, Oakeley AE, Craig DM, Quick G, Jagers J, et al. Soluble complement receptor-1 protects heart, lung, and cardiac myofilament function from cardiopulmonary bypass damage. *Circulation* 2000;101:541–6. <https://doi.org/10.1161/01.cir.101.5.541>.
- [66] Tofukuji M, Stahl GL, Agah A, Metais C, Simons M, Sellke FW. Anti-C5a monoclonal antibody reduces cardiopulmonary bypass and cardioplegia-induced coronary endothelial dysfunction. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;116:1060–8. [https://doi.org/10.1016/S0022-5223\(98\)70059-5](https://doi.org/10.1016/S0022-5223(98)70059-5).
- [67] Dixon B. The role of microvascular thrombosis in sepsis. *Anaesth Intensive Care* 2004;32:619–29. <https://doi.org/10.1177/0310057X0403200502>.
- [68] Levi M, van der Poll T. Coagulation and sepsis. *Thromb Res* 2017;149:38–44. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2016.11.007>.
- [69] Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 2000;407:258–64. <https://doi.org/10.1038/35025229>.
- [70] Ranieri VM, Thompson BT, Barie PS, Dhainaut J-F, Douglas IS, Finfer S, et al. Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock. *N Engl J Med* 2012;366:2055–64. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1202290>.
- [71] Warren BL, Eid A, Singer P, Pillay SS, Carl P, Novak I, et al. Caring for the critically ill patient. High-dose antithrombin III in severe sepsis: a randomized controlled trial. *JAMA* 2001;286:1869–78. <https://doi.org/10.1001/jama.286.15.1869>.
- [72] Gomez HG, Gonzalez SM, Londoño JM, Hoyos NA, Niño CD, Leon AL, et al. Immunological characterization of compensatory anti-inflammatory response syndrome in patients with severe sepsis: a longitudinal study*. *Crit Care Med* 2014;42:771–80. <https://doi.org/10.1097/CCM.000000000000100>.

- [73] Venet F, Monneret G. Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression. *Nat Rev Nephrol* 2018;14:121–37. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2017.165>.
- [74] Scumpia PO, Moldawer LL. Biology of interleukin-10 and its regulatory roles in sepsis syndromes. *Crit Care Med* 2005;33:S468-471.
- [75] Unsinger J, McGlynn M, Kasten KR, Hoekzema AS, Watanabe E, Muenzer JT, et al. IL-7 promotes T cell viability, trafficking, and functionality and improves survival in sepsis. *J Immunol Baltim Md* 1950 2010;184:3768–79. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903151>.
- [76] Delwarde B, Peronnet E, Venet F, Cerrato E, Meunier B, Mouillaux J, et al. Low Interleukin-7 Receptor Messenger RNA Expression Is Independently Associated With Day 28 Mortality in Septic Shock Patients. *Crit Care Med* 2018;46:1739–46. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000003281>.
- [77] Francois B, Jeannet R, Daix T, Walton AH, Shotwell MS, Unsinger J, et al. Interleukin-7 restores lymphocytes in septic shock: the IRIS-7 randomized clinical trial. *JCI Insight* 2018;3. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.98960>.
- [78] Rosas-Ballina M, Olofsson PS, Ochani M, Valdés-Ferrer SI, Levine YA, Reardon C, et al. Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. *Science* 2011;334:98–101. <https://doi.org/10.1126/science.1209985>.
- [79] Komegae EN, Farmer DGS, Brooks VL, McKinley MJ, McAllen RM, Martelli D. Vagal afferent activation suppresses systemic inflammation via the splanchnic anti-inflammatory pathway. *Brain Behav Immun* 2018;73:441–9. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.06.005>.
- [80] Hotchkiss RS, Nicholson DW. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol* 2006;6:813–22. <https://doi.org/10.1038/nri1943>.
- [81] Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Schmiege RE, Hui JJ, Chang KC, et al. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol Baltim Md* 1950 2001;166:6952–63. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.11.6952>.
- [82] Jensen IJ, Sjaastad FV, Griffith TS, Badovinac VP. Sepsis-Induced T Cell Immunoparalysis: The Ins and Outs of Impaired T Cell Immunity. *J Immunol Baltim Md* 1950 2018;200:1543–53. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701618>.
- [83] Shankar-Hari M, Fear D, Lavender P, Mare T, Beale R, Swanson C, et al. Activation-Associated Accelerated Apoptosis of Memory B Cells in Critically Ill Patients With Sepsis. *Crit Care Med* 2017;45:875–82. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000002380>.
- [84] Drewry AM, Samra N, Skrupky LP, Fuller BM, Compton SM, Hotchkiss RS. Persistent lymphopenia after diagnosis of sepsis predicts mortality. *Shock Augusta Ga* 2014;42:383–91. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000234>.

- [85] van Vught LA, Klein Klouwenberg PMC, Spitoni C, Scicluna BP, Wiewel MA, Horn J, et al. Incidence, Risk Factors, and Attributable Mortality of Secondary Infections in the Intensive Care Unit After Admission for Sepsis. *JAMA* 2016;315:1469–79. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.2691>.
- [86] Opal SM, Fisher CJ, Dhainaut JF, Vincent JL, Brase R, Lowry SF, et al. Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. The Interleukin-1 Receptor Antagonist Sepsis Investigator Group. *Crit Care Med* 1997;25:1115–24. <https://doi.org/10.1097/00003246-199707000-00010>.
- [87] Abraham E, Wunderink R, Silverman H, Perl TM, Nasraway S, Levy H, et al. Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor alpha in patients with sepsis syndrome. A randomized, controlled, double-blind, multicenter clinical trial. TNF-alpha MAb Sepsis Study Group. *JAMA* 1995;273:934–41.
- [88] Abraham E, Anzueto A, Gutierrez G, Tessler S, San Pedro G, Wunderink R, et al. Double-blind randomised controlled trial of monoclonal antibody to human tumour necrosis factor in treatment of septic shock. NORASEPT II Study Group. *Lancet Lond Engl* 1998;351:929–33.
- [89] Opal SM, Laterre P-F, Francois B, LaRosa SP, Angus DC, Mira J-P, et al. Effect of eritoran, an antagonist of MD2-TLR4, on mortality in patients with severe sepsis: the ACCESS randomized trial. *JAMA* 2013;309:1154–62. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.2194>.
- [90] Vardon-Boune F, Ruiz S, Gratacap M-P, Garcia C, Payrastre B, Minville V. Platelets Are Critical Key Players in Sepsis. *Int J Mol Sci* 2019;20. <https://doi.org/10.3390/ijms20143494>.
- [91] de Stoppelaar SF, van 't Veer C, van der Poll T. The role of platelets in sepsis. *Thromb Haemost* 2014;112:666–77. <https://doi.org/10.1160/TH14-02-0126>.
- [92] Zimmerman GA. Two by two: the pairings of P-selectin and P-selectin glycoprotein ligand 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:10023–4. <https://doi.org/10.1073/pnas.191367898>.
- [93] Ranucci M, Pistuddi V, Di Dedda U, Menicanti L, De Vincentiis C, Baryshnikova E. Platelet function after cardiac surgery and its association with severe postoperative bleeding: the PLATFORM study. *Platelets* 2019;30:908–14. <https://doi.org/10.1080/09537104.2018.1535706>.
- [94] Murase M, Nakayama Y, Sessler DI, Mukai N, Ogawa S, Nakajima Y. Changes in platelet Bax levels contribute to impaired platelet response to thrombin after cardiopulmonary bypass: prospective observational clinical and laboratory investigations. *Br J Anaesth* 2017;119:1118–26. <https://doi.org/10.1093/bja/aex349>.
- [95] Mukai N, Nakayama Y, Ishi S, Ogawa S, Maeda S, Anada N, et al. Changes in MicroRNA Expression Level of Circulating Platelets Contribute to Platelet Defect After Cardiopulmonary Bypass. *Crit Care Med* 2018;46:e761–7. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000003197>.

- [96] Rinder CS, Gaal D, Student LA, Smith BR. Platelet-leukocyte activation and modulation of adhesion receptors in pediatric patients with congenital heart disease undergoing cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994;107:280–8.
- [97] Bateman RM, Sharpe MD, Singer M, Ellis CG. The Effect of Sepsis on the Erythrocyte. *Int J Mol Sci* 2017;18. <https://doi.org/10.3390/ijms18091932>.
- [98] Minasyan HA. Erythrocyte and leukocyte: two partners in bacteria killing. *Int Rev Immunol* 2014;33:490–7. <https://doi.org/10.3109/08830185.2014.956359>.
- [99] Morariu AM, Gu YJ, Huet RCGG, Siemons WA, Rakhorst G, Oeveren WV. Red blood cell aggregation during cardiopulmonary bypass: a pathogenic cofactor in endothelial cell activation? *Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg* 2004;26:939–46. <https://doi.org/10.1016/j.ejcts.2004.06.010>.
- [100] Pries AR, Kuebler WM. Normal endothelium. *Handb Exp Pharmacol* 2006:1–40.
- [101] Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 2012;33:829–37, 837a–837d. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>.
- [102] Cinelli MA, Do HT, Miley GP, Silverman RB. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. *Med Res Rev* 2020;40:158–89. <https://doi.org/10.1002/med.21599>.
- [103] Fulton DJR. Transcriptional and Posttranslational Regulation of eNOS in the Endothelium. *Adv Pharmacol San Diego Calif* 2016;77:29–64. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2016.04.001>.
- [104] Broman MT, Kouklis P, Gao X, Ramchandran R, Neamu RF, Minshall RD, et al. Cdc42 regulates adherens junction stability and endothelial permeability by inducing alpha-catenin interaction with the vascular endothelial cadherin complex. *Circ Res* 2006;98:73–80. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000198387.44395.e9>.
- [105] Söhl G, Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res* 2004;62:228–32. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2003.11.013>.
- [106] Dejana E. Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:261–70. <https://doi.org/10.1038/nrm1357>.
- [107] Perez-Moreno M, Fuchs E. Catenins: keeping cells from getting their signals crossed. *Dev Cell* 2006;11:601–12. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.10.010>.
- [108] Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MAMJ, oude Egbrink MGA. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch* 2007;454:345–59. <https://doi.org/10.1007/s00424-007-0212-8>.
- [109] Giantsos-Adams KM, Koo AJ-A, Song S, Sakai J, Sankaran J, Shin JH, et al. Heparan Sulfate Regrowth Profiles Under Laminar Shear Flow Following Enzymatic Degradation. *Cell Mol Bioeng* 2013;6:160–74. <https://doi.org/10.1007/s12195-013-0273-z>.

- [110] Harrison DG, Widder J, Grumbach I, Chen W, Weber M, Searles C. Endothelial mechanotransduction, nitric oxide and vascular inflammation. *J Intern Med* 2006;259:351–63. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2006.01621.x>.
- [111] Rossaint J, Berger C, Van Aken H, Scheld HH, Zahn PK, Rukosujew A, et al. Cardiopulmonary Bypass during Cardiac Surgery Modulates Systemic Inflammation by Affecting Different Steps of the Leukocyte Recruitment Cascade. *PLoS ONE* 2012;7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045738>.
- [112] Gross SS, Jaffe EA, Levi R, Kilbourn RG. Cytokine-activated endothelial cells express an isotype of nitric oxide synthase which is tetrahydrobiopterin-dependent, calmodulin-independent and inhibited by arginine analogs with a rank-order of potency characteristic of activated macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;178:823–9. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(91\)90965-a](https://doi.org/10.1016/0006-291x(91)90965-a).
- [113] Busse R, Fleming I. Pulsatile stretch and shear stress: physical stimuli determining the production of endothelium-derived relaxing factors. *J Vasc Res* 1998;35:73–84. <https://doi.org/10.1159/000025568>.
- [114] Kolářová H, Ambrůzová B, Švihálková Šindlerová L, Klinke A, Kubala L. Modulation of Endothelial Glycocalyx Structure under Inflammatory Conditions. *Mediators Inflamm* 2014;2014. <https://doi.org/10.1155/2014/694312>.
- [115] Kumar P, Shen Q, Pivetti CD, Lee ES, Wu MH, Yuan SY. Molecular mechanisms of endothelial hyperpermeability: implications in inflammation. *Expert Rev Mol Med* 2009;11:e19. <https://doi.org/10.1017/S1462399409001112>.
- [116] Ince C, Mayeux PR, Nguyen T, Gomez H, Kellum JA, Ospina-Tascón GA, et al. THE ENDOTHELIUM IN SEPSIS. *Shock Augusta Ga* 2016;45:259–70. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000473>.
- [117] Zhu J, Li X, Yin J, Hu Y, Gu Y, Pan S. Glycocalyx degradation leads to blood-brain barrier dysfunction and brain edema after asphyxia cardiac arrest in rats. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab* 2018;38:1979–92. <https://doi.org/10.1177/0271678X17726062>.
- [118] Rahbar E, Cardenas JC, Baimukanova G, Usadi B, Bruhn R, Pati S, et al. Endothelial glycocalyx shedding and vascular permeability in severely injured trauma patients. *J Transl Med* 2015;13:117. <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0481-5>.
- [119] Besnier E, Boubèche S, Clavier T, Popoff B, Dureuil B, Doguet F, et al. Early Positive Fluid Balance is Associated with Mortality In Patients Treated with Veno-Arterial Extra Corporeal Membrane Oxygenation For Cardiogenic Shock: A Retrospective Cohort Study. *Shock Augusta Ga* 2019. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001381>.
- [120] Acheampong A, Vincent J-L. A positive fluid balance is an independent prognostic factor in patients with sepsis. *Crit Care Lond Engl* 2015;19:251. <https://doi.org/10.1186/s13054-015-0970-1>.

- [121] Leclerc J, Pu Q, Corseaux D, Haddad E, Decoene C, Bordet R, et al. A single endotoxin injection in the rabbit causes prolonged blood vessel dysfunction and a procoagulant state. *Crit Care Med* 2000;28:3672–8. <https://doi.org/10.1097/00003246-200011000-00023>.
- [122] Mutunga M, Fulton B, Bullock R, Batchelor A, Gascoigne A, Gillespie JI, et al. Circulating endothelial cells in patients with septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:195–200. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.163.1.9912036>.
- [123] Stefanec T. Endothelial apoptosis: could it have a role in the pathogenesis and treatment of disease? *Chest* 2000;117:841–54. <https://doi.org/10.1378/chest.117.3.841>.
- [124] Bombeli T, Karsan A, Tait JF, Harlan JM. Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant. *Blood* 1997;89:2429–42.
- [125] Soriano AO, Jy W, Chirinos JA, Valdivia MA, Velasquez HS, Jimenez JJ, et al. 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* 2005;33:2540–6. <https://doi.org/10.1097/01.ccm.0000186414.86162.03>.
- [126] Shaefi S, Mittel A, Klick J, Evans A, Ivascu NS, Gutsche J, et al. Vasoplegia After Cardiovascular Procedures-Pathophysiology and Targeted Therapy. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2018;32:1013–22. <https://doi.org/10.1053/j.jvca.2017.10.032>.
- [127] Price SA, Spain DA, Wilson MA, Harris PD, Garrison RN. Subacute sepsis impairs vascular smooth muscle contractile machinery and alters vasoconstrictor and dilator mechanisms. *J Surg Res* 1999;83:75–80. <https://doi.org/10.1006/jsre.1998.5568>.
- [128] Singel DJ, Stamler JS. Chemical physiology of blood flow regulation by red blood cells: the role of nitric oxide and S-nitrosohemoglobin. *Annu Rev Physiol* 2005;67:99–145. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.67.060603.090918>.
- [129] Condon MR, Kim JE, Deitch EA, Machiedo GW, Spolarics Z. Appearance of an erythrocyte population with decreased deformability and hemoglobin content following sepsis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:H2177-2184. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01069.2002>.
- [130] Amalakuhan B, Habib SA, Mangat M, Reyes LF, Rodriguez AH, Hinojosa CA, et al. Endothelial adhesion molecules and multiple organ failure in patients with severe sepsis. *Cytokine* 2016;88:267–73. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.08.028>.
- [131] Fang Y, Li C, Shao R, Yu H, Zhang Q. The role of biomarkers of endothelial activation in predicting morbidity and mortality in patients with severe sepsis and septic shock in intensive care: A prospective observational study. *Thromb Res* 2018;171:149–54. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2018.09.059>.
- [132] Lundberg OHM, Bergenzaun L, Rydén J, Rosenqvist M, Melander O, Chew MS. Adrenomedullin and endothelin-1 are associated with myocardial injury and death in septic shock patients. *Crit Care Lond Engl* 2016;20:178. <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1361-y>.

- [133] Pittet JF, Morel DR, Hemsén A, Gunning K, Lacroix JS, Suter PM, et al. Elevated plasma endothelin-1 concentrations are associated with the severity of illness in patients with sepsis. *Ann Surg* 1991;213:261–4. <https://doi.org/10.1097/0000658-199103000-00014>.
- [134] Yoo J-W, Moon J-Y, Hong S-B, Lim C-M, Koh Y, Huh J-W. Clinical significance of circulating endothelial cells in patients with severe sepsis or septic shock. *Infect Dis Lond Engl* 2015;47:393–8. <https://doi.org/10.3109/00365548.2014.1001999>.
- [135] Doerschug KC, Delsing AS, Schmidt GA, Haynes WG. Impairments in microvascular reactivity are related to organ failure in human sepsis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:H1065-1071. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01237.2006>.
- [136] Trzeciak S, McCoy JV, Phillip Dellinger R, Arnold RC, Rizzuto M, Abate NL, et al. Early increases in microcirculatory perfusion during protocol-directed resuscitation are associated with reduced multi-organ failure at 24 h in patients with sepsis. *Intensive Care Med* 2008;34:2210–7. <https://doi.org/10.1007/s00134-008-1193-6>.
- [137] Walborn A, Rondina M, Mosier M, Fareed J, Hoppensteadt D. Endothelial Dysfunction Is Associated with Mortality and Severity of Coagulopathy in Patients with Sepsis and Disseminated Intravascular Coagulation. *Clin Appl Thromb Off J Int Acad Clin Appl Thromb* 2019;25:1076029619852163. <https://doi.org/10.1177/1076029619852163>.
- [138] Brettner F, Chappell D, Schwartz L, Lukasz A, Kümpers P, Becker BF, et al. Vascular Endothelial Dysfunction during Cardiac Surgery: On-Pump versus Off-Pump Coronary Surgery. *Eur Surg Res Eur Chir Forsch Rech Chir Eur* 2017;58:354–68. <https://doi.org/10.1159/000480431>.
- [139] Wu Q, Gao W, Zhou J, He G, Ye J, Fang F, et al. Correlation between acute degradation of the endothelial glycocalyx and microcirculation dysfunction during cardiopulmonary bypass in cardiac surgery. *Microvasc Res* 2019;124:37–42. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2019.02.004>.
- [140] Dekker N a. M, Veerhoek D, Koning NJ, van Leeuwen ALI, Elbers PWG, van den Brom CE, et al. Postoperative microcirculatory perfusion and endothelial glycocalyx shedding following cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *Anaesthesia* 2019;74:609–18. <https://doi.org/10.1111/anae.14577>.
- [141] Dekker NAM, van Leeuwen ALI, van Strien WWJ, Majolée J, Szulcek R, Vonk ABA, et al. Microcirculatory perfusion disturbances following cardiac surgery with cardiopulmonary bypass are associated with in vitro endothelial hyperpermeability and increased angiotensin-2 levels. *Crit Care Lond Engl* 2019;23:117. <https://doi.org/10.1186/s13054-019-2418-5>.
- [142] Boldt J, Osmer C, Linke LC, Dapper F, Hempelmann G. Circulating adhesion molecules in pediatric cardiac surgery. *Anesth Analg* 1995;81:1129–35. <https://doi.org/10.1097/0000539-199512000-00003>.
- [143] Shi S, Gao Y, Wang L, Liu J, Yuan Z, Yu M. Elevated free fatty acid level is a risk factor for early postoperative hypoxemia after on-pump coronary artery bypass grafting: association

with endothelial activation. *J Cardiothorac Surg* 2015;10:122. <https://doi.org/10.1186/s13019-015-0323-9>.

[144] Robinson-Cohen C, Katz R, Price BL, Harju-Baker S, Mikacenic C, Himmelfarb J, et al. Association of markers of endothelial dysregulation Ang1 and Ang2 with acute kidney injury in critically ill patients. *Crit Care Lond Engl* 2016;20:207. <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1385-3>.

[145] Lotan D, Prince T, Dagan O, Keller N, Ben-Abraham R, Weinbroum A, et al. Soluble P-selectin and the postoperative course following cardiopulmonary bypass in children. *Paediatr Anaesth* 2001;11:303–8. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9592.2001.00663.x>.

[146] Wei M, Laurikka J, Kuukasjärvi P, Pehkonen E, Tarkka M. Soluble adhesion molecules in coronary artery bypass surgery. *Asian Cardiovasc Thorac Ann* 2003;11:198–202. <https://doi.org/10.1177/021849230301100303>.

[147] Abou-Arab O, Martineau L, Bar S, Huette P, Amar AB, Caus T, et al. Postoperative Vasoplegic Syndrome Is Associated With Impaired Endothelial Vasomotor Response in Cardiac Surgery: A Prospective, Observational Study. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2018;32:2218–24. <https://doi.org/10.1053/j.jvca.2018.02.006>.

[148] Vincent J-L, Van Nuffelen M. Septic shock: new pharmacotherapy options or better trial design? *Expert Opin Pharmacother* 2013;14:561–70. <https://doi.org/10.1517/14656566.2013.777429>.

[149] Marik PE, Khangoora V, Rivera R, Hooper MH, Catravas J. Hydrocortisone, Vitamin C, and Thiamine for the Treatment of Severe Sepsis and Septic Shock: A Retrospective Before-After Study. *Chest* 2017;151:1229–38. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2016.11.036>.

[150] Lei C, Berra L, Rezoagli E, Yu B, Dong H, Yu S, et al. Nitric Oxide Decreases Acute Kidney Injury and Stage 3 Chronic Kidney Disease after Cardiac Surgery. *Am J Respir Crit Care Med* 2018;198:1279–87. <https://doi.org/10.1164/rccm.201710-2150OC>.

[151] Marrazzo F, Spina S, Zadek F, Lama T, Xu C, Larson G, et al. Protocol of a randomised controlled trial in cardiac surgical patients with endothelial dysfunction aimed to prevent postoperative acute kidney injury by administering nitric oxide gas. *BMJ Open* 2019;9:e026848. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2018-026848>.

[152] Garg AX, Chan MTV, Cuerden MS, Devereaux PJ, Abbasi SH, Hildebrand A, et al. Effect of methylprednisolone on acute kidney injury in patients undergoing cardiac surgery with a cardiopulmonary bypass pump: a randomized controlled trial. *CMAJ Can Med Assoc J J Assoc Medicale Can* 2019;191:E247–56. <https://doi.org/10.1503/cmaj.181644>.

[153] Whitlock RP, Devereaux PJ, Teoh KH, Lamy A, Vincent J, Pogue J, et al. Methylprednisolone in patients undergoing cardiopulmonary bypass (SIRS): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Lond Engl* 2015;386:1243–53. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00273-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00273-1).

- [154] Axelrod DM, Sutherland SM, Anglemyer A, Grimm PC, Roth SJ. A Double-Blinded, Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial of Aminophylline to Prevent Acute Kidney Injury in Children Following Congenital Heart Surgery With Cardiopulmonary Bypass. *Pediatr Crit Care Med J Soc Crit Care Med World Fed Pediatr Intensive Crit Care Soc* 2016;17:135–43. <https://doi.org/10.1097/PCC.0000000000000612>.
- [155] Werdan K, Pilz G, Müller-Werdan U, Maas Enriquez M, Schmitt DV, Mohr F-W, et al. Immunoglobulin G treatment of postcardiac surgery patients with score-identified severe systemic inflammatory response syndrome--the ESSICS study. *Crit Care Med* 2008;36:716–23. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0B013E3181611F62F>.
- [156] Putzu A, Capelli B, Belletti A, Cassina T, Ferrari E, Gallo M, et al. Perioperative statin therapy in cardiac surgery: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Crit Care Lond Engl* 2016;20:395. <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1560-6>.
- [157] Schwarz DS, Blower MD. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell Mol Life Sci CMLS* 2016;73:79–94. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2052-6>.
- [158] Radons J. The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? *Cell Stress Chaperones* 2016;21:379–404. <https://doi.org/10.1007/s12192-016-0676-6>.
- [159] Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, Lockhart DJ, Weissman JS, Walter P. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* 2000;101:249–58. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80835-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80835-1).
- [160] Patil C, Walter P. Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13:349–55. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(00\)00219-2](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(00)00219-2).
- [161] Kampinga HH, Craig EA. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11:579–92. <https://doi.org/10.1038/nrm2941>.
- [162] Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:519–29. <https://doi.org/10.1038/nrm2199>.
- [163] So J-S. Roles of Endoplasmic Reticulum Stress in Immune Responses. *Mol Cells* 2018;41:705–16. <https://doi.org/10.14348/molcells.2018.0241>.
- [164] Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 2000;2:326–32. <https://doi.org/10.1038/35014014>.
- [165] Maurel M, Chevet E, Tavernier J, Gerlo S. Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation. *Trends Biochem Sci* 2014;39:245–54. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.02.008>.

- [166] Han D, Lerner AG, Vande Walle L, Upton J-P, Xu W, Hagen A, et al. IRE1alpha kinase activation modes control alternate endoribonuclease outputs to determine divergent cell fates. *Cell* 2009;138:562–75. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.017>.
- [167] Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomari S, Novoa I, Zhang Y, Jungreis R, et al. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev* 2004;18:3066–77. <https://doi.org/10.1101/gad.1250704>.
- [168] McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol* 2001;21:1249–59. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.4.1249-1259.2001>.
- [169] Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Davé UP, Prywes R, et al. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell* 2000;6:1355–64. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)00133-7](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)00133-7).
- [170] Shoulders MD, Ryno LM, Genereux JC, Moresco JJ, Tu PG, Wu C, et al. Stress-independent activation of XBP1s and/or ATF6 reveals three functionally diverse ER proteostasis environments. *Cell Rep* 2013;3:1279–92. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.03.024>.
- [171] Okada T, Yoshida H, Akazawa R, Negishi M, Mori K. Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. *Biochem J* 2002;366:585–94. <https://doi.org/10.1042/BJ20020391>.
- [172] Yoshida H, Matsui T, Hosokawa N, Kaufman RJ, Nagata K, Mori K. A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. *Dev Cell* 2003;4:265–71. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(03\)00022-4](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(03)00022-4).
- [173] Khan MM, Yang W-L, Wang P. ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS IN SEPSIS. *Shock Augusta Ga* 2015;44:294–304. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000425>.
- [174] Galán M, Kassan M, Kadowitz PJ, Trebak M, Belmadani S, Matrougui K. Mechanism of endoplasmic reticulum stress-induced vascular endothelial dysfunction. *Biochim Biophys Acta* 2014;1843:1063–75. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.02.009>.
- [175] Kassan M, Galán M, Partyka M, Saifudeen Z, Henrion D, Trebak M, et al. Endoplasmic reticulum stress is involved in cardiac damage and vascular endothelial dysfunction in hypertensive mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:1652–61. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.249318>.
- [176] Mohanan Nair M, Zhao R, Xie X, Shen GX. Impact of glycated LDL on endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells: involvement of transmembrane signaling and endoplasmic reticulum stress. *J Diabetes Complications* 2016;30:391–7. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2016.01.008>.

- [177] Thiebaut P-A, Delile E, Coquerel D, Brunel J-M, Renet S, Tamion F, et al. Protein tyrosine phosphatase 1B regulates endothelial endoplasmic reticulum stress; role in endothelial dysfunction. *Vascul Pharmacol* 2018;109:36–44. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2018.05.011>.
- [178] Walsh LK, Restaino RM, Neuringer M, Manrique C, Padilla J. Administration of tauroursodeoxycholic acid prevents endothelial dysfunction caused by an oral glucose load. *Clin Sci Lond Engl* 1979 2016;130:1881–8. <https://doi.org/10.1042/CS20160501>.
- [179] Ferlito M, Wang Q, Fulton WB, Colombani PM, Marchionni L, Fox-Talbot K, et al. Hydrogen sulfide [corrected] increases survival during sepsis: protective effect of CHOP inhibition. *J Immunol Baltim Md* 1950 2014;192:1806–14. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300835>.
- [180] Ma T, Han L, Gao Y, Li L, Shang X, Hu W, et al. The endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis signal pathway is involved in sepsis-induced abnormal lymphocyte apoptosis. *Eur Surg Res Eur Chir Forsch Rech Chir Eur* 2008;41:219–25. <https://doi.org/10.1159/000135631>.
- [181] Endo M, Oyadomari S, Suga M, Mori M, Gotoh T. The ER stress pathway involving CHOP is activated in the lungs of LPS-treated mice. *J Biochem (Tokyo)* 2005;138:501–7. <https://doi.org/10.1093/jb/mvi143>.
- [182] Kim HJ, Jeong JS, Kim SR, Park SY, Chae HJ, Lee YC. Inhibition of endoplasmic reticulum stress alleviates lipopolysaccharide-induced lung inflammation through modulation of NF- κ B/HIF-1 α signaling pathway. *Sci Rep* 2013;3:1142. <https://doi.org/10.1038/srep01142>.
- [183] Liu L, Wu H, Zang J, Yang G, Zhu Y, Wu Y, et al. 4-Phenylbutyric Acid Reveals Good Beneficial Effects on Vital Organ Function via Anti-Endoplasmic Reticulum Stress in Septic Rats. *Crit Care Med* 2016;44:e689-701. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000001662>.
- [184] Doerflinger M, Glab J, Nedeva C, Jose I, Lin A, O'Reilly L, et al. Chemical chaperone TUDCA prevents apoptosis and improves survival during polymicrobial sepsis in mice. *Sci Rep* 2016;6. <https://doi.org/10.1038/srep34702>.
- [185] Hong Y-P, Deng W-H, Guo W-Y, Shi Q, Zhao L, You Y-D, et al. Inhibition of endoplasmic reticulum stress by 4-phenylbutyric acid prevents vital organ injury in rat acute pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2018;315:G838–47. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00102.2018>.
- [186] Hong Y-P, Guo W-Y, Wang W-X, Zhao L, Xiang M-W, Mei F-C, et al. 4-Phenylbutyric Acid Attenuates Pancreatic Beta-Cell Injury in Rats with Experimental Severe Acute Pancreatitis. *Int J Endocrinol* 2016;2016:4592346. <https://doi.org/10.1155/2016/4592346>.
- [187] You Y-D, Deng W-H, Guo W-Y, Zhao L, Mei F-C, Hong Y-P, et al. 4-Phenylbutyric Acid Attenuates Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Intestinal Epithelial Cell Apoptosis in Rats with Severe Acute Pancreatitis. *Dig Dis Sci* 2019;64:1535–47. <https://doi.org/10.1007/s10620-018-5437-1>.

- [188] Mizukami T, Orihashi K, Herlambang B, Takahashi S, Hamaishi M, Okada K, et al. Sodium 4-phenylbutyrate protects against spinal cord ischemia by inhibition of endoplasmic reticulum stress. *J Vasc Surg* 2010;52:1580–6. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2010.06.172>.
- [189] Jian L, Lu Y, Lu S, Lu C. Chemical Chaperone 4-Phenylbutyric Acid Reduces Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury by Alleviating Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res* 2016;22:5218–27. <https://doi.org/10.12659/msm.898623>.
- [190] Takatori O, Usui S, Okajima M, Kaneko S, Ootsuji H, Takashima S-I, et al. Sodium 4-Phenylbutyrate Attenuates Myocardial Reperfusion Injury by Reducing the Unfolded Protein Response. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2017;22:283–92. <https://doi.org/10.1177/1074248416679308>.
- [191] Yoshino J, Almeda-Valdes P, Moseley AC, Mittendorfer B, Klein S. Percutaneous muscle biopsy-induced tissue injury causes local endoplasmic reticulum stress. *Physiol Rep* 2018;6:e13679. <https://doi.org/10.14814/phy2.13679>.
- [192] Boden G, Silviera M, Smith B, Cheung P, Homko C. Acute tissue injury caused by subcutaneous fat biopsies produces endoplasmic reticulum stress. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:349–52. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-1815>.
- [193] Tautz L, Critton DA, Grotegut S. Protein tyrosine phosphatases: structure, function, and implication in human disease. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 2013;1053:179–221. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-562-0_13.
- [194] Feldhammer M, Uetani N, Miranda-Saavedra D, Tremblay ML. PTP1B: a simple enzyme for a complex world. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2013;48:430–45. <https://doi.org/10.3109/10409238.2013.819830>.
- [195] Haj FG, Verveer PJ, Squire A, Neel BG, Bastiaens PIH. Imaging sites of receptor dephosphorylation by PTP1B on the surface of the endoplasmic reticulum. *Science* 2002;295:1708–11. <https://doi.org/10.1126/science.1067566>.
- [196] Cheng A, Uetani N, Simoncic PD, Chaubey VP, Lee-Loy A, McGlade CJ, et al. Attenuation of leptin action and regulation of obesity by protein tyrosine phosphatase 1B. *Dev Cell* 2002;2:497–503. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(02\)00149-1](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(02)00149-1).
- [197] Zabolotny JM, Kim Y-B, Welsh LA, Kershaw EE, Neel BG, Kahn BB. Protein-tyrosine phosphatase 1B expression is induced by inflammation in vivo. *J Biol Chem* 2008;283:14230–41. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800061200>.
- [198] Inada S, Ikeda Y, Suehiro T, Takata H, Osaki F, Arai K, et al. Glucose enhances protein tyrosine phosphatase 1B gene transcription in hepatocytes. *Mol Cell Endocrinol* 2007;271:64–70. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2007.04.005>.
- [199] Hu S, Huang M, Li Z, Jia F, Ghosh Z, Lijkwan MA, et al. MicroRNA-210 as a novel therapy for treatment of ischemic heart disease. *Circulation* 2010;122:S124–131. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.928424>.

- [200] Yang YM, Seo SY, Kim TH, Kim SG. Decrease of microRNA-122 causes hepatic insulin resistance by inducing protein tyrosine phosphatase 1B, which is reversed by licorice flavonoid. *Hepatology* 2012;56:2209–20. <https://doi.org/10.1002/hep.25912>.
- [201] Chen Y-Y, Chu H-M, Pan K-T, Teng C-H, Wang D-L, Wang AH-J, et al. Cysteine S-nitrosylation protects protein-tyrosine phosphatase 1B against oxidation-induced permanent inactivation. *J Biol Chem* 2008;283:35265–72. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805287200>.
- [202] Takakura K, Beckman JS, MacMillan-Crow LA, Crow JP. Rapid and irreversible inactivation of protein tyrosine phosphatases PTP1B, CD45, and LAR by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* 1999;369:197–207. <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1374>.
- [203] Ravichandran LV, Chen H, Li Y, Quon MJ. Phosphorylation of PTP1B at Ser(50) by Akt impairs its ability to dephosphorylate the insulin receptor. *Mol Endocrinol* 2001;15:1768–80. <https://doi.org/10.1210/mend.15.10.0711>.
- [204] Feldhammer M, Uetani N, Miranda-Saavedra D, Tremblay ML. PTP1B: a simple enzyme for a complex world. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2013;48:430–45. <https://doi.org/10.3109/10409238.2013.819830>.
- [205] Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, Cromlish W, Collins S, Loy AL, et al. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* 1999;283:1544–8.
- [206] Ahmad F, Azevedo JL, Cortright R, Dohm GL, Goldstein BJ. Alterations in skeletal muscle protein-tyrosine phosphatase activity and expression in insulin-resistant human obesity and diabetes. *J Clin Invest* 1997;100:449–58. <https://doi.org/10.1172/JCI119552>.
- [207] McGuire MC, Fields RM, Nyomba BL, Raz I, Bogardus C, Tonks NK, et al. Abnormal regulation of protein tyrosine phosphatase activities in skeletal muscle of insulin-resistant humans. *Diabetes* 1991;40:939–42.
- [208] Delile E, Nevière R, Thiébaud P-A, Maupoint J, Mulder P, Coquerel D, et al. Reduced Insulin Resistance Contributes to the Beneficial Effect of Protein Tyrosine Phosphatase-1B Deletion in a Mouse Model of Sepsis. *Shock* Augusta Ga 2017. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000853>.
- [209] Zabolotny JM, Kim Y-B, Welsh LA, Kershaw EE, Neel BG, Kahn BB. Protein-tyrosine phosphatase 1B expression is induced by inflammation in vivo. *J Biol Chem* 2008;283:14230–41. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800061200>.
- [210] Vercauteren M, Remy E, Devaux C, Dautreux B, Henry J-P, Bauer F, et al. Improvement of peripheral endothelial dysfunction by protein tyrosine phosphatase inhibitors in heart failure. *Circulation* 2006;114:2498–507. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.630129>.
- [211] Thiebaut P-A, Besnier M, Gomez E, Richard V. Role of protein tyrosine phosphatase 1B in cardiovascular diseases. *J Mol Cell Cardiol* 2016;101:50–7. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2016.09.002>.

- [212] Coquerel D, Neviere R, Delile E, Mulder P, Marechal X, Montaigne D, et al. Gene deletion of protein tyrosine phosphatase 1B protects against sepsis-induced cardiovascular dysfunction and mortality. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014;34:1032–44. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.303450>.
- [213] Kandadi MR, Panzhinskiy E, Roe ND, Nair S, Hu D, Sun A. Deletion of protein tyrosine phosphatase 1B rescues against myocardial anomalies in high fat diet-induced obesity: Role of AMPK-dependent autophagy. *Biochim Biophys Acta* 2015;1852:299–309. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.07.004>.
- [214] Maupoint J, Besnier M, Gomez E, Bouhzam N, Henry J-P, Boyer O, et al. Selective Vascular Endothelial Protection Reduces Cardiac Dysfunction in Chronic Heart Failure. *Circ Heart Fail* 2016;9:e002895. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.115.002895>.
- [215] Bettaieb A, Matsuo K, Matsuo I, Wang S, Melhem R, Koromilas AE, et al. Protein tyrosine phosphatase 1B deficiency potentiates PERK/eIF2 α signaling in brown adipocytes. *PloS One* 2012;7:e34412. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034412>.
- [216] Delibegovic M, Zimmer D, Kauffman C, Rak K, Hong E-G, Cho Y-R, et al. Liver-specific deletion of protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) improves metabolic syndrome and attenuates diet-induced endoplasmic reticulum stress. *Diabetes* 2009;58:590–9. <https://doi.org/10.2337/db08-0913>.
- [217] Gu F, Nguyễn DT, Stuble M, Dubé N, Tremblay ML, Chevet E. Protein-tyrosine phosphatase 1B potentiates IRE1 signaling during endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 2004;279:49689–93. <https://doi.org/10.1074/jbc.C400261200>.
- [218] Panzhinskiy E, Hua Y, Culver B, Ren J, Nair S. Endoplasmic reticulum stress upregulates protein tyrosine phosphatase 1B and impairs glucose uptake in cultured myotubes. *Diabetologia* 2013;56:598–607. <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2782-z>.
- [219] Wang S, Chen X, Nair S, Sun D, Wang X, Ren J. Deletion of protein tyrosine phosphatase 1B obliterates endoplasmic reticulum stress-induced myocardial dysfunction through regulation of autophagy. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2017;1863:3060–74. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.09.015>.
- [220] Koch A, Gressner OA, Sanson E, Tacke F, Trautwein C. Serum resistin levels in critically ill patients are associated with inflammation, organ dysfunction and metabolism and may predict survival of non-septic patients. *Crit Care Lond Engl* 2009;13:R95. <https://doi.org/10.1186/cc7925>.
- [221] von Loeffelholz C, Thomas-Rüddel D, Bauer M, Birkenfeld A. Effect of Magnesium Loading Dose on Insulin Resistance in Patients With Stress-Induced Hyperglycemia: A Randomized Clinical Trial. *J Intensive Care Med* 2018;885066618803866. <https://doi.org/10.1177/0885066618803866>.
- [222] Horiguchi H, Loftus TJ, Hawkins RB, Raymond SL, Stortz JA, Hollen MK, et al. Innate Immunity in the Persistent Inflammation, Immunosuppression, and Catabolism Syndrome and

Its Implications for Therapy. *Front Immunol* 2018;9:595. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00595>.

[223] Mira JC, Gentile LF, Mathias BJ, Efron PA, Brakenridge SC, Mohr AM, et al. Sepsis Pathophysiology, Chronic Critical Illness, and Persistent Inflammation-Immunosuppression and Catabolism Syndrome. *Crit Care Med* 2017;45:253–62. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000002074>.

[224] Fohlen B, Tavernier Q, Huynh T-M, Caradeuc C, Le Corre D, Bertho G, et al. Real-Time and Non-invasive Monitoring of the Activation of the IRE1 α -XBP1 Pathway in Individuals with Hemodynamic Impairment. *EBioMedicine* 2018;27:284–92. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.12.023>.

[225] Feezor RJ, Baker HV, Mindrinos M, Hayden D, Tannahill CL, Brownstein BH, et al. Whole blood and leukocyte RNA isolation for gene expression analyses. *Physiol Genomics* 2004;19:247–54. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00020.2004>.

[226] So J-S. Roles of Endoplasmic Reticulum Stress in Immune Responses. *Mol Cells* 2018;41:705–16. <https://doi.org/10.14348/molcells.2018.0241>.

[227] Ma Y, Shimizu Y, Mann MJ, Jin Y, Hendershot LM. Plasma cell differentiation initiates a limited ER stress response by specifically suppressing the PERK-dependent branch of the unfolded protein response. *Cell Stress Chaperones* 2010;15:281–93. <https://doi.org/10.1007/s12192-009-0142-9>.

[228] Kim HJ, Jeong JS, Kim SR, Park SY, Chae HJ, Lee YC. Inhibition of endoplasmic reticulum stress alleviates lipopolysaccharide-induced lung inflammation through modulation of NF- κ B/HIF-1 α signaling pathway. *Sci Rep* 2013;3:1142. <https://doi.org/10.1038/srep01142>.

[229] Liu L, Wu H, Zang J, Yang G, Zhu Y, Wu Y, et al. 4-Phenylbutyric Acid Reveals Good Beneficial Effects on Vital Organ Function via Anti-Endoplasmic Reticulum Stress in Septic Rats. *Crit Care Med* 2016;44:e689-701. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000001662>.

[230] Diao L, Marshall AH, Dai X, Bogdanovic E, Abdullahi A, Amini-Nik S, et al. Burn plus lipopolysaccharide augments endoplasmic reticulum stress and NLRP3 inflammasome activation and reduces PGC-1 α in liver. *Shock Augusta Ga* 2014;41:138–44. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000075>.

[231] Elia AE, Lalli S, Monsurrò MR, Sagnelli A, Taiello AC, Reggiori B, et al. Tauroursodeoxycholic acid in the treatment of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurol* 2016;23:45–52. <https://doi.org/10.1111/ene.12664>.

[232] Portincasa P, DiCiaula A, Palmieri V, Velardi A, Van Berge-Henegouwen GP, Palasciano G. Tauroursodeoxycholic acid, ursodeoxycholic acid and gallbladder motility in gallstone patients and healthy subjects. *Ital J Gastroenterol* 1996;28:111–3.

[233] Mily A, Rekha RS, Kamal SMM, Arifuzzaman ASM, Rahim Z, Khan L, et al. Significant Effects of Oral Phenylbutyrate and Vitamin D3 Adjunctive Therapy in Pulmonary Tuberculosis:

A Randomized Controlled Trial. PLoS One 2015;10:e0138340. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138340>.

[234] Rubenstein RC, Zeitlin PL. A pilot clinical trial of oral sodium 4-phenylbutyrate (Buphenyl) in deltaF508-homozygous cystic fibrosis patients: partial restoration of nasal epithelial CFTR function. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:484–90. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.157.2.9706088>.

[235] Kars M, Yang L, Gregor MF, Mohammed BS, Pietka TA, Finck BN, et al. Tauroursodeoxycholic Acid may improve liver and muscle but not adipose tissue insulin sensitivity in obese men and women. *Diabetes* 2010;59:1899–905. <https://doi.org/10.2337/db10-0308>.

[236] van Lier D, Geven C, Leijte GP, Pickkers P. Experimental human endotoxemia as a model of systemic inflammation. *Biochimie* 2019;159:99–106. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.06.014>.

[237] Calvano SE, Coyle SM. Experimental human endotoxemia: a model of the systemic inflammatory response syndrome? *Surg Infect* 2012;13:293–9. <https://doi.org/10.1089/sur.2012.155>.

[238] Kamisoglu K, Haimovich B, Calvano SE, Coyle SM, Corbett SA, Langley RJ, et al. Human metabolic response to systemic inflammation: assessment of the concordance between experimental endotoxemia and clinical cases of sepsis/SIRS. *Crit Care Lond Engl* 2015;19:71. <https://doi.org/10.1186/s13054-015-0783-2>.

[239] Zwaag J, Beunders R, Warlé MC, Kellum JA, Riksen NP, Pickkers P, et al. Remote ischaemic preconditioning does not modulate the systemic inflammatory response or renal tubular stress biomarkers after endotoxaemia in healthy human volunteers: a single-centre, mechanistic, randomised controlled trial. *Br J Anaesth* 2019;123:177–85. <https://doi.org/10.1016/j.bja.2019.03.037>.

[240] Kiers D, Leijte GP, Gerretsen J, Zwaag J, Kox M, Pickkers P. Comparison of different lots of endotoxin and evaluation of in vivo potency over time in the experimental human endotoxemia model. *Innate Immun* 2019;25:34–45. <https://doi.org/10.1177/1753425918819754>.

[241] Kiers D, Wielockx B, Peters E, van Eijk LT, Gerretsen J, John A, et al. Short-Term Hypoxia Dampens Inflammation in vivo via Enhanced Adenosine Release and Adenosine 2B Receptor Stimulation. *EBioMedicine* 2018;33:144–56. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.06.021>.