



**HAL**  
open science

# Effet de l'inhibition ciblée des interférons de type I sur l'endothélium vasculaire au cours du sepsis

Raphaël Clere-Jehl

► **To cite this version:**

Raphaël Clere-Jehl. Effet de l'inhibition ciblée des interférons de type I sur l'endothélium vasculaire au cours du sepsis. Immunologie. Université de Strasbourg, 2020. Français. NNT : 2020STRAJ034 . tel-03504438

**HAL Id: tel-03504438**

**<https://theses.hal.science/tel-03504438>**

Submitted on 29 Dec 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.

*ÉCOLE DOCTORALE Sciences de la vie et de la santé*  
INSERM UMR \_S1109 – Immuno-rhumatologie moléculaire

**THÈSE** présentée par :

**Raphaël CLERE-JEHL**

soutenue le : **21 septembre 2020**

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

Discipline/ Spécialité : Immunologie

**Effet de l'inhibition ciblée des interférons  
de type I sur l'endothélium vasculaire au  
cours du sepsis**

THÈSE co-dirigée par :

**Mme HELMS Julie**

Professeur, INSERM UMR \_S1109, Hôpitaux universitaires de Strasbourg

**M. GEORGEL Philippe**

Professeur, INSERM UMR \_S1109, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

**M. DALOD Marc**

Professeur, CNRS, INSERM, Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy,  
Université d'Aix-Marseille

**M. GRIMALDI David**

Professeur, Université libre de Bruxelles, Hôpital Universitaire Erasme

---

AUTRES MEMBRES DU JURY :

**Mme SOULAS-SPRAUEL Pauline**

Professeur, CNRS UPR3572, Université de Strasbourg

**Mme ZAFRANI Lara**

Professeur, INSERM UMR 976, Université de Paris Diderot



*ÉCOLE DOCTORALE Sciences de la vie et de la santé*  
INSERM UMR \_S1109 – Immuno-rhumatologie moléculaire

**THÈSE** présentée par :

**Raphaël CLERE-JEHL**

soutenue le : **21 septembre 2020**

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

Discipline/ Spécialité : Immunologie

**Effet de l'inhibition ciblée des interférons  
de type I sur l'endothélium vasculaire au  
cours du sepsis**

THÈSE co-dirigée par :

**Mme HELMS Julie**

Professeur, INSERM UMR \_S1109, Hôpitaux universitaires de Strasbourg

**M. GEORGEL Philippe**

Professeur, INSERM UMR \_S1109, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

**M. DALOD Marc**

Professeur, CNRS, INSERM, Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy,  
Université d'Aix-Marseille

**M. GRIMALDI David**

Professeur, Université libre de Bruxelles, Hôpital Universitaire Erasme

---

AUTRES MEMBRES DU JURY :

**Mme SOULAS-SPRAUEL Pauline**

Professeur, CNRS UPR3572, Université de Strasbourg

**Mme ZAFRANI Lara**

Professeur, INSERM UMR 976, Université de Paris Diderot



*A la mémoire de Mathéo,  
En hommage à ma Famille.*

## Remerciements

Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements aux membres de mon jury, **Madame le Professeur Zafrani, Madame le Professeur Soulas-Sprauel, Monsieur le Professeur Dalod et Monsieur le Professeur Grimaldi**, pour avoir pris le temps de juger ce travail.

Je souhaite remercier vivement ma directrice de thèse, **Madame le Professeur Helms**, qui m'a proposé ce travail, pour lequel j'ai éprouvé un très grand intérêt. Je la remercie également pour l'exemple qu'elle m'a montré en termes d'implication scientifique, de rigueur professionnelle, de persévérance, et pour l'ensemble du suivi attentif qui a permis l'aboutissement de ce travail de thèse.

Je voudrais remercier chaleureusement mon co-directeur de thèse, **Monsieur le Professeur Georgel**, qui a su me communiquer à la fois son enthousiasme pour la recherche, et les connaissances dont j'ai eu besoin afin de faire aboutir la partie expérimentale de ce travail. Ses qualités humaines et scientifiques me font espérer que l'avenir nous donnera l'occasion de travailler à nouveau ensemble.

Je tiens à exprimer ma plus profonde gratitude à **Monsieur le Professeur Meziani**, qui a joué un rôle primordial dans mon évolution professionnelle, et ce depuis le premier jour où j'ai travaillé à ses côtés. Je le remercie pour la qualité et la rigueur de sa formation, autant d'un point de vue clinique que scientifique. Ses qualités professionnelles, et son exigence, ne sauraient faire oublier la bienveillance et la générosité dont il a fait preuve à mon égard, en tous types de circonstances.

Je remercie également avec insistance **Monsieur le Professeur Bahram**, qui m'a fait l'honneur de m'accueillir au sein de son laboratoire. Je le remercie également pour ses conseils scientifiques avisés, et pour son précieux soutien dans ce projet.

Je souhaite remercier tous mes collègues et compagnons de labeur, au laboratoire comme à l'hôpital, pour l'aide infiniment précieuse qu'ils m'ont apportée, et sans qui je n'aurais pas pu terminer ce combat mené sur plusieurs fronts. Parmi eux, je ne saurais comment exprimer ma gratitude au **Docteur Antoine Studer**.

Enfin, qu'il me soit permis de remercier ici, avec toute mon affection, et tout mon amour, tous les membres de ma **Famille**, qui m'ont aidé et accompagné dans mon parcours.



## Table des matières

Remerciements .....	4
Table des matières .....	6
Liste des tableaux.....	8
Liste des figures .....	9
Liste des abréviations .....	11
INTRODUCTION .....	14
I. Le choc septique.....	14
1. Sepsis et choc septique : généralités .....	14
a. Définitions et diagnostics .....	14
b. Epidémiologie.....	17
2. Physiopathologie du choc septique .....	19
a. Réponse pro-inflammatoire .....	19
b. Réponse anti-inflammatoire et immunosuppression post-sepsis.....	28
c. La myélopoïèse d'urgence .....	33
d. L'activation et la dysfonction endothéliales au cours du choc septique .....	35
e. La coagulopathie induite par le choc septique et la CIVD .....	49
II. Les interférons de type I et leurs principaux rôles.....	61
1. Classification des interférons .....	61
a. Interférons de type I.....	61
b. Interférons de types II et III.....	62
2. Voies de signalisation des interférons de type I.....	65
a. Le récepteur IFNAR.....	65
b. La voie JAK-STAT .....	67
3. Interférons de type I et réponse anti-infectieuse .....	68
a. Réponse antivirale.....	68
b. Réponse antibactérienne.....	70
4. Réponse anti-tumorale et apoptose.....	74
III. Interférons de type I, sepsis et dysfonction endothéliale .....	79
1. Interférons de type I, sepsis et dysfonctions immunitaires.....	79
a. Réponse pro-inflammatoire .....	80
b. Réponse anti-inflammatoire.....	81
2. Interférons de type I, sepsis et défaillances viscérales .....	83
3. Interférons de type I, dysfonction endothéliale et coagulopathie .....	85

a. Activation et dysfonction endothéliales d'origine infectieuse .....	85
b. Autres exemples d'activation et de dysfonction endothéliales .....	88
4. Pistes thérapeutiques potentielles .....	93
Objectifs.....	100
Travaux personnels .....	103
Article 1 .....	104
Article 2 .....	155
Discussion .....	174
Conclusion et perspectives.....	190
REFERENCES .....	194
Annexes.....	224
Annexe 1 : Complément méthodologique .....	225
Annexe 2 .....	228
Annexe 3 .....	237
Résumé .....	252
Résumé en anglais .....	252

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Score SOFA.....	15
Tableau 2 : Résumé des PRRs en fonction de leur localisation et de leur famille moléculaire.....	20
Tableau 3 : Rôle respectif des membres de la famille JAK-STAT dans la réponse immunitaire au cours du sepsis. ....	29
Tableau 4 : Principales molécules impliquées dans l'adhésion plaquettaire à l'endothélium ou au sous-endothélium. ....	54
Tableau 5 : Diagnostic de la CIVD selon le score de l'ISTH.....	58
Tableau 6 : Diagnostic de la CIVD selon le score JAAM-DIC modifié en 2016. ....	59
Tableau 7 : Principaux mécanismes antiviraux induits par les interférons de type I. ....	69
Tableau 8 : Inhibiteurs de la voie de signalisation JAK/STAT : cibles, indications et implications en recherche clinique.....	98
Tableau 9 : Protocole d'élimination des DNases par traitement thermique .....	226
Tableau 10 : Protocole de rétro transcription.....	226
Tableau 11 : Amorces utilisées lors des amplifications par RT-qPCR.....	226
Tableau 12 : Protocole de qPCR.....	227

## Liste des figures

Figure 1 : Illustration des critères diagnostiques du sepsis et du choc septique.....	16
Figure 2 : Incidence du sepsis par pays .....	17
Figure 3 : Voies de signalisation des TLRs 1, 2, 3, 4 et 6. Description des voies de signalisation dépendantes de MyD88 et de TRIF. ....	22
Figure 4 : Cellules de l'immunité innée, aspect et fonctions. ....	25
Figure 5 : La réponse inflammatoire de l'hôte au cours du sepsis.....	32
Figure 6: La myélopoïèse d'urgence.....	34
Figure 7 : Principaux médiateurs moléculaires des cellules endothéliales à l'état physiologique.....	36
Figure 8 : Facteurs déclenchants de l'activation endothéliale.....	39
Figure 9: Molécules impliquées dans l'adhésion des leucocytes à l'endothélium .....	41
Figure 10 : Principaux mécanismes vasoconstricteurs au cours du sepsis. ....	44
Figure 11 : Mécanismes physiopathologiques de la vasoplégie au cours du sepsis	47
Figure 12 : La dysfonction endothéliale au cours du sepsis. ....	48
Figure 13 : Expression du facteur tissulaire et initiation de la cascade de la coagulation par la voie extrinsèque.....	50
Figure 14 : Les voies "intrinsèque" et "extrinsèque" de la coagulation et le rôle de la thrombine.....	51
Figure 15 : principaux mécanismes de l'adhésion et de l'agrégation plaquettaire. ...	53
Figure 16 : Principaux mécanismes régulateurs de la coagulation.....	56
Figure 17 : le rôle central de la plasmine dans la fibrinolyse et ses mécanismes de régulation.....	57
Figure 18 : Structure moléculaire des interférons de type I. ....	61
Figure 19 : Interféron- $\gamma$ . A. Structure moléculaire. B. Récepteur de l'interféron- $\gamma$ . C. Voie de signalisation.....	63
Figure 20 : Les récepteurs des interférons de types I et III et leur voie de signalisation. ....	66
Figure 21 : Détection cytosolique de l'ADN bactérien et production d'interférons de type I. ....	72
Figure 22 : Interférons de type I et interactions avec les cellules tumorales.....	76
Figure 23 : Le rôle des interférons de type I dans l'immunité antibactérienne. ....	79
Figure 24 : déclenchement de la coagulopathie en réponse aux LPS.....	86

Figure 25 : Les interférons de type I dans l'athérosclérose. ....	89
Figure 26 : La régulation du processus métastatique au niveau endothélial par les IFNs de type I.....	92
Figure 27 : Proposition d'une thérapie ciblant l'endothélium, basée sur l'utilisation de nanoparticules liant le récepteur endothélial CD31. ....	94
Figure 28 : L'implication de STAT1 dans les voies de signalisation des 3 types d'IFNs .....	97

## Liste des abréviations

**ADAR** : *adenosine deaminase acting on RNA*  
**ADN** : acide désoxyribonucléique  
**AMPc** : adénosine monophosphate cyclique  
**AMPs** : *antimicrobial peptides*  
**AP-1** : *activator protein 1*  
**ARN** : acide ribonucléique  
**ARNm** : ARN messenger  
**AT** : antithrombine  
**CARS** : *compensatory antiinflammatory response syndrome*  
**CASP** : péritonite avec stent du colon ascendant  
**CCL2** : *chemokine ligand 2*  
**C/EBP $\beta$**  : *CCAAT-enhancer-binding protein  $\beta$*   
**CLP** : *cecal ligation and puncture*  
**cGAS** : synthase de GMP-AMP cyclique  
**CIVD** : coagulation intravasculaire disséminée  
**CMH** : complexe majeur d'histocompatibilité  
**COX** : cyclooxygénase  
**CXCL** : *C-X-C motif chemokine ligand*  
**DAI** : *DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors*  
**DAMPs** : *damage associated molecular pattern*  
**DD** : D-dimères  
**eNOS** : NO<sup>•</sup> synthase endothéliale  
**EDH** : *endothelium-dependant hyperpolarization*  
**EPCR** : récepteur endothélial de la protéine C  
**FADD** : *Fas-associated protein with death domain*  
**FCGR** : *Fc- $\gamma$  receptor*  
**FT** : facteur tissulaire  
**FvW** : facteur von Willebrand  
**GAS** :  *$\gamma$  interferon-activated sequence*  
**G-CSF** : *Granulocyte-Colony Stimulating Factor*  
**GP** : Glycoprotéine  
**GMPC** : guanosine 3',5' monophosphate cyclique  
**HMGB-1** : *high-mobility group box 1*  
**HUVEC** : *human umbilical vein endothelial cells*  
**ICAM-1** : *intercellular adhesion molecule 1*  
**IDO** : indoleamine dioxygénase  
**IFI16** : *interferon-inducible protein 16*  
**IFN** : interféron

**IFNAR** : récepteur de l'interféron- $\alpha$   
**IFNGR** : récepteur de l'interféron- $\gamma$   
**IFNLR1** : *interferon- $\lambda$  receptor 1*  
**Ig** : immunoglobuline  
**IKK $\beta$**  : *inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit  $\beta$*   
**IL** : interleukine  
**IL-1Ra** : *interleukin-1 receptor antagonist*  
**IL10RB** : *interleukin-10 receptor,  $\beta$  subunit*  
**ILC** : *innate lymphoid cell*  
**iNOS** : NO $\cdot$  synthase inductible  
**IRAK** : *IL-1 receptor-associated kinase*  
**IRF** : *interferon responsive factor*  
**ISG** : *interferon-stimulated genes*  
**ISGF** : *interferon-stimulated gene factor*  
**ISTH** : *International Society on Thrombosis and Haemostasis*  
**JAAM** : *Japanese Association for Acute Medicine*  
**JAK** : *Janus kinase*  
**LDL** : *light density lipoprotein*  
**LPS** : lipopolysaccharide  
**MAPK** : *mitogen-activated protein kinases*  
**MCP-1** : *monocyte chemoattractant protein-1*  
**MDSC** : *myeloid-derived suppressor cells*  
**MIP-2** : *macrophage inflammatory protein 2*  
**MyD88** : *Myeloid differentiation factor 88*  
**NADPH** : nicotinamide adenine dinucleotide phosphate  
**NETs** : *neutrophil extracellular traps*  
**NF- $\kappa$ B** : *nuclear factor kappa B*  
**NK** : *natural killers*  
**nNOS** : NO $\cdot$  synthase neuronale  
**NO $\cdot$**  : *monoxyde d'azote*  
**NOX** : NADPH oxydase  
**PAF** : facteur d'activation plaquettaire  
**PAI-1** : *plasminogen activator inhibitor-1*  
**PAMPs** : *pathogen associated molecular pattern*  
**PAR** : *protease activated receptor*  
**PC** : protéine C  
**PCa** : protéine C active  
**PCI** : inhibiteur de la protéine C  
**pDC** : cellule dendritique plasmacytoïde  
**PhtdSer** : phosphatidylsérine

**PKR** : *protein kinase RNA-activated*  
**PNN** : polynucléaires neutrophiles  
**PRR** : *pattern recognition receptor*  
**PS** : phosphatidylsérine  
**PSGL-1** : P-selectin glycoprotein ligand 1  
**RNS** : *reactive nitrogen species*  
**ROS** : *reactive oxygen species*  
**S1P1** : *sphingosine-1-phosphate receptor 1*  
**SAPS II** : *Simplified Acute Physiology Score*  
**SAVI** : *STING-associated vasculopathy with onset in infancy*  
**siRNA** : *small interfering RNA*  
**SIRS** : *systemic inflammatory response syndrome*  
**SOCS** : *suppressor of cytokine signalling*  
**SOFA** : *Sepsis-related Organ Failure Assessment* ou *Sequential Organ Failure Assessment*  
**STAT** : *signal transducers and activator of transcription*  
**STING** : *stimulator of interferon genes*  
**TAFI** : inhibiteur de la fibrinolyse activé par la thrombine  
**TAK-1** : *Transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase 1*  
**TAM** : *Tumor-associated macrophages*  
**TAN** : *Tumor-associated neutrophils*  
**TANK** : *TRAF family member-associated NF-kappa-B*  
**TBK** : *TANK binding kinase*  
**TFPI** : inhibiteur de la voie du facteur tissulaire  
**TGF- $\beta$**  : *Transforming growth factor- $\beta$*   
**Th** : *Lymphocyte T helper*  
**TIR, domaine** : *toll-interleukin 1 receptor domain*  
**TIRAP** : *toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein*  
**TLR** : *toll like receptor*  
**TM** : thrombomoduline  
**TNF** : *tumor necrosis factor*  
**TP** : taux de prothrombine  
**TRAF-6** : *TNF receptor-associated factor 6*  
**TRAIL-R** : *TNF related apoptosis inducing ligand - receptor*  
**TRAM** : *TRIF-related adaptor molecule*  
**TRIF** : *TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon- $\beta$*   
**Tyk2** : *tyrosine kinase 2*  
**VCAM-1** : *vascular cell adhesion molecule 1*  
**VLA-4** : *very late antigen-4*  
**XO** : xanthine oxidase  
**ZBP-1** : *Z-DNA binding protein*



## **INTRODUCTION**

### **I. Le choc septique**

#### **1. Sepsis et choc septique : généralités**

Le mot « sepsis » vient du grec « σηψις », qui signifie « putréfaction », et dont la première description figure dans les poèmes d'Homère au VIII<sup>ème</sup> siècle avant Jésus-Christ. Par la suite, le terme sepsis a été repris par la littérature médicale pour désigner certaines complications systémiques causées par des agents infectieux pathogènes (Geroulanos and Douka 2006).

##### **a. Définitions et diagnostics**

Les critères diagnostiques ont été révisés en 2016 par la troisième conférence internationale de consensus sur les définitions du sepsis et du choc septique (Singer, et al. 2016). Sepsis et choc septique sont deux degrés croissants de sévérité d'une infection et ont pour dénominateur commun une ou plusieurs défaillances d'organes en lien avec une altération hémodynamique d'intensité variable. La survenue du sepsis ou du choc septique dépend de l'intensité et de la qualité de la réponse immunitaire de l'hôte (Cohen 2002), plus encore que de l'effet du pathogène lui-même.

##### **Sepsis**

Le sepsis est défini comme une infection suspectée ou prouvée, le plus souvent bactérienne, responsable d'une ou plusieurs défaillances d'organes mettant en jeu le pronostic vital, consécutives à une réponse immunitaire inadaptée de l'hôte à l'infection (Singer, et al. 2016). La dysfonction de la réponse immunitaire se traduit par un état hyper-inflammatoire initial (Bosmann and Ward 2013) qui, par la mise en jeu de différents mécanismes, y compris hémodynamiques, aboutit à des défaillances d'organes. Ces défaillances d'organes, aiguës, sont évaluées par le score SOFA

(*Sepsis-related Organ Failure Assessment*) (Vincent, et al. 1996) (Tableau 1). La définition du sepsis comporte donc une augmentation du score SOFA d'au moins deux points. A noter que, dans ce travail, le terme de sepsis désignera le sepsis bactérien.

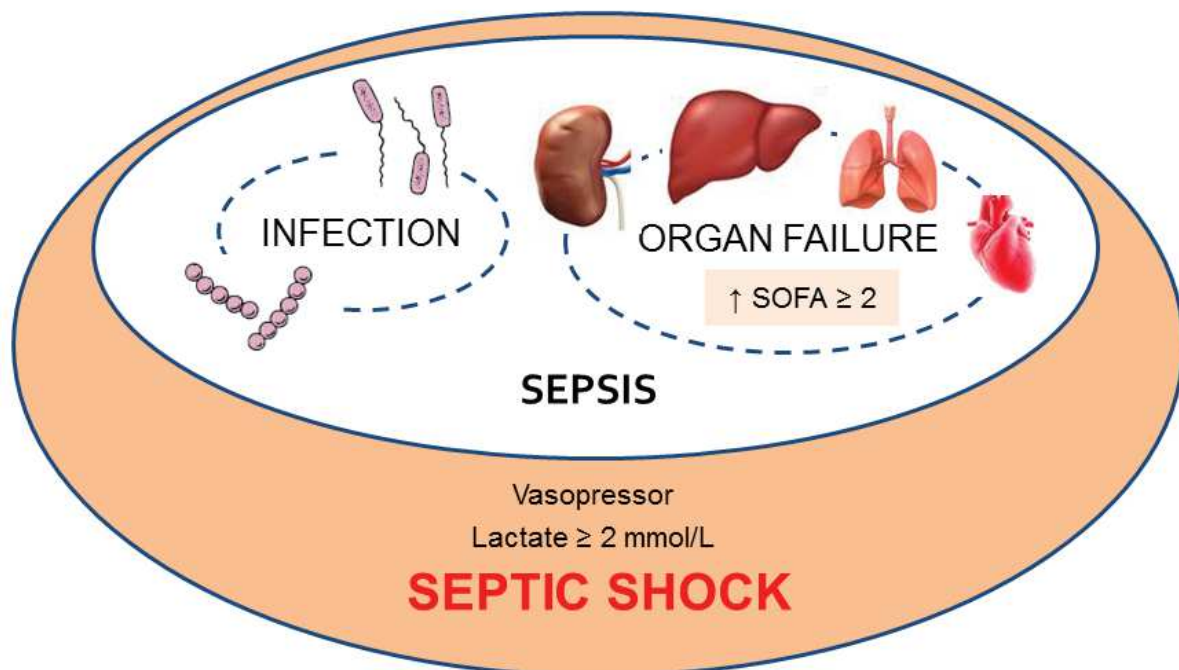
### Choc septique

Le choc septique est la forme la plus sévère d'une infection. Il se définit par l'association d'un sepsis avec une hypotension artérielle réfractaire à un remplissage vasculaire bien conduit et nécessitant un support vasopresseur pour maintenir une pression artérielle moyenne supérieure à 65 mmHg, avec sur le plan biologique, une hyperlactatémie artérielle supérieure à 2 mmol/L (Singer, et al. 2016) (Figure 1).

Organe / Système	0	1	2	3	4
<b>Respiration</b> PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> (mmHg)	> 400	≤ 400	≤ 300	≤ 200 <sup>a</sup>	≤ 100 <sup>a</sup>
<b>Coagulation</b> Plaquettes (10 <sup>9</sup> /L)	> 150	≤ 150	≤ 100	≤ 50	≤ 20
<b>Hépatique</b> Bilirubine (μmol/L)	< 20	20-32	33-101	102-204	> 204
<b>Cardiovasculaire</b> Hypotension	PAM ≥ 70 mmHg	PAM < 70 mmHg	Dopa ≤ 5 <sup>b</sup> or Dobutamine (any dose)	Dopa > 5 or Epi ≤ 0.1 or Norepi ≤ 0.1 <sup>b</sup>	Dopa > 15 or Epi > 0.1 or Norepi > 0.1 <sup>b</sup>
<b>SNC</b> Score de Glasgow	15	13-14	10-12	6-9	< 6
<b>Rénal</b> Creatinine (μmol/L) Urines émises (mL/j)	< 110	110-170	171-299	300-440 < 500	> 440 < 200

**Tableau 1 : Score SOFA (*Sepsis-related Organ Failure assessment*) (Vincent, et al. 1996).** <sup>a</sup> avec assistance respiratoire ; <sup>b</sup> catécholamines administrées pendant au moins une heure (doses en μg/kg/min). Abréviations : PAM, pression artérielle moyenne ; dopa, dopamine ; epi, épinéphrine ; norepi, norépinéphrine ; SNC, système nerveux central.

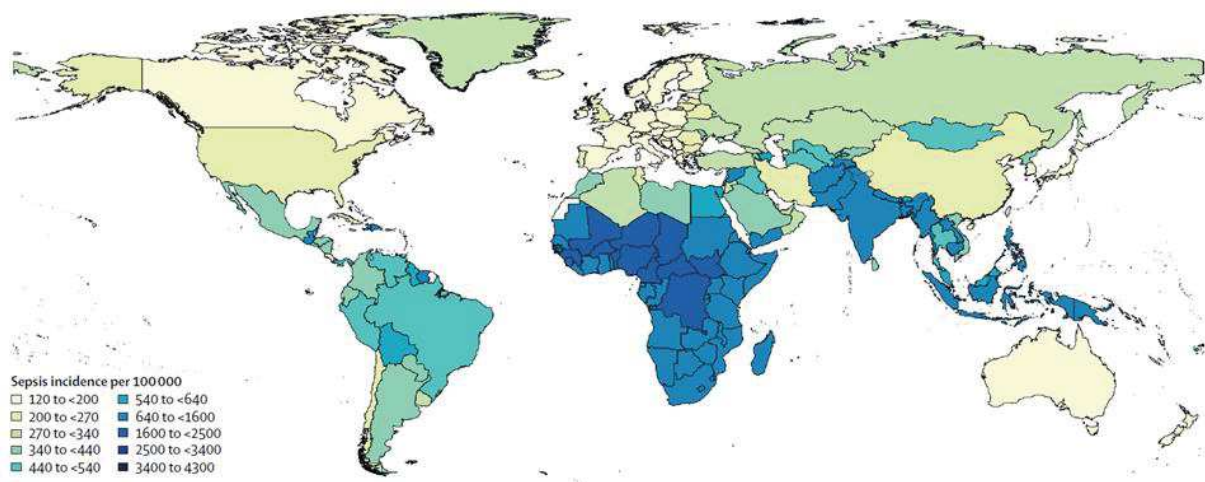
Le choc septique s'accompagne d'une altération hémodynamique en lien avec une vasoplégie, secondaire à la réponse pro-inflammatoire initiale. La vasoplégie, responsable d'une hypovolémie relative, est alors le premier mécanisme de l'hypotension artérielle observée et occasionne une hypoperfusion. Si cette vasoplégie est trop importante, le remplissage vasculaire même bien conduit –de l'ordre de 30 mL/kg de solutés cristalloïdes (Rhodes, et al. 2017)- ne permet pas la correction de l'hypotension artérielle et des signes hypoperfusion. Le support vasopresseur est alors nécessaire, en première intention par noradrénaline (Rhodes, et al. 2017). De façon concomitante à cette altération hémodynamique, une hypoxie tissulaire est observée. Elle participe à la survenue et à l'aggravation des défaillances d'organes. Par ailleurs, elle est responsable d'une déviation du métabolisme aérobie vers un métabolisme anaérobie, ce qui explique l'hyperlactatémie.



**Figure 1 : Illustration des critères diagnostiques du sepsis et du choc septique. Adapté de Singer et al., 2016**

## b. Épidémiologie

Les estimations épidémiologiques les plus récentes font état de 48,9 millions de cas de sepsis dans le monde chaque année, soit une incidence de 677 nouveaux cas pour 100 000 personnes-années (Rudd, et al. 2020). Onze millions de décès sont imputés au sepsis, ce qui lui confère un taux de mortalité de 22,5%. On estime ainsi que le sepsis est responsable, à l'échelle mondiale, de 19,7% des décès. On note d'importantes disparités géographiques (Figure 2), avec une incidence et une mortalité imputable plus fortes en Afrique subsaharienne et en Asie du Sud-Est. L'incidence et la mortalité du sepsis ont poussé l'Organisation Mondiale de la Santé en 2017 à définir le sepsis comme une priorité en matière de santé publique, non seulement quant à sa prise en charge, mais également en matière de prévention et de diagnostic (Reinhart, et al. 2017). A noter qu'on ne dispose pas de données suffisantes pour permettre d'identifier à l'échelle mondiale la part des patients présentant les critères diagnostiques de choc septique, sous-groupe moins nombreux, mais au sein duquel le taux de mortalité est attendu plus élevé.



**Figure 2 : Incidence du sepsis par pays, exprimée en nombre de nouveaux cas pour 100 000 personnes-années, d'après Rudd *et al.*, 2020**

En Europe et en Amérique du Nord, on estime que le sepsis représente 10,4% des admissions en réanimation et qu'il est grevé d'une mortalité de 37,3% durant le séjour en réanimation, pour une mortalité intra-hospitalière totale de 39% (Vincent, et al. 2019).

En France (Quenot, et al. 2013), l'étude EPISS permet d'estimer l'incidence du choc septique à 50 cas pour 100 000 personnes-années, ce qui représente environ 32 500 cas par an à l'échelle nationale. L'incidence du choc septique connaît une augmentation sur les dernières décennies dans les pays industrialisés, attribuable à des critères diagnostiques plus sensibles, ainsi qu'au vieillissement de la population (Gaieski, et al. 2013).

L'âge médian des patients traités pour choc septique en réanimation est de 68 ans [IQR, 58-78] en France, avec une nette prédominance masculine (64%) (Quenot, et al. 2013). Les infections respiratoires basses sont le site infectieux le plus fréquent en France (53,6%), tandis que les bacilles Gram négatif représentent 48,7% des germes identifiés (Quenot, et al. 2013). Le taux de mortalité à 28 jours est de 42%, pour une mortalité intra-hospitalière de 48,7%, cette différence traduisant l'importance des décès tardifs, survenant au-delà de 28 jours. Bien que la mortalité à 28 jours semble en baisse par rapport aux décennies précédentes (62,1% en 1993 et 55,9% en 2000) (Annane, et al. 2003), l'incidence et la mortalité du choc septique restent élevées, ce qui en fait un important enjeu de santé publique.

Cet enjeu est renforcé par les coûts pesant sur le système de santé. Le coût moyen des soins engendrés par un cas de choc septique est estimé à 38 298 dollars aux États-Unis (Paoli, et al. 2018).

## **2. Physiopathologie du choc septique**

Le choc septique est en lien avec une dysfonction de la réponse immunitaire, qui comporte deux versants : une réponse pro-inflammatoire visant à combattre l'agent pathogène, et une réponse anti-inflammatoire visant à limiter les dommages occasionnés par cet état hyper-inflammatoire. Nous allons décrire les aspects de cette dysfonction immunitaire au cours du choc septique, ainsi que l'activation endothéliale et la coagulopathie qui en découlent.

### **a. Réponse pro-inflammatoire**

Au cours du choc septique, la réponse immunitaire initiale, pro-inflammatoire (Figure 5), a pour but d'éradiquer l'agent pathogène responsable de l'infection. Cette réponse implique tout d'abord la reconnaissance de l'agent pathogène par le système immunitaire, la réponse de l'immunité innée en première ligne, puis la réponse immunitaire adaptative, avec la mise en jeu de mécanismes moléculaires en particulier cytokiniques.

### **Reconnaissance de l'agent pathogène et réponse cytokinique de l'immunité innée**

Les micro-organismes pathogènes expriment un grand nombre de signatures moléculaires, les PAMPs (*pathogen associated molecular pattern*), qui permettent leur reconnaissance rapide par le système immunitaire inné (Kumar, et al. 2011), *via* les PRRs (*pattern recognition receptor*). Les PAMPs sont en général des structures moléculaires souvent indispensables à la survie du pathogène, et constitutionnelles, ce qui explique le caractère très conservé de ces structures au fil de l'évolution (Mogensen 2009). On peut citer l'exemple des LPS (lipopolysaccharides), qui sont un composant essentiel de la couche externe de la membrane des bacilles Gram négatifs

(Zhang, et al. 2013) et du peptidoglycane, qui est un composant discriminant de la paroi bactérienne et particulièrement majoritaire pour les cocci Gram positifs (Silhavy, et al. 2010).

Les PRRs peuvent être transmembranaires, endosomaux ou intracytoplasmiques et incluent plusieurs familles de récepteurs (Tableau 2), dont les plus étudiés sont les TLRs (*toll like receptor*). Les TLRs étant les plus impliqués dans la réponse immunitaire innée antibactérienne, leur rôle dans la phase pro-inflammatoire du choc septique est de premier ordre (Tsujimoto, et al. 2008). De plus, l'activation des TLRs participe à la stimulation des gènes des interférons de type I (Pandey, et al. 2014). Nous allons donc décrire, à titre d'exemple choisi au sein des PRRs, les principales voies de signalisation des TLRs.

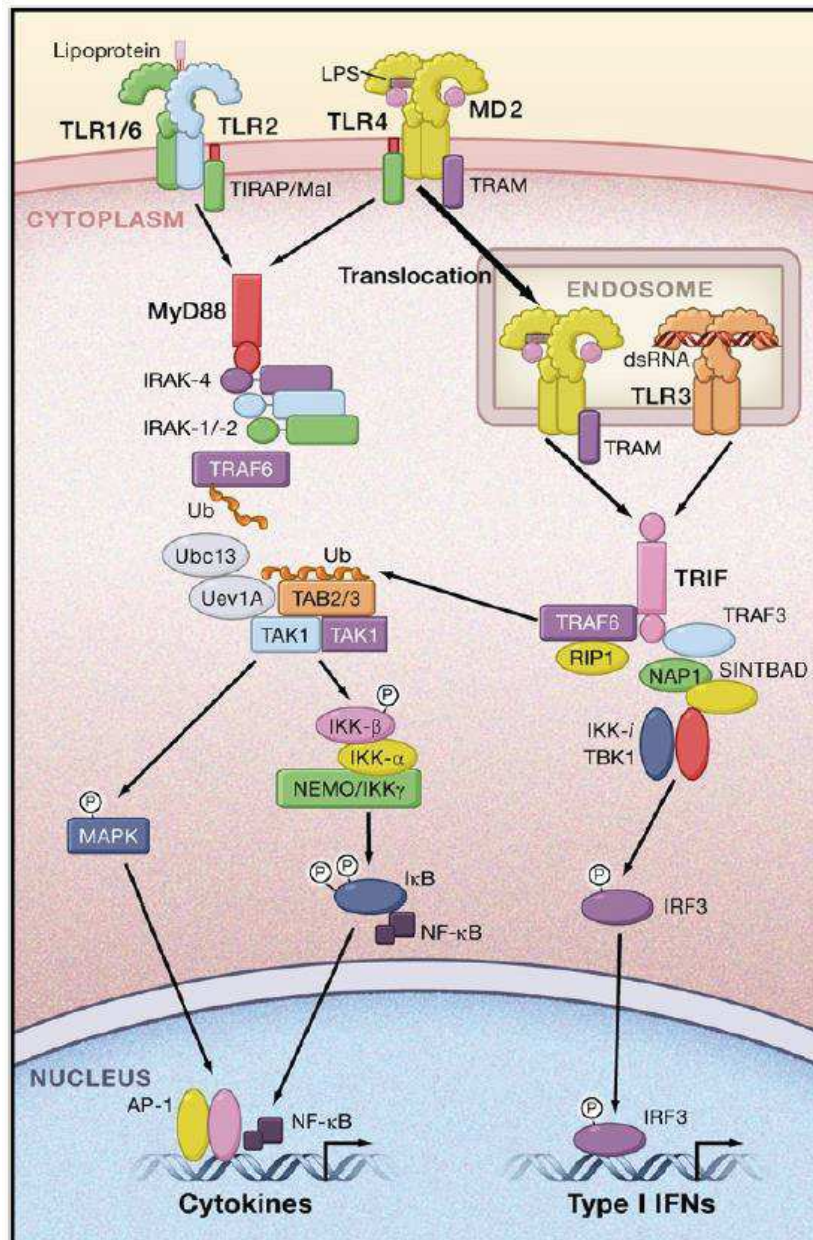
Localisation des PRRs	Familles de PRRs	Principaux PAMPs reconnus	Références
Transmembranaires	Récepteurs de type toll* 1,2,4,5,6,11	PAMPs bactériens extracellulaires	(Pandey, et al. 2014)
	Récepteurs de lectine de type C#	PAMPs fongiques extracellulaires	(Hoving, et al. 2014)
Endolysosomes	Récepteurs de type toll* 3,7,8,9,10	ARN et ADN (viraux et bactériens) captés par endocytose	(Takeuchi and Akira 2010)
Récepteurs intra-cytoplasmiques	Récepteurs de type RIG-I†	ARN viral intracellulaire	(Takeuchi and Akira 2010)
	Récepteurs de type Nod‡	PAMPs bactériens intracellulaires	(Takeuchi and Akira 2010)
	Récepteurs de type AIM**	ADN cytosolique d'origine rétrovirale (retrotransposons)	(Nakaya, et al. 2017)
	Récepteur cGAS	ADN cytosoliques (viraux et bactériens)	(Xiao and Fitzgerald 2013)

**Tableau 2 : Résumé des PRRs (*pattern recognition receptors*) en fonction de leur localisation et de leur famille moléculaire. Réalisation personnelle.** Autres noms des récepteurs : \*TLRs (*toll-like receptor*) ; cGAS, synthase de GMP-AMP cyclique ; #CLR (*C-type lectin receptors*) ; †RLRs (*RIG-I-like receptors*) ; ‡NLRs (*NOD-like receptors*) ; \*\*ALRs (*AIM2-like receptors*).

Après liaison avec leur ligand respectif, les TLRs activés recrutent différemment quatre protéines en fonction du TLR et du type de cellule concerné : MyD88 (*Myeloid differentiation factor 88*) est la plus fréquemment impliquée, les autres protéines étant TRIF (*TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon- $\beta$* ), TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*) et TIRAP (*toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein*) (Pandey, et al. 2014). MyD88, TRIF, TRAM et TIRAP sont toutes des protéines adaptatrices contenant un domaine TIR (*toll-interleukin 1 receptor domain*). Le domaine TIR est un domaine de reconnaissance des protéines-kinases IRAK (*IL-1 receptor-associated kinases*), et ce domaine est commun aux récepteurs TLR et aux récepteurs des interleukines 1 (Narayanan and Park 2015).

On décrit principalement deux voies de signalisation des TLRs, en fonction de la protéine à domaine TIR prédominante : la voie dépendante de MyD88 et la voie dépendante de TRIF (Figure 3). La voie de signalisation majoritaire des TLRs est la voie dépendante de MyD88, qui concerne la quasi-totalité des TLRs à l'exception du TLR3 (Takeuchi and Akira 2010). MyD88, par son domaine TIR, active les protéines-kinases IRAK-4, puis IRAK-2 et IRAK-1, qui ensemble forment le « Myddosome » et activent TRAF-6 (*TNF receptor-associated factor 6*), puis le complexe TAK-1 (*Transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase 1*). TAK-1 phosphoryle à son tour les kinases d'aval, notamment IKK $\beta$  (*inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit  $\beta$* ) et MAPK (*mitogen-activated protein kinases*), ce qui conduit à l'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-B*) par la voie canonique et AP-1 (*activator protein 1*), respectivement (Kawai and Akira 2010; Walsh, et al. 2015). Ces deux facteurs de transcription entraînent l'expression de gènes codant pour un grand nombre de cytokines pro-inflammatoires, telles que IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12 et TNF- $\alpha$  (Liu, et al. 2017).





**Figure 3 : Voies de signalisation des TLRs 1, 2, 3, 4 et 6. Description des voies de signalisation dépendantes de MyD88 et de TRIF. Issu de Takeuchi and Akira, 2010.**

La voie TRIF, utilisée notamment par TLR 3 et TLR4 (Hu, et al. 2015), active deux voies de signalisation (Figure 3). D'une part, l'activation de TRAF-6 aboutit à l'activation de NF-κB *via* TAK-1, une partie de cette voie de signalisation étant donc commune avec MyD88 (Takeuchi and Akira 2010). D'autre part, TRIF, par l'activation de TRAF-3, puis de TBK-1 (TANK binding kinase 1) et IKKi (*inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit i*), entraîne la phosphorylation d'IRF-3 (*interferon regulatory*

*factor-3*) et d'IRF-7 (Pandey, et al. 2014). IRF-3 et IRF-7 sont des facteurs transcriptionnels majeurs pour les gènes codant les interférons de type I (Honda, et al. 2006), soulignant l'importance de la voie TRIF.

L'ensemble de ces réponses moléculaires mène à un « orage cytokinique » en réponse à l'agent pathogène (Chousterman, et al. 2017), menant à la fois à une amplification initiale de la réponse cytokinique elle-même et à la stimulation des cellules de l'immunité innée et adaptative.

### **Réponse des cellules de l'immunité innée**

La réponse des cellules de l'immunité innée est capitale dans la réponse pro-inflammatoire et donc dans la physiopathologie du sepsis et du choc septique (Delano and Ward 2016).

Au sein des cellules hématopoïétiques, les cellules myéloïdes phagocytaires sont les principaux agents de l'immunité innée (Figure 4) et incluent les monocytes et macrophages, les cellules dendritiques et les polynucléaires neutrophiles (PNN) (Turvey and Broide 2010). Ces trois types de cellules sont souvent appelés « phagocytes professionnels » (Colucci-Guyon, et al. 2011). Toutefois, en plus de leur capacité à phagocyter et à détruire directement l'agent pathogène, ces cellules participent massivement à la réponse moléculaire contre l'agent pathogène, incluant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Lacy and Stow 2011), de lysozyme (Ragland and Criss 2017), et la libération de peptides antimicrobiens (AMPs) (Lai and Gallo 2009).

Ainsi, lors de la phase pro-inflammatoire, les macrophages acquièrent une polarisation M1, caractérisée par la production de cytokines pro-inflammatoires, telles

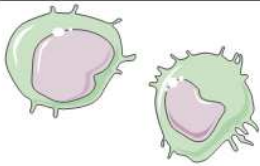




que TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, et par la stimulation de la NO synthase inducible (iNOS). Ainsi, les macrophages M1 créent un environnement hautement bactéricide par production d'espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species*, ROS) et de l'azote (*reactive nitrogen species*, RNS) (Arango Duque and Descoteaux 2014), qui jouent à la fois un rôle antibactérien direct et un rôle de médiateurs moléculaires (Swindle and Metcalfe 2007). Les macrophages M1 sécrètent également des peptides antimicrobiens tels que les défensines (Lai and Gallo 2009).

Les PNN phagocytent les agents pathogènes, ou bien produisent des pièges extracellulaires des neutrophiles (NETs), ce qui dépend essentiellement de la taille de l'agent ciblé (Manfredi, et al. 2018). De plus, les PNN sécrètent des défensines et la cathélicidine, qui sont des AMPs (Lai and Gallo 2009).

Les cellules dendritiques captent dans les tissus les antigènes provenant des agents pathogènes et activent d'autres cellules du système immunitaire par présentation de l'antigène, créant ainsi une jonction entre immunités innée et adaptative (Wu, et al. 2017). Elles sécrètent également des cytokines.

En dehors des « phagocytes professionnels », les cellules d'origine hématopoïétique de l'immunité innée comprennent les mastocytes, les cellules lymphoïdes innées (*innate lymphoid cell*, ILC), dont font partie les NK (*natural killers*), et quelques cellules lymphoïdes présentant un profil mixte inné et adaptatif (*cf infra*).

Les mastocytes sont situés dans les tissus et participent à l'immunité innée par plusieurs mécanismes. Les mastocytes exercent une action bactéricide directe par sécrétion d'AMPs (cathélicidine) et par production d'espèces réactives de l'oxygène.

Type de cellule	Aspect	Fonctions dans l'immunité innée	
Monocytes (sang) Macrophages (tissus)		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Phagocytose</li> <li>• Sécrétion AMPs (défensines)</li> <li>• Présentation d'antigène</li> <li>• Macrophages: polarisation M1</li> <li>• Sécrétion cytokinique</li> </ul>	Phagocytes professionnels
Polynucléaires neutrophiles		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Phagocytose</li> <li>• Libération de NETs</li> <li>• Sécrétions AMPs (défensines, cathélicidine)</li> </ul>	
Cellules dendritiques		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Phagocytose</li> <li>• Présentation d'antigène, rôle dans l'interaction avec l'immunité adaptative</li> <li>• Sécrétion cytokinique</li> </ul>	
Mastocytes		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vasodilatation par libération d'histamine</li> <li>• Production d'espèces réactives de l'oxygène</li> <li>• Sécrétions AMPs (cathélicidine)</li> </ul>	
Cellules lymphoïdes innées Ex: Natural Killers		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Destruction d'agents pathogènes</li> <li>• Sécrétion cytokines immunomodulatrices (IFN-γ)</li> </ul>	

**Figure 4 : Principales cellules de l'immunité innée, aspect et fonctions.** Les cellules lymphoïdes innées (ILC) comprennent également les ILCs 1, 2 et 3 ; les cellules NK (*natural killers*) sont décrites à titre d'exemple. **Réalisation personnelle.**

Par dégranulation histaminique, les mastocytes déclenchent également une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité capillaire, ce qui permet une meilleure mobilisation des cellules immunitaires sur le site infectieux. Cette mobilisation est renforcée par la sécrétion de facteurs chimiotactiques qui coordonnent le recrutement des cellules immunitaires (Urb and Sheppard 2012). De plus, les mastocytes sont capables de générer des pièges extracellulaires, à l'instar des PNN (von Kockritz-Blickwede, et al. 2008).

Enfin, quelques cellules lymphoïdes participent à la communication entre immunités innée et adaptative, dont les ILCs. N'exprimant pas de récepteur de l'antigène, les ILCs font partie de l'immunité innée. Elles comportent les cellules NK (*natural killers*), premières cellules décrites au sein de ce groupe, mais également les ILCs 1, 2 et 3. Les cellules NK, décrites à titre d'exemple, tirent leur nom de leur

capacité à lyser les cellules tumorales ou les cellules infectées par un agent viral. Dans l'immunité antibactérienne, les cellules NK sont capables de reconnaître un très grand nombre de PAMPs. Une fois activées, les cellules NK secrètent des cytokines immunomodulatrices, en particulier l'interféron- $\gamma$ , et ainsi jouent un rôle-clé dans la mobilisation et la coordination de l'ensemble des cellules immunitaires. Les cellules NK participent donc de façon majeure à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative (Cooper, et al. 2009).

D'autres cellules lymphoïdes présentent un profil mixte inné/adaptatif, dont les NK T, les lymphocytes  $T\gamma\delta$ , et les lymphocytes MAIT (*mucosal-associated invariant T cells*). Ces cellules lymphoïdes mobilisent également les cellules de l'immunité innée par sécrétion cytokinique.

### **Interface entre immunité innée et adaptative**

Les cellules de l'immunité adaptative sont représentées par les lymphocytes. Les lymphocytes T sont composés par les lymphocytes T-CD4+, également appelés T auxiliaires ou Th (*T helper*), et par les lymphocytes T-CD8+, également appelés T cytotoxiques. L'activation des lymphocytes T naïfs nécessite trois signaux : *i.* l'activation du TCR (*T cell receptor*) spécifique de l'antigène, *ii.* l'activation des récepteurs de co-stimulation positive (notamment CD28) par les ligands portés par les cellules présentatrices d'antigènes (CD80, CD86), et *iii.* la stimulation par les cytokines activatrices, promouvant la prolifération des lymphocytes et leur polarisation fonctionnelle (ex : Th1 ou Th2, *cf infra*). Si les lymphocytes B sont activés par une interaction directe avec l'antigène, et stimulés par certaines cytokines, les lymphocytes T sont en revanche strictement tributaires des cellules présentatrices d'antigènes, ce qui constitue, en plus de la stimulation cytokinique, un deuxième mécanisme d'interactions avec l'immunité innée (Iwasaki and Medzhitov 2015). Les cellules

présentatrices d'antigènes de l'immunité innée comprennent en particulier les cellules dendritiques, dont c'est le rôle premier, mais aussi les monocytes et macrophages. Ces cellules présentent les antigènes aux lymphocytes T, en utilisant le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type II pour présenter les antigènes exogènes aux lymphocytes T-CD4+, et le CMH de type I pour présenter les molécules du soi aux lymphocytes T-CD8+ (Blum, et al. 2013).

Les lymphocytes B et T sont stimulés, parallèlement à leur activation par les antigènes, par un grand nombre de cytokines (émanant initialement des cellules de l'immunité innée) parmi lesquelles figurent les interférons de types I et II. En effet, les interférons- $\alpha$  et - $\beta$  (type I) activent surtout les lymphocytes T-CD8+ *via* le récepteur de l'interféron- $\alpha$  (IFNAR) (Le Bon, et al. 2006; Sun, et al. 1998; Thornley, et al. 2007), parfois en synergie avec l'IFN- $\gamma$  (Bhat, et al. 2017; Curtsinger, et al. 2012; Krummel, et al. 2018), mais activent également les T-CD4+ (Havenar-Daughton, et al. 2006; Way, et al. 2007). L'interféron- $\gamma$  (type 2) secrété par les cellules NK active préférentiellement les lymphocytes T-CD4+, en particulier les T helpers de type 1 (Th1) en favorisant leur prolifération et leur survie (Reed, et al. 2008; Wakil, et al. 1998). Les lymphocytes T-CD4+ une fois activés, en particulier les lymphocytes Th1, sécrètent à leur tour d'importantes quantités d'interféron- $\gamma$  (Gaudino and Kumar 2019; Green, et al. 2013), ce qui crée une boucle d'auto-amplification. Les lymphocytes T-CD4+ sécrètent de nombreuses autres cytokines qui vont permettre de recruter et de réguler à leur tour les cellules de l'immunité innée (Mosser and Edwards 2008).

L'immunité innée et l'immunité adaptative sont donc interdépendantes et la coordination entre ces deux versants de l'immunité repose en grande partie sur les réponses cytokiniques, dont une importante partie emprunte les voies de signalisation JAK-STAT. Nous avons donc étudié ces réponses cytokiniques sous l'angle de leurs

voies de signalisation, dans le cadre d'une revue de la littérature portant sur l'implication des voies de signalisation JAK-STAT au cours du sepsis (Tableau 3).

### **b. Réponse anti-inflammatoire et immunosuppression post-sepsis**

Suite à la réponse pro-inflammatoire, des mécanismes anti-inflammatoires sont mis en place afin de limiter les effets délétères de l'hyper-inflammation (Figure 5). Ces mécanismes anti-inflammatoires, parfois nommés Syndrome de Réponse Anti-inflammatoire Compensatoire (CARS)(Angus and van der Poll 2013), impliquent de façon interdépendante l'immunité innée et l'immunité adaptative.

La réponse cytokinique anti-inflammatoire repose notamment sur les interleukines (IL)-4, IL-10, IL-13 (Opal and DePalo 2000). L'IL-4 et l'IL-13 sont structurellement proches et induisent au sein des lymphocytes T-CD4+, *via* l'activation de STAT6, une réponse anti-inflammatoire de type Th2 (Kaplan, et al. 1996)(Tableau 3). L'IL-10 diminue la réponse pro-inflammatoire de type Th1 en inhibant la phosphorylation de STAT1, ce qui diminue l'expression de gènes stimulés par les interférons (ISG, *interferon-stimulated genes*). L'IL-10 participe ainsi à une anergie des cellules Th1, se traduisant par un défaut de sécrétion cytokinique, en particulier en IFN- $\gamma$ , en réponse à une stimulation (Poujol, et al. 2018). De plus, IL-10 participe *via* l'activation de STAT3 à l'induction de la réponse anti-inflammatoire de type Th2 (Hillmer, et al. 2016). Les lymphocytes développent également une proportion accrue de cellules Treg, qui expriment CD25 et FOXP3 sous l'effet de l'IL-10 (Poujol, et al. 2018) et des IL-2 et IL-3 *via* STAT5 (Tableau 3) (Burchill, et al. 2007; Monneret, et al. 2003). L'antagoniste au récepteur de l'IL-1 (IL-1Ra) (Cohen 2002), le TGF- $\beta$  (Ahmad, et al. 1997) et les SOCS (*suppressor of cytokine signalling*) (Duncan, et al. 2017) participent également à la réponse anti-inflammatoire.

**Tableau 3 : Rôle respectif des membres de la famille JAK-STAT dans la réponse immunitaire au cours du sepsis. Réalisation personnelle (Clere-Jehl, et al. 2020).**

STATs	Upstream cytokine	JAK	Downstream genes#	Effector cells	Response to bacterial infections	Phenotype of STAT <sup>-/-</sup> mice		[Ref]
						CLP-Resistant	LPS-Resistant	
<b>STAT1</b>	IFN-γ	JAK1, JAK2	Interferon-Stimulated Genes*	Monocytes Macrophages	Proinflammatory Th1	Yes	Yes	(Herzig, et al. 2012; Kamezaki, et al. 2004)
	IFN-α/β IL-27, IFN-λ	JAK1, Tyk2						
<b>STAT2</b>	IFN-α/β	JAK1, Tyk2	Interferon-Stimulated Genes*	Monocytes Macrophages Neutrophils	Proinflammatory Th1	Not Published	No (more susceptible)	(Alazawi, et al. 2013)
<b>STAT3</b>	IL-6	JAK1-2, Tyk2	Immunoregulatory genes (eg. TGF-β)	Monocytes Macrophages MDSC	Proinflammatory Th17 (IL-6) Immunoregulatory Th2 (IL-10) Emergency granulopoiesis	No (more susceptible) <sup>†</sup>	No (more susceptible) <sup>†</sup>	(Matsukawa, et al. 2003; Takeda, et al. 1999)
	IL-10	JAK1, Tyk2	Apoptosis regulation (eg. BCL-XL)					
	G-CSF	JAK1-2, Tyk2	Granulopoiesis (eg. C/EBPβ, c-Myc)					
<b>STAT4</b>	IL-12	JAK2, Tyk2	IFN-γ, AP-1 (IFN-γ promoter) IRF-1 IL-12R (positive feedback loop)	Lymphocytes Natural killers Dendritic cells	Proinflammatory Th1	Yes	No (more susceptible)	(Lentsch, et al. 2001; Matsukawa, et al. 2001)
<b>STAT5a</b>	IL-2, IL-3	JAK2	Foxp3	Lymphocytes (CD4 T cells)	Immunoregulatory Th2 (IL-2,3) T cell survival (IL-7)	Not Published <sup>‡</sup>		
<b>STAT5b</b>	IL-7	JAK1,3	Bcl-2	Myeloid cells	Emergency granulopoiesis	Yes	No (more susceptible)	(Lentsch, et al. 2001; Matsukawa, et al. 2001)
	GM-CSF	JAK1-2	Granulopoiesis (eg. C/EBPα/β/δ)					
<b>STAT6</b>	IL-4	JAK1, JAK3	IL-4, IL-13 (positive feedback loop)	Lymphocytes (B and T cells)	Immunoregulatory Th2	Yes	No (more susceptible)	(Lentsch, et al. 2001; Matsukawa, et al. 2001)
	IL-13	JAK1-2, Tyk2	IL-5, IL-9 Gata3					



### Tableau 3 / Notes :

\*réponse transmise par ISGF-3 (Interferon-Stimulated Gene Factor 3), facteur de transcription hétéro-trimérique associant STAT1, STAT2 et IRF-9. Les gènes stimulés par l'interféron (ISG) comprennent des centaines de gènes impliqués dans la lutte contre l'agent pathogène (ex : IRF1, 3, 7). #Chaque protéine de la famille STAT peut activer une multitude de gènes en réponse à un signal cytokinique. Seuls quelques exemples représentatifs sont mentionnés dans le tableau. †Seuls les résultats des souris knockout conditionnelles, présentant une délétion de *Stat3* dans les neutrophiles et les macrophages, sont présentés, les souris *Stat3*<sup>-/-</sup> n'étant pas viables. ‡Les souris *Stat5*<sup>-/-</sup> sont exposées à une très forte mortalité périnatale, et *Stat5a* et *Stat5b* présentent une forte homologie de structure et de fonction, expliquant que *Stat5a* et *Stat5b* se compensent mutuellement chez les souris *Stat5a*<sup>-/-</sup> et *Stat5b*<sup>-/-</sup>.

Abréviations : AP-1, activator protein-1; CLP, cecal ligation and puncture; G-CSF, Granulocyte-Colony Stimulating Factor; IFN, interferon; IL, interleukin; IRF, interferon regulatory factor; JAK, Janus kinase; LPS, lipopolysaccharides; STAT, signal transducers and activator of transcription; TGF- $\beta$ , Transforming Growth Factor- $\beta$ ; Tyk, tyrosine kinase

D'un point de vue quantitatif, les lymphocytes sont particulièrement touchés par une réduction de leur prolifération et par une apoptose massive. Ainsi, en réponse à l'IL-2, SOCS3 inhibe la prolifération lymphocytaire par régulation de STAT5 (Cohney, et al. 1999). Quant à l'apoptose, celle-ci est médiée par les gènes de la famille Bcl-2 (Chetoui, et al. 2010) et touche en particulier les lymphocytes B et T-CD4<sup>+</sup> (Hotchkiss, et al. 2001).

Au sein des cellules de l'immunité innée, l'apoptose touche principalement les monocytes (Giamarellos-Bourboulis, et al. 2006) et les cellules dendritiques conventionnelles (cDC1) (Fuertes Marraco, et al. 2011). En parallèle, on note une atteinte qualitative de la réponse des cellules de l'immunité innée, en partie médiée

par les lymphocytes Th2 et Treg par le biais des cytokines et médiateurs anti-inflammatoires, mais également par les cellules myéloïdes suppressives (MDSC, *myeloid-derived suppressor cells*) (Schrijver, et al. 2019). Fait majeur, ces mécanismes anti-inflammatoires aboutissent à une réduction de la capacité des cellules de l'immunité innée à présenter les antigènes, ce qui concerne les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques. Ces altérations s'accompagnent d'une diminution de l'expression des molécules du CMH de classe II par l'ensemble des cellules présentatrices d'antigènes (Roquilly, et al. 2017; Vega-Ramos, et al. 2014) et d'une diminution de l'expression de l'HLA-DR par les monocytes.

La mesure de cette expression de l'HLA-DR sur les monocytes circulants par cytométrie en flux permet une évaluation quantitative de l'immunosuppression post-sepsis et a montré une corrélation avec la survenue d'infections secondaires (Landelle, et al. 2010) et avec la mortalité (Monneret, et al. 2006). On estime que les infections secondaires sont responsables de 10% des décès dans les 60 jours suivant le diagnostic de choc septique (van Vught, et al. 2016), soulignant l'importance de l'immunosuppression post-sepsis d'un point de vue clinique et la nécessité d'élargir les perspectives thérapeutiques (Grimaldi, et al. 2014).

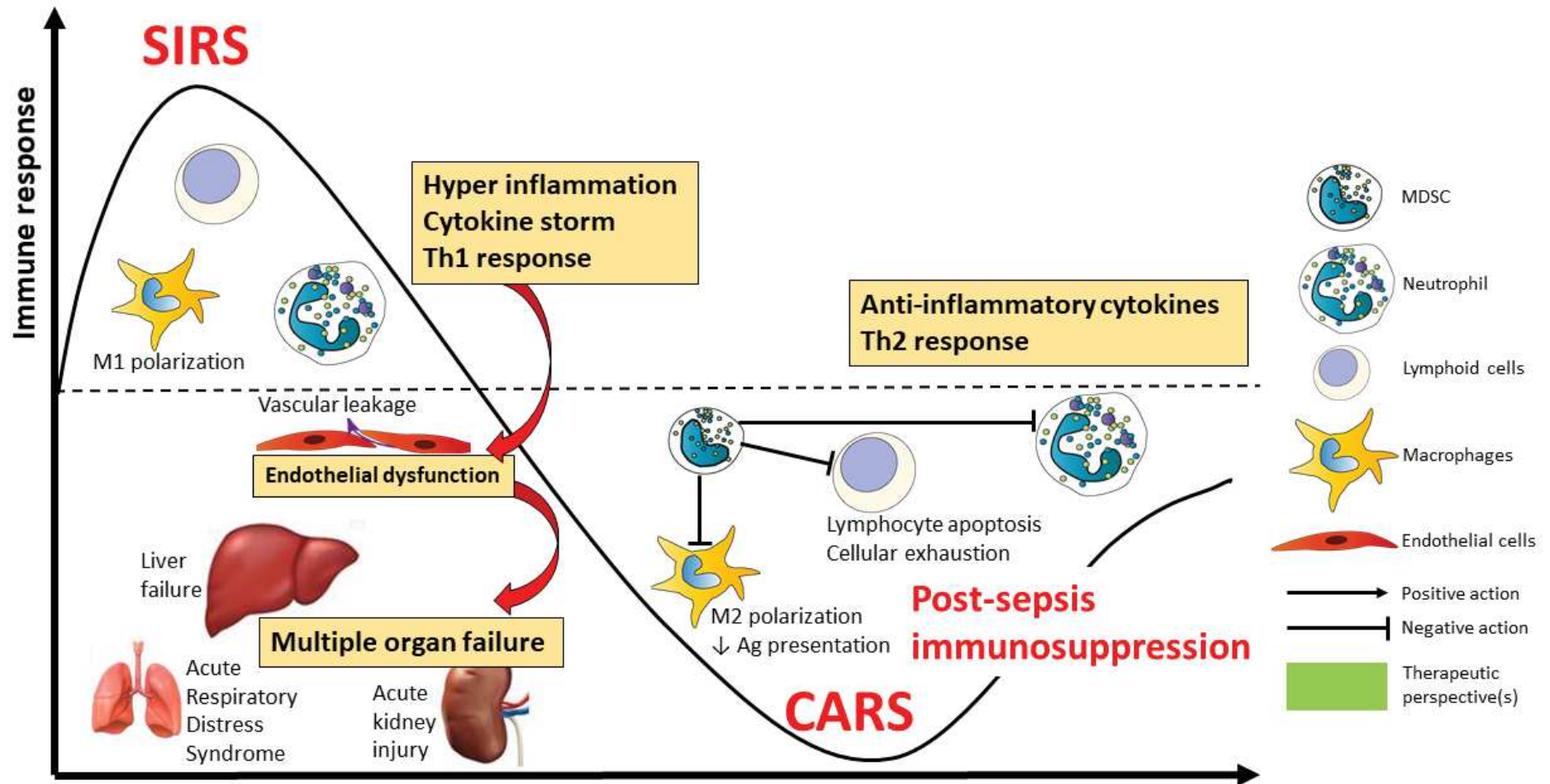
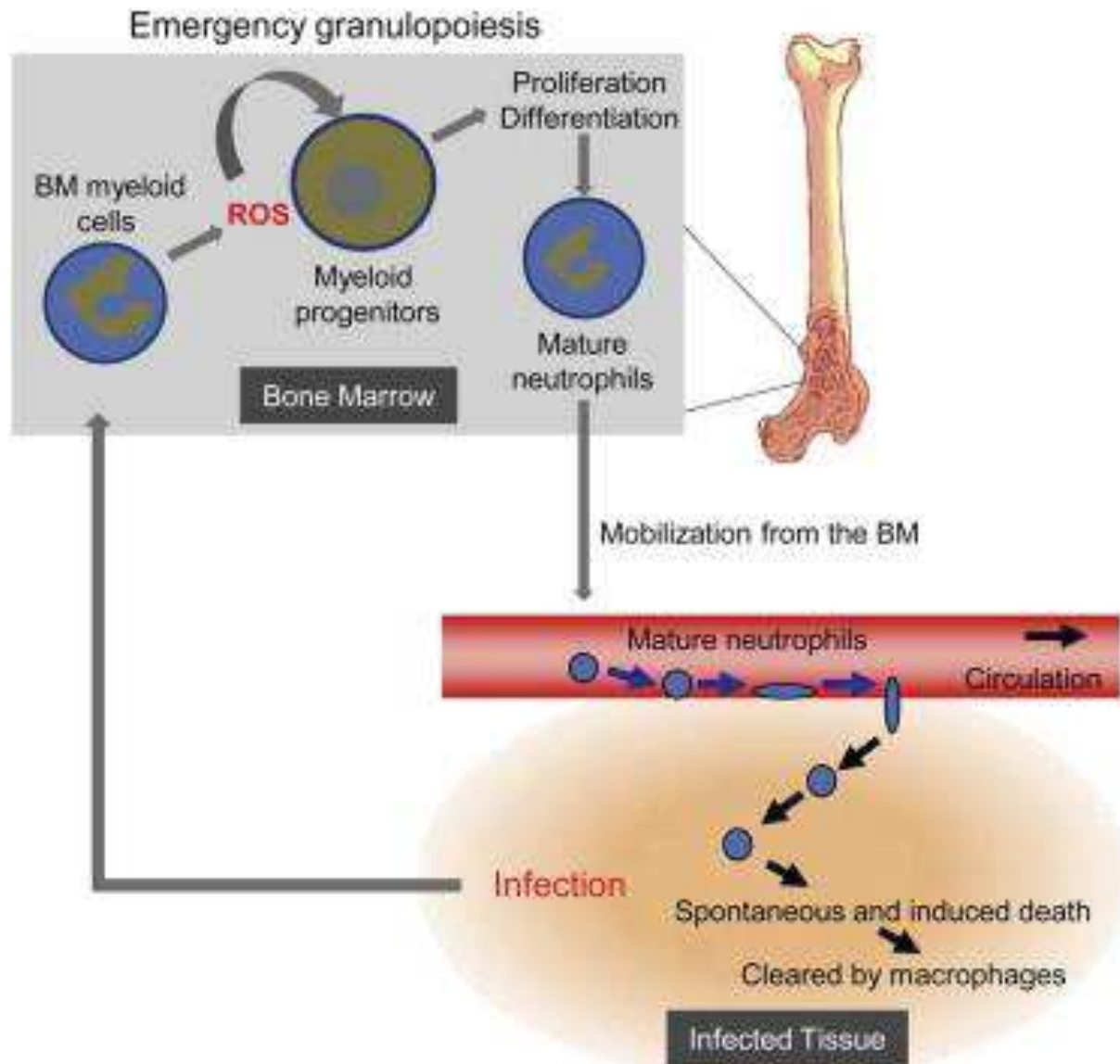


Figure 5: La réponse immunitaire de l'hôte au cours du sepsis fait intervenir des versants pro- et anti-inflammatoires, respectivement appelés syndrome inflammatoire de réponse systémique (SIRS) et syndrome de réponse anti-inflammatoire compensatoire (CARS, *compensatory antiinflammatory response syndrome*). Le SIRS fait intervenir des cytokines pro-inflammatoires, ainsi qu'une polarisation pro-inflammatoire des cellules immunitaires (M1 pour les macrophages, Th1 pour les lymphocytes), menant à des lésions tissulaires, impliquant une dysfonction endothéliale, et pouvant entraîner des défaillances d'organes aigus. Le CARS s'accompagne d'une réponse cytokinique et d'une polarisation cellulaire anti-inflammatoires (M2 pour les macrophages, Th2 pour les lymphocytes), débouchant *in fine* sur un état d'immunosuppression post-sepsis. **Réalisation personnelle (Clere-Jehl et al., 2020).**

### **c. La myélopoïèse d'urgence**

Le déploiement des cellules immunitaires contre un agent pathogène requiert la production rapide et massive de cellules myéloïdes de l'immunité innée, en particulier les polynucléaires neutrophiles. Ce processus nommé « myélopoïèse d'urgence » ou « granulopoïèse d'urgence » (Manz and Boettcher 2014) (Figure 6) est principalement déclenché par l'activation des TLR (Boettcher, et al. 2014) et par la production d'espèces réactives de l'oxygène sur le site infectieux par les macrophages (Kwak, et al. 2015), puis médié par la production de G-CSF et de MIP-2 (CXCL2) (Nguyen-Jackson, et al. 2012). Le G-CSF est produit par les cellules souches hématopoïétiques et par les cellules endothéliales (Boettcher, et al. 2014). L'activation du récepteur au G-CSF provoque la phosphorylation de STAT3 par JAK1-2 et Tyk2 au sein des cellules souches hématopoïétiques, ce qui induit leur prolifération (Zhang, et al. 2010). STAT3 contrôle l'expression de CCAAT-enhancer-binding protein  $\beta$  (C/EBP $\beta$ ), qui est un facteur-clé dans la réponse hématopoïétique d'urgence et augmente l'expression des gènes c-Myc (qui stimule la prolifération cellulaire) et Fanconi C (FANCC) ; ce dernier gène codant pour la protéine (FANCC) ayant pour rôle de réparer l'ADN afin de maintenir la viabilité des cellules myéloïdes au cours de cette myélo-prolifération d'urgence (Shah, et al. 2018).

De façon concomitante, on note une activation de la thrombopoïèse dans la moelle osseuse, par sécrétion de thrombopoïétine, secondairement à l'activation des TLR par certains PAMPs, dont TLR4 par le LPS (Stohlawetz, et al. 1999). TLR4 joue un rôle dans la maturation des mégacaryocytes et donc dans la fabrication des plaquettes libérées dans la circulation sanguine (Beaulieu and Freedman 2010).



**Figure 6: La myélopoïèse d'urgence.** Les espèces réactives de l'oxygène produites sur le site infectieux déclenchent la prolifération puis la différenciation des progéniteurs myéloïdes situés dans la moelle osseuse. Les polynucléaires neutrophiles, une fois arrivés à maturités, vont être mobilisés depuis la moelle osseuse jusqu'au site infectieux *via* la circulation sanguine. **Issu de Kwak et al., 2015.**

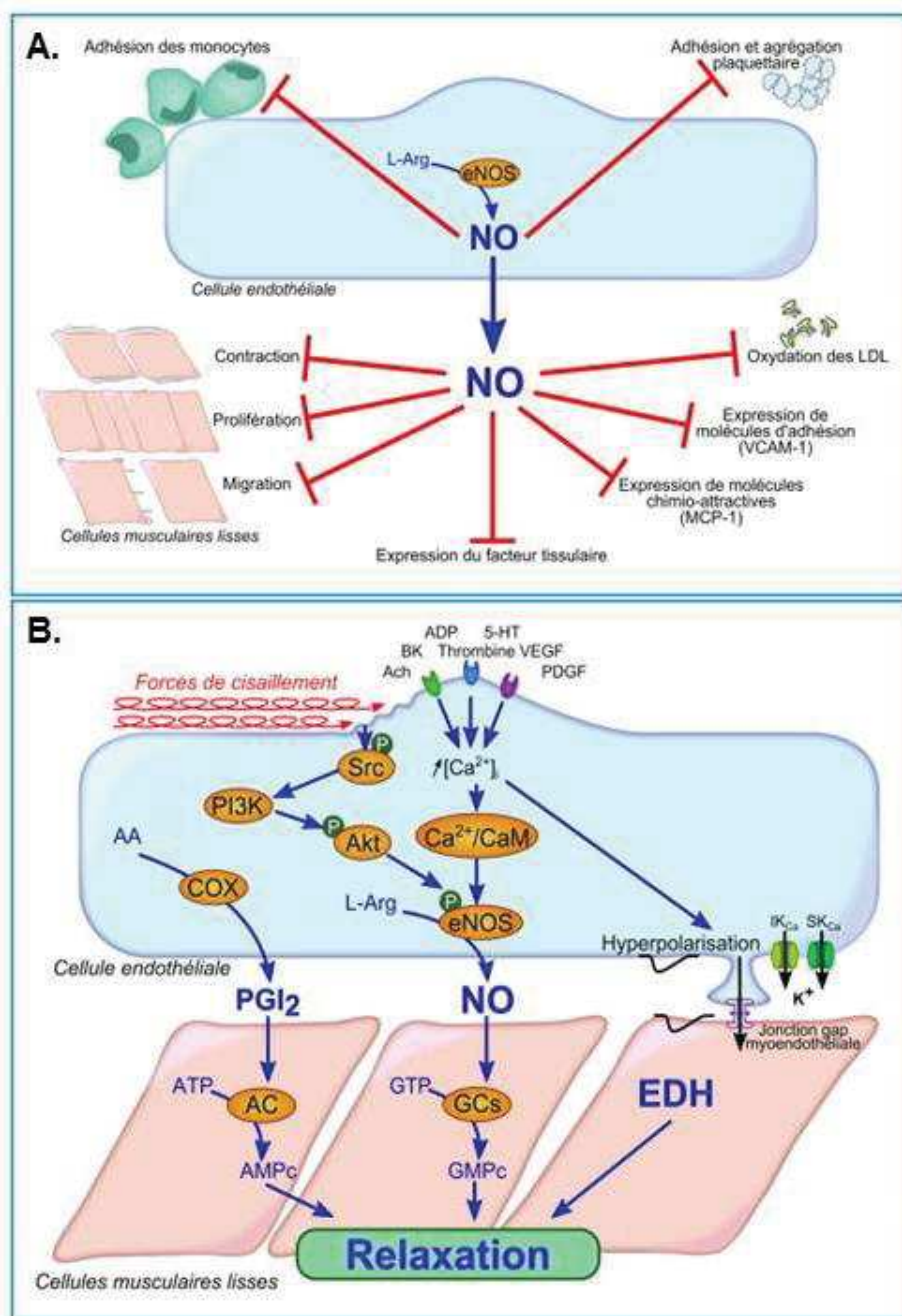
De plus les TLR2 et TLR4 plaquettaires sont directement impliqués dans l'activation plaquettaire au cours du sepsis (Blair, et al. 2009; Zhang, et al. 2009), elle-même en lien étroit avec l'initiation de la coagulation et l'activation endothéliale au cours du sepsis.

#### **d. L'activation et la dysfonction endothéliales au cours du choc septique**

L'endothélium vasculaire se situe au carrefour entre plusieurs fonctions capitales pour l'hôte au cours du sepsis. En particulier, l'endothélium est impliqué dans le maintien de la fonction circulatoire, dans l'hémostase primaire et secondaire et dans l'immunité (Pons, et al. 2020). Au cours du sepsis, on peut observer tout d'abord une activation endothéliale, qui correspond à une réponse adaptée de l'endothélium vasculaire, mais qui peut évoluer vers une réelle dysfonction endothéliale lorsque les capacités d'adaptation endothéliales sont dépassées (Boisrame-Helms, et al. 2013).

#### **L'endothélium à l'état basal**

A l'état basal, l'endothélium assure un rôle de barrière semi-perméable entre les compartiments intra- et extravasculaire, en maintenant les cellules sanguines et un grand nombre de protéines dans le compartiment intravasculaire, tout en autorisant la perméabilité nécessaire à la régulation de la balance hydro-électrolytique entre les deux compartiments (Rodrigues and Granger 2015). En conditions physiologiques, l'endothélium possède également des propriétés anti-agrégantes et anticoagulantes et participe au maintien du tonus vasculaire par interaction avec les cellules musculaires lisses de la média (Boisrame-Helms, et al. 2013). En effet, la réponse des cellules endothéliales est indissociable de celle des cellules musculaires lisses vasculaires en raison d'une communication intercellulaire très élaborée entre ces deux types de cellules. Cette signalisation intercellulaire fait intervenir des molécules vaso-actives telles que le monoxyde d'azote (NO<sup>\*</sup>) et les prostaglandines, mais également des mécanismes électrophysiologiques tels que l'hyperpolarisation dépendante des cellules endothéliales (EDH, *endothelium-dependant hyperpolarization*) (Feletou, et al. 2003).



**Figure 7 : Principaux médiateurs moléculaires des cellules endothéliales à l'état physiologique. A. Rôle central du NO dans l'homéostasie vasculaire.** Le NO est produit par la NO synthase endothéliale (eNOS) et exerce à la surface lumineuse des cellules endothéliales un rôle anti-adhérent pour les monocytes et les plaquettes, et anti-agrégant plaquettaire ; il inhibe également l'expression de molécules chimio-attractives et d'adhésion. Dans la paroi vasculaire, le NO entraîne une relaxation des cellules musculaires lisses. **B. Mécanismes vaso-relaxants dépendants de l'endothélium.** La relaxation des cellules musculaires lisses est dépendante de la production d'AMPc et de GMPc sous le contrôle de la prostacycline (Pgl<sub>2</sub>) et du NO, respectivement. L'hyperpolarisation dépendante des cellules endothéliales exerce également un effet vaso-relaxant. **Issu d'Auger 2014.**

Au niveau moléculaire, le monoxyde d'azote (NO<sup>\*</sup>) est un radical hautement diffusible jouant un rôle central dans l'homéostasie vasculaire (Figure 7A). Les cellules endothéliales expriment constitutivement la NO<sup>\*</sup> synthase endothéliale (eNOS), qui produit le NO<sup>\*</sup> à partir de la L-arginine, en ajustant la quantité produite en fonction des besoins (Auger 2014). Ainsi, le NO<sup>\*</sup> régule le tonus vasculaire en entraînant la relaxation des cellules musculaires lisses vasculaires, *via* la production de GMPc (guanosine 3',5' monophosphate cyclique) par activation de la guanylyl cyclase soluble. Le NO<sup>\*</sup> a également un rôle dans l'inhibition de l'adhésion et de l'agrégation plaquettaire, ce qui empêche le déclenchement du processus d'hémostase primaire en situation physiologique. De façon complémentaire, le NO<sup>\*</sup> inhibe l'expression du facteur tissulaire, assurant ainsi un rôle anticoagulant à l'état basal. Enfin, le NO<sup>\*</sup> joue également un rôle antiinflammatoire en situation physiologique, en inhibant l'expression de molécules d'adhésion leucocytaire (ex : VCAM-1, *vascular cell adhesion molecule 1*) et de molécules chimio-attractives telles que MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*), également appelée CCL2 (*chemokine ligand 2*).

Le NO<sup>\*</sup> est accompagné dans ses rôles de vasodilatateur et d'inhibiteur de l'agrégation plaquettaire par la prostacycline (PGI<sub>2</sub>, prostaglandine I<sub>2</sub>) (Figure 7B), membre de la famille des eicosanoïdes et produite par les cellules endothéliales à partir de l'acide arachidonique, lui-même obtenu à partir des phospholipides membranaires par la phospholipase A2. L'acide arachidonique est transformé en deux étapes en prostacycline, par action successive de la cyclo-oxygénase 1 (COX1) puis de la PGI<sub>2</sub> synthase (Stitham, et al. 2011). La prostacycline libérée par les cellules endothéliales diffuse ensuite vers les cellules musculaires lisses, où elle provoque



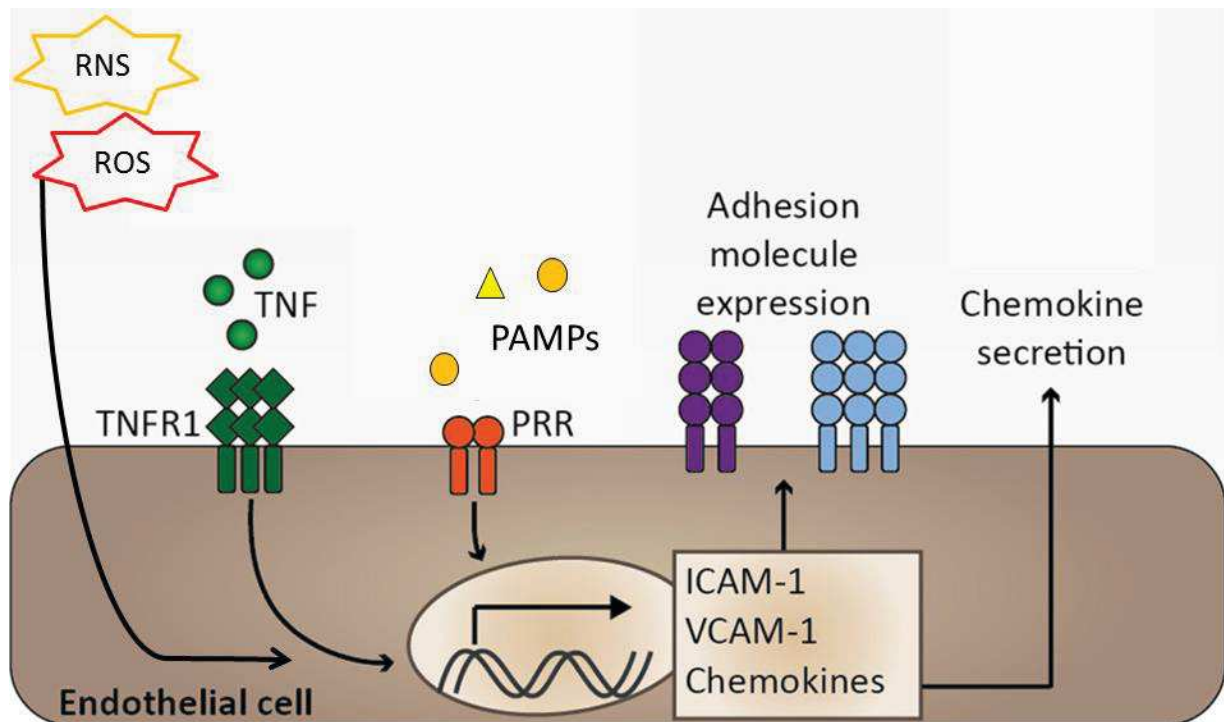
l'activation de l'adénylyl cyclase et donc la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) entraînant une vasodilatation par relaxation des muscles lisses.

Enfin, la régulation du tonus vasculaire fait intervenir un troisième acteur : l'hyperpolarisation dépendante des cellules endothéliales (EDH, *endothelium-dependant hyperpolarization*) (Figure 7B), qui se définit par une hyperpolarisation de la cellule endothéliale secondaire à l'activation de canaux potassiques calcium-dépendants. En utilisant les jonctions gap myoendothéliales, cette hyperpolarisation est transmise aux cellules musculaires lisses vasculaires par couplage électrique et entraîne leur relaxation en réduisant la facilité d'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants (Feletou 2016).

En situation pathologique, chacun de ces mécanismes de régulation subit des modifications qui, en fonction de la nature et de l'intensité du stress cellulaire occasionné, participent à une réponse endothéliale adaptée (activation endothéliale), ou inadaptée et dépassée (dysfonction endothéliale).

### **Activation endothéliale au cours du sepsis**

Les cellules endothéliales sont parfois considérées comme des cellules immunitaires innées « conditionnelles », en raison de leur capacité à s'activer en réponse à l'invasion d'un agent pathogène (106), cette activation se traduisant par la capacité à recruter les cellules immunitaires et à interagir avec elles.



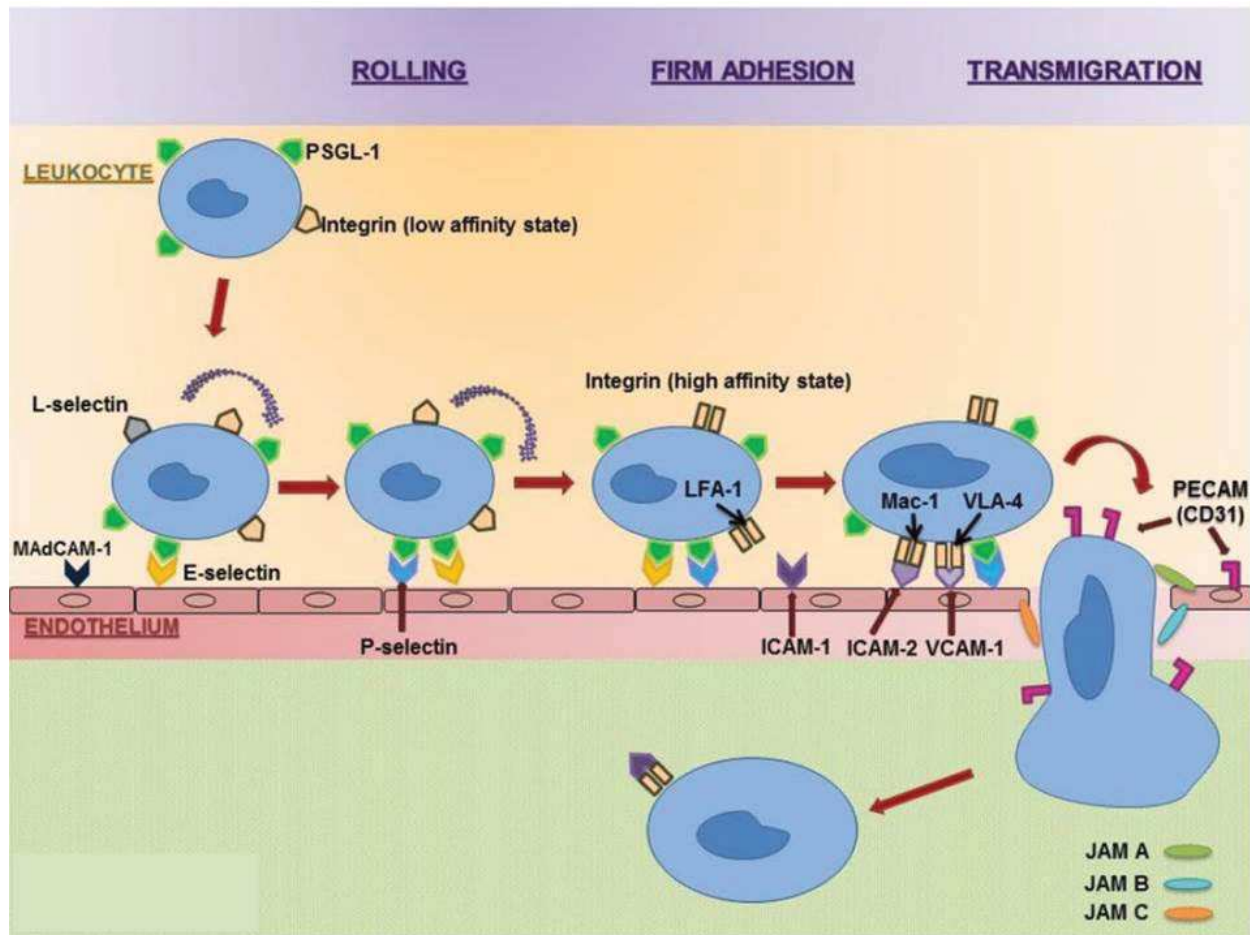
**Figure 8 : Les facteurs déclenchants de l'activation endothéliale** sont essentiellement les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS), les cytokines pro-inflammatoires (ex : TNF) et les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs). L'activation endothéliale est marquée par l'expression de molécules d'adhésion. **Adapté de Dunst et al., 2017.** Abréviations : ICAM, intercellular adhesion molecule ; PAMP, pathogen associated molecular pattern ; PRR, pattern recognition receptor ; TNF, tumor necrosis factor ; VCAM, vascular cell adhesion molecule.

Au cours du sepsis, on note principalement trois types de facteurs capables de déclencher l'activation endothéliale (Figure 8) : l'activation des PRRs endothéliaux par les PAMPs, la réponse de l'endothélium aux cytokines pro-inflammatoires et l'exposition des cellules endothéliales aux espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS). Parmi les PRRs, les cellules endothéliales expriment de façon constitutive les TLR1 à 6 et le TLR9, ce qui permet l'activation directe des cellules endothéliales par les PAMPs tels que le peptidoglycane *via* TLR2, le LPS *via* TLR4 ou encore les motifs hypométhylés (motifs CpG) d'ADN bactérien *via* TLR9 (Khakpour, et al. 2015). Les cytokines pro-inflammatoires libérées lors du SIRS sont également capables d'activer directement les cellules endothéliales, exposées en première ligne

à l'orage cytokinique par le flux sanguin. Cette capacité d'activation directe des cellules endothéliales par les cytokines pro-inflammatoires a été montrée pour le TNF (Liang, et al. 2014) et l'IL-6 (Watson, et al. 1996). Enfin, les ROS ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ , HOCl) et les RNS ( $NO^{\cdot}$ ,  $ONOO^{\cdot-}$ ) produites par les cellules immunitaires telles que les macrophages et les PNN pour combattre l'agent pathogène exercent également un rôle majeur dans l'activation de l'endothélium vasculaire (Huet, et al. 2011).

Tout d'abord, les ROS en quantité faible ou modérée stimulent la survie de la cellule endothéliale, en particulier par la voie du facteur de transcription Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) et par la réponse UPR (*unfolded protein response*) (Ma 2013). De plus, les ROS et RNS ont un impact sur le tonus vasculaire, majoritairement dans le sens d'une vasodilatation dans le cas d'une infection. En effet le  $NO^{\cdot}$ , en particulier, joue un rôle vasodilatateur dont la fonction physiologique est de favoriser l'afflux des médiateurs moléculaires et des cellules de l'immunité sur le site de l'infection et de l'inflammation. Cet effet vasodilatateur est renforcé par plusieurs dérivés de l'acide arachidonique (eicosanoïdes) : les prostaglandines E2 et I2, produites par les cyclooxygénases (COX) 1 (constitutive) et 2 (inductible) (Ricciotti and FitzGerald 2011). D'autres eicosanoïdes, en particulier les leucotriènes produits par les lipooxygénases, ont un rôle chimiotactique vis-à-vis des leucocytes, et parfois vasoconstricteur (Back 2007).

L'activation des cellules endothéliales se traduit par l'expression de molécules d'adhésion et est donc en lien étroit avec l'activation des leucocytes et des plaquettes, qui interagissent étroitement avec l'endothélium au cours du sepsis. On reconnaît trois grandes familles de molécules d'adhésion participant à cette interaction (Figure 9) : les sélectines, les intégrines, et les molécules appartenant à la superfamille des immunoglobulines (Ig) (Boisrame-Helms, et al. 2013).



**Figure 9: Molécules impliquées dans l'adhésion des leucocytes à l'endothélium.** L'expression des sélectines entraîne le « rolling » et l'adhésion des plaquettes et des leucocytes à l'endothélium. L'intervention d'autres molécules d'adhésion (VCAM-1, ICAM-1 et ICAM-2) est nécessaire à la diapédèse. **Issu de Chae et al. 2018.**

Les sélectines sont des glycoprotéines transmembranaires exprimées par les plaquettes (sélectine P), les leucocytes (sélectine L) et les cellules endothéliales (sélectine E), certaines sélectines pouvant être exprimées par des types cellulaires différents. Ainsi, les sélectines E et P sont toutes deux exprimées à la surface des cellules endothéliales, mais seulement en cas d'activation. Leur présence est donc le témoin d'une activation endothéliale, qui se traduit par l'adhésion des leucocytes et des plaquettes. Si l'adhésion initiale des leucocytes ainsi que la phase de roulement sur la paroi vasculaire (« *rolling* ») sont le fait des sélectines, la diapédèse, qui

correspond à la migration des leucocytes entre les cellules endothéliales des microvaisseaux, nécessite l'intervention d'autres molécules d'adhésion (McEver and Zhu 2010).

Parmi ces molécules, les protéines VCAM-1, ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule*) et ICAM-2 appartiennent à la superfamille des Ig et possèdent dans leur partie extracellulaire des domaines analogues aux chaînes lourdes et légères des Ig. Ces récepteurs sont exprimés, entre autres, à la surface des cellules endothéliales activées et ont pour ligands les intégrines exprimées par les leucocytes. Les intégrines sont des associations de chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  formant des hétérodimères, dont la composition détermine l'affinité pour leur récepteur respectif. Ainsi, les intégrines des neutrophiles et des monocytes comportant une chaîne  $\beta 2$  (CD18) interagissent avec ICAM-1 et -2 exprimées par les cellules endothéliales activées. A noter qu'ICAM-1 n'est exprimé sur les cellules endothéliales qu'à la suite de leur activation, tandis qu'ICAM-2 est constitutivement présente à la surface de l'endothélium (Durand 1992). Les lymphocytes expriment l'intégrine VLA-4 (*very late antigen-4*), qui comporte une chaîne  $\beta 1$  (CD29) et interagissent avec VCAM-1 (Zonneveld, et al. 2014).

### **Dysfonction endothéliale au cours du sepsis**

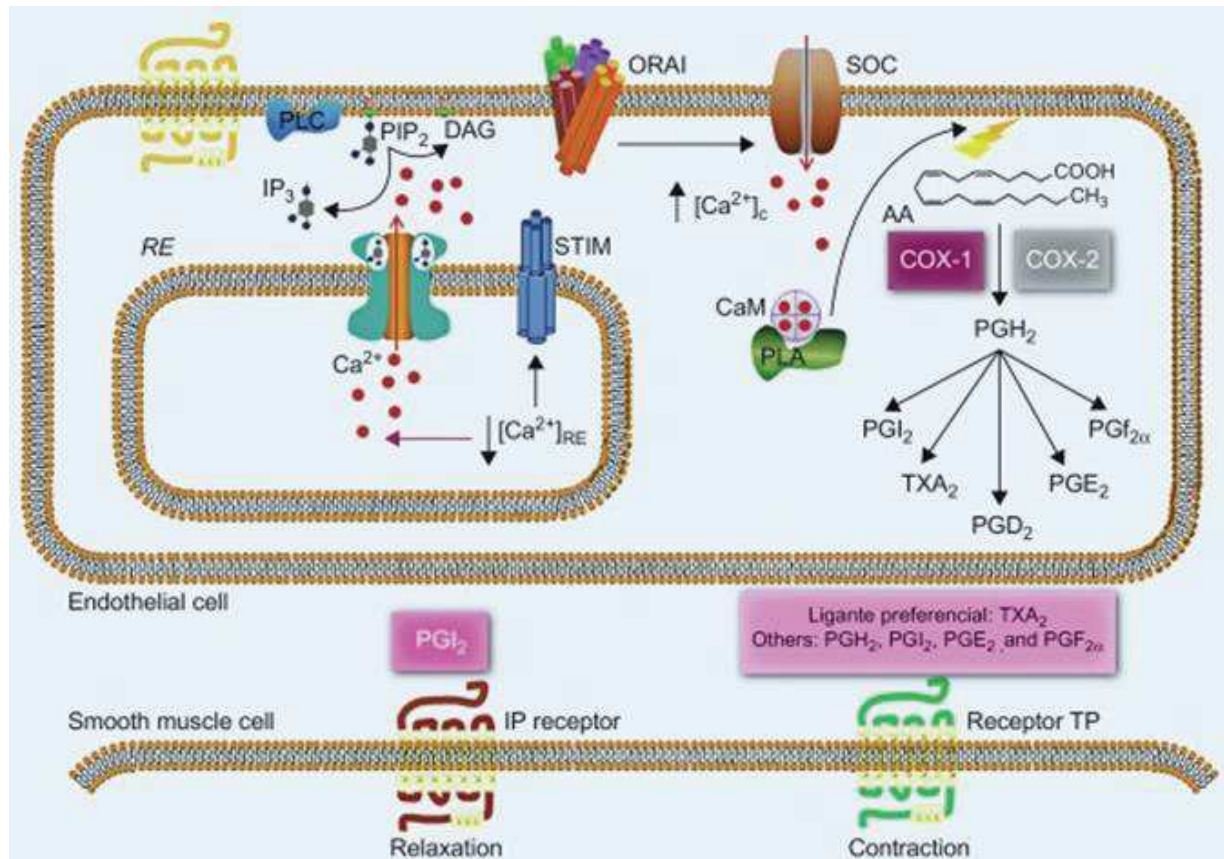
L'adhésion, puis la migration leucocytaire parfois massives médiées par ces mécanismes, jouent un rôle capital dans le passage d'un état d'activation endothéliale à un état de réelle dysfonction endothéliale. La dysfonction endothéliale joue un rôle-clé dans l'altération hémodynamique et la survenue du syndrome de défaillance multi-viscérale au cours du sepsis par quatre mécanismes principaux : la fuite capillaire, la dérégulation des mécanismes vasomoteurs, la migration leucocytaire et la participation à la coagulopathie (Boisrame-Helms, et al. 2013).

Cette dysfonction endothéliale est directement impliquée dans l'hypovolémie observée lors du sepsis. Tout d'abord, le passage des leucocytes à travers l'endothélium participe à la genèse d'une hyperperméabilité capillaire, qui va entraîner l'extravasation d'eau, d'ions et de petites molécules du compartiment sanguin vers le compartiment extracellulaire. Cette atteinte directe de la barrière endothéliale, dont nous détaillons plus bas les mécanismes d'aggravation (par les ROS et RNS notamment), engendre une part d'hypovolémie absolue (Lee and Slutsky 2010).

La part de l'hypovolémie relative repose sur un mécanisme distributif, par une dérégulation majeure des différents mécanismes vasomoteurs (Vincent and De Backer 2005). On observe en effet une hétérogénéité de la réponse vasculaire au cours du choc septique. Si la majorité des vaisseaux fait l'objet d'une vasodilatation, on peut également observer une vasoconstriction dans d'autres zones, en particulier dans les tissus périphériques ; le but de cette vasoconstriction périphérique étant de redistribuer le flux sanguin vers les organes vitaux. Bien que cette redistribution soit souvent adaptée à la phase initiale du sepsis, la dérégulation des différents mécanismes vasomoteurs a donc deux types de conséquences, paradoxales, aggravant toutes les deux l'hypoxie tissulaire : *i.* l'altération de la microcirculation dans les zones faisant l'objet d'une vasoconstriction, cette dernière pouvant *in fine* toucher même les organes nobles une fois la dysfonction endothéliale installée ; *ii.* la vasoplégie induite par la tendance globale à la vasodilatation, ce qui occasionne une hypotension artérielle sévère et participe à l'hypoperfusion globale.

La vasoconstriction de certaines zones de la microcirculation au cours du sepsis a été observée par vidéomicroscopie, et prouvée par une réversibilité sous acétylcholine (De Backer, et al. 2002). Il a été montré que cette vasoconstriction est capable de toucher différents organes nobles, tels que le rein au cours du sepsis (Badr

1992) et qu'elle met en jeu plusieurs vasoconstricteurs dérivés de l'acide arachidonique et dont la production est induite par la réponse pro-inflammatoire, tels que les leucotriènes C4 et D4, le thromboxane A2 (Boffa, et al. 2004), ou encore les prostaglandines D2, F2 et H2 (Badr 1992) (Figure 10).



**Figure 10 : Les principaux mécanismes vasoconstricteurs au cours du sepsis sont des agents dérivés de l'acide arachidonique** (lui-même dérivés des phospholipides de la membrane cellulaire sous l'action des phospholipases A et C), ces agents étant produits au niveau de la cellule endothéliale par les COX1 et 2: les leucotriènes C4 et D4, le thromboxane A2, les prostaglandines D2, F2 et H2, dont plusieurs agissent *via* le récepteur du thromboxane présent sur les cellules musculaires lisses. **Issu de Cau 2018.** Abréviations : AA, acide arachidonique ; CaM, calmoduline ; COX, cyclooxygénase ; DAG, diacylglycérol ; IP<sub>3</sub>, 1,4,5-inositol triphosphate ; IP receptor, récepteur de la prostaglandine I<sub>2</sub> ; PG, prostaglandine ; PIP<sub>2</sub>, phosphatidylinositol-4,5-biphosphate ; PLA, phospholipase A ; PLC, phospholipase C ; TP receptor, récepteur du thromboxane ; Tx, thromboxane.

L'endothéline-1, produite par les cellules endothéliales, joue également un rôle vasoconstricteur au cours du sepsis, parfois responsable d'une hypoperfusion rénale

(Badr 1992) et hépatique (Kaffarnik, et al. 2017). Cette vasoconstriction est une des explications principales quant à la survenue de défaillances viscérales parfois décrites en dehors d'une réelle défaillance hémodynamique au cours du sepsis.

Toutefois, ces mécanismes vasoconstricteurs sont plutôt minoritaires, ou localisés, tandis que la tendance globale est en faveur de la vasodilatation et de la vasoplégie au cours du choc septique. Contrairement au cas d'une situation localisée où la vasodilatation favorise un recrutement adapté des cellules immunitaires sur le site de l'infection, la tendance générale à la vasoplégie lors du choc septique occasionne une hypotension artérielle sévère aggravant l'hypoxie tissulaire. Parmi les mécanismes invoqués quant à cette vasoplégie induite par le sepsis, la majorité est sous l'influence directe de l'endothélium (Jeanneret 2011) : on peut citer les effets vasodilatateurs du NO<sup>•</sup>, du peroxy-nitrite (ONOO<sup>-</sup>), de la prostacycline produite par la COX2, de la kynurénine, mais aussi l'ouverture des canaux potassiques ATP-dépendants induisant l'hyperpolarisation des cellules endothéliales et subséquemment des cellules musculaires lisses (EDH) (Figure 11).

Le rôle vasodilatateur du NO<sup>•</sup> est primordial en contexte de sepsis et sa production est accrue par la NO<sup>•</sup> synthase inductible (iNOS) exprimée en particulier par les macrophages, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et par la NO<sup>•</sup> synthase neuronale (nNOS). Toutefois, le NO<sup>•</sup> n'est pas la seule RNS vasodilatatrice, son potentiel étant renforcé par son dérivé, le peroxy-nitrite (ONOO<sup>-</sup>), formé par réaction immédiate du NO<sup>•</sup> avec l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>). O<sub>2</sub><sup>•-</sup> provient de plusieurs sources lors du sepsis : *i.* extracellulaire *via* les canaux chlorure ClC-3 (Fisher 2009), et *ii.* intracellulaire par réduction partielle de l'oxygène au niveau des mitochondries, ainsi que par les enzymes NADPH oxydase (NOX) et xanthine oxydase (XO), toutes deux surexprimées par les cellules endothéliales sous l'effet des

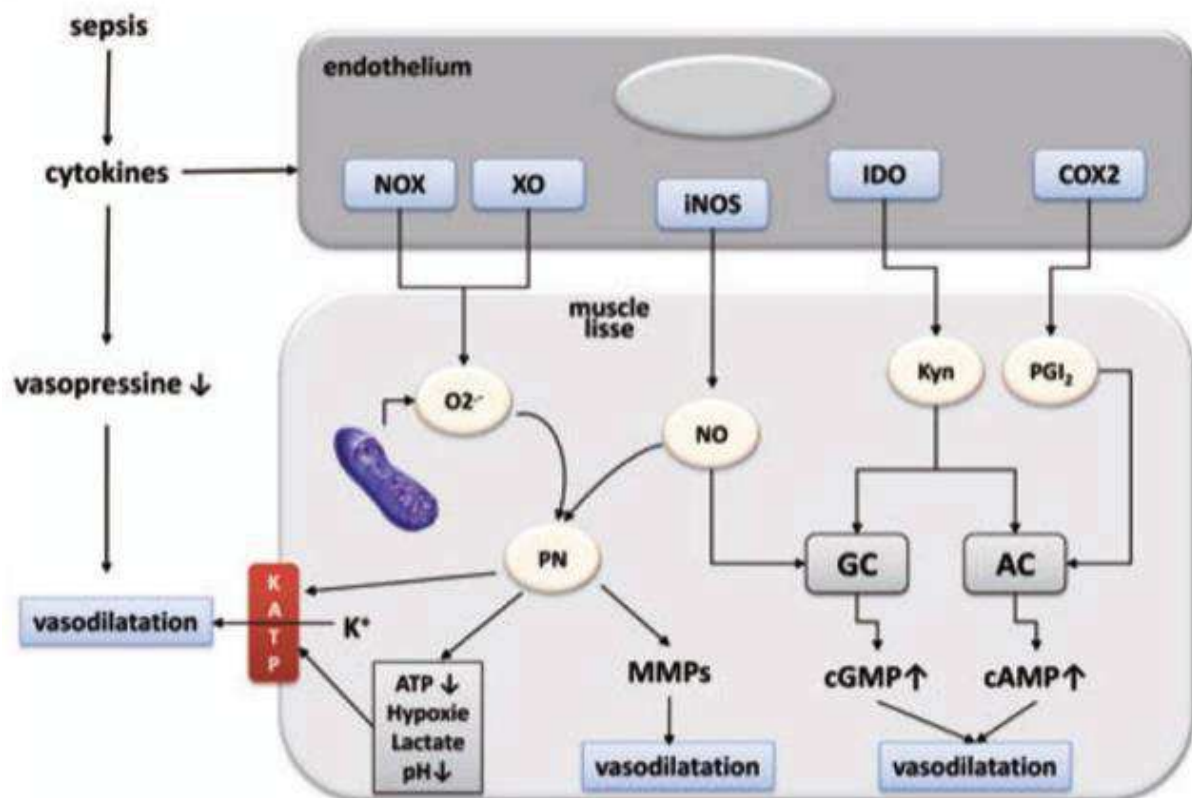


cytokines proinflammatoires (Jeanneret 2011). La vasoplégie induite par le peroxy-nitrite ( $\text{ONOO}^-$ ) repose sur plusieurs mécanismes, impliquant la défaillance bioénergétique des cellules musculaires lisses (avec production de lactate et diminution de la production d'ATP), l'hyperpolarisation de ces cellules par sortie de potassium *via* l'ouverture des canaux potassiques ATP-dépendants, l'activation des métalloprotéinases de matrice entraînant une vasorelaxation, l'altération des catécholamines et de leurs récepteurs (Jeanneret 2011).

Parmi les autres mécanismes vasodilatateurs impliquant l'endothélium, la kynurénine est produite par l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) inductible au niveau des cellules endothéliales (Wang, et al. 2010a) par conversion du tryptophane, lors de la phase pro inflammatoire. L'IDO est positivement régulée par l'IFN- $\gamma$  (Hassanain, et al. 1993). La kynurénine produite par l'IDO a la propriété de relaxer les cellules musculaires lisses vasculaires en activant la guanylyl cyclase et l'adenylyl cyclase (Jeanneret 2011).

Le déficit en vasopressine observé lors du sepsis participe également à la vasoplégie. En effet, un déficit en arginine-vasopressine (hormone antidiurétique) est observé lors du sepsis, par déplétion des stocks hypophysaires, pour des raisons mal connues. L'effet vasoconstricteur médié par les récepteurs V1a des cellules musculaires lisses vasculaires n'est donc plus assuré. Si l'endothélium n'intervient pas directement dans l'effet de la vasopressine, l'effet vasoconstricteur de celle-ci s'appuie néanmoins sur sa capacité à inhiber les canaux potassiques ATP-dépendants et la production de  $\text{NO}^*$ , ce qui exerce donc un effet indirect sur l'endothélium (Jeanneret 2011).

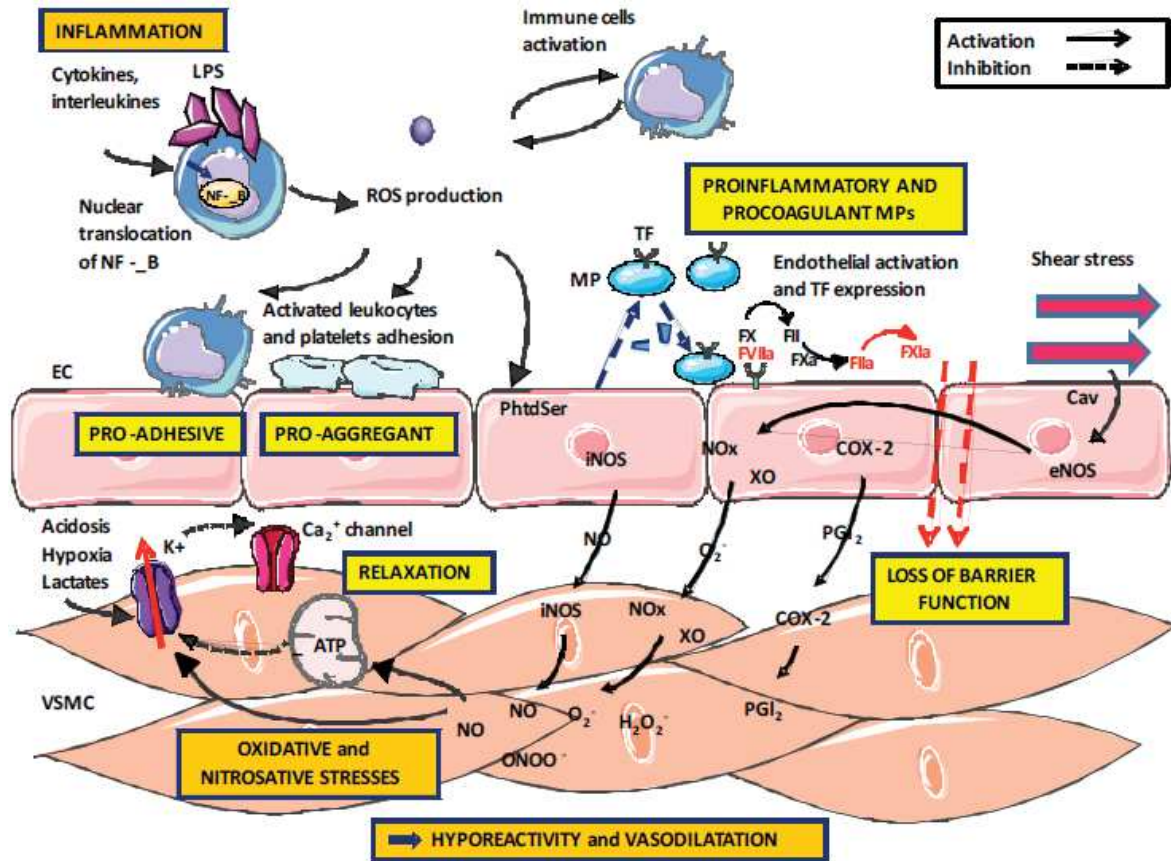
L'adhésion et la migration leucocytaires à travers l'endothélium sont également à l'origine de lésions endothéliales et tissulaires. En effet, les leucocytes recrutés produisent d'importantes quantités de ROS ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ , HOCl) et de RNS ( $NO^{\cdot}$ ,  $ONOO^-$ ), de protéases et d'enzymes cytotoxiques, qui jouent un rôle majeur dans la physiopathologie de la dysfonction endothéliale.



**Figure 11 : Mécanismes physiopathologiques de la vasoplégie au cours du sepsis.** La plupart des facteurs vasodilatateurs sont sous l'influence de l'endothélium, tels que le  $NO^{\cdot}$ , le peroxynitrite ( $ONOO^-$ ), la prostacycline ( $PGI_2$ ) produite par la COX2, la kynurénine, mais aussi l'ouverture des canaux potassiques ATP-dépendants induisant l'hyperpolarisation des cellules endothéliales et subséquentement des cellules musculaires lisses (EDH). On note également un déficit en vasopressine, indépendant de l'endothélium. **Issu de Jeanneret 2011.**

La libération excessive de ROS et de RNS dépasse les défenses antioxydantes des cellules endothéliales, ce qui aboutit à des lésions cellulaires sévères, non seulement par atteinte directe de la membrane plasmique du fait de l'interaction avec les lipides et les protéines membranaires, mais également par déclenchement de

l'apoptose par la voie extrinsèque. En effet, les ROS sont capables d'activer plusieurs types de récepteurs de mort cellulaire, dont Fas, TRAIL-R1/2 (*TNF related apoptosis inducing ligand – receptor 1/2*) et TNF-R1 (Redza-Dutordoir and Averill-Bates 2016).



**Figure 12 : La dysfonction endothéliale au cours du sepsis participe à 4 phénomènes physiopathologiques majeurs au cours du choc septique : la vasoplégie par relaxation des cellules musculaires lisses, la perte de la fonction barrière, la perte des propriétés anti-adhérentes et anti-agrégantes pour les plaquettes, et l'état pro-coagulant menant à la coagulopathie septique. Issu de Boisrame-Helms *et al.* 2013.**

Les ROS peuvent également pénétrer à l'intérieur de la cellule, tels que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *via* les aquaporines et O<sub>2</sub><sup>-</sup> *via* les canaux chlorure ClC-3 (Fisher 2009). A l'intérieur de la cellule, les ROS peuvent causer des lésions aux organites tels que la mitochondrie et induire des modifications chimiques des protéines produites par la cellule endothéliale. Les ROS peuvent également créer des dommages directs aux ARNm ou

encore à l'ADN, mais jouent surtout un rôle de signalisation intracellulaire. Les ROS présents en grande quantité sont donc, de surcroît, capables d'induire l'apoptose par la voie intrinsèque (Simon, et al. 2000). Ainsi, les lésions induites par les ROS empruntent des mécanismes multiples et peuvent aboutir à la mort cellulaire, par apoptose ou par nécrose. Ces dommages cellulaires ont lieu non seulement au niveau de l'endothélium et des tissus bordés par l'endothélium vasculaire, mais également au niveau des cellules musculaires lisses sous-jacentes.

Enfin, en plus de sa participation majeure dans les altérations circulatoires au cours du sepsis (Zafrani, et al. 2015), ainsi que dans la migration leucocytaire et ses conséquences, la dysfonction endothéliale joue un rôle considérable dans l'initiation de la coagulopathie induite par le choc septique (Boisrame-Helms, et al. 2013) (Figure 12).

#### **e. La coagulopathie induite par le choc septique et la CIVD**

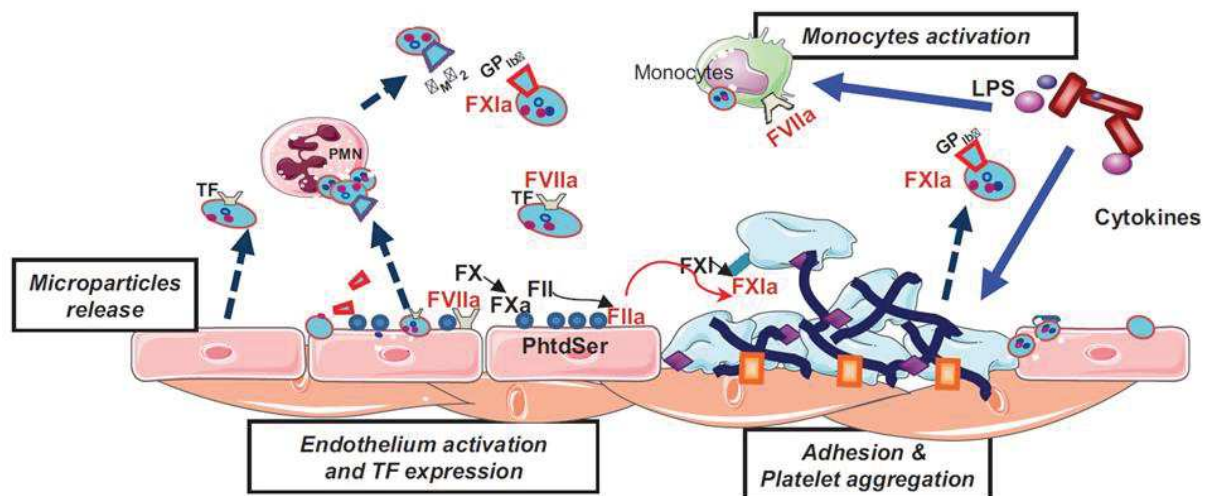
La présence d'une dysfonction endothéliale est associée à la survenue et à la sévérité de la coagulopathie associée au sepsis et donc à l'évolution vers une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) (Walborn, et al. 2019) qui aggrave le pronostic (Okamoto, et al. 2016) chez 30 à 40% des patients atteints de choc septique (Bakhtiari, et al. 2004; Dhainaut, et al. 2004).

#### **L'activation de la coagulation**

La coagulopathie et la CIVD résultent d'une activation excessive et dérégulée de la coagulation, provoquant d'une part la formation de micro-caillots dans les capillaires de manière disséminée, conduisant à l'aggravation de l'hypoxie et des lésions tissulaires et exposant d'autre part à un risque hémorragique par

consommation des facteurs de coagulation et des plaquettes (Levi and Scully 2018). Bien que la CIVD soit une complication bien décrite de la phase pro-inflammatoire du sepsis, les mécanismes moléculaires reliant l'hyper-inflammation à l'initiation de la cascade de la coagulation sont encore débattus (Levi and van der Poll 2010).

Sous l'influence de plusieurs médiateurs pro inflammatoires, plusieurs types de cellules sur-expriment le facteur tissulaire (Pawlinski and Mackman 2010), dont les plaquettes, les monocytes activés et les cellules endothéliales (Figure 13). En raison des lésions endothéliales induites par le sepsis, le facteur tissulaire présent dans les structures sous-endothéliales est également exposé (Osterud and Bjorklid 2001) (Figure 14).



**Figure 13 : Expression du facteur tissulaire et initiation de la cascade de la coagulation par la voie extrinsèque.** Le facteur tissulaire (TF) exprimé par les plaquettes, les monocytes et les cellules endothéliales activés, ainsi que par les structures sous-endothéliales exposées par les lésions endothéliales, se lie au facteur VII et l'active, ce qui active secondairement les facteurs X puis II, le facteur IIa constituant la thrombine, qui transforme le fibrinogène en un caillot de fibrine. **Issu de Meziani et al. 2010.**

En parallèle, plusieurs types de cellules activées, dont les plaquettes et les cellules endothéliales, externalisent la phosphatidylsérine (Zhang, et al. 2016) qui se

trouve initialement dans le feuillet interne de la membrane plasmique de la cellule au repos. La phosphatidylsérine, une fois externalisée, va catalyser l'activation des facteurs de coagulation, cette capacité étant en partie due à sa charge électrique nette négative (Lentz 2003).

Image protégée par droits d'auteur.

Disponible sur <https://mhemofr.fr/les-pathologies/physiologie-de-lhemostase/>

**Figure 14 : Les voies "intrinsèque" et "extrinsèque" de la coagulation et le rôle de la thrombine.** Chacune des voies de coagulation est en général activée suite à une lésion endothéliale. La voie intrinsèque est activée au contact d'une surface sous-endothéliale électronégative, et débute par l'activation du facteur XII, suivie par l'activation successive des facteurs XI et IX. Le facteur VIII agit ensuite comme cofacteur du facteur IX pour activer le facteur X. La voie extrinsèque, initiée par le facteur tissulaire qui active le facteur VII, active également le facteur X. Le facteur X est ainsi au carrefour entre les deux voies de la coagulation, et, en présence du facteur Va, active le facteur II en thrombine (facteur IIa). **Issu de Bazin et al.**

Cette exposition intraluminale du facteur tissulaire et de phosphatidylsérine au sein des microvaisseaux joue un rôle-clé dans l'initiation de la cascade de la coagulation (Meziani, et al. 2010), par la voie dite « extrinsèque » (Figure 13 et 14).

Cette voie est ainsi nommée car elle est activée par le facteur tissulaire, qui n'est pas physiologiquement présent dans la circulation sanguine, mais est exposé ou libéré surtout en cas de lésion endothéliale, à l'instar du sepsis. Ainsi, le facteur tissulaire lie et active son ligand : le facteur VII. Le complexe formé par le facteur tissulaire et le facteur VII activé (facteur VIIa) entraîne l'activation du facteur X (facteur Stuart), et le facteur Xa active à son tour le facteur II (prothrombine). Le facteur IIa (thrombine) est à l'origine de (Figure 14) : *i.* la transformation du fibrinogène (facteur I) en un caillot de fibrine, initialement soluble, *ii.* l'activation du facteur XIII ayant pour rôle de stabiliser la fibrine en un caillot insoluble, dont la présence définit l'aboutissement du processus de coagulation, et *iii.* l'amplification de la coagulation par la voie dite « intrinsèque », *via* l'activation du facteur XI et du facteur VIII (facteur anti-hémophilique A). La fibrine constitue un maillage capable de retenir les plaquettes activées (Meziani, et al. 2010) (Figure 13).

Le facteur tissulaire et la phosphatidylsérine externalisée sont également présents à la surface des microparticules circulantes d'origine monocyttaire et endothéliale (Meziani, et al. 2010), qui sont impliquées dans la propagation systémique de la coagulation.

### **Le rôle des plaquettes dans la CIVD**

La CIVD s'accompagne d'une forte activation de l'agrégation plaquettaire, ainsi que de l'adhésion plaquettaire à l'endothélium (Figure 15), qui se traduit par une thrombopénie.

Concernant l'agrégation plaquettaire, deux structures moléculaires principales permettent de lier les plaquettes entre elles : le fibrinogène soluble et le facteur von Willebrand (FvW). Les récepteurs plaquettaires capables de lier chacune de ces deux structures moléculaires sont la glycoprotéine GPIIb/IIIa et le complexe plaquettaire glycoprotéique GPIb-IX-V. En effet, les plaquettes expriment une glycoprotéine spécifique, la GPIIb/IIIa, également appelée intégrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , majoritaire pour ces cellules (environ 80000 récepteurs par plaquette) et qui joue un rôle capital dans l'agrégation plaquettaire.

Image protégée par droits d'auteur.

Disponible sur <https://mhemmo.fr/les-pathologies/physiologie-de-lhemostase/>

**Figure 15 : principaux mécanismes de l'adhésion et de l'agrégation plaquettaire.** Après leur activation, les plaquettes subissent un changement conformationnel et expriment plusieurs glycoprotéines (GP) plaquettaires. La GPIIb/IIIa et la GPIb-IX-V permettent l'agrégation des plaquettes entre elles, par l'intermédiaire du fibrinogène soluble et du facteur von Willebrand (FvW). Le FvW, liant les plaquettes par le GPIIb/IIIa, permet également l'adhésion des plaquettes aux structures sous-endothéliales. Les plaquettes adhèrent également aux collagènes de types I et IV du sous-endothélium par la GPIa-IIa. **Issu de Bazin et al.**



Pour les plaquettes au repos,  $\alpha_{IIb}\beta_3$  présente un état de basse affinité ne permettant pas de lier le fibrinogène soluble ni le FvW. L'activation des plaquettes entraîne une modification de la conformation d' $\alpha_{IIb}\beta_3$  (signalisation *inside-out*), qui peut alors lier le fibrinogène soluble et le FvW, ce qui est nécessaire au processus d'agrégation plaquettaire (Missy 2001). Le complexe plaquettaire glycoprotéique GPIb-IX-V permet aux plaquettes de renforcer cette liaison avec le fibrinogène soluble et avec le FvW *via* la sous-unité GPIb $\alpha$ . A noter que cette même sous-unité GPIb $\alpha$  du complexe plaquettaire glycoprotéique GPIb-IX-V permet également de lier à la fois le facteur XI et la thrombine (Baglia, et al. 2002), laquelle va activer le facteur XI et ainsi renforcer le processus de coagulation par la voie dite « intrinsèque » (Figure 14).

Molécules exprimées par les plaquettes	Pont moléculaire	Molécules endothéliales* ou sous-endothéliales#	Références
GPIIb/IIIa	Fibrinogène	ICAM-1* Intégrine $\alpha_v\beta_3$ *	(Bombeli, et al. 1998)
GPIIb/IIIa	Fibronectine	Intégrine $\alpha_v\beta_3$ *	(Bombeli, et al. 1998)
GPIIb/IIIa GPIb $\alpha$	Facteur von Willebrand	Collagène I et IV#	(Bombeli, et al. 1998)
GPIb $\alpha$ PSGL-1	Non	P-sélectine*	(Romo, et al. 1999) (Frenette, et al. 2000)
P-sélectine	Non	Intégrine $\alpha_v\beta_3$ *	(Frenette, et al. 1998)

**Tableau 4 : Principales molécules impliquées dans l'adhésion plaquettaire à l'endothélium\* ou au sous-endothélium#.** Abréviations : GP, glycoprotéine; ICAM-1, intercellular adhesion molecule 1; PSGL-1, P-selectin glycoprotein ligand 1. **Réalisation personnelle.**

Concernant l'adhésion plaquettaire (Tableau 4), celle-ci peut être précédée par un phénomène de « rolling » médié par la sélectine P endothéliale (Frenette, et al. 1995) et utilisant les ligands plaquettaires PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand 1) et GPIb $\alpha$  (Denis 2001). L'adhésion elle-même fait à nouveau intervenir le FvW, qui se lie d'une part au collagène du sous-endothélium lorsque la paroi endothéliale est lésée et d'autre part aux plaquettes par l'intermédiaire de la GPIIb/IIIa, et de la sous-unité GPIb $\alpha$  du complexe plaquettaire glycoprotéique GPIb-IX-V. La GPIIb/IIIa peut également lier la plaquette à l'intégrine endothéliale  $\alpha v\beta 3$  par l'intermédiaire du fibrinogène ou de la fibronectine (Denis 2001). Les plaquettes ont également la propriété d'adhérer directement aux collagènes de types I et IV du sous-endothélium par la glycoprotéine plaquettaire GPIa-IIa, qui correspond à l'intégrine  $\alpha 2\beta 1$ , la chaîne  $\alpha 2$  comprenant un domaine homologue au domaine du FvW liant le collagène.

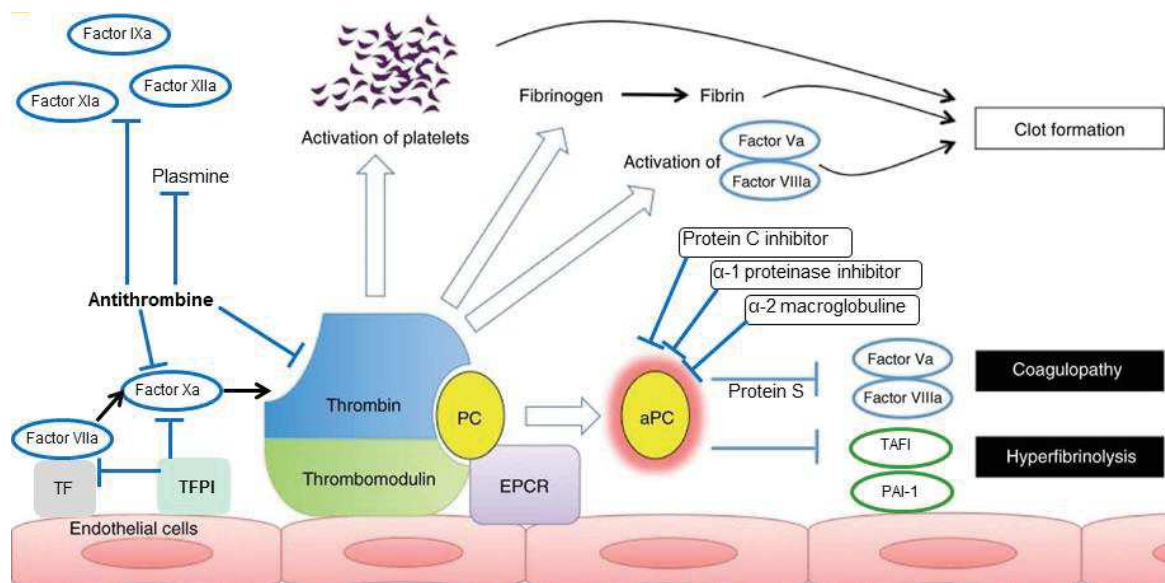
### **Dérégulation de la coagulation au cours de la CIVD**

Les principaux inhibiteurs naturels de la coagulation impliqués au cours du sepsis (Fourrier 2008) sont représentés par l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI), l'antithrombine et le système de la protéine C (Figure 16). Au cours du sepsis, tous font l'objet d'une dérégulation, par consommation, par défaut de production ou par inhibition.

Le TFPI possède de puissantes qualités anticoagulantes, en neutralisant le facteur Xa par formation d'un complexe Xa-TFPI qui lie secondairement le complexe facteur tissulaire-VIIa et l'inhibe. Le complexe quadrimoléculaire ainsi formé bloque donc l'initiation de la voie extrinsèque de la coagulation (Fourrier 2008). De plus, le TFPI est capable de moduler les réponses inflammatoires (NF- $\kappa$ B, COX2) par liaison avec les récepteurs PAR (protease activated receptor).

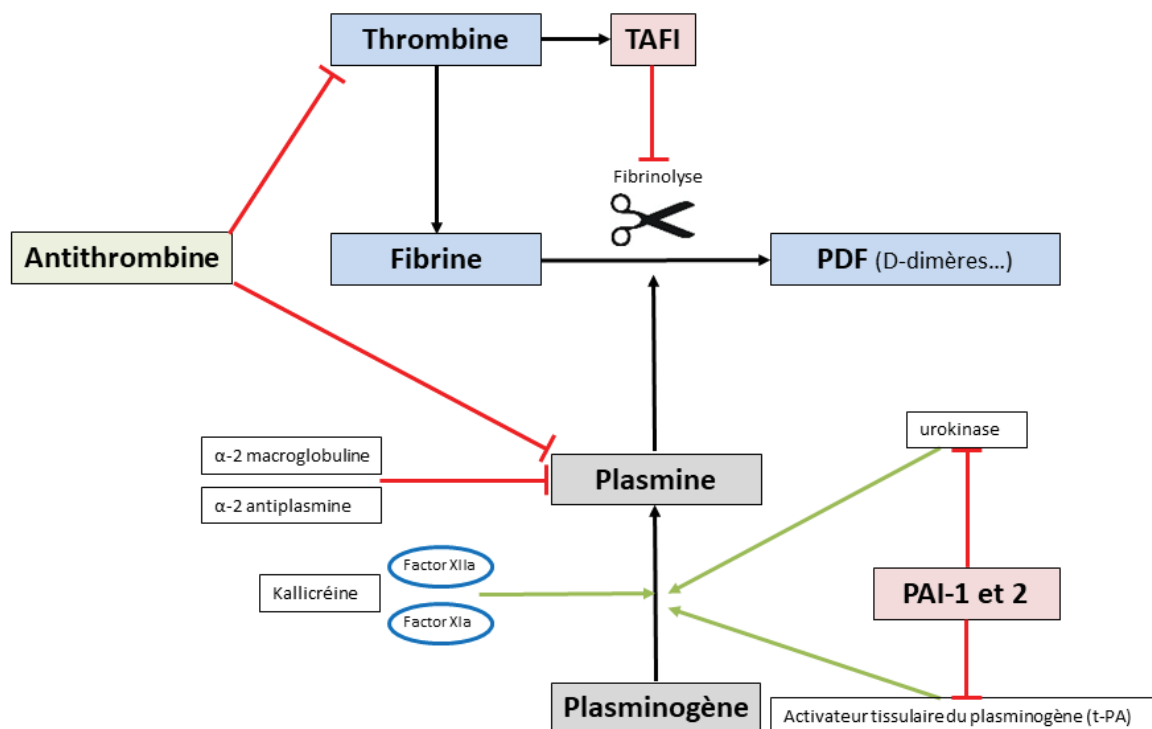
L'antithrombine neutralise les protéases à sérine, inhibant ainsi le facteur IIa (thrombine) et le facteur X (facteur Stuart), mais également les facteurs XIIIa, XIa, IXa et la plasmine (peptidase lysant la fibrine dans le processus de fibrinolyse) (Figure 17). Son effet est potentialisé par le TFPI. L'antithrombine exerce aussi une action sur la régulation de l'inflammation et de la vasomotricité, notamment par relargage de la prostacycline endothéliale (Fourrier 2008). Chez l'Homme, la profondeur du déficit en antithrombine au cours du sepsis a été associée à la mortalité (Iba, et al. 2016).

La protéine C est produite par le foie, de façon dépendante de la vitamine K et activée par le complexe thrombine-thrombomoduline au contact du récepteur endothélial de la protéine C (EPCR) (Figure 16).



**Figure 16 : Principaux mécanismes régulateurs de la coagulation : TFPI, antithrombine et système de la protéine C.** Le TFPI neutralise le facteur Xa par formation d'un complexe Xa-TFPI, qui lie secondairement le complexe facteur tissulaire-VIIa et l'inhibe, bloquant la voie extrinsèque de la coagulation. L'antithrombine neutralise les facteurs IIa (thrombine) et X, mais également les facteurs XIIIa, XIa, IXa et la plasmine (peptidase lysant la fibrine dans le processus de fibrinolyse). La protéine C est activée par le complexe thrombine-thrombomoduline au contact de l'EPCR. La protéine C activée, en présence de la protéine S (son cofacteur), inhibe les facteurs Va et VIIIa, mais exerce également un effet profibrinolytique, par régulation négative des facteurs anti fibrinolytiques physiologiques : PAI-1 et TAFI. La protéine C est inhibée par trois facteurs principaux : l'inhibiteur de la protéine C (PCI), l' $\alpha$ -1 protéinase inhibiteur et l' $\alpha$ -2 macroglobuline. **Adapté de Thorsen et al., 2011.**  
 Abréviations : EPCR, récepteur endothélial à la protéine C ; PAI-1, inhibiteur de l'activateur du plaminogène ; PC, protéine C ; PCa, protéine C active ; PCI, inhibiteur de la protéine C ; TAFI, inhibiteur de la fibrinolyse activé par la thrombine ; TF, facteur tissulaire ; TFPI, inhibiteur de la voie du facteur tissulaire.

La protéine C activée exerce non seulement un effet inhibiteur sur le processus de coagulation en présence de la protéine S (son cofacteur), *via* l'inhibition des facteurs Va et VIIIa, mais également un effet profibrinolytique, par régulation négative des facteurs anti fibrinolytiques physiologiques : PAI-1 (inhibiteur de l'activateur du plasminogène) et TAFI (inhibiteur de la fibrinolyse activé par la thrombine). La protéine C est inhibée par trois facteurs principaux : un inhibiteur plasmatique (protéine C inhibiteur), l' $\alpha$ -1 protéinase inhibiteur et l' $\alpha$ -2 macroglobuline. La protéine C diminue au cours de la CIVD accompagnant le choc septique, par consommation, par diminution de la thrombomoduline, par diminution de la synthèse hépatique (foie de choc), par diminution de la protéine S (Fourrier 2008).



**Figure 17 : le rôle central de la plasmine dans la fibrinolyse et ses mécanismes de régulation.** La plasmine est une peptidase lysant la fibrine dans le processus de fibrinolyse, et est issue de l'activation du plasminogène par l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) et par l'urokinase. La plasmine est inhibée par l'antithrombine, l' $\alpha$ -2 macroglobuline, et l' $\alpha$ -2 antiplasmine. *Réalisation personnelle.*

## Diagnostic de la CIVD

Si la CIVD peut être suspectée sur des arguments cliniques (maladie sous-jacente compatible avec la survenue d'une CIVD, défaillance multi-viscérale, hémorragie en nappe aux points de ponction, ischémie ou nécrose des extrémités), le diagnostic de la CIVD est avant tout biologique. Les deux scores diagnostiques les plus utilisés sont celui de l'ISTH (*International Society on Thrombosis and Haemostasis*), et le score JAAM-DIC (*Japanese Association for Acute Medicine-disseminated intravascular coagulation*).

Test	Résultats	Score
Numération plaquettaire (G/L)	> 100	0
	50-100	1
	< 50	2
D-dimères ou produits de dégradation de la fibrine	Pas d'augmentation	0
	Augmentation modérée	1
	Augmentation forte	2
Augmentation du temps de prothrombine	< 3 s	0
	3-6 s	1
	> 6 s	2
Fibrinogène (g/L)	≥ 1	0
	<1	1
<b>Total</b>	<b>CIVD</b>	<b>≥ 5</b>

**Tableau 5 : Diagnostic de la CIVD selon le score de l'ISTH (*International Society on Thrombosis and Haemostasis*).** Abréviations : CIVD, coagulation intravasculaire disséminée.

Parmi leurs points communs, ces deux scores utilisent la numération plaquettaire, la mesure des produits de dégradation de la fibrine (dont les D-dimères) qui sont le témoin d'une activation de la fibrinolyse en réponse à une activation de la

coagulation et l'augmentation du temps de prothrombine (TP) en valeur absolue ou relative. Le prérequis commun au calcul de ces deux scores est l'existence d'une pathologie prédisposant à la survenue d'une CIVD, notamment le sepsis.

Le score de l'ISTH (*International Society on Thrombosis and Haemostasis*), publié en 2001 (Taylor, et al. 2001), indique la présence d'une CIVD s'il est supérieur ou égal à 5 (Tableau 5).

Le score JAAM-DIC modifié en 2016 (Iba, et al. 2016) permet de porter le diagnostic de CIVD s'il est supérieur ou égal à 4 (Tableau 6).

Test	Résultats	Score
Numération plaquettaire (G/L)	> 120	0
	80-120 ou diminution > 30% en 24 h	1
	< 80 ou diminution > 50% en 24 h	3
Produits de dégradation de la fibrine (µg/mL)	< 10	0
	10-25	1
	≥ 25	3
Ratio du temps de prothrombine (/témoin)	< 1,2	0
	≥ 1,2	1
Antithrombine (%)	≥ 70	0
	< 70	1
<b>Total</b>	<b>CIVD</b>	<b>≥ 4</b>

**Tableau 6 : Diagnostic de la CIVD selon le score JAAM-DIC (*Japanese Association for Acute Medicine-disseminated intravascular coagulation*) modifié en 2016. Adapté de Iba et al., 2016.** Abréviations : CIVD, coagulation intravasculaire disséminée.

Ce score se distingue du score de l'ISTH par la prise en compte de la cinétique de la numération plaquettaire, ce qui tend à le rendre plus sensible, et du taux

d'antithrombine, aux dépens du fibrinogène. A noter que le critère « antithrombine » a remplacé le critère « SIRS » des précédentes versions du score JAAM-DIC (Gando, et al. 2013), le critère SIRS étant jugé peu sensible et peu spécifique quant au diagnostic de coagulopathie, contrairement à l'antithrombine. En effet, la diminution de l'antithrombine est corrélée à la présence d'une coagulopathie et à la mortalité (Iba, et al. 2016).

## II. Les interférons de type I et leurs principaux rôles

### 1. Classification des interférons

La première description des interférons a été faite en 1957 par Isaacs et Lindenmann (Isaacs and Lindenmann 1957), qui ont observé que l'infection de cellules par le virus de la grippe entraînait la production d'une glycoprotéine permettant de rendre les cellules résistantes à ce virus. Ce phénomène dit « d'interférence virale » est à l'origine du mot « interféron ». Les interférons sont une famille de cytokines, dont les types et sous-types ont été découverts progressivement. Les trois types d'interférons (I, II et III) se partagent des rôles dans les défenses anti-infectieuses, anti-tumorales et exercent des effets immunomodulateurs sur l'immunité innée et adaptative (Lopez de Padilla and Niewold 2016).

#### a. Interférons de type I

Les interférons de type I sont représentés, chez l'Homme, par les interférons  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\kappa$ , et  $\omega$ , qui ont en commun leur récepteur : IFNAR (récepteur de l'interféron- $\alpha$ ).

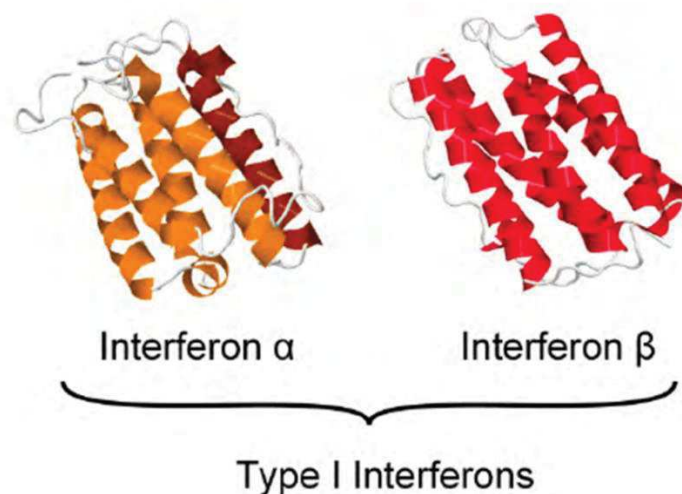


Figure 18 : Structure moléculaire des interférons de type I. Issu de Clark *et al.*, 2012.



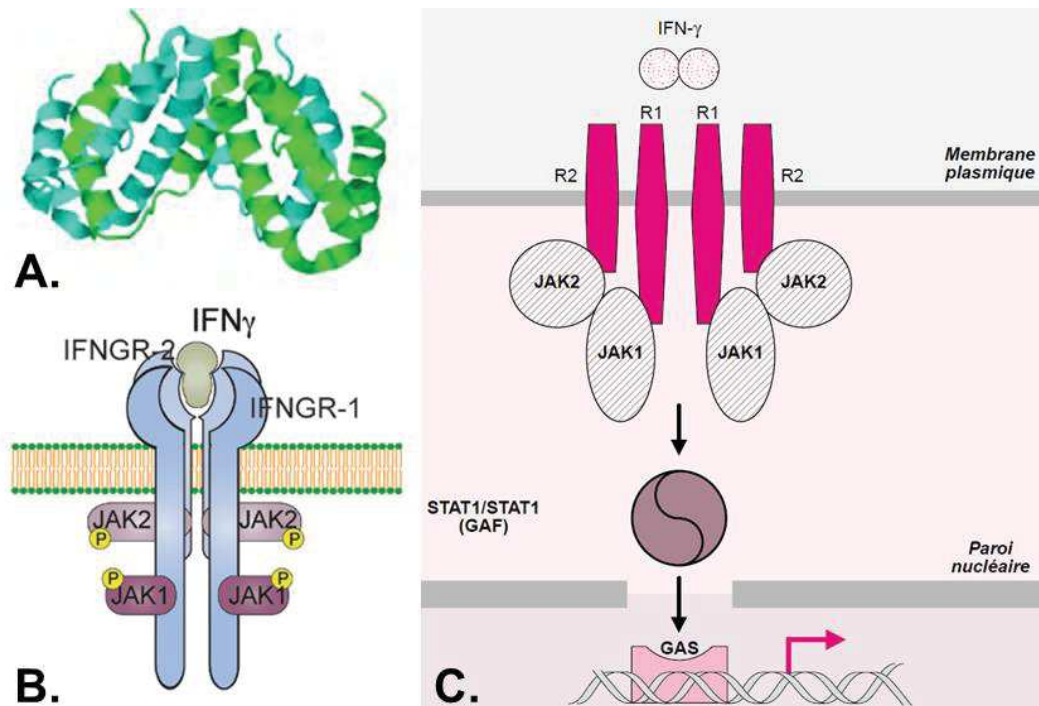
Les interférons  $\alpha$  sont encodés par 13 gènes différents (IFN- $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 4,  $\alpha$ 5,  $\alpha$ 6,  $\alpha$ 7,  $\alpha$ 8,  $\alpha$ 10,  $\alpha$ 13,  $\alpha$ 14,  $\alpha$ 16,  $\alpha$ 17,  $\alpha$ 21), sans introns, situés sur le bras court du chromosome 9 et qui partagent une homologie de séquence de l'ordre de 80% (Lopez de Padilla and Niewold 2016). Les IFN- $\alpha$  comportent 12 sous-types moléculaires différents identifiés, les IFN- $\alpha$ 1 et - $\alpha$ 13 étant structurellement identiques. Les IFN- $\alpha$  sont presque tous composés de 165 acides aminés (166 pour IFN- $\alpha$ 2) organisés en cinq hélices  $\alpha$  (Figure 18) (Clark 2012). Les sous-types d'IFN- $\alpha$ , bien qu'ayant des différences de structures parfois très subtiles, revêtent des fonctions différentes et parfois compétitives (Yanai, et al. 2001), allant de l'activité anti-infectieuse aux propriétés anti-tumorales.

Chacun des autres IFN de type I ( $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\kappa$ , et  $\omega$ ) est en revanche encodé par un seul gène. Le gène de l'interféron- $\beta$  partage une homologie de séquence de l'ordre de 35% avec les gènes des IFN- $\alpha$ .

## **b. Interférons de types II et III**

### **Interféron de type II**

L'interféron- $\gamma$  (Figure 19A) est le seul représentant du type II, encodé par un gène situé sur le chromosome 12. IFN- $\gamma$  possède pour seul récepteur IFNGR (récepteur de l'interféron- $\gamma$ ), composé des deux sous-unités IFNGR1 et IFNGR2 (Figure 19B).



**Figure 19 : Interféron- $\gamma$ .** A. Structure moléculaire. Issu de Clark et al., 2012. B. Récepteur de l'interféron- $\gamma$ . Issu de Szelag et al., 2016. C. Voie de signalisation. Issu de Altare, 2001.

La signalisation d'IFN- $\gamma$  emprunte la voie JAK-STAT (Figure 19C et Tableau 3), avec phosphorylation, dimérisation et translocation de STAT1 dans le noyau où les homodimères STAT1 se fixent au motif ADN de type GAS ( $\gamma$  interferon-activated sequence). Ceci déclenche la transcription des gènes d'aval d'IFN- $\gamma$ , parmi lesquels on peut citer les gènes codant pour les FCGR (Fc- $\gamma$  receptor) et pour les molécules des CMH de classes I et II. L'interféron- $\gamma$  intervient à la fois dans l'immunité antivirale et antibactérienne avec une importance particulière dans l'immunité visant les mycobactéries, dont la tuberculose (Altare 2001). L'IFN- $\gamma$  joue aussi un rôle majeur dans la stimulation des macrophages (Wu, et al. 2014).

L'interféron- $\gamma$  est sécrété par plusieurs types de cellules, telles que les NK, NK T, ILC1, et les lymphocytes T, de façon en partie conditionnée par plusieurs cytokines pro inflammatoires. En effet, la réponse antivirale en IFN- $\gamma$ , notamment anti-

herpétique, est dépendante des IFN de type I (Gill, et al. 2011), tandis que la réponse contre les mycobactéries est tributaire de l'IL-12 (Altare 2001). Dans les deux cas, la signalisation en amont de la production d'IFN- $\gamma$  est médiée par STAT4 (Altare 2001; Lee and Ashkar 2018) (Tableau 3).

Ainsi, l'IFN- $\gamma$  est produit à la fois par les cellules de l'immunité innée (NK) et adaptative (lymphocytes T) sous le contrôle de médiateurs moléculaires de l'immunité innée et déclenche la mise en jeu de mécanismes-clés de l'immunité adaptative. L'IFN- $\gamma$  assure donc un lien essentiel entre immunité innée et adaptative.

### **Interférons de type III**

Les interférons  $\lambda$  constituent les IFNs de type III qui sont de découverte plus récente, rapportée en 2003 (Kotenko, et al. 2003). Les IFNs de type III sont encodés par 4 gènes organisés en cluster sur le chromosome 19. Ils sont représentés par les IFN- $\lambda$ 1 (également appelé IL-29), - $\lambda$ 2 (IL-28A), - $\lambda$ 3 (IL-28B), et - $\lambda$ 4 (dont la structure est très proche d'IFN- $\lambda$ 3). Leur récepteur, hétérodimérique, est composé des sous-unités IL10RB (IL-10 receptor,  $\beta$  subunit) et IFNLR1 (IFN- $\lambda$  receptor 1). La signalisation des IFN- $\lambda$  emprunte également la voie JAK-STAT, une partie de cette voie de signalisation étant commune à celle des interférons de type I (voir partie 2, Figure 20A). Toutefois, les IFNs de type III n'ont pas la même capacité que les IFNs de type I à activer IRF-1 (Forero, et al. 2019), ce qui se traduit par une activation moindre des gènes pro-inflammatoires, dont CXCL10, CXCL9 et CXCL11 (Figure 20B).

A l'instar des IFNs de type I, les IFN de type III ont d'abord été étudiés pour leurs propriétés liées à l'immunité innée antivirale (Kotenko, et al. 2003). A titre d'exemple, le rôle des IFN- $\lambda$ 3 et - $\lambda$ 4 a été démontré dans la clairance virale au cours de l'infection par le virus de l'hépatite C (Boisvert and Shoukry 2016). Les IFNs de type

III jouent également un rôle dans la réponse immunitaire antibactérienne (Odendall, et al. 2017). De façon notable, les IFNs de type III jouent un rôle sur la barrière épithéliale au cours des infections, toutefois leur intervention peut se traduire, en fonction du type d'infection, par un renforcement de la barrière épithéliale afin de limiter la propagation de l'agent pathogène (Odendall, et al. 2017), ou par une rupture de l'intégrité de l'épithélium, démontrée en particulier au cours des infections virales telles que la grippe ou la pneumopathie induite par le coronavirus souche 2019 (SARS-CoV2) (Broggi, et al. 2020; Major, et al. 2020).

De plus, les IFNs de type III interviennent, comme les interférons de type I, dans la régulation de l'apoptose en lien avec la réponse anti-tumorale (Li, et al. 2008).

## **2. Voies de signalisation des interférons de type I**

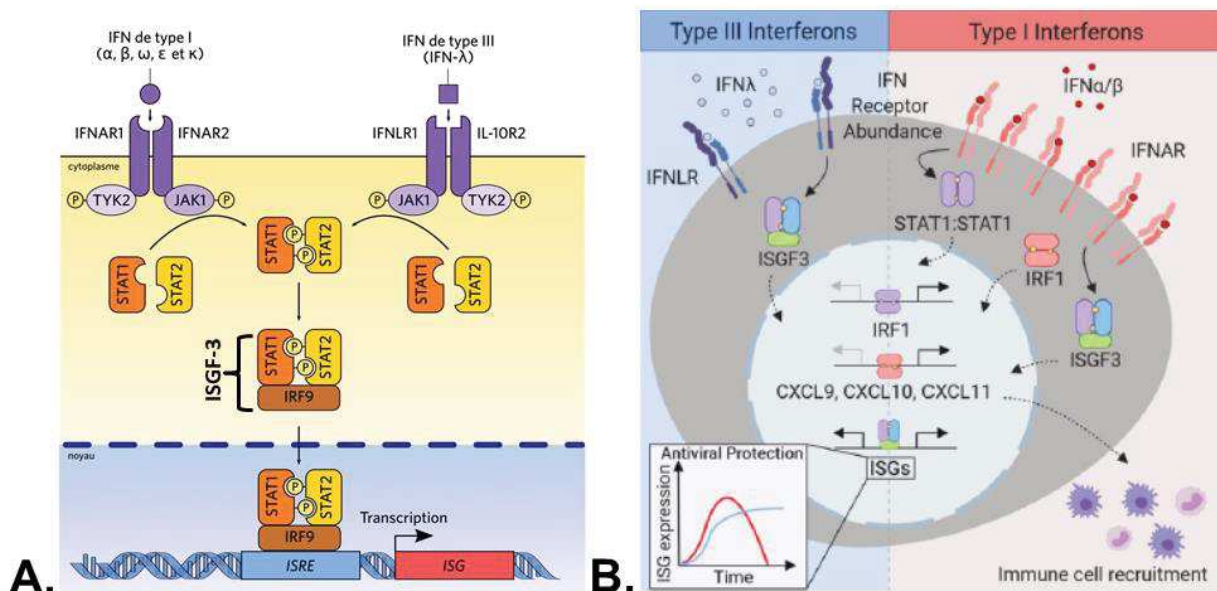
### **a. Le récepteur IFNAR**

Le récepteur IFNAR est un récepteur membranaire, composé de deux sous-unités différentes : IFNAR1 et IFNAR2. La liaison du ligand à chacune des deux sous-unités est requise pour leur dimérisation et donc pour l'activation du récepteur (Figure 20A).

Les différents sous-types d'IFN- $\alpha$ , dont la structure moléculaire est très proche, bien que partageant le même récepteur IFNAR, ont une activité biologique différente. En effet, l'affinité pour chaque sous-unité du récepteur varie en fonction du sous-type d'IFN- $\alpha$ , ce qui induit des différences dans la signalisation en aval de ce même récepteur, et peut expliquer des effets parfois ambivalents. Ces différences entre sous-unités ont été montrées notamment au cours de l'infection herpétique chez la souris (Harle, et al. 2002). Il a également été montré que ces différences d'affinité entre sous-

types permettent d'activer de façon sélective les voies STAT et de la MAPK, ce qui se traduit par des différences en terme d'activité antiproliférative (Cull, et al. 2003).

Les récepteurs IFNAR sont présents de façon ubiquitaire. L'expression prédomine à la surface de l'ensemble des cellules immunitaires, en particulier les polynucléaires (Proteinatlas 2020) (Proteinatlas 2020) (Proteinatlas 2020). IFNAR médie également la réponse aux interférons des cellules endothéliales (Buie, et al. 2017; Jia, et al. 2018) et peut être activé selon un mode autocrine (Moll, et al. 2008).



**Figure 20 : Les récepteurs des interférons de types I et III et leur voie de signalisation. A. Voie de signalisation commune.** Les récepteurs des IFNs de types I (IFNAR) et III (IFNLR) portent sur leur domaine intra cytoplasmique les tyrosine-kinases Tyk-2 et Jak-1. Après activation du récepteur, Tyk-2 et Jak-1 phosphorylent chacune une sous-unité du récepteur, permettant la liaison et la phosphorylation de STAT2, qui recrute STAT1. STAT1 et STAT2 phosphorylées se lient à l'IRF-9 pour former le facteur de transcription hétérotrimérique ISGF-3. ISGF-3 est transféré dans le noyau cellulaire où il se lie aux ISREs, qui sont des séquences d'ADN situées sur des gènes promoteurs des ISGs. **Issu de Sallard et al., 2018.** **B. Différences de signalisation entre IFNs de types I et III.** A la différence des IFNs de type III, les IFNs de type I phosphorylent et activent des homodimères STAT1, aboutissant à une expression accrue d'IRF-1, et donc à un recrutement plus marqué des cellules immunitaires, par surexpression de CXCL9, 10 et 11. **Issu de Forero et al., 2019.** Abréviations : CXCL, C-X-C motif chemokine ligand ; IFN, interféron ; IRF, interferon regulatory factor ; ISG, interferon-stimulated gene ; ISGF, interferon-stimulated gene factor ; ISRE, IFN-stimulated response elements.

## **b. La voie JAK-STAT**

Les sous-unités IFNAR1 et IFNAR2 portent sur leur domaine intracytoplasmique les tyrosine-kinases Tyk-2 et Jak-1, respectivement (Figure 20). Une fois activé, le récepteur IFNAR active à son tour Tyk-2 et Jak-1, qui phosphorylent IFNAR1 et IFNAR2. Ainsi, la tyrosine 466 d'IFNAR1 est phosphorylée, ce qui permet la liaison de STAT2, qui est phosphorylée à son tour, puis recrute STAT1 (Yan, et al. 1996). STAT1 et STAT2 phosphorylées se lient à l'IRF-9 (*interferon regulatory factor-9*) pour former le facteur de transcription hétérotrimérique ISGF-3 (*interferon-stimulated gene factor 3*). ISGF-3 est transféré dans le noyau cellulaire où il se lie aux ISREs (*IFN-stimulated response elements*), qui sont des séquences d'ADN reconnues par ISGF-3 et situées sur des gènes promoteurs des ISG (*interferon-stimulated genes*) (MacMicking 2012). Les ISG regroupent plusieurs centaines de gènes, parmi lesquels on trouve plusieurs IRF (ex : IRF-3, -7), qui participent à la mise en jeu de l'immunité innée et adaptative.

De façon notable, les IFNs de type I activent également les homodimères STAT1 de façon nettement plus importante que les IFNs de type III, ce qui aboutit à une expression plus importante d'IRF-1 en réponse aux IFNs de type I (Forero, et al. 2019), induisant ainsi une réponse proinflammatoire majorée, avec en particulier un recrutement plus important des cellules immunitaires médié par les CXCL9, 10 et 11 (Figure 20B).

### 3. Interférons de type I et réponse anti-infectieuse

#### a. Réponse antivirale

Les PAMPs d'origine virale stimulent plusieurs types de PRRs intracytoplasmiques (Voir partie I.2.a., Tableau 2), dont les TLRs 3 (détection des ARN double brin d'origine virale), 7, 8 (ARN simple brin) et 9 (ADN viraux CpG non méthylés). L'activation de ces TLRs induit la production de plusieurs médiateurs de l'immunité innée, dont les interférons de type I en réponse à une intrusion virale (Takeuchi and Akira 2010). Les récepteurs de type RIG-I (liant les ARN viraux intracellulaire) jouent également un rôle majeur dans la stimulation de la synthèse des interférons de type I (Kell and Gale 2015). La voie cGAS-STING a été découverte plus récemment (Figure 21) (Xiao and Fitzgerald 2013). En effet, la synthase de GMP-AMP cyclique (cGAS) lie les ADN viraux cytosoliques, ce qui provoque la synthèse de GMP-AMP cyclique, lequel se fixe à son récepteur STING (*stimulator of interferon genes*), localisé sur le réticulum endoplasmique. Cette liaison induit l'activation des kinases TBK1 et IKK (*inhibitor of nuclear factor kappa kinase*), qui phosphorylent IRF3 et I $\kappa$ B $\alpha$ , respectivement. IRF3 ainsi activé déclenche la transcription des gènes des interférons de type I (Chanut and Petrilli 2019). I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylé libère NF- $\kappa$ B, ce qui induit la synthèse de plusieurs cytokines proinflammatoires en parallèle.

Enfin, les récepteurs de type AIM (activés par les retrotransposons), participent à la régulation de la réponse en interférons de type I (Nakaya, et al. 2017), mais de façon plus accessoire (Gray, et al. 2016).

Parmi les cellules productrices d'interférons de type I, il convient de citer en priorité les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) (Dalod, et al. 2014). Les pDC expriment essentiellement les TLRs 7 et 9 et sont à l'origine de la production la plus

importante d'interférons de type I pour un type cellulaire donné (Dalod, et al. 2003; Reizis, et al. 2011).

Les IFNs de type I ainsi produits vont ensuite exercer leur effet antiviral par différents mécanismes, dont les principaux sont résumés dans le Tableau 7.

Mécanismes antiviraux	Gènes / Molécules stimulés	Action du gène / de la molécule	Références
Présentation d'antigènes	CMH I	Présentation Ag aux LcT CD8+	(Welsh, et al. 2012)
	CMH II	Présentation Ag aux LcT CD4+	(Simmons, et al. 2012)
Dégradation ARN viral	Oligoadénylate Synthétase (OAS)	Activation de la RNase L, qui dégrade les ARN simple brin	(Bisbal and Salehzada 2008)
Edition ARN viral	Adenosine deaminase (ADAR1)	Convertit l'adénosine des ARN double brin en inosine	(Chung, et al. 2018)
Edition ARN et ADN viraux	APOBEC3 (cytidine désaminase)	ARN: conversion Cytidine-Uridine ADN: conversion Guanine-Adénine (TGG → TAG [codon stop])	(Schoggins 2019)
Synthèse ARN viral	ISG20	Activité exonucléase	(Schoggins 2019) (Weiss, et al. 2018)
Inhibition traduction	Protéine kinase PKR	Inhibe, par phosphorylation, la traduction virale par eIF-2 $\alpha$	(McAllister, et al. 2012)
Apoptose	Protéine kinase PKR	Gènes pro-apoptotiques Fas, Bax Induction apoptose par voie FADD	(Balachandran, et al. 1998)
	RNase L	Modification ARNm pro-apoptotiques	(Zhou, et al. 1997)
Autres	IFIT 1,2,3,5	Liaison ARN viral Inhibition traduction <i>via</i> eIF-3	(Schoggins 2019)
	Mx GTPases	Inhibition réplication ribonucléoprotéines Fixation protéines capsid virale	(Verhelst, et al. 2013) (Samuel 2001)
	iNOS2 / ROS	Inhibition protéase	(Saura, et al. 1999)
		Mutation génome viral Effet immunomodulateur	(Akaike and Maeda 2000)

**Tableau 7 : Principaux mécanismes antiviraux induits par les interférons de type I. Réalisation personnelle.**

Abréviations : ADAR, *adenosine deaminase acting on RNA*; Ag, antigène ; APOBEC3, apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like ; CMH, complexe majeur d'histocompatibilité ; eIF-2 $\alpha$ , eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$  ; FADD, Fas-associated protein with death domain ; IFIT, interferon induced proteins with Tetratricopeptide repeats ; iNOS, NO synthase inducible ; ISG, interferon-stimulated gene ; LcT, lymphocyte T ; PKR, *protein kinase RNA-activated* ; ROS, espèces réactives de l'oxygène.



Parmi les gènes d'aval des IFNs de type I, il convient de citer les gènes de la famille Mx, dont font partie Mx1 et Mx2 chez la souris, ou MxA et MxB chez l'Homme (Verhelst, et al. 2013). Mx1 a été le premier gène découvert concernant la réponse aux IFN de type I chez la souris. Les gènes de la famille Mx sont exprimés en réponse aux IFN de types I et III, de façon spécifique et constituent donc une signature de la stimulation par ces IFN. La famille des protéines Mx a en commun une activité GTPase hautement conservée, indispensable à l'activité antivirale. Cette activité antivirale utilise des mécanismes multiples, dépendant de la famille virale visée et comprend par exemple l'inhibition de la réplication des ribonucléoprotéines virales, le blocage du transfert intranucléaire de ces ribonucléoprotéines ou encore la liaison aux protéines de la (nucléo)capside virale (Samuel 2001; Verhelst, et al. 2013).

#### **b. Réponse antibactérienne**

En plus de leurs propriétés antivirales, qui ont été les plus étudiées, les interférons jouent également un rôle dans l'immunité antibactérienne (Kovarik, et al. 2016), dont l'étude est plus récente (Boxx and Cheng 2016). On observe par ailleurs une dualité des effets des interférons au cours de la réponse antibactérienne, une partie de la réponse étant protectrice *via* l'éradication de l'agent pathogène, contrastant avec des effets délétères pour l'hôte (*cf.* Partie III).

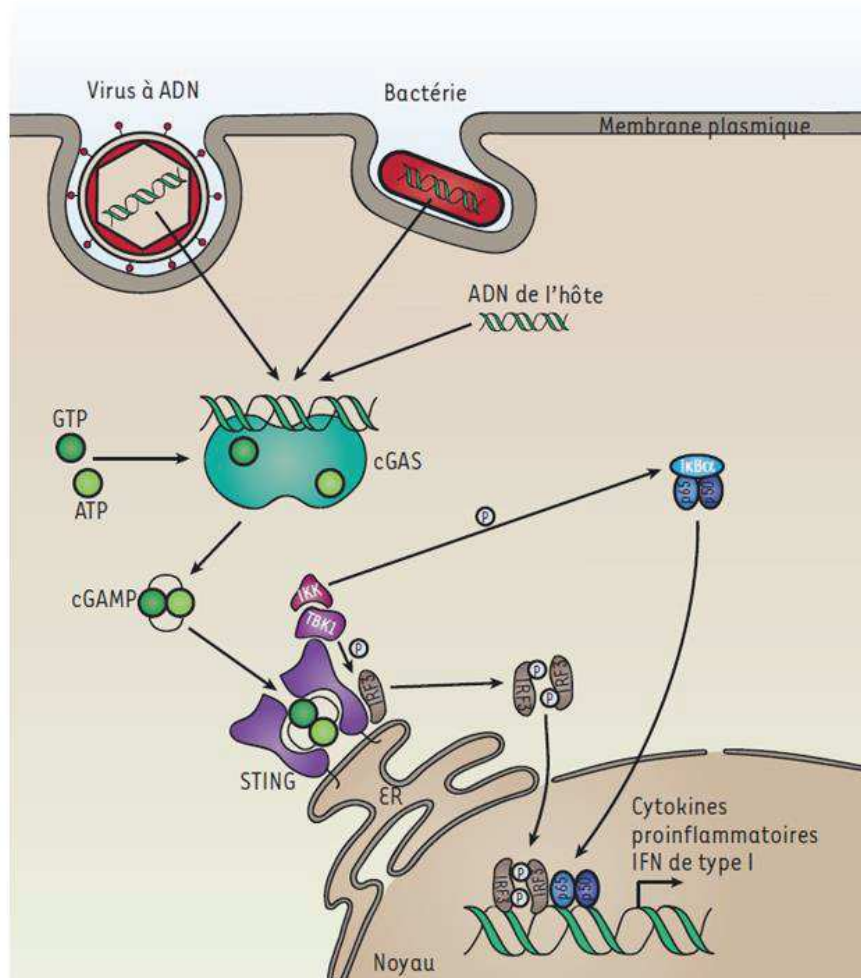
#### **Production d'interférons en réponse aux infections bactériennes**

D'une façon analogue à la réponse antivirale, les PAMPs d'origine bactérienne activent plusieurs PRRs capables d'induire la production d'interférons de type I, notamment les TLRs 2, 4 et 8 chez l'Homme, qui reconnaissent respectivement les lipoprotéines et peptidoglycanes, les LPS et les ARN bactériens simple brin (Moen, et

al. 2019). Le TLR8 reconnaît deux types de ligands produits par la dégradation des ARN simple brin, l'uridine et une séquence courte oligonucléotidique, qui se fixent chacun sur un site distinct du TLR8. En effet, l'uridine fixe l'interface de dimérisation du TLR8, tandis que la séquence courte oligonucléotidique fixe un site du domaine extracellulaire, en forme de fer à cheval, du TLR8 (Tanji, et al. 2015). De façon équivalente au TLR8 chez l'Homme, TLR13 de la souris reconnaît les ARN bactériens (Hidmark, et al. 2012). Les récepteurs NOD1 et NOD2 sont également capables de déclencher la sécrétion d'interférons de type I (Kovarik, et al. 2016).

Mais l'induction des interférons de type I fait intervenir d'autres voies de signalisation en réponses aux PAMPs bactériens. Parmi ces mécanismes, on peut citer la détection de l'ADN par la voie cGAS-STING (Figure 21) (Bouis, et al. 2019). En effet, de façon similaire à la détection intracytosolique de l'ADN viral, cGAS lie également l'ADN bactérien cytosolique, induisant la synthèse de GMP-AMP cyclique, lequel se fixe à son récepteur STING. Cette liaison, *via* la phosphorylation d'IRF3, déclenche la transcription des gènes des interférons de type I (Chanut and Petrilli 2019).

Parmi les mécanismes similaires, c'est-à-dire détectant l'ADN bactérien au niveau cytosolique et déclenchant la production des interférons de type I par l'activation de STING, on peut également citer le DAI (*DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors*), également connu sous le nom de ZBP-1 (Z-DNA binding protein) (Keating, et al. 2011). De même, la protéine IFI16 (*interferon-inducible 16*), dont l'équivalent est IFI204 chez la souris, est capable d'activer STING en réponse à certaines bactéries intracellulaires (Hansen, et al. 2014) et, de façon plus récemment démontrée, à des germes extracellulaires tels que *Staphylococcus aureus* (Chen, et al. 2019).



**Figure 21 : Détection cytosolique de l'ADN bactérien et production d'interférons de type I.** L'ADN bactérien ou viral, après pénétration intracytosolique, lie la synthèse de GMP-AMP cyclique (cGAS), ce qui produit du GMP-AMP cyclique, qui se fixe à son récepteur STING. STING, *via* la phosphorylation d'IRF3, déclenche la transcription des gènes des interférons de type I. Issu de Chanut *et al.*, 2019.

Parmi les types et sous-types d'interférons de type I sécrétés en réponse aux signaux d'origine bactérienne, l'IFN- $\beta$  semble produit en réponse à la majorité des micro-organismes bactériens : cocci Gram positifs (Bergstrom, et al. 2015), bacilles Gram négatifs (Perkins, et al. 2015) et germes intracellulaires (Pontiroli, et al. 2012) dont les mycobactéries (Wiens and Ernst 2016). Les sous-types d'IFN- $\alpha$  semblent produits en quantité moindre qu'IFN- $\beta$  en réponse aux antigènes bactériens (Hillyer, et al. 2012) mais l'intensité de l'expression et la prédominance des sous-types d'IFN-

$\alpha$  exprimés varient en fonction de la classe bactérienne. Ainsi, il a été montré qu'IFN- $\alpha$ 1 est le sous-type le plus représenté en réponse à la stimulation par les LPS des bacilles Gram négatifs (Hillyer, et al. 2012).

### **Mécanismes antibactériens induits par les interférons de type I**

Les IFNs de type I interviennent dans l'immunité antibactérienne de l'hôte de plusieurs façons, avec des différences notables d'action en fonction du type de micro-organisme et du site infectieux. Tout d'abord, les IFNs de type I sont à l'origine d'une réponse pro-inflammatoire protectrice en réponse à des infections telles que *Helicobacter pylori* et *Listeria monocytogenes* par voie digestive, via la production de CXCL10 (Watanabe, et al. 2010) et via la stimulation d'IFN- $\gamma$  (Kernbauer, et al. 2013), respectivement. Les IFNs de type I jouent également un rôle protecteur en stimulant la réponse des macrophages face aux bactériémies à streptocoques du groupe B, à pneumocoque à *Escherichia coli* (Mancuso, et al. 2007) et également face aux infections pulmonaires à *Legionella pneumophila*, ce qui augmente la clairance bactérienne (Lippmann, et al. 2011). Les IFNs de type I ont également montré un rôle protecteur par leur effet immuno-régulateur. Ainsi les IFNs de type I préviennent l'hyperinflammation médiée par IL-1 $\beta$  au cours de l'infection à *Streptococcus pyogenes* (Castiglia, et al. 2016).

Enfin, les IFNs de type I exercent également un rôle protecteur en participant au maintien de l'intégrité de l'épithélium et de l'endothélium pulmonaires au cours de certaines infections, dont l'infection respiratoire basse à pneumocoque. Les mécanismes avancés en sont une réduction de la transcytose médiée par le récepteur PAF (facteur d'activation plaquettaire) et un maintien de l'intégrité des jonctions

serrées, ce qui limite le caractère invasif de l'infection à pneumocoque (LeMessurier, et al. 2013).

#### **4. Réponse anti-tumorale et apoptose**

A l'instar de leur implication dans la réponse antibactérienne, les interférons de type I jouent un rôle ambivalent dans l'activité anti-tumorale (Figure 22). Ces effets s'exercent par interaction directe avec les cellules tumorales, ou par interaction avec les cellules immunitaires et endothéliales. L'action résultante, pro- ou anti-tumorale, dépend du type et du stade des tumeurs, et est influencée par le caractère chronique de la sécrétion des interférons de type I.

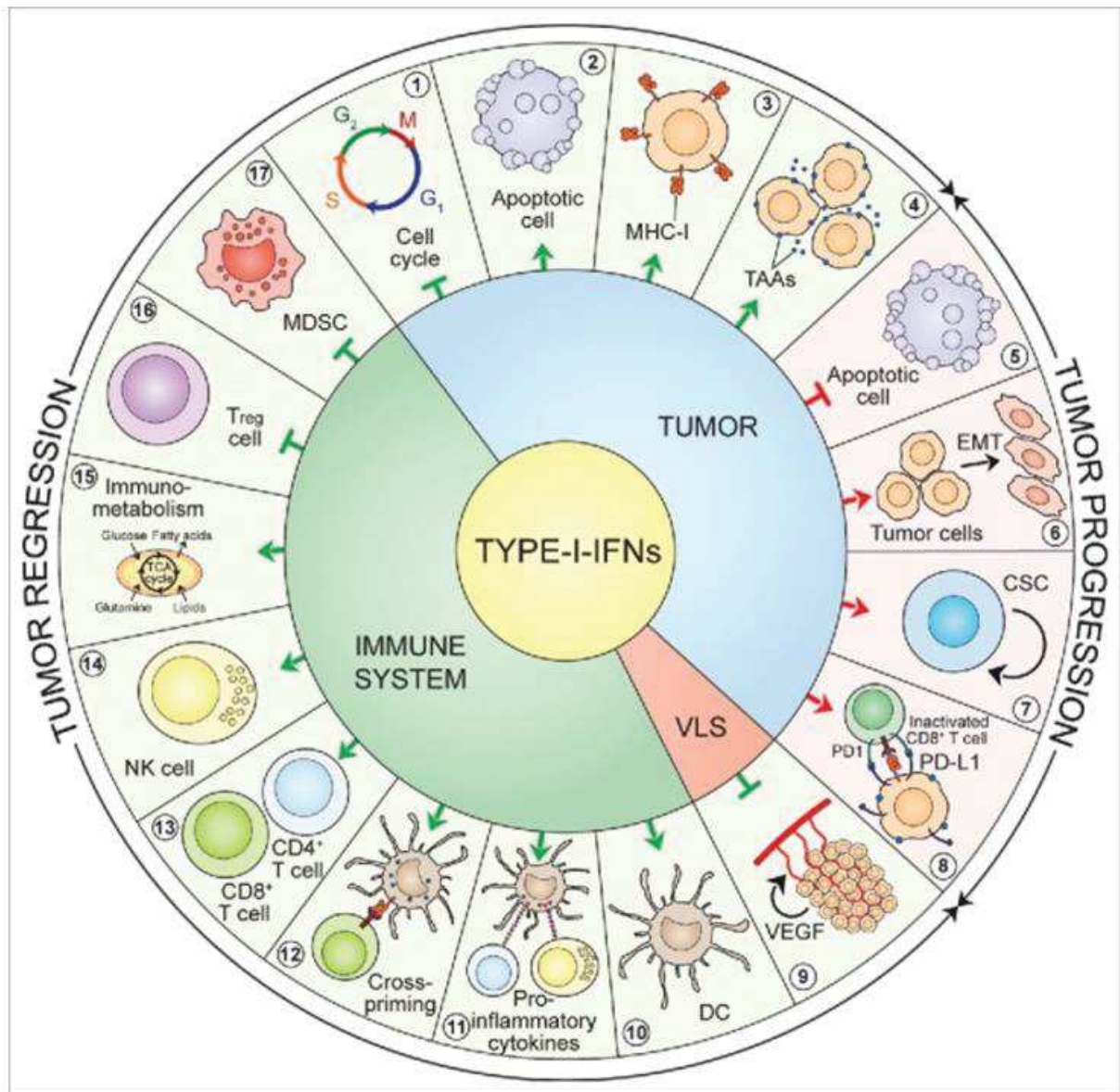
Concernant les effets anti-tumoraux, les IFNs de type I exercent un effet anti-angiogénique bien démontré par inhibition de la synthèse de VEGF (von Marschall, et al. 2003), soulignant l'importance de la signalisation des interférons de type I sur les cellules endothéliales au cours des pathologies tumorales (Enomoto, et al. 2017). Cet effet anti-angiogénique se traduit par une réduction de la croissance tumorale.

Concernant les actions anti-tumorales directes, les interférons de type I sont capables de bloquer le cycle cellulaire afin de ralentir la multiplication des cellules tumorales (Maeda, et al. 2014) et de provoquer leur apoptose, principalement par la voie extrinsèque médiée par TRAIL (Chawla-Sarkar, et al. 2001), mais également par la voie intrinsèque (Thyrell, et al. 2002). En plus de la majoration de l'expression des antigènes associés aux tumeurs (Greiner, et al. 1984), les interférons de type I peuvent également induire l'expression du CMH-I à la surface des cellules tumorales, ce qui, combiné au recrutement des lymphocytes par CXCL10 dont la sécrétion est elle-même provoquée par les IFNs de types I et II, stimule la réponse anti-tumorale des

lymphocytes T CD8 (Guo, et al. 2019). Les IFNs de type I renforcent la réponse anti-tumorale des lymphocytes, *via* la voie de signalisation JAK-STAT, en promouvant le recrutement sur le site tumoral (Wenzel, et al. 2005), la survie (Zitvogel, et al. 2015) et l'activation (Cauwels, et al. 2018) des lymphocytes, ainsi qu'en provoquant la maturation des cellules dendritiques de l'environnement tumoral (Diamond, et al. 2011), renforçant leur rôle de présentation croisée des antigènes tumoraux aux lymphocytes CD8<sup>+</sup> (Fuertes, et al. 2011).

D'autres mécanismes pro-inflammatoires sont mis en œuvre par les IFNs de type I sur le site tumoral, dont la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et de chémokines, qui recrutent et stimulent les polynucléaires neutrophiles associés aux tumeurs (TAN) tout en induisant une polarisation de type N1 (anti-tumorale) et une surexpression des récepteurs des chémokines, à l'exemple de CXCR2 (Pylaeva, et al. 2016). De façon similaire, les IFNs  $\alpha$  et  $\beta$  sont à même d'induire une polarisation M1 anti-tumorale des macrophages associés aux tumeurs (TAM) (Vidarthi, et al. 2018) et stimulent la réponse immunitaire des cellules NK (Muller, et al. 2017).

De façon parallèle, les mécanismes anti-inflammatoires favorisant la croissance tumorale sont parfois inhibés par les IFNs de type I, ce qui inclut la répression des lymphocytes Treg (Gangaplara, et al. 2018) et des cellules myéloïdes suppressives du microenvironnement tumoral (Parker, et al. 2016).



**Figure 22 : Interférons de type I et interactions avec les cellules tumorales.** Les interférons de type I possèdent différents effets anti-tumoraux, parmi lesquels on note des effets directs sur les cellules tumorales, incluant l'inhibition du cycle cellulaire et l'induction d'une apoptose dans certaines conditions, et des effets indirects impliquant les cellules endothéliales (effet anti-angiogénique) et les cellules immunitaires. Ces effets incluent, en complément de la stimulation de l'expression d'antigènes tumoraux (TAA, *tumor-associated antigen*) et du CMH-I, une stimulation des cellules présentatrices d'antigènes, des cellules NK, des lymphocytes T CD4+ et CD8+, et une répression des cellules myéloïdes suppressives (MDSCs) et des lymphocytes Treg. Paradoxalement, les IFNs de type I peuvent également provoquer des effets pro-tumoraux, incluant l'inhibition de l'apoptose dans certains autres cas, la stimulation la croissance des cellules souches cancéreuses et de la transition épithélio-mésenchymateuse, ou encore l'inactivation des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques. **Issu de Musella et al., 2017.**

Toutefois, l'effet des IFNs de type I sur les cellules myéloïdes suppressives du microenvironnement tumoral est controversé, et une immunosuppression bénéficiant aux cellules tumorales, par recrutement des MDSCs, a été observée chez la souris en réponse à l'irradiation. Ce recrutement est réalisé par l'intermédiaire des IFNs de type I, produits par activation de la voie STING (Liang, et al. 2017). De même, les IFNs de type I jouent un rôle ambivalent sur les macrophages associés aux tumeurs (TAMs). En effet, si les IFNs de type I peuvent induire la différenciation des monocytes en TAMs, dont le rôle est anti-tumoral, ils peuvent également induire l'expression d'arginase par ces mêmes TAMs (Tong, et al. 2019), dont l'effet est pro tumoral en raison de la nécessité de la L-arginine pour produire du NO<sup>•</sup>, qui contribue à l'effet cytotoxique des TAMs (Chang, et al. 2001).

De façon également ambivalente, l'effet immunologique des IFNs de type I sur les cellules tumorales est parfois contrecarré ou détourné par ces dernières. A titre d'exemple, les IFNs de type I sont impliqués, *via* la surexpression de la NO synthase 2, dans l'échappement immunitaire aux inhibiteurs de PD-1, ce qui inactive l'effet anti-tumoral des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Jacquelot, et al. 2019).

Il a également été prouvé que certains profils de réponse des cellules tumorales aux interférons de types I et II entraînent une plus forte croissance tumorale en réponse aux interférons, ainsi qu'une résistance aux inhibiteurs de point de contrôle immunitaire (*immune checkpoint inhibitors*) tels que les anti-PDL1 et les anti-CTLA4. Cette résistance est en partie expliquée par la perte de l'expression des molécules du CMH de type I en réponse aux interférons (Benci, et al. 2019). De plus, il a été montré que cette résistance aux inhibiteurs de point de contrôle immunitaire survient plus volontiers en cas d'activation prolongée de la voie de signalisation des interférons de type I, et que l'activation prolongée de la voie de signalisation des interférons de type

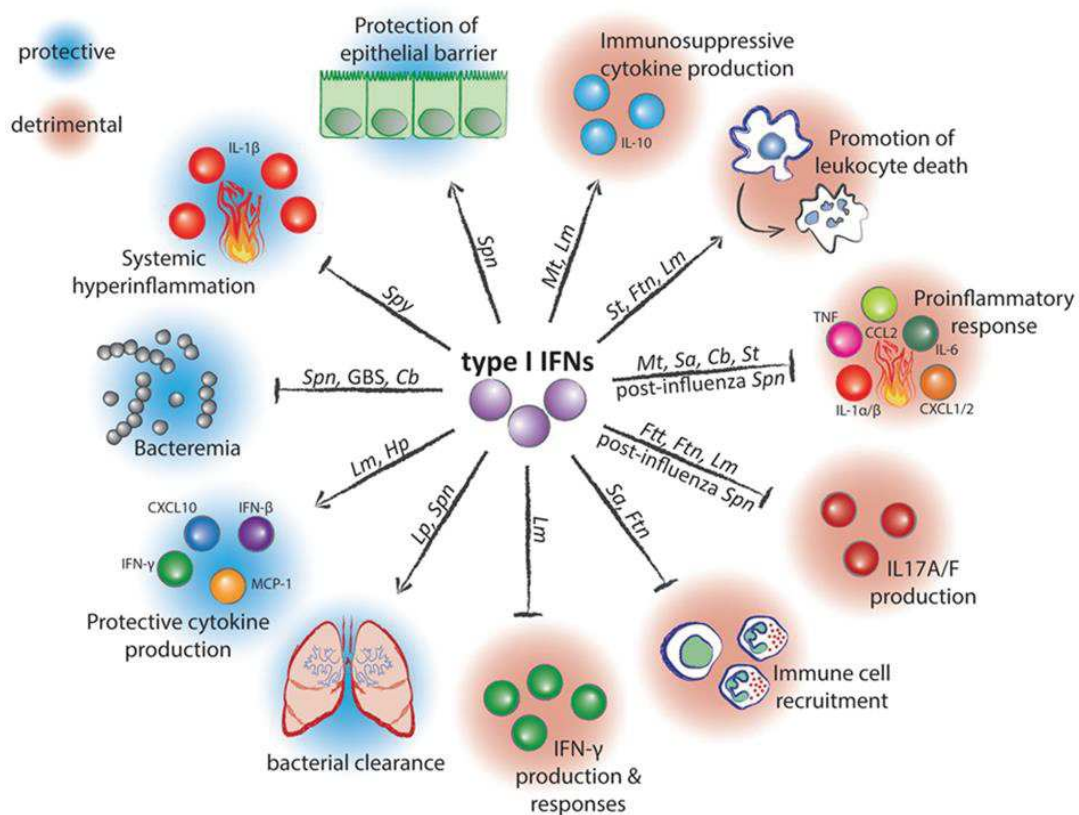


Il s'accompagne de la production de ligands à destination des récepteurs inhibiteurs des lymphocytes T, favorisant également la croissance tumorale (Benci, et al. 2016).

### III. Interférons de type I, sepsis et dysfonction endothéliale

#### 1. Interférons de type I, sepsis et dysfonctions immunitaires

Si les IFNs de type I sont capables de jouer un rôle protecteur dans la lutte antibactérienne, ils participent néanmoins à la dysfonction immunitaire observée au cours du sepsis et peuvent, selon le type de micro-organisme et le site infectieux, aggraver le phénomène d'hyperinflammation initiale, ou contribuer à l'immunosuppression (Figure 23).



**Figure 23 : Le rôle ambivalent des interférons de type I dans l'immunité antibactérienne selon le type d'infection.** Les interférons (IFNs) de type I participent à la protection antibactérienne (fond bleu) par la stimulation de cytokines (IFN- $\gamma$ ) et de chemokines (CXCL10, MCP-1) indispensables à la lutte contre l'agent pathogène, ce qui participe à la clairance bactérienne, tout en participant à la régulation de l'hyperinflammation. Les IFNs de type I préservent dans certains cas la barrière épithéliale, notamment pulmonaire au cours des infections à *Streptococcus pneumoniae*, ce qui contribue à prévenir l'évolution vers la bactériémie. Toutefois, les IFNs de type I peuvent également exercer des effets délétères (fond rouge), en inhibant la production de cytokines proinflammatoires et le recrutement des cellules immunitaires, en stimulant la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires (IL-10), ou en promouvant l'apoptose de certains leucocytes. **Issu de Kovarik et al., 2016.** Abréviations : Cb, *Coxiella burnetii* ; Ftn, *Francisella tularensis* ; Hp, *Helicobacter pylori* ; Lm, *Listeria monocytogenes* ; Mt, *Mycobacterium tuberculosis* ; Sa, *Staphylococcus aureus* ; Spn, *Streptococcus pneumoniae* ; Spy, *Streptococcus pyogenes*.

### a. Réponse pro-inflammatoire

Les IFNs de type I sont à l'origine d'une majoration du SIRS dans plusieurs types d'infection. Ainsi, il a été montré que les IFNs de type I majorent l'hyper-inflammation et le risque de mortalité dans les deux principaux modèles murins de choc septique : le choc septique par péritonite (induite par ligature et perforation caecale (Toscano, et al. 2011) (CLP) ou par péritonite avec stent du colon ascendant (Traeger, et al. 2010) (CASP)) et le modèle de choc endotoxinique induit par injection de LPS chez la souris. En effet, les souris déficientes pour le gène IFNAR (*Ifnar*<sup>-/-</sup>) sont protégées au cours de l'injection de LPS (Karaghiosoff, et al. 2003; Mahieu, et al. 2006), en lien avec une réduction de la réponse en cytokines pro-inflammatoires telles qu'IL-6 (Dejager, et al. 2014). Ces données au cours du choc endotoxinique induit par LPS sont confortées par des résultats similaires obtenus par inhibition pharmacologique d'IFNAR1 (Dejager, et al. 2014). Les souris *Ifnar*<sup>-/-</sup> sont également protégées dans les modèles de choc septique secondaire à une péritonite induite par CASP (Weighardt, et al. 2006) ou par CLP, avec réduction de l'inflammation systémique attestée par une diminution du taux plasmatique d'IL-6 (Dejager, et al. 2014), contrastant étonnamment avec un meilleur recrutement neutrophilique local (intra-péritonéal) à l'origine d'une clairance bactérienne plus efficace et participant à la survie (Dejager, et al. 2014; Weighardt, et al. 2006).

Les IFNs de type I sont également à l'origine d'une exacerbation de la réponse des cytokines pro inflammatoires et du recrutement des leucocytes en réponse à un modèle murin d'infection pulmonaire à *Staphylococcus aureus* (Martin, et al. 2009; Parker, et al. 2014). Les souris *Ifnar*<sup>+/+</sup> sont l'objet d'une plus forte mortalité, avec une différence en fonction des souches de *S aureus*. En effet, les souches à l'origine d'un relargage plus important de peptidoglycane (souche 502A) sont associées à une

surexpression d'IFNs de type I qui semble corrélée à l'importance de la surmortalité (Parker, et al. 2014).

Ce type de réponse pro-inflammatoire délétère médiée par les IFNs de type I est également retrouvé dans un modèle murin d'infection à *Coxiella burnetti*, et s'associe à une perte de poids nettement plus marquée chez les souris *Ifnar<sup>wt</sup>* comparées aux souris *Ifnar<sup>-/-</sup>* (Hedges, et al. 2016).

L'observation de ce type de mécanisme pro-inflammatoire médié par les IFNs de type I pour des bactéries intra- comme extra-cellulaires montre l'absence d'effet propre à une classe de germes en particulier.

#### **b. Réponse anti-inflammatoire**

L'exemple des modèles murins de choc septique par péritonite (CLP ou CASP), dans lesquels les souris *Ifnar<sup>-/-</sup>* font l'objet d'une moindre inflammation systémique contrastant avec un meilleur recrutement neutrophilique local (Dejager, et al. 2014; Weighardt, et al. 2006), montre l'ambivalence du rôle des interférons de type I. En effet, les IFNs  $\alpha$  et  $\beta$  ont des propriétés anti-inflammatoires et immunosuppressives dans différentes situations d'infections bactériennes. Là aussi, il convient de remarquer que ces propriétés ne sont pas liées à une classe de germes en particulier.

Parmi les bacilles Gram négatifs, les IFNs de type I sont à l'origine d'une immunosuppression en réponse aux salmonelles par nécroptose des macrophages (Robinson, et al. 2012), ainsi que par réduction de l'expression des chémokines CXCL1, CXCL2 et d'IL-1 $\beta$  (Perkins, et al. 2015) se traduisant par une diminution de la clairance bactérienne. Un phénomène du même ordre se produit en réponse aux infections à *Francisella tularensis* (Gram négatif intracellulaire) au cours desquelles les

IFNs de type I sont à l'origine d'une déplétion des macrophages (Henry, et al. 2007) et d'un déficit en production d'IL-17A par les lymphocytes T CD4+, se traduisant par un recrutement réduit en neutrophiles et une plus forte croissance bactérienne (Henry, et al. 2010).

Ce déficit en IL-17A a également été objectivé dans un modèle murin d'infection systémique à *Listeria monocytogenes* (Henry, et al. 2010), qui est un bacille Gram positif intracellulaire. Au cours des infections à *L. monocytogenes* par voie extra-digestive, les IFNs de type I participent à l'immunosuppression également par suppression de la réponse en IFN- $\gamma$ , à la fois par diminution de leur sécrétion (Kernbauer, et al. 2013) et par diminution de l'expression des IFNGR (Rayamajhi, et al. 2010), menant à un défaut d'activation des macrophages. Cette immunosuppression est renforcée par une apoptose des lymphocytes, elle aussi induite par les IFNs de type I (Carrero, et al. 2004; O'Connell, et al. 2004). Comme nous l'avons vu, la voie de l'infection conditionne la réponse médiée par les IFNs de type I, l'infection à *L. monocytogenes* par voie intragastrique étant à l'inverse l'objet d'une réponse protectrice des IFN-I (cf partie 0.3.b.).

Enfin, les effets immunosuppresseurs des IFNs de type I ont été montrés dans les modèles murins d'infections pulmonaires post-grippales. Ces effets ont été attribués à la diminution de l'expression des chémokines CXCL1, CXCL2 (Shahangian, et al. 2009) et CCL2 (Nakamura, et al. 2011) à la déplétion en lymphocytes T  $\gamma\delta$  producteurs d'IL17 (Li, et al. 2012) en réponse aux infections post-grippales à pneumocoque. L'importance de ce défaut de la réponse Th17, médié par les IFNs de type I a été soulignée par des découvertes similaires au cours des infections pulmonaires post-grippales à *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Staphylococcus aureus* (Lee, et al. 2015). Ces données suggèrent un rôle des IFNs

de type I dans la réponse anti-inflammatoire compensatoire post-grippale, dont le rôle physiologique est de limiter les conséquences délétères d'une hyper-inflammation, mais dont le risque est la survenue d'infections opportunistes.

## **2. Interférons de type I, sepsis et défaillances viscérales**

Les IFNs de type I sont associées à plusieurs types de défaillances d'organes au cours du sepsis, notamment pulmonaire et cardiaque.

### **Atteintes pulmonaires**

Les IFNs de type 1 jouent un rôle majeur dans le recrutement des cellules immunitaires au niveau du parenchyme pulmonaire, notamment *via* la production de CXCL10 pour le recrutement des monocytes et macrophages et des cellules dendritiques (Goritzka, et al. 2014; Ito, et al. 2001) et *via* la production de CCL2 pour les monocytes, NK et lymphocytes T (Lehmann, et al. 2016). Ils sont également responsables de l'activation et de la maturation des cellules dendritiques au niveau pulmonaire au cours des infections virales et bactériennes (Asselin-Paturel, et al. 2005; Parker and Prince 2012), accroissant leur expression de CMH-I et leurs capacités de présentation antigénique (Spadaro, et al. 2012). Ces effets sont complétés par une amplification de la réponse en cytokines pro inflammatoires au niveau du parenchyme pulmonaire (Goritzka, et al. 2014). Ainsi, les IFNs de type 1 jouent un rôle majeur dans la genèse de l'inflammation pulmonaire (Goritzka, et al. 2015; Makris, et al. 2017) et donc de l'insuffisance respiratoire aiguë.

De plus, pour des raisons encore mal connues, les IFNs de type 1 sont impliqués dans le caractère invasif de certaines souches bactériennes au niveau du

parenchyme pulmonaire, ce qui est par exemple le cas pour le pneumocoque du sérotype 1 (Hughes, et al. 2014).

### **Cardiomyopathie septique**

Parmi les défaillances les plus récemment identifiées chez l'Homme, la défaillance cardiaque associée au sepsis, parfois nommée « cardiomyopathie septique » a été montrée comme associée à l'expression des IFNs de type I (Cirulis, et al. 2019). En effet, dans une étude pilote publiée en 2019 sur une cohorte prospective de 24 patients en choc septique dont 18 présentaient une cardiomyopathie septique, une analyse transcriptomique réalisée sur les leucocytes du sang périphérique a montré, par une méthode d'analyse d'enrichissement fonctionnel, que le cluster de gènes le plus surexprimé concernait les interférons de type I, leur voie de signalisation et leurs gènes d'aval (ISG) (Cirulis, et al. 2019). Cette surexpression était indépendante de la famille de germes concernée.

Ce résultat récent soulignant le lien potentiel entre l'expression des IFNs de type I et la défaillance cardiaque au cours du sepsis est cohérent avec les données antérieures mettant en relation l'activation de la voie de signalisation des IFNs de type I avec la cardiomyopathie septique. En effet, sur un modèle cellulaire de cardiomyopathie septique, une activation de STAT1 et d'IRF1 a été montrée, et ce en lien avec l'apoptose des cardiomyocytes (Kumar, et al. 2005). De façon complémentaire, l'activation de TRIF, qui est en amont de l'expression d'IFN- $\beta$ , a été mise en lien avec la survenue d'une cardiomyopathie septique chez la souris traitée par CLP (Ouyang, et al. 2018). Un autre argument indirect est fourni par le rôle d'IL-6 dans la survenue de la cardiomyopathie septique (Jin, et al. 2018; Terrell, et al. 2006),

la réponse en IL-6, qui est un ISG, étant amplifiée par les IFNs de type I (Zimmermann, et al. 2016).

De façon très intriquée avec la cardiomyopathie septique, la dysfonction endothéliale induite par le sepsis comporte également, dans ses différents mécanismes physiopathologiques, une part d'activation imputable aux IFNs de type I.

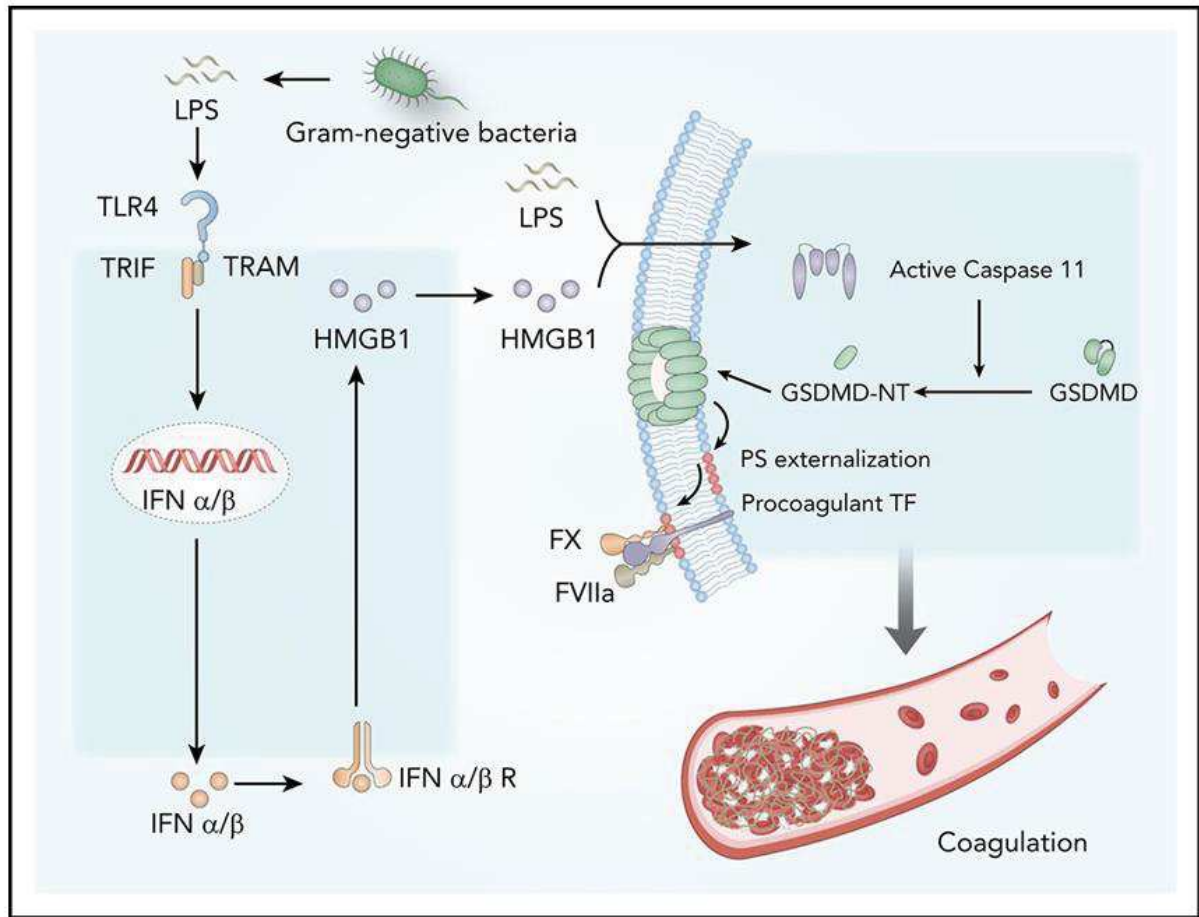
### **3. Interférons de type I, dysfonction endothéliale et coagulopathie**

#### **a. Activation et dysfonction endothéliales d'origine infectieuse**

Des données récentes suggèrent fortement l'implication des interférons de type I sur la dysfonction endothéliale au cours du choc septique chez la souris. En effet, Yang *et al.* ont montré l'implication du récepteur des interférons de type I (IFNAR) au cours des infections à bacilles Gram négatif dans la survenue de la coagulopathie associée au sepsis (Yang, et al. 2020), la coagulopathie étant fortement corrélée à l'activation et à la dysfonction endothéliale (Boisrame-Helms, et al. 2013). Les mécanismes invoqués sont le déclenchement d'une production d'interférons de type I en réponse aux LPS (Richez, et al. 2009), *via* le TLR4 et la voie TRIF (Figure 24) (Hu, et al. 2015), suivie d'une production de médiateurs pro inflammatoires, dont HMGB-1 (*high-mobility group box 1*). Cette réponse pro inflammatoire est à l'origine d'une externalisation de la phosphatidylsérine (PS) à la surface cellulaire (Yang, et al. 2020), ce qui potentialise l'effet pro-coagulant du facteur tissulaire (Langer and Ruf 2014), lequel lie et active le facteur VII, ce qui initie la cascade de la coagulation par la voie extrinsèque (Golino 2002). De plus, les leucocytes activés libèrent des médiateurs pro-inflammatoires activant la réponse en interférons par les cellules endothéliales (Le, et al. 2019), ce qui crée une boucle d'amplification impliquant les cellules endothéliales.



Cette boucle d'amplification est majorée par la capacité d'activation autocrine des cellules endothéliales par production d'interférons de type I (Moll, et al. 2008).



**Figure 24 : Déclenchement de la coagulopathie médiée par les IFNs de type I.** Les IFNs de type I, exprimés en réponse aux LPS *via* le TLR4 et la voie TRIF, induisent une surexpression plasmatisque de HMGB1, qui active la Gasdermine-D par l'intermédiaire de la caspase 11. La Gasdermine-D promeut l'externalisation de la phosphatidylsérine, ce qui potentialise l'effet pro-coagulant du facteur tissulaire, initiant ainsi l'activation du facteur VII, et donc la cascade de la coagulation par la voie extrinsèque. **Issu de Yang et al., 2020.** Abréviations : GSDMD, Gasdermine-D ; HMGB1, high-mobility group box 1 ; IFN, interféron ; LPS, lipopolysaccharides ; PS, phosphatidylsérine ; TF, facteur tissulaire ; TLR, toll like receptor ; TRAM, TRIF-related adaptor molecule ; TRIF, TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon- $\beta$ .

D'autres arguments indirects, en particulier l'implication de certains IRF et de la voie JAK-STAT dans l'activation endothéliale associée au sepsis, soulignent le rôle potentiel des interférons de type I dans cette dysfonction endothéliale. Ainsi, il a été montré que l'IRF1 (*interferon regulatory factor 1*) régule l'expression de VCAM-1

induite par les LPS au niveau des cellules endothéliales (Yan, et al. 2017). En effet, l'utilisation de siRNA bloquant l'ARNm codant pour IRF-1 est capable de diminuer significativement l'expression de VCAM-1 par les cellules de type HUVEC en culture, en réponse au LPS. Cette production d'IRF-1 fait intervenir les PRRs de type RIG-I, en réponse au LPS (Kong, et al. 2009) et est indépendante de NF- $\kappa$ B (Yan, et al. 2017). De plus, cette implication d'IRF-1 est en faveur d'une relative spécificité des IFNs de type I quant à cette expression de VCAM-1, IRF-1 étant nettement moins exprimé en réponse aux IFNs de type III (Forero, et al. 2019).

Concernant l'implication de la voie JAK-STAT dans la survenue de la dysfonction endothéliale au cours du sepsis, que nous avons argumentée dans notre revue de la littérature intitulée « *JAK-STAT targeting offers novel therapeutic opportunities in sepsis* » (Clere-Jehl, et al. 2020), elle constitue un autre argument indirect pour le rôle des interférons de type I. En particulier, il a été montré qu'IFN- $\alpha$  active STAT4 dans les cellules endothéliales vasculaires, ce qui favorise l'activation endothéliale et le recrutement des monocytes et des lymphocytes, *via* l'expression de MCP-1 (CCL2) (Torpey, et al. 2004). Les IFNs- $\alpha$ , en particulier ses sous-types  $\alpha$ 2b et  $\alpha$ 5, stimulent également l'adhésion et la migration trans-endothéliales des cellules dendritiques (Rouzaut, et al. 2010).

Cette implication des IFNs de type I dans l'activation endothéliale et le recrutement des cellules immunitaires joue un rôle particulièrement important dans la régulation de la migration tissulaire des cellules immunitaires au cours des infections pulmonaires (Teijaro, et al. 2011). Cette régulation de la perméabilité de l'endothélium par les IFNs de type I illustre leur rôle ambivalent, parfois protecteur, sur l'endothélium. Ainsi, les IFNs de type I diminuent la capacité des infections pulmonaires à

pneumocoque d'évoluer vers une bactériémie, en promouvant le maintien de la barrière endothéliale (LeMessurier, et al. 2013). De surcroît, les cellules endothéliales pulmonaires jouent un véritable rôle de « chef d'orchestre » dans le déroulement du signal cytokinique pulmonaire, en partie *via* les récepteurs S1P1 (*sphingosine-1-phosphate receptor 1*), qui jouent un rôle immunomodulateur vis-à-vis des cytokines pro-inflammatoires et de la production endothéliale des chémokines (Teijaro, et al. 2011).

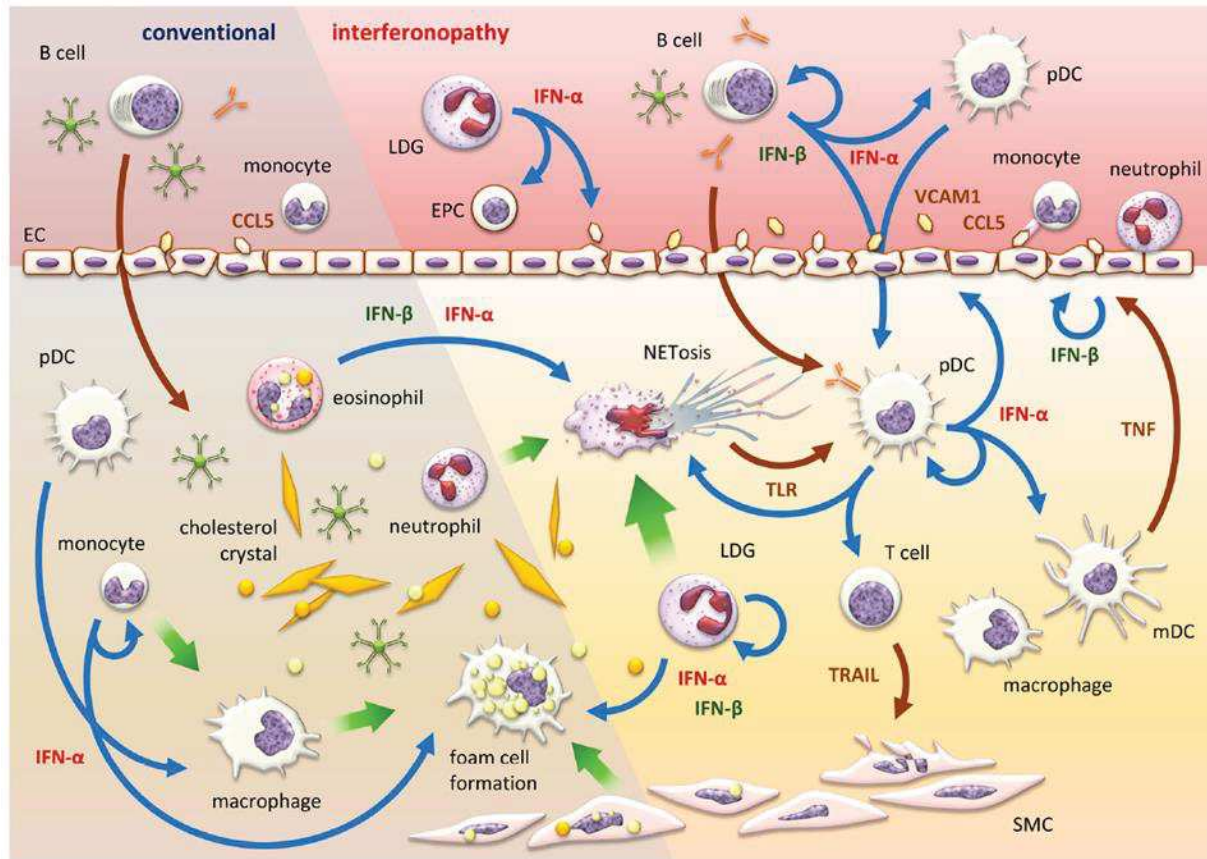
#### **b. Autres exemples d'activation et de dysfonction endothéliales**

En dehors des conditions infectieuses, les interférons de type I sont impliqués dans l'activation et la pathologie endothéliales dans plusieurs domaines, dont l'athérosclérose, certaines maladies auto-immunes ou encore les maladies néoplasiques.

##### **Athérosclérose**

L'athérosclérose est, d'après la définition de l'OMS, une association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyen calibre, consistant en une accumulation focale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissus fibreux et de dépôts calcaires, le tout accompagné de modifications de la média (Lusis 2000). La formation des plaques d'athérome comporte une participation inflammatoire dans laquelle les interférons de type I jouent un rôle à part entière (Chen, et al. 2020) (Figure 25). Les IFNs de type I favorisent la transformation des monocytes en macrophages, leur recrutement *via* l'expression de chémokines par l'endothélium, ainsi que l'expression par ces cellules de récepteurs de type « scavengers » (aussi appelés récepteurs éboueurs) qui sont à l'origine de la captation

des lipoprotéines de basse densité (LDL) oxydées et donc de la formation des cellules spumeuses (Ahmed, et al. 2018).



**Figure 25 : Les interférons (IFNs) de type I dans le processus d'athérosclérose.** Les IFN- $\alpha$  et  $\beta$  produits par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) et par les leucocytes favorisent le recrutement de polynucléaires neutrophiles et de monocytes *via* l'expression de chemokines par les cellules endothéliales (EC), ainsi que l'expression de récepteurs de type « scavengers » (récepteurs éboueurs) qui sont à l'origine de la captation des lipoprotéines de basse densité (LDL) oxydées par l'endothélium. Les IFNs de type I favorisent la différenciation des monocytes recrutés en macrophages, qui deviennent des cellules spumeuses après absorption des LDL oxydées, et entraînent également le phénomène de NETose en agissant sur les polynucléaires neutrophiles recrutés. Ces deux phénomènes participent ainsi à l'inflammation endothéliale contribuant à l'athérosclérose. De plus, les IFNs de type I empêchent la maturation des cellules progénitrices endothéliales (EPC) et donc le renouvellement de l'endothélium altéré. **Issu de Chen et al., 2020.**

Les cellules spumeuses s'accumulent dans la paroi artérielle, sous l'endothélium, pour former la strie lipidique qui est la première étape, réversible, d'un processus inflammatoire aboutissant à la genèse d'une plaque d'athérome. Les IFNs

de type I sont également directement responsables de la dysfonction endothéliale impliquée dans l'athérosclérose, en empêchant la maturation des cellules progénitrices endothéliales et donc le renouvellement de l'endothélium altéré (Grenn, et al. 2017). Les IFNs de type I favorisent le recrutement d'autres cellules immunitaires, dont les polynucléaires neutrophiles *via* CCL5 (Drechsler, et al. 2010), les cellules dendritiques et les lymphocytes (Chen, et al. 2020).

Les IFNs de type I exercent un effet pro-inflammatoire sur chacune de ces cellules, ce qui va aggraver les lésions endothéliales causées par le processus d'athérosclérose. Concernant les neutrophiles, les IFNs de type I favorisent la NETose, ce qui crée, entre autres, une boucle d'auto-amplification compte tenu de la stimulation de la production des IFNs de type I par les cellules dendritiques plasmacytoïdes en contact des NETs (Doring, et al. 2017).

### **Maladies auto-immunes**

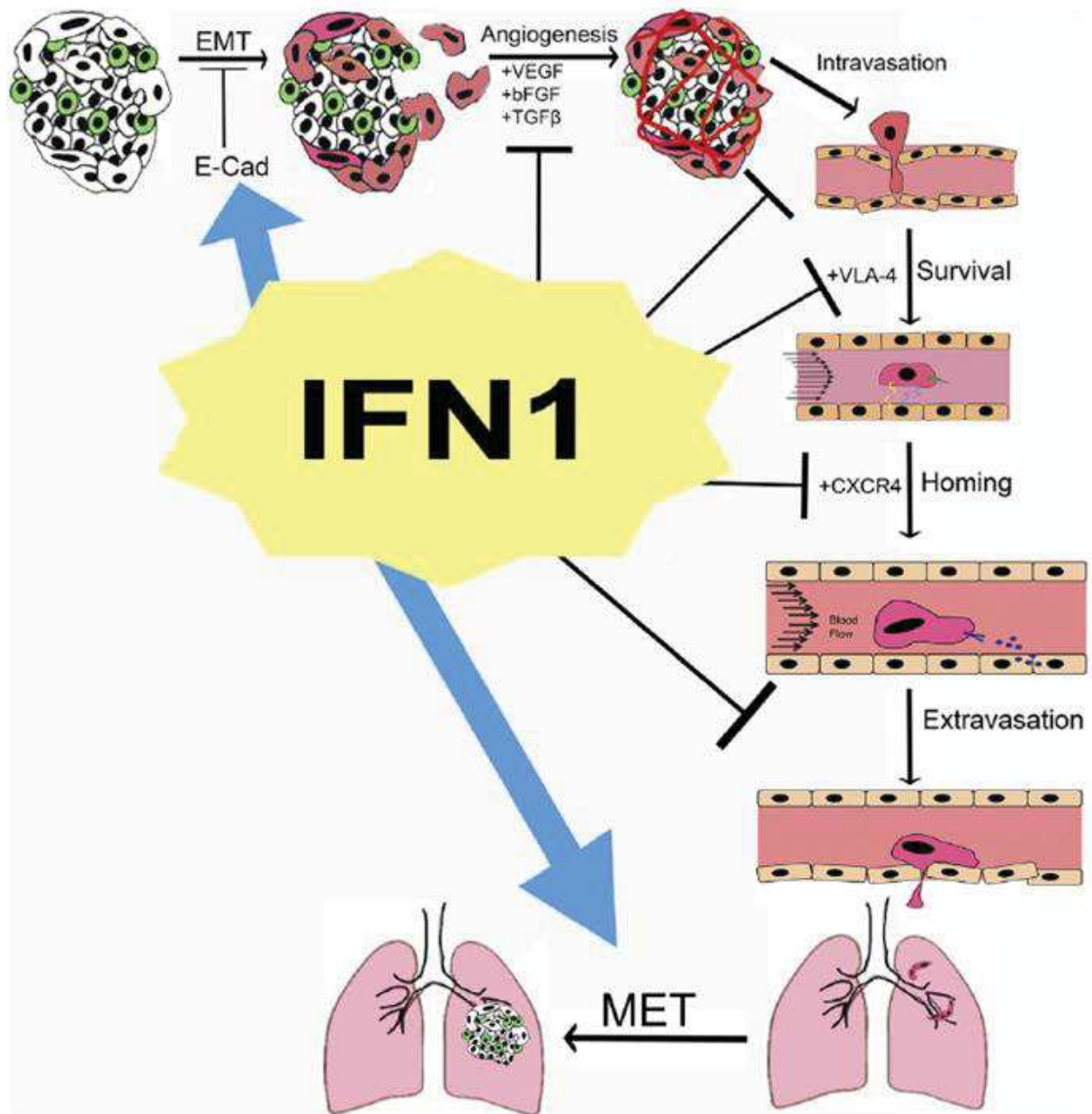
Les interférons de type I sont impliqués dans la dysfonction endothéliale observée au cours du lupus érythémateux systémique, qui est sans doute le meilleur exemple de pathologie auto-immune pour illustrer ce rôle endothélial des IFNs de type I. Cet impact endothélial des IFNs de type I est précisément une des explications quant à la tendance accélérée à l'athérosclérose chez les patientes lupiques. Cette dysfonction endothéliale au cours du lupus a été mise en lien avec une diminution d'activité de la NO<sup>•</sup> synthase endothéliale constitutive (eNOS), résultant en une diminution de la biodisponibilité du NO<sup>•</sup> (Jones Buie and Oates 2014). Il a également été montré qu'IFN- $\alpha$  promeut l'expression de MCP-1 et de VCAM-1 par les cellules endothéliales au cours du lupus, ce qui active le recrutement des cellules immunitaires

(Buie, et al. 2017). Parmi elles, les neutrophiles produisent des NETs sous l'influence des IFNs de type I, dont dérivent des enzymes produisant des agents oxydants telle que la myéloperoxydase (Smith, et al. 2014). Ainsi, les NETs aggravent de façon notable la dysfonction endothéliale observée au cours du lupus (O'Neil, et al. 2019), à l'instar de l'athérosclérose. De plus, les capacités de régénération vasculaire et endothéliale sont réduites par les IFNs de type I au cours du lupus, par apoptose des cellules endothéliales et des progéniteurs endothéliaux ainsi que par diminution de l'expression de VEGF (Denny, et al. 2007).

Parmi les exemples plus rares d'atteinte endothéliale en lien avec une surexpression des interférons de type I, on peut également citer la vasculopathie de l'enfant liée à STING (SAVI, *STING-associated vasculopathy with onset in infancy*) (Bouis, et al. 2019). Dans cette maladie auto-inflammatoire, une activation constitutionnelle de STING, d'origine génétique, est à l'origine d'une interféronopathie de type I, entraînant une atteinte des petits vaisseaux, ce qui induit des atteintes articulaires, cutanées, et pulmonaires.

### **Pathologies néoplasiques**

La diminution de l'expression de VEGF, par action des IFNs de type I, joue également un rôle capital dans l'effet antitumoral des IFNs de type I, par inhibition de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales, ce qui diminue l'angiogenèse tumorale (Indraccolo 2010). La régulation de l'angiogenèse est un des mécanismes essentiels de l'action anti-métastatique des IFNs de type I (Figure 26) (Ortiz and Fuchs 2017). Toutefois, les IFNs de type I utilisent de nombreux autres moyens pour empêcher les cellules tumorales de franchir la barrière endothéliale.



**Figure 26 : La régulation du processus métastatique au niveau endothélial par les IFNs de type I.** Les IFNs de type I stimulent l'expression de la cadhérine E par les cellules tumorales, freinant ainsi la transition épithélio-mésenchymateuse, et inhibent l'angiogénèse tumorale. Les IFNs de type I ralentissent également l'intravasation des cellules tumorales, et diminuent la capacité d'adhésion des cellules tumorales circulantes à l'endothélium, en inhibant leur expression d'intégrine VLA-4 (*very late antigen-4*) et l'expression de CXCR4 par les cellules endothéliales. Les IFNs de type I s'opposent ainsi à l'extravasation des cellules tumorales circulantes, et donc au processus métastatique. **Issu de Ortiz et al., 2017.**

Tout d'abord, l'IFN- $\alpha$  stimule la production d'E-cadhérines, qui permettent de maintenir l'adhésion cellule-cellule au sein d'un tissu épithélial et ainsi d'éviter la transition épithélio-mésenchymateuse (Slaton, et al. 2001) qui se caractérise par l'expression d'autres molécules d'adhésion (ex : vimentine, N-cadhérine) se liant à la matrice extracellulaire. Au cours du processus métastatique, cette adhésion est suivie d'une dégradation de la lame basale bordant l'épithélium par la sécrétion de métalloprotéinases, puis par l'intravasation des cellules tumorales à travers l'endothélium dans le réseau vasculaire, localement amplifié par l'angiogenèse tumorale. Les IFNs de type I jouent également un rôle inhibiteur sur cette phase d'intravasation, l'IFN- $\beta$  stimulant la maturation des cellules endothéliales et permettant ainsi de maintenir la barrière endothéliale (Dickson, et al. 2007).

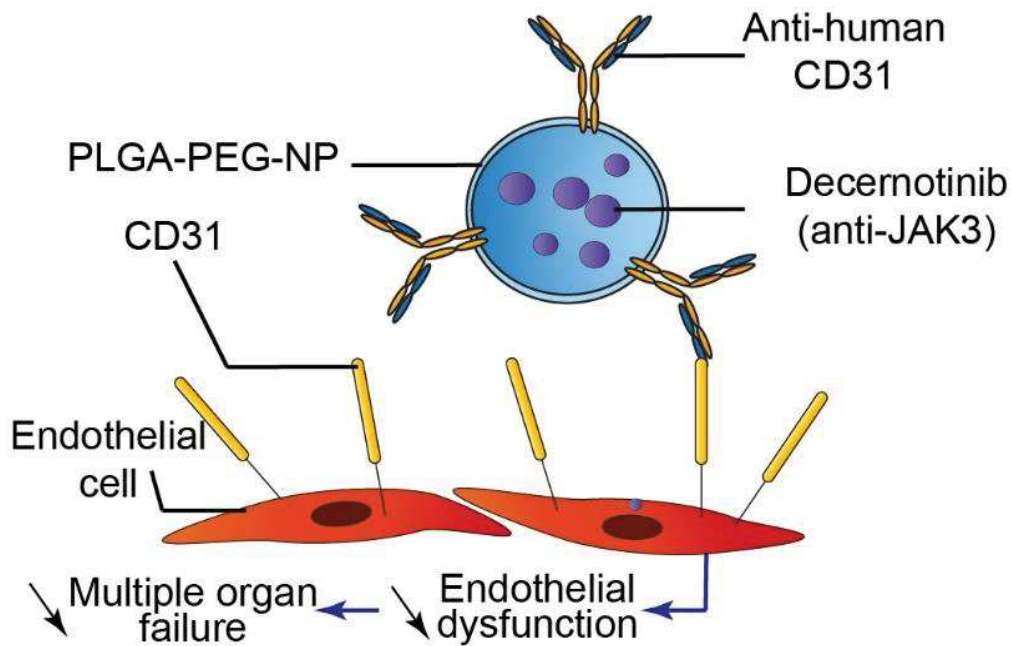
Dans le secteur vasculaire, l'IFN- $\beta$  réduit l'expression de l'intégrine VLA-4 (Soilu-Hanninen, et al. 1995) par les cellules tumorales, ce qui empêche leur liaison aux molécules d'adhésions exprimées par l'endothélium activé et diminue leur survie (Matsunaga, et al. 2003). Enfin, les IFNs de type I freinent l'extravasation des cellules tumorales vers leur site métastatique de destination, en promouvant la maturation des cellules endothéliales et en maintenant les jonctions serrées (« tight junctions ») de la barrière endothéliale (Minagar, et al. 2003).

#### **4. Pistes thérapeutiques potentielles**

Ainsi, les nombreuses implications des interférons de type I dans l'activation et la dysfonction endothéliales au cours de différentes pathologies, en font une famille de molécules présentant un intérêt majeur dans une pathologie telle que le sepsis, où la



dysfonction endothéliale est un mécanisme physiopathologique de premier ordre (Boisrame-Helms, et al. 2013). Si l'efficacité de l'inhibition des IFNs de type I est déjà connue sur la survie dans les modèles murins de choc septique (Dejager, et al. 2014; Karaghiosoff, et al. 2003; Mahieu, et al. 2006; Weighardt, et al. 2006), l'impact de cette inhibition sur la dysfonction endothéliale reste mal connu.



**Figure 27 : Proposition d'une thérapie basée sur les *jakinibs* et ciblant l'endothélium.** La proposition thérapeutique est basée sur une nanoparticule polymérique de PGLA (acide polylactique-co-glycolique)-PEG (polyéthylène glycol), contenant un *jakinib* (exemple ici du decernotinib, inhibant Jak3). Le ciblage endothélial est assuré par un anticorps anti-CD31 fixé en surface de la nanoparticule thérapeutique, CD31 étant une protéine transmembranaire très exprimée par les cellules endothéliales. **Réalisation personnelle (Clere-Jehl, et al. 2020).**

Or, l'importance de la capacité des interférons de type I à interagir avec l'endothélium pourrait être exploitée au cours du sepsis, par l'intermédiaire de thérapies anti-interférons capables de cibler l'endothélium. En effet, nous avons montré dans notre revue de la littérature (Clere-Jehl, et al. 2020) que les prérequis

techniques existent, certaines nanoparticules ayant été spécifiquement conçues pour cibler les cellules endothéliales *via* le récepteur CD31 dans le cadre de la prévention des réactions de rejet en contexte de transplantation rénale (Tietjen, et al. 2017). Ces nanoparticules ciblées permettent de délivrer des traitements immunosuppresseurs sur les cellules endothéliales, sans affecter les fonctions des cellules immunitaires.

Une telle approche revêt un intérêt tout particulier dans le sepsis où l'utilisation d'anticorps monoclonaux visant les médiateurs pro-inflammatoires au cours des essais cliniques, dans le but de limiter l'hyper-inflammation et la mortalité induites par l'orage cytokinique, a été un échec jusqu'alors. En effet, l'utilisation de stratégies inhibant l'IL-1 ou le TNF chez l'Homme a montré, au mieux, une absence d'amélioration de la survie (Abraham, et al. 1998; Fisher, et al. 1996), contrairement aux modèles animaux. La principale explication à ces échecs est attribuée à l'effet inhibiteur de ces stratégies thérapeutiques sur l'ensemble des cellules immunitaires, ce qui s'avère préjudiciable dans la lutte de l'hôte contre l'agent pathogène dans la phase cruciale du sepsis.

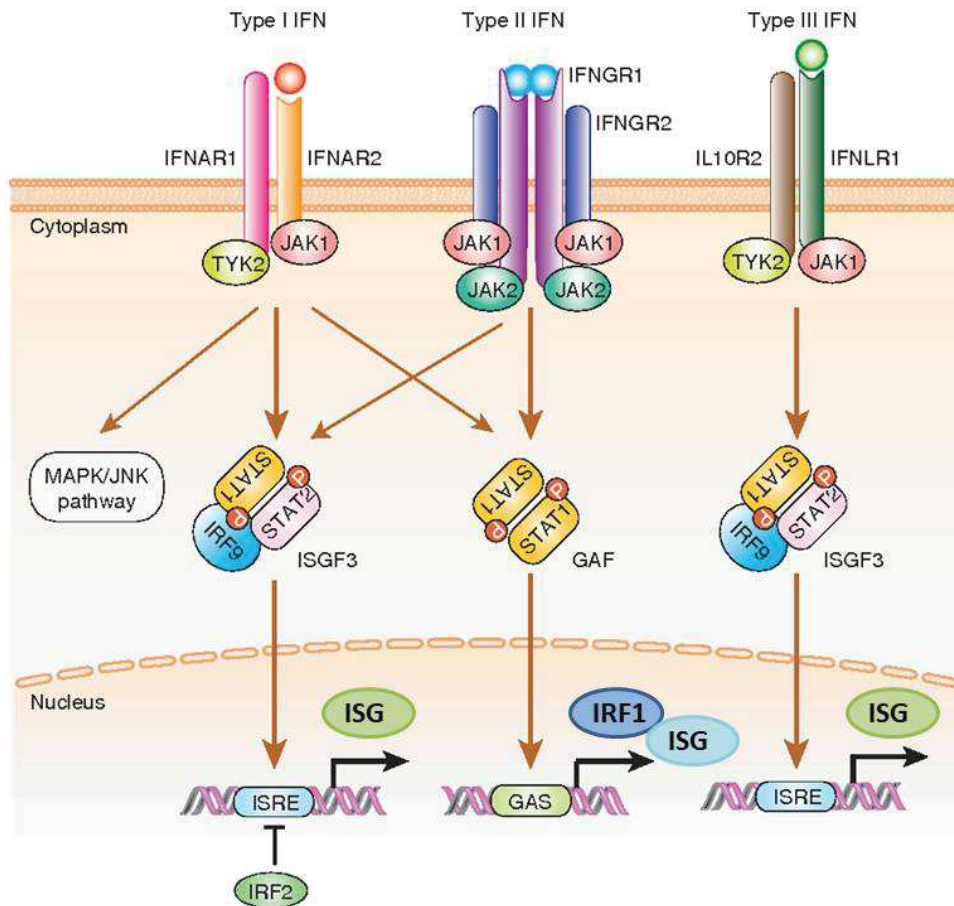
Ainsi, l'investigation du rôle des IFNs de type I sur la dysfonction endothéliale pourrait permettre, en cas de résultats positifs, d'envisager une thérapie anti-interféron ciblée sur l'endothélium (Figure 27). Parmi les molécules éligibles à visée inhibitrice sur les IFNs de type I et conçues pour une utilisation chez l'Homme, il convient de remarquer le développement récent de l'anifrolumab (Furie, et al. 2017). L'anifrolumab est un anticorps monoclonal inhibant de façon efficace la sous-unité IFNAR1 du récepteur des interférons de type I. L'anifrolumab a été développé dans le cadre de la recherche clinique sur le lupus érythémateux systémique (Morand, et al. 2020), pathologie dans laquelle nous avons souligné l'implication des interférons de type I, plus précisément sur la dysfonction endothéliale. A noter que l'anifrolumab visant le

récepteur des IFNs de type I et non pas les interférons eux-mêmes, il peut être utilisé pour une inhibition ciblée.

Toutefois, l'anifrolumab est actuellement un des seuls anti-IFNAR en phase avancée de développement chez l'Homme et n'est pas encore disponible pour un usage clinique. D'autre part, l'anifrolumab n'est pas adapté à la structure d'IFNAR1 chez la souris, ce qui réduit la possibilité des investigations expérimentales indispensables à la mise au point d'une thérapie ciblée. De plus, l'anifrolumab ayant une forte affinité pour IFNAR1, il est possible qu'il s'y fixe indépendamment du ciblage cellulaire du nanovecteur, posant le problème de l'efficacité et de la spécificité du ciblage à l'endothélium vasculaire. Nous nous sommes donc intéressés également à voie de signalisation des interférons de type I qui utilise en particulier STAT1. De façon intéressante, STAT1 est impliqué dans les voies de signalisation des interférons de types I, II, et III (Figure 20 et Figure 28). Par ailleurs, l'implication de STAT1 dans la réponse à la stimulation endotoxinique a bien été montrée (Doughty, et al. 2001; Durbin, et al. 2003).

Si l'utilisation d'inhibiteurs de la voie Jak-STAT à visée systémique semble également imprudente à la phase aiguë du choc septique en raison de leur potentiel immunosuppresseur (de façon similaire à l'anifrolumab), l'effet d'une inhibition ciblée sur l'endothélium mérite d'être étudié de façon expérimentale.

L'implication de STAT1 dans les voies de signalisation des 3 types d'IFNs pourrait permettre d'inhiber plusieurs de ces voies avec une seule et même molécule, mais de façon ciblée sur le tissu endothélial.



**Figure 28 : L'implication de STAT1 dans les voies de signalisation des 3 types d'interférons.** Les récepteurs des IFNs de types I (IFNAR) et III (IFNLR) activent, *via* Tyk-2 et Jak-1, STAT1 et STAT2, qui une fois phosphorylées se lient à l'IRF-9 pour former le facteur de transcription hétérotrimérique ISGF-3. ISGF-3 est transféré dans le noyau cellulaire où il se lie aux ISREs, qui sont des séquences d'ADN situées sur des gènes promoteurs des ISGs. Les IFNs de type I activent également une autre voie, partagée avec l'IFN de type II (IFN- $\gamma$ ) : la voie médiée par GAF ( $\gamma$ -activated factor), GAF étant un homodimère STAT1. GAF est transféré dans le noyau cellulaire où il se lie aux séquences d'ADN de type GAS ( $\gamma$ -activated sequences), aboutissant à une expression d'IRF-1, et d'autres ISGs. **Adapté de Negishi *et al.*, 2019.** Abréviations : IFN, interféron ; IRF, interferon regulatory factor ; ISG, interferon-stimulated gene ; ISGF, interferon-stimulated gene factor ; ISRE, IFN-stimulated response elements.

Ainsi, l'élargissement de nos travaux sur la voie Jak-STAT pourrait conférer un avantage capital à visée thérapeutique, car cette ouverture permettrait d'utiliser l'arsenal thérapeutique déjà très important, et croissant, fourni par les *jakinibs* (Tableau 8). Une thérapie ciblée sur l'endothélium pourrait ainsi également être proposée, en utilisant une nanoparticule vectrice d'un *jakinib* et liant le récepteur endothélial CD31 (Tietjen, et al. 2017).

**Tableau 8 : Inhibiteurs de la voie de signalisation JAK/STAT : cibles, indications et implications en recherche clinique. Réalisation personnelle (Clere-Jehl, et al. 2020).**

Types of inhibitors	Inhibitor	Targeted JAK/STAT	Indications	Phase	Therapeutic trials in progress *
Non selective	<b>Ruxolitinib</b>	JAK1, JAK2	Myelofibrosis / myeloproliferative neoplasms Hematological malignancies Auto-immune diseases	FDA-approved (2011)	223
	<b>Tofacitinib</b>	JAK1, JAK2, JAK3#	Autoimmune diseases (First FDA approval : rheumatoid arthritis)	FDA-approved (2012)	167
	<b>Baricitinib</b>	JAK1, JAK2	Autoimmune diseases	FDA-approved (2018)	76
	<b>Peficitinib</b>	JAK1, JAK2, JAK3, Tyk2#	Autoimmune diseases	Approved in Japan (2019)	34
	<b>Momelotinib</b>	JAK1, JAK2	Myelofibrosis / myeloproliferative neoplasms Advanced Solid Malignancies	III	14
	<b>PF-06700841</b>	Tyk2, JAK1	Autoimmune diseases (Systemic lupus erythematosus, Psoriasis, Inflammatory Bowel Diseases)	II	19
	<b>Cerdulatinib</b>	JAK1, JAK3, Tyk2	Lymphoid malignancies Vitiligo	II B	3
	<b>AZD-1480</b>	JAK1, JAK2	Advanced Solid Malignancies	I	3
Selective	<b>Upadacitinib</b>	JAK1	Autoimmune diseases (First FDA approval : rheumatoid arthritis)	FDA-approved (2019)	41
	<b>Filgotinib</b>	JAK1	Autoimmune diseases (rheumatoid arthritis, Crohn's disease)	III	37
	<b>BMS-986165</b>	Tyk2	Autoimmune diseases (Systemic lupus erythematosus, Psoriasis, Inflammatory Bowel Diseases)	III	36
	<b>Pacritinib</b>	JAK2	Myelofibrosis Hematological malignancies	III	23
	<b>PF-06651600</b>	JAK3	Autoimmune diseases (Alopecia areata, Inflammatory Bowel Diseases)	III	24
	<b>Fedratinib</b>	JAK2	Myelofibrosis / myeloproliferative neoplasms	FDA-approved (2019)	13
	<b>Solcitinib</b>	JAK1	Systemic lupus erythematosus	II	0
	<b>Decernotinib</b>	JAK3	Rheumatoid arthritis	II	0

<b>Other inhibitors</b>	<b>Sunitinib</b>	STAT3 <sup>†</sup>	Renal cell carcinoma (RCC) gastrointestinal stromal tumor (GIST)	FDA-approved (2006)	606
	<b>Axitinib</b>	STAT3 <sup>‡</sup>	Renal cell carcinoma (RCC)	FDA-approved (2012)	150
	<b>AZD-9150</b>	STAT3	Advanced Solid Malignancies Digestive neoplasms, ovarian cancer	II	11
	<b>WP-1066</b>	STAT3	Brain neoplasm	I	2

### Tableau 8 / Notes :

#Tofacitinib et peficitinib sont parfois appelés inhibiteurs "pan-JAK". <sup>†</sup>Sunitinib est un inhibiteur des récepteurs à activité tyrosine-kinase, dont les cibles sont multiples, et qui empêche notamment la phosphorylation de STAT3. <sup>‡</sup>Axitinib est un inhibiteur du récepteur du VEGF, qui fait partie des récepteurs à activité tyrosine-kinase ; axitinib empêche la phosphorylation de STAT3, en particulier au niveau des cellules endothéliales. \*Nombres d'essais cliniques répertoriés sur <https://clinicaltrials.gov/> en date du 20 mai 2020, et n'incluant pas les anciens essais.

Abréviations : JAK, Janus kinase; STAT, signal transducer and activator of transcription; Tyk, tyrosine kinase; VEGF, vascular endothelial growth factor.

## **Objectifs**

Le choc septique demeure une pathologie grevée d'une lourde mortalité et d'une importante morbidité. Si l'amélioration des techniques de suppléance des défaillances d'organes, en complément des traitements à visée anti-infectieuse, a permis une amélioration relative du pronostic, il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement spécifique du choc septique chez l'Homme, en particulier aucun traitement immunomodulateur. Cette absence de thérapeutique spécifique à visée immunologique s'explique en particulier par la difficulté de trouver un traitement immunomodulateur qui n'ait pas d'action systémique négative sur l'ensemble des cellules immunitaires. De plus, il n'existe aucun traitement visant la dysfonction endothéliale, malgré son implication physiopathologique majeure.

Les objectifs de ce travail de thèse étaient donc d'établir :

- Le rôle des IFNs de type I dans la dysfonction endothéliale au cours du choc septique,
- L'impact d'une inhibition des IFNs de type I et de leur voie de signalisation STAT1, ciblée sur l'endothélium.

Ce manuscrit s'organise ainsi autour de nos résultats originaux de recherche expérimentale sur modèle murin et de recherche clinique, dans le cadre d'une approche translationnelle. Les articles sont présentés en rapport avec nos deux objectifs. Le premier article (article original) montre l'impact des interférons de type I sur l'activation et la dysfonction endothéliale au cours du choc septique, chez l'animal et chez l'Homme, ainsi que l'effet de l'inhibition de leur voie de signalisation (STAT1) de façon ciblée sur l'endothélium vasculaire. Le deuxième article (revue de la littérature) met en évidence l'importance de la voie de signalisation JAK-STAT dans le sepsis bactérien, tout en décrivant une approche thérapeutique innovante reposant



sur l'utilisation des *jakinibs* couplés à des nanoparticules thérapeutiques ciblant l'endothélium. La stratégie ciblée ainsi décrite permet d'asseoir les perspectives thérapeutiques découlant des résultats originaux.

## **Travaux personnels**

## Article 1

### **A translational investigation of interferon- $\alpha$ and STAT1 signaling in endothelial cells during septic shock provides therapeutic perspectives**

**Raphaël Clere-Jehl**, Hamid Merdji, Mohamad Kassem, Cécile Macquin, Aurore De Cauwer, Alicia Sibony , Kei Kurihara, Laetitia Minniti, Chérine Abou Fayçal, Seiamak Bahram, Ferhat Meziani, Julie Helms, Philippe Georgel.

Article soumis à American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology

En cours de révision (version présentée: R1)

Notre **premier article** fait état du rôle joué par les interférons de type I dans l'activation et la dysfonction endothéliales au cours du choc septique. La dysfonction endothéliale est un mécanisme central dans physiopathologie du choc septique et elle est impliquée dans la survenue des principaux facteurs associés à la mortalité dans le choc septique : la coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) et la défaillance des organes nobles.

Les résultats de ce travail ont été exposés en trois parties.

Une partie rapporte les résultats obtenus chez l'animal, sur un modèle murin de choc septique (CLP), chez des souris présentant un déficit génétique total en récepteur des interférons de type I (*Ifnar1<sup>-/-</sup>*). Ce travail sur l'animal –réalisé chronologiquement en premier mais présenté en second dans l'article- a servi de point de départ à l'ensemble de notre travail de recherche. Il a permis de confirmer, sur des critères hémodynamiques et de sévérité du sepsis murin, que les souris déficientes en récepteur IFNAR1 sont protégées face au choc septique, ce qui a placé le début de notre travail en cohérence avec la littérature. Nous avons poursuivi les investigations en analysant, par qPCR, l'expression des gènes associés à l'activation et à la dysfonction endothéliales et ce au niveau des tissus aortiques. Ces analyses ont prouvé que le déficit en IFNAR1 est associé à une franche diminution de l'expression des gènes codant pour les molécules d'activation endothéliale, telles qu'ICAM-1.

L'enjeu de la partie clinique a été de transposer à l'Homme ces résultats mettant en rapport les IFNs de type I avec la dysfonction endothéliale au cours du choc septique, dans le cadre de notre objectif translationnel. Cette tâche a été rendue difficile par l'impossibilité de prélever des tissus afin de mesurer l'expression des gènes d'activation endothéliale. Nous avons donc travaillé sur la CIVD, dont on sait qu'elle

est fortement corrélée à l'existence et à l'importance de la dysfonction endothéliale dans le choc septique et sur les microparticules endothéliales circulantes. Parmi tous les types (I, II, III) et sous-types d'interférons dosés, seuls l'IFN- $\alpha$  et son sous-type –  $\alpha$ 1 ont montré une corrélation avec la survenue de la CIVD d'une part et avec le dosage plasmatique des microparticules endothéliales circulantes dans le plasma (notamment CD105) d'autre part. Ces résultats ont confirmé, chez l'Homme, le rôle potentiel des IFNs de type I dans la dysfonction endothéliale au cours du choc septique. En parallèle, nous avons montré une surexpression de l'IFN- $\alpha$  au cours des infections à bacilles Gram négatif.

La troisième et dernière partie des résultats s'est attachée à montrer l'impact d'une inhibition de la voie de signalisation (STAT1) des IFNs de type I, de façon ciblée sur l'endothélium vasculaire au cours du choc septique. Pour ce faire, nous avons créé par croisement, spécifiquement pour ce travail, une lignée de souris de type CreLox, présentant un déficit en protéine STAT1 de façon élective sur l'endothélium et inducible par tamoxifène. Cette lignée de souris a montré une résistance face au choc septique induit par CLP, attestée par une amélioration significative du profil hémodynamique et du score de sévérité du sepsis murin.

En conclusion, nous avons confirmé dans ce travail le rôle des interférons de type I dans la dysfonction endothéliale au cours du choc septique, chez la souris et chez l'Homme, et l'effet protecteur conféré par leur inhibition ciblée sur l'endothélium, répondant ainsi à la question inhérente au sujet de la présente thèse. De façon complémentaire, nous avons montré le même type d'effet protecteur de l'inhibition de leur voie de signalisation (STAT1) ciblée sur l'endothélium, permettant d'ouvrir les perspectives thérapeutiques sur une utilisation des *jakinibs* ciblée sur l'endothélium.

# **A translational investigation of interferon- $\alpha$ and STAT1 signaling in endothelial cells during septic shock provides therapeutic perspectives**

Raphaël Clere-Jehl <sup>1,2</sup>, Hamid Merdji <sup>1,3</sup>, Mohamad Kassem <sup>3</sup>, Cécile Macquin <sup>2</sup>, Aurore De Cauwer <sup>2</sup>, Alicia Sibony <sup>1,2</sup>, Kei Kurihara <sup>3</sup>, Laetitia Minniti <sup>1,2</sup>, Chérine Abou Fayçal <sup>2</sup>, Seiamak Bahram <sup>2</sup>, Ferhat Meziani <sup>1,3</sup>, Julie Helms <sup>1,2\*</sup>, Philippe Georgel <sup>2\*</sup>.

<sup>1</sup> Université de Strasbourg (UNISTRA), Faculté de Médecine, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Service de Médecine Intensive-Réanimation, Nouvel Hôpital Civil, Strasbourg, France

<sup>2</sup> Laboratoire d'ImmunoRhumatologie Moléculaire, INSERM (French National Institute of Health and Medical Research), UMR\_S1109, Centre de Recherche d'Immunologie et d'Hématologie, Faculté de Médecine, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Université de Strasbourg, 67085 Strasbourg Cedex, France

<sup>3</sup> INSERM, UMR\_S1260, Regenerative Nanomedicine (RNM), Faculté de Pharmacie, FMTS, Université de Strasbourg, 67085 Strasbourg Cedex, France

## **\* Corresponding authors:**

Julie Helms  
Service de Service de Médecine Intensive-Réanimation  
Nouvel Hôpital Civil  
1, place de l'Hôpital  
F-67091 Strasbourg Cedex, France.  
Phone: +33 (0) 369 550 434; Fax: +33 (0) 369 551 859  
E-mail: Julie.helms@chru-strasbourg.fr

Philippe Georgel  
INSERM UMR\_S 1109 Molecular ImmunoRheumatology

Centre d'Hématologie et d'Immunologie  
Faculté de Médecine  
1 Place de l'Hôpital  
67085 Strasbourg, France  
Phone: +33(0)368853984  
E-mail: [pgeorgel@unistra.fr](mailto:pgeorgel@unistra.fr)

**Authors' contribution:** JH, SB, FM, PG and RCJ participated in the writing and editing of the manuscript. MK and KK performed the surgery on mice and the measurement of intra-carotid blood pressure. CM, AS, LM, CAF and ADC performed the analyses on mice organs. JH, FM, HM and RCJ included the patients. AS and RCJ performed the ELISA assays on human plasma samples.

**Funding:** This work was supported by grants from INSERM U1109, the Institut Universitaire de France (IUF), the University of Strasbourg (including IDEX UNISTRA), all to SB. Research work in our intensive care unit is supported by grants from the ADIRAL Assistance and from the French Eastern Interregional Group of Clinical Research and Innovation (GIRCI Est ; appel à projet « jeunes chercheurs », APJ 2018).

**Running title: IFN- $\alpha$  and sepsis-induced endothelial dysfunction**

**Descriptor number:** 3.4 Endothelium

**Word count:** 3056

**At a Glance:** This work provides new insights into the role of IFN- $\alpha$  and its signaling pathway in the sepsis-induced endothelial dysfunction and in the related disseminated intravascular coagulation, in animals as in humans. Moreover, by showing the efficiency of a endothelium-targeted inhibition of *Ifnar1* and *Stat1* in sepsis, this study offers interesting therapeutic perspectives acting at the endothelial level.

**Online data supplement:** This article has an online data supplement, which is accessible from this issue's table of content online at [www.atsjournals.org](http://www.atsjournals.org)

## Abstract

**Rationale:** Septic shock and disseminated intravascular coagulation are characterized by an endothelial cell dysfunction. The molecular mechanisms underlying this relationship are poorly understood.

**Objectives:** To investigate human circulating interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) in septic shock-induced DIC and to test the potential role of endothelial *Stat1* as a therapeutic target.

**Methods:** *i*) Circulating type I, II and III IFNs and procoagulant microvesicles were quantified in a prospective cohort of septic shock patients *ii*) In a septic shock model by cecal ligation and puncture (CLP) in wild-type (WT) mice and *Ifnar1* (type I IFN receptor)-knockout (KO) mice, endothelial cell activation was assessed using RT-qPCR in aorta to quantify gene expression. *iii*) The efficacy of tamoxifen-inducible conditional *Ifnar1*- and *Stat1*-KO mice (CreERT<sup>2</sup>/LoxP) was assessed.

**Measurements and Main Results:** In humans, circulating IFN- $\alpha$  and IFN- $\alpha$ 1 expressions were higher in DIC compared to non-DIC patients (700 pg/mL [381-1417] vs. 347 [26-697],  $p < 0.01$ ; 91 pg/mL [42-177] vs. 54 [13-93],  $p = 0.04$ ). Levels of IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IFN- $\lambda$ 1, IFN- $\lambda$ 2, IFN- $\lambda$ 3 were not different. IFN- $\alpha$  level was positively correlated with CD105-microvesicle levels, reflecting endothelial injury ( $r = 0.599$ ;  $p < 0.05$ ).

In *Ifnar1*<sup>-/-</sup> mice CLP did not induce septic shock, and was characterized by lesser endothelial cell injury, with lower aortic inflammatory cytokine expression, endothelial inflammatory-related genes expression and fibrinolysis. *Stat1*<sup>fl/fl</sup>;Cdh5(PAC)-CreERT<sup>2</sup> mice were protected from sepsis as *Ifnar1*<sup>-/-</sup> mice, suggesting the value of an endothelium-targeted strategy.

**Conclusions:** This work highlights the potential key roles of type I interferons as pathogenic players in septic shock-induced DIC and the potential pertinence of STAT1 as an endothelial target.



**Word count (abstract):** 250

**Key words:** sepsis, endothelium, disseminated intravascular coagulation, interferons, STAT transcription factors

## Introduction

Septic shock is a life-threatening condition caused by a dysregulated host immune response to infection (1), which contributes to a subsequent endothelial dysfunction (2, 3). Up to 30 to 40% of patients develop a disseminated intravascular coagulation (DIC) secondary to this endothelial dysfunction, characterized by a dysregulated activation of coagulation, disseminated microthrombosis and subsequent multiple organ failure and death (4-6). However, molecular mechanisms linking immune dysfunction to endothelial dysfunction and coagulation dysregulation are still debated (7).

Interferons (IFNs), which mostly act as proinflammatory mediators (8), are divided into three families (9). Type I IFNs include IFN- $\alpha$ , - $\beta$  and - $\omega$  and share a common heterodimeric receptor made of IFN- $\alpha$  receptor 1 (IFNAR1) and 2 (IFNAR2) chains (10). Type II IFN is represented by IFN- $\gamma$ , which signals through the IFN- $\gamma$  receptor (IFNGR) (11). Type III IFNs include IFN- $\lambda$ 1 (IL-29), IFN- $\lambda$ 2 (IL-28A) and IFN- $\lambda$ 3 (IL-28B) (12) and signal through the IFN- $\lambda$  receptor 1 (IFNLR1) paired with the IL-10R2 subunit. These three IFN families participate in the proinflammatory response and subsequent organ damages/lethality (13-15). However, the precise role of each IFN type remains to be elucidated in sepsis.

Recently, type I IFNs have been shown to be involved in the pathophysiology of DIC induced by Gram-negative bacteria infections in mice (16), through LPS-TLR4 interactions (17, 18) and a TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$  (TRIF)-dependent pathway (19). Type I IFNs and their receptor use a JAK-STAT signaling pathway, in which STAT1 is essential: in response to IFN- $\alpha$  binding, IFNAR subunits associate and activate Jak1 and tyrosine kinase 2 (Tyk2), allowing the STAT1 and STAT2 phosphorylation, which associate with interferon regulatory factor 9 (IRF-9) to form the heterotrimeric transcription factor complex Interferon-Stimulated Gene Factor 3 (ISGF-3) (20). Type I IFNs-dependent activation of the Jak1/STAT1 pathway induces the transcription of various mediators, including extracellular high-mobility

group box 1 (HMGB-1) (21), promoting the externalization of phosphatidylserine (PS) at cell surface (16). PS externalization increases the procoagulant activity of tissue factor (TF) (22), which activates factor VII and initiates the coagulation cascade (23). Moreover, activated leukocytes release mediators, activating IFN-response by endothelial cells (24) in a positive feedback loop.

The aim of the present translational study was to assess the role of type I IFN in sepsis-induced endothelial dysfunction and to identify a potential therapeutic target to prevent this dysfunction in septic shock (16). The role of type I IFN in septic shock-induced inflammation and endothelial dysfunction was assessed in a cohort of septic shock patients with or without DIC, and in mice lacking *Ifnar1*, which are protected against sepsis (13, 25, 26). Lastly, we have evidenced that a significant protection against septic shock was provided by endothelium-specific *Ifnar1* and *Stat1* KO mice, opening the way to future cell-targeted therapy using Jak/Stat inhibitors and broadening therapeutic options for sepsis.

## **Methods**

### **Patients**

Adult patients admitted in ICU for septic shock (2) were prospectively included after written consent. There were 32 patients with, and 33 without DIC. DIC was positively diagnosed once the JAAM-DIC 2016 score was above 4 (27). Exclusion criteria included history of auto-immune or auto-inflammatory diseases, tuberculosis, pregnancy or hematologic malignancy. Controls were 15 healthy adult blood donors recruited by the French blood agency. The ethics committee of Strasbourg University Hospital approved the study (n° DC-2016-2794). Data collection and blood samples management are described in an online data supplement.

### **ELISA assays for Interferons**

Interferon assays were performed using enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) according to the manufacturer's instructions. Seven types or subtypes of IFNs were quantified: IFN- $\alpha$  (RayBiotech<sup>®</sup>, Norcross, GA, USA), IFN- $\alpha$ 1/13 subtype and IFN- $\beta$  (FineTest<sup>®</sup>, Wuhan, Hubei, China), IFN- $\gamma$ , IFN- $\lambda$ 1 (IL-29) and IFN- $\lambda$ 2 (IL-28A) (Boster<sup>®</sup>, Pleasanton, CA, USA), and IFN- $\lambda$ 3 (IL-28B) (OmniKine<sup>™</sup>, Assay Biotechnology Company, Sunnyvale, CA, USA).

### **Microvesicle quantification**

Procoagulant microvesicles were measured by prothrombinase assay and their levels were expressed in nanomolar phosphatidylserine equivalents (nM eq. PhtdSer) (28). The cellular origin of microvesicles was determined by biotinylated monoclonal antibodies: anti-CD105 for stimulated endothelial cells, anti-CD31 for apoptotic endothelial cells and anti-CD11a for activated leucocytes (29).

## **Animals**

Mice deleted for the IFN- $\alpha$  receptor (*Ifnar1*<sup>-/-</sup> mice) were obtained from Rolf Zinkernagel (University Hospital, Zurich, Switzerland) and compared to their littermates controls (*Ifnar1*<sup>wt</sup>). Endothelium-specific tamoxifen-inducible conditional *Ifnar1* and *Stat1* knockout mice (*CreERT*<sup>2</sup>/*LoxP* transgenic mice) were obtained by crossing *B6-Cdh5(PAC)-CreERT*<sup>2</sup> transgenic mice (30), obtained from the Max Planck Institute for Molecular Medicine (Münster, Germany), and either *B6.129-Ifnar1*<sup>tm1Uka</sup> (31) or *B6-STAT1*<sup>tm1c(EUCOMM)Wtsi</sup> floxed mice, obtained from Marc Dalod (Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Aix-Marseille University, France). Endothelial deletion of *Ifnar1* or *Stat1* was initiated 12 days before the sacrifice and induced by a daily injection of tamoxifen (30  $\mu$ g/g of body weight) for 5 days. Mutant mice were compared to their littermates controls *Ifnar1*<sup>+/+</sup> or *Stat1*<sup>+/+</sup>; *B6-Cdh5(PAC)-CreERT*<sup>2</sup> mice, all of which were treated with tamoxifen. Mouse experiments were approved by the institutional ethics committee (CREMEAS; approval number: APAFIS#14927-2018050214561547).

## **Mice model of septic shock**

Cecal ligation and puncture (CLP) was performed as previously described (32) in 8-week-old mice, and compared to sham-operated mice (see the online data supplement).

## **Exploration of septic-shock induced endothelial activation and dysfunction in mice**

After mRNA extraction from the aorta and the kidneys, the relative expression of eight genes was measured by RT-qPCR: inflammatory markers (*Tnf*, *Il-1 $\alpha$* , *Il-6*), *Cxcl1* reflecting neutrophilic infiltrate, endothelial activation (*Icam-1*, *E-selectin*), injury (*Zonula occludens-1*) and fibrinolysis (*Pai-1*) markers.

## **Statistical analyses**

Quantitative variables are described using the medians [IQR 25-75] if not mentioned otherwise. Qualitative variables are described as numbers and percentages. Comparisons between the quantitative variables were realized with the Mann-Whitney test. The differences between the values for different days (d1, d3, d7) were analyzed with the Kruskal-Wallis test and, when significant, Dunn's multiple comparisons tests were used. To compare the qualitative variables, a non-parametric Fisher's exact test was used. Relationships between two quantitative variables were analyzed using the Spearman's correlation coefficient. The significance level was fixed at 5%. Statistics were calculated using Graph Pad Prism v7 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

## Results

### **Interferon- $\alpha$ is involved in septic shock-induced endothelial activation and DIC in humans**

#### *Patient baseline characteristics*

Samples from 65 septic shock patients and fifteen healthy controls were analyzed. Baseline characteristics of septic shock patients, including 32 DIC and 33 non-DIC patients (see flow chart on Figure E1 in the online data supplement), are summarized in Table 1. Septic shock patients were mostly male with a median age of 61 years (IQR, 55-70). The most frequent infection sites were blood-stream (34%; n=22) and the lung (29%; n=19). Gram negative bacilli were the most frequently isolated pathogen (43%; n=28). Acute kidney injury (KDIGO stage 2 and 3) was the most frequent organ failure (75%, n=49). Among the 33 patients without DIC at day 1, a minority of patients (n=5) developed DIC at day 2 (See Table E2 in the online data supplement), and were analyzed in their initial group (non-DIC patients). During the first week in the ICU, 23% of patients died (n=15) and 17% were released from ICU (n=11); hence, 39 patients reached the day-7 sample (See Table E3 in the online data supplement). Mortality reached 34% (n=22) at day 28.

#### *DIC patients displayed higher IFN- $\alpha$ and IFN- $\alpha$ 1 plasma levels*

DIC patients displayed a 2-fold higher median IFN- $\alpha$  plasma level (Figure 1) at day 1 compared with patients without DIC (700 pg/mL [IQR, 381-1417] vs. 347 [IQR, 26-697]; p<0.01). IFN- $\alpha$ 1 subtype plasma level at day 1 was also higher in DIC patients (91 pg/mL [IQR, 42-177] vs. 54 [IQR, 13-93]; p=0.04). Healthy controls exhibited median IFN- $\alpha$  and IFN- $\alpha$ 1 levels of respectively 118 pg/mL [IQR, 52-275] and 8.9 pg/mL [IQR, 4.7-13.1]. The others interferon subtype levels were not different between patients with vs. without DIC (See Table E4 in the online data supplement).

### *Correlations between interferon- $\alpha$ levels and DIC-associated microvesicles*

Significant correlations were found between IFN- $\alpha$  and endothelial CD105-microvesicles ( $r=0.599$ ;  $p<0.05$ ) and leukocyte-derived CD11a-microvesicles ( $r=0.474$ ;  $p<0.01$ ) (See Figure E2 in the online data supplement). These results were confirmed by significant correlations between IFN- $\alpha 1$  levels and CD105- and CD11a-microvesicles ( $r=0.438$ ;  $p<0.05$  and  $r=0.488$ ;  $p<0.01$ , respectively). No correlation was found with CD31-microvesicles, which are associated to endothelial cell apoptosis.

### *Interferon- $\alpha 1$ levels depend on the type of pathogen and infection source*

IFN- $\alpha 1$  levels were significantly higher in septic shock patients infected by Gram negative bacilli compared to Gram positive cocci (93 [37-92] pg/mL vs. 24 [12-61] pg/mL,  $p=0.02$ ) (Figure 2A). IFN- $\alpha$  were not significantly different (682 [296-1060] vs. 314 [106-845] pg/mL,  $p=NS$ ).

As far as infection source is concerned, the highest levels of IFN- $\alpha$  and IFN- $\alpha 1$  were observed in patients with urinary tract infections (610 [278-929] and 119 [57-173] pg/mL respectively), followed by bacteremia (598 [168-3851] and 75 [31-93] pg/mL respectively) (Figure 2B).

## **Role of interferon- $\alpha$ and signaling pathway in septic shock-induced endothelial cell activation and dysfunction in mice**

### *Ifnar1<sup>-/-</sup> mice were protected against CLP-induced septic shock*

*Ifnar1<sup>-/-</sup>* mice ( $n=12$ ) were partly protected against septic shock, as assessed by significantly higher blood pressure and lower murine sepsis severity score in CLP group ( $n=6$ ) (Figure 3). Of note, 2/8 (25%) *Ifnar1<sup>+/+</sup>* mice in CLP group died before blood pressure could be measured ( $n=6/8$ ), due to severity of septic shock.



*Endothelial injury was reduced in Ifnar1<sup>-/-</sup> mice after CLP-induced septic shock*

*Ifnar1<sup>-/-</sup>* mice expressed a significantly lower level of transcripts encoding inflammatory markers (especially *Il-1α* and *Il-6*) in their aorta during CLP, as well as a reduced *Cxcl1* mRNA level (Figure 4A), in favor of reduced neutrophil chemotaxis. Moreover, *Ifnar1<sup>-/-</sup>* mice exhibited reduced expression of genes involved in endothelial activation (*Icam-1*, *E-selectin*), endothelial injury (*Zonula occludens-1*), and DIC (*Pai-1*) (Figure 4B). Similar results were obtained on kidney transcripts (See Figure E3 on the online data supplement). This reduced endothelial activation was confirmed by light microscopy with immunofluorescence, showing that CLP-induced overexpression of VCAM-1 is reduced in *Ifnar1<sup>-/-</sup>* mice (Figure 5). The microscopy results for sham mice are shown in Figure E4 (See the online data supplement).

*Endothelium-specific conditional Ifnar1- and Stat1-knockout mice were protected against CLP-induced septic shock*

To identify the role of IFN-dependent signaling in the endothelium, we used an endothelium-targeted deletion of *Ifnar1* and *Stat1* induced by the inducible expression of a transgene expressing a CreERT<sup>2</sup> under the control of a cadherin 5 (*Cdh5*, a vascular endothelial-specific gene) promoter. Comparison of hemodynamics and severity of sepsis between *Stat1<sup>fl/fl</sup>; Cdh5-Cre* mice (n=7) and littermate controls (*Stat1<sup>+/+</sup>; Cdh5-Cre*) mice (n=7) were made following cecal ligation and puncture (CLP). The same comparisons following CLP were made between *Ifnar1<sup>fl/fl</sup>; Cdh5-Cre* mice (n=5) and littermate controls (*Ifnar1<sup>+/+</sup>; Cdh5-Cre*) mice (n=7). Mice carrying an endothelium-specific *Stat1* deletion were protected against septic shock, as attested by significantly higher blood pressure and lower murine sepsis severity score (Figure 6). We also checked that tamoxifen-free *Ifnar1<sup>fl/fl</sup>* and *Stat1<sup>fl/fl</sup>* mice exhibited similar results with control mice (see Figure E5 in the online data supplement).

*Endothelium-specific conditional Stat1-knockout mice displayed decreased inflammation and endothelial injury*

Endothelium-targeted deletion of *Stat1* induced a significantly reduced level of transcripts encoding inflammatory markers (*Il-1 $\alpha$* , *Il-6*) in their kidney during CLP. Markers of activated type I IFNs signalization pathway (*Mx2*) were also lower (See Figure E6A on the online data supplement). In addition, endothelium-specific *Stat1* deletion displayed a reduced expression of genes involved in endothelial activation (*Icam-1*, *Vcam-1*), endothelial injury (*Zonula occludens-1*), and DIC (*Pai-1*) (Figure E6B). These results were obtained on kidneys transcripts, because aortas were preferentially used for immunofluorescence microscopy, which highlighted that CLP-induced overexpression of VCAM-1 is reduced in *Stat1<sup>fl/fl</sup>; Cdh5-Cre* mice, as in *Ifnar1<sup>-/-</sup>* mice (Figure 5). Of note, plasma IL-6 levels 20 hours after CLP were not different between controls and mutants, suggesting that the effect on systemic inflammation does not explain the differences on endothelial inflammation and activation, which is in favor of an action at the endothelial level (See Figure E7 in the online data supplement). Finally, differences regarding RT-qPCR (*DNS*) and microscopy with VCAM-1 immunofluorescence staining (Figure 5) between endothelium-specific *Ifnar1*-knockout mice and controls were not significant.

## Discussion

This work provides evidence, in humans and mice, that IFN- $\alpha$  and downstream signaling pathway play a significant role in endothelial dysfunction and in the pathogenesis of septic shock-induced disseminated intravascular coagulation.

We first focused here on the role of IFN- $\alpha$  in sepsis-induced endothelial activation and DIC. For this, we quantified IFNs and endothelial-derived microvesicles in blood samples of 65 patients admitted to ICU for septic shock with or without DIC, while the role of inflammatory cytokines in sepsis was previously investigated in cohorts of limited size (30 patients compared to 13 controls) (33, 34). We found elevated IFN- $\alpha$  levels in DIC patients, which may be due to the high proportion of Gram-negative bacterial infection in our cohort (35). Indeed, leukocytes mostly express IFN- $\alpha$ 1 in response to LPS (35), which fits with the high rate of Gram-negative bacterial infection seen in our cohort. Interestingly, quantification of the IFN- $\alpha$ 1 subtype - which is similar to IFN- $\alpha$ 13 (35)- is proportional to that of IFN- $\alpha$  - which reflects additional IFN- $\alpha$  subtypes (36), thereby eliminating a technical bias.

Furthermore, our work establishes a functional link between IFN- $\alpha$ /- $\alpha$ 1 and markers of endothelial activation (microvesicles) and endothelial dysfunction during septic shock. Indeed, the amounts of circulating CD105-microvesicles, which are derived from stimulated endothelial cells (37), are significantly correlated with IFN- $\alpha$ /- $\alpha$ 1 (and not other types of IFNs) levels. This strongly supports the IFN- $\alpha$ -mediated endothelial activation during sepsis. A similar rise in CD11a-microvesicles, emanating from leukocytes, suggests that activation of these cells results from cellular contacts through adhesion molecules with the endothelium (38, 39). Importantly, no correlation was found with CD31-containing microvesicles, which rules out a potential effect of endothelial cell apoptosis (40).

Our results must be discussed regarding the differences between the two groups of patients. Indeed, patients with DIC exhibit a higher severity of septic shock, especially with more acute

kidney failures and a more frequent use of renal replacement therapy (RRT). Although this higher severity and more frequent organ failures are well described among DIC patients (6), we cannot rule out that these differences could have influenced the levels of IFN- $\alpha$  and of endothelium-derived microvesicles, through the overexpression due to the overall severity of the disease, or through clearance differences. We can only show that IFN- $\alpha$ / $\alpha$ 1 are significantly associated with DIC and with endothelium-derived microvesicles in our human population. Due to the small sample size of our pilot-study, it is not possible to prove that type I IFNs are independently associated with DIC or with endothelium-derived microvesicles levels. However, we aim at adjusting for imbalances in future clinical studies, in which we plan to include more patients.

Of note, we analyzed the 5 patients developing DIC at day 2 (Table E2) in their initial group (non-DIC patients), in order not to select patients regarding their evolution. Indeed, we wanted to compare patients based on their clinical presentation at day 1, given that further clinical studies will aim at targeting patients as soon as day 1. We then observed that IFN- $\alpha$ / $\alpha$ 1 levels increased in parallel with the development of DIC. Whether this elevation is responsible for endothelial dysfunction and subsequent coagulopathy or is just due to earlier admission in ICU, is presently difficult to assess. Such difficulties to precise timing, links and mechanisms of sepsis in humans compelled us to study the role of type I IFNs and pathway in endothelial dysfunction in septic mice.

With this question in mind, we secondly showed an increased resistance and improved hemodynamics in *Ifnar1*<sup>-/-</sup> mice following CLP, in agreement with previous studies demonstrating a protective effect of type I IFN blockade during murine sepsis (13, 25, 26, 41). While our results essentially show hemodynamics and sepsis severity which were recorded first chronologically, it is important to note that our main goal was to study the endothelial activation and dysfunction. Better survival in sepsis models is often presented as a consequence of reduced

expression of pro-inflammatory cytokines, including *Il-6* (13, 25). Our results confirm the impact of type I IFN on hyperinflammation. However, beyond the role of type I IFNs in hyperinflammation, we have also shown IFN-dependent transcriptional regulation of genes involved in endothelial activation (*Icam-1*, *E-selectin*) (42) and in response to endothelial injury (*Zonula occludens-1*) (43). Moreover, both mRNA extracted from the aorta and the kidneys, reflecting the macro- and the micro-circulation respectively, showed similar results in *Ifnar1*<sup>-/-</sup> mice, micro-circulation being generally the most implicated in the coagulopathy process. Our results are therefore consistent with recent data highlighting type I IFN-mediated activation of the coagulation cascade in response to Gram-negative bacteria (16). Moreover, type I IFN-dependent increased *Pai-1* expression has been observed by Yang *et al.* (16), in line with our results. PAI-1 is correlated with sepsis-induced endothelial dysfunction, inhibits fibrinolysis and thus contributes to massive fibrin depositions in microvessels during DIC (44). Accordingly, low *Pai-1* expression in *Ifnar1*<sup>-/-</sup> mice upon CLP highlights the role of IFN- $\alpha$  in both endothelial dysfunction and sepsis-induced DIC.

Finally, we have reported the major contribution of endothelium-specific IFN signaling in the pathophysiology of sepsis, through the results obtained with endothelium-specific conditional *Ifnar1*- and *Stat1*-knockout mice. Of note, endothelium-targeted *Stat1*-deficient mice displayed the most significant results regarding sepsis severity, hemodynamics, inflammation and endothelial activation. This can be explained by the implication of STAT1 in several signaling pathways of the inflammatory response, such as type II/III IFNs and IL-27 (45, 46), whereas a deletion of *Ifnar1* restricted to the endothelium appears insufficient to reduce endothelial dysfunction and to protect from septic shock. This also suggests that treating sepsis-induced endothelial dysfunction needs to target a set of proinflammatory mediators pathways, among which IFNAR play an important but non-exclusive role, and for which STAT1 is at the crossroads. Therefore, our observation suggests novel therapeutic options.

Indeed, STAT1-mediated inhibition of IFN signaling can be achieved by *jakinibs* acting on Jak1, such as ruxolitinib (47). Moreover, ruxolitinib was shown to specifically improve IFN- $\alpha$ -mediated endothelial lesions in auto-immune diseases (48). Therefore, the potential efficacy of an endothelium-targeted strategy using *jakinibs* (45), demonstrated here by conditional *Stat1* knockout mice, offers interesting therapeutic perspectives.

## Conclusion

Altogether, our results confirm the involvement of IFN- $\alpha$ , its receptor (IFNAR1) and downstream signaling components (e.g. STAT1) in the circulatory failure during septic shock, especially following Gram-negative bacterial infections. Combining mouse models with human samples from sepsis patients, we provide evidence for a role of IFN- $\alpha$  in endothelial cells inflammation, activation and dysfunction, as well as in the subsequent DIC. Our work brings novel mechanistic insights for a better understanding of the pathophysiology of this disease and the management of patients. It also provides potential endothelium-targeted therapeutic strategies.

## Acknowledgements

We sincerely thank Marc Dalod and Karine Crozat for their helpful contribution. Mice *B6.129-Ifnar1<sup>tm1Uka</sup>* or *B6-STAT1<sup>tm1c(EUCOMM)Wtsi</sup>* were provided by Marc Dalod from the Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy (CIML), Marseille, France. *Cdh5(PAC)-CreERT<sup>2</sup>* mice, developed by Ralf Adams (30), were provided by the Max Planck Institute for Molecular Medicine (Münster, Germany) with permission from Cancer Research Technology Limited (Angel Building, 407 St John Street, London, EC1V 4AD, United Kingdom).

## References

1. Finfer S, Machado FR. The Global Epidemiology of Sepsis. Does It Matter That We Know So Little? *Am J Respir Crit Care Med* 2016; 193: 228-230.
2. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent JL, Angus DC. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016; 315: 801-810.
3. Joffe J, Hellman J, Ince C, Ait-Oufella H. Endothelial Responses in Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2020.
4. Boisrame-Helms J, Kremer H, Schini-Kerth V, Meziani F. Endothelial dysfunction in sepsis. *Curr Vasc Pharmacol* 2013; 11: 150-160.
5. Delabranche X, Helms J, Meziani F. Immunohaemostasis: a new view on haemostasis during sepsis. *Annals of intensive care* 2017; 7: 117.
6. Delabranche X, Quenot JP, Lavigne T, Mercier E, Francois B, Severac F, Grunebaum L, Mehdi M, Zobairi F, Toti F, Meziani F, Boisrame-Helms J, on behalf to the Clinical Research in Intensive C, Sepsis N. Early Detection of Disseminated Intravascular Coagulation During Septic Shock: A Multicenter Prospective Study. *Crit Care Med* 2016; 44: e930-939.
7. Levi M, van der Poll T. Inflammation and coagulation. *Crit Care Med* 2010; 38: S26-34.
8. Hotchkiss RS, Moldawer LL, Opal SM, Reinhart K, Turnbull IR, Vincent JL. Sepsis and septic shock. *Nat Rev Dis Primers* 2016; 2: 16045.
9. Stanifer ML, Pervolaraki K, Boulant S. Differential Regulation of Type I and Type III Interferon Signaling. *Int J Mol Sci* 2019; 20.
10. Lopez de Padilla CM, Niewold TB. The type I interferons: Basic concepts and clinical relevance in immune-mediated inflammatory diseases. *Gene* 2016; 576: 14-21.
11. Lee AJ, Ashkar AA. The Dual Nature of Type I and Type II Interferons. *Front Immunol* 2018; 9: 2061.
12. Osterlund PI, Pietila TE, Veckman V, Kotenko SV, Julkunen I. IFN regulatory factor family members differentially regulate the expression of type III IFN (IFN-lambda) genes. *J Immunol* 2007; 179: 3434-3442.
13. Dejager L, Vandevyver S, Ballegeer M, Van Wonterghem E, An LL, Riggs J, Kolbeck R, Libert C. Pharmacological inhibition of type I interferon signaling protects mice against lethal sepsis. *J Infect Dis* 2014; 209: 960-970.
14. Romero CR, Herzig DS, Etogo A, Nunez J, Mahmoudizad R, Fang G, Murphey ED, Toliver-Kinsky T, Sherwood ER. The role of interferon-gamma in the pathogenesis of acute intra-abdominal sepsis. *J Leukoc Biol* 2010; 88: 725-735.

15. Zanoni I, Granucci F, Broggi A. Interferon (IFN)-lambda Takes the Helm: Immunomodulatory Roles of Type III IFNs. *Front Immunol* 2017; 8: 1661.
16. Yang X, Cheng X, Tang Y, Qiu X, Wang Z, Fu G, Wu J, Kang H, Wang J, Wang H, Chen F, Xiao X, Billiar TR, Lu B. The role of type 1 interferons in coagulation induced by gram-negative bacteria. *Blood* 2020; 135: 1087-1100.
17. Richez C, Yasuda K, Watkins AA, Akira S, Lafyatis R, van Seventer JM, Rifkin IR. TLR4 ligands induce IFN-alpha production by mouse conventional dendritic cells and human monocytes after IFN-beta priming. *J Immunol* 2009; 182: 820-828.
18. Hoshino K, Kaisho T, Iwabe T, Takeuchi O, Akira S. Differential involvement of IFN-beta in Toll-like receptor-stimulated dendritic cell activation. *Int Immunol* 2002; 14: 1225-1231.
19. Hu W, Jain A, Gao Y, Dozmorov IM, Mandraju R, Wakeland EK, Pasare C. Differential outcome of TRIF-mediated signaling in TLR4 and TLR3 induced DC maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112: 13994-13999.
20. Horvath CM. The Jak-STAT pathway stimulated by interferon alpha or interferon beta. *Sci STKE* 2004; 2004: tr10.
21. Lu B, Antoine DJ, Kwan K, Lundback P, Wahamaa H, Schierbeck H, Robinson M, Van Zoelen MA, Yang H, Li J, Erlandsson-Harris H, Chavan SS, Wang H, Andersson U, Tracey KJ. JAK/STAT1 signaling promotes HMGB1 hyperacetylation and nuclear translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111: 3068-3073.
22. Langer F, Ruf W. Synergies of phosphatidylserine and protein disulfide isomerase in tissue factor activation. *Thromb Haemost* 2014; 111: 590-597.
23. Golino P. The inhibitors of the tissue factor:factor VII pathway. *Thromb Res* 2002; 106: V257-265.
24. Le KTT, Chu X, Jaeger M, Plantinga JA, Matzaraki V, Withoff S, Joosten LAB, Netea MG, Wijmenga C, Li Y, Moser J, Kumar V. Leukocyte-Released Mediators in Response to Both Bacterial and Fungal Infections Trigger IFN Pathways, Independent of IL-1 and TNF-alpha, in Endothelial Cells. *Front Immunol* 2019; 10: 2508.
25. Mahieu T, Park JM, Revets H, Pasche B, Lengeling A, Staelens J, Wullaert A, Vanlaere I, Hochepped T, van Roy F, Karin M, Libert C. The wild-derived inbred mouse strain SPRET/Ei is resistant to LPS and defective in IFN-beta production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 2292-2297.
26. Karaghiosoff M, Steinborn R, Kovarik P, Kriegshauser G, Baccarini M, Donabauer B, Reichart U, Kolbe T, Bogdan C, Leanderson T, Levy D, Decker T, Muller M. Central role for type I interferons and Tyk2 in lipopolysaccharide-induced endotoxin shock. *Nat Immunol* 2003; 4: 471-477.



27. Iba T, Di Nisio M, Thachil J, Wada H, Asakura H, Sato K, Kitamura N, Saitoh D. Revision of the Japanese Association for Acute Medicine (JAAM) disseminated intravascular coagulation (DIC) diagnostic criteria using antithrombin activity. *Crit Care* 2016; 20: 287.
28. Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ, Ahn YS, Biro E, Nieuwland R, Sturk A, Dignat-George F, Sabatier F, Camoin-Jau L, Sampol J, Hugel B, Zobairi F, Freyssinet JM, Nomura S, Shet AS, Key NS, Hebbel RP. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 1842-1851.
29. Delabranche X, Boisrame-Helms J, Asfar P, Berger A, Mootien Y, Lavigne T, Grunebaum L, Lanza F, Gachet C, Freyssinet JM, Toti F, Meziani F. Microparticles are new biomarkers of septic shock-induced disseminated intravascular coagulopathy. *Intensive Care Med* 2013; 39: 1695-1703.
30. Wang Y, Nakayama M, Pitulescu ME, Schmidt TS, Bochenek ML, Sakakibara A, Adams S, Davy A, Deutsch U, Luthi U, Barberis A, Benjamin LE, Makinen T, Nobes CD, Adams RH. Ephrin-B2 controls VEGF-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature* 2010; 465: 483-486.
31. Kamphuis E, Junt T, Waibler Z, Forster R, Kalinke U. Type I interferons directly regulate lymphocyte recirculation and cause transient blood lymphopenia. *Blood* 2006; 108: 3253-3261.
32. Toscano MG, Ganea D, Gamero AM. Cecal ligation puncture procedure. *J Vis Exp* 2011.
33. Matsumoto H, Ogura H, Shimizu K, Ikeda M, Hirose T, Matsuura H, Kang S, Takahashi K, Tanaka T, Shimazu T. The clinical importance of a cytokine network in the acute phase of sepsis. *Sci Rep* 2018; 8: 13995.
34. Mera S, Tatulescu D, Cismaru C, Bondor C, Slavcovici A, Zanc V, Carstina D, Oltean M. Multiplex cytokine profiling in patients with sepsis. *APMIS* 2011; 119: 155-163.
35. Hillyer P, Mane VP, Schramm LM, Puig M, Verthelyi D, Chen A, Zhao Z, Navarro MB, Kirschman KD, Bykadi S, Jubin RG, Rabin RL. Expression profiles of human interferon-alpha and interferon-lambda subtypes are ligand- and cell-dependent. *Immunol Cell Biol* 2012; 90: 774-783.
36. Gibbert K, Schlaak JF, Yang D, Dittmer U. IFN-alpha subtypes: distinct biological activities in anti-viral therapy. *Br J Pharmacol* 2013; 168: 1048-1058.
37. Deng F, Wang S, Zhang L. Endothelial microparticles act as novel diagnostic and therapeutic biomarkers of circulatory hypoxia-related diseases: a literature review. *J Cell Mol Med* 2017; 21: 1698-1710.
38. Panes J, Perry M, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. *Br J Pharmacol* 1999; 126: 537-550.

39. Langer HF, Chavakis T. Leukocyte-endothelial interactions in inflammation. *J Cell Mol Med* 2009; 13: 1211-1220.
40. Werner N, Wassmann S, Ahlers P, Kosiol S, Nickenig G. Circulating CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles correlate with coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 112-116.
41. Doughty L, Nguyen K, Durbin J, Biron C. A role for IFN-alpha beta in virus infection-induced sensitization to endotoxin. *J Immunol* 2001; 166: 2658-2664.
42. Schuetz P, Jones AE, Aird WC, Shapiro NI. Endothelial cell activation in emergency department patients with sepsis-related and non-sepsis-related hypotension. *Shock* 2011; 36: 104-108.
43. Tornavaca O, Chia M, Dufton N, Almagro LO, Conway DE, Randi AM, Schwartz MA, Matter K, Balda MS. ZO-1 controls endothelial adherens junctions, cell-cell tension, angiogenesis, and barrier formation. *J Cell Biol* 2015; 208: 821-838.
44. Iba T, Thachil J. Clinical significance of measuring plasminogen activator inhibitor-1 in sepsis. *J Intensive Care* 2017; 5: 56.
45. Clere-Jehl R, Mariotte A, Meziani F, Bahram S, Georgel P, Helms J. JAK-STAT Targeting Offers Novel Therapeutic Opportunities in Sepsis. *Trends Mol Med* 2020.
46. Negishi H, Taniguchi T, Yanai H. The Interferon (IFN) Class of Cytokines and the IFN Regulatory Factor (IRF) Transcription Factor Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2018; 10.
47. Zimmerman O, Olbrich P, Freeman AF, Rosen LB, Uzel G, Zerbe CS, Rosenzweig SD, Kuehn HS, Holmes KL, Stephany D, Ding L, Sampaio EP, Hsu AP, Holland SM. STAT1 Gain-of-Function Mutations Cause High Total STAT1 Levels With Normal Dephosphorylation. *Front Immunol* 2019; 10: 1433.
48. Ladislau L, Suarez-Calvet X, Toquet S, Landon-Cardinal O, Amelin D, Depp M, Rodero MP, Hathazi D, Duffy D, Bondet V, Preusse C, Bienvenu B, Rozenberg F, Roos A, Benjamim CF, Gallardo E, Illa I, Mouly V, Stenzel W, Butler-Browne G, Benveniste O, Allenbach Y. JAK inhibitor improves type I interferon induced damage: proof of concept in dermatomyositis. *Brain* 2018; 141: 1609-1621.

## Tables

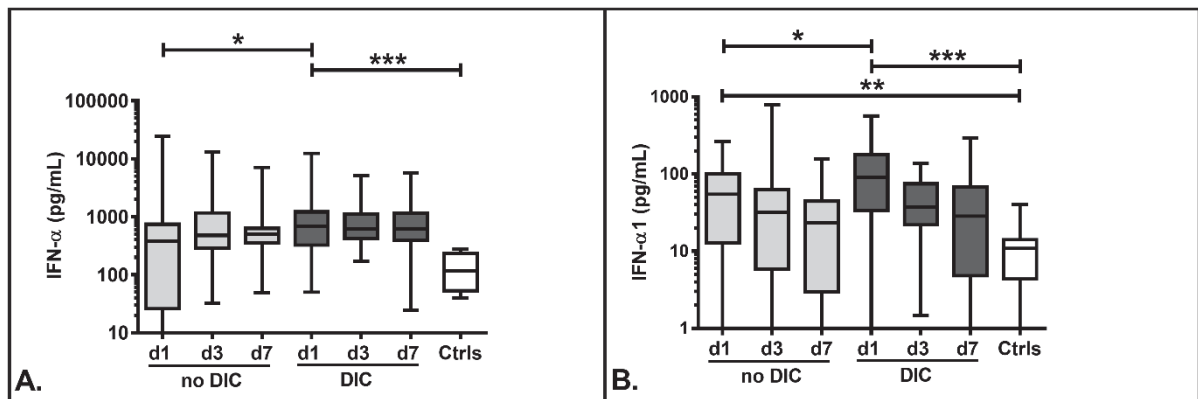
**Table 1: Baseline characteristics of septic shock patients**

	All patients	DIC Patients	non-DIC Patients	P value
N=	65	32	33	
<b>General characteristics</b>				
Men. N (%)	39 (60.0%)	20 (62.5%)	19 (57.6%)	0.80
Age (years), median (IQR)	61 (55-70)	61 (57-67)	62 (50-73)	0.94
SAPS II	56 (46-72)	64 (50-76)	53 (41-69)	<b>0.04</b>
Mortality at day 7	15 (23.0%)	10 (31.2%)	5 (15.2%)	0.15
Mortality at day 28	22 (33.8%)	14 (43.7%)	8 (24.2%)	0.12
<b>Organ failures</b>				
SOFA	12 (10-14)	14 (11-16)	10 (8-12)	<b>&lt; 0.01</b>
Acute kidney failure	49 (75.4%)	29 (90.6%)	20 (60.6%)	<b>&lt; 0.01</b>
Acute respiratory failure	46 (70.7%)	25 (78.1%)	21 (63.7%)	0.28
Acute liver failure	26 (40%)	17 (53.1%)	9 (27.3%)	<b>0.04</b>
JAAM-DIC score (points)	4.0 (2.0-6.0)	6.0 (5.0-8.0)	2.0 (1.0-3.0)	<b>&lt; 0.01</b>
Coma	5 (7.7%)	3 (9.3%)	2 (6.0%)	0.67
<b>Infection source</b>				
Bacteraemia	22 (33.8%)	12 (37.5%)	10 (30.3%)	0.79
Pneumonia	19 (29.2%)	7 (21.9%)	12 (36.4%)	0.28
Abdominal	12 (18.5%)	2 (6.3%)	10 (30.3%)	<b>0.02</b>
Urinary tract	10 (15.4%)	9 (28.1%)	1 (3.0%)	<b>&lt; 0.01</b>
Skin	1 (1.5%)	1 (3.1%)	0 (0.0%)	0.49
Undetermined	3 (4.6%)	2 (6.3%)	1 (3.0%)	0.61
<b>Pathogens</b>				
Gram negative bacillus	28 (43.1%)	15 (46.9%)	13 (39.4%)	0.62
Gram positive cocci	16 (24.6%)	5 (15.6%)	11 (33.3%)	0.15
Gram positive bacillus	3 (4.6%)	2 (6.3%)	1 (1.0%)	0.61
Virus	2 (3.0%)	0 (0.0%)	2 (6.0%)	0.49

Fungi	1 (1.5%)	0 (0.0%)	1 (3.0%)	0.48
Parasite	1 (1.5%)	1 (3.1%)	0 (0.0%)	0.49
Undetermined	14 (21.5%)	9 (28.1%)	5 (15.2%)	0.79
<b>Supportive treatments</b>				
Norepinephrin	65 (100%)	32 (100%)	33 (100%)	0.99
Epinephrin	18 (27.7%)	12 (37.5%)	6 (18.2%)	0.10
Dobutamine	15 (23.0%)	9 (28.1%)	6 (18.2%)	0.39
Mechanical ventilation	48 (73.8%)	25 (78.1%)	23 (70.0%)	0.57
Renal Replacement Therapy	33 (50.8%)	21 (65.6%)	12 (36.4%)	<b>0.02</b>
<b>Biology</b>				
Lactate (mmol/L)	3.5 (2.1-5.7)	4.3 (3.1-6.8)	2.5 (1.8-4.4)	<b>0.02</b>
Creatinine ( $\mu\text{mol/L}$ )	166 (91-261)	221 (142-348)	116 (75-226)	<b>&lt; 0.01</b>
Hemoglobin (g/dL)	11 (9.2-12)	10 (9.1-12)	11 (9.2-12)	0.68
Neutrophil count ( $10^9/\text{L}$ )	14 (4.4-25)	11 (2.7-22)	15 (6.1-28)	0.21
Lymphocyte count ( $10^9/\text{L}$ )	0.7 (0.4-1.2)	0.5 (0.2-0.9)	1.0 (0.7-1.2)	<b>0.03</b>
Monocyte count ( $10^9/\text{L}$ )	0.7 (0.3-1.5)	0.6 (0.1-1.3)	1.0 (0.4-1.5)	0.35
Platelet count ( $10^9/\text{L}$ )	121 (63-199)	61 (42-94)	191 (143-355)	<b>&lt; 0.01</b>
INR	1.7 (1.3-2.2)	2.1 (1.6-2.5)	1.3 (1.2-1.7)	<b>&lt; 0.01</b>
Fibrinogen (g/L)	5.1 (3.5-6.6)	4.2 (2.4-5.9)	5.6 (4.3-7.9)	<b>&lt; 0.01</b>
D-dimer ( $\mu\text{g/L}$ )	6.2 (2.6-19.8)	19.8 (10.1-20.0)	3.1 (1.7-5.6)	<b>&lt; 0.01</b>
Antithrombin (%)	56 (45-73)	52 (35-65)	64 (53-83)	<b>0.04</b>

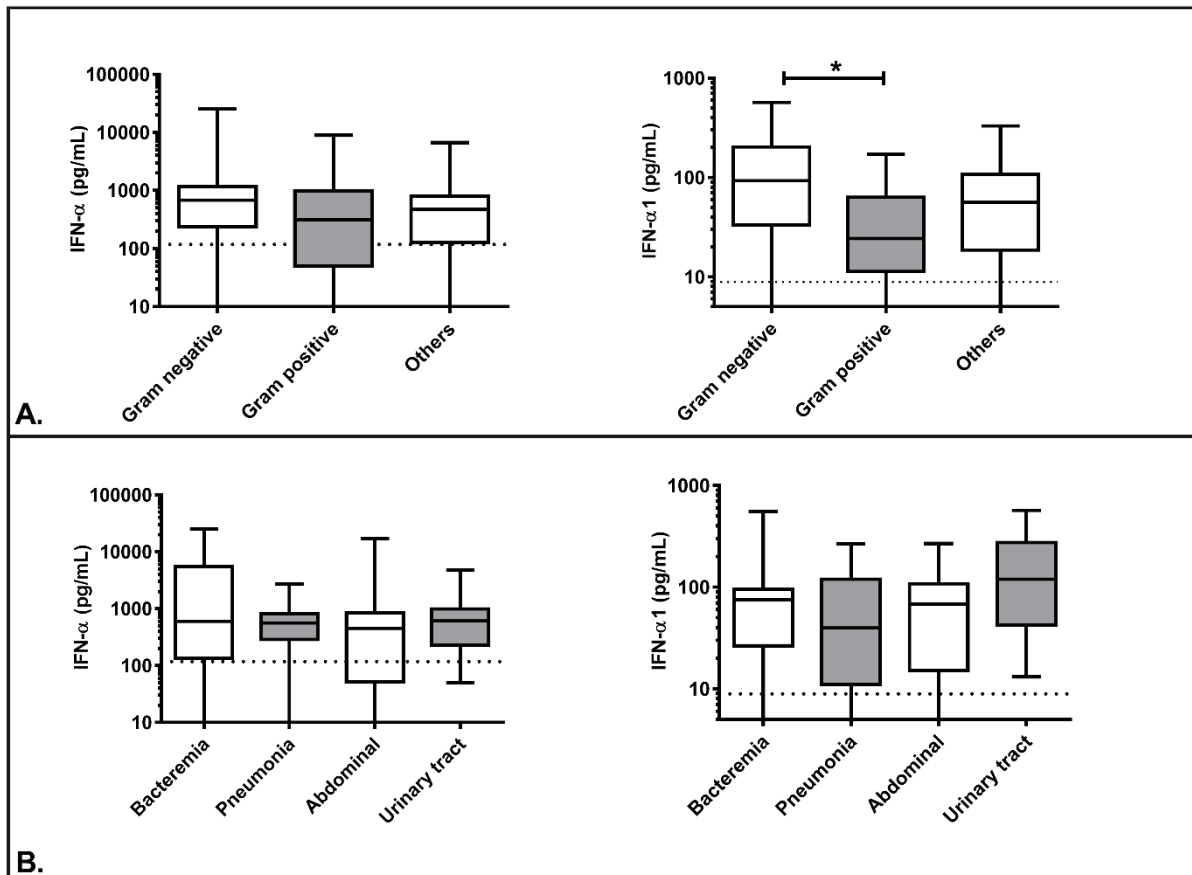
Footnotes: results are expressed in median (IQR) or in n (%). Comparisons are not corrected for multiple comparisons. Abbreviations: DIC, disseminated intravascular coagulation; INR, international normalized ratio; JAAM, Japanese association for acute medicine; SAPS, simplified acute physiology score; SOFA, sepsis-related organ failure assessment.

## Figures

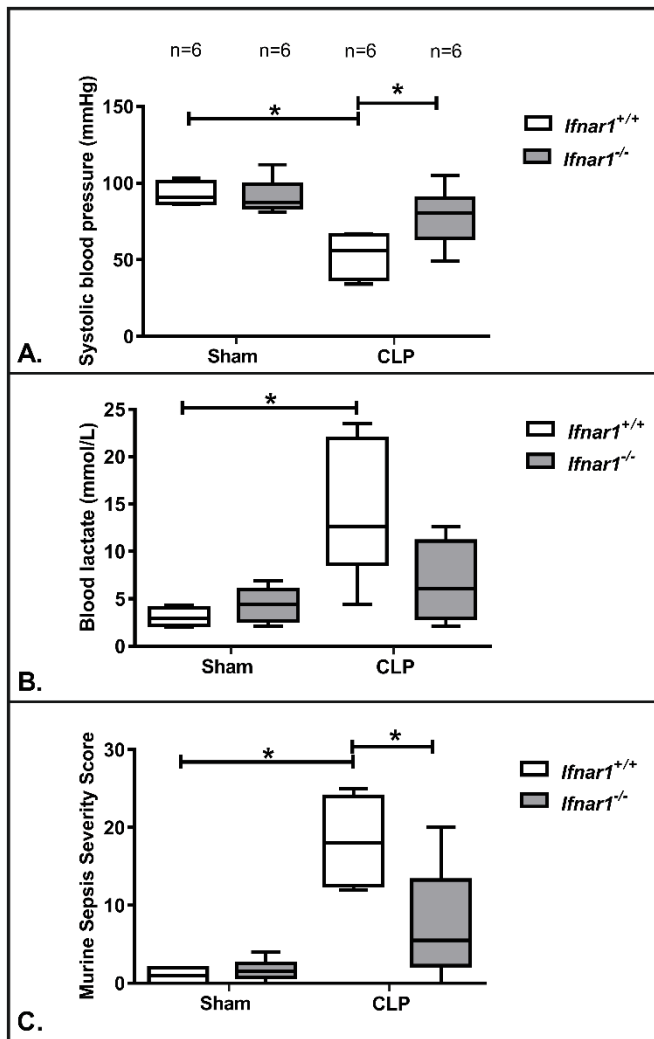


**Figure 1: Time-course of IFN- $\alpha$  and IFN- $\alpha$ 1 in DIC and non-DIC septic shock patients.**

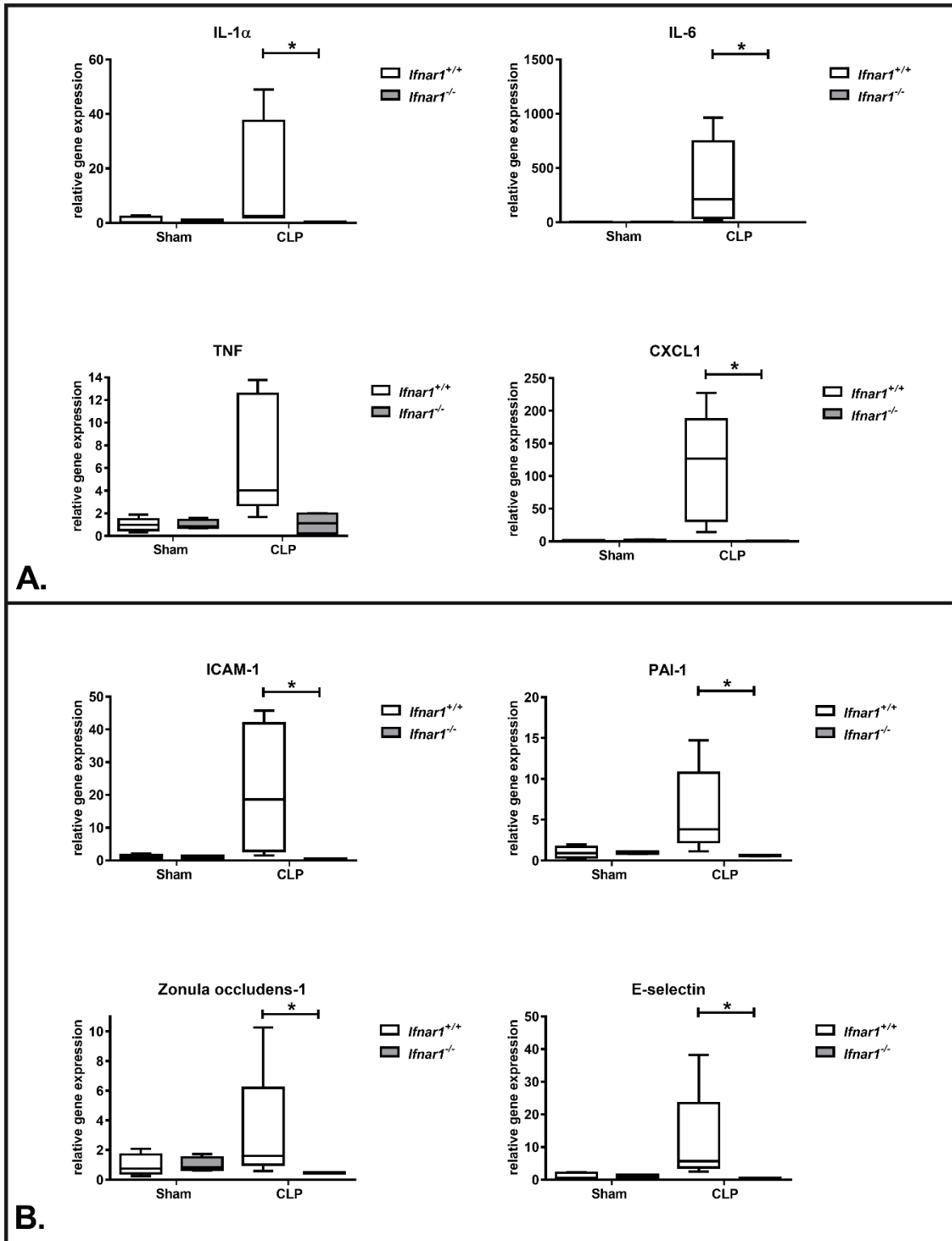
Results are shown in white (healthy controls), light grey (no DIC) or dark grey (early DIC) whisker boxes (horizontal line inside the box median, upper and lower box limits 25–75th percentiles and T-bars min–max, respectively). Comparison were performed between controls and patients with early or without DIC only at day 1 (DIC vs. no DIC at day 1). **(A)** IFN- $\alpha$ . **(B)** IFN- $\alpha$ 1 subtype. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ . Abbreviations: Ctrls, controls; IFN, interferon.



**Figure 2: IFN- $\alpha$ 1 is higher in Gram-negative bacteria infections.** IFN- $\alpha$  (left) and IFN- $\alpha$ 1 (right) levels were quantified regarding: **(A)** the type of pathogen involved in septic shock and **(B)** the source of infection. N=65. Abbreviations: IFN, interferon.



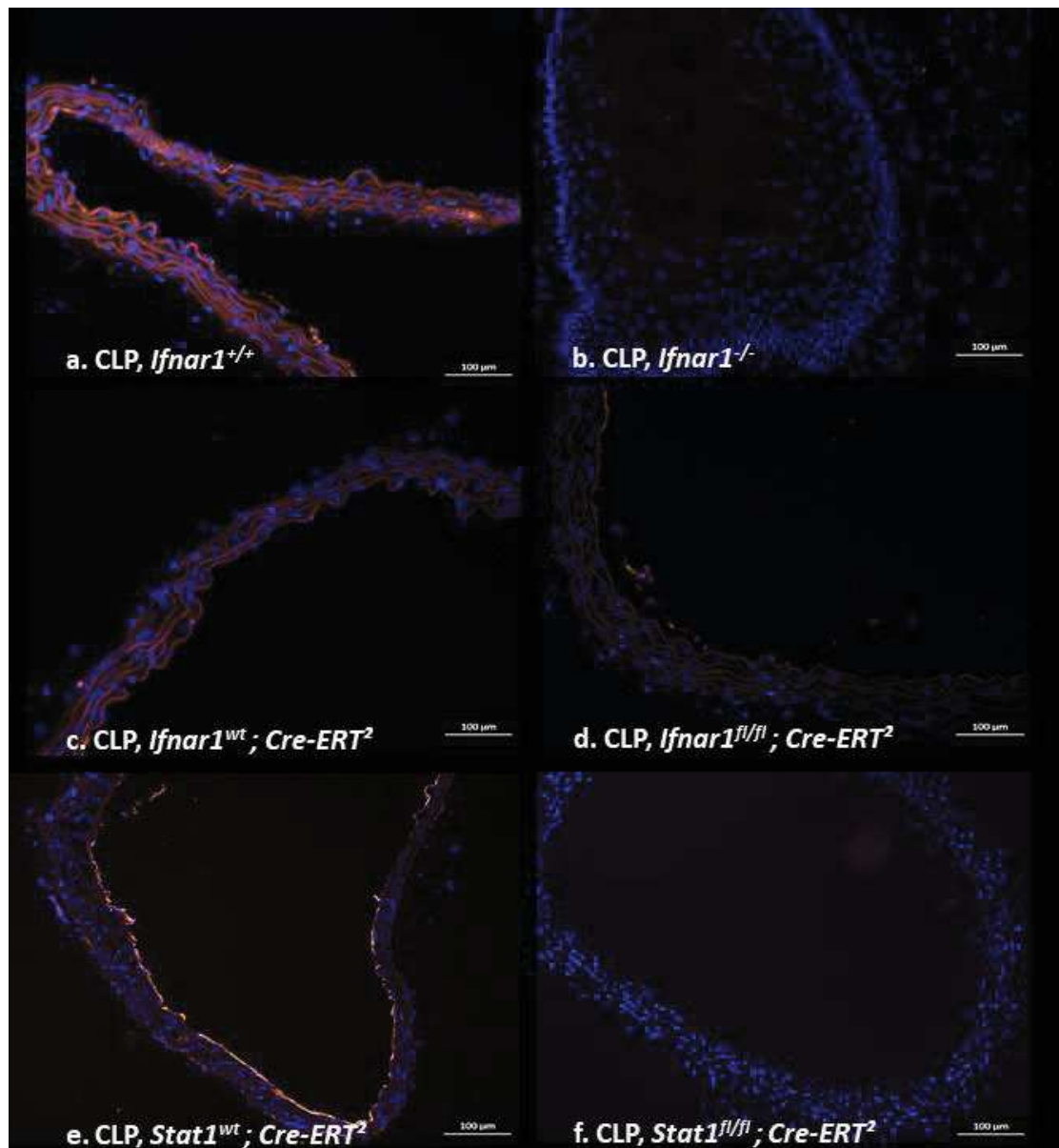
**Figure 3: Assessment of severity 20 hours after CLP and sham-operated in *Ifnar1*<sup>+/+</sup> and *Ifnar1*<sup>-/-</sup> mice.** (A) Systolic blood pressure was measured by intra-carotid catheter. 2/8 (25%) *Ifnar1*<sup>+/+</sup> mice in CLP group died before blood pressure could be measured (resulting in n=6), due to severity of septic shock. (B) Blood lactate level was measured by capillary drop. (C) Murine sepsis severity score after CLP/sham surgery. n=6 in each of the 4 groups. \* p<0.05. Abbreviations: CLP: Cecal ligation and puncture; IFNAR, interferon- $\alpha$  receptor.



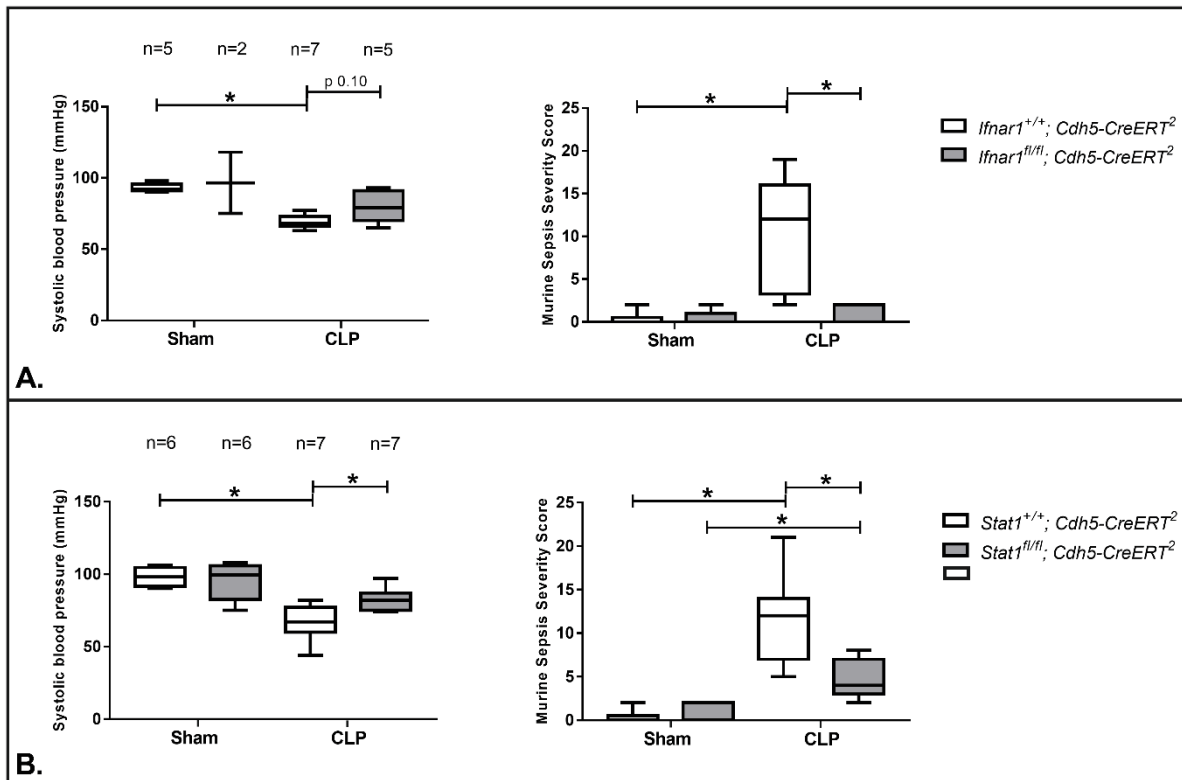
**Figure 4: Inflammation-, neutrophil recruitment- and endothelial activation-related gene expression in the aorta measured by RT-qPCR in *Ifnar1*<sup>+/+</sup> and *Ifnar1*<sup>-/-</sup> mice. Gene expression levels relative to actin expression. (A) Expression of inflammation (IL-1 $\alpha$ , IL-6, TNF) and neutrophil recruitment (Cxcl1) markers. (B) Expression of endothelial activation**



markers (Icam-1, Pai-1, Zo-1, E-selectin). Ifnar1<sup>-/-</sup> mice: n=12, and controls (Ifnar1<sup>+/+</sup>) mice: n=12; CLP: n=6, and sham: n=6 in each group. Samples are from the same mice as the data from Figure 3. \* p<0.05. Abbreviations: CLP: Cecal ligation and puncture; CXCL, C-X-C motif chemokine ligand; ICAM, intercellular adhesion molecule; IFNAR, interferon- $\alpha$  receptor; IL, interleukin; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; TNF, tumor necrosis factor; Zo-1, zonula occludens-1.



**Figure 5: Analysis of mouse aorta sections by immunofluorescence. Sepsis-induced overexpression of VCAM-1 (in orange) is reduced in *Ifnar1*<sup>-/-</sup> and in *Stat1*<sup>fl/fl</sup>; *Cre-ERT*<sup>2</sup> mice. DAPI is in blue. a. CLP-treated *Ifnar1*<sup>+/+</sup> mouse. b. CLP-treated *Ifnar1*<sup>-/-</sup> mouse. c. CLP-treated *Ifnar1*<sup>wt</sup>; *Cre-ERT*<sup>2</sup> mouse. d. CLP-treated *Ifnar1*<sup>fl/fl</sup>; *Cre-ERT*<sup>2</sup> mouse. e. CLP-treated *Stat1*<sup>wt</sup>; *Cre-ERT*<sup>2</sup> mouse. f. CLP-treated *Stat1*<sup>fl/fl</sup>; *Cre-ERT*<sup>2</sup> mouse. Abbreviations: ERT<sup>2</sup>, tamoxifen-inducible estrogen receptor; CLP, cecal ligation and puncture; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; IFNAR, interferon- $\alpha$  receptor; STAT, signal transducer and activator of transcription; VCAM, vascular cell adhesion molecule.**



**Figure 6: Endothelium-targeted *Ifnar1* and *Stat1* deletions provide protection against septic shock.** Assessment of severity 20 hours after surgery in CLP- vs. sham-operated mice, by measuring systolic blood pressure by intra-carotid catheter (left), and murine sepsis severity score (right). **(A)** tamoxifen-treated controls (*Ifnar1*<sup>+/+</sup>; *Cdh5-CreERT*<sup>2</sup>) in white (CLP: n=7; sham: n=5) and *Ifnar1*<sup>fl/fl</sup>; *Cdh5-CreERT*<sup>2</sup> mice in grey (CLP: n=5; sham: n=2). **(B)** tamoxifen-treated controls (*Stat1*<sup>+/+</sup>; *Cdh5-CreERT*<sup>2</sup>) in white (CLP: n=7; sham: n=6) and *Stat1*<sup>fl/fl</sup>; *Cdh5-CreERT*<sup>2</sup> mice in grey (CLP: n=7; sham: n=6). \* p<0.05. Abbreviations: CLP, Cecal ligation and puncture; IFNAR, interferon- $\alpha$  receptor; STAT, signal transducer and activator of transcription.

## **Online Data Supplement**

### **A translational investigation of interferon- $\alpha$ and STAT1 signaling in endothelial cells during septic shock provides therapeutic perspectives**

Raphaël Clere-Jehl, Hamid Merdji, Mohamed Kassem, Cécile Macquin, Aurore De Cauwer, Alicia Sibony, Kei Kurihara, Laetitia Minniti, Chérine Abou Fayçal, Seiamak Bahram, Ferhat Meziani, Julie Helms, Philippe Georgel.

#### **Supplementary material:**

##### **Mice model of septic shock**

All mice were operated on blind for their genetic group. At time “0”, mice underwent isoflurane anesthesia. A 1.5 cm midline laparotomy incision was performed in all mice (Sham and CLP) and the cecum was pulled out and examined. In Sham mice, the cecum was carefully reintroduced into the abdomen without any lesion. In mice treated with CLP, the whole cecum was tied, without creating colonic obstruction, by the mean of a 6.0 silk thread, before being punctured twice by a 23 G needle. The cecum was lightly squeezed to release a drop of feces from each hole, and was then reintegrated into the abdomen so that the two drops of feces were in contact with the peritoneum to trigger peritonitis. Afterwards, a two-layer suture was performed in the same way in all mice (muscle layer first, skin layer second). All mice were injected subcutaneously with 1 mL of 0.9% Sodium Chloride immediately after being operated to compensate for the predicted hypovolemia. No antibiotics, IV fluids, or catecholamines were administered, at any time. As this CLP model is lethal, resulting in death in more than 80% of

wild-type mice between 20 and 24 hours after surgery, mice were assessed at the 20<sup>th</sup> hour. Twenty hours after surgery, the murine sepsis severity score (1) was assessed (see below) and mice were anesthetized for the last time (again by isoflurane anesthesia). Blood pressure was measured by inserting an intra-carotid catheter and blood lactate level measured at the mouse tail. Mice were sacrificed immediately after these measurements (*i.e.* 20 to 20.5 hours after the initial laparotomy). The aorta and kidneys were dissected, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for future mRNA extraction. Some samples were also stored in optimal cutting temperature compound (OCT compound) and frozen at -80 °C for optical microscopy.

### **Murine sepsis severity score**

The murine sepsis severity score was assessed at the 20<sup>th</sup> hour, just before the last anesthesia. Mice were assessed blindly for their genetic group, moreover by a person who did not carry out the surgery. The theoretical maximum score was 28 points. For ethical reasons, we designed the study so that the score did not exceed 21 points (score generally reached after the 20<sup>th</sup> hour in wild-type mice in this CLP model).

**Table E1: The murine sepsis severity score. From Shrum et al. (E1).**

Variable	Score and description
Appearance	<p>0- Coat is smooth.</p> <p>1- Patches of hair piloerected.</p> <p>2- Majority of back is piloerected.</p> <p>3- Piloerection may or may not be present, mouse appears “puffy”.</p> <p>4- Piloerection may or may not be present, mouse appears emaciated.</p>
Level of consciousness	<p>0- Mouse is active.</p> <p>1- Mouse is active but avoids standing upright.</p> <p>2- Mouse activity is noticeably slowed. The mouse is still ambulant.</p> <p>3- Activity is impaired. Mouse only moves when provoked, movements have a tremor.</p> <p>4- Activity severely impaired. Mouse remains stationary when provoked, with possible tremor.</p>
Activity	<p>0- Normal amount of activity. Mouse is able to eat, drink, climb, run and fight.</p> <p>1- Slightly suppressed activity. Mouse is moving around bottom of cage.</p> <p>2- Suppressed activity. Mouse is stationary with occasional investigative movements.</p> <p>3- No activity. Mouse is stationary.</p> <p>4- No activity. Mouse experiencing tremors, particularly in the hind legs.</p>
Response to stimulus	<p>0- Mouse responds immediately to auditory stimulus or touch.</p> <p>1- Slow or no response to auditory stimulus; strong response to touch (moves to escape).</p> <p>2- No response to auditory stimulus; moderate response to touch (moves a few steps).</p> <p>3- No response to auditory stimulus; mild response to touch (no locomotion).</p> <p>4- No response to auditory stimulus; little/no response to touch; cannot right itself if pushed over.</p>
Eyes	<p>0- Open.</p> <p>1- Eyes not fully open, possibly with secretions.</p> <p>2- Eyes half closed, possibly with secretions.</p> <p>3- Eyes more than half closed, possibly with secretions.</p> <p>4- Eyes closed or milky.</p>
Respiration rate	<p>0- Normal. Rapid mouse respiration.</p> <p>1- Slightly decreased respiration (rate not quantifiable by eye).</p> <p>2- Moderately reduced respiration (rate at the upper range of quantifying by eye).</p> <p>3- Severely reduced respiration (rate easily countable by eye, 0.5 s between breaths).</p> <p>4- Extremely reduced respiration (&gt; 1 s between breaths).</p>
Respiration quality	<p>0- Normal.</p> <p>1- Brief periods of labored breathing.</p> <p>2- Labored, no gasping.</p> <p>3- Labored with intermittent gasps.</p> <p>4- Gasping.</p>

### **Replicate experiments in mice**

In each mouse line, two independent replicate experiments were performed. The average size was 3 to 4 mice per group in each experiment (sample size was allowed to be smaller for sham mice), with all the data pooled together in the analysis and figures, hence the average size of 6 to 7 mice per group finally.

### **Patients inclusion**

Only patients with septic shock, and therefore requiring norepinephrine in accordance with the third international consensus definitions (E2), were included in this prospective pilot-study. For all patients, septic shock was the reason for their admission in ICU. Patients had to be included within 12 hours after norepinephrine onset. In all cases, a written consent was obtained before inclusion, either from the patient himself or from his next of kin.

### **Data collection**

Baseline characteristics of the patients were prospectively recorded and included the sequential organ failure assessment (SOFA) score, simplified acute physiology score (SAPS II) at ICU admission, organ failures, the source of sepsis and type of micro-organism involved, treatments and organ supportive therapy, as well as 7-day and 28-day mortality rates.

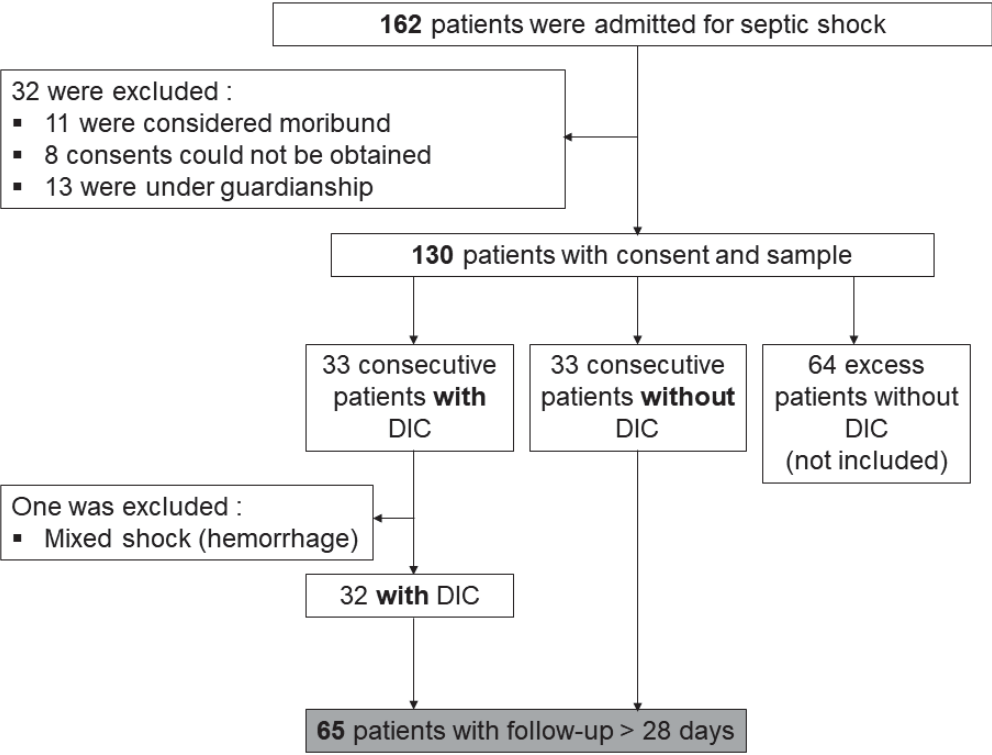
### **Blood samples**

Blood was sampled in two citrate tubes (BD Vacutainer Citrate tube, 0.129M = 3.8%, 4.5 mL, Becton-Dickinson, United Kingdom) at day 1 (D1), day 3 (D3) and day 7 (D7) and only once for the control group. Two successive centrifugations at 2500 g for 15 minutes were performed and poor platelet plasma was immediately stored at -80°C. Day 1 was the first day the patients required vasopressors. Blood was sampled immediately after inclusion, *i.e.* within 12 hours

after norepinephrine onset. For day 3 and day 7, only the samples of patients who were still present in ICU could be collected and analyzed (See Table E3). If a patient died or was discharged in the first 7 days, all the data and samples collected before death or discharge were analyzed. No patient was excluded, therefore data were not censored.



**Supplementary data:**



**Figure E1: Flow chart**

In the *DIC* group, all patients had DIC on Day 1. The *no DIC* group included all consecutive patients without DIC at day 1. In this *no DIC* group, 5 of the 33 patients (15%) developed DIC later than day 1 (always at day 2-3, none of them developed DIC later). Please see Table E2. We observed that the values of IFN- $\alpha$ / $\alpha$ 1 at day 1 were roughly the same compared to the other patients from the *no DIC* group, but with an increase at day 3 along with the DIC onset, reaching the levels of the *DIC* group.

**Table E2: IFN- $\alpha$ / $\alpha$ 1 levels of patients, compared between groups DIC vs. no DIC at day 1 (among them: focus on patients developing DIC at day 2).**

Day		<i>no DIC</i> at d1 (n=33)	Among them :	<i>DIC</i> at day 1 (n=32)
			<b>DIC at day 2 (n=5)</b>	
JAAM-DIC	d1	1	<b>3</b>	6
	d2	2	<b>6</b>	6
	d3	1	<b>5</b>	4
<hr/>				
IFN- $\alpha$	d1	347	<b>314</b>	700
	d3	476	<b>693</b>	674
IFN- $\alpha$ 1	d1	54	<b>31</b>	91
	d3	32	<b>82</b>	37

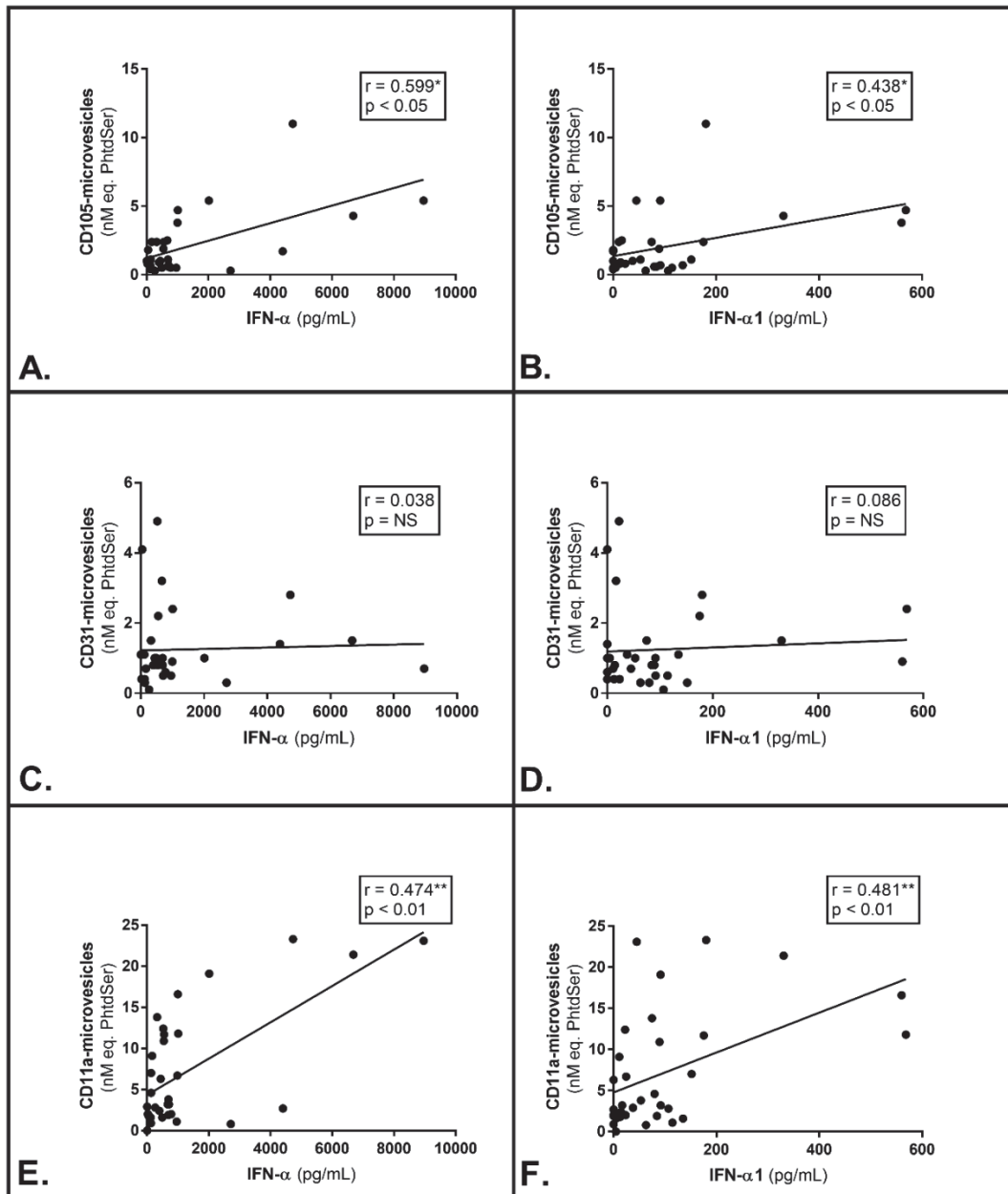
**Table E3: Overall number of patients samples at days 1, 3, and 7, and regarding subgroups.**

	<b>Day</b>	<b>All patients</b>	<b>DIC patients</b>	<b>Non- DIC patients</b>
<b>Number of patients</b>	<b>D1</b>	65	32	33
	<b>D3</b>	51	25	26
	<b>D7</b>	39	20	19

**Table E4: IFN subtypes plasma levels among septic shock patients (exhibiting DIC or not) at days 1, 3 and 7.**

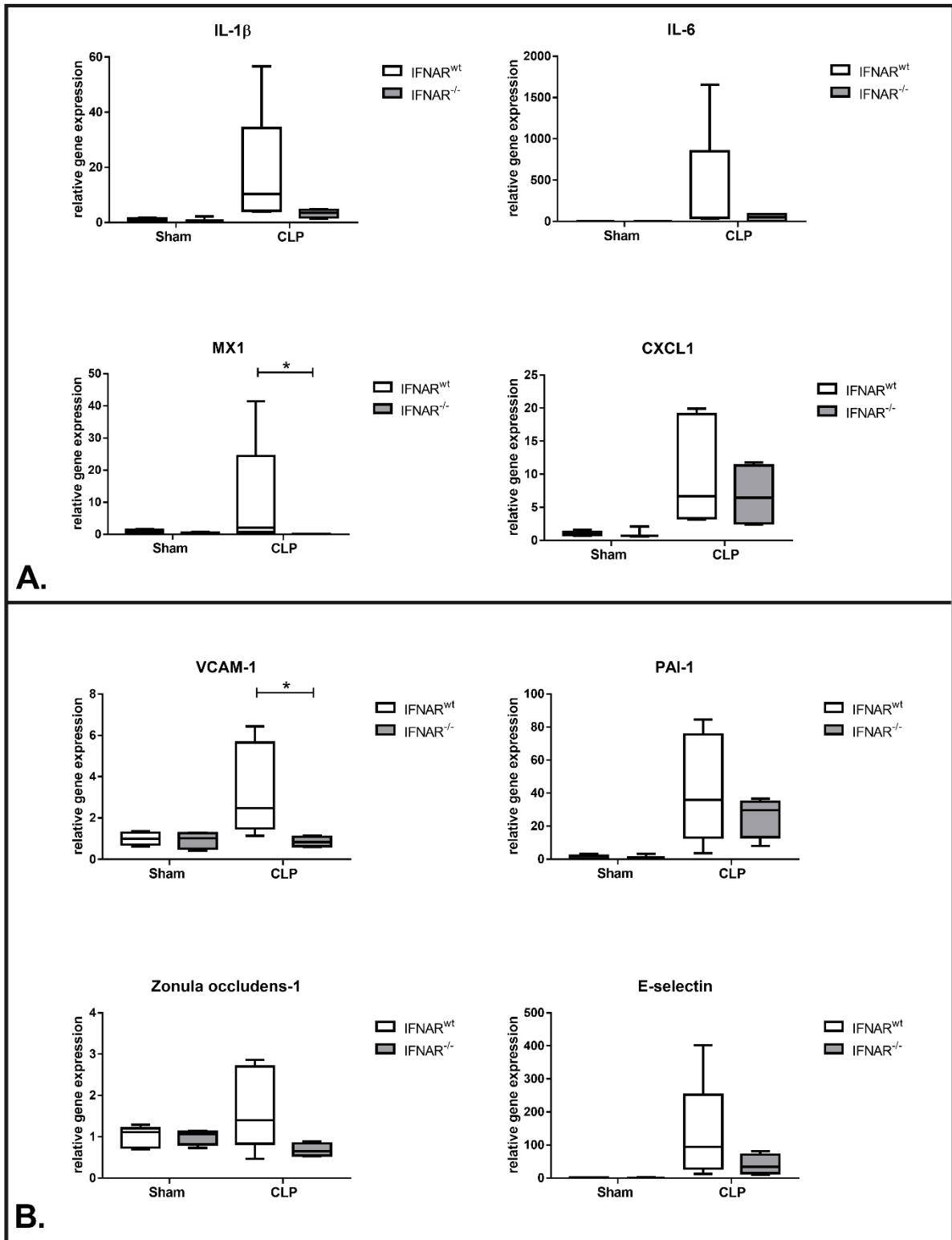
		<b>All patients</b>	<b>DIC</b>	<b>no DIC</b>	
N=		65	32	33	p
<b>type I IFN - median (IQR)</b>					
IFN- $\alpha$ (pg/mL)	d1	546 (161-964)	700 (381-1417)	347 (26-697)	<b>0.01</b>
	d3	559 (349-1127)	674 (439-1143)	476 (306-1078)	0.16
	d7	536 (389-950)	631 (401-1874)	502 (369-602)	0.33
IFN- $\alpha$ 1 (pg/mL)	d1	63 (19-120)	91 (42-177)	54 (13-93)	<b>0.04</b>
	d3	36 (17-70)	37 (23-73)	32 (7-58)	0.54
	d7	24 (5-45)	28 (5-67)	23 (4-43)	0.60
IFN- $\beta$ (pg/mL)	d1	120 (48-520)	155 (70-480)	113 (13-579)	0.58
	d3	435 (262-734)	457 (258-947)	409 (274-550)	0.53
	d7	446 (230-886)	437 (226-1055)	469 (280-637)	0.88
<b>type II IFN - median (IQR)</b>					
IFN- $\gamma$ (pg/mL)	d1	6 (2-12)	7 (2-17)	6 (2-10)	0.65
	d3	9 (5-17)	9 (5-18)	9 (5-14)	0.83
	d7	10 (5-14)	7 (5-14)	12 (7-18)	0.07
<b>type III IFN- median (IQR)</b>					
IL-28A (pg/mL)	d1	58 (16-131)	49 (16-118)	61 (26-131)	0.66
	d3	51 (23-101)	59 (37-141)	39 (19-71)	0.21
	d7	35 (20-76)	43 (22-77)	31 (19-62)	0.26
IL-28B (pg/mL)	d1	18 (10-47)	26 (12-81)	16 (9-26)	0.14
	d3	13 (8-36)	18 (10-42)	11 (6-30)	0.06
	d7	12 (6-34)	12 (7-36)	12 (5-22)	0.28
IL-29 (pg/mL)	d1	55 (19-166)	64 (27-171)	55 (19-138)	0.45
	d3	54 (14-228)	105 (23-253)	37 (10-119)	0.10
	d7	47 (22-179)	61 (33-315)	36 (21-119)	0.18

Footnotes: Abbreviations: DIC, disseminated intravascular coagulation ; IFN, interferon; IL, interleukin.



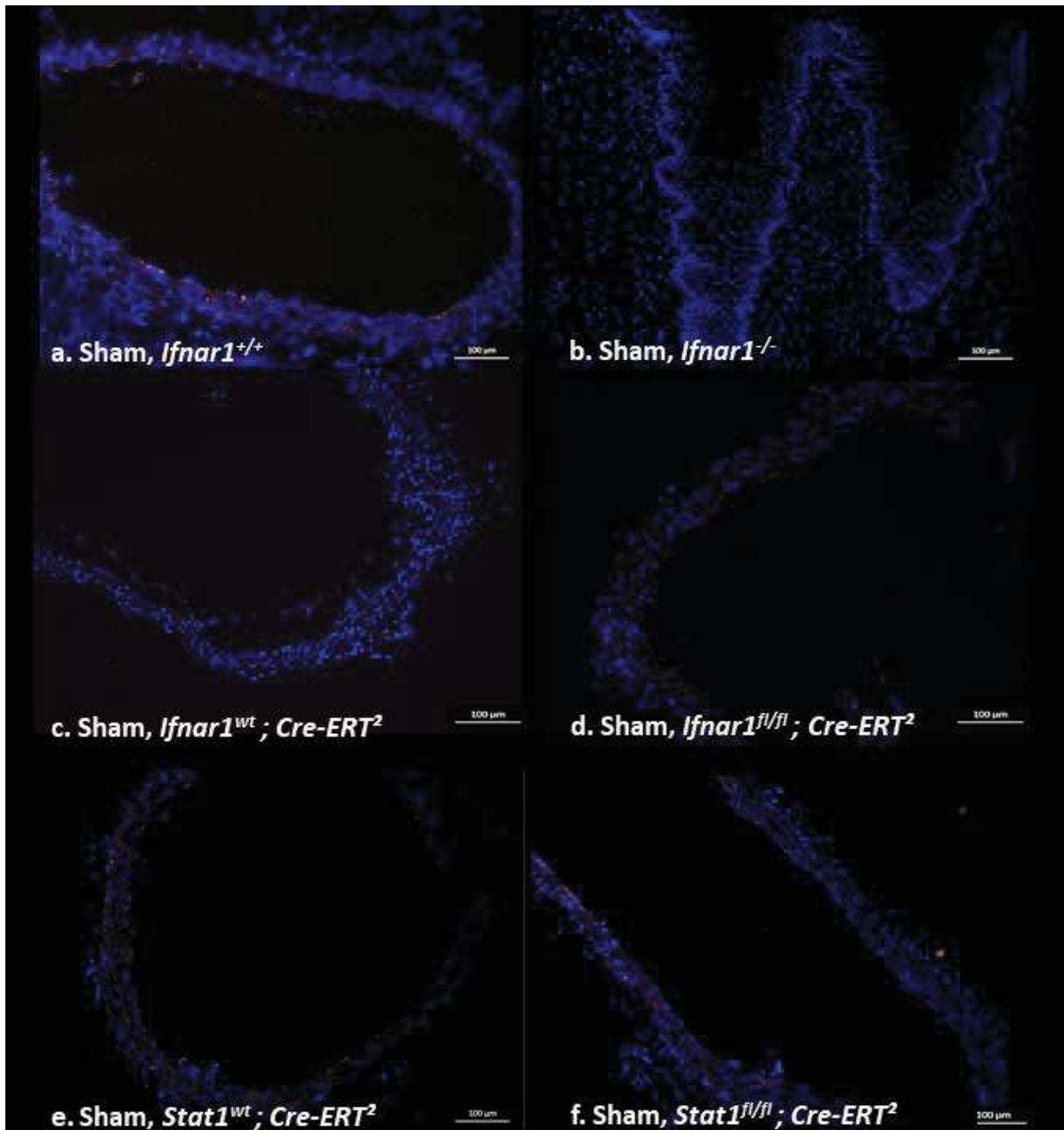
**Figure E2: Correlation between IFN- $\alpha$ /- $\alpha 1$  and endothelial cell-/leucocyte-derived microvesicles levels in plasma at day 1.**

Left (A, C, E): IFN- $\alpha$ , Right (B, D, F): IFN- $\alpha 1$  subtype. Microvesicles levels are expressed in nanomolar equivalent phosphatidylserine (nM eq. PhtdSer) and IFN in pg/mL. Upper part (A, B): endothelial cell-derived CD105-microvesicles; middle part (C, D): endothelial cell-derived CD31-microvesicles; lower part (E, F): leucocyte-derived CD11a-microvesicles. Statistical analyses show the Pearson correlation coefficient  $r$  and the related  $p$  value. NS: Non-Significant.



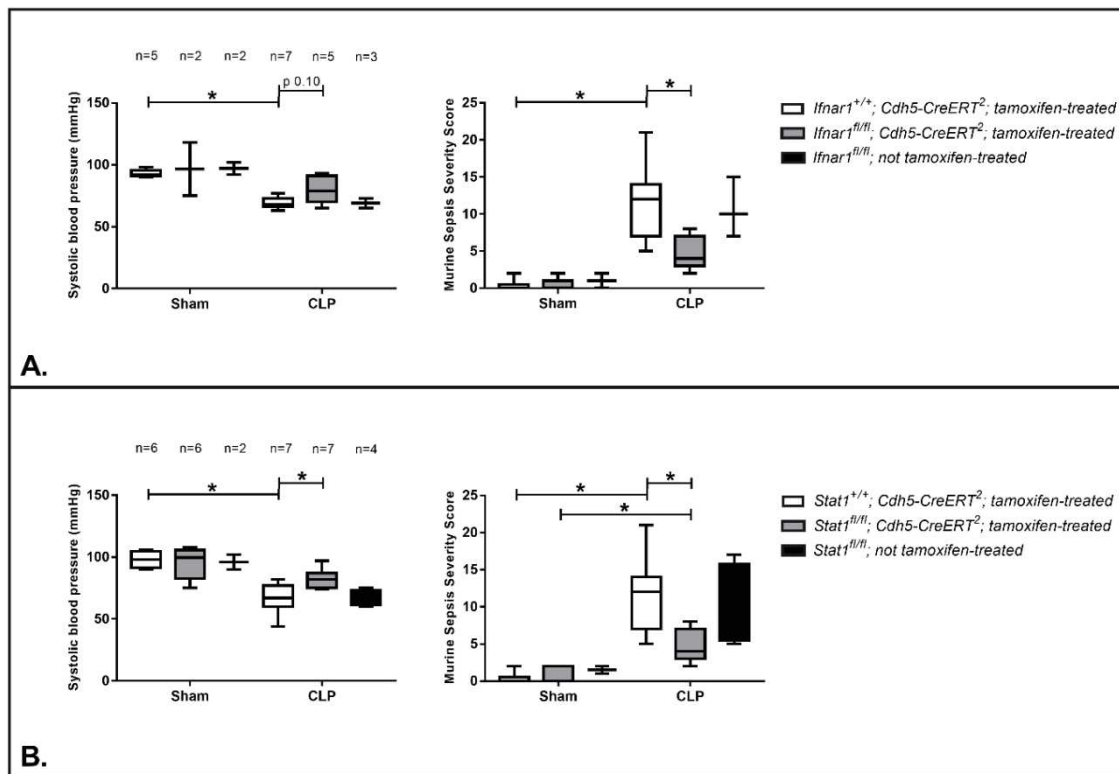
**Figure E3: Inflammation-, neutrophil recruitment- and endothelial activation-related gene expression in the kidney measured by RT-qPCR in *Ifnar1*<sup>+/+</sup> and *Ifnar1*<sup>-/-</sup> mice. Gene expression levels relative to actin expression. (A) Expression of inflammation (Il-1 $\alpha$ , Il-6,**

Mx1) and neutrophil recruitment (Cxc11) markers. **(B)** Expression of endothelial activation markers (Vcam-1, Pai-1, Zo-1, E-selectin). Ifnar1<sup>-/-</sup> mice: n=8, and controls (Ifnar1<sup>+/+</sup>) mice: n=8; CLP: n=4, and sham: n=4 in each group. The samples are from the mice in Figure 3. \* p<0.05. Abbreviations: CLP: Cecal ligation and puncture; Cxcl, C-X-C motif chemokine ligand; Vcam, vascular cell adhesion molecule; Ifnar, interferon- $\alpha$  receptor; Il, interleukin; Pai-1, plasminogen activator inhibitor-1; Tnf, tumor necrosis factor; Zo-1, zonula occludens-1.



**Figure E4: Analysis of mouse aorta sections by immunofluorescence in sham-operated mice. VCAM-1 is in orange, DAPI is in blue. a. Sham-treated *Ifnar1*<sup>+/+</sup> mouse. b. Sham-treated *Ifnar1*<sup>-/-</sup> mouse. c. Sham-treated *Ifnar1*<sup>wt</sup> ; *Cre-ERT*<sup>2</sup> mouse. d. Sham-treated *Ifnar1*<sup>fl/fl</sup> ; *Cre-ERT*<sup>2</sup> mouse. e. Sham-treated *Stat1*<sup>wt</sup> ; *Cre-ERT*<sup>2</sup> mouse. f. Sham-treated *Stat1*<sup>fl/fl</sup> ; *Cre-ERT*<sup>2</sup> mouse. Abbreviations: ERT<sup>2</sup>, tamoxifen-inducible estrogen receptor; CLP, cecal ligation and puncture; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; Ifnar, interferon- $\alpha$  receptor; Stat, signal transducer and activator of transcription; Vcam, vascular cell adhesion molecule.**





**Figure E5: Endothelium-targeted *Ifnar1* and *Stat1* deletions provide protection against septic shock.** Assessment of severity 20 hours after surgery in CLP- vs. sham-operated mice, by measuring systolic blood pressure by intra-carotid catheter (left), and murine sepsis severity score (right). **(A)** tamoxifen-treated controls (*Ifnar1*<sup>+/+</sup>; *Cdh5-CreERT*<sup>2</sup>) in white (CLP: n=7; sham: n=5), *Ifnar1*<sup>fl/fl</sup>; *Cdh5-CreERT*<sup>2</sup> in grey (CLP: n=5; sham: n=2) and tamoxifen-free *Ifnar1*<sup>fl/fl</sup> mice in black (CLP: n=3; sham: n=2). **(B)** tamoxifen-treated controls (*Stat1*<sup>+/+</sup>; *Cdh5-CreERT*<sup>2</sup>) in white (CLP: n=7; sham: n=6), *Stat1*<sup>fl/fl</sup>; *Cdh5-CreERT*<sup>2</sup> mice in grey (CLP: n=7; sham: n=6) and tamoxifen-free *Stat1*<sup>fl/fl</sup> mice in black (CLP: n=4; sham: n=2). Samples are from the same mice as the data from Figure 5. \* p<0.05. Abbreviations: CLP, Cecal ligation and puncture; Ifnar, interferon- $\alpha$  receptor; Stat, signal transducer and activator of transcription.

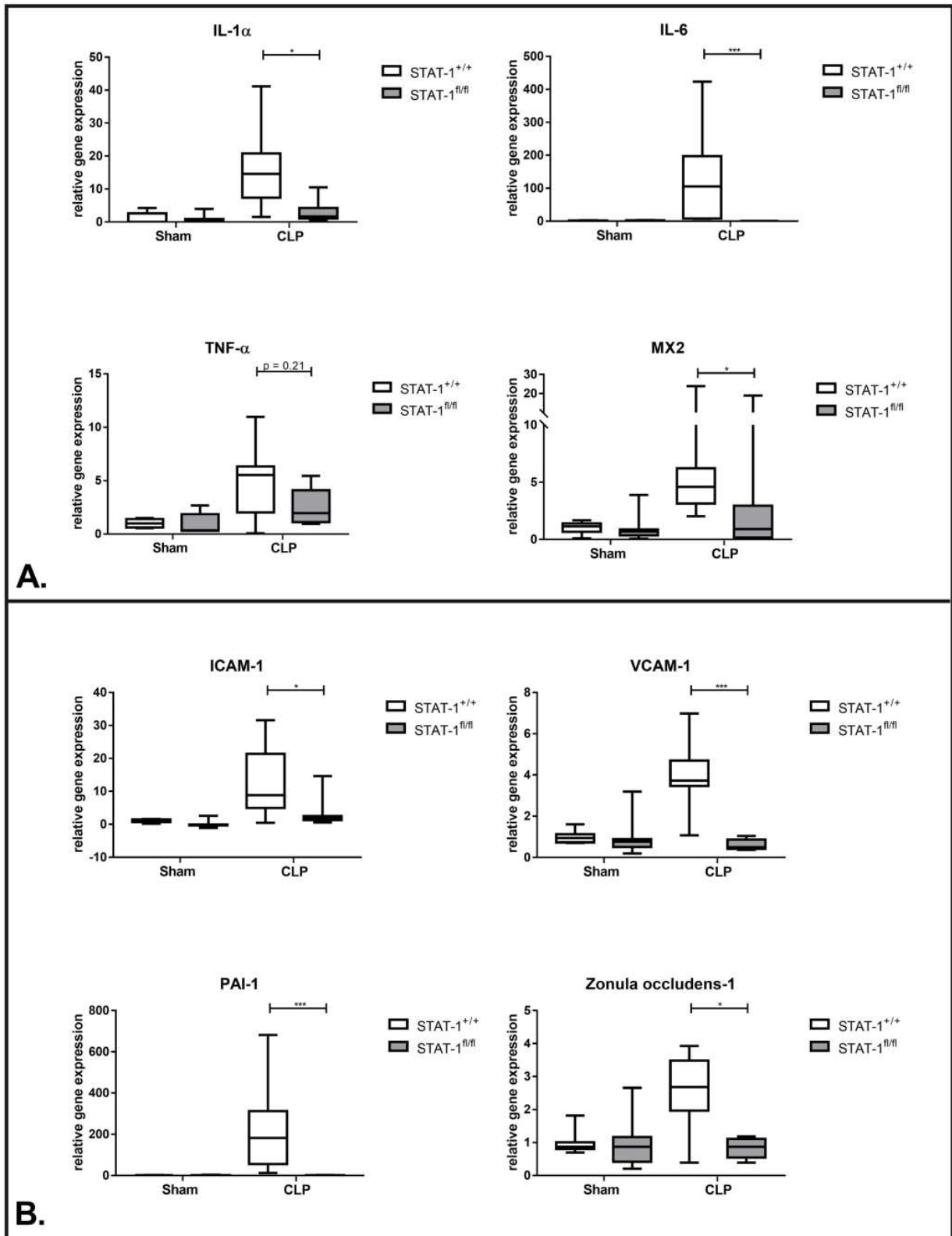
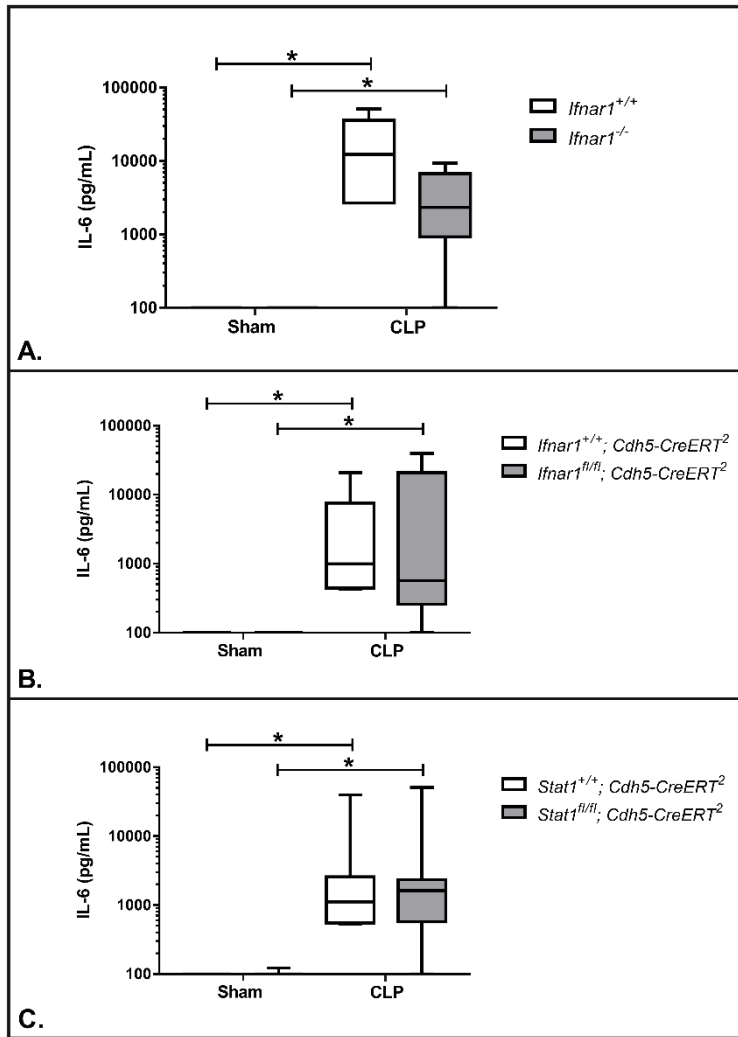


Figure E6: Inflammation- and endothelial activation-related gene expression in the kidney measured by RT-qPCR in endothelium-targeted *Stat1*-deficient mice. Gene expression levels relative to *actin* expression. (A) Expression of inflammation markers (*Il-*

*Iα, Il-6, Tnf, Mx2*). **(B)** Expression of endothelial activation markers (*Icam-1, Pai-1, Zo-1, E-selectin*). Tamoxifen-treated controls (*Stat1<sup>+/+</sup>; Cdh5-CreERT<sup>2</sup>*) are indicated in white (CLP: n=7; sham: n=6) and *Stat1<sup>fl/fl</sup>; Cdh5-CreERT<sup>2</sup>* mice are indicated in grey (CLP: n=7; sham: n=6). Samples are from the same mice as in Figure 6. \* p<0.05. Abbreviations: CLP: Cecal ligation and puncture; Icam, intercellular adhesion molecule; Ifnar, interferon- $\alpha$  receptor; Il, interleukin; Pai-1, plasminogen activator inhibitor-1; Stat, signal transducer and activator of transcription; Tnf, tumor necrosis factor; Zo-1, zonula occludens-1.



**Figure E7: Plasma IL-6 levels 20 hours after surgery in CLP- vs. sham-operated mice. (A)** *Ifnar1*<sup>+/+</sup> (controls) in white and *Ifnar1*<sup>-/-</sup> mice in grey (n=6 in each group). **(B)** tamoxifen-treated controls (*Ifnar1*<sup>+/+</sup>; *Cdh5-CreERT2*) in white (CLP: n=7; sham: n=5), and *Ifnar1*<sup>fl/fl</sup>; *Cdh5-CreERT2* in grey (CLP: n=5; sham: n=2). **(C)** tamoxifen-treated controls (*Stat1*<sup>+/+</sup>; *Cdh5-CreERT2*) in white (CLP: n=7; sham: n=6), and *Stat1*<sup>fl/fl</sup>; *Cdh5-CreERT2* mice in grey (CLP: n=7; sham: n=6). \* p<0.05. Abbreviations: CLP, Cecal ligation and puncture; *Ifnar*, interferon- $\alpha$  receptor; IL, interleukin; *Stat*, signal transducer and activator of transcription.

## References

- E1. Shrum B, Anantha RV, Xu SX, Donnelly M, Haeryfar SM, McCormick JK, Mele T. A robust scoring system to evaluate sepsis severity in an animal model. *BMC Res Notes* 2014; 7: 233.
- E2. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent JL, Angus DC. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016; 315: 801-810.

## Article 2

**JAK-STAT targeting offers novel therapeutic opportunities in sepsis.**

**Raphaël Clere-Jehl**, Alexandre Mariotte, Ferhat Meziani, Seiamak Bahram, Philippe Georget, Julie Helms

Trends in Molecular Medicine. 2020; S1471-4914(20)30158-1.

Notre **deuxième article** est une revue de la littérature détaillant l'impact de la voie de signalisation JAK-STAT au cours du sepsis, et incluant les découvertes les plus récentes dans le domaine. Cet article nous a aussi permis de conceptualiser un modèle de thérapie inhibant la voie de signalisation JAK-STAT, de façon ciblée sur l'endothélium, ou sur d'autres types cellulaires.

La première partie de cette revue de la littérature est consacrée à la description de l'implication de la voie de signalisation JAK-STAT dans la dysfonction immunitaire qui caractérise le sepsis. Après avoir expliqué le fonctionnement moléculaire de cette voie de signalisation, et précisé les principales cytokines d'amont, dont les interférons de type I, nous avons précisé la participation de la voie JAK-STAT dans l'hyperinflammation initiale et dans l'immunosuppression post-sepsis. Nous y soulignons l'implication de membres différents de la famille JAK-STAT dans chacun des deux cas, avec notamment l'implication prédominante de STAT1 et STAT4 dans la réponse pro-inflammatoire, tandis que la réponse anti-inflammatoire fait davantage intervenir STAT3 et STAT6.

Dans la deuxième partie, nous exposons le rôle de la voie JAK-STAT dans la survenue des défaillances d'organes au cours du sepsis : rénale, hépatique, pulmonaire, cardiaque et vasculaire. C'est dans l'explication du rôle joué par JAK-STAT au niveau des défaillances cardiaque et vasculaire que nous détaillons l'impact de la voie JAK-STAT sur la dysfonction endothéliale, en soulignant le rôle actuellement décrit concernant STAT2 et STAT3 en particulier.

Dans la troisième et dernière partie, nous exposons les possibilités thérapeutiques basées sur l'inhibition de la voie JAK-STAT (*jakinibs*), initialement développées dans le cadre d'autres pathologies (onco-hématologiques et auto-

immunes). Nous discutons l'extension de ces thérapeutiques aux problématiques liées au sepsis : hyperinflammation initiale, défaillances d'organes, et immunosuppression post-sepsis. En nous appuyant sur des stratégies existantes de thérapies ciblées, utilisant comme vecteurs des nanoparticules couplées à un ligand permettant de lier un type cellulaire spécifique (dont l'endothélium), nous proposons plusieurs stratégies novatrices permettant de délivrer un *jakinib* à un tissu donné. En particulier, la Figure 4 décrit une proposition de thérapie ciblée délivrant un *jakinib* à l'endothélium.

En conclusion, ce travail publié permet de conforter la faisabilité d'une stratégie thérapeutique d'inhibition de STAT1 ciblée sur l'endothélium, permettant ainsi de donner une perspective thérapeutique aux observations expérimentales du premier article.

→ *Ce travail est publié :*

**Raphaël Clere-Jehl, Alexandre Mariotte, Ferhat Meziani, Seiamak Bahram, Philippe Georgel, Julie Helms.** *JAK-STAT targeting offers novel therapeutic opportunities in sepsis. Trends in Molecular Medicine. 2020; S1471-4914(20)30158-1.*



## Feature Review

## JAK–STAT Targeting Offers Novel Therapeutic Opportunities in Sepsis

Raphaël Clere-Jehl,<sup>1,2</sup> Alexandre Mariotte,<sup>2</sup> Ferhat Meziani,<sup>1</sup> Seiamak Bahram,<sup>2</sup> Philippe Georgel,<sup>2,\*</sup> and Julie Helms<sup>1,2,\*</sup>

**Sepsis is a life-threatening condition caused by exaggerated host responses to infections taking place in two phases: (i) a systemic (hyper)inflammatory response syndrome (SIRS), participating in multiple organ failure (MOF), a major complication of septic shock, followed by (ii) a compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS), leading to sepsis-induced immunosuppression and resulting in late infections and long-term mortality. The Janus kinase–signal transducer and activator of transcription (JAK–STAT)-dependent signaling pathway is involved in both manifestations, hence playing a key role during sepsis. It is also involved in emergency myelopoiesis, which participates in host defense. The aim of this review is to highlight and refine the recent implications of this signaling pathway in sepsis and illustrate why its central position makes it a potential biomarker and therapeutic target.**

### The JAK–STAT Pathway, an Essential Player in Sepsis

The **Janus kinases** (see [Glossary](#)) and **signal transducers and activators of transcription** (JAKs–STATs) are among the most important signaling components downstream of cytokine receptors [1]. They are involved in most pathological conditions, such as cancer [2], and immunological [3] and infectious [4] diseases. **Sepsis** is a deregulated host response to infection leading to organ dysfunction [5,6], affecting about 30 million patients each year with a mortality rate of 30–40% [7,8]. The deregulated host response includes an exacerbated **systemic inflammatory response syndrome (SIRS)** [9,10] to fight off invading pathogens and a **compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS)** [9], which should balance pro- and anti-inflammatory cytokine secretion, but ultimately often leads to secondary immunoparalysis [11] (see Clinician's Corner). The two leading causes of death identified during sepsis are SIRS-induced multiple organ failure (MOF) [12] ([Figure 1](#)) and sepsis-induced immunoparalysis responsible for late infections [13]; both of which rely on JAK–STAT pathways. SIRS is mainly mediated by STAT1 [14] and STAT4 [15], whereas CARS is predominantly mediated by STAT3 [16] and STAT6 [15], with the involvement of JAK1–2 and tyrosine kinase (TYK)2 for both cases [14]. Furthermore, the functions of the JAK–STAT pathway in cell proliferation and apoptosis [17] advocate for its involvement in sepsis-triggered emergency hematopoiesis [18] and sepsis-induced organ dysfunction [19].

Targeting JAK–STAT signaling in sepsis could therefore reduce sepsis-induced MOF and sepsis-induced immunosuppression. The recent successful development of JAK–STAT-targeted therapies in oncology and hematology [20] provides novel opportunities to cure sepsis patients.

### Molecular Aspects: The JAK–STAT Pathway

JAKs are tyrosine kinases that are activated upon cytokine binding to their cognate receptors and phosphorylate the receptor intracellular domain. In most cases, this phosphorylation triggers STATs binding, phosphorylation, and dimerization [17]. Of note, some STATs are activated by

### Highlights

Increasing evidence suggest that STAT2 and STAT3 control the expression of endothelial adhesion molecules [intercellular adhesion molecule (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule (VCAM-1)], initiating endothelial dysfunction during sepsis and subsequently participating in vasoplegia, coagulopathy, and MOF.

Recent studies on emergency myelopoiesis, a fundamental process accompanying the immune response during sepsis, show that STAT3 controls C/EBP $\beta$  and Fanconi C (FANCC) gene expression, which are key factors in this process.

The involvement of the JAK–STAT pathway in myeloid-derived suppressor cell development is a key finding in sepsis-induced immunosuppression. A better understanding of JAK–STAT involvement in immune dysfunction and MOF provides novel insights into the two leading causes of death during sepsis.

<sup>1</sup>Université de Strasbourg, Faculté de Médecine, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Service de Médecine Intensive et Réanimation, Nouvel Hôpital Civil, Strasbourg, France

<sup>2</sup>ImmunoRhumatologie Moléculaire, INSERM UMR\_S1109, LabEx TRANSPLANTEX, Centre de Recherche d'Immunologie et d'Hématologie, Faculté de Médecine, Fédération Hospitalo-Universitaire (FHU) OMICARE, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Université de Strasbourg, Strasbourg, France

\*Correspondence: pgeorgel@unistra.fr (P. Georgel) and julie.helms@chru-strasbourg.fr (J. Helms).

JAKs without requiring tyrosine phosphorylation of the receptor [21]. Following their phosphorylation and dimerization, STATs translocate to the nucleus, where they act as transcription factors. There are four different JAKs (JAK1–3 and TYK2) and seven STATs (STAT1–4, 5A, 5B, and 6). Different cytokine receptors utilize various combinations, resulting in diverse biological responses. Among the most important examples, STAT1 and STAT2 are phosphorylated by JAK1 and TYK2 following type I interferon (IFN) receptor engagement. Phosphorylated STAT1 and STAT2 bind to **interferon regulatory factor (IRF)-9** to form a heterotrimeric transcription factor complex called IFN-stimulated gene factor (ISGF)-3, which induces expression of hundreds of IFN-stimulated genes (e.g., IRF1, 3, and 7) that participate in the clearance of the invading pathogens [22].

JAK–STAT pathways are tightly regulated by inhibitors preventing immune response deregulation. Three main inhibitors have been described: protein inhibitors of activated STAT (PIASs); suppressors of cytokine signaling (SOCS); and protein tyrosine phosphatases (PTPases) [1]. PIASs are regulators of STATs, acting through transcriptional regulation and protein stability [23]. SOCS family members prevent STAT phosphorylation and have important roles in inducing degradation of cytokine receptor complexes [24]. PTPases inactivate JAK and STAT family members by triggering their dephosphorylation [25]. The role of these inhibitors has been shown in physiological and pathological contexts. Inspired by their mode of action, pharmacological blockers of JAKs (**jakinibs**) have been designed and are used to treat a broad spectrum of immune-related disorders ranging from rheumatologic diseases to hematological malignancies [26].

### JAKs, STATs, and Immunity during Sepsis

#### Role of JAK–STAT Signaling Pathways during Sepsis

JAKs and STATs play complex roles during sepsis, through host defense against pathogens, and immunity regulation (Table 1). Indeed, following **pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)** recognition by **pathogen recognition receptors (PRRs)**, which activate the innate immune system, many of the most important receptors involved in the immune response during sepsis need the JAK–STAT signaling pathways: these include the receptors for **granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)**, macrophage inflammatory protein (MIP)-2 (also called C-X-C motif chemokine ligand 2, CXCL2), type I cytokines, including interleukins (IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, and IL-13), and type II cytokines, including **interferons** (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , and IFN- $\gamma$ ). JAKs and STATs are thus involved both in proinflammatory (IFN- $\gamma$ , IL-12, and IL-27) and anti-inflammatory (IL-4, IL-10, and IL-13) cytokine signaling. This reveals the capacity of various STAT family members to differentially regulate the T helper (**Th**)1/Th2 cell balance.

The presence of STATs in various cell types enables a partially cell-type-restricted signaling in response to cytokines. Thus, macrophage activation is mostly regulated by cytokines using STAT1, participating in inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression and STAT3 signaling pathways, whereas neutrophils require STAT2, which enhances superoxide dismutase activity. Lymphocytes are mostly regulated by STAT4 [27] and STAT6 [28] for proinflammatory Th1 and immunoregulatory Th2 responses [28], respectively. STAT4 is also required for IL-12-mediated responses [29] of natural killer cells and dendritic cells [30]. Although the JAK–STAT pathways are of critical importance for innate immunity, they are also involved in the hyperinflammation and immunosuppression following sepsis.

#### Role of JAK–STAT in Hyperinflammation Contributing to Mortality

The JAK–STAT signaling pathways are involved in the production of proinflammatory molecules that require especially STAT1, STAT4, TYK2, and JAK2, as well as in emergency myelopoiesis (Box 1); a fundamental process accompanying the immune response during sepsis. The resulting hyperinflammatory state (Figure 2, Key Figure) contributes to death during sepsis, as demonstrated

### Glossary

**Compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS):** anti-inflammatory process that limits the consequences of SIRS during sepsis and restores immune balance.

**Cecal ligation and puncture (CLP):** mouse model of sepsis. CLP-mice undergo a laparotomy, a ligation and puncture of the cecum, which is then reintegrated in the peritoneum. Mice develop peritonitis within a few hours, resulting in sepsis.

**Disseminated intravascular coagulation (DIC):** abnormal activation of coagulation and defective fibrinolysis, resulting in the formation of disseminated microthrombosis, along with a consumption of platelets and clotting factors, resulting in bleeding complications.

**Endothelium:** single layer-type of epithelium lining the interior of the heart and blood vessels. Normally, the endothelial surface is impermeable, antiaggregant, and anticoagulant.

**Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF):** cytokine acting as a growth factor, which stimulates neutrophil production. Neutrophils are white blood cells belonging to the granular lineage.

**Interferons:** cytokines produced by immune cells during the proinflammatory response to an infection. IFNs can be of type I ( $\alpha$ ,  $\beta$ ), II ( $\gamma$ ), or III ( $\lambda$ ). IFNs stimulate the production and activation of immune cells.

**Interferon regulatory factor-9 (IRF-9):** intracytoplasmic protein that, in association with phosphorylated forms of STAT1 and STAT2, forms the trimeric transcription factor ISGF-3.

**Jakinibs:** recent pharmaceutical class inhibiting JAKs.

**Janus kinase:** intracellular tyrosine kinase that allows transduction of signals downstream of cytokine receptors, and phosphorylates STATs.

**Lipopolysaccharide (LPS):** essential component of the outer membrane of Gram-negative bacteria.

**Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs):** molecular motifs specific to a class of microorganisms and activating innate immunity via the PRRs (e.g., LPS is a PAMP from Gram-negative bacteria which is recognized by the PRR called TLR4).

**Pathogen recognition receptors (PRRs):** receptors expressed by innate immunity effector cells, recognizing

by knockout mouse models (Table 1). *Stat1*<sup>-/-</sup> mice are resistant to **lipopolysaccharide (LPS)**-induced endotoxemia [31] and **cecal ligation and puncture (CLP)**-induced **septic shock** [14]. *Stat4*<sup>-/-</sup> mice display increased resistance to CLP-induced lethality [32]. This enhanced survival has been attributed to diminished Th1 and augmented Th2 immune responses, leading to reduced inflammation and organ injuries in the liver and kidneys. Consistently, TYK2, phosphorylating STAT1 and STAT4, was shown to promote sepsis-induced lethality. Indeed, *Tyk2*<sup>-/-</sup> mice were resistant to LPS-induced endotoxin shock and to CLP-triggered polymicrobial sepsis by reducing the production of proinflammatory IL-27 [33]. Finally, hematopoiesis defects in *Jak2*<sup>-/-</sup> mice and lethality prevent their analysis in infectious settings. It could be shown, however, that JAK2 inhibitors increase survival after CLP in mice and rats by decreasing the expression of proinflammatory mediators such as tumor necrosis factor (TNF), IL-6, and high mobility group box (HMGB)-1 [34]. Of note, HMGB-1 can be induced by LPS through the Toll-like receptor (TLR)4–JAK–STAT1 pathway leading to deleterious consequences, like pyroptosis [35]. HMGB-1 is an example of the pleiotropic consequences of JAK–STAT signaling. Indeed, HMGB-1 expression by macrophages can be suppressed *in vitro* [36] by AG490 (a JAK2 inhibitor, see below), or fludarabine (a STAT1 inhibitor). Macrophages also undergo pyroptosis promoted by STAT1-mediated caspase 11 activation [37]. These pathways participate in MOF also by activating apoptosis of nonimmune cells, such as hepatocytes, cardiac myocytes, and fibroblasts. Furthermore, STAT1 plays a well-known role in stress-induced apoptosis.

Altogether, the overwhelming inflammation mediated by JAKs–STATs during septic shock contributes to mortality through tissue damage and MOF syndrome [19], forcing the host to mount anti-inflammatory compensation mechanisms.

#### CARS and Post-sepsis Immunosuppression

During sepsis, SIRS is rapidly followed by downregulation called CARS (Figure 2) [9,38], involving predominantly STAT3 and STAT6. CARS starts from the onset of septic shock [9] and its suspected physiological function is to protect cells and tissues from an excessive inflammatory immune response during septic shock. Several anti-inflammatory cytokine receptors also use the JAK–STAT pathways: IL-10 downregulates proinflammatory IFN-induced genes by suppressing STAT1 phosphorylation and initiates the STAT3-mediated anti-inflammatory Th2 response [39]. Indeed, activated STAT3 limits the production of TNF and IL-6 in murine models of LPS-induced sepsis, particularly in monocytes and macrophages. The STAT3 anti-inflammatory role is confirmed by the hyperinflammation and subsequent lethality following peritonitis in mice lacking STAT3 selectively in macrophages and neutrophils [40,41]; likewise, during LPS-induced endotoxin shock [42]. Similarly, conditional STAT5-deficient mice in dendritic cells and macrophages, using CD11c-cre mediated deletion, exhibit exaggerated LPS-induced inflammatory responses and vascular leak [43], which can be explained by the need of STAT5 to promote a Th2 response [44].

IL-4 and IL-13 are two other immunoregulatory cytokines that require STAT6 for signal transduction [28] and participation in Th2 responses. Accordingly, *Stat6*<sup>-/-</sup> mice exhibit increased Th1 responses and produce higher levels of TNF and IL-6 during endotoxemia [15]. Of note, increased Th1 response and enhanced bacterial clearance improved survival of *Stat6*<sup>-/-</sup> mice following CLP (Table 1) [32].

Additionally, JAK–STAT-dependent inflammation is negatively regulated by the three main families of inhibitors: SOCS [45], PIAS [46], and PTPases [47]. Activated STATs induce the transcription of *Socs* genes, which are part of a retro control mechanism. SOCS proteins target STATs or JAKs by facilitating their ubiquitin-mediated degradation and preventing their phosphorylation,

PAMPs and activating proinflammatory response to fight off the pathogen.

PRRs include TLRs.

**Sepsis:** dysregulated hyperinflammatory host response to an infection, resulting in organ dysfunction.

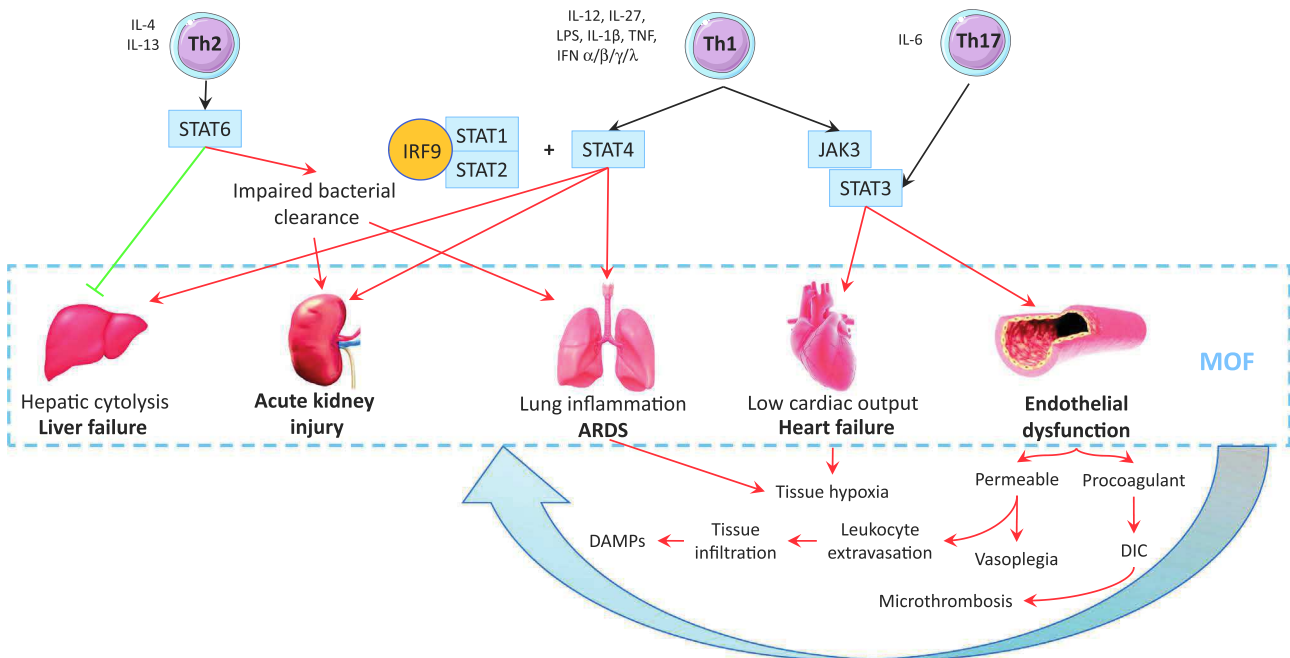
**Septic shock:** sepsis with acute circulatory failure, defined by low blood pressure requiring vasopressors and by hyperlactatemia, which reflects tissue hypoxia.

**Signal transducers and activator of transcription (STAT):** cytoplasmic transcription factors enabling, after their phosphorylation by JAKs, the transduction of cytokine signals from the cell membrane to the nucleus.

**Systemic inflammatory response syndrome (SIRS):** hyperinflammatory response with release of proinflammatory cytokines, which can be triggered by an infection, aimed at fighting off the pathogen.

**Th1 response:** proinflammatory immune response mediated by T-bet<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells (type 1 T helper cells), producing IFN- $\gamma$ .

**Th2 response:** immune response mediated by GATA3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells (Th2 cells) involved in the anti-inflammatory response following Th1 and leading to the production of IL-10. Th2 is also involved in atopy and in the response against helminths via IL-4, -5, and -13.



Trends in Molecular Medicine

**Figure 1. JAK–STAT Signaling in Sepsis-Induced Organ Dysfunction.** STAT1, 2, 3, 4, and 6 have been linked to experimental sepsis-related organ dysfunctions. STAT1 and 2 proinflammatory response (Th1) is mediated by interferon-stimulated gene factor 3 (ISGF-3), which is a heterotrimeric transcription factor complex associating STAT1, STAT2, and interferon regulatory factor 9 (IRF-9). STAT4 exerts pathogenic effects by promoting Th1 immune responses involved in acute kidney and liver failures and lung inflammation leading to acute respiratory distress syndrome (ARDS). Conversely, STAT6 mediates Th2 response and acts in two different ways: (i) by directly restricting liver inflammation or (ii) by compromising Th1-mediated bacterial clearance and exacerbating acute kidney injury and lung inflammation. The JAK3–STAT3 pathway is also associated with myocardial failure directly and indirectly by promoting endothelial dysfunction. STAT3-mediated endothelial dysfunction plays a key role in sepsis-induced multiple organ failure (MOF), because of the endothelial role in capillary leak, vasoplegia, and disseminated intravascular coagulopathy (DIC); all of which worsen the tissue hypoxia observed in septic shock. Moreover, tissue injuries are responsible for the generation of damage-associated molecular patterns (DAMPs) that reinforce the proinflammatory response, forming a vicious circle. Red arrows symbolize organ insults and their mechanisms. Protective effects are indicated in green. Abbreviations: IFN, interferon; IL, interleukin; JAK–STAT, Janus kinase–signal transducer and activator of transcription; LPS, lipopolysaccharide; Th, T helper cell; TNF, tumor necrosis factor.

thereby downregulating proinflammatory cytokine production during sepsis. Thus, SOCS3 contributes to the control of hyperinflammation by inhibiting STAT1, STAT4, and STAT5, while SOCS1 interacts with TYK2 and STAT1. SOCS action on JAK–STAT can be cell specific, like macrophages following LPS stimulation or phagocytes upon CLP [48,49]. PIAS family members are also involved in these negative feedback loops: PIAS1 and PIASx inhibit STAT1 and STAT4, respectively [50,51]. Among PTPases, Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase (SHP)1, SHP2, and PTP1B show important immunomodulatory roles in response to LPS in mice [52–55], with SHP1 being the best example. Indeed, mice lacking SHP-1 (motheaten mice) exhibit hyper-responsive macrophages after stimulation by LPS and IFN- $\gamma$ , as attested by increased TNF secretion and iNOS protein accumulation [52]. Moreover, Cre-Lox mice with hepatocyte-specific SHP1 deficiency show higher mortality following LPS stimulation and exhibit increased levels of proinflammatory cytokines [53], which indicate an immunoregulatory role of SHP1 through STAT1, STAT3, STAT5, and STAT6 dephosphorylation [56]. PTP1B-deficient mice display higher survival and bacterial clearance during *Pseudomonas aeruginosa* infection [55], in line with the role of PTP1B on STAT1- and STAT3-mediated signaling [57].

These anti-inflammatory processes may last for weeks and lead to post-sepsis immunosuppression. Following CARS, immunosuppression induced by sepsis [58] is the second leading cause of

Table 1. Respective Roles of JAK and STAT Family Members in the Host Response against Bacterial Sepsis

STATs	Upstream cytokine	JAK	Downstream genes <sup>a</sup>	Effector cells	Response to bacterial infections	Phenotype of STAT <sup>-/-</sup> mice		
						CLP-resistant	LPS-resistant	Refs
<b>STAT1</b>	IFN- $\gamma$	JAK1, JAK2	ISGs <sup>b</sup>	Monocytes Macrophages	Proinflammatory Th1	Yes	Yes	[14,31]
	IFN- $\alpha/\beta$	JAK1, TYK2						
	IL-27, IFN- $\lambda$							
<b>STAT2</b>	IFN- $\alpha/\beta$	JAK1, TYK2	ISGs <sup>b</sup>	Monocytes Macrophages Neutrophils	Proinflammatory Th1	None published	No (more susceptible)	[70]
<b>STAT3</b>	IL-6	JAK1/2, TYK2	Immunoregulatory genes (e.g., TGF- $\beta$ )	Monocytes Macrophages MDSC	Proinflammatory Th17 (IL-6)	No (more susceptible) <sup>c</sup>	No (more susceptible) <sup>c</sup>	[41,42]
	IL-10	JAK1, TYK2	Apoptosis regulation (e.g., BCL-XL)		Immunoregulatory Th2 (IL-10)			
	G-CSF	JAK1/2, TYK2	Granulopoiesis (e.g., C/EBP $\beta$ , c-Myc)		Emergency granulopoiesis			
<b>STAT4</b>	IL-12	JAK2, TYK2	IFN- $\gamma$ , AP-1 <sup>e</sup> (IFN- $\gamma$ promoter)	Lymphocytes Natural killers Dendritic cells	Proinflammatory Th1	Yes	No (more susceptible)	[15,32]
			IRF-1					
			IL-12R (positive feedback loop)					
<b>STAT5a</b>	IL-2, IL-3	JAK2	Foxp3	Lymphocytes (CD4 T cells)	Immunoregulatory Th2 (IL-2,3)	None published	No (more susceptible) <sup>d</sup>	[43]
<b>STAT5b</b>	IL-7	JAK1/3	Bcl-2		T cell survival (IL-7)			
	GM-CSF	JAK1/2	Granulopoiesis (e.g., C/EBP $\alpha/\beta/\delta$ )	Myeloid cells	Emergency granulopoiesis			
<b>STAT6</b>	IL-4	JAK1, JAK3	IL-4, IL-13 (positive feedback loop)	Lymphocytes (B and T cells)	Immunoregulatory Th2	Yes	No (more susceptible)	[15,32]
	IL-13	JAK1/2, TYK2	IL-5, IL-9					
			Gata3					

<sup>a</sup>Each STAT protein may activate a plethora of genes in response to cytokine signaling. Only some of the most representative activated genes during sepsis are mentioned above.

<sup>b</sup>Mediated by ISGF-3, heterotrimeric transcription factor complex associating STAT1, STAT2, and IRF-9. ISGs include hundreds of genes aimed at eliminating the invading pathogen (e.g., IRF1, 3, and 7).

<sup>c</sup>Conditional deficient mice in neutrophils and macrophages (LysM-cre mediated deletion), as Stat3<sup>-/-</sup> mice are not viable.

<sup>d</sup>Conditional deficient mice in dendritic cells and macrophages (CD11c-cre mediated deletion), as Stat5<sup>-/-</sup> mice exhibit a high perinatal lethality.

<sup>e</sup>Abbreviations: AP-1, activator protein-1; LysM, lysozyme M; TGF- $\beta$ , transforming growth factor- $\beta$ .

death after MOF [13]. Sepsis-induced immunosuppression includes apoptosis of immune cells, immunoregulatory mechanisms, and cellular exhaustion [58]. The JAK–STAT pathway is a potentially interesting therapeutic target because of its critical importance in sepsis-induced immunosuppression.

Importantly, STAT1 and 5 regulate *FOXP3* gene expression in humans, which is constitutively expressed by the regulatory T lymphocytes (Tregs) involved in post-sepsis immunoparalysis [59]. Lymphocytes apoptosis, which is another important component of immunosuppression following sepsis, is partially regulated by STAT3-activated caspase 3 and by STAT5 activating Bcl-2. Lymphocyte proliferation is controlled by STAT6 regulating the cell-cycle inhibitor p27Kip1 and by SOCS3 inhibiting STAT5 phosphorylation. Myeloid-derived suppressor cells

**Box 1. JAK–STAT and Hematopoiesis during Sepsis**

Pro- and anti-inflammatory molecular mechanisms are accompanied by a hematopoietic cellular response. Indeed, fighting against bacterial pathogens requires a rapid and massive production of immune cells, a process termed emergency myelopoiesis or emergency granulopoiesis [105], mainly driven by G-CSF and MIP-2 (CXCL2). G-CSF is produced by hematopoietic stem and progenitor cells and endothelial cells. G-CSF receptor activation induces STAT3 phosphorylation in bone marrow hematopoietic stem cells, resulting in their proliferation and expansion [106]. STAT3 is phosphorylated by JAK1/2 and TYK2 during emergency myelopoiesis and plays a major role in this process. It directly controls the expression of C/EBP $\beta$ , a key factor in the emergency myelopoiesis response, upregulating c-Myc and activating hematopoietic cell proliferation and Fanconi C (FANCC) gene, a DNA repair pathway maintaining myeloid cells viable during this emergency proliferation [107]. In a positive feedback loop, phospho-STAT3 upregulates the transcription of the genes encoding MIP-2 (CXCL2) and its receptor (C-X-C motif chemokine receptor, CXCR2) [108,109].

(MDSCs), which also contribute to immunosuppression, require the NF- $\kappa$ B–CCAAT-enhancer-binding protein (C/EBP) $\beta$ –STAT3 axis, and their survival is promoted by STAT5 [60]. Finally, STAT3 is involved in the reduced expression of MHC class II genes leading to limited antigen presentation [61]. Hence, reduced HLA-DR expression [62] on monocytes quantified by flow cytometry is a classical biomarker of sepsis-induced immunosuppression which correlates with intensive-care-unit-acquired infection [63] and high mortality [64]. Altogether, these examples highlight the therapeutic potential of targeting JAK–STAT signaling to counter sepsis-induced immunosuppression.

**JAK–STAT and Organ Failure during Sepsis****MOF**

Sepsis and septic shock are responsible for MOF. The involvement of the JAK–STAT pathways during sepsis is a matter of debate and seems to depend on the experimental settings. Indeed, CLP-induced peritonitis generates a local (peritoneal) proinflammatory Th1 response and a systemic immunoregulatory Th2 response, while LPS-induced endotoxemia is responsible for a generalized systemic Th1 hyperinflammatory response [15]. In this section, we discuss the relationships between JAK–STAT signaling and experimental sepsis-related organ dysfunction (Figure 1).

**Liver Failure**

During LPS-induced endotoxemia, *Stat6*<sup>-/-</sup> mice exhibit leukocyte infiltration in the liver and hepatocyte necrosis, along with upregulation of NF- $\kappa$ B, increased proinflammatory cytokines [MIP-1 $\alpha$ , MIP-2, IFN- $\gamma$ -induced protein (IP)-10, and monocyte chemoattractant protein (MCP)-1] expression and significant hepatocellular injury attested by increased aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT) production [15]. These observations suggest that STAT6 prevents liver failure, possibly by inducing a Th2 response regulating systemic inflammation.

By contrast, *Stat4*<sup>-/-</sup> mice display an increased resistance to CLP-induced lethality [65] as well as reduced liver failure, attested by significantly lower plasma levels of AST and ALT. This correlates with fewer neutrophil infiltrating the liver and reduced levels of neutrophil chemokines MIP-2 (CXCL2) and KC (CXCL1), whereas IL-13 and IL-10 expression is increased [32], arguing for a deleterious proinflammatory Th1 response mediated by STAT4 [65].

**Kidney Failure**

*Stat4*<sup>-/-</sup> mice are resistant to CLP-induced acute kidney failure, as assessed by their significantly lower plasma levels of urea and creatinine, reduced renal levels of MIP-2 and KC [32]. *Stat6*<sup>-/-</sup> mice also display reduced CLP-induced kidney injury and lower MIP-2 and KC levels. This suggests that the more effective bacterial clearance observed in these mice after CLP could reduce the severity of sepsis and subsequent organ failure.

## Key Figure

## JAK–STAT-Targeted Therapies in Sepsis

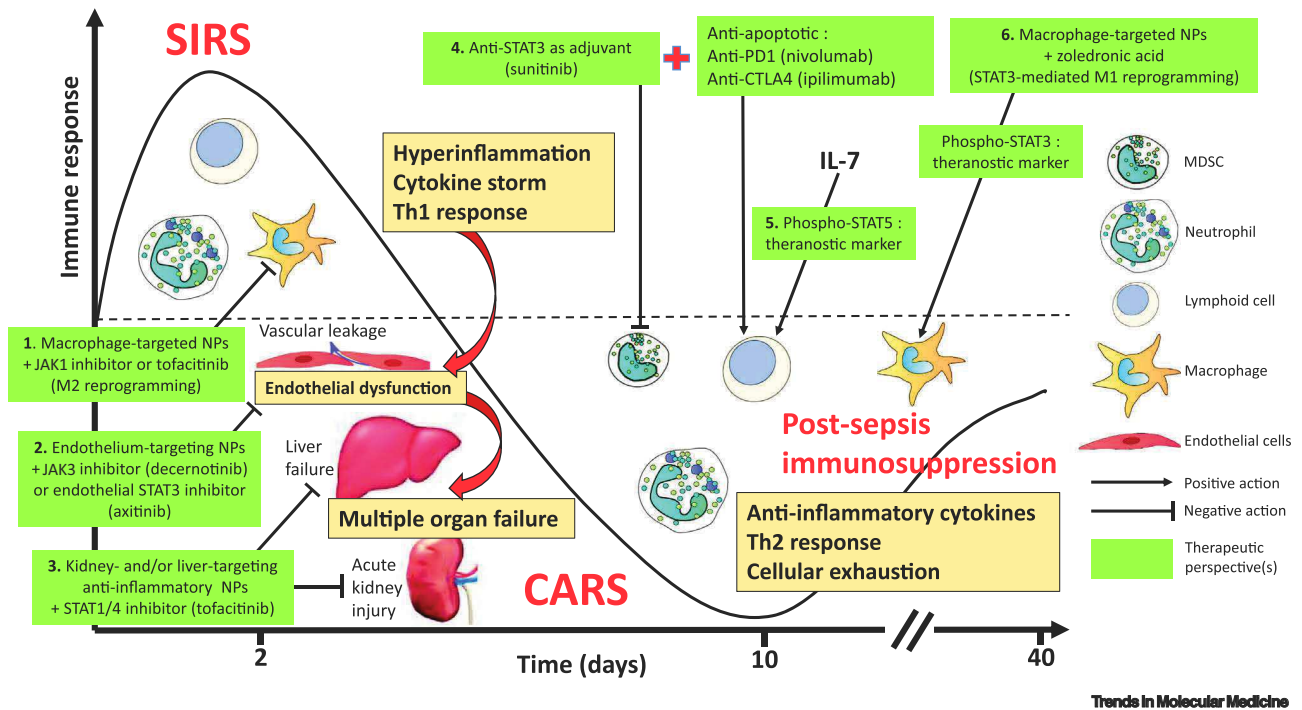


Figure 2.

For a Figure360 author presentation of Figure 2, see the figure legend at <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2020.06.007>.

Therapeutic strategies vary according to the phase of sepsis and the cells that are involved. During the early phase of sepsis, systemic inflammatory response syndrome (SIRS) triggers organ damage through an exacerbated cellular and molecular inflammatory response, part of which is JAK–STAT-mediated. Nanoparticles (NPs) allow targeted JAK–STAT inhibition on cells of interest. Using this cell-targeted strategy, the following therapies are proposed: (1) macrophage-targeted tofacitinib to perform M2 reprogramming, which leads to an immunoregulatory phenotype; (2) endothelium-targeted decernotinib (JAK3 inhibitor) or axitinib (inhibiting STAT3) to reduce endothelial dysfunction and subsequent multiple organ failure; (3) kidney- or liver-targeted tofacitinib to reduce the deleterious consequences of STAT1/4-mediated Th1 response on these organs. Of note, targeting the endothelium allows targeting of both the liver and kidneys, which are rich in blood vessels. During the late phase of sepsis, compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) leads to sepsis-induced immunosuppression and results in late infections and long-term mortality. CARS also uses the JAK–STAT pathways. Therefore, the following strategies are considered: (4) using sunitinib (STAT3 inhibitor) as an adjuvant treatment with boosting immunotherapies (nivolumab and ipilimumab) to prevent immune escape mediated by myeloid-derived suppressor cells (MDSCs); (5) interleukin-7 (IL-7) stimulating STAT5-mediated T cell survival, which allows one to use phosphorylated STAT5 as a therapeutic marker; (6) macrophage-targeted NPs containing zoledronic acid or mRNA aimed at M1 reprogramming, which enables one to use phosphorylated STAT3 as a therapeutic marker. Abbreviations: CTLA4, cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4; JAK–STAT, Janus kinase–signal transducer and activator of transcription; PD1, programmed death 1; Th, T helper cell.

## Lung Inflammation

During LPS endotoxemia, *Stat6*<sup>-/-</sup> mice display increased inflammation in the lungs, attested by upregulation of NF-κB, increased proinflammatory cytokines expression and granulocytes, and infiltration of mononuclear cells, especially lymphocytes [15]. *Stat4*<sup>-/-</sup> mice displayed an increased myeloperoxidase activity in the lungs, evocative of neutrophil accumulation. Of note, these observations were not supported by lung dysfunction after 24 h. This contrasts with CLP-induced sepsis, during which the levels of MIP-2 and KC in the lung of *Stat4*<sup>-/-</sup> mice were significantly decreased [32].

### *Endothelial Dysfunction and Implication of Endothelial Cells during Sepsis*

Sepsis is characterized by an endothelial dysfunction [66], participating in vasomotor paralysis, coagulopathy [67], capillary leak, and MOF. JAK3 is expressed in vascular endothelial cells, especially when stimulated by LPS, TNF, IL-1 $\beta$ , and IFN- $\gamma$ . Through STAT3 phosphorylation and NF- $\kappa$ B activation, JAK3 drives overexpression of the endothelial adhesion molecules intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1, and platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM)-1, enabling the attachment of leukocytes and platelets to the **endothelium** and their transmigration into peripheral tissues [68]. While STAT3-mediated expression of PECAM-1 maintains endothelial integrity, ICAM1 promotes STAT3-mediated leukocyte transmigration and increases the overall microvascular permeability, which is the onset of sepsis-induced capillary leak. This overexpression of cell adhesion molecules can be prevented by the JAK3 inhibitor Janex-1 or by the platelet-activating factor (PAF) that attenuates LPS-mediated interactions between neutrophils and endothelial cells [69]. STAT2 controls excessive ICAM-1-mediated cellular egress and *Stat2*<sup>-/-</sup> mice exhibit higher lethality by a mechanism centered on enhanced endothelial dysfunction, in line with ICAM-1 overexpression and subsequent cellular transmigration [70].

Sepsis also promotes atherosclerosis through IFN- $\gamma$ -induced activation of JAK2-STAT1 in endothelial cells, an inflammatory response partially prevented by salivianolic acid.

### *Heart Failure*

Sepsis induces an acute myocardial dysfunction after LPS-induced endotoxemia [71] as well as in CLP models. In both cases, altered cardiac functions, increased myocardial inflammatory cytokine production, cardiomyocyte apoptosis [72,73], and neutrophil infiltration are observed. STAT1 mediates apoptosis during sepsis-induced myocardial dysfunction. Endothelial dysfunction during sepsis contributes to myocardial dysfunction through JAK3-STAT3-mediated LPS-induced myocardial vascular leakage, which can be prevented by the JAK3 inhibitor Janex-1. IL-6 also induces cardiac dysfunction during LPS-induced endotoxemia [74]. Of note, exchange protein activated by cAMP (Epac)-1 activation [75] or overexpression could prevent IL-6-induced cardiomyocyte dysfunction as well as sepsis-induced arrhythmia through decreased STAT3 phosphorylation and subsequent inhibition of iNOS expression. Epac-1 is a recently described target of cAMP signaling, suggesting a new STAT-mediated mechanism of catecholamine action on sepsis-induced myocardial dysfunction [76].

## Therapeutic Targets for Experimental and Clinical Research

### *Jakinibs*

JAK inhibitors, also called jakinibs, are a growing recent drug class, whose most representative examples are listed in Table 2, with a focus on their use in clinical trials. These molecules inhibit one or more JAKs, thereby preventing the phosphorylation and activation of the corresponding STAT proteins. So far, most of the drugs targeting the JAK-STAT pathways have been used for their immunosuppressive or antitumoral properties. Among them, the most studied currently are ruxolitinib [77], tofacitinib [78–80], and baricitinib [81]. Ruxolitinib, which was the first nonselective JAK1/2 inhibitor to be approved, was developed for the treatment of myeloproliferative neoplasms [82]. Tofacitinib, a nonselective JAK1/2/3 inhibitor, was then approved for the treatment of rheumatoid arthritis. In spite of the overall high number of clinical trials involving JAK inhibitors, none is scheduled in the field of sepsis.

### *Direct Inhibitors of the JAK-STAT Pathways in Experimental Research*

As demonstrated earlier, the JAK-STAT pathways play heterogeneous roles during sepsis. Modulation of JAK-STAT pathways for therapeutic purposes in sepsis is of interest because



Table 2. JAK/STAT Inhibitors: Targets, Indications, and Current Status in Clinical Research

Types of inhibitors	Inhibitor	Targeted JAK/STAT	Indications	Phase	Therapeutic trials in progress <sup>a</sup>
Nonselective	<b>Ruxolitinib</b>	JAK1, JAK2	Myelofibrosis/myeloproliferative neoplasms, hematological malignancies, autoimmune diseases	FDA approved (2011)	223
	<b>Tofacitinib</b>	JAK1, JAK2, JAK3 <sup>b</sup>	Autoimmune diseases (first FDA approval: rheumatoid arthritis)	FDA approved (2012)	167
	<b>Baricitinib</b>	JAK1, JAK2	Autoimmune diseases	FDA approved (2018)	76
	<b>Peficitinib</b>	JAK1, JAK2, JAK3, TYK2 <sup>b</sup>	Autoimmune diseases	Approved in Japan (2019)	34
	<b>Momelotinib</b>	JAK1, JAK2	Myelofibrosis/myeloproliferative neoplasms, advanced solid malignancies	III	14
	<b>PF-06700841</b>	TYK2, JAK1	Autoimmune diseases (systemic lupus erythematosus, psoriasis, inflammatory bowel diseases)	II	19
	<b>Cerdulatinib</b>	JAK1, JAK3, TYK2	Lymphoid malignancies vitiligo	II B	3
	<b>AZD-1480</b>	JAK1, JAK2	Advanced solid malignancies	I	3
Selective	<b>Upadacitinib</b>	JAK1	Autoimmune diseases (first FDA approval: rheumatoid arthritis)	FDA approved (2019)	41
	<b>Filgotinib</b>	JAK1	Autoimmune diseases (rheumatoid arthritis, Crohn's disease)	III	37
	<b>BMS-986165</b>	Tyk2	Autoimmune diseases (systemic lupus erythematosus, psoriasis, inflammatory bowel diseases)	III	36
	<b>Pacritinib</b>	JAK2	Myelofibrosis hematological malignancies	III	23
	<b>PF-06651600</b>	JAK3	Autoimmune diseases (alopecia areata, inflammatory bowel diseases)	III	24
	<b>Fedratinib</b>	JAK2	Myelofibrosis/myeloproliferative neoplasms	FDA approved (2019)	13
	<b>Solcitinib</b>	JAK1	Systemic lupus erythematosus	II	0
	<b>Decernotinib</b>	JAK3	Rheumatoid arthritis	II	0
Other inhibitors	<b>Sunitinib</b>	STAT3 <sup>c</sup>	Renal cell carcinoma, gastrointestinal stromal tumor	FDA approved (2006)	606
	<b>Axitinib</b>	STAT3 <sup>d</sup>	Renal cell carcinoma	FDA approved (2012)	150
	<b>AZD-9150</b>	STAT3	Advanced solid malignancies, digestive neoplasms, ovarian cancer	II	11
	<b>WP-1066</b>	STAT3	Brain neoplasm	I	2

<sup>a</sup>Number of clinical trials in progress listed in <https://clinicaltrials.gov/> as of May 20, 2020. Does not include past trials.

<sup>b</sup>Pan-JAK inhibitor.

<sup>c</sup>Sunitinib is a multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor, which prevents STAT3 phosphorylation.

<sup>d</sup>Axitinib is an inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR), which is a receptor tyrosine kinase; axitinib prevents STAT3 phosphorylation, especially in endothelial cells.

the pathways can regulate the Th1/Th2 balance, as well as emergency myelopoiesis or endothelial activation. Experimental data confirm this hypothesis. Ruxolitinib, a JAK1/JAK2 inhibitor, is able to improve the prognosis of *Candida* sepsis in mice [83]. Results obtained with ruxolitinib during murine sepsis illustrate the importance of the timing of this immunomodulatory medication: when started 1 day before sepsis, ruxolitinib acts as an immunosuppressor and reduces survival, while providing ruxolitinib 1 day after infection onset improves survival, depending on the dose. The best survival is obtained for a dose of 6.25 mg/kg/day, for which the hyperinflammation is downregulated without increasing the pathogen load [84].

Other experimental studies have shown the effectiveness of JAK2 inhibitors and confirm that the best time of administration is about 24 h after onset of sepsis. Indeed, JAK2 inhibitors increase survival when administered 24 h after onset of CLP-induced polymicrobial sepsis in mice and rats by decreasing expression of proinflammatory mediators such as TNF, IL-6, and HMGB-1. This effect is obtained through JAK2 inactivation by the jakinib AG490, which acts as a STAT3 inhibitor by preventing tyrosine phosphorylation. This concentration-dependent inactivation specifically precludes activation of the canonical NF- $\kappa$ B pathway but does not prevent the alternative pathway, which allows maintaining host antimicrobial defense. Of note, AG490 is not available for clinical use but has the same mode of action as WP1066 (listed in Table 2), which entered clinical trials.

Inhibitors of the JAK–STAT pathways can avoid post-sepsis immunosuppression. Indeed, the two STAT3 inhibitors sunitinib and axitinib are reported to inhibit recruitment of MDSCs into renal carcinoma tumors in mice [85]; this is in line with STAT3 roles in the expansion and survival of MDSCs [86] involved in immune escape. MDSCs are among the most promising therapeutic targets to treat post-sepsis immunosuppression [87], providing a central position for STAT3 inhibitors during the late phase of sepsis.

These inhibitors offer novel possibilities to target the JAK–STAT signaling pathways in experimental and clinical research on sepsis.

#### Modulators of the JAK–STAT Pathways and Applicability in Sepsis

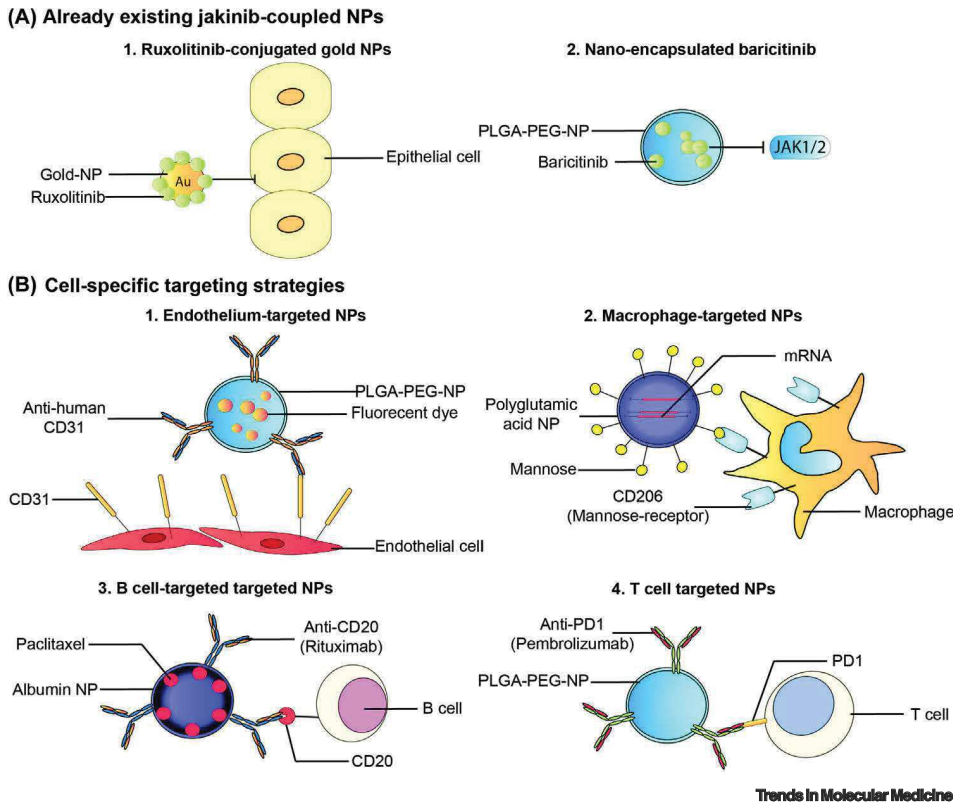
##### *JAK–STAT-Based Therapies and the Two Sides of Sepsis-Induced Dysimmunity*

As seen earlier, sepsis is a progressive disease, involving many tissues and cell types, initiated by a hyperinflammatory response followed by immune cell exhaustion; both of which are responsible for the high mortality rate of this condition (Figure 2). Importantly, the common feature between these cell types and immune dysfunctions is their requirement of the JAK–STAT pathway. This has led us to consider the potential interest of JAK inhibitors to modulate sepsis using time- and organ-oriented therapies.

##### *Early Phase of Sepsis and Hyperinflammation*

During the acute hyperinflammatory phase of sepsis, using the immunosuppressive properties of JAK–STAT inhibitors might be tricky. Although ruxolitinib is able to improve the survival during *Candida* sepsis in mice, a 2.6% risk of infections was observed in humans [88]. As stated earlier, ruxolitinib doses and timing of administration greatly influence the immune state, the subsequent pathogen clearance and survival [84]. Besides, a withdrawal syndrome is described when patients cease ruxolitinib treatment, which is termed ruxolitinib discontinuation syndrome and can lead to a cytokine storm that could be highly detrimental in a context of sepsis [89]. All this makes the systemic delivery double-edged in human sepsis, in which the real onset time of the infection may be unknown, with greater variability of the offending pathogen, of its initial load, and of the immune response. A recent meta-analysis showed a low rate of serious infections with jakinibs [90]; such potential immunosuppressive effects make their systemic delivery risky, leading us to suggest alternative strategies.

A more specific, cell- or tissue-targeted strategy could be an alternative of choice and is currently one of the best focuses of research to improve inflammatory diseases treatment. This targeting strategy is based on a nanoparticle encapsulation of therapeutic molecules [91]. This long-dreamed strategy to avoid the systemic side effects of drugs of interest is now technically possible and several options have now been developed (Figure 3), as demonstrated by the newly designed nanoencapsulated jakinib baricitinib in 2019 [92]. In 2017, ruxolitinib-conjugated gold



**Figure 3. Existing Strategies for JAK–STAT-Based Therapies of Sepsis.** (A) Already existing jakinib-coupled nanoparticles (NPs): (1) ruxolitinib-conjugated gold NPs (Boca *et al.* [93]) developed to treat alopecia topically while limiting systemic absorption; (2) nanoencapsulated baricitinib (Ansari *et al.* [92]) in poly lactic-co-glycolic acid (PLGA); PLGA-NPs increase oral bioavailability. (B) Cell-specific targeted strategies: (1) human endothelial CD31-targeted poly(lactic acid)-poly(ethylene)glycol-nanoparticles (PLA-PEG-NPs) developed to administer therapeutics directly to the graft before kidney transplantation (Tietjen *et al.* [98]); (2) macrophage-targeted polyglutamic acid-NPs (Zhang *et al.* [95]) using CD206 as a receptor (mannose receptor), and containing mRNA encoding M1-polarization; (3) B cell-targeted paclitaxel loaded albumin-NPs, aimed at treating CD20+ B-cell lymphoma (Nevala *et al.* [96]); (4) T-cell-targeted PEG-PLGA-NPs binding to PD-1 (Schmid *et al.* [97]). Abbreviations: JAK–STAT, Janus kinase–signal transducer and activator of transcription.

nanoparticles were designated for topical administration, with a reduced systemic absorption into the blood flow [93]. Nanoparticles have a ligand that allow targeting of specific cells or tissue, ranging from a given organ [94] to immune cells subtypes such as macrophages [95], B cells [96], or T cells [97]. This targeting allows two major strategies during the hyperinflammatory phase of septic shock (Figures 2 and 4). The first one is to target a tissue highly implicated in the pathophysiology of septic shock, such as the endothelium, in which dysfunctional JAK3 and STAT3 are involved, with repercussions on heart dysfunction (see earlier). The existence of nanoparticles targeting the endothelium via CD31 [98] makes it possible to integrate an anti-STAT3 or anti-JAK3 (decernotinib) to reduce endothelial dysfunction. The second strategy is to target a specific immune cell type involved in hyperinflammation, such as macrophages (Figures 3B and 4) with CD206-targeted nanoparticles [95].

This targeted strategy aims at reprogramming macrophages towards M2 polarization by JAK1 inhibitors, such as tofacitinib [99], in order to modulate inflammation at the acute phase of sepsis without killing the immune cells. This cell-targeted strategy may also apply to post-sepsis immunosuppression, according to the targeted cells.

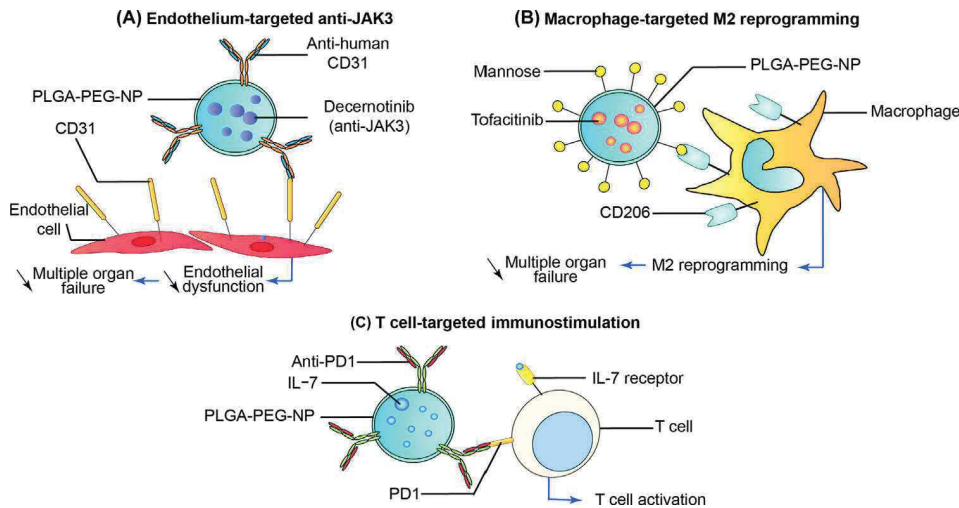
### Clinician's Corner

From the clinician's point of view, the prognosis of sepsis patients is greatly influenced by the two leading causes of mortality following disease onset: the SIRS-induced MOF syndrome and the sepsis-induced immunosuppression resulting in late infections and long-term mortality. The balance between proinflammatory and anti-inflammatory immune responses is therefore the core of these two issues that physicians have to deal with, and the JAK–STAT pathways are fully involved in both sides of these responses. The challenge is to highlight and put into practice the tremendous potential of JAK–STAT-based therapies in clinical research on sepsis.

Several JAK–STAT-based therapeutic approaches have been identified, like the jakinibs. Comprehension of JAK–STAT involvement in each tissue and cell type has become essential because each STAT may have different, cell-specific roles. Therefore, the most appropriate approach to use these molecules in sepsis likely requires cell- or tissue-targeted strategies, which are made possible by the use of cell-targeted nanoparticles, thereby providing an exciting new area of clinical research in sepsis.

SIRS relies on STAT1, 2, and 4, which are involved in liver failure, lung inflammation, and acute kidney injury. In addition, STAT3 mediates endothelial activation and dysfunction and subsequent cardiovascular dysfunction. Endothelial dysfunction plays a key role during septic shock, as it is responsible for vasoplegia participating in hemodynamic failure, coagulopathy resulting in disseminated intravascular coagulation (DIC), and capillary leak that worsens all organ damage. Moreover, STAT1 and 3 are involved in sepsis-induced myocardial failure, which is an aggravating component of hemodynamic failure. These recent discoveries may indicate a path towards developing a tissue-targeted inhibition of the JAK–STAT pathways. An endothelium-targeted inhibition of STAT3 would be of major interest in future experimental and clinical research.

Following hyperinflammation, CARS, which requires STAT3 and 6, can lead to a long-lasting sepsis-induced



## Trends in Molecular Medicine

**Figure 4. Innovative Human Cell- and Tissue-Targeted Therapeutics Acting on JAK–STAT during Sepsis.** (A) CD31-targeted poly(lactic acid)-poly(ethylene)glycol-nanoparticles (PLGA-PEG-NPs) delivering decemotininib (anti-JAK3) to endothelial cells to reduce endothelial dysfunction and subsequent multiple organ failure during systemic inflammatory response syndrome (SIRS). (B) CD206-targeted PLGA-PEG-NPs delivering tofacitinib (JAK1–3 inhibitor) selectively to macrophages during SIRS for M2 reprogramming to reduce hyperinflammation without killing macrophages. (C) Programmed death 1 (PD1)-targeted immunostimulation of T-cells by interleukin (IL)-7 during sepsis-induced immunosuppression, resulting in STAT5-mediated T-cell survival. T cells phosphorylated by STAT5 is proposed as a theranostic marker. Abbreviations: JAK–STAT, Janus kinase–signal transducer and activator of transcription

### Post-sepsis Immunosuppression

Despite the absence of clinical trials directly targeting JAK–STAT during post-sepsis immunosuppression until now, this track must be kept in view. Indeed, treatments currently in therapeutic trials in the field of sepsis impact on the JAK–STAT pathways to mediate their effect. IL-7, which aims at restoring post-sepsis immunity [100] by promoting CD4<sup>+</sup> T cells survival, and which entered Phase II clinical studies in this perspective (e.g., NCT03821038<sup>i</sup>), upregulates Bcl-2 by phosphorylating STAT5. As the IL-7 signaling pathway involves STAT5, phosphorylated STAT5 could be a convenient theranostic marker to follow and evaluate IL-7 effects, particularly in T lymphocytes [101] to monitor the treatment of sepsis-induced immunosuppression. Moreover, nanoparticles can target T cells (Figure 3B) via the anti-PD1 (programmed cell death 1) pembrolizumab [97], which also acts as an antiapoptotic agent on T cells. Such T cell-targeted nanoparticles could be loaded with IL-7 (Figure 4).

During sepsis-induced immunosuppression, cellular exhaustion also involves macrophages, and CD206-targeted NPs could be proposed for M1 reprogramming [95], which enables the use of phosphorylated STAT3 as a theranostic marker [102] (Figure 2). In addition to using the status (phosphorylation) of JAK–STAT proteins as biomarkers, JAK–STAT inhibitors may be an adjuvant treatment for immunomodulators, especially during post-sepsis immunoparalysis (Figure 2). This strategy is inspired by recent therapeutic trials in oncology, in which STAT3 inhibitors such as sunitinib or axitinib were combined with the anti-PD1 nivolumab in Phase I and II studies (NCT03277924<sup>ii</sup>, NCT03172754<sup>iii</sup>) to prevent MDSC-mediated immune escape [103]. Indeed, some therapeutic targets in post-sepsis immunosuppression are common with oncology, especially the immune checkpoint molecules PD1 and cytotoxic T lymphocyte-associated antigen (CTLA)4: anti-PD1 and anti-CTLA4 both improve survival in humans with malignant diseases; they also increase survival in mice during post-sepsis immunosuppression [104]. Moreover, the

immunosuppression. Therefore, STAT3 inhibitors such as sunitinib or axitinib are drugs of choice to counteract the anti-inflammatory immune response mediated by several types of immunosuppressive cells, such as MDSCs. Moreover, using nanoparticles coupled to specific receptors, JAK–STAT-based therapies could target Th2 cells, M2 macrophages, or MDSCs, and would be a highly innovative therapeutic track.

anti-PD1 nivolumab is already being tested for its capacity to relieve sepsis-induced immunosuppression in a Phase I study (NCT02960854<sup>iv</sup>). The demonstrated role of MDSCs in the resistance to immunotherapy in cancer patients [103] suggests that an association of nivolumab with STAT3 inhibitors could be relevant in future trials to control sepsis-induced immunosuppression. Similarly with the cell-targeted strategies considered for the hyperinflammatory phase, MDSCs could be targeted by nanoparticles, which would minimize the side-effects of JAK–STAT inhibitors.

### Concluding Remarks

Targeting JAKs and/or STATs might become an important approach to reduce mortality in septic shock patients because these proteins are clearly involved in immunological dysfunctions and MOF. Original JAK–STAT-based therapies should be designed to treat sepsis-induced immunosuppression, and could reach new targets in this field, such as MDSCs. Moreover, phosphorylated STATs may offer creative theranostic markers to drive such treatments. Of note, the large number of animal studies on JAK–STAT pathways and their well-known effects on sepsis strikingly contrast with the lack of clinical trials, which, up to now, mainly concern the fields of autoimmune diseases and oncohematology. This may be explained by the pleiotropic effects (and sometimes opposing, such as proinflammatory or immunoregulatory) of the various JAK–STAT family members, depending on the cell type in which they act and the signal that triggers their activation. Therefore, development of innovative JAK–STAT-based therapies in sepsis should probably integrate a tissue- or cell-targeted approach (see Outstanding Questions), which can be achieved through the design of innovative nanoparticles. From this perspective, JAK–STAT-based therapies could reduce hyperinflammation in a selected organ, or in a key tissue such as the endothelium, thereby allowing the improvement of organ dysfunctions during sepsis.

We have thus highlighted tactical approaches (Figure 4) that combine recent existing therapeutic means at different stages of clinical use, most of them in pathologies other than sepsis until now. These strategies provide technically feasible treatments to counteract the two main causes of mortality during sepsis, namely MOF syndrome and the immunosuppression following sepsis. Thus, the development of JAK–STAT-based clinical trials will be the next exciting step towards improving the prognosis of sepsis patients.

### Acknowledgments

Work in our laboratory is supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR) (ANR-11-LABX-0070\_TRANSPLANTEX), INSERM (UMR\_S 1109), the Institut Universitaire de France (IUF), the University of Strasbourg (IDEX UNISTRA), the European regional development fund (European Union) INTERREG V program (project n°3.2 TRIDIAG), and MSD-Avenir grant AUTOGEN. Research work in our intensive care unit is supported by grants from ADIRAL Assistance and from the French Eastern Interregional Group of Clinical Research and Innovation (GIRCI Est; appel à projet « jeunes chercheurs », APJ 2018).

### Resources

- <sup>i</sup> <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03821038>
- <sup>ii</sup> <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03277924>
- <sup>iii</sup> <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03172754>
- <sup>iv</sup> <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02960854>

### References

1. Villarino, A.V. *et al.* (2017) Mechanisms and consequences of Jak-STAT signaling in the immune system. *Nat. Immunol.* 18, 374–384
2. Groner, B. and von Manstein, V. (2017) Jak Stat signaling and cancer: opportunities, benefits and side effects of targeted inhibition. *Mol. Cell. Endocrinol.* 451, 1–14
3. Banerjee, S. *et al.* (2017) JAK-STAT signaling as a target for inflammatory and autoimmune diseases: current and future prospects. *Drugs* 77, 521–546
4. Gavegnano, C. *et al.* (2017) Novel mechanisms to inhibit HIV reservoir seeding using Jak inhibitors. *PLoS Pathog.* 13, e1006740

### Outstanding Questions

Why and how can we develop a more targeted strategy to use inhibitors of the JAK–STAT pathway? Each STAT family member can exert different effects, depending on the type of cells and the trigger. Targeting a specific cell type would avoid systemic adverse effects. Jakinib-conjugated nanoparticles are currently being developed for this purpose.

How could a tissue-targeted strategy prevent sepsis-induced MOF? Can this strategy be applied to other diseases? Reaching all the organs which are impaired during septic shock requires targeting a common tissue. The endothelium is an excellent candidate and can be targeted through its specific ligand CD31. Such an endothelium-targeted strategy could be used in other diseases, such as atherosclerosis and autoimmune vasculitis, inflammatory diseases involving both the endothelium and JAK–STAT signaling.

Can STAT proteins be used as theranostic markers? Growing evidence suggests that phosphorylated STAT5 in CD4<sup>+</sup> T cells could be used as a biomarker of IL-7 efficiency in the treatment of sepsis-induced immunosuppression. Similarly, the effects of jakinibs could be monitored by the level of phosphorylation of the corresponding STATs.

In addition to sepsis, which diseases can benefit from JAK–STAT-targeted immunomodulation? After their success in rheumatoid arthritis, jakinibs are being tested in a larger panel of autoimmune diseases with promising results including systemic lupus erythematosus and inflammatory bowel disease. Conversely, STAT3 inhibitors prevent MDSC-mediated immune escape and are of great interest in HIV or mycobacterial infections.

5. Singer, M. *et al.* (2016) The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315, 801–810
6. Rhodes, A. *et al.* (2017) Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock: 2016. *Crit. Care Med.* 45, 486–552
7. Fleischmann, C. *et al.* (2016) Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis. Current estimates and limitations. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 193, 259–272
8. de Groot, H.J. *et al.* (2018) Unexplained mortality differences between septic shock trials: a systematic analysis of population characteristics and control-group mortality rates. *Intensive Care Med.* 44, 311–322
9. Angus, D.C. and van der Poll, T. (2013) Severe sepsis and septic shock. *N. Engl. J. Med.* 369, 840–851
10. Bosmann, M. and Ward, P.A. (2013) The inflammatory response in sepsis. *Trends Immunol.* 34, 129–136
11. Peters van Ton, A.M. *et al.* (2018) Precision immunotherapy for sepsis. *Front. Immunol.* 9, 1926
12. Elke, G. *et al.* (2018) Identification of developing multiple organ failure in sepsis patients with low or moderate SOFA scores. *Crit. Care* 22, 147
13. van Vught, L.A. *et al.* (2016) Incidence, risk factors, and attributable mortality of secondary infections in the intensive care unit after admission for sepsis. *JAMA* 315, 1469–1479
14. Herzig, D. *et al.* (2012) STAT1-deficient mice are resistant to cecal ligation and puncture-induced septic shock. *Shock* 38, 395–402
15. Lentsch, A.B. *et al.* (2001) STAT4 and STAT6 regulate systemic inflammation and protect against lethal endotoxemia. *J. Clin. Invest.* 108, 1475–1482
16. Mukherjee, S. *et al.* (2012) STAT3-mediated IL-17 production by postseptic T cells exacerbates viral immunopathology of the lung. *Shock* 38, 515–523
17. O'Shea, J.J. *et al.* (2013) JAKs and STATs in immunity, immunodeficiency, and cancer. *N. Engl. J. Med.* 368, 161–170
18. Ward, A.C. *et al.* (2000) The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis. *Blood* 95, 19–29
19. Cai, B. *et al.* (2015) The specific roles of JAK/STAT signaling pathway in sepsis. *Inflammation* 38, 1599–1608
20. Gadina, M. *et al.* (2018) Translational and clinical advances in JAK-STAT biology: the present and future of jakinibs. *J. Leukoc. Biol.* 104, 499–514
21. Zhu, X. *et al.* (1997) Stat1 serine phosphorylation occurs independently of tyrosine phosphorylation and requires an activated Jak2 kinase. *Mol. Cell. Biol.* 17, 6618–6623
22. Schneider, W.M. *et al.* (2014) Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu. Rev. Immunol.* 32, 513–545
23. Shuai, K. (2006) Regulation of cytokine signaling pathways by PIAS proteins. *Cell Res.* 16, 196–202
24. Yoshimura, A. *et al.* (2007) SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 454–465
25. Xu, D. and Qu, C.K. (2008) Protein tyrosine phosphatases in the JAK/STAT pathway. *Front. Biosci.* 13, 4925–4932
26. Schwartz, D.M. *et al.* (2016) Type I/II cytokines, JAKs, and new strategies for treating autoimmune diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* 12, 25–36
27. Stark, R. *et al.* (2013) IL-12-mediated STAT4 signaling and TCR signal strength cooperate in the induction of CD40L in human and mouse CD8<sup>+</sup> T cells. *Eur. J. Immunol.* 43, 1511–1517
28. Kaplan, M.H. *et al.* (1996) Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity* 4, 313–319
29. Nakahira, M. *et al.* (2001) An absolute requirement for STAT4 and a role for IFN- $\gamma$  as an amplifying factor in IL-12 induction of the functional IL-18 receptor complex. *J. Immunol.* 167, 1306–1312
30. Fukao, T. *et al.* (2001) Inducible expression of Stat4 in dendritic cells and macrophages and its critical role in innate and adaptive immune responses. *J. Immunol.* 166, 4446–4455
31. Kamezaki, K. *et al.* (2004) The role of Tyk2, Stat1 and Stat4 in LPS-induced endotoxin signals. *Int. Immunol.* 16, 1173–1179
32. Matsukawa, A. *et al.* (2001) Pivotal role of signal transducer and activator of transcription (Stat)4 and Stat6 in the innate immune response during sepsis. *J. Exp. Med.* 193, 679–688
33. Bosmann, M. *et al.* (2014) Tyrosine kinase 2 promotes sepsis-associated lethality by facilitating production of interleukin-27. *J. Leukoc. Biol.* 96, 123–131
34. Pena, G. *et al.* (2010) JAK2 inhibition prevents innate immune responses and rescues animals from sepsis. *J. Mol. Med. (Berl.)* 88, 851–859
35. Deng, M. *et al.* (2018) The endotoxin delivery protein HMGB1 mediates caspase-11-dependent lethality in sepsis. *Immunity* 49, 740–753 e7
36. Liu, H. *et al.* (2007) Role of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathway in regulation of expression and inflammation-promoting activity of high mobility group box protein 1 in rat peritoneal macrophages. *Shock* 27, 55–60
37. Vígano, E. and Mortellaro, A. (2013) Caspase-11: the driving factor for noncanonical inflammasomes. *Eur. J. Immunol.* 43, 2240–2245
38. Gomez, H.G. *et al.* (2014) Immunological characterization of compensatory anti-inflammatory response syndrome in patients with severe sepsis: a longitudinal study. *Crit. Care Med.* 42, 771–780
39. Hillmer, E.J. *et al.* (2016) STAT3 signaling in immunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 31, 1–15
40. Matsukawa, A. *et al.* (2005) Stat3 in resident macrophages as a repressor protein of inflammatory response. *J. Immunol.* 175, 3354–3359
41. Matsukawa, A. *et al.* (2003) Aberrant inflammation and lethality to septic peritonitis in mice lacking STAT3 in macrophages and neutrophils. *J. Immunol.* 171, 6198–6205
42. Takeda, K. *et al.* (1999) Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity* 10, 39–49
43. Eddy, W.E. *et al.* (2017) Stat5 is required for CD103(+) dendritic cell and alveolar macrophage development and protection from lung injury. *J. Immunol.* 198, 4813–4822
44. Bell, B.D. *et al.* (2013) The transcription factor STAT5 is critical in dendritic cells for the development of TH2 but not TH1 responses. *Nat. Immunol.* 14, 364–371
45. Duncan, S.A. *et al.* (2017) SOCS proteins as regulators of inflammatory responses induced by bacterial infections: a review. *Front. Microbiol.* 8, 2431
46. Niu, G.J. *et al.* (2018) Protein inhibitor of activated STAT (PIAS) negatively regulates the JAK/STAT pathway by inhibiting STAT phosphorylation and translocation. *Front. Immunol.* 9, 2392
47. Xiao, Y. *et al.* (2015) Protein tyrosine phosphatase SHP-1 modulates T cell responses by controlling Cbl-b degradation. *J. Immunol.* 195, 4218–4227
48. Bode, J.G. *et al.* (1999) LPS and TNF $\alpha$  induce SOCS3 mRNA and inhibit IL-6-induced activation of STAT3 in macrophages. *FEBS Lett.* 463, 365–370
49. Grutkoski, P.S. *et al.* (2003) Sepsis-induced SOCS-3 expression is immunologically restricted to phagocytes. *J. Leukoc. Biol.* 74, 916–922
50. Liu, B. *et al.* (1998) Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 10626–10631
51. Arora, T. *et al.* (2003) PIASx is a transcriptional co-repressor of signal transducer and activator of transcription 4. *J. Biol. Chem.* 278, 21327–21330
52. Hardin, A.O. *et al.* (2006) SHP-1 inhibits LPS-mediated TNF and iNOS production in murine macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342, 547–555
53. Adhikari, A. *et al.* (2017) Hepatocyte SHP-1 is a critical modulator of inflammation during endotoxemia. *Sci. Rep.* 7, 2218
54. Hsu, M.F. *et al.* (2017) Protein tyrosine phosphatase Shp2 deficiency in podocytes attenuates lipopolysaccharide-induced proteinuria. *Sci. Rep.* 7, 461
55. Yue, L. *et al.* (2016) Protein tyrosine phosphatase-1B negatively impacts host defense against *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Am. J. Pathol.* 186, 1234–1244
56. Abram, C.L. and Lowell, C.A. (2017) Shp1 function in myeloid cells. *J. Leukoc. Biol.* 102, 657–675

57. Pike, K.A. *et al.* (2014) Protein tyrosine phosphatase 1B is a regulator of the interleukin-10-induced transcriptional program in macrophages. *Sci. Signal* 7, ra43
58. Hotchkiss, R.S. *et al.* (2013) Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect. Dis.* 13, 260–268
59. Venet, F. *et al.* (2008) Regulatory T cell populations in sepsis and trauma. *J. Leukoc. Biol.* 83, 523–535
60. Ray, A. *et al.* (2013) Immunosuppressive MDSCs induced by TLR signaling during infection and role in resolution of inflammation. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3, 52
61. Roquilly, A. *et al.* (2017) Local modulation of antigen-presenting cell development after resolution of pneumonia induces long-term susceptibility to secondary infections. *Immunity* 47, 135–147.e5
62. Remy, S. *et al.* (2018) Occurrence of marked sepsis-induced immunosuppression in pediatric septic shock: a pilot study. *Ann. Intensive Care* 8, 36
63. Landelle, C. *et al.* (2010) Low monocyte human leukocyte antigen-DR is independently associated with nosocomial infections after septic shock. *Intensive Care Med.* 36, 1859–1866
64. Manzoli, T.F. *et al.* (2016) Prolonged suppression of monocytic human leukocyte antigen-DR expression correlates with mortality in pediatric septic patients in a pediatric tertiary Intensive Care Unit. *J. Crit. Care* 33, 84–89
65. Godshall, C.J. *et al.* (2001) STAT4 is required for antibacterial defense but enhances mortality during polymicrobial sepsis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8, 1044–1048
66. Boisrarme-Helms, J. *et al.* (2013) Endothelial dysfunction in sepsis. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 11, 150–160
67. Mezzani, F. *et al.* (2017) Should all patients with sepsis receive anticoagulation? Yes. *Intensive Care Med.* 43, 452–454
68. Frank, P.G. and Lisanti, M.P. (2008) ICAM-1: role in inflammation and in the regulation of vascular permeability. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 295, H926–H927
69. Noh, K.T. *et al.* (2017) Platelet-activating factor mediates endotoxin tolerance by regulating indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent expression of the suppressor of cytokine signaling 3. *J. Biol. Chem.* 292, 3290–3298
70. Alazawi, W. *et al.* (2013) Stat2 loss leads to cytokine-independent, cell-mediated lethality in LPS-induced sepsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 8656–8661
71. Jin, H. *et al.* (2017) Cardiac overexpression of Epac1 in transgenic mice rescues lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction and inhibits Jak-STAT pathway. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 108, 170–180
72. Kumar, A. *et al.* (2005) Human serum from patients with septic shock activates transcription factors STAT1, IRF1, and NF-kappaB and induces apoptosis in human cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 280, 42619–42626
73. Hussein, S. *et al.* (2009) Characterization of human septic sera induced gene expression modulation in human myocytes. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2, 131–148
74. Terrell, A.M. *et al.* (2006) Jak/STAT/SOCS signaling circuits and associated cytokine-mediated inflammation and hypertrophy in the heart. *Shock* 26, 226–234
75. Jin, H. *et al.* (2018) Epac activation inhibits IL-6-induced cardiac myocyte dysfunction. *J. Physiol. Sci.* 68, 77–87
76. Okumura, S. *et al.* (2014) Epac1-dependent phospholamban phosphorylation mediates the cardiac response to stresses. *J. Clin. Invest.* 124, 2785–2801
77. Gonzalez Vicent, M. *et al.* (2019) Ruxolitinib treatment for steroid refractory acute and chronic graft vs host disease in children: Clinical and immunological results. *Am. J. Hematol.* 94, 319–326
78. Mease, P. *et al.* (2017) Tofacitinib or adalimumab versus placebo for psoriatic arthritis. *N. Engl. J. Med.* 377, 1537–1550
79. Damsky, W. *et al.* (2018) Tofacitinib treatment and molecular analysis of cutaneous sarcoidosis. *N. Engl. J. Med.* 379, 2540–2546
80. van Vollenhoven, R. *et al.* (2019) Evaluation of the short-, mid-, and long-term effects of tofacitinib on lymphocytes in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 71, 685–695
81. Taylor, P.C. *et al.* (2017) Baricitinib versus placebo or adalimumab in rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* 376, 652–662
82. Verstovsek, S. *et al.* (2010) Safety and efficacy of INCB018424, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *N. Engl. J. Med.* 363, 1117–1127
83. Tsigotis, P. *et al.* (2016) Balanced control of both hyper and hypo-inflammatory phases as a new treatment paradigm in sepsis. *J. Thorac. Dis.* 8, E312–E316
84. Tsigotis, P. *et al.* (2015) Treatment of experimental *Candida* sepsis with a Janus kinase inhibitor controls inflammation and prolongs survival. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 7367–7373
85. Yuan, H. *et al.* (2014) Axitinib augments antitumor activity in renal cell carcinoma via STAT3-dependent reversal of myeloid-derived suppressor cell accumulation. *Biomed. Pharmacother.* 68, 751–756
86. Su, Y.L. *et al.* (2018) STAT3 in tumor-associated myeloid cells: multitasking to disrupt immunity. *Int. J. Mol. Sci.* 19
87. Schrijver, I.T. *et al.* (2019) Myeloid-derived suppressor cells in sepsis. *Front. Immunol.* 10, 327
88. Verstovsek, S. *et al.* (2017) Long-term treatment with ruxolitinib for patients with myelofibrosis: 5-year update from the randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 COMFORT-I trial. *J. Hematol. Oncol.* 10, 55
89. Chukwuka, N.H. *et al.* (2020) Ruxolitinib discontinuation syndrome. *Am. J. Ther.* Published online March 20, 2020. <https://doi.org/10.1097/MJT.0000000000001150>
90. Bechman, K. *et al.* (2019) A systematic review and meta-analysis of infection risk with small molecule JAK inhibitors in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 58, 1755–1766
91. Rizzuto, M.A. *et al.* (2019) Are nanotechnological approaches the future of treating inflammatory diseases? *Nanomedicine (London)* 14, 2379–2390
92. Ansari, M.J. and Alshahrani, S.M. (2019) Nano-encapsulation and characterization of baricitinib using poly-lactic-glycolic acid co-polymer. *Saudi Pharm. J.* 27, 491–501
93. Boca, S. *et al.* (2017) Ruxolitinib-conjugated gold nanoparticles for topical administration: an alternative for treating alopecia? *Med. Hypotheses* 109, 42–45
94. Autio, K.A. *et al.* (2018) Safety and efficacy of BIND-014, a docetaxel nanoparticle targeting prostate-specific membrane antigen for patients with metastatic castration-resistant prostate cancer: a phase 2 clinical trial. *JAMA Oncol.* 4, 1344–1351
95. Zhang, F. *et al.* (2019) Genetic programming of macrophages to perform anti-tumor functions using targeted mRNA nanocarriers. *Nat. Commun.* 10, 3974
96. Nevala, W.K. *et al.* (2017) Antibody-targeted paclitaxel loaded nanoparticles for the treatment of CD20(+) B-cell lymphoma. *Sci. Rep.* 7, 45682
97. Schmid, D. *et al.* (2017) T cell-targeting nanoparticles focus delivery of immunotherapy to improve antitumor immunity. *Nat. Commun.* 8, 1747
98. Tietjen, G.T. *et al.* (2017) Nanoparticle targeting to the endothelium during normothermic machine perfusion of human kidneys. *Sci. Transl. Med.* 9, eaam6764
99. De Vries, L.C.S. *et al.* (2019) A JAK1 selective kinase inhibitor and tofacitinib affect macrophage activation and function. *Inflamm. Bowel Dis.* 25, 647–660
100. Venet, F. *et al.* (2012) IL-7 restores lymphocyte functions in septic patients. *J. Immunol.* 189, 5073–5081
101. Demaret, J. *et al.* (2015) STAT5 phosphorylation in T cell subsets from septic patients in response to recombinant human interleukin-7: a pilot study. *J. Leukoc. Biol.* 97, 791–796
102. Qin, H. *et al.* (2012) SOCS3 deficiency promotes M1 macrophage polarization and inflammation. *J. Immunol.* 189, 3439–3448
103. Weber, R. *et al.* (2018) Myeloid-derived suppressor cells hinder the anti-cancer activity of immune checkpoint inhibitors. *Front. Immunol.* 9, 1310
104. Chang, K.C. *et al.* (2013) Blockade of the negative co-stimulatory molecules PD-1 and CTLA-4 improves survival in primary and secondary fungal sepsis. *Crit. Care* 17, R85
105. Manz, M.G. and Boettcher, S. (2014) Emergency granulopoiesis. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 302–314
106. Skirecki, T. *et al.* (2015) Early severe impairment of hematopoietic stem and progenitor cells from the bone marrow caused by CLP sepsis and endotoxemia in a humanized mice model. *Stem Cell Res Ther* 6, 142

107. Shah, C.A. *et al.* (2018) Stat3 and CCAAT enhancer-binding protein beta (C/ebpbeta) activate Fanconi C gene transcription during emergency granulopoiesis. *J. Biol. Chem.* 293, 3937–3948
108. Nguyen-Jackson, H. *et al.* (2010) STAT3 controls the neutrophil migratory response to CXCR2 ligands by direct activation of G-CSF-induced CXCR2 expression and via modulation of CXCR2 signal transduction. *Blood* 115, 3354–3363
109. Nguyen-Jackson, H.T. *et al.* (2012) G-CSF-activated STAT3 enhances production of the chemokine MIP-2 in bone marrow neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 92, 1215–1225



## Discussion

Dans ce travail de thèse, nous avons tenté de préciser le rôle des interférons de type I dans la dysfonction endothéliale au cours du choc septique ainsi que le rôle de leur voie de signalisation JAK-STAT, en soulignant les implications physiopathologiques et les perspectives de thérapies ciblées sur l'endothélium qui en découlent.

La première phase de notre travail a consisté à confirmer les données faisant état d'un rôle protecteur d'une inhibition des interférons de type I dans un modèle murin de choc septique. Ainsi, nous avons objectivé une amélioration du profil hémodynamique et du score de sévérité du sepsis murin bactérien chez les souris présentant un déficit global en récepteur IFNAR1 (*Ifnar1*<sup>-/-</sup>). Ces résultats sont cohérents avec les études antérieures ayant utilisé des souris *Ifnar1*<sup>-/-</sup>, qui ne développaient pas de choc septique. Cette protection a été observée à la fois dans les modèles murins de choc endotoxiques obtenus par injection de LPS (Karaghiosoff, et al. 2003; Mahieu, et al. 2006) et dans les modèles de choc septique secondaire à une péritonite (Weighardt, et al. 2006), similaires au protocole de ligature et perforation caecale que nous avons utilisé (Toscano, et al. 2011). Ces résultats sont également confortés par l'effet protecteur conféré par une inhibition pharmacologique des IFNs de type I (Dejager, et al. 2014).

De façon complémentaire, nous avons montré que l'inhibition d'IFNAR1 s'associe à une réduction de l'expression des gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, là aussi en accord avec la littérature, ce qui donne une validité extrinsèque au point de départ de nos résultats (Dejager, et al. 2014; Weighardt, et al. 2006). De façon notable, nous avons mis en évidence une réduction de l'expression des gènes pro-inflammatoires dans l'aorte des souris *Ifnar1*<sup>-/-</sup>, ce qui a

permis de montrer que cette amplification de l'inflammation, induite par les IFNs de type I, a lieu dans un tissu riche en endothélium vasculaire. Ceci a constitué une première étape pour suggérer un rôle significatif des IFNs de type I sur l'endothélium vasculaire, même à distance du processus locorégional de péritonite, c'est-à-dire systémique. Si les IFNs de type I sont connus pour aggraver la dysfonction endothéliale dans d'autres pathologies, telles que le lupus érythémateux systémique (Buie, et al. 2017; O'Neil, et al. 2019; Smith, et al. 2014) et l'athérosclérose (Chen, et al. 2020; Grenn, et al. 2017), il n'existait jusqu'alors, à notre connaissance, pas de données mettant en évidence un rôle spécifique des IFNs de type I sur la dysfonction endothéliale au cours du sepsis bactérien.

Poursuivant dans cette logique, nous avons montré que l'inhibition systémique d'IFNAR1 réduit l'expression des gènes associés à l'activation endothéliale au niveau du tissu aortique, *Icam-1* et *E-sélectine* étant sous-exprimés chez les souris *Ifnar1<sup>-/-</sup>*. Si la stimulation de l'expression des molécules d'adhésion par les interférons de types I et II a déjà été montrée sur les cellules endothéliales *in vitro* dans différentes conditions, incluant la stimulation par TNF, IL-1 et LPS (Buie, et al. 2017; Leeuwenberg, et al. 1992), il n'existe actuellement pas de données *in vivo* au cours du sepsis bactérien induit par CLP, ce qui renforce l'intérêt de ce travail chez la souris. On trouve seulement des arguments indirects en faveur d'une telle activation, avec notamment une expression endothéliale de VCAM-1 régulée par IRF1 chez la souris en réponse au LPS (Yan, et al. 2017). De la même façon, nous montrons chez les souris *Ifnar1<sup>-/-</sup>* une réduction de l'expression aortique de *Zonula occludens-1 (Zo-1)*, en faveur d'une réduction des lésions endothéliales, compte tenu de l'expression de *Zo-1* en réponse à l'atteinte des jonctions adhérentes de l'endothélium (Tornavaca, et al. 2015).

Ces résultats obtenus sur un macro-vaisseau, l'aorte, ont été également confortés par des qPCR réalisées sur des échantillons de reins de souris, montrant également une sous-expression des cytokines pro-inflammatoires et des marqueurs d'activation endothéliale chez les souris *Ifnar1<sup>-/-</sup>*. Les reins ont été choisis compte tenu de la richesse du parenchyme rénal en micro-vaisseaux et donc en endothélium, afin d'étendre ces résultats à la microcirculation.

Concernant la CIVD induite par le sepsis bactérien, on note une démonstration récente du rôle des interférons de type I dans la survenue de la coagulopathie induite par les bacilles Gram négatif, publiée par Yang *et al.* (Yang, et al. 2020). De façon intéressante et complémentaire à notre étude, Yang *et al.* montrent le rôle d'IFNAR1 dans l'initiation de la cascade de la coagulation, et donc davantage sur le versant hématologique de la coagulopathie, tandis que nous soulignons le rôle d'IFNAR1 dans l'activation et dans la dysfonction endothéliales, qui sont un des points de départ de cette coagulopathie. Yang *et al.* mettent en évidence chez les souris *Ifnar1<sup>-/-</sup>*, en réponse au LPS, une réduction de l'agrégation plaquettaire ainsi qu'une diminution de l'intensité du processus de coagulation, attestée par une réduction de la génération de thrombine, de fibrine et de D-dimères. De plus, une diminution des marqueurs de fibrinolyse est montrée chez les souris *Ifnar1<sup>-/-</sup>*, au sein desquelles les complexes TAT (thrombine-antithrombine) et le PAI-1 sont diminués. Confirmant ces résultats, nous montrons chez les souris *Ifnar1<sup>-/-</sup>* une diminution de l'expression endothéliale de PAI-1 sur le tissu aortique, attestée par les résultats de qPCR. Nos résultats concernant PAI-1 sont par ailleurs notre principal argument en faveur d'une réduction de la coagulopathie chez les souris *Ifnar1<sup>-/-</sup>*, notre travail s'étant intéressé en premier lieu à l'endothélium lui-même.

Concernant le modèle de choc septique que nous avons choisi (ligature et perforation caecale, CLP), celui-ci permet également de renforcer les résultats de Yang *et al.*, obtenus sur un modèle endotoxinique par injection de LPS. En effet, le choc septique par CLP est un modèle de choc septique plurimicrobien considéré comme plus proche de la physiopathologie du sepsis bactérien (Dejager, et al. 2011). D'une part, les LPS ne sont qu'un composant de la paroi bactérienne des bacilles Gram négatif, tandis que la péritonite induite par CLP est induite par des micro-organismes à part entière, incluant des bactéries de types cocci Gram positif, des bacilles Gram négatif et des germes anaérobies. D'autre part, l'injection de LPS provoque une production plus rapide et explosive de cytokines pro-inflammatoires, notamment IL-1, IL-6 et TNF, alors que la CLP entraîne, à l'instar du sepsis humain, un relargage moins intense, mais plus prolongé, de médiateurs pro-inflammatoires. Ces conditions plus fidèles au sepsis humain renforcent l'hypothèse d'un rôle des interférons de type I sur la dysfonction endothéliale au cours du sepsis chez l'Homme.

Parmi les limites de ce travail, on peut relever l'absence de confirmation de l'expression des molécules d'activation et de dysfonction endothéliale par une deuxième méthode.

Concernant les perspectives expérimentales, nous avons donc prévu de compléter ce travail sur l'endothélium par une analyse histologique de l'endothélium vasculaire chez les souris *Ifnar1<sup>-/-</sup>* vs. *Ifnar1<sup>+/+</sup>* au cours du choc septique. Pour ce faire, nous travaillons actuellement sur un immuno-marquage des molécules d'activation endothéliale, telles que VCAM-1, sur des coupes de tissus cardiaque, aortique, et rénal. La mise en évidence de VCAM-1 par Western Blot est également prévue.

Dans un deuxième temps, nous avons donc cherché à démontrer ce rôle des interférons de type I sur la dysfonction endothéliale chez les patients en choc septique. Devant l'impossibilité de travailler sur des échantillons tissulaires, contrairement à la souris, nous avons dû nous concentrer sur les études réalisables à partir de prélèvements sanguins, ce qui constitue une limite à ce travail chez l'Homme.

Comme première approche, nous avons choisi d'étudier les corrélations pouvant exister entre les interférons de type I et la CIVD, la CIVD étant fortement associée à la dysfonction endothéliale (Boisrame-Helms, et al. 2013). Nous avons dosé par ELISA les 3 types d'interférons, parmi lesquels les IFN- $\alpha$ , - $\alpha$ 1 et - $\beta$  pour les IFNs de type I, IFN- $\gamma$  (type II), et les IFN- $\lambda$ 1, - $\lambda$ 2, - $\lambda$ 3 pour les IFNs de type III. Les augmentations significatives chez les patients en CIVD, par comparaison aux patients indemnes de CIVD, ont concerné IFN- $\alpha$  (tous sous-types confondus) et son sous-type IFN- $\alpha$ 1. De façon notable, aucun autre des IFNs dosés n'a montré de différences significatives entre patients avec vs. sans CIVD. Les IFNs de types II et III ont donc servi de « dosages témoins » pour orienter vers une spécificité de la corrélation existant entre IFN- $\alpha$  et CIVD.

Très peu d'études cliniques se sont intéressées spécifiquement aux dosages des différents types et sous-types d'IFNs au cours du choc septique. En effet, les dosages d'IFNs de type I et d'IFN- $\gamma$  ont le plus souvent été réalisés au sein d'un panel plus large de cytokines pro-inflammatoires (Matsumoto, et al. 2018; Mera, et al. 2011). De plus, les dosages dans ces travaux ont souvent utilisé des techniques différentes, telles que les techniques de PCR multiplex (Mera, et al. 2011) ou encore des kits de

billes utilisées en cytométrie en flux (Matsumoto, et al. 2018), tandis que nous avons utilisé un kit ELISA spécifique pour chaque IFN.

Bien que nos taux d'IFN- $\gamma$  se trouvent dans des valeurs faibles -pour la plupart inférieures à 15 pg/mL- et similaires à l'étude de Matsumoto *et al.* (Matsumoto, et al. 2018), cette différence entre techniques utilisées peut en partie expliquer que nos taux médians d'IFN- $\alpha$  (546 pg/mL) soient plus élevés que les taux observés par Matsumoto *et al.*, qui sont de l'ordre de 100 pg/mL (Matsumoto, et al. 2018). Ainsi, au sein des cytokines dosées, Matsumoto *et al.* ne parviennent pas à établir de corrélation entre IFN- $\alpha$  et les scores de CIVD (JAAM et ISTH) ni avec le niveau plasmatique de PAI-1, compte tenu des faibles valeurs d'IFN- $\alpha$  mesurées (Matsumoto, et al. 2018).

Le dosage du sous-type IFN- $\alpha$ 1, que nous avons réalisé en utilisant un kit ELISA d'un fabricant différent, permet de conforter nos résultats et d'écartier l'hypothèse d'un biais d'origine technique qui aurait pu donner des dosages d'IFN- $\alpha$  faussement élevés. En effet, les taux médians d'IFN- $\alpha$ 1 ont indiqué des valeurs de l'ordre de 1/7 par rapport aux taux d'IFN- $\alpha$  et ce quel que soit le groupe de patients : avec et sans CIVD. Les différences statistiquement significatives entre ces deux groupes ont donc été observées pour IFN- $\alpha$ 1, comme pour IFN- $\alpha$ , mais pour aucun autre type d'IFN, ce qui renforce l'hypothèse d'un lien entre coagulopathie et IFNs de type I.

Par ailleurs, les différences significatives de taux d'IFN- $\alpha$ / $\alpha$ 1 que nous avons obtenues en comparant les patients avec et sans CIVD peuvent aussi s'expliquer par l'effectif de notre population et par le type de micro-organismes majoritaires.

En effet, notre cohorte de 65 patients en choc septique est de taille supérieure à la plupart des études prospectives ayant réalisé des dosages d'interférons de types I et II, et dont les effectifs sont de 31 et 30 patients, respectivement (Matsumoto, et al.

2018; Mera, et al. 2011). Notre effectif, par ailleurs réparti de façon volontairement équilibrée entre CIVD (n=32) et non-CIVD (n=33), peut donc avoir conféré une plus grande puissance statistique.

Concernant le type de germes majoritaires, notre population comporte un taux élevé d'infections à bacilles Gram négatif (43%), du même ordre que celui de l'étude française EPISS (Quenot, et al. 2013), mais plus élevé que d'autres cohortes de patients en choc septique ayant étudié la CIVD (Lyons, et al. 2018). Ce taux élevé d'infections à bacilles Gram négatif peut lui aussi contribuer à une expression plus élevée d'IFN- $\alpha$ . En effet, dans notre cohorte, les taux les plus élevés d'IFN- $\alpha$  (et surtout d'IFN- $\alpha$ 1) sont observés chez les patients infectés par des bacilles Gram négatif. Cette observation est cohérente avec les observations *in vitro* mettant en évidence la capacité des LPS à induire la sécrétion d'IFN- $\alpha$  par les cellules immunitaires (Hillyer, et al. 2012) et par les expériences *in vivo* chez la souris montrant l'activation d'IFNAR par les LPS (Yang, et al. 2020). De plus, il a été montré que les LPS des bacilles Gram négatif stimulent plus particulièrement l'expression d'IFN- $\alpha$ 1 par les leucocytes (Hillyer, et al. 2012).

De façon complémentaire, nous avons dosé les cytokines pro-inflammatoires IL-1 et IL-6, pour lesquelles nous n'avons pas observé de corrélation franche avec la CIVD. A noter que l'IL-1 plasmatique était en général à un taux très faible, voire indétectable, ce qui est fréquemment rapporté dans le sepsis (Damas, et al. 1992). Cependant, IL-1 et IL-6 ont montré leurs capacités à déclencher la cascade de la coagulation *in vitro*, en particulier *via* la voie extrinsèque par expression endothéliale du facteur tissulaire (Herbert, et al. 1992; Nawroth, et al. 1986; Neumann, et al. 1997) et *in vivo*, avec induction de la formation de thrombine et de complexes thrombine-antithrombine III (Jansen, et al. 1995; Stouthard, et al. 1996). Il faut noter que plusieurs



études ont mis en évidence des taux plasmatiques d'IL-6 corrélés à la gravité chez l'Homme (Damas, et al. 1992). La CIVD touchant des patients de gravité plus importante, certaines études ont montré une augmentation des taux d'IL-1 et d'IL-6 de façon corrélée à la fois à la gravité, attestée par le score SOFA, et aux scores JAAM-DIC et ISTH (Matsumoto, et al. 2018) et il est probable que les taux d'IL-6 reflètent avant tout la gravité des patients. Néanmoins, l'expression d'IL-6 peut être amplifiée par les IFNs de type I (Zimmermann, et al. 2016), dont le rôle est donc possible dans cette surexpression d'IL-6 chez les patients atteints de CIVD dans l'étude de Matsumoto *et al.*

De façon intéressante, les taux d'IFN- $\alpha$ 1 n'étaient pas corrélés à la gravité de nos patients, ce qui permet de proposer l'hypothèse d'un rôle propre des IFNs sur la CIVD chez l'Homme. A notre connaissance, aucun dosage au cours du choc septique chez l'Homme n'a mis en évidence de corrélation entre IFNs et CIVD jusqu'à ce jour, y compris avec les IFNs de type I. Afin d'explorer cette hypothèse d'un rôle des IFNs de type I sur la CIVD, nous nous sommes intéressés aux rapports pouvant exister entre IFNs de type I et dysfonction endothéliale, la CIVD n'étant qu'un marqueur indirect de dysfonction endothéliale.

Cette tâche était rendue difficile par l'impossibilité de travailler sur du matériel tissulaire. Nous avons donc décidé de travailler sur les microparticules endothéliales circulantes, dans le plasma des patients en choc septique. Notre travail a ainsi établi une corrélation entre les taux plasmatiques d'IFN- $\alpha$ /- $\alpha$ 1 d'une part, et de microparticules circulantes exprimant le CD105 d'autre part. Les microparticules exprimant le CD105 étant dérivées des cellules endothéliales activées (Deng, et al. 2017), cette corrélation est un argument majeur quant à l'implication potentielle des IFN- $\alpha$ /- $\alpha$ 1 dans l'activation endothéliale chez l'Homme. Cette corrélation n'était pas

retrouvée avec les autres types d'IFNs. Là aussi, la présence d'une corrélation à la fois avec le taux global d'IFN- $\alpha$  et avec le taux d'IFN- $\alpha$ 1 renforce la validité de nos résultats et tend à éliminer un biais d'origine technique.

Parmi les autres microparticules dosées (CD11a et CD31), celles exprimant le CD11a, émanant des leucocytes activés par l'endothélium, sont également corrélées à la présence d'une CIVD (Delabranche, et al. 2013), ce qui renforce l'idée d'une activation endothéliale en lien avec la surexpression d'IFN- $\alpha$ / $\alpha$ 1 et dont la CIVD serait une conséquence. En revanche, les microparticules exprimant le CD31, qui sont davantage exprimées en contexte d'apoptose des cellules endothéliales (Werner, et al. 2006), ne sont pas corrélées à la présence d'une CIVD (Delabranche, et al. 2013). De façon cohérente, on remarque donc que les IFN- $\alpha$ / $\alpha$ 1 sont corrélés aux microparticules associées à la présence d'une CIVD : CD105 et CD11a (Delabranche, et al. 2013).

Dans un troisième temps, nous avons souhaité étudier l'importance de la part endothéliale dans les résultats obtenus par l'inhibition des IFNs de type I. En parallèle aux travaux portant sur les souris *Ifnar1*<sup>-/-</sup>, nous avons généré des souris porteuses d'une délétion conditionnelle tissu-spécifique par le système Cre/loxP. Nous avons utilisé une lignée exprimant la CreERT2 sous le contrôle du promoteur de la VE-cadhérine (*vascular endothelial cadherin*, également appelée cadhérine 5 ou *Cdh5*) au niveau des cellules endothéliales (Harris and Nelson 2010). Dans cette lignée, l'activation de la protéine CreERT2 exprimée par les cellules endothéliales est inducible par le tamoxifène. En effet, l'enzyme recombinase Cre est couplée au domaine de liaison des ligands modifié du récepteur des œstrogènes, de telle façon

que seul le tamoxifène (et non les oestrogènes endogènes) puisse fixer ce domaine de liaison des ligands (Feil, et al. 1997), d'où le nom de CreERT2 (*estrogen receptor tamoxifen 2*). La fixation du tamoxifène par ERT2 permet la translocation de la recombinaise Cre dans le noyau et sa fixation à l'ADN, ce qui va permettre l'excision des séquences flanquées d'une séquence loxp reconnue par la recombinaise Cre. Cette lignée *Cdh5(PAC)-CreERT2* permet donc une délétion tissu-dépendante (expression de la Cre sous le contrôle d'un promoteur endothélial) et temps-dépendante (inductible par tamoxifène) des gènes d'intérêt.

Cette lignée *Cdh5(PAC)-CreERT2*, utilisée par l'équipe du Professeur Ralf H Adams (Wang, et al. 2010b), a montré une expression de la protéine Cre-ERT2 très spécifique des cellules endothéliales, ce qui a motivé notre choix par rapport à d'autres modèles « Cre » permettant de cibler un gène au niveau du tissu endothélial. Par exemple, dans le modèle constitutif *Tie2-Cre* (Kisanuki, et al. 2001), l'expression de la recombinaise Cre n'est pas limitée au tissu endothélial, une expression par les cellules hématopoïétique ayant également été rapportée (Tang, et al. 2010). De plus, un modèle constitutif (et donc non inductible par tamoxifène) aurait pu poser le problème d'une sous-expression d'une protéine importante pour le développement endothélial des souris avant l'âge adulte.

Nous avons croisé cette lignée *Cdh5(PAC)-CreERT2* avec deux lignées de souris différentes obtenues auprès du Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy (CIML) : une première lignée (B6.129-*Ifnar1<sup>tm1Uka</sup>*) présentant une version « floxée » du gène *Ifnar1* et une deuxième lignée « floxée » pour le gène STAT1 (B6-*Stat1<sup>tm1c(EUCOMM)Wtsi</sup>*). Ces deux lignées différentes ont permis d'explorer d'une part l'effet d'une inhibition des interférons de type I ciblée sur l'endothélium (par inactivation

d'*Ifnar1*) et d'autre part l'effet d'une inhibition de leur voie de signalisation par neutralisation ciblée de *Stat1*.

Les deux lignées de souris ainsi obtenues par croisement ont toutes deux montré un niveau de protection partielle face au choc septique induit par péritonite, confirmant l'importance physiopathologique des IFNs de type I et de leur voie de signalisation spécifiquement au niveau de l'endothélium. Concernant les souris STAT1 floxées, nous avons pu vérifier que l'inactivation de *Stat1* au niveau endothélial suffit à réduire l'expression des médiateurs pro-inflammatoires, et ce de façon moins prononcée que pour les souris *Ifnar1*<sup>-/-</sup>. Ainsi, IL-6 est surexprimée d'un facteur proche de 200 chez les souris *Ifnar1*<sup>wt</sup> par rapport aux souris *Ifnar1*<sup>-/-</sup>, tandis que cette surexpression est environ d'un facteur 100 chez les souris *Stat1*<sup>wt</sup> par rapport aux souris *Stat1*<sup>fl/fl</sup>. Cet aspect moins marqué de la différence d'expression chez les souris *Stat1*<sup>fl/fl</sup> est cohérent avec le caractère ciblé sur l'endothélium de l'inactivation du gène d'intérêt.

De façon intéressante et attendue, la sous-expression des gènes relatifs à l'activation endothéliale et à la dysfonction endothéliale est tout aussi marquée chez les souris *Stat1*<sup>fl/fl</sup> que chez les souris *Ifnar1*<sup>-/-</sup>. Concernant PAI-1, on note même une différence d'expression d'un facteur proche de 200 pour les souris *Stat1*<sup>fl/fl</sup> vs 5 pour les souris *Ifnar1*<sup>-/-</sup>, ce qui tend à souligner l'importance de STAT1 dans l'activation de la coagulation en lien avec la dysfonction endothéliale.

Là aussi, l'analyse par RT-qPCR est actuellement le seul élément dont nous disposons dans ce travail pour analyser l'activation et la dysfonction endothéliales, ce qui constitue une limite. De façon similaire aux souris *Ifnar1*<sup>-/-</sup>, nous avons prévu d'approfondir ces résultats par une analyse histologique de l'endothélium vasculaire

au niveau des tissus cardiaque, aortique et rénal, avec immunomarquage de molécules témoins de l'activation endothéliale, telles que VCAM-1. La mise en évidence de VCAM-1 par Western Blot est également en cours d'élaboration.

Ces résultats sur la voie JAK-STAT revêtent une importance majeure, en raison de l'élargissement des possibilités thérapeutiques qui en découlent. En effet, alors que les inhibiteurs d'IFNAR1 développés dans le cadre de la recherche clinique sur le lupus érythémateux systémique (Morand, et al. 2020) ne sont pas encore commercialisés chez l'Homme, les inhibiteurs de la voie JAK-STAT (*jakinibs*) offrent un arsenal thérapeutique de grande ampleur (cf. introduction). Une des limites de notre travail est l'absence d'utilisation des *jakinibs* dans notre modèle murin de choc septique par CLP, utilisation qui aurait été intéressante afin de déterminer si une inhibition pharmacologique de STAT1 confère la même protection qu'une délétion de *Stat1*. Toutefois, malgré l'effet protecteur conféré par la délétion complète de *Stat1* sur modèle murin de choc septique par CLP (Herzig, et al. 2012) et la démonstration d'un rôle protecteur du ruxolitinib administré par voie systémique sur un modèle murin de sepsis à *Candida albicans* (Tsirigotis, et al. 2015), il a également été montré que le timing de l'administration et la dose de *jakinib* utilisée peut totalement changer l'efficacité du traitement au cours du sepsis. En effet, l'administration de ruxolitinib un jour après le début de l'infection, à la dose de 6,25 mg/kg, est associée à une meilleure survie, et à une réduction du processus hyper-inflammatoire, tandis qu'une administration un jour avant l'infection est associée à une surmortalité, par immunosuppression (Tsirigotis, et al. 2015).

Ainsi, l'inhibition systémique de STAT1, bien qu'intéressante, est trop risquée chez l'Homme, en l'état actuel des connaissances, en raison de l'immunosuppression conférée. D'où l'intérêt de la démonstration du rôle protecteur de l'inhibition de *Stat1*

de façon ciblée sur l'endothélium. Il restait à montrer qu'une approche thérapeutique crédible, ciblée sur l'endothélium, pouvait en découler. Nous avons alors montré dans notre revue de la littérature, à partir des exemples existants de *jakinibs* couplés à des nanoparticules thérapeutiques d'une part (Ansari and Alshahrani 2019; Boca, et al. 2017) et de traitement immunomodulateurs ciblant l'endothélium *via* CD31 d'autre part (Tietjen, et al. 2017), la faisabilité de thérapeutiques basées sur l'inhibition de la voie JAK-STAT et ciblées sur l'endothélium.

La possibilité de créer des nanoparticules incorporant des *jakinibs* permet par ailleurs de contourner un problème que pourraient poser des nanoparticules couplées à un anti-IFNAR1 de forte affinité, tel que l'anifrolumab. En effet, cette forte affinité pourrait entraîner une fixation de la molécule thérapeutique aux récepteurs IFNAR de façon ubiquitaire, indépendamment du ciblage cellulaire de la nanoparticule, posant le problème de l'efficacité et de la spécificité du ciblage à l'endothélium vasculaire. Cet inconvénient potentiel est contourné par l'utilisation des *jakinibs*, qui se fixent à des molécules intracellulaires, qui sont peu susceptibles d'affecter le ciblage.

L'intérêt d'une stratégie immunomodulatrice ciblée sur l'endothélium a déjà été montré chez la souris, ce qui conforte notre hypothèse de travail centrée sur le tissu endothélial. En effet, une inhibition de NF- $\kappa$ B ciblée sur l'endothélium a été réalisée par Ye *et al.* (Ye, et al. 2008) sur des souris transgéniques (EC-rtTA/I- $\kappa$ B $\alpha$  mt) exprimant I- $\kappa$ B $\alpha$  (*nuclear factor of  $\kappa$  light polypeptide gene enhancer in B-cell inhibitor,  $\alpha$* ) spécifiquement sur les cellules endothéliales sous le contrôle de la doxycycline, I- $\kappa$ B $\alpha$  étant un inhibiteur de NF- $\kappa$ B. Il a été montré que cette inhibition de NF- $\kappa$ B ciblée sur l'endothélium a un effet protecteur au cours du choc septique chez la souris, à la fois dans le modèle reposant sur la CLP et dans le choc endotoxinique induit par l'injection de LPS (Ding, et al. 2009). Cette protection se traduit par une amélioration

significative de la pression artérielle, en lien avec une moindre expression de iNOS, chez les souris mutées.

L'intérêt de ces stratégies ciblées sur l'endothélium est renforcé par l'importance de maintenir la fonctionnalité des cellules immunitaires au cours du sepsis. En effet, toutes les thérapies immunosuppressives à effet systémique ont échoué dans le choc septique jusqu'à ce jour, au cours des essais cliniques chez l'Homme, à l'exemple des anti-TNF (Abraham, et al. 1998; Abraham, et al. 1995; Cohen and Carlet 1996) et des antagonistes du récepteur de l'IL-1 (Fisher, et al. 1994; Opal, et al. 1997). En effet, aucune amélioration significative de la survie à J28 n'a pu être démontrée. Une des explications avancées est que l'inhibition des défenses immunitaires à un moment clé de la lutte contre l'agent pathogène s'avère *in fine* préjudiciable à l'hôte (Grimaldi, et al. 2016).





## **Conclusion et perspectives**

Le sepsis bactérien se caractérise par une dysfonction de la réponse immunitaire en réponse à une infection. La réponse hyper-inflammatoire initiale fait intervenir de nombreux médiateurs et cytokines pro-inflammatoires qui exercent une action sur les cellules immunitaires, mais également sur les cellules endothéliales qui se comportent comme des cellules immunitaires conditionnelles. L'activation et la dysfonction endothéliale induites jouent un rôle majeur dans la défaillance multi-viscérale et dans la survenue d'une coagulopathie, dont le stade extrême est la coagulation intravasculaire disséminée. Malgré les nombreux travaux sur le sujet, le rôle respectif des différents médiateurs pro-inflammatoires sur l'endothélium au cours du sepsis reste encore mal connu. Parmi ces médiateurs pro-inflammatoires, les interférons de type I, initialement découverts dans le cadre de l'immunité antivirale, montrent d'année en année davantage d'implications dans le sepsis.

Dans ce contexte, et partant du constat de leur rôle dans la dysfonction endothéliale au cours d'autres pathologies, en particulier l'athérosclérose et le lupus érythémateux systémique, notre travail a permis de déterminer l'implication des interférons de type I dans la dysfonction endothéliale au cours du sepsis. Nous avons montré cette implication des IFNs de type I dans la dysfonction endothéliale chez l'animal et chez l'Homme, permettant d'apporter des éléments physiopathologiques nouveaux, en vue de déterminer des axes de recherche thérapeutique innovants dans le sepsis. Afin de renforcer ces perspectives, nous avons conforté ces résultats en montrant chez l'animal des résultats similaires concernant STAT1, composant essentiel de la voie de signalisation des IFNs de type I.

Nous avons ainsi démontré, chez l'animal, que l'inhibition complète du récepteur des IFNs de type I, IFNAR, est associé non seulement à une diminution de la mortalité et de l'hyper-inflammation initiale, mais également à une réduction des marqueurs d'activation et de dysfonction endothéliale. Cette réduction de la dysfonction endothéliale s'accompagne d'une amélioration significative du profil hémodynamique et de modifications de l'expression des marqueurs de coagulopathie, notamment PAI-1, en faveur d'une protection chez les souris n'exprimant pas IFNAR1.

Ces résultats sont étayés, chez l'Homme, par la démonstration d'un lien existant entre IFN- $\alpha$  et coagulation intravasculaire disséminée d'une part, et avec la présence de microparticules d'origine endothéliale d'autre part. Ces deux éléments attestent d'une activation et d'une dysfonction endothéliale significativement plus marquée chez les patients présentant des taux plus élevés d'IFN- $\alpha$ .

Enfin, dernière étape de ce travail de thèse, nous avons évalué l'effet d'une inhibition des interférons de type I, ciblée sur l'endothélium vasculaire, sur modèle murin de choc septique. Nous avons étudié à la fois l'effet d'un déficit en récepteur IFNAR ciblé sur l'endothélium, et l'effet d'un déficit en STAT1, STAT1 faisant partie de la voie de signalisation d'IFNAR, également de façon ciblée sur l'endothélium. Dans les deux cas, nous avons montré, pour la première fois, qu'une inhibition des interférons de type I, ou de leur voie de signalisation, de façon ciblée sur l'endothélium, est associée à un meilleur pronostic au cours du sepsis murin. Nous avons également montré que cette inhibition ciblée est capable de réduire la dysfonction endothéliale au cours du choc septique, répondant à la question posée par ce travail de thèse.

Concernant les perspectives thérapeutiques, nous avons en parallèle montré à partir de molécules existantes une stratégie techniquement réalisable, et capable de cibler l'endothélium vasculaire *via* l'utilisation de nanoparticules thérapeutiques de haute affinité pour CD31 (Clere-Jehl, et al. 2020), protéine fortement exprimée par les cellules endothéliales. De telles nanoparticules peuvent être couplées à différents types de traitements immunomodulateurs, dont les inhibiteurs d'IFNAR et les *jakinibs*, les *jakinibs* semblant plus à même de respecter le ciblage endothélial. Cette stratégie pourrait permettre d'obtenir une inhibition pharmacologique des interférons de type I de façon ciblée sur l'endothélium, de façon similaire à nos souris de type Cre/loxp.

Ainsi, la mise au point de telles nanoparticules ouvre en premier lieu des perspectives de recherche, tout d'abord expérimentales chez la souris, chez qui nous envisageons de mettre au point et de tester de telles thérapeutiques au cours du sepsis et dans un second temps chez l'Homme. Certains types de nanoparticules couplées à d'autres thérapeutiques ayant déjà reçu une autorisation de mise sur le marché par les autorités sanitaires, nous avons pour but de développer nos nanoparticules à partir de modèles ayant déjà montré leur innocuité chez l'Homme.

De plus, ces nanoparticules thérapeutiques visant l'endothélium sont une stratégie innovante qui permettrait de renforcer les connaissances physiopathologiques dans plusieurs pathologies impliquant d'endothélium vasculaire. Ainsi, si l'intérêt de mettre au point une nanoparticule dotée d'une capacité immunomodulatrice et ciblée sur l'endothélium est souligné concernant le sepsis dans ce travail de thèse, cette même stratégie ouvre d'autres perspectives de recherche et de thérapeutiques dans des pathologies où la dysfonction endothéliale joue un rôle-clé, telles que l'athérosclérose, les maladies auto-immunes, en particulier le lupus érythémateux systémique, ou encore les pathologies néoplasiques.

## REFERENCES

- Abraham, E., et al.  
1998 Double-blind randomised controlled trial of monoclonal antibody to human tumour necrosis factor in treatment of septic shock. NORASEPT II Study Group. *Lancet* 351(9107):929-33.
- Abraham, E., et al.  
1995 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* 273(12):934-41.
- Ahmad, S., et al.  
1997 Transforming growth factor-beta negatively modulates T-cell responses in sepsis. *FEBS Lett* 402(2-3):213-8.
- Ahmed, D., et al.  
2018 Transcriptional Profiling Suggests Extensive Metabolic Rewiring of Human and Mouse Macrophages during Early Interferon Alpha Responses. *Mediators Inflamm* 2018:5906819.
- Akaike, T., and H. Maeda  
2000 Nitric oxide and virus infection. *Immunology* 101(3):300-8.
- Alazawi, W., et al.  
2013 Stat2 loss leads to cytokine-independent, cell-mediated lethality in LPS-induced sepsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(21):8656-61.
- Altare, Frédéric  
2001 IL-12 et interféron gamma : un axe clé de l'immunité anti-mycobactérienne chez l'Homme. *Médecine et sciences* 17:1112-1119.
- Angus, D. C., and T. van der Poll  
2013 Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 369(9):840-51.
- Annane, D., et al.  
2003 Current epidemiology of septic shock: the CUB-Rea Network. *Am J Respir Crit Care Med* 168(2):165-72.
- Ansari, M. J., and S. M. Alshahrani  
2019 Nano-encapsulation and characterization of baricitinib using poly-lactic-glycolic acid co-polymer. *Saudi Pharm J* 27(4):491-501.
- Arango Duque, G., and A. Descoteaux  
2014 Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol* 5:491.
- Asselin-Paturel, C., et al.  
2005 Type I interferon dependence of plasmacytoid dendritic cell activation and migration. *J Exp Med* 201(7):1157-67.

- Auger, Cyril  
2014 Potential of polyphenols to improve vascular health by stimulating the endothelial function. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*. 49(4):160-172.
- Back, M.  
2007 Leukotriene receptors: crucial components in vascular inflammation. *ScientificWorldJournal* 7:1422-39.
- Badr, K. F.  
1992 Sepsis-associated renal vasoconstriction: potential targets for future therapy. *Am J Kidney Dis* 20(3):207-13.
- Baglia, F. A., et al.  
2002 Factor XI binding to the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex promotes factor XI activation by thrombin. *J Biol Chem* 277(3):1662-8.
- Bakhtiari, K., et al.  
2004 Prospective validation of the International Society of Thrombosis and Haemostasis scoring system for disseminated intravascular coagulation. *Crit Care Med* 32(12):2416-21.
- Balachandran, S., et al.  
1998 Activation of the dsRNA-dependent protein kinase, PKR, induces apoptosis through FADD-mediated death signaling. *EMBO J* 17(23):6888-902.
- Beaulieu, L. M., and J. E. Freedman  
2010 The role of inflammation in regulating platelet production and function: Toll-like receptors in platelets and megakaryocytes. *Thromb Res* 125(3):205-9.
- Benci, J. L., et al.  
2019 Opposing Functions of Interferon Coordinate Adaptive and Innate Immune Responses to Cancer Immune Checkpoint Blockade. *Cell* 178(4):933-948 e14.
- Benci, J. L., et al.  
2016 Tumor Interferon Signaling Regulates a Multigenic Resistance Program to Immune Checkpoint Blockade. *Cell* 167(6):1540-1554 e12.
- Bergstrom, B., et al.  
2015 TLR8 Senses Staphylococcus aureus RNA in Human Primary Monocytes and Macrophages and Induces IFN-beta Production via a TAK1-IKKbeta-IRF5 Signaling Pathway. *J Immunol* 195(3):1100-11.
- Bhat, P., et al.  
2017 Interferon-gamma derived from cytotoxic lymphocytes directly enhances their motility and cytotoxicity. *Cell Death Dis* 8(6):e2836.
- Bisbal, C., and T. Salehzada

- 2008 [RNase L, a crucial mediator of innate immunity and other cell functions]. *Med Sci (Paris)* 24(10):859-64.
- Blair, P., et al.  
2009 Stimulation of Toll-like receptor 2 in human platelets induces a thromboinflammatory response through activation of phosphoinositide 3-kinase. *Circ Res* 104(3):346-54.
- Blum, J. S., P. A. Wearsch, and P. Cresswell  
2013 Pathways of antigen processing. *Annu Rev Immunol* 31:443-73.
- Boca, S., et al.  
2017 Ruxolitinib-conjugated gold nanoparticles for topical administration: An alternative for treating alopecia? *Med Hypotheses* 109:42-45.
- Boettcher, S., et al.  
2014 Endothelial cells translate pathogen signals into G-CSF-driven emergency granulopoiesis. *Blood* 124(9):1393-403.
- Boffa, J. J., et al.  
2004 Thromboxane receptor mediates renal vasoconstriction and contributes to acute renal failure in endotoxemic mice. *J Am Soc Nephrol* 15(9):2358-65.
- Boisrame-Helms, J., et al.  
2013 Endothelial dysfunction in sepsis. *Curr Vasc Pharmacol* 11(2):150-60.
- Boisvert, M., and N. H. Shoukry  
2016 Type III Interferons in Hepatitis C Virus Infection. *Front Immunol* 7:628.
- Bombeli, T., B. R. Schwartz, and J. M. Harlan  
1998 Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alpha5beta3 integrin, and GPIIb/IIIa. *J Exp Med* 187(3):329-39.
- Bosmann, M., and P. A. Ward  
2013 The inflammatory response in sepsis. *Trends Immunol* 34(3):129-36.
- Bouis, D., et al.  
2019 Severe combined immunodeficiency in stimulator of interferon genes (STING) V154M/wild-type mice. *J Allergy Clin Immunol* 143(2):712-725 e5.
- Boxx, G. M., and G. Cheng  
2016 The Roles of Type I Interferon in Bacterial Infection. *Cell Host Microbe* 19(6):760-9.
- Broggi, A., et al.

- 2020 Type III interferons disrupt the lung epithelial barrier upon viral recognition. *Science* 369(6504):706-712.
- Buie, J. J., et al.  
2017 IFN-alpha Negatively Regulates the Expression of Endothelial Nitric Oxide Synthase and Nitric Oxide Production: Implications for Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol* 199(6):1979-1988.
- Burchill, M. A., et al.  
2007 IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 178(1):280-90.
- Carrero, J. A., B. Calderon, and E. R. Unanue  
2004 Type I interferon sensitizes lymphocytes to apoptosis and reduces resistance to *Listeria* infection. *J Exp Med* 200(4):535-40.
- Castiglia, V., et al.  
2016 Type I Interferon Signaling Prevents IL-1beta-Driven Lethal Systemic Hyperinflammation during Invasive Bacterial Infection of Soft Tissue. *Cell Host Microbe* 19(3):375-87.
- Cauwels, A., et al.  
2018 A safe and highly efficient tumor-targeted type I interferon immunotherapy depends on the tumor microenvironment. *Oncoimmunology* 7(3):e1398876.
- Chang, C. I., J. C. Liao, and L. Kuo  
2001 Macrophage arginase promotes tumor cell growth and suppresses nitric oxide-mediated tumor cytotoxicity. *Cancer Res* 61(3):1100-6.
- Chanut, R., and V. Petrilli  
2019 [Cytosolic DNA sensing by the cGAS-STING pathway in cancer]. *Med Sci (Paris)* 35(6-7):527-534.
- Chawla-Sarkar, M., D. W. Leaman, and E. C. Borden  
2001 Preferential induction of apoptosis by interferon (IFN)-beta compared with IFN-alpha2: correlation with TRAIL/Apo2L induction in melanoma cell lines. *Clin Cancer Res* 7(6):1821-31.
- Chen, H. J., S. W. Tas, and M. P. J. de Winther  
2020 Type-I interferons in atherosclerosis. *J Exp Med* 217(1).
- Chen, W., et al.  
2019 DNA Sensor IFI204 Contributes to Host Defense Against *Staphylococcus aureus* Infection in Mice. *Front Immunol* 10:474.
- Chetoui, N., et al.  
2010 Interleukin-7 promotes the survival of human CD4+ effector/memory T cells by up-regulating Bcl-2 proteins and activating the JAK/STAT signalling pathway. *Immunology* 130(3):418-26.
- Chousterman, B. G., F. K. Swirski, and G. F. Weber



- 2017 Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Semin Immunopathol* 39(5):517-528.
- Chung, H., et al.  
2018 Human ADAR1 Prevents Endogenous RNA from Triggering Translational Shutdown. *Cell* 172(4):811-824 e14.
- Cirulis, M. M., et al.  
2019 The peripheral blood transcriptome in septic cardiomyopathy: an observational, pilot study. *Intensive Care Med Exp* 7(1):57.
- Clark, Daniel  
2012 Interferon and apoptosis in systemic lupus erythematosus. *In Systemic lupus erythematosus*. H. Almoallim, ed.
- Clere-Jehl, R., et al.  
2020 JAK-STAT Targeting Offers Novel Therapeutic Opportunities in Sepsis. *Trends Mol Med*.
- Cohen, J.  
2002 The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420(6917):885-91.
- Cohen, J., and J. Carlet  
1996 INTERSEPT: an international, multicenter, placebo-controlled trial of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor-alpha in patients with sepsis. International Sepsis Trial Study Group. *Crit Care Med* 24(9):1431-40.
- Cohney, S. J., et al.  
1999 SOCS-3 is tyrosine phosphorylated in response to interleukin-2 and suppresses STAT5 phosphorylation and lymphocyte proliferation. *Mol Cell Biol* 19(7):4980-8.
- Colucci-Guyon, E., et al.  
2011 Strategies of professional phagocytes in vivo: unlike macrophages, neutrophils engulf only surface-associated microbes. *J Cell Sci* 124(Pt 18):3053-9.
- Cooper, M. A., M. Colonna, and W. M. Yokoyama  
2009 Hidden talents of natural killers: NK cells in innate and adaptive immunity. *EMBO Rep* 10(10):1103-10.
- Cull, V. S., et al.  
2003 Type I interferon differential therapy for erythroleukemia: specificity of STAT activation. *Blood* 101(7):2727-35.
- Curtsinger, J. M., et al.  
2012 Autocrine IFN-gamma promotes naive CD8 T cell differentiation and synergizes with IFN-alpha to stimulate strong function. *J Immunol* 189(2):659-68.
- Dalod, M., et al.

- 2014 Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming. *EMBO J* 33(10):1104-16.
- Dalod, M., et al.  
2003 Dendritic cell responses to early murine cytomegalovirus infection: subset functional specialization and differential regulation by interferon alpha/beta. *J Exp Med* 197(7):885-98.
- Damas, P., et al.  
1992 Cytokine serum level during severe sepsis in human IL-6 as a marker of severity. *Ann Surg* 215(4):356-62.
- De Backer, D., et al.  
2002 Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 166(1):98-104.
- Dejager, L., et al.  
2011 Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? *Trends Microbiol* 19(4):198-208.
- Dejager, L., et al.  
2014 Pharmacological inhibition of type I interferon signaling protects mice against lethal sepsis. *J Infect Dis* 209(6):960-70.
- Delabranche, X., et al.  
2013 Microparticles are new biomarkers of septic shock-induced disseminated intravascular coagulopathy. *Intensive Care Med* 39(10):1695-703.
- Delabranche, X., J. Helms, and F. Meziani  
2017 Immunohaemostasis: a new view on haemostasis during sepsis. *Ann Intensive Care* 7(1):117.
- Delabranche, X., et al.  
2016 Early Detection of Disseminated Intravascular Coagulation During Septic Shock: A Multicenter Prospective Study. *Crit Care Med* 44(10):e930-9.
- Delano, M. J., and P. A. Ward  
2016 The immune system's role in sepsis progression, resolution, and long-term outcome. *Immunol Rev* 274(1):330-353.
- Deng, F., S. Wang, and L. Zhang  
2017 Endothelial microparticles act as novel diagnostic and therapeutic biomarkers of circulatory hypoxia-related diseases: a literature review. *J Cell Mol Med* 21(9):1698-1710.
- Denis, Cécile  
2001 Plaquettes et endothélium : un mariage de raison. *Médecine et sciences* 17:252-255.
- Denny, M. F., et al.

- 2007 Interferon-alpha promotes abnormal vasculogenesis in lupus: a potential pathway for premature atherosclerosis. *Blood* 110(8):2907-15.
- Dhainaut, J. F., et al.  
2004 Treatment effects of drotrecogin alfa (activated) in patients with severe sepsis with or without overt disseminated intravascular coagulation. *J Thromb Haemost* 2(11):1924-33.
- Diamond, M. S., et al.  
2011 Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors. *J Exp Med* 208(10):1989-2003.
- Dickson, P. V., et al.  
2007 Continuous delivery of IFN-beta promotes sustained maturation of intratumoral vasculature. *Mol Cancer Res* 5(6):531-42.
- Ding, J., et al.  
2009 A pivotal role of endothelial-specific NF-kappaB signaling in the pathogenesis of septic shock and septic vascular dysfunction. *J Immunol* 183(6):4031-8.
- Doring, Y., O. Soehnlein, and C. Weber  
2017 Neutrophil Extracellular Traps in Atherosclerosis and Atherothrombosis. *Circ Res* 120(4):736-743.
- Doughty, L., et al.  
2001 A role for IFN-alpha beta in virus infection-induced sensitization to endotoxin. *J Immunol* 166(4):2658-64.
- Drechsler, M., et al.  
2010 Hyperlipidemia-triggered neutrophilia promotes early atherosclerosis. *Circulation* 122(18):1837-45.
- Duncan, S. A., et al.  
2017 SOCS Proteins as Regulators of Inflammatory Responses Induced by Bacterial Infections: A Review. *Front Microbiol* 8:2431.
- Durand, Geneviève  
1992 Les sélectines et leur rôle dans l'interaction des leucocytes avec les cellules endothéliales. *Médecine et Sciences*. 8:1051-1056.
- Durbin, J., et al.  
2003 The role of STAT1 in viral sensitization to LPS. *J Endotoxin Res* 9(5):313-6.
- Enomoto, H., et al.  
2017 The in vivo antitumor effects of type I-interferon against hepatocellular carcinoma: the suppression of tumor cell growth and angiogenesis. *Sci Rep* 7(1):12189.
- Feil, R., et al.  
1997 Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun* 237(3):752-7.

- Feletou, M.  
2016 Endothelium-Dependent Hyperpolarization and Endothelial Dysfunction. *J Cardiovasc Pharmacol* 67(5):373-87.
- Feletou, M., et al.  
2003 [Communication between endothelial and smooth muscle cells]. *Med Sci (Paris)* 19(12):1242-50.
- Finfer, S., and F. R. Machado  
2016 The Global Epidemiology of Sepsis. Does It Matter That We Know So Little? *Am J Respir Crit Care Med* 193(3):228-30.
- Fisher, A. B.  
2009 Redox signaling across cell membranes. *Antioxid Redox Signal* 11(6):1349-56.
- Fisher, C. J., Jr., et al.  
1996 Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group. *N Engl J Med* 334(26):1697-702.
- Fisher, C. J., Jr., et al.  
1994 Recombinant human interleukin 1 receptor antagonist in the treatment of patients with sepsis syndrome. Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Phase III rhIL-1ra Sepsis Syndrome Study Group. *JAMA* 271(23):1836-43.
- Forero, A., et al.  
2019 Differential Activation of the Transcription Factor IRF1 Underlies the Distinct Immune Responses Elicited by Type I and Type III Interferons. *Immunity* 51(3):451-464 e6.
- Fourrier, François  
2008 Inhibiteurs de la coagulation et états infectieux graves. *Réanimation* 17:370-378.
- Frenette, P. S., et al.  
2000 P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *J Exp Med* 191(8):1413-22.
- Frenette, P. S., et al.  
1995 Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(16):7450-4.
- Frenette, P. S., et al.  
1998 Platelet-endothelial interactions in inflamed mesenteric venules. *Blood* 91(4):1318-24.
- Fuertes, M. B., et al.  
2011 Host type I IFN signals are required for antitumor CD8<sup>+</sup> T cell responses through CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> dendritic cells. *J Exp Med* 208(10):2005-16.

- Fuertes Marraco, S. A., et al.  
2011 Type I interferon drives dendritic cell apoptosis via multiple BH3-only proteins following activation by PolyIC in vivo. *PLoS One* 6(6):e20189.
- Furie, R., et al.  
2017 Anifrolumab, an Anti-Interferon-alpha Receptor Monoclonal Antibody, in Moderate-to-Severe Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol* 69(2):376-386.
- Gaieski, D. F., et al.  
2013 Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. *Crit Care Med* 41(5):1167-74.
- Gando, S., et al.  
2013 A multicenter, prospective validation study of the Japanese Association for Acute Medicine disseminated intravascular coagulation scoring system in patients with severe sepsis. *Crit Care* 17(3):R111.
- Gangaplara, A., et al.  
2018 Type I interferon signaling attenuates regulatory T cell function in viral infection and in the tumor microenvironment. *PLoS Pathog* 14(4):e1006985.
- Gaudino, S. J., and P. Kumar  
2019 Cross-Talk Between Antigen Presenting Cells and T Cells Impacts Intestinal Homeostasis, Bacterial Infections, and Tumorigenesis. *Front Immunol* 10:360.
- Geroulanos, S., and E. T. Douka  
2006 Historical perspective of the word "sepsis". *Intensive Care Med* 32(12):2077.
- Giamarellos-Bourboulis, E. J., et al.  
2006 Early apoptosis of blood monocytes in the septic host: is it a mechanism of protection in the event of septic shock? *Crit Care* 10(3):R76.
- Gibbert, K., et al.  
2013 IFN-alpha subtypes: distinct biological activities in anti-viral therapy. *Br J Pharmacol* 168(5):1048-58.
- Gill, N., et al.  
2011 NK cells require type I IFN receptor for antiviral responses during genital HSV-2 infection. *Cell Immunol* 269(1):29-37.
- Golino, P.  
2002 The inhibitors of the tissue factor:factor VII pathway. *Thromb Res* 106(3):V257-65.
- Goritzka, M., et al.

- 2014 Alpha/beta interferon receptor signaling amplifies early proinflammatory cytokine production in the lung during respiratory syncytial virus infection. *J Virol* 88(11):6128-36.
- Goritzka, M., et al.  
2015 Alveolar macrophage-derived type I interferons orchestrate innate immunity to RSV through recruitment of antiviral monocytes. *J Exp Med* 212(5):699-714.
- Gray, E. E., et al.  
2016 The AIM2-like Receptors Are Dispensable for the Interferon Response to Intracellular DNA. *Immunity* 45(2):255-66.
- Green, A. M., R. Difazio, and J. L. Flynn  
2013 IFN-gamma from CD4 T cells is essential for host survival and enhances CD8 T cell function during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* 190(1):270-7.
- Greiner, J. W., et al.  
1984 Enhanced expression of surface tumor-associated antigens on human breast and colon tumor cells after recombinant human leukocyte alpha-interferon treatment. *Cancer Res* 44(8):3208-14.
- Grenn, R. C., et al.  
2017 Endothelial progenitor dysfunction associates with a type I interferon signature in primary antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* 76(2):450-457.
- Grimaldi, D., E. W. Goicoechea Turcott, and F. S. Taccone  
2016 IL-1 receptor antagonist in sepsis: new findings with old data? *J Thorac Dis* 8(9):2379-2382.
- Grimaldi, D., J. F. Llitjos, and F. Pene  
2014 Post-infectious immune suppression: a new paradigm of severe infections. *Med Mal Infect* 44(10):455-63.
- Guo, J., et al.  
2019 Empowering therapeutic antibodies with IFN-alpha for cancer immunotherapy. *PLoS One* 14(8):e0219829.
- Hansen, K., et al.  
2014 *Listeria monocytogenes* induces IFNbeta expression through an IFI16-, cGAS- and STING-dependent pathway. *EMBO J* 33(15):1654-66.
- Harle, P., et al.  
2002 Transient transfection of mouse fibroblasts with type I interferon transgenes provides various degrees of protection against herpes simplex virus infection. *Antiviral Res* 56(1):39-49.
- Harris, E. S., and W. J. Nelson  
2010 VE-cadherin: at the front, center, and sides of endothelial cell organization and function. *Curr Opin Cell Biol* 22(5):651-8.
- Hassanain, H. H., S. Y. Chon, and S. L. Gupta

- 1993 Differential regulation of human indoleamine 2,3-dioxygenase gene expression by interferons-gamma and -alpha. Analysis of the regulatory region of the gene and identification of an interferon-gamma-inducible DNA-binding factor. *J Biol Chem* 268(7):5077-84.
- Havenar-Daughton, C., G. A. Kolumam, and K. Murali-Krishna  
2006 Cutting Edge: The direct action of type I IFN on CD4 T cells is critical for sustaining clonal expansion in response to a viral but not a bacterial infection. *J Immunol* 176(6):3315-9.
- Hedges, J. F., et al.  
2016 Type I Interferon Counters or Promotes *Coxiella burnetii* Replication Dependent on Tissue. *Infect Immun* 84(6):1815-1825.
- Henry, T., et al.  
2007 Type I interferon signaling is required for activation of the inflammasome during *Francisella* infection. *J Exp Med* 204(5):987-94.
- Henry, T., et al.  
2010 Type I IFN signaling constrains IL-17A/F secretion by gammadelta T cells during bacterial infections. *J Immunol* 184(7):3755-67.
- Herbert, J. M., et al.  
1992 IL-4 inhibits LPS-, IL-1 beta- and TNF alpha-induced expression of tissue factor in endothelial cells and monocytes. *FEBS Lett* 310(1):31-3.
- Herzig, D., et al.  
2012 STAT1-deficient mice are resistant to cecal ligation and puncture-induced septic shock. *Shock* 38(4):395-402.
- Hidmark, A., A. von Saint Paul, and A. H. Dalpke  
2012 Cutting edge: TLR13 is a receptor for bacterial RNA. *J Immunol* 189(6):2717-21.
- Hillmer, E. J., et al.  
2016 STAT3 signaling in immunity. *Cytokine Growth Factor Rev* 31:1-15.
- Hillyer, P., et al.  
2012 Expression profiles of human interferon-alpha and interferon-lambda subtypes are ligand- and cell-dependent. *Immunol Cell Biol* 90(8):774-83.
- Honda, K., A. Takaoka, and T. Taniguchi  
2006 Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity* 25(3):349-60.
- Horvath, C. M.  
2004 The Jak-STAT pathway stimulated by interferon alpha or interferon beta. *Sci STKE* 2004(260):tr10.

- Hoshino, K., et al.  
2002 Differential involvement of IFN-beta in Toll-like receptor-stimulated dendritic cell activation. *Int Immunol* 14(10):1225-31.
- Hotchkiss, R. S., et al.  
2016 Sepsis and septic shock. *Nat Rev Dis Primers* 2:16045.
- Hotchkiss, R. S., et al.  
2001 Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol* 166(11):6952-63.
- Hoving, J. C., G. J. Wilson, and G. D. Brown  
2014 Signalling C-type lectin receptors, microbial recognition and immunity. *Cell Microbiol* 16(2):185-94.
- Hu, W., et al.  
2015 Differential outcome of TRIF-mediated signaling in TLR4 and TLR3 induced DC maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(45):13994-9.
- Huet, O., et al.  
2011 Oxidative stress and endothelial dysfunction during sepsis. *Front Biosci (Landmark Ed)* 16:1986-95.
- Hughes, C. E., et al.  
2014 Development of primary invasive pneumococcal disease caused by serotype 1 pneumococci is driven by early increased type I interferon response in the lung. *Infect Immun* 82(9):3919-26.
- Iba, T., et al.  
2016 Revision of the Japanese Association for Acute Medicine (JAAM) disseminated intravascular coagulation (DIC) diagnostic criteria using antithrombin activity. *Crit Care* 20:287.
- Iba, T., and J. Thachil  
2017 Clinical significance of measuring plasminogen activator inhibitor-1 in sepsis. *J Intensive Care* 5:56.
- Indraccolo, S.  
2010 Interferon-alpha as angiogenesis inhibitor: learning from tumor models. *Autoimmunity* 43(3):244-7.
- Isaacs, A., and J. Lindenmann  
1957 Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147(927):258-67.
- Ito, T., et al.  
2001 Differential regulation of human blood dendritic cell subsets by IFNs. *J Immunol* 166(5):2961-9.
- Iwasaki, A., and R. Medzhitov  
2015 Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol* 16(4):343-53.
- Jacquelot, N., et al.



- 2019 Sustained Type I interferon signaling as a mechanism of resistance to PD-1 blockade. *Cell Res* 29(10):846-861.
- Jansen, P. M., et al.  
1995 Contribution of interleukin-1 to activation of coagulation and fibrinolysis, neutrophil degranulation, and the release of secretory-type phospholipase A2 in sepsis: studies in nonhuman primates after interleukin-1 alpha administration and during lethal bacteremia. *Blood* 86(3):1027-34.
- Jeanneret, S  
2011 Physiopathologie et traitement de la vasoplégie au cours du sepsis. *La revue médicale suisse* 7:2435-8.
- Jia, H., et al.  
2018 Endothelial cell functions impaired by interferon in vitro: Insights into the molecular mechanism of thrombotic microangiopathy associated with interferon therapy. *Thromb Res* 163:105-116.
- Jin, H., et al.  
2018 Epac activation inhibits IL-6-induced cardiac myocyte dysfunction. *J Physiol Sci* 68(1):77-87.
- Joffre, J., et al.  
2020 Endothelial Responses in Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*.
- Jones Buie, J. N., and J. C. Oates  
2014 Role of interferon alpha in endothelial dysfunction: insights into endothelial nitric oxide synthase-related mechanisms. *Am J Med Sci* 348(2):168-75.
- Jy, W., et al.  
2004 Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* 2(10):1842-51.
- Kaffarnik, M. F., et al.  
2017 Correlation between plasma endothelin-1 levels and severity of septic liver failure quantified by maximal liver function capacity (LiMAx test). A prospective study. *PLoS One* 12(5):e0178237.
- Kamezaki, K., et al.  
2004 The role of Tyk2, Stat1 and Stat4 in LPS-induced endotoxin signals. *Int Immunol* 16(8):1173-9.
- Kamphuis, E., et al.  
2006 Type I interferons directly regulate lymphocyte recirculation and cause transient blood lymphopenia. *Blood* 108(10):3253-61.
- Kaplan, M. H., et al.  
1996 Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity* 4(3):313-9.
- Karaghiosoff, M., et al.

- 2003 Central role for type I interferons and Tyk2 in lipopolysaccharide-induced endotoxin shock. *Nat Immunol* 4(5):471-7.
- Kawai, T., and S. Akira  
2010 The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11(5):373-84.
- Keating, S. E., M. Baran, and A. G. Bowie  
2011 Cytosolic DNA sensors regulating type I interferon induction. *Trends Immunol* 32(12):574-81.
- Kell, A. M., and M. Gale, Jr.  
2015 RIG-I in RNA virus recognition. *Virology* 479-480:110-21.
- Kernbauer, E., et al.  
2013 Route of Infection Determines the Impact of Type I Interferons on Innate Immunity to *Listeria monocytogenes*. *PLoS One* 8(6):e65007.
- Khakpour, S., K. Wilhelmsen, and J. Hellman  
2015 Vascular endothelial cell Toll-like receptor pathways in sepsis. *Innate Immun* 21(8):827-46.
- Kisanuki, Y. Y., et al.  
2001 Tie2-Cre transgenic mice: a new model for endothelial cell-lineage analysis in vivo. *Dev Biol* 230(2):230-42.
- Kong, L., et al.  
2009 An essential role for RIG-I in toll-like receptor-stimulated phagocytosis. *Cell Host Microbe* 6(2):150-61.
- Kotenko, S. V., et al.  
2003 IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol* 4(1):69-77.
- Kovarik, P., et al.  
2016 Type I Interferons in Bacterial Infections: A Balancing Act. *Front Immunol* 7:652.
- Krummel, M. F., et al.  
2018 Paracrine costimulation of IFN-gamma signaling by integrins modulates CD8 T cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115(45):11585-11590.
- Kumar, A., et al.  
2005 Human serum from patients with septic shock activates transcription factors STAT1, IRF1, and NF-kappaB and induces apoptosis in human cardiac myocytes. *J Biol Chem* 280(52):42619-26.
- Kumar, H., T. Kawai, and S. Akira  
2011 Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 30(1):16-34.
- Kwak, H. J., et al.

- 2015 Myeloid cell-derived reactive oxygen species externally regulate the proliferation of myeloid progenitors in emergency granulopoiesis. *Immunity* 42(1):159-71.
- Lacy, P., and J. L. Stow  
2011 Cytokine release from innate immune cells: association with diverse membrane trafficking pathways. *Blood* 118(1):9-18.
- Ladislau, L., et al.  
2018 JAK inhibitor improves type I interferon induced damage: proof of concept in dermatomyositis. *Brain* 141(6):1609-1621.
- Lai, Y., and R. L. Gallo  
2009 AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol* 30(3):131-41.
- Landelle, C., et al.  
2010 Low monocyte human leukocyte antigen-DR is independently associated with nosocomial infections after septic shock. *Intensive Care Med* 36(11):1859-66.
- Langer, F., and W. Ruf  
2014 Synergies of phosphatidylserine and protein disulfide isomerase in tissue factor activation. *Thromb Haemost* 111(4):590-7.
- Langer, H. F., and T. Chavakis  
2009 Leukocyte-endothelial interactions in inflammation. *J Cell Mol Med* 13(7):1211-20.
- Le Bon, A., et al.  
2006 Direct stimulation of T cells by type I IFN enhances the CD8+ T cell response during cross-priming. *J Immunol* 176(8):4682-9.
- Le, K. T. T., et al.  
2019 Leukocyte-Released Mediators in Response to Both Bacterial and Fungal Infections Trigger IFN Pathways, Independent of IL-1 and TNF-alpha, in Endothelial Cells. *Front Immunol* 10:2508.
- Lee, A. J., and A. A. Ashkar  
2018 The Dual Nature of Type I and Type II Interferons. *Front Immunol* 9:2061.
- Lee, B., et al.  
2015 Influenza-induced type I interferon enhances susceptibility to gram-negative and gram-positive bacterial pneumonia in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 309(2):L158-67.
- Lee, W. L., and A. S. Slutsky  
2010 Sepsis and endothelial permeability. *N Engl J Med* 363(7):689-91.
- Leeuwenberg, J. F., et al.

- 1992 E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 are released by activated human endothelial cells in vitro. *Immunology* 77(4):543-9.
- Lehmann, M. H., et al.  
2016 CCL2 expression is mediated by type I IFN receptor and recruits NK and T cells to the lung during MVA infection. *J Leukoc Biol* 99(6):1057-64.
- LeMessurier, K. S., et al.  
2013 Type I interferon protects against pneumococcal invasive disease by inhibiting bacterial transmigration across the lung. *PLoS Pathog* 9(11):e1003727.
- Lentsch, A. B., et al.  
2001 STAT4 and STAT6 regulate systemic inflammation and protect against lethal endotoxemia. *J Clin Invest* 108(10):1475-82.
- Lentz, B. R.  
2003 Exposure of platelet membrane phosphatidylserine regulates blood coagulation. *Prog Lipid Res* 42(5):423-38.
- Levi, M., and M. Scully  
2018 How I treat disseminated intravascular coagulation. *Blood* 131(8):845-854.
- Levi, M., and T. van der Poll  
2010 Inflammation and coagulation. *Crit Care Med* 38(2 Suppl):S26-34.
- Li, W., et al.  
2008 Regulation of apoptosis by type III interferons. *Cell Prolif* 41(6):960-979.
- Li, W., B. Molledo, and T. M. Moran  
2012 Type I interferon induction during influenza virus infection increases susceptibility to secondary *Streptococcus pneumoniae* infection by negative regulation of gamma delta T cells. *J Virol* 86(22):12304-12.
- Liang, H., et al.  
2017 Host STING-dependent MDSC mobilization drives extrinsic radiation resistance. *Nat Commun* 8(1):1736.
- Liang, Y., et al.  
2014 Elevated levels of plasma TNF-alpha are associated with microvascular endothelial dysfunction in patients with sepsis through activating the NF-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase in endothelial cells. *Shock* 41(4):275-81.
- Lippmann, J., et al.  
2011 Dissection of a type I interferon pathway in controlling bacterial intracellular infection in mice. *Cell Microbiol* 13(11):1668-82.
- Liu, T., et al.

- 2017 NF-kappaB signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther* 2.
- Lopez de Padilla, C. M., and T. B. Niewold  
2016 The type I interferons: Basic concepts and clinical relevance in immune-mediated inflammatory diseases. *Gene* 576(1 Pt 1):14-21.
- Lu, B., et al.  
2014 JAK/STAT1 signaling promotes HMGB1 hyperacetylation and nuclear translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(8):3068-73.
- Lusis, A. J.  
2000 Atherosclerosis. *Nature* 407(6801):233-41.
- Lyons, P. G., et al.  
2018 Sepsis-Associated Coagulopathy Severity Predicts Hospital Mortality. *Crit Care Med* 46(5):736-742.
- Ma, Q.  
2013 Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 53:401-26.
- MacMicking, J. D.  
2012 Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity. *Nat Rev Immunol* 12(5):367-82.
- Maeda, S., et al.  
2014 Interferon-alpha acts on the S/G2/M phases to induce apoptosis in the G1 phase of an IFNAR2-expressing hepatocellular carcinoma cell line. *J Biol Chem* 289(34):23786-95.
- Mahieu, T., et al.  
2006 The wild-derived inbred mouse strain SPRET/Ei is resistant to LPS and defective in IFN-beta production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(7):2292-7.
- Major, J., et al.  
2020 Type I and III interferons disrupt lung epithelial repair during recovery from viral infection. *Science* 369(6504):712-717.
- Makris, S., M. Paulsen, and C. Johansson  
2017 Type I Interferons as Regulators of Lung Inflammation. *Front Immunol* 8:259.
- Mancuso, G., et al.  
2007 Type I IFN signaling is crucial for host resistance against different species of pathogenic bacteria. *J Immunol* 178(5):3126-33.
- Manfredi, A. A., et al.  
2018 The Neutrophil's Choice: Phagocytose vs Make Neutrophil Extracellular Traps. *Front Immunol* 9:288.
- Manz, M. G., and S. Boettcher  
2014 Emergency granulopoiesis. *Nat Rev Immunol* 14(5):302-14.
- Martin, F. J., et al.

- 2009 Staphylococcus aureus activates type I IFN signaling in mice and humans through the Xr repeated sequences of protein A. *J Clin Invest* 119(7):1931-9.
- Matsukawa, A., et al.  
2001 Pivotal role of signal transducer and activator of transcription (Stat)4 and Stat6 in the innate immune response during sepsis. *J Exp Med* 193(6):679-88.
- Matsukawa, A., et al.  
2003 Aberrant inflammation and lethality to septic peritonitis in mice lacking STAT3 in macrophages and neutrophils. *J Immunol* 171(11):6198-205.
- Matsumoto, H., et al.  
2018 The clinical importance of a cytokine network in the acute phase of sepsis. *Sci Rep* 8(1):13995.
- Matsunaga, T., et al.  
2003 Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia. *Nat Med* 9(9):1158-65.
- McAllister, C. S., N. Taghavi, and C. E. Samuel  
2012 Protein kinase PKR amplification of interferon beta induction occurs through initiation factor eIF-2alpha-mediated translational control. *J Biol Chem* 287(43):36384-92.
- McEver, R. P., and C. Zhu  
2010 Rolling cell adhesion. *Annu Rev Cell Dev Biol* 26:363-96.
- Mera, S., et al.  
2011 Multiplex cytokine profiling in patients with sepsis. *APMIS* 119(2):155-63.
- Meziani, F., et al.  
2010 Bench-to-bedside review: circulating microparticles--a new player in sepsis? *Crit Care* 14(5):236.
- Minagar, A., et al.  
2003 Interferon (IFN)-beta 1a and IFN-beta 1b block IFN-gamma-induced disintegration of endothelial junction integrity and barrier. *Endothelium* 10(6):299-307.
- Missy, Karine  
2001 L'intégrine  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  dans les plaquettes sanguines: un rôle dans la transduction des signaux. *Médecine et sciences* 17:155-161.
- Moen, S. H., et al.  
2019 Human Toll-like Receptor 8 (TLR8) Is an Important Sensor of Pyogenic Bacteria, and Is Attenuated by Cell Surface TLR Signaling. *Front Immunol* 10:1209.
- Mogensen, T. H.

- 2009 Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev* 22(2):240-73, Table of Contents.
- Moll, H. P., et al.  
2008 Neutralizing type I IFN antibodies trigger an IFN-like response in endothelial cells. *J Immunol* 180(8):5250-6.
- Monneret, G., et al.  
2003 Marked elevation of human circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in sepsis-induced immunoparalysis. *Crit Care Med* 31(7):2068-71.
- Monneret, G., et al.  
2006 Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med* 32(8):1175-83.
- Morand, E. F., et al.  
2020 Trial of Anifrolumab in Active Systemic Lupus Erythematosus. *N Engl J Med* 382(3):211-221.
- Mosser, D. M., and J. P. Edwards  
2008 Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8(12):958-69.
- Muller, L., P. Aigner, and D. Stoiber  
2017 Type I Interferons and Natural Killer Cell Regulation in Cancer. *Front Immunol* 8:304.
- Nakamura, S., K. M. Davis, and J. N. Weiser  
2011 Synergistic stimulation of type I interferons during influenza virus coinfection promotes *Streptococcus pneumoniae* colonization in mice. *J Clin Invest* 121(9):3657-65.
- Nakaya, Y., et al.  
2017 AIM2-Like Receptors Positively and Negatively Regulate the Interferon Response Induced by Cytosolic DNA. *mBio* 8(4).
- Narayanan, K. B., and H. H. Park  
2015 Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain-mediated cellular signaling pathways. *Apoptosis* 20(2):196-209.
- Nawroth, P. P., et al.  
1986 Interleukin 1 induces endothelial cell procoagulant while suppressing cell-surface anticoagulant activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(10):3460-4.
- Negishi, H., T. Taniguchi, and H. Yanai  
2018 The Interferon (IFN) Class of Cytokines and the IFN Regulatory Factor (IRF) Transcription Factor Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10(11).
- Neumann, F. J., et al.

- 1997 Effect of human recombinant interleukin-6 and interleukin-8 on monocyte procoagulant activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17(12):3399-405.
- Nguyen-Jackson, H. T., et al.  
2012 G-CSF-activated STAT3 enhances production of the chemokine MIP-2 in bone marrow neutrophils. *J Leukoc Biol* 92(6):1215-25.
- O'Connell, R. M., et al.  
2004 Type I interferon production enhances susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection. *J Exp Med* 200(4):437-45.
- O'Neil, L. J., M. J. Kaplan, and C. Carmona-Rivera  
2019 The Role of Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps in Vascular Damage in Systemic Lupus Erythematosus. *J Clin Med* 8(9).
- Odendall, C., A. A. Voak, and J. C. Kagan  
2017 Type III IFNs Are Commonly Induced by Bacteria-Sensing TLRs and Reinforce Epithelial Barriers during Infection. *J Immunol* 199(9):3270-3279.
- Okamoto, K., T. Tamura, and Y. Sawatsubashi  
2016 Sepsis and disseminated intravascular coagulation. *J Intensive Care* 4:23.
- Opal, S. M., and V. A. DePalo  
2000 Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 117(4):1162-72.
- Opal, S. M., et al.  
1997 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* 25(7):1115-24.
- Ortiz, A., and S. Y. Fuchs  
2017 Anti-metastatic functions of type 1 interferons: Foundation for the adjuvant therapy of cancer. *Cytokine* 89:4-11.
- Osterlund, P. I., et al.  
2007 IFN regulatory factor family members differentially regulate the expression of type III IFN (IFN-lambda) genes. *J Immunol* 179(6):3434-42.
- Osterud, B., and E. Bjorklid  
2001 The tissue factor pathway in disseminated intravascular coagulation. *Semin Thromb Hemost* 27(6):605-17.
- Ouyang, M. Z., et al.  
2018 The inhibition of MyD88 and TRIF signaling serve equivalent roles in attenuating myocardial deterioration due to acute severe inflammation. *Int J Mol Med* 41(1):399-408.
- Pandey, S., T. Kawai, and S. Akira



- 2014 Microbial sensing by Toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7(1):a016246.
- Panes, J., M. Perry, and D. N. Granger  
1999 Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. *Br J Pharmacol* 126(3):537-50.
- Paoli, C. J., et al.  
2018 Epidemiology and Costs of Sepsis in the United States-An Analysis Based on Timing of Diagnosis and Severity Level. *Crit Care Med* 46(12):1889-1897.
- Parker, B. S., J. Rautela, and P. J. Hertzog  
2016 Antitumour actions of interferons: implications for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 16(3):131-44.
- Parker, D., et al.  
2014 Induction of type I interferon signaling determines the relative pathogenicity of *Staphylococcus aureus* strains. *PLoS Pathog* 10(2):e1003951.
- Parker, D., and A. Prince  
2012 *Staphylococcus aureus* induces type I IFN signaling in dendritic cells via TLR9. *J Immunol* 189(8):4040-6.
- Pawlinski, R., and N. Mackman  
2010 Cellular sources of tissue factor in endotoxemia and sepsis. *Thromb Res* 125 Suppl 1:S70-3.
- Perkins, D. J., et al.  
2015 *Salmonella Typhimurium* Co-opts the Host Type I IFN System To Restrict Macrophage Innate Immune Transcriptional Responses Selectively. *J Immunol* 195(5):2461-71.
- Pons, S., et al.  
2020 Immune Consequences of Endothelial Cells' Activation and Dysfunction During Sepsis. *Crit Care Clin* 36(2):401-413.
- Pontiroli, F., et al.  
2012 The timing of IFN $\beta$  production affects early innate responses to *Listeria monocytogenes* and determines the overall outcome of lethal infection. *PLoS One* 7(8):e43455.
- Poujol, F., et al.  
2018 Ex vivo Stimulation of Lymphocytes with IL-10 Mimics Sepsis-Induced Intrinsic T-Cell Alterations. *Immunol Invest* 47(2):154-168.
- ProteinAtlas  
2020 The Human protein atlas. Pp. 1.  
<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000142166-IFNAR1/tissue>.
- Pylaeva, E., S. Lang, and J. Jablonska  
2016 The Essential Role of Type I Interferons in Differentiation and Activation of Tumor-Associated Neutrophils. *Front Immunol* 7:629.
- Quenot, J. P., et al.

- 2013 The epidemiology of septic shock in French intensive care units: the prospective multicenter cohort EPISS study. *Crit Care* 17(2):R65.
- Ragland, S. A., and A. K. Criss  
2017 From bacterial killing to immune modulation: Recent insights into the functions of lysozyme. *PLoS Pathog* 13(9):e1006512.
- Rayamajhi, M., et al.  
2010 Induction of IFN- $\alpha$  enables *Listeria monocytogenes* to suppress macrophage activation by IFN- $\gamma$ . *J Exp Med* 207(2):327-37.
- Redza-Dutordoir, M., and D. A. Averill-Bates  
2016 Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta* 1863(12):2977-2992.
- Reed, J. M., P. J. Branigan, and A. Bamezai  
2008 Interferon gamma enhances clonal expansion and survival of CD4+ T cells. *J Interferon Cytokine Res* 28(10):611-22.
- Reinhart, K., et al.  
2017 Recognizing Sepsis as a Global Health Priority - A WHO Resolution. *N Engl J Med* 377(5):414-417.
- Reizis, B., et al.  
2011 Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annu Rev Immunol* 29:163-83.
- Rhodes, A., et al.  
2017 Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Crit Care Med* 45(3):486-552.
- Ricciotti, E., and G. A. FitzGerald  
2011 Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31(5):986-1000.
- Richez, C., et al.  
2009 TLR4 ligands induce IFN- $\alpha$  production by mouse conventional dendritic cells and human monocytes after IFN- $\beta$  priming. *J Immunol* 182(2):820-8.
- Robinson, N., et al.  
2012 Type I interferon induces necroptosis in macrophages during infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Nat Immunol* 13(10):954-62.
- Rodrigues, S. F., and D. N. Granger  
2015 Blood cells and endothelial barrier function. *Tissue Barriers* 3(1-2):e978720.
- Romero, C. R., et al.  
2010 The role of interferon- $\gamma$  in the pathogenesis of acute intra-abdominal sepsis. *J Leukoc Biol* 88(4):725-35.

- Romo, G. M., et al.  
1999 The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin. *J Exp Med* 190(6):803-14.
- Roquilly, A., et al.  
2017 Local Modulation of Antigen-Presenting Cell Development after Resolution of Pneumonia Induces Long-Term Susceptibility to Secondary Infections. *Immunity* 47(1):135-147 e5.
- Rouzaut, A., et al.  
2010 Dendritic cells adhere to and transmigrate across lymphatic endothelium in response to IFN-alpha. *Eur J Immunol* 40(11):3054-63.
- Rudd, K. E., et al.  
2020 Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet* 395(10219):200-211.
- Samuel, C. E.  
2001 Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* 14(4):778-809, table of contents.
- Saura, M., et al.  
1999 An antiviral mechanism of nitric oxide: inhibition of a viral protease. *Immunity* 10(1):21-8.
- Schoggins, J. W.  
2019 Interferon-Stimulated Genes: What Do They All Do? *Annu Rev Virol* 6(1):567-584.
- Schrijver, I. T., C. Theroude, and T. Roger  
2019 Myeloid-Derived Suppressor Cells in Sepsis. *Front Immunol* 10:327.
- Schuetz, P., et al.  
2011 Endothelial cell activation in emergency department patients with sepsis-related and non-sepsis-related hypotension. *Shock* 36(2):104-8.
- Shah, C. A., et al.  
2018 Stat3 and CCAAT enhancer-binding protein beta (C/ebpbeta) activate Fanconi C gene transcription during emergency granulopoiesis. *J Biol Chem* 293(11):3937-3948.
- Shahangian, A., et al.  
2009 Type I IFNs mediate development of postinfluenza bacterial pneumonia in mice. *J Clin Invest* 119(7):1910-20.
- Shrum, B., et al.  
2014 A robust scoring system to evaluate sepsis severity in an animal model. *BMC Res Notes* 7:233.
- Silhavy, T. J., D. Kahne, and S. Walker

- 2010 The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(5):a000414.
- Simmons, D. P., et al.  
2012 Type I IFN drives a distinctive dendritic cell maturation phenotype that allows continued class II MHC synthesis and antigen processing. *J Immunol* 188(7):3116-26.
- Simon, H. U., A. Haj-Yehia, and F. Levi-Schaffer  
2000 Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 5(5):415-8.
- Singer, M., et al.  
2016 The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315(8):801-10.
- Slaton, J. W., et al.  
2001 Treatment with low-dose interferon-alpha restores the balance between matrix metalloproteinase-9 and E-cadherin expression in human transitional cell carcinoma of the bladder. *Clin Cancer Res* 7(9):2840-53.
- Smith, C. K., et al.  
2014 Neutrophil extracellular trap-derived enzymes oxidize high-density lipoprotein: an additional proatherogenic mechanism in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol* 66(9):2532-2544.
- Soilu-Hanninen, M., A. Salmi, and R. Salonen  
1995 Interferon-beta downregulates expression of VLA-4 antigen and antagonizes interferon-gamma-induced expression of HLA-DQ on human peripheral blood monocytes. *J Neuroimmunol* 60(1-2):99-106.
- Spadaro, F., et al.  
2012 IFN-alpha enhances cross-presentation in human dendritic cells by modulating antigen survival, endocytic routing, and processing. *Blood* 119(6):1407-17.
- Stanifer, M. L., K. Pervolaraki, and S. Boulant  
2019 Differential Regulation of Type I and Type III Interferon Signaling. *Int J Mol Sci* 20(6).
- Stitham, J., et al.  
2011 Prostacyclin: an inflammatory paradox. *Front Pharmacol* 2:24.
- Stohlawetz, P., et al.  
1999 Effects of endotoxemia on thrombopoiesis in men. *Thromb Haemost* 81(4):613-7.
- Stouthard, J. M., et al.  
1996 Interleukin-6 stimulates coagulation, not fibrinolysis, in humans. *Thromb Haemost* 76(5):738-42.
- Sun, S., et al.

- 1998 Type I interferon-mediated stimulation of T cells by CpG DNA. *J Exp Med* 188(12):2335-42.
- Swindle, E. J., and D. D. Metcalfe  
2007 The role of reactive oxygen species and nitric oxide in mast cell-dependent inflammatory processes. *Immunol Rev* 217:186-205.
- Takeda, K., et al.  
1999 Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity* 10(1):39-49.
- Takeuchi, O., and S. Akira  
2010 Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140(6):805-20.
- Tang, Y., et al.  
2010 The contribution of the Tie2+ lineage to primitive and definitive hematopoietic cells. *Genesis* 48(9):563-7.
- Tanji, H., et al.  
2015 Toll-like receptor 8 senses degradation products of single-stranded RNA. *Nat Struct Mol Biol* 22(2):109-15.
- Taylor, F. B., Jr., et al.  
2001 Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost* 86(5):1327-30.
- Teijaro, J. R., et al.  
2011 Endothelial cells are central orchestrators of cytokine amplification during influenza virus infection. *Cell* 146(6):980-91.
- Terrell, A. M., et al.  
2006 Jak/STAT/SOCS signaling circuits and associated cytokine-mediated inflammation and hypertrophy in the heart. *Shock* 26(3):226-34.
- Thornley, T. B., et al.  
2007 Type 1 IFN mediates cross-talk between innate and adaptive immunity that abrogates transplantation tolerance. *J Immunol* 179(10):6620-9.
- Thyrell, L., et al.  
2002 Mechanisms of Interferon-alpha induced apoptosis in malignant cells. *Oncogene* 21(8):1251-62.
- Tietjen, G. T., et al.  
2017 Nanoparticle targeting to the endothelium during normothermic machine perfusion of human kidneys. *Sci Transl Med* 9(418).
- Tong, Y., et al.  
2019 Concomitant type I IFN and M-CSF signaling reprograms monocyte differentiation and drives pro-tumoral arginase production. *EBioMedicine* 39:132-144.

- Tornavaca, O., et al.  
2015 ZO-1 controls endothelial adherens junctions, cell-cell tension, angiogenesis, and barrier formation. *J Cell Biol* 208(6):821-38.
- Torpey, N., et al.  
2004 Interferon alpha but not interleukin 12 activates STAT4 signaling in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 279(25):26789-96.
- Toscano, M. G., D. Ganea, and A. M. Gamero  
2011 Cecal ligation puncture procedure. *J Vis Exp* (51).
- Traeger, T., et al.  
2010 Colon ascendens stent peritonitis (CASP)--a standardized model for polymicrobial abdominal sepsis. *J Vis Exp* (46).
- Tsirigotis, P., et al.  
2015 Treatment of Experimental Candida Sepsis with a Janus Kinase Inhibitor Controls Inflammation and Prolongs Survival. *Antimicrob Agents Chemother* 59(12):7367-73.
- Tsujimoto, H., et al.  
2008 Role of Toll-like receptors in the development of sepsis. *Shock* 29(3):315-21.
- Turvey, S. E., and D. H. Broide  
2010 Innate immunity. *J Allergy Clin Immunol* 125(2 Suppl 2):S24-32.
- Urb, M., and D. C. Sheppard  
2012 The role of mast cells in the defence against pathogens. *PLoS Pathog* 8(4):e1002619.
- van Vught, L. A., et al.  
2016 Incidence, Risk Factors, and Attributable Mortality of Secondary Infections in the Intensive Care Unit After Admission for Sepsis. *JAMA* 315(14):1469-79.
- Vega-Ramos, J., et al.  
2014 Inflammation conditions mature dendritic cells to retain the capacity to present new antigens but with altered cytokine secretion function. *J Immunol* 193(8):3851-9.
- Verhelst, J., P. Hulpiau, and X. Saelens  
2013 Mx proteins: antiviral gatekeepers that restrain the uninvited. *Microbiol Mol Biol Rev* 77(4):551-66.
- Vidarthi, A., et al.  
2018 TLR-3 Stimulation Skews M2 Macrophages to M1 Through IFN- $\alpha$  Signaling and Restricts Tumor Progression. *Front Immunol* 9:1650.
- Vincent, J. L., and D. De Backer  
2005 Microvascular dysfunction as a cause of organ dysfunction in severe sepsis. *Crit Care* 9 Suppl 4:S9-12.

- Vincent, J. L., et al.  
2019 Frequency and mortality of septic shock in Europe and North America: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care* 23(1):196.
- Vincent, J. L., et al.  
1996 The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med* 22(7):707-10.
- von Kockritz-Blickwede, M., et al.  
2008 Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. *Blood* 111(6):3070-80.
- von Marschall, Z., et al.  
2003 Effects of interferon alpha on vascular endothelial growth factor gene transcription and tumor angiogenesis. *J Natl Cancer Inst* 95(6):437-48.
- Wakil, A. E., et al.  
1998 Interferon gamma derived from CD4(+) T cells is sufficient to mediate T helper cell type 1 development. *J Exp Med* 188(9):1651-6.
- Walborn, A., et al.  
2019 Endothelial Dysfunction Is Associated with Mortality and Severity of Coagulopathy in Patients with Sepsis and Disseminated Intravascular Coagulation. *Clin Appl Thromb Hemost* 25:1076029619852163.
- Walsh, M. C., J. Lee, and Y. Choi  
2015 Tumor necrosis factor receptor- associated factor 6 (TRAF6) regulation of development, function, and homeostasis of the immune system. *Immunol Rev* 266(1):72-92.
- Wang, Y., et al.  
2010a Kynurenine is an endothelium-derived relaxing factor produced during inflammation. *Nat Med* 16(3):279-85.
- Wang, Y., et al.  
2010b Ephrin-B2 controls VEGF-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature* 465(7297):483-6.
- Watanabe, T., et al.  
2010 NOD1 contributes to mouse host defense against *Helicobacter pylori* via induction of type I IFN and activation of the ISGF3 signaling pathway. *J Clin Invest* 120(5):1645-62.
- Watson, C., et al.  
1996 IL-6 acts on endothelial cells to preferentially increase their adherence for lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 105(1):112-9.
- Way, S. S., et al.

- 2007 IL-12 and type-I IFN synergize for IFN-gamma production by CD4 T cells, whereas neither are required for IFN-gamma production by CD8 T cells after *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* 178(7):4498-505.
- Weighardt, H., et al.  
2006 Type I IFN modulates host defense and late hyperinflammation in septic peritonitis. *J Immunol* 177(8):5623-30.
- Weiss, C. M., et al.  
2018 The Interferon-Induced Exonuclease ISG20 Exerts Antiviral Activity through Upregulation of Type I Interferon Response Proteins. *mSphere* 3(5).
- Welsh, R. M., et al.  
2012 Type 1 interferons and antiviral CD8 T-cell responses. *PLoS Pathog* 8(1):e1002352.
- Wenzel, J., et al.  
2005 Type I interferon-associated recruitment of cytotoxic lymphocytes: a common mechanism in regressive melanocytic lesions. *Am J Clin Pathol* 124(1):37-48.
- Werner, N., et al.  
2006 Circulating CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles correlate with coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(1):112-6.
- Wiens, K. E., and J. D. Ernst  
2016 The Mechanism for Type I Interferon Induction by *Mycobacterium tuberculosis* is Bacterial Strain-Dependent. *PLoS Pathog* 12(8):e1005809.
- Wu, C., et al.  
2014 IFN-gamma primes macrophage activation by increasing phosphatase and tensin homolog via downregulation of miR-3473b. *J Immunol* 193(6):3036-44.
- Wu, D. D., T. Li, and X. Y. Ji  
2017 Dendritic Cells in Sepsis: Pathological Alterations and Therapeutic Implications. *J Immunol Res* 2017:3591248.
- Xiao, T. S., and K. A. Fitzgerald  
2013 The cGAS-STING pathway for DNA sensing. *Mol Cell* 51(2):135-9.
- Yan, H., et al.  
1996 Phosphorylated interferon-alpha receptor 1 subunit (IFN $\alpha$ R1) acts as a docking site for the latent form of the 113 kDa STAT2 protein. *EMBO J* 15(5):1064-74.
- Yan, R., et al.



- 2017 Endothelial Interferon Regulatory Factor 1 Regulates Lipopolysaccharide-Induced VCAM-1 Expression Independent of NFkappaB. *J Innate Immun.*
- Yanai, Y., et al.  
2001 Analysis of the antiviral activities of natural IFN-alpha preparations and their subtype compositions. *J Interferon Cytokine Res* 21(10):835-41.
- Yang, X., et al.  
2020 The role of type 1 interferons in coagulation induced by gram-negative bacteria. *Blood* 135(14):1087-1100.
- Ye, X., et al.  
2008 Divergent roles of endothelial NF-kappaB in multiple organ injury and bacterial clearance in mouse models of sepsis. *J Exp Med* 205(6):1303-15.
- Zafrani, L., et al.  
2015 The microcirculation of the septic kidney. *Semin Nephrol* 35(1):75-84.
- Zanoni, I., F. Granucci, and A. Broggi  
2017 Interferon (IFN)-lambda Takes the Helm: Immunomodulatory Roles of Type III IFNs. *Front Immunol* 8:1661.
- Zhang, G., et al.  
2009 Lipopolysaccharide stimulates platelet secretion and potentiates platelet aggregation via TLR4/MyD88 and the cGMP-dependent protein kinase pathway. *J Immunol* 182(12):7997-8004.
- Zhang, G., T. C. Meredith, and D. Kahne  
2013 On the essentiality of lipopolysaccharide to Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol* 16(6):779-85.
- Zhang, H., et al.  
2010 STAT3 controls myeloid progenitor growth during emergency granulopoiesis. *Blood* 116(14):2462-71.
- Zhang, Y., et al.  
2016 Circulating Microparticles, Blood Cells, and Endothelium Induce Procoagulant Activity in Sepsis through Phosphatidylserine Exposure. *Shock* 45(3):299-307.
- Zhou, A., et al.  
1997 Interferon action and apoptosis are defective in mice devoid of 2',5'-oligoadenylate-dependent RNase L. *EMBO J* 16(21):6355-63.
- Zimmerman, O., et al.  
2019 STAT1 Gain-of-Function Mutations Cause High Total STAT1 Levels With Normal Dephosphorylation. *Front Immunol* 10:1433.
- Zimmermann, M., et al.  
2016 IFNalpha enhances the production of IL-6 by human neutrophils activated via TLR8. *Sci Rep* 6:19674.

Zitvogel, L., et al.

2015 Type I interferons in anticancer immunity. *Nat Rev Immunol* 15(7):405-14.

Zonneveld, R., et al.

2014 Soluble adhesion molecules as markers for sepsis and the potential pathophysiological discrepancy in neonates, children and adults. *Crit Care* 18(2):204.

## **Annexes**

## **Annexe 1 : Complément méthodologique**

## Précisions méthodologiques quant au protocole de RT-qPCR réalisé sur échantillons murins

**Tableau 9 : Protocole d'élimination des DNases par traitement thermique**

Étapes	Température (°C)	Temps (minutes)
Processing	25	30
Inactivation de la DNase	75	5

**Tableau 10 : Protocole de rétro transcription**

Étapes	Température (°C)	Temps (minutes)
Priming	25	5
Rétrotranscription	46	30
Inactivation de la rétrotranscriptase	95	1

**Tableau 11 : Amorces utilisées, diluées au 1/10<sup>ème</sup>, lors des amplifications par RT-qPCR sur échantillons d'organes de souris**

Gène	Amorce sens (5' → 3')	Amorce sens (3' → 5')
<i>Cxcl1</i>	CGCTGGATTCACCTCAAGAACAT	AAGCCTCGCGACCATTCTTGA
<i>Il-1<math>\alpha</math></i>	TGAGTTTTGGTGTCTTCTGGC	TCGGGAGGAGACGACTCTAA
<i>Il-1<math>\beta</math></i>	AATTGGTCATAGCCCGCACT	AAGCAATGTGCTGGTGCTTC
<i>Il-6</i>	ATGAACAACGATGATGCACTTG	TATCCAGTTTGGTAGCATCCAT
<i>Mx1</i>	CCAGGTCCTGCTCCACAC	TCTGAGGAGAGCCAGACGAT
<i>Mx2</i>	CAGGGAGTCGATGAGGTCAA	CTTACCCAGTGGAGAGACGG
<i>Tnf</i>	CTACTCCCAGGTTCTCTTCAA	GCAGAGAGGAGGTTGACTTTC

**Tableau 12 : Protocole de qPCR**

<b>Etapes</b>	<b>Température (°C)</b>	<b>Temps (secondes)</b>	<b>Cycling</b>
Denaturation	95	30	1
Processing	95	5	40
	60	20	

## Annexe 2

## SEPTIC SHOCK ALTERS MITOCHONDRIAL RESPIRATION OF LYMPHOID CELL-LINES AND HUMAN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS: THE ROLE OF PLASMA

Raphael Clere-Jehl,<sup>\*†</sup> Julie Helms,<sup>\*‡</sup> Mohamad Kassem,<sup>§</sup> Pierrick Le Borgne,<sup>†||</sup> Xavier Delabranche,<sup>\*</sup> Anne-Laure Charles,<sup>†</sup> Bernard Geny,<sup>†</sup> Ferhat Meziani,<sup>\*¶</sup> and Pascal Bilbault<sup>||¶</sup>

<sup>\*</sup>University of Strasbourg, Faculty of Medicine, Hôpitaux universitaires de Strasbourg, Intensive Care Ward, nouvel hôpital civil, Strasbourg, France; <sup>†</sup>Federation of Translational Medicine of Strasbourg, Faculty of Medicine, University of Strasbourg, Strasbourg, France; <sup>‡</sup>University of Strasbourg, INSERM (French National Institute of Health and Medical Research), EFS Grand Est, Strasbourg, France; <sup>§</sup>Vascular and Tissular Stress in Transplantation, Federation of Translational Medicine of Strasbourg, Faculty of Medicine, University of Strasbourg, Illkirch-Graffenstaden, France; <sup>||</sup>Emergency Department, Hôpital de Hautepierre, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France; and <sup>¶</sup>INSERM (French National Institute of Health and Medical Research), Regenerative Nanomedicine (RNM), FMTS, Strasbourg, France

Received 27 Aug 2017; first review completed 25 Sep 2017; accepted in final form 7 Feb 2018

**ABSTRACT—Introduction:** In septic shock patients, postseptic immunosuppression state after the systemic inflammatory response syndrome is responsible for nosocomial infections, with subsequent increased mortality. The aim of the present study was to assess the underlying cellular mechanisms of the postseptic immunosuppression state, by investigating mitochondrial functions of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from septic shock patients over 7 days. **Materials and methods:** Eighteen patients admitted to a French intensive care unit for septic shock were included. At days 1 and 7, PBMCs were isolated by Ficoll density gradient centrifugation. Mitochondrial respiration of intact septic PBMCs was assessed *versus* control group PBMCs, by measuring O<sub>2</sub> consumption in plasma, using high-resolution respirometry. Mitochondrial respiration was then compared between septic plasmas and control plasmas for control PBMCs, septic PBMCs, and lymphoid cell-line (CEM). To investigate the role of plasma, we measured several plasma cytokines, among them High-Mobility Group Box 1 (HMGB1), by enzyme-linked immunosorbent assays. **Results:** Basal O<sub>2</sub> consumption of septic shock PBMCs was of 8.27 ± 3.39 and 10.48 ± 3.99 pmol/s/10<sup>6</sup> cells at days 1 and 7, respectively, significantly higher than in control PBMCs (5.37 ± 1.46 pmol/s/10<sup>6</sup> cells, *P* < 0.05). Septic patient PBMCs showed a lower response to oligomycin, suggesting a reduced ATP-synthase activity, as well as an increased response to carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP) suggesting an increased mitochondrial respiratory capacity. At 6 h, septic plasmas showed a decreased O<sub>2</sub> consumption of CEM (4.73 ± 1.46 vs. 6.58 ± 1.53, *P* < 0.05) as well as in control group PBMCs (1.76 ± 0.36 vs. 2.70 ± 0.42, *P* < 0.05), and triggered a decreased ATP-synthase activity but an increased response to FCCP. These differences are not explained by different cell survival. High HMGB1 levels were significantly associated with reduced PBMCs mitochondrial respiration. **Conclusions:** Septic plasma impairs mitochondrial respiration in immune cells, with a possible role of the proinflammatory protein HMGB1, leading to a subsequent compensation, probably by enzymatic activation. This compensation result is an improvement of global mitochondrial respiratory capacity, but without restoring ATP-synthase activity.

**KEYWORDS—**HMGB1, lymphocytes, mitochondria, monocytes, PBMCs, plasma, sepsis

**ABBREVIATIONS—**CBC—complete blood count; DIC—disseminated intravascular coagulation; ELISA—enzyme-linked immunosorbent assays; FCCP—carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone; HMGB1—High-Mobility Group Box 1; ICU—intensive care unit; JAAM—Japanese association for acute medicine; MC—million of cells; PBMCs—peripheral blood mononuclear cells

Address reprint requests to Pascal Bilbault, MD, PhD, Service d'Accueil des Urgences, Hôpital de Hautepierre, 1 avenue Molière, F-67091 Strasbourg Cedex, France; E-mail: pascal.bilbault@chru-strasbourg.fr.

Authors' contributions: RCJ, FM, and PB had full access to all the study data and take responsibility for their integrity and the accuracy of the analysis. RCJ, FM, BG, and PB participated in the study design. RCJ, JH, XD, PL, and ALC collected the data. MK performed the ELISA assays. RCJ, JH, and XD analyzed the data. RCJ, JH, XD, PL, and ALC performed biological analyses. RCJ and FM drafted the report, and the report was revised for important intellectual content by RCJ, JH, XD, ALC, FM, BG, and PB. All authors read and approved the final manuscript.

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

The authors report no conflicts of interest.

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citation appears in the printed text and is provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Web site ([www.shockjournal.com](http://www.shockjournal.com)).

DOI: 10.1097/SHK.0000000000001125

Copyright © 2018 by the Shock Society

## INTRODUCTION

According to the *Surviving Sepsis Campaign* recommendations (1), septic shock is a life-threatening organ dysfunction caused by a dysregulated hyperinflammatory host response to infection (2). Septic shock is followed by an immunosuppression state (3, 4), resulting in late infections (5, 6) and participating in 28-day mortality (7). Consequently, immunosuppression after sepsis seems to be a potential therapeutic target to improve late outcome (8, 9).

Several cellular mechanisms leading to the postseptic immunosuppression state target monocytes (10, 11) and lymphocytes (6, 7), both are early quantitatively (12) and qualitatively (13, 14) downregulated. A quantitative decrease of circulating



lymphocytes and monocytes is observed at an early stage of septic shock (15) and is linked to a well-known sepsis-induced apoptosis (16–18).

Qualitative impairments of lymphocytes, which have been less studied, reinforce this downregulation, giving a cellular phenotype described by some authors as “lymphocyte exhaustion” (15). The result is a reduced production of inflammatory cytokines (13) and a reduced activation of the lymphocyte in response to cytokines stimulation (19).

Some studies point out mitochondrial dysfunctions (20, 21) as key findings to explain lymphocyte exhaustion during sepsis. Mitochondrial impairments have also been shown during sepsis (22–25), but part of the involved mechanisms remains unclear (26). Former studies found heterogeneous results: impairments of mitochondrial respiration were observed during sepsis for immune cells as well as for other types of cells, such as muscular cells (27–29). However, at least one study showed an increased mitochondrial capacity in link with increased mitochondrial content of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) during sepsis (30). These studies used different methods, but most of them relied on permeabilized cells (22), whereas new methods have more frequently used intact cells to be closer to physiological conditions.

During sepsis, whether the immune cells undergo an intrinsic mitochondrial dysfunction or plasma factors induce mitochondrial dysfunction is not known yet. Plasma might alter mitochondrial respiration of immune and other cells during sepsis (22).

Thus, we measured mitochondrial respiratory capacity of lymphocytes and monocytes from septic shock patients over time compared with controls, using intact PBMCs. We also assessed the role of plasma from septic shock patients on mitochondrial respiration compared with plasma from controls.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients

Eighteen adult patients (18–85 years old) admitted for septic shock (1) to one of the two medical intensive care units (ICUs) of Strasbourg University Hospital were enrolled in a prospective cohort. Patients were excluded when presented with known mitochondrial disease, pregnancy, hematologic malignancy, white cell count inferior to  $500/\text{mm}^3$  and if it was not possible to reach at least 8 million PBMCs, and if weight was less than 40 kg. The first blood sample had to be collected less than 12 h after the beginning of noradrenaline.

Controls were all adult outpatients without any signs of sepsis.

Our study received the approval of the ethics committee of the Strasbourg University Hospital in January 2014. Written, informed consent was signed by the patient or next of kin.

### Baseline characteristics and outcome

Patients' epidemiologic characteristics and treatments were prospectively recorded, including the simplified acute physiology score (SAPS II) and the sequential organ failure assessment (SOFA) at ICU admission, as well as a complete blood count (CBC). We also recorded the occurrence of acute respiratory, kidney, liver, heart failure, or disseminated intravascular coagulation defined by a score of the Japanese association for acute medicine superior to four. The site of sepsis and type of microorganism involved, the implementation of treatments such as renal replacement therapy, mechanical ventilation, and catecholamines used, as well as 7- and 28-day mortality rates were collected.

### Blood samples and isolation of PBMCs

Thirty milliliters of each patient's blood were sampled in sodium heparin tubes (BD Vacutainer NH 170 IU; Becton-Dickinson, United Kingdom) at day 1

and day 7 and only once for control group. PBMCs (lymphocytes and monocytes) were isolated by Ficoll density gradient centrifugation and separated from plasma. PBMCs were counted manually with a count check by flow cytometry (Muse Cell Analyser, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) and used for respirometry within 10 min after sampling.

### Plasma samples

All plasma samples obtained from Ficoll density gradient centrifugation were depleted from platelets by two successive centrifugations at 2,500 *g* for 15 min, before immediate use (in the case of PBMC comparisons, *cf. infra*) or storing at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Frozen plasma samples were used for plasma comparisons on mitochondrial respiration, and pooled at the time of experiments after defrosting (see plasma comparisons, *cf. infra*). Frozen plasma samples were also used for plasma assays (see plasma assays, *cf. infra*).

### Plasma assays

Cytokines and soluble immune activation markers assays were performed using enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) as follows: High-Mobility Group Box 1 (HMGB1) was measured using a human plasma ELISA kit (Cloud-Clone Corp., Katy, Tex) according to the manufacturer's instructions. Interleukine 10 (IL-10), monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, and soluble Programmed cell Death (sPD)-1 assays were performed using human plasma ELISA kits (RayBiotech, Norcross, Ga) according to the manufacturer's instructions.

### Cells culture

The lymphoid cell-line CEM (ATCC # CLL-119 from the American Type Culture Collection, Rockville, Md) was used to approach the cellular phenotype of lymphocytes. Initial cell-seeding density was set at  $2.10^5/\text{mL}$ . CEM were cultured in ready-to-use cell growth medium X-VIVO 15 according to the manufacturer instructions (Lonza, Basel, Switzerland). At the fourth passage, CEM were randomly challenged with plasmas from septic patients or controls as described below.

### High-resolution respirometry

Two milliliters of platelet-poor plasma were used as nutrient medium, without additional substrate, in each oxygraphy chamber and 4 millions of cells were used in each chamber to reach a final concentration of  $2.10^6$  cells/mL. Measurements were performed in a high-resolution oxygraph (Oxygraph-2k; Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) at  $37^{\circ}\text{C}$ . Oxygen concentration (micromolar) and oxygen flux (expressed in  $\text{pmol O}_2/\text{s}/10^6$  cells) were recorded with DatLab software 4.3 (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria). Calibration on air was performed before each sample treatment. Oxygen concentration was calculated with barometric pressure and solubility factor was set to 0.89 for plasma. Oxygen consumption background was measured in each plasma sample immediately after calibration and automatically corrected for the ensuing experiments. Only intact cells were used for measurements. Cells were directly put in suspension in plasma just before closing the chamber, maintaining respiration by endogenous plasma-derived substrates only. After stabilization of  $\text{O}_2$  consumption, the “routine” respiration was reached. The “routine” respiration was the first measure, common to all experiments of  $\text{O}_2$  consumption measurements: PBMC comparisons and plasma comparisons. Each measurement was made using two oxygraphy chambers simultaneously to allow pairwise comparisons.

### PBMC comparisons for cellular respiration

To compare PBMCs, we measured  $\text{O}_2$  consumption of septic patient and control PBMCs in the subject's own plasma. The plasma was not frozen and immediately used after Ficoll density gradient centrifugation and depletion of platelets. When “routine” respiration was reached,  $1 \mu\text{L}$  oligomycin at  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo), which is an inhibitor of ATP-synthase, was added to induce a state 4-like respiration in which respiration is primarily related to a proton leak through the inner mitochondrial membrane. Relative response to oligomycin was established by calculating the oligomycin/routine ratio of  $\text{O}_2$  consumption, which is inversely related to the ATP-synthase activity. Maximal oxygen flux (as supported by plasma-derived substrates) was subsequently reached by adding the uncoupler carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP; Sigma Aldrich) at a concentration of  $80 \mu\text{M}$ . Relative response to FCCP was established by calculating the FCCP/routine ratio of  $\text{O}_2$  consumption, to determine the maximal mitochondrial respiratory capacity. Finally, complex I was inhibited by adding rotenone (Sigma Aldrich) at a concentration of  $2 \mu\text{M}$ .

### Plasma comparisons for cellular respiration over 6 h

To compare plasmas (septic vs. controls), we consecutively measured O<sub>2</sub> consumption of the three types of cells (lymphoid cell-line CEM, control PBMCs, and septic PBMCs). Cells were put in suspension in pooled plasmas from six septic patients versus six controls, so as to limit interindividual variations. After reaching “routine” respiration, O<sub>2</sub> consumption was measured hourly over 6 h. After measuring O<sub>2</sub> consumption, cells were counted every hour to measure survival and the oxygraphy chambers were at the same time reoxygenated for 5 min. Only at the end of these 6 h, we added successively oligomycin, FCCP, and rotenone after the same protocol as PBMC comparisons.

### Statistical analysis

Statistics were calculated using Graph Pad Prism v. 7 (GraphPad Software Inc., La Jolla, Calif). Quantitative variables are described using the means  $\pm$  SDs if not mentioned otherwise. Qualitative variables are described as numbers and percentages. Comparisons between the quantitative variables were realized with Mann–Whitney *U* test. Difference between each day was analyzed with repeated measures ANOVA and, when significant, Dunnett’s multiple comparisons tests were used. Differences between paired data were analyzed with Wilcoxon matched-pairs signed-rank test. To compare the qualitative variables, nonparametric Fisher’s exact test was used. Relationships between two quantitative variables were analyzed using the Pearson’s correlation coefficient. The significance level was fixed at 5%.

## RESULTS

### Inclusion and baseline

Between January 2014 and December 2015, 18 septic shock patients and 19 controls were included, whose characteristics are presented in Tables 1 and 2. Septic patients were mostly

TABLE 1. Patient characteristics at baseline

	Patients, n = 18
<b>Epidemiology</b>	
Sex, female, n (%)	8 (44)
Age, y	63.9 $\pm$ 13.2
SAPS II	51 $\pm$ 17
7-d mortality, n (%)	3 (17)
28-d mortality, n (%)	4 (22)
<b>Organ failures</b>	
SOFA at admission	11 $\pm$ 3
Acute respiratory failure, n (%)	12 (67)
Acute kidney injury, n (%)	14 (78)
Acute liver failure, n (%)	7 (39)
Acute heart failure, n (%)	11 (61)
DIC (JAAM >4), n (%)	7 (39)
Coma, n (%)	2 (11)
<b>Site of sepsis</b>	
Lung infections, n (%)	7 (39)
Blood-stream infections, n (%)	3 (17)
Abdominal, n (%)	3 (17)
Urinary, n (%)	3 (17)
Soft tissues, n (%)	2 (11)
<b>Microorganism</b>	
Gram-positive cocci, n (%)	5 (28)
Gram-negative bacilli, n (%)	5 (28)
Other, n (%)	8 (44)
<b>Treatments</b>	
Renal replacement therapy, n (%)	6 (33)
Invasive mechanical ventilation, n (%)	18 (100)
Norepinephrin, n (%)	18 (100)
Epinephrin, n (%)	3 (17)
Dobutamine, n (%)	8 (44)

Results expressed as the means  $\pm$  SD or n (%). DIC, disseminated intravascular coagulation; JAAM, Japanese association for acute medicine.

TABLE 2. Patient and control biological characteristics at baseline

	Controls, n = 19	Patients, n = 18	<i>P</i>
<b>Biology</b>			
Hemoglobin, g/dL	13.8 $\pm$ 1.5	8.8 $\pm$ 1.6	<0.001
Platelets, g/L	233 $\pm$ 49	128 $\pm$ 91	<0.001
Neutrophils, /mm <sup>3</sup>	2,402 $\pm$ 604	10,300 $\pm$ 4,800	<0.001
Lymphocytes, /mm <sup>3</sup>	1,919 $\pm$ 420	604 $\pm$ 403	<0.001
Monocytes, /mm <sup>3</sup>	699 $\pm$ 188	525 $\pm$ 336	<0.05

Results expressed as the means  $\pm$  SD.

male with a mean age of 64 years (33–88 years). The most frequent site of infection was the lung in 39% (n = 7). Acute kidney injury was the most frequent organ failure (78%, n = 14). During the first week in the ICU, 17% of patients died (n = 3) and 22% were released from ICU (n = 4). Controls were predominantly male (14 of 19) with a mean age of 47 years (26–67 years).

### PBMC comparisons for cellular respiration

Mitochondrial respiration of PBMCs from control and septic patients at day 1 and day 7 was assessed in fresh homologous plasma. Mitochondrial respiration was shown in Figure 1, describing the three main steps of mitochondrial respiration: basal O<sub>2</sub> consumption (called “Routine”), ATP-synthase inhibition by oligomycin, and maximal mitochondrial respiratory capacity on FCCP. We described mitochondrial respiration in absolute values (Fig. 1A), which showed an overall gradual increase of O<sub>2</sub> consumption at all steps, and in relative values (Fig. 1B) to define the involved mechanisms in these modifications of mitochondrial respiratory capacity.

**Basal O<sub>2</sub> consumption of PBMCs**—At day 1, basal O<sub>2</sub> consumption (called “routine” O<sub>2</sub> consumption) of septic PBMCs in the patient’s own plasma was measured at 8.27  $\pm$  3.39 pmol/s/MC. It was significantly higher than Routine O<sub>2</sub> consumption of control PBMCs in their own plasma (5.37  $\pm$  1.46 pmol/s/MC, *P* < 0.05). At day 7, septic patients Routine O<sub>2</sub> consumption increased to 10.48  $\pm$  3.99 pmol/s/MC and was still significantly higher than controls (*P* < 0.05; Fig. 1A).

**ATP-synthase inhibition by oligomycin**—After ATP-synthase inhibition by oligomycin, septic patients O<sub>2</sub> consumption in absolute and relative value were significantly higher than controls O<sub>2</sub> consumption. The response to oligomycin, measured by the relative value (Fig. 1B), showed a significantly higher inhibition by oligomycin for control PBMCs than septic PBMCs.

**Maximal mitochondrial respiratory capacity on FCCP**—After administration of FCCP, septic patients O<sub>2</sub> consumption in absolute and relative value was significantly higher than controls O<sub>2</sub> consumption. The response to FCCP, measured by the relative value (Fig. 1B), shows a significantly higher maximal mitochondrial respiratory capacity in the septic patients group at day 1.

**Inhibition by rotenone**—After inhibition of complex I by rotenone (data not shown), septic patients O<sub>2</sub> consumption (in absolute value) was measured at 3.43  $\pm$  3.27 pmol/s/MC at day 1 and 4.21  $\pm$  1.15 pmol/s/MC at day 7. Only the value

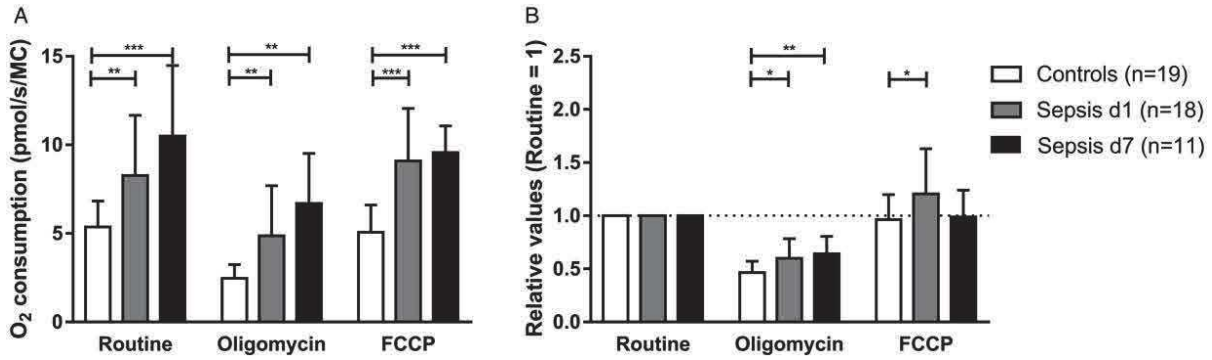


FIG. 1. Cell comparisons for PBMCs mitochondrial respiration in fresh homologous plasma: controls, sepsis at day 1 and sepsis at day 7. (A) PBMC comparisons for absolute values. (B) PBMC comparisons for relative values (Routine value = 1). FCCP, carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone; MC, millions of cells; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .

at day 7 was significantly higher than in controls ( $2.34 \pm 0.81$  pmol/s/MC,  $P < 0.05$ ).

**Correlation between mitochondrial respiration, HMGB1 plasma levels, and biological variables**

We found a significant correlation between HMGB1 and septic PBMCs mitochondrial respiration at each of the four steps described above (Fig. 2). We did not find any other significant correlation between PBMCs mitochondrial respiration and the other cytokines or soluble immune activation

markers assays (IL-10, MCP-1, sPD-1). We did not find any association between mitochondrial respiration and the monocyte or lymphocyte counts.

**Correlation between mitochondrial respiration and epidemiologic characteristics**

There was no significant difference of mitochondrial respiration linked to age (Supplementary Fig. 2, <http://links.lww.com/SHK/A708>), to gravity scores at admission (SOFA, IGS 2, and SAPS 2), and to survival (data not shown).

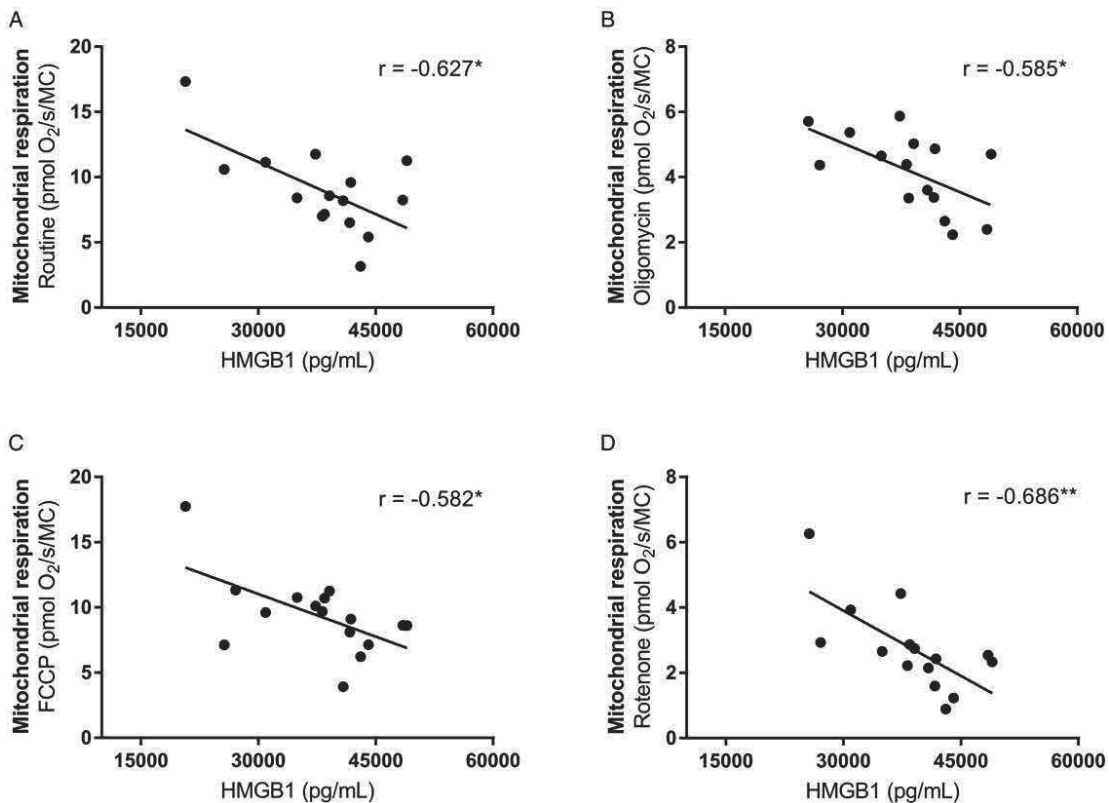


FIG. 2. Correlation between HMGB1 level (pg/mL) and mitochondrial respiration (pmol O<sub>2</sub>/s/MC) at the four steps. (A) Routine (basal O<sub>2</sub> consumption of PBMCs). (B) ATP-synthase inhibition by oligomycin. (C) Maximal mitochondrial respiratory capacity on FCCP. (D) Inhibition by rotenone. FCCP, carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone; MC, millions of cells; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

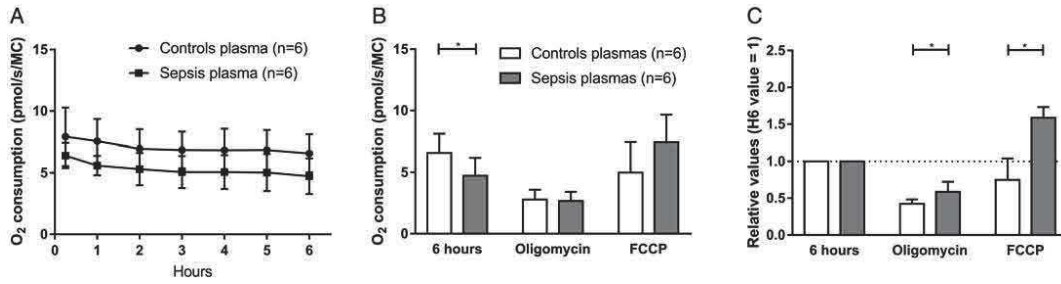


FIG. 3. Plasma comparisons for mitochondrial respiration: control plasmas versus septic plasmas, on CEM. (A) Mitochondrial respiration curves. Circles: controls plasma; squares: sepsis plasma. (B) Plasma comparisons for absolute values. White: controls plasma; gray: sepsis plasma. (C) Plasma comparisons for relative values (value at 6 h = 1). MC, millions of cells; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells. \**P* < 0.05.

**Plasma comparisons regarding cellular respiration over 6 h**

Mitochondrial respiration in control and septic plasmas was assessed for three groups of cells over 6 h: for CEM in Figure 3, for control PBMCs in Figure 4, and for septic PBMCs in Figure 5.

*O<sub>2</sub> consumption over 6 h*—*O<sub>2</sub>* consumption of CEM cells and of control PBMCs over time was significantly increased in the control plasmas versus sepsis plasmas at the sixth hour, whereas *O<sub>2</sub>* consumption of septic patient PBMCs was not significantly different in control plasmas versus sepsis plasmas.

*ATP-synthase inhibition by oligomycin*—After ATP-synthase inhibition by oligomycin on CEM, relative response of CEM and control PBMCs to oligomycin (Figs. 3C and 4C), measured by the oligomycin/routine ratio, showed a signifi-

cantly stronger response in control plasmas versus septic patient plasmas, whereas no difference was found among septic patient PBMCs (Fig. 5C).

*Maximal mitochondrial respiratory capacity on FCCP*—Relative response to FCCP, measured by the FCCP/routine ratio, showed in the three cell groups (Figs. 3C, 4C, and 5C) a significantly stronger FCCP-induced increase of *O<sub>2</sub>* consumption in septic patient plasmas versus control plasmas.

*Inhibition by rotenone*—After inhibition of complex I by Rotenone (data not shown), *O<sub>2</sub>* consumption (in absolute value) was significantly higher in control PBMCs in control plasmas versus septic plasmas ( $1.09 \pm 0.38$  vs.  $0.59 \pm 0.27$  pmol/s/MC, *P* < 0.05). The same tendency was found on CEM and septic PBMCs, but did not reach statistical significance.

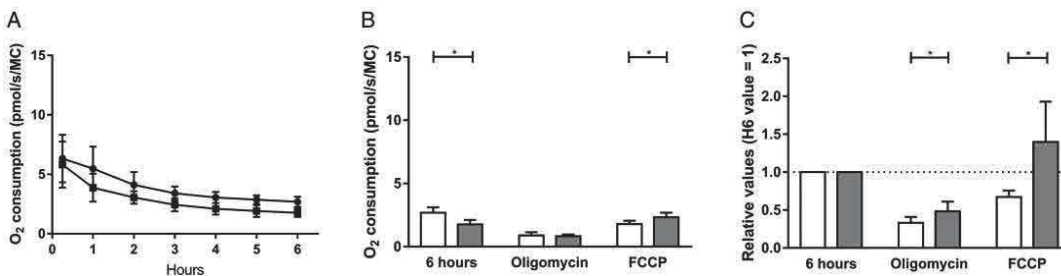


FIG. 4. Plasma comparisons for mitochondrial respiration: control plasmas versus septic plasmas, on control PBMCs. (A) Mitochondrial respiration curves. Circles: controls plasma; squares: sepsis plasma. (B) Plasma comparisons for absolute values. White: controls plasma; gray: sepsis plasma. (C) Plasma comparisons for relative values (value at 6 h = 1). MC, millions of cells; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells. \**P* < 0.05.

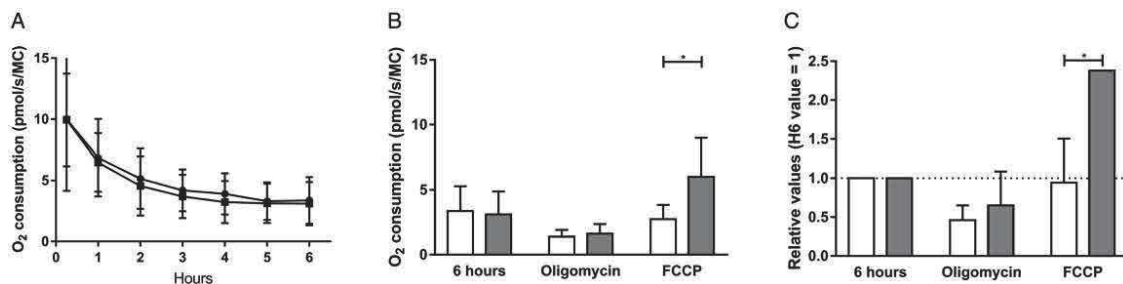


FIG. 5. Plasma comparisons for mitochondrial respiration: control plasmas versus septic plasmas, on septic PBMCs. (A) Mitochondrial respiration curves. Circles: controls plasma; squares: sepsis plasma. (B) Plasma comparisons for absolute values. White: controls plasma; gray: sepsis plasma. (C) Plasma comparisons for relative values (value at 6 h = 1). MC, millions of cells; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells. \**P* < 0.05.

### **Survival of cells over 6 h in control and septic patient plasmas**

Survival of cells over 6 h was not significantly different in control plasmas versus septic patient plasmas, in the three groups of cells: CEM, control PBMCs, and septic patient PBMCs (respectively supplementary Figs. 1A, 1B, 1C, <http://links.lww.com/SHK/A709>).

## **DISCUSSION**

The key findings of the present study are that plasma from septic shock patients alters mitochondrial respiration of lymphoid cell-lines and human PBMCs, with impairment of non-stimulated mitochondrial respiration and ATP-synthase activity. This contrasts with a paradoxical gradual increase of the global mitochondrial respiratory capacity in PBMCs from the same group of septic shock patients during the first 7 days, but with persistent enzymatic impairments involving ATP-synthase activity. High plasma levels of proinflammatory HMGB1 are associated with a lower mitochondrial respiration at all steps. There is no significant difference linked to age or survival.

Septic shock is characterized by a systemic vascular cell dysfunction (31) and induces modifications in leukocytes metabolism (32). Previous studies showed seemingly conflicting results about mitochondrial respiratory capacity during septic shock. Indeed, an initial quantitative (25, 27) or qualitative (22, 23, 25) impairment of cellular mitochondrial respiration in patients with septic shock has been shown in several studies, whereas Sjövall et al. showed a gradual increase in the overall cellular mitochondrial respiratory capacity in PBMCs from patients with septic shock (30). Our findings are concordant with those of Sjövall et al. (30), who used similar methods and managed to reach consistent results with intact cells and permeabilized cells. These results are in favor of the reliability of our data. This consistency with former results compensates for the relatively small number of patients in our study, like in former studies (22, 30). Only septic shock patients were included in our study to define more accurate inclusion criteria, which reduced our number of patients, whereas previous studies also included severe sepsis (22, 30).

To our knowledge, this is the first work that shows, on intact PBMCs and CEM, these plasma-induced mitochondrial impairments and the paradoxical increased mitochondrial respiratory capacity of patients PBMCs.

Regarding the nonstimulated mitochondrial respiration, septic plasmas were able to diminish the spontaneous O<sub>2</sub> consumption at the sixth hour on two types of cells in our study: CEM and control PBMCs. Both have a naive behavior regarding sepsis. These short-term plasma-induced impairments are not explained by a difference of cells survival over 6 h with or without septic patient plasmas, whatever the group of cells, as we showed in the last part of our results. Consequently, these impairments are rather linked to a mitochondrial dysfunction. Interestingly, septic PBMCs, which have a higher Routine O<sub>2</sub> consumption than control PBMCs, do not experience this plasma-induced decrease in O<sub>2</sub> consumption. These elements suggest coping mechanisms (30) among septic PBMCs.

We analyzed the mitochondrial qualitative changes of PBMCs to better understand the sepsis injury and the subsequent coping mechanisms. Most qualitative impairments of mitochondrial respiration during sepsis have been attributed to either ATP-synthase activity or uncoupling in other studies (22, 23, 25). Combination of these two types of impairment (i.e., uncoupling and inhibition of ATP-synthase activity) would result in a higher O<sub>2</sub> consumption of PBMCs during sepsis, without production of more ATP, which is a main source of energy for cells. After these former study findings, we focused on the ATP-synthase activity by measuring the response to oligomycin, and on the research of the maximal oxidative capacity by measuring the response to FCCP, during sepsis, for both PBMC comparisons and plasma comparisons.

A reduced ATP-synthase activity in the context of sepsis has been shown in this work by a lower response of PBMCs to oligomycin, which is an ATP-synthase inhibitor. PBMC comparisons between septic patients and controls showed a reduced ATP-synthase activity in septic patient PBMCs, with a significantly lower response to oligomycin at day 1. Such an impairment of mitochondrial function has been previously observed with other methods (23), which showed a reduction of F1Fo adenosine-5'-triphosphate synthase activity in digitonin-permeabilized PBMCs in patients with septic shock compared with controls. Interestingly, plasma from septic patients could induce this reduced ATP-synthase activity after 6 h on cells that were naive regarding sepsis (CEM and control PBMCs). Similar results were found by Belikova et al. (22), using digitonin-permeabilized PBMCs after a 3-h incubation period in plasma.

Septic patient PBMCs exhibited a significantly increased relative value of FCCP-stimulated O<sub>2</sub> consumption at day 1 compared with control PBMCs. FCCP is an uncoupling agent that shows the maximal O<sub>2</sub> consumption capacity. Such an increase suggests that septic PBMCs exhibit an increased mitochondrial capacity when stimulated. In fact, septic plasma could induce such an increased capacity, showed by a higher relative response to FCCP after a 6-h incubation period on the three types of cells, with a maximal effect on septic PBMCs, suggesting the additional effect of an increased inherent capacity of septic PBMCs and of septic plasmas. These results suggest a plasma-induced mitochondrial enzymatic activation, as the very short delay of activation does not seem consistent with a complete process of mitochondrial biogenesis (30, 33).

This increased inherent mitochondrial capacity of septic PBMCs is in line with the finding of Sjövall et al. (30), but the effect of septic plasmas in our study is different from the main study that worked on the effect of septic plasma on PBMCs mitochondrial respiration (22). Belikova et al. found a lack of response to FCCP, suggesting a plasma-induced uncoupling among PBMCs during sepsis. ADP was injected immediately before FCCP in Belikova et al.'s method, which enables to prove uncoupling, whereas the use of FCCP in our study only aims to show the maximal mitochondrial respiratory capacity, as we do not add ADP. Former studies also showed contrasted results about uncoupled mitochondrial respiration (22, 25, 30), and some of these differences could be linked to the use of different methods. Indeed, digitonin-permeabilized

PBMCs were predominantly used before 2012 (22), whereas more recent studies used intact PBMCs in plasma as a medium for oxygraphy (30) without additional substrate. We initially wished to perform the two different methods (intact and permeabilized cells); it was not possible because of the insufficient number of PBMCs among our septic patients presenting with lymphopenia (7, 12). We therefore chose to work on intact cells, which seems to be closer to physiological conditions and allowed us to measure survival by cell count every hour. It also enabled us to measure O<sub>2</sub> consumption continuously during incubation in plasmas, which was not possible with former methods. Besides, it cannot be excluded that differences found about uncoupled respiration may be linked to differences between the patient groups. The site of primary infection was predominantly the lung in our study, whereas abdomen was the first site of infection in other main studies (22, 30), in which surgery is more likely to be needed.

Plasma-induced impairments of mitochondrial respiration lead to a paradox, given that global mitochondrial capacity of septic patient PBMCs is increased compared with control PBMCs. One of the best explanations of the involved mechanisms is given by Sjövall et al. (30), who showed an increased mitochondrial content, as indicated by increased mitochondrial DNA, mitochondrial protein content, and resulting enzyme activity. These results suggest mitochondrial biogenesis among PBMCs during sepsis as a medium-term compensatory response to sepsis injury. But the whole process of mitochondrial biogenesis might start before the admission in ICU and might last for a longer time than 6 h (33). This hypothesis is based on the gradual increase of PBMCs mitochondrial respiration going on over 1 week in our study, also showed by Sjövall et al. (30).

Furthermore, our results suggest here a short-term metabolic activation, as a new additional mechanism of mitochondrial compensation, based on an immediate enzymatic activation triggered by septic plasma, as previously discussed. However, it seems difficult to prove that either enzymatic activation or mitochondrial biogenesis manages to improve the postseptic immunosuppression state and the clinical outcome during sepsis (34). The importance of mitochondrial biogenesis has been linked with survival in former experimental studies (33, 35, 36), whereas Sjövall et al. showed that increase of platelet mitochondrial respiration is negatively associated with clinical outcome in patients with sepsis (34). Besides, the reduced ATP-synthase activity, which remains a common finding of the main former studies (22, 23), reduces the effectiveness of these adaptive mechanisms, as they may not entirely manage to reach their ultimate aim: the production of ATP. The confirmation of this hypothesis needs to be supported by direct ATP measurements in further studies.

Plasma HMGB1 level is the only factor significantly associated with mitochondrial respiration in our study, which pointed out this relationship, for the first time to our knowledge, in PBMCs. We measured HMGB1 level because of its well-known role as a proinflammatory mediator, which can be passively released from necrotic cells, acting as damage-associated molecular patterns (DAMPs), or actively secreted by inflammatory cells (37). Moreover, a relationship between HMGB1 and mitochondrial dysfunction during sepsis has

already been shown on kidney cells (38), with impairment of ATP production. Two previously described mechanisms could explain that high HMGB1 levels are associated with lower mitochondrial respiration. First, HMGB1 has been shown to induce giant mitochondria, and this mitochondrial swelling leads to bioenergetics failure and cell death (39). Second, HMGB1 has been described as an inhibitor of the tetrameric pyruvate kinase isoform M2, thus blocking glucose-driven aerobic respiration (40), which could explain our results.

## CONCLUSIONS

Our results suggest that plasma factors, among which HMGB1 may play a role, modify immune cells metabolism, with impairments of mitochondrial respiration in PBMCs during septic shock. These impairments lead to a compensation of mitochondrial function, by means of immediate and delayed coping mechanisms. These compensations result in an improvement in global mitochondrial respiratory capacity, but do not protect PBMCs from mitochondrial qualitative impairments, involving ATP-synthase activity and making availability of ATP uncertain for immune cells.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr Gilles Prevost (MD, PhD) from the institute of Bacteriology (University hospital of Strasbourg, France), Dr Joffrey Zoll (MD, PhD) from the EA 3072 (Faculty of Medicine, University of Strasbourg, France), and Mrs Fatiha Zobairi from the EA 7293 (Faculty of Medicine, University of Strasbourg, France) for their contribution. The authors also thank Dr Claude Geronimus (MD, Service d'Accueil des Urgences, Hôpital de Hautepierre, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg) for the correction of English.

## REFERENCES

- Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, Kumar A, Sevransky JE, Sprung CL, Nunnally ME, et al.: Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock: 2016. *Crit Care Med* 45(3):486–552, 2017.
- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM, et al.: The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA* 315(8):801–810, 2016.
- Boomer JS, To K, Chang KC, Takasu O, Osborne DF, Walton AH, Bricker TL, Jarman SD, 2nd Kreisel D, Krupnick AS, et al.: Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA* 306(23):2594–2605, 2011.
- Rimmele T, Payen D, Cantaluppi V, Marshall J, Gomez H, Gomez A, Murray P, Kellum JA, ADQI XIV Workgroup. Immune cell phenotype and function in sepsis. *Shock* 45(3):282–291, 2016.
- Van Vught LA, Klein Klouwenberg PM, Spitoni C, Scicluna BP, Wiewel MA, Horn J, Schultz MJ, Nürnberg P, Bonten MJ, Cremer OL, et al.: Incidence, risk factors, and attributable mortality of secondary infections in the intensive care unit after admission for sepsis. *JAMA* 315(14):1469–1479, 2016.
- Cabrera-Perez J, Condotta SA, Badovinac VP, Griffith TS: Impact of sepsis on CD4 T cell immunity. *J Leukoc Biol* 96(5):767–777, 2014.
- Lange A, Sunden-Cullberg J, Magnuson A, Hultgren O: Soluble B and T lymphocyte attenuator correlates to disease severity in sepsis and high levels are associated with an increased risk of mortality. *PLoS One* 12(1):e0169176, 2017.
- Martire-Greco D, Rodriguez-Rodriguez N, Castillo LA, Vecchione MB, de Campos-Nebel M, Moreno MC, Meiss R, Vermeulen M, Landoni VI, Fernandez GC, et al.: Novel use of all-trans-retinoic acid in a model of lipopolysaccharide-immunosuppression to decrease the generation of myeloid-derived suppressor cells by reducing the proliferation of CD34+ precursor cells. *Shock* 48(1):94–103, 2016.
- Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D: Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis* 13:260–268, 2013.

10. Arens C, Bajwa SA, Koch C, Siegler BH, Schneck E, Hecker A, Weiterer S, Lichtenstern C, Weigand MA, Uhl F: Sepsis-induced long-term immune paralysis: results of a descriptive, explorative study. *Crit Care* 20:93, 2016.
11. Shalova IN, Lim JY, Chittezhath M, Zinkernagel AS, Beasley F, Hernandez-Jimenez E, Toledano V, Cubillos-Zapata C, Rapisarda A, Chen J, et al.: Human monocytes undergo functional re-programming during sepsis mediated by hypoxia-inducible factor-1alpha. *Immunity* 42(3):484–498, 2015.
12. Girardot T, Rimmel T, Venet F, Monneret G: Apoptosis-induced lymphopenia in sepsis and other severe injuries. *Apoptosis* 22(2):295–305, 2017.
13. Boomer JS, Shuherk-Shaffer J, Hotchkiss RS, Green JM: A prospective analysis of lymphocyte phenotype and function over the course of acute sepsis. *Crit Care* 16(3):R112, 2012.
14. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D: Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 13(12):862–874, 2013.
15. Monneret G, Venet F: A rapidly progressing lymphocyte exhaustion after severe sepsis. *Crit Care* 16:140, 2012.
16. Shankar-Hari M, Fear D, Lavender P, Mare T, Beale R, Swanson C, Singer M, Spencer J: Activation-associated accelerated apoptosis of memory B cells in critically ill patients with sepsis. *Crit Care Med* 45(5):875–882, 2017.
17. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Schmiege RE Jr, Hui JJ, Chang KC, Osborne DF, Freeman BD, Cobb JP, Buchman TG, et al.: Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol* 166:6952–6963, 2001.
18. Bilbault P, Lavaux T, Lahlou A, Uring-Lambert B, Gaub MP, Ratomponirina C, Meyer N, Oudet P, Schneider F: Transient Bcl-2 gene down-expression in circulating mononuclear cells of severe sepsis patients who died despite appropriate intensive care. *Intensive Care Med* 30:408–415, 2004.
19. Hoogendijk AJ, Garcia-Laorden MI, van Vught LA, Wiewel MA, Belkasim-Bohoudi H, Duitman J, Horn J, Schultz MJ, Scicluna BP, van't Veer C, et al.: Sepsis patients display a reduced capacity to activate nuclear factor-kappaB in multiple cell types. *Crit Care Med* 45(5):e524–e531, 2017.
20. Chang KC, Unsinger J, Davis CG, Schwulst SJ, Muenzer JT, Strasser A, Hotchkiss RS: Multiple triggers of cell death in sepsis: death receptor and mitochondrial-mediated apoptosis. *FASEB J* 21:708–719, 2007.
21. Ledderose C, Bao Y, Ledderose S, Woehrlt T, Heinisch M, Yip L, Zhang J, Robson SC, Shapiro NI, Junger WG: Mitochondrial dysfunction, depleted purinergic signaling, and defective T cell vigilance and immune defense. *J Infect Dis* 213:456–464, 2016.
22. Belikova I, Lukaszewicz AC, Faivre V, Damoiseil C, Singer M, Payen D: Oxygen consumption of human peripheral blood mononuclear cells in severe human sepsis. *Crit Care Med* 35:2702–2708, 2007.
23. Japiassu AM, Santiago AP, d'Avila JC, Garcia-Souza LF, Galina A, Castro Faria-Neto HC, Bozza FA, Oliveira MF: Bioenergetic failure of human peripheral blood monocytes in patients with septic shock is mediated by reduced F1Fo adenosine-5'-triphosphate synthase activity. *Crit Care Med* 39:1056–1063, 2011.
24. Arulkumaran N, Deutschman CS, Pinsky MR, Zuckerbraun B, Schumacker PT, Gomez H, Murray P, Kellum JA, ADQI XIV Workgroup. Mitochondrial function in sepsis. *Shock* 45:271–281, 2016.
25. Weiss SL, Selak MA, Tuluc F, Perales Villarreal J, Nadkarni VM, Deutschman CS, Becker LB: Mitochondrial dysfunction in peripheral blood mononuclear cells in pediatric septic shock. *Pediatr Crit Care Med* 16:e4–e12, 2015.
26. Exline MC, Crouser ED: Mitochondrial dysfunction during sepsis: still more questions than answers. *Crit Care Med* 39:1216–1217, 2011.
27. Garrabou G, Moren C, Lopez S, Tobias E, Cardellach F, Miro O, Casademont J: The effects of sepsis on mitochondria. *J Infect Dis* 205:392–400, 2012.
28. Carre JE, Orban JC, Re L, Felsmann K, Iffert W, Bauer M, Suliman HB, Piantadosi CA, Mayhew TM, Breen P, et al.: Survival in critical illness is associated with early activation of mitochondrial biogenesis. *Am J Respir Crit Care Med* 182:745–751, 2010.
29. Maestraggi Q, Lebas B, Clere-Jehl R, Ludes PO, Chamaraux-Tran TN, Schneider F, et al.: Skeletal muscle and lymphocyte mitochondrial dysfunctions in septic shock trigger ICU-acquired weakness and sepsis-induced immunoparalysis. *Biomed Res Int* 2017:7897325, 2017.
30. Sjovald F, Morota S, Persson J, Hansson MJ, Elmer E: Patients with sepsis exhibit increased mitochondrial respiratory capacity in peripheral blood immune cells. *Crit Care* 17:R152, 2013.
31. Delabranche X, Quenot JP, Lavigne T, Mercier E, Francois B, Severac F, Grunebaum L, Mehdi M, Zobairi F, Toti F, et al.: Early detection of disseminated intravascular coagulation during septic shock: a multicenter prospective study. *Crit Care Med* 44(10):e930–939, 2016.
32. Stiel L, Meziani F, Helms J: Neutrophil activation during septic shock. *Shock* 49(4):371–384, 2018.
33. Haden DW, Suliman HB, Carraway MS, Welty-Wolf KE, Ali AS, Shitara H, Yonekawa H, Piantadosi CA: Mitochondrial biogenesis restores oxidative metabolism during *Staphylococcus aureus* sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 176(8):768–777, 2007.
34. Sjovald F, Morota S, Hansson MJ, Friberg H, Gnaiger E, Elmer E: Temporal increase of platelet mitochondrial respiration is negatively associated with clinical outcome in patients with sepsis. *Crit Care* 14(6):R214, 2010.
35. MacGarvey NC, Suliman HB, Bartz RR, Fu P, Withers CM, Welty-Wolf KE, Piantadosi CA: Activation of mitochondrial biogenesis by heme oxygenase-1-mediated NF-E2-related factor-2 induction rescues mice from lethal *Staphylococcus aureus* sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 185:851–861, 2012.
36. Brealey D, Brand M, Hargreaves I, Heales S, Land J, Smolenski R, Davies NA, Cooper CE, Singer M: Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet* 360:219–223, 2002.
37. Erlandsson Harris H, Andersson U: Mini-review: the nuclear protein HMGB1 as a proinflammatory mediator. *Eur J Immunol* 34(6):1503–1512, 2004.
38. Abdulmahdi W, Patel D, Rabadi MM, Azar T, Jules E, Lipphardt M, Hashemiyou R, Ratliff BB: HMGB1 redox during sepsis. *Redox Biol* 13:600–607, 2017.
39. Gdynia G, Keith M, Kopitz J, Bergmann M, Fassl A, Weber AN, George J, Kees T, Zentgraf HW, Wiestler OD, et al.: Danger signaling protein HMGB1 induces a distinct form of cell death accompanied by formation of giant mitochondria. *Cancer Res* 70(21):8558–8568, 2010.
40. Gdynia G, Sauer SW, Kopitz J, Fuchs D, Duglova K, Ruppert T, Miller M, Pahl J, Cerwenka A, Enders M, et al.: The HMGB1 protein induces a metabolic type of tumour cell death by blocking aerobic respiration. *Nat Commun* 7:10764, 2016.



## **Annexe 3**



## ORIGINAL ARTICLE

# Timing of Renal-Replacement Therapy in Patients with Acute Kidney Injury and Sepsis

S.D. Barbar, R. Clere-Jehl, A. Bourredjem, R. Hernu, F. Montini, R. Bruyère, C. Lebert, J. Bohé, J. Badie, J.-P. Eraldi, J.-P. Rigaud, B. Levy, S. Siami, G. Louis, L. Bouadma, J.-M. Constantin, E. Mercier, K. Klouche, D. du Cheyron, G. Piton, D. Annane, S. Jaber, T. van der Linden, G. Blasco, J.-P. Mira, C. Schwebel, L. Chimot, P. Guiot, M.-A. Nay, F. Meziani, J. Helms, C. Roger, B. Louart, R. Trusson, A. Dargent, C. Biquet, and J.-P. Quenot, for the IDEAL-ICU Trial Investigators and the CRICS TRIGGERSEP Network\*

## ABSTRACT

**BACKGROUND**

Acute kidney injury is the most frequent complication in patients with septic shock and is an independent risk factor for death. Although renal-replacement therapy is the standard of care for severe acute kidney injury, the ideal time for initiation remains controversial.

**METHODS**

In a multicenter, randomized, controlled trial, we assigned patients with early-stage septic shock who had severe acute kidney injury at the failure stage of the risk, injury, failure, loss, and end-stage kidney disease (RIFLE) classification system but without life-threatening complications related to acute kidney injury to receive renal-replacement therapy either within 12 hours after documentation of failure-stage acute kidney injury (early strategy) or after a delay of 48 hours if renal recovery had not occurred (delayed strategy). The failure stage of the RIFLE classification system is characterized by a serum creatinine level 3 times the baseline level (or  $\geq 4$  mg per deciliter with a rapid increase of  $\geq 0.5$  mg per deciliter), urine output less than 0.3 ml per kilogram of body weight per hour for 24 hours or longer, or anuria for at least 12 hours. The primary outcome was death at 90 days.

**RESULTS**

The trial was stopped early for futility after the second planned interim analysis. A total of 488 patients underwent randomization; there were no significant between-group differences in the characteristics at baseline. Among the 477 patients for whom follow-up data at 90 days were available, 58% of the patients in the early-strategy group (138 of 239 patients) and 54% in the delayed-strategy group (128 of 238 patients) had died ( $P=0.38$ ). In the delayed-strategy group, 38% (93 patients) did not receive renal-replacement therapy. Criteria for emergency renal-replacement therapy were met in 17% of the patients in the delayed-strategy group (41 patients).

**CONCLUSIONS**

Among patients with septic shock who had severe acute kidney injury, there was no significant difference in overall mortality at 90 days between patients who were assigned to an early strategy for the initiation of renal-replacement therapy and those who were assigned to a delayed strategy. (Funded by the French Ministry of Health; IDEAL-ICU ClinicalTrials.gov number, NCT01682590.)

The authors' full names, academic degrees, and affiliations are listed in the Appendix. Address reprint requests to Dr. Quenot at the Critical Care Department, University Hospital François Mitterrand, 14 rue Paul Gaffarel, 21079 Dijon, France.

\*A complete list of the IDEAL-ICU Trial Investigators is provided in the Supplementary Appendix, available at NEJM.org.

N Engl J Med 2018;379:1431-42.

DOI: 10.1056/NEJMoa1803213

Copyright © 2018 Massachusetts Medical Society.



A Quick Take  
is available at  
NEJM.org

**A**CU TE KIDNEY INJURY IS A FREQUENT complication in patients hospitalized in the intensive care unit (ICU) for septic shock<sup>1-3</sup> and is associated with high mortality.<sup>3-7</sup> Acute kidney injury associated with sepsis is characterized by a distinct pathophysiology,<sup>8</sup> and patients with acute kidney injury and septic shock may have a different response to renal-replacement therapy than patients with acute kidney injury without septic shock.<sup>9</sup> In managing severe acute kidney injury, whether to provide renal-replacement therapy and, if so, when to initiate it are unclear. It is widely accepted that if there are life-threatening complications of acute kidney injury, such as hyperkalemia or metabolic acidosis, renal-replacement therapy should be initiated immediately. However, in the absence of such complications, the appropriate timing of the initiation of renal-replacement therapy remains unclear. Some clinical investigators have explored strategies of very early renal-replacement therapy to treat the initial phase of septic shock, but in reports of such efforts, hemofiltration techniques were introduced, irrespective of the presence of renal failure.<sup>10,11</sup> Recently, two randomized, controlled trials comparing an early strategy with a delayed strategy for the initiation of renal-replacement therapy reported conflicting results.<sup>12,13</sup> Thus, whether there is a benefit to early initiation of renal-replacement therapy is not established, and the magnitude of the risk (if any risk exists) associated with delaying the initiation of renal-replacement therapy in the setting of acute kidney injury associated with sepsis is not known. Here we report the results of a randomized, multicenter, controlled trial that we performed to investigate the effect on 90-day mortality of the timing of the initiation of renal-replacement therapy in patients with septic shock and severe acute kidney injury.

## METHODS

### TRIAL DESIGN

The Initiation of Dialysis Early Versus Delayed in the Intensive Care Unit (IDEAL-ICU) trial was a randomized, controlled, open-label, multicenter trial that was designed to compare an early strategy with a delayed strategy for the initiation of renal-replacement therapy in the management

of severe acute kidney injury in patients in the initial phase of septic shock. (Trial definitions are provided in Table S1 in the Supplementary Appendix, available with the full text of this article at NEJM.org.) The trial design has been reported previously; the protocol is available at NEJM.org.<sup>14</sup> With the early strategy, renal-replacement therapy was started within 12 hours after the onset of acute kidney injury that was determined to be at the failure stage of the risk, injury, failure, loss, and end-stage kidney disease (RIFLE) classification (see the Box in the Supplementary Appendix).<sup>15</sup> With the delayed strategy, renal-replacement therapy was initiated after a delay of 48 hours if renal function did not spontaneously recover and if no condition meeting the criteria for emergency renal-replacement therapy developed.

### TRIAL OVERSIGHT

The University Hospital of Dijon, France, supervised the use of the trial funding. An independent data and safety monitoring board reviewed safety data and results at two planned interim analyses. This trial received approval for all participating centers from the Dijon ethics committee (Comité de Protection des Personnes Est I). The trial was overseen by a trial management committee. The first author wrote the first draft of the manuscript, which was reviewed by the management committee. Statistical analyses were performed by the trial statistician in accordance with International Conference on Harmonisation Good Clinical Practice guidelines. The authors vouch for the accuracy and completeness of the reported analyses and for the fidelity of the trial to the protocol. There was no commercial support for the trial. Further details are provided in the Supplementary Appendix.

### TRIAL POPULATION

Patients were eligible if they were 18 years of age or older, were admitted to the ICU in the early phase of septic shock (within 48 hours after the start of vasopressor therapy), and had acute kidney injury meeting at least one of the following criteria for the failure stage of the RIFLE classification: oliguria (urine output <0.3 ml per kilogram of body weight per hour for  $\geq 24$  hours), anuria for 12 hours or more, or a serum creatinine level 3 times the baseline level (or  $\geq 4$  mg per deciliter [ $\geq 350$   $\mu\text{mol}$  per liter] accompanied by a

rapid increase of  $\geq 0.5$  mg per deciliter [ $\geq 44$   $\mu\text{mol}$  per liter]). Written informed consent was obtained from the patient or a responsible surrogate either before randomization or as soon as possible thereafter (see the Informed Consent Procedures section in the Supplementary Appendix). Patients requiring emergency renal-replacement therapy before randomization were not eligible for the trial. A detailed list of inclusion and exclusion criteria is provided in Table S2 in the Supplementary Appendix.

#### RANDOMIZATION

Randomization was performed by means of an online response system, with the use of Tenalea software (FormsVision BV), during the first 48 hours of septic shock after acute kidney injury was determined to be at the failure stage of the RIFLE classification. Randomization was performed on the basis of a minimization technique with stratification according to center, age, Sepsis-related Organ Failure Assessment (SOFA) score (which ranges from 0 to 24, with higher scores indicating more severe organ failure),<sup>16</sup> site, and type of infection. Patients were randomly assigned to the early-strategy group or the delayed-strategy group in a 1:1 ratio. The INSERM Clinical Epidemiology Unit (Centre d'Investigation Clinique 1432 in Dijon, France) managed the data and generated blinded reports for the data and safety monitoring board.

#### INTERVENTIONS

In the early-strategy group, renal-replacement therapy was initiated within 12 hours after documentation of failure-stage acute kidney injury. Patients assigned to the delayed-strategy group were closely monitored after randomization to detect the development of any one of the following conditions included in the criteria for emergency renal-replacement therapy: hyperkalemia (potassium level  $>6.5$  mmol per liter), metabolic acidosis (pH  $<7.15$ ), or fluid overload (extravascular fluid overload that was refractory to diuretics, with pulmonary edema). If any of these conditions occurred, renal-replacement therapy was initiated as soon as possible. If none of these conditions occurred, renal-replacement therapy was initiated in this group 48 hours after the diagnosis of acute kidney injury. Renal-replacement therapy was not initiated in the

delayed-strategy group if spontaneous renal recovery occurred (defined as a decrease in creatinine level and a return of spontaneous urine output to  $>1000$  ml per 24 hours [or  $>2000$  ml per 24 hours in patients receiving diuretics]).

The choice of renal-replacement therapy technique (intermittent or continuous) was at the discretion of clinical experts at each site, but participating clinicians were required to adhere to protocol instructions for settings and monitoring, which were based on international guidelines<sup>17,18</sup> (see Table S3 in the Supplementary Appendix). In both groups, discontinuation of renal-replacement therapy was considered if renal recovery occurred, as defined above.

#### TRIAL OUTCOMES

The primary outcome was death from any cause at 90 days after randomization. Secondary outcomes were death at 28 days and at 180 days; the number of days free of renal-replacement therapy, mechanical ventilation, and vasopressors at 28 days after randomization; the length of stay in the ICU and in the hospital; adverse events during the entire ICU stay, with a focus on the complications potentially related to acute kidney injury or renal-replacement therapy during the first 7 days after enrollment; fluid balance in the first 7 days after enrollment; the need for emergency renal-replacement therapy in the delayed-strategy group; death of patients in the delayed-strategy group in whom at least one criterion for emergency renal-replacement therapy was met; and dependence on renal-replacement therapy at hospital discharge.

#### STATISTICAL ANALYSIS

Considering that death at 90 days was a binary outcome and assuming that mortality would be 10 percentage points lower in the early-strategy group than in the delayed-strategy group (45% vs. 55%) and that 5% of the patients would not be able to be evaluated, we estimated that 864 patients (432 per group) would need to be enrolled to provide 80% power at a two-sided alpha level of 0.05. Two interim efficacy analyses were planned (see the Interim Analyses section in the Supplementary Appendix). In both interim analyses, the frequency of death at 90 days after randomization in the two groups was compared with the chi-square test, at an alpha level of 0.0001<sup>19</sup>

to avoid changing the level of significance of the final primary analysis.

The primary analysis was performed according to the intention-to-treat principle. Categorical variables are expressed as numbers and percentages; continuous variables are expressed as means and standard deviations or medians and interquartile ranges as appropriate. Both categorical and continuous variables were compared in bivariate analyses with the use of corresponding tests. For the main comparison between the two groups of the proportion of deaths at 90 days, we used a chi-square test. A logistic-regression analysis with further stratification according to center was performed with adjustment for baseline prognostic factors (the presence or absence of chronic renal failure and exposure or nonexposure to hydroxyethyl starch in the 24 hours before randomization).

In secondary analyses, the proportion of deaths at 28 days and at 180 days was assessed and the corresponding survival probabilities were plotted with the use of the Kaplan–Meier method. The time from documentation of acute kidney injury to initiation of renal-replacement therapy, the length of ICU and hospital stay, and the number of days free of mechanical ventilation, vasopressors, and renal-replacement therapy are expressed as medians and interquartile ranges and were compared with the use of the Mann–Whitney test. We evaluated safety by calculating the percentage of patients in the two groups in whom the criteria for emergency renal-replacement therapy were met and the percentage with severe metabolic disorders, pulmonary edema due to fluid overload, arterial hypotension requiring an increase in vasopressor dose or a reintroduction of vasopressors, severe symptomatic cardiac arrhythmias, and severe hemorrhage; percentages were compared with the use of appropriate tests.

Analyses were performed with SAS software, version 9.3 (SAS Institute). The significance level was set at 0.05 for all analyses. Given the negative primary outcome, secondary outcomes should be regarded as exploratory and should not be used for inferences about treatment differences.

## RESULTS

### ENROLLMENT

The trial was conducted from July 2012 through October 2016 in 29 ICUs (22 university teaching

hospitals and 7 general hospitals) in France. A total of 1728 of the patients who were assessed were eligible for inclusion, of whom 488 underwent randomization; 246 patients were assigned to the early-strategy group and 242 to the delayed-strategy group (Fig. 1). After the second interim analysis, the independent data and safety monitoring board deemed that completion of enrollment was unlikely to change the results of the trial significantly and recommended that the trial be stopped. The conditional power calculated at the second interim analysis, when termination of the trial owing to futility was recommended, was 51.44% (details are provided in the Interim Analyses section in the Supplementary Appendix).

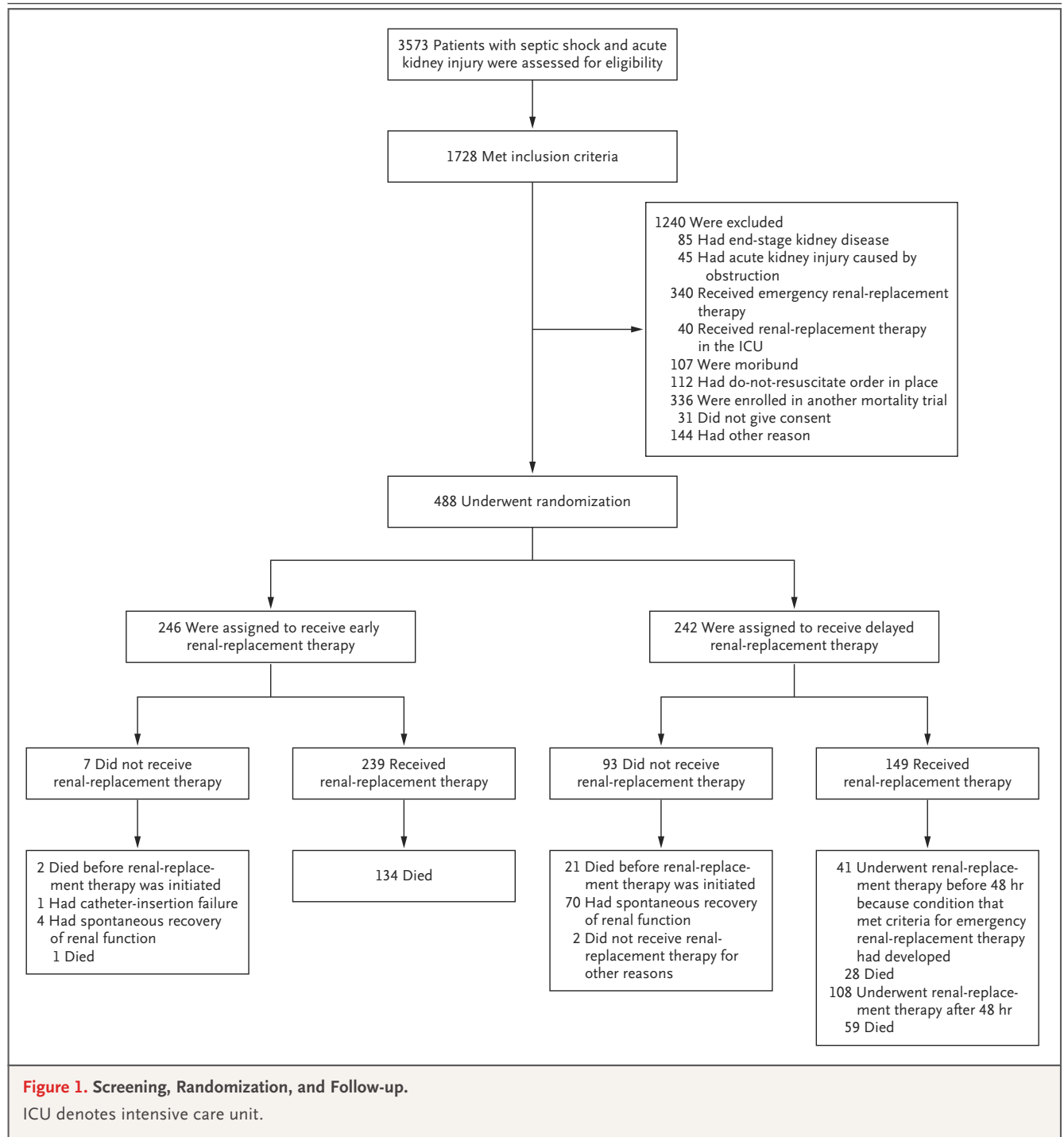
### BASELINE CHARACTERISTICS

There were no significant differences in baseline characteristics between the groups (Table 1, and Table S4 in the Supplementary Appendix). In addition, diagnostic criteria for acute kidney injury did not differ between the two groups. The frequency of chronic renal failure was higher in the delayed-strategy group, and exposure to nephrotoxic agents was higher in the early-strategy group, but neither difference was significant.

### INITIATION OF RENAL-REPLACEMENT THERAPIES

Nearly all patients assigned to the early-strategy group received renal-replacement therapy (239 of 246 patients [97%]). In the delayed-strategy group, 149 of 242 patients (62%) received renal-replacement therapy; of the remaining 93 patients, 70 (29%) did not receive renal-replacement therapy because they had spontaneous recovery of renal function, 21 (8%) died before renal-replacement therapy was initiated, and 2 (1%) did not receive renal-replacement therapy for other reasons (Table S5 in the Supplementary Appendix).

The median time from diagnosis of acute kidney injury to initiation of renal-replacement therapy was 7.6 hours (interquartile range, 4.4 to 11.5) in the early-strategy group and 51.5 hours (interquartile range, 34.6 to 59.5) in the delayed-strategy group ( $P < 0.001$ ). Criteria for emergency renal-replacement therapy were met in 41 patients in the delayed-strategy group (17%), who thus received renal-replacement therapy before the 48-hour delay had taken place. Patient characteristics at the time of initiation of renal-replacement therapy are provided in Table S6 in the Supplementary Appendix.



**PRIMARY OUTCOME**

Follow-up data at 90 days were available for 477 patients (98%). The early initiation of renal-replacement therapy did not result in lower mortality at 90 days than the delayed strategy; 138 of 239 patients (58%) in the early-strategy group died and 128 of 238 patients (54%) in the delayed-strategy group died (P=0.38) (Table 2).

Further stratification according to center and adjustment for preexisting chronic renal failure and exposure to nephrotoxic agents did not change the results.

**SECONDARY OUTCOMES**

The delayed strategy resulted in a significantly larger number of days free of renal-replacement

**Table 1. Characteristics of the Patients at Baseline.\***

Characteristic	Early Strategy (N = 246)	Delayed Strategy (N = 242)
Age — yr	69.3±11.6	68.7±12.8
Sex — no. (%)		
Male	142 (58)	154 (64)
Female	104 (42)	88 (36)
Body-mass index†	28.8±7.7	29.0±8.3
Coexisting conditions — no. (%)		
Chronic renal failure	32 (13)	44 (18)
Hypertension	145 (59)	137 (57)
Diabetes	80 (33)	69 (29)
Congestive heart failure‡	20 (8)	20 (8)
Chronic respiratory failure	19 (8)	10 (4)
Chronic liver disease	31 (13)	31 (13)
Immunosuppression	69 (28)	74 (31)
Median days in hospital before ICU admission (IQR)	1 (1–2)	1 (1–3)
SAPS II at ICU admission§	65.1±16.5	64.1±15.6
SOFA score at enrollment¶	12.2±2.9	12.4±2.9
Exposure to at least one nephrotoxic agent within 4 days before randomization — no. (%)	128 (52)	106 (44)
Multiple organ support in ICU — no. (%)		
Invasive mechanical ventilation	219 (89)	213 (88)
Vasopressor support with norepinephrine or epinephrine	246 (100)	242 (100)
Inotropic support with dobutamine	52 (21)	58 (24)
Extracorporeal membrane oxygenation	1 (<1)	9 (4)
Diagnostic criteria for acute kidney injury at the failure stage of the RIFLE classification — no. (%)		
Oliguria	86 (35)	80 (33)
Anuria	83 (34)	88 (36)
Serum creatinine 3 times the baseline level**	156 (63)	149 (62)
Serum creatinine before ICU admission — mg/dl**	1.01±0.49	1.06±0.50
Serum creatinine at enrollment — mg/dl	3.21±1.48	3.40±1.60
Blood urea nitrogen — mg/dl	59.2±26.9	63.1±30.0
Serum potassium — mmol/liter	4.3±0.8	4.5±0.9
Serum bicarbonate — mmol/liter	17.7±5.0	17.7±4.5
Fluid balance before enrollment — ml/24 hr	3194±2352	3211±2244

\* Plus-minus values are means ±SD. There were no significant between-group differences in the characteristics at baseline. To convert the values for creatinine to micromoles per liter, multiply by 88.4. To convert the values for blood urea nitrogen to millimoles per liter, multiply by 0.357. ICU denotes intensive care unit, and IQR interquartile range.

† The body-mass index is the weight in kilograms divided by the square of the height in meters.

‡ This category includes patients who had a New York Heart Association class of III or IV.

§ The Simplified Acute Physiology Score (SAPS) II ranges from 0 to 163, with higher scores indicating more severe disease and a higher risk of death.

¶ The Sepsis-related Organ Failure Assessment (SOFA) score ranges from 0 to 24, with higher scores indicating more severe organ failure.

|| The failure stage of the risk, injury, failure, loss, and end-stage kidney disease (RIFLE) classification is defined as a serum creatinine level 3 times the baseline level (or ≥4 mg per deciliter with a rapid increase of ≥0.5 mg per deciliter), oliguria (urine output <0.3 ml per kilogram of body weight per hour for ≥24 hours), or anuria for 12 hours or more.

\*\* The baseline serum creatinine level either was determined with the use of values measured in the 12 months preceding the ICU stay or was estimated.

therapy (median days, 16; interquartile range, 2 to 28) than the early strategy (median days, 12; interquartile range, 1 to 25) ( $P=0.006$ ). There were no significant differences between the groups in the other secondary outcomes, namely mortality at 28 days and 180 days, number of days free of mechanical ventilation and vasopressors, and length of ICU and hospital stay (Table 2, and Table S7 in the Supplementary Appendix). Overall survival estimated with the Kaplan–Meier method is shown in Figure 2. The rate of dependence on renal-replacement therapy among survivors at 28 days did not differ significantly between the groups (13% in the early-strategy group and 12% in the delayed-strategy group;  $P=0.89$ ). Details of renal-replacement therapy techniques and settings are provided in Table S8 in the Supplementary Appendix.

#### SAFETY

In the delayed-strategy group, a condition meeting at least one criterion for emergency renal-replacement therapy developed in 41 patients (17%); 28 of these patients died. Metabolic abnormalities observed in the first 7 days after enrollment were more common in the delayed-strategy group than in the early-strategy group; 9 patients (4%) in the delayed-strategy group had severe hyperkalemia (with a median potassium level of 7.0 mmol per liter [interquartile range, 6.7 to 7.3]), whereas no patients in the early-strategy group had hyperkalemia ( $P=0.03$ ) (Table 3). There were no significant differences between the groups in other adverse events.

#### FLUID BALANCE

There was no significant difference between the groups in fluid balance in the 24 hours before randomization, in the 48 hours after enrollment, or at 7 days. Details are provided in Table S9 in the Supplementary Appendix.

### DISCUSSION

Our trial addressed the question of the timing of renal-replacement therapy specifically in a homogeneous population of patients with severe acute kidney injury who were in the early phase of septic shock. In this population, a strategy of early initiation of renal-replacement therapy did not result in lower mortality at 90 days than a strategy in which initiation of renal-replacement therapy was delayed by 48 hours. There was less

use of renal-replacement therapy in the delayed-strategy group; 38% of patients did not undergo renal-replacement therapy (75% of these patients had spontaneous recovery of renal function). The overall mortality was 55%, corresponding exactly to our working hypothesis, which was based on published data.<sup>4-7</sup>

Recently, two randomized, controlled trials<sup>12,13</sup> explored the question of the timing of initiation of renal-replacement therapy, but their results were conflicting. Our results are similar to those reported by Gaudry and colleagues,<sup>12</sup> who enrolled more than 600 patients who were admitted to the ICU with acute kidney injury of Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) classification stage 3 (serum creatinine 3 times the baseline level or  $\geq 4$  mg per deciliter, urine output  $<0.3$  ml per kilogram per hour for  $\geq 24$  hours, or anuria for  $\geq 12$  hours; stages range from 1 to 3, with higher stages indicating more severe kidney injury); they found no significant difference in mortality at 60 days when comparing a strategy of early renal-replacement therapy with a delayed strategy in which renal-replacement therapy was initiated only if prespecified criteria were met. A post hoc analysis involving 348 patients with septic shock (56% of the overall population) had similar results.<sup>20</sup> The second trial<sup>13</sup> was a single-center, randomized, controlled trial that enrolled 231 patients with acute kidney injury of KDIGO stage 2 (serum creatinine level 2.0 to 2.9 times the baseline level or urine output  $<0.5$  ml per kilogram per hour for  $\geq 12$  hours) and showed the opposite result — significantly lower mortality at 90 days in the group assigned to early initiation than in the group assigned to delayed initiation. Differences in inclusion criteria and dialysis techniques might explain the discrepancies in the results between that trial and our current trial.

The potential advantage of earlier initiation of dialysis in acute kidney injury is that it may improve acid–base, electrolyte, and fluid balance, thereby preventing more severe complications of acute kidney injury and perhaps also enhancing removal of toxins.<sup>21</sup> However, in our trial we did not observe lower mortality with early initiation than with delayed initiation. Thus, our results did not confirm our hypothesis that a strategy of early renal-replacement therapy could improve fluid balance and outcomes in this specific population. A possible explanation is that fluid removal with renal-replacement therapy cannot be

**Table 2. Primary and Secondary Outcomes.\***

Variable	Early Strategy (N=246)	Delayed Strategy (N=242)	P Value
<b>Primary outcome</b>			
Death at 90 days — no./total no. (%)	138/239 (58)	128/238 (54)	0.38
<b>Secondary outcomes</b>			
Death at 28 days — no. (%)	111 (45)	102 (42)	0.48
Death at 180 days — no./total no. (%)	143/236 (61)	134/235 (57)	0.37
Median time from diagnosis of failure-stage acute kidney injury to initiation of renal-replacement therapy (IQR) — hr†	7.6 (4.4–11.5)	51.5 (34.6–59.5)	<0.001
Patients who received renal-replacement therapy — no. (%)	239 (97)	149 (62)	<0.001
Patients in the delayed-strategy group who received emergency renal-replacement therapy before 48 hr, according to criterion — no. (%)‡		41 (17)	
<b>Metabolic acidosis</b>			
No. of patients (%)		20 (8)	
Median pH (IQR)		7.10 (7.06–7.13)	
<b>Hyperkalemia</b>			
No. of patients (%)		9 (4)	
Median potassium level (IQR) — mmol/liter		7.0 (6.7–7.3)	
<b>Fluid overload — no. (%)</b>			
Other criterion — no. (%)§		6 (2)	
Median days of renal-replacement therapy (IQR)	4 (2–8)	2 (0–6)	<0.001
Median days free of renal-replacement therapy (IQR)¶	12 (1–25)	16 (2–28)	0.006
Median days free of mechanical ventilation (IQR)¶	2 (0–19)	3 (0–21)	0.19
Median days free of vasopressors (IQR)¶	16 (0–25)	17 (0–25)	0.87
<b>Median length of ICU stay (IQR) — days</b>			
Survivors	12 (8–21)	12 (8–21)	0.88
Nonsurvivors	5 (2–15)	6 (3–14)	0.64
<b>Median length of hospital stay (IQR) — days</b>			
Survivors	22.0 (9.0–38.0)	21.0 (10.0–42.5)	0.53
Nonsurvivors	25 (15–53)	42 (33–56)	0.08
<b>SOFA score without renal component  </b>			
Day 1	9.3±3.5	9.3±3.2	0.84
Day 2	8.6±3.8	8.4±3.9	0.57
Day 3	8.0±4.0	7.8±4.1	0.64
Day 7	5.9±3.8	6.3±3.9	0.30
<b>Fluid balance — ml</b>			
Cumulative fluid balance after day 2	3737±3925	3437±3371	0.40
Cumulative fluid balance at day 7	5570±8761	5878±7472	0.75
<b>Receipt of diuretics from day 0 to 7</b>			
No. of patients (%)	121 (49)	124 (51)	0.65
Median cumulative dose of furosemide from day 0 to 7 (IQR) — mg	215 (65–760)	295 (80–1160)	0.18
<b>Dependence on renal-replacement therapy among survivors — no./total no. (%)</b>			
Day 28	17/134 (13)	17/140 (12)	0.89
Day 90	2/101 (2)	3/110 (3)	1.00



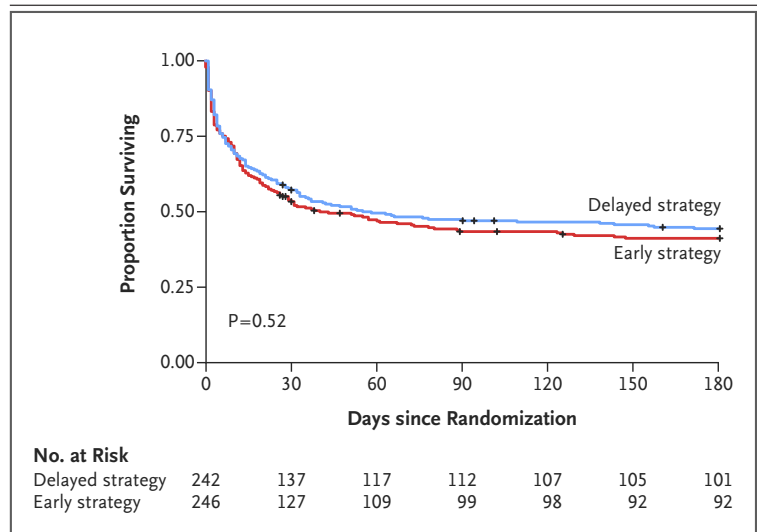
**Table 2. (Continued.)**

Variable	Early Strategy (N=246)	Delayed Strategy (N=242)	P Value
Creatinine — mg/dl**			
At ICU discharge	2.00±1.26	2.19±1.47	0.15
At hospital discharge	1.46±0.98	1.61±1.30	0.31

\* Plus-minus values are means ±SD.  
 † Acute kidney injury in failure stage was defined according to the RIFLE classification.  
 ‡ This category includes patients in the delayed-strategy group who met criteria for emergency renal-replacement therapy. Metabolic acidosis was defined as a pH less than 7.15 and a base deficit of more than 5 mmol per liter or a bicarbonate level of 18 mmol or less per liter. Hyperkalemia was defined as a potassium level of more than 6.5 mmol per liter with characteristic electrocardiographic changes. The median pH and median potassium values were calculated only in patients who underwent renal-replacement therapy because they met these specific criteria. Fluid overload was defined as extravascular fluid overload that was refractory to diuretics, with pulmonary edema. Other reasons included worsening of the patient’s clinical status, with acidosis and hyperkalemia below the prespecified threshold, associated with hyperlactatemia, with the need for emergency renal-replacement therapy as determined by the clinician treating the patient.  
 § Other criterion was worsening of multiple organ failure that mandated the initiation of renal-replacement therapy in the opinion of the clinician caring for the patient, confirmed by an increase of at least 2 points in the SOFA score (not a prespecified criterion for emergency renal-replacement therapy).  
 ¶ The number of days free of renal-replacement therapy, mechanical ventilation, or vasopressor therapy was calculated according to the number of days the patient was alive without the intervention at day 28; patients who died were assigned zero free days.  
 || In patients who received renal-replacement therapy, the renal component of the SOFA score was calculated on the basis of urine output only.  
 \*\* Creatinine values are for all living patients who were no longer receiving renal-replacement therapy.

performed easily or safely in patients with hemodynamic instability in the early phases of septic shock, so starting such therapy earlier would not improve fluid balance.

Our results show that initiating renal-replacement therapy too early could unnecessarily expose patients in whom renal dysfunction would have recovered spontaneously to the risks associated with renal-replacement therapy. Indeed, 29% of the patients in the delayed-strategy group did not require renal-replacement therapy because they had spontaneous recovery of renal function, although 26% of these patients (18 of 70 patients) subsequently died, which is similar to rates reported in other studies.<sup>22</sup> It is possible that more patients might have recovered without renal-replacement therapy if the delay had been longer than 48 hours, as was observed in a recent study.<sup>12</sup> Mortality was higher among patients assigned to the delayed-strategy group who met criteria for emergency renal-replacement therapy (68% [28 of 41 patients]) than among those who did not meet the criteria. However, the development of these complications may be identifying a subgroup of patients with more severe underlying disease, and we cannot conclude that death was related to the delay in renal-replacement therapy or that earlier initiation of renal-replacement therapy would have saved a given patient.



**Figure 2. Overall Survival among Patients Assigned to Early Renal-Replacement Therapy and Delayed Renal-Replacement Therapy.**

In the early-strategy group, renal-replacement therapy was initiated within 12 hours after documentation of acute kidney injury. In the delayed-strategy group, renal-replacement therapy was initiated 48 hours after the documentation of acute kidney injury, if renal recovery had not occurred. If criteria for emergency renal-replacement therapy were met by a patient in this group, renal-replacement therapy was initiated as soon as possible. The tick marks indicate censored data. The P value is for the comparison of overall survival between the two groups.

Although our trial did not show any benefit to expediting the initiation of renal-replacement therapy in the absence of emergency criteria, our

**Table 3. Complications and Adverse Events.**

Complication or Adverse Event	Early Strategy (N=246)	Delayed Strategy (N=242)	P Value
<b>Complications potentially related to acute kidney injury or renal-replacement therapy in the first 7 days after enrollment</b>			
Metabolic acidosis*			
No. of patients (%)	22 (9)	40 (17)	0.07
Median pH (IQR)	7.1 (7.1–7.1)	7.1 (7.0–7.1)	0.36
Hyperkalemia†			
No. of patients (%)	0	10 (4)	0.03
Median potassium level (IQR) — mmol/liter	—	7.0 (6.7–7.3)	—
Fluid overload — no. of patients (%)‡	1 (<1)	9 (4)	0.16
Severe cardiac-rhythm disorder — no. of patients (%)§	23 (10)	13 (5)	0.77
Symptomatic bradycardia	15 (6)	11 (4)	0.67
Ventricular tachycardia or ventricular fibrillation	10 (4)	3 (1)	0.25
Severe bleeding event¶			
No. of patients (%)	12 (5)	15 (6)	0.52
Median volume of packed red cells transfused per patient (IQR) — units	4.0 (3.5–7.0)	5.0 (3.0–7.0)	0.98
Hypotensive episode during renal-replacement therapy			
No. of patients/total no. (%)	86/239 (36)	57/149 (38)	0.62
Median mean arterial pressure of the most severe episode (IQR)	47 (40–52)	44 (36–52)	0.40
<b>Other adverse events that occurred during the trial — no. of patients (%)</b>			
Other cardiovascular complication	94 (38)	95 (39)	0.81
New infection	55 (22)	44 (18)	0.25
Respiratory complication	25 (10)	36 (15)	0.11
Gastrointestinal complication	32 (13)	25 (10)	0.36
Neurologic complication	29 (12)	20 (8)	0.19
Thrombotic or embolic complication	13 (5)	14 (6)	0.81
Minor bleeding event¶	52 (21)	53 (22)	0.84
Other hematologic complication	22 (9)	23 (10)	0.83
Other metabolic complication**	9 (4)	8 (3)	0.83

\* Metabolic acidosis was defined as a pH of less than 7.15 and a base deficit of more than 5 mmol per liter or a bicarbonate level of 18 mmol or less per liter.

† Hyperkalemia was defined as a potassium level of more than 6.5 mmol per liter with characteristic electrocardiographic changes.

‡ Fluid overload was defined as extravascular fluid overload that was refractory to diuretics with pulmonary edema.

§ Severe cardiac-rhythm disorders were defined as ventricular tachycardia, ventricular fibrillation, torsades de pointes, third-degree atrioventricular block, or extreme bradycardia requiring medical treatment.

¶ Severe bleeding events were defined as the need for transfusion of 3 or more consecutive units of packed red cells in the same day. Minor bleeding events were defined as the need for transfusion of less than 3 units of packed red cells in the same day.

|| Hypotensive episodes during renal-replacement therapy were defined as a mean arterial pressure of 55 mm Hg or less and an increase in vasopressor dose or a reintroduction of vasopressors. The frequency of this adverse event was calculated only in patients who underwent renal-replacement therapy.

\*\* Other metabolic complications were defined as severe hypophosphatemia (serum phosphate <0.5 mmol per liter [ $<1.5$  mg per deciliter]) or severe hypoglycemia (glucose <2.8 mmol per liter [ $<50$  mg per deciliter]).

results cannot be interpreted as encouraging indefinite deferral of renal-replacement therapy. Rather, our data indicate that the risk of death is not increased if renal-replacement therapy is postponed for at least 48 hours, as long as care is taken to identify patients in whom criteria for emergency renal-replacement therapy are likely to be met.

Our trial has certain limitations. First, we used the failure stage of the RIFLE classification to identify eligible patients. RIFLE was the most commonly used classification for the identification of patients with acute kidney injury at the time the trial was designed. However, studies have shown that RIFLE is not as sensitive as the most recent classification system. Moreover, the failure stage was not necessarily intended to identify patients who would require renal-replacement therapy. The second limitation is the choice of a delay of only 48 hours, which may not be sufficiently long to allow recovery of renal function in some patients or to detect a difference between

early and delayed initiation of renal-replacement therapy. However, we thought that a longer delay would be unethical and unsafe for patients who actually needed renal-replacement therapy.

In conclusion, this trial showed no significant difference in mortality between a strategy of early initiation of renal-replacement therapy and a strategy of delayed initiation in patients with septic shock and severe acute kidney injury but with no immediate, life-threatening complications linked to acute kidney injury.

Supported by a grant (A00519-34) from the Programme Hospitalier de Recherche Clinique National, funded by the French Ministry of Health.

Dr. Jaber reports receiving consulting fees from Dräger Medical, Fisher and Paykel, and Xenios; and Dr. Roger, receiving travel support from MSD and Pfizer. No other potential conflict of interest relevant to this article was reported.

Disclosure forms provided by the authors are available with the full text of this article at NEJM.org.

We thank the staff in the participating ICUs; the clinical research assistants for data entry; Alexandra Felin, project leader (INSERM Centre d'Investigation Clinique-Epidémiologie Clinique 1432, Dijon, France); and Fiona Ecartot (EA3920, University Hospital, Besançon, France) for translation and critical revision.

#### APPENDIX

The authors' full names and academic degrees are as follows: Saber D. Barbar, M.D., Ph.D., Raphaël Clere-Jehl, M.D., Abderrahmane Bourredjem, M.Sc., Romain Hernu, M.D., Florent Montini, M.D., Rémi Bruyère, M.D., Christine Lebert, M.D., Julien Bohé, M.D., Ph.D., Julio Badie, M.D., Jean-Pierre Eraldi, M.D., Jean-Philippe Rigaud, M.D., Ph.D., Bruno Levy, M.D., Ph.D., Shidasp Siami, M.D., Ph.D., Guillaume Louis, M.D., Lila Bouadma, M.D., Ph.D., Jean-Michel Constantini, M.D., Ph.D., Emmanuelle Mercier, M.D., Kada Klouche, M.D., Ph.D., Damien du Cheyron, M.D., Ph.D., Gaël Piton, M.D., Ph.D., Djillali Annane, M.D., Ph.D., Samir Jaber, M.D., Ph.D., Thierry van der Linden, M.D., Ph.D., Gilles Blasco, M.D., Jean-Paul Mira, M.D., Ph.D., Carole Schwebel, M.D., Ph.D., Loïc Chimot, M.D., Philippe Guiot, M.D., Mai-Anh Nay, M.D., Ferhat Meziani, M.D., Ph.D., Julie Helms, M.D., Ph.D., Claire Roger, M.D., Ph.D., Benjamin Louart, M.D., Remi Trusson, M.D., Auguste Dargent, M.D., Christine Binquet, M.D., Ph.D., and Jean-Pierre Quenot, M.D., Ph.D.

The authors' affiliations are as follows: Réanimation Médicale, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Nîmes (S.D.B., B. Louart, R.T.), and Saint Eloi, CHU de Montpellier, Université de Montpellier, and INSERM Unité 1046 (S.J.), Service de Réanimation Médicale, CHU Lapeyronie (K.K.), Montpellier, Université de Strasbourg, Faculté de Médecine, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Service de Réanimation, Nouvel Hôpital Civil, Strasbourg (R.C.-J., F. Meziani, J.H.), Service de Médecine Intensive Réanimation, Hôpital Universitaire François Mitterrand, and Lipness Team, INSERM Research Center Lipids, Nutrition, Cancer-Unité Mixte de Recherche 1231 and Laboratoire d'Excellence LipSTIC (A.D., J.-P.Q.), and Centre d'Investigation Clinique-Epidémiologie Clinique, CHU Dijon-Bourgogne and INSERM Centre d'Investigation Clinique 1432, Université de Bourgogne, Dijon (A.B., C.B., J.-P.Q.), Réanimation Médicale, Hôpital Edouard Herriot, Hospices Civils de Lyon, Lyon (R.H.), Réanimation Polyvalente, Centre Hospitalier d'Avignon, Avignon (F. Montini), Réanimation Polyvalente, Centre Hospitalier de Bourg-en-Bresse, Bourg-en-Bresse (R.B.), Service de Médecine Intensive-Réanimation, Centre Hospitalier de La Roche-sur-Yon, La Roche-sur-Yon (C.L.), Intensive Care Unit, Hospices Civils de Lyon, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Pierre-Bénite (J. Bohé), Réanimation Polyvalente, Hôpital Nord Franche-Comté, Belfort (J. Badie), Médecine Intensive Réanimation, Centre Hospitalier de Dieppe, Dieppe (J.-P.E., J.-P.R.), Service de Réanimation Médicale, CHU de Nancy-Brabois, Nancy (B. Levy), Service d'Anesthésie-Réanimation, Centre Hospitalier d'Etampes, Etampes (S.S.), Réanimation Polyvalente, Hôpital Bon Secours, Centre Hospitalier Régional de Metz, Metz (G.L.), Infection, Antimicrobiens, Modélisation, Evolution, Unité 1137, Team Decision Sciences in Infectious Disease Prevention, Control, and Care, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, and Medical and Infectious Diseases ICU, Bichat-Claude-Bernard Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (L.B.), and Service de Réanimation Médicale, Hôpital Cochin (J.-P.M.), Paris, Pôle de Médecine Péri-Opératoire, GrE, and INSERM Unité 1103, CHU Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand (J.-M.C.), Service de Réanimation Médicale, CHU Régional de Tours, Tours (E.M.), CHU de Caen, Service de Réanimation Médicale, Caen (D.C.), Service de Réanimation Médicale (G.P.) and Service de Réanimation Chirurgicale (G.B.), CHU de Besançon, Besançon, Service de Médecine Intensive et Réanimation, Hôpital Raymond Poincaré, Garches (D.A.), Laboratory of Infection and Inflammation, INSERM Unité 1173, University of Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, Montigny-le-Bretonneux (D.A.), Service de Médecine Intensive Réanimation, Groupe des Hôpitaux de l'Institut Catholique de Lille, Université Catholique de Lille, Lille (T.L.), Service de Réanimation Médicale, CHU de Grenoble, Grenoble (C.S.), Service de Réanimation, Centre Hospitalier de Périgueux, Périgueux (L.C.), Service de Réanimation Polyvalente, Centre Hospitalier Général de Mulhouse, Mulhouse (P.G.), Médecine Intensive Réanimation, Centre Hospitalier Régional d'Orléans, Orléans (M.-A.N.), and Réanimation Chirurgicale-CHU de Nîmes, Nîmes (C.R.) — all in France.

## REFERENCES

1. Hoste EA, Bagshaw SM, Bellomo R, et al. Epidemiology of acute kidney injury in critically ill patients: the multinational AKI-EPI study. *Intensive Care Med* 2015; 41:1411-23.
2. Mehta RL, Cerda J, Burdmann EA, et al. International Society of Nephrology's 0by25 initiative for acute kidney injury (zero preventable deaths by 2025): a human rights case for nephrology. *Lancet* 2015;385: 2616-43.
3. Quenot JP, Binquet C, Kara F, et al. The epidemiology of septic shock in French intensive care units: the prospective multicenter cohort EPISS study. *Crit Care* 2013; 17:R65.
4. Bagshaw SM, George C, Bellomo R. Early acute kidney injury and sepsis: a multicentre evaluation. *Crit Care* 2008;12:R47.
5. The RENAL Replacement Therapy Study Investigators. Intensity of continuous renal-replacement therapy in critically ill patients. *N Engl J Med* 2009;361: 1627-38.
6. The VA/NIH Acute Renal Failure Trial Network. Intensity of renal support in critically ill patients with acute kidney injury. *N Engl J Med* 2008;359:7-20.
7. Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, et al. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *JAMA* 2005;294:813-8.
8. 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* 2016;20:61.
9. Bellomo R, Kellum JA, Ronco C, et al. Acute kidney injury in sepsis. *Intensive Care Med* 2017;43:816-28.
10. Payen D, Mateo J, Cavaillon JM, Fraise F, Floriot C, Vicaut E. Impact of continuous venovenous hemofiltration on organ failure during the early phase of severe sepsis: a randomized controlled trial. *Crit Care Med* 2009;37:803-10.
11. Piccinni P, Dan M, Barbacini S, et al. Early isovolaemic haemofiltration in oliguric patients with septic shock. *Intensive Care Med* 2006;32:80-6.
12. Gaudry S, Hajage D, Schortgen F, et al. Initiation strategies for renal-replacement therapy in the intensive care unit. *N Engl J Med* 2016;375:122-33.
13. Zarbock A, Kellum JA, Schmidt C, et al. Effect of early vs delayed initiation of renal replacement therapy on mortality in critically ill patients with acute kidney injury: the ELAIN randomized clinical trial. *JAMA* 2016;315:2190-9.
14. Barbar SD, Binquet C, Monchi M, Bruyère R, Quenot JP. Impact on mortality of the timing of renal replacement therapy in patients with severe acute kidney injury in septic shock: the IDEAL-ICU study (initiation of dialysis early versus delayed in the intensive care unit): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 2014; 15:270.
15. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P. Acute renal failure — definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs. *Crit Care* 2004;8:R204-R212.
16. Vincent JL, Moreno R, Takala J, et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. *Intensive Care Med* 1996; 22:707-10.
17. Brochard L, Abroug F, Brenner M, et al. An official ATS/ERS/ESICM/SCCM/SRLF statement: Prevention and Management of Acute Renal Failure in the ICU Patient: an international consensus conference in intensive care medicine. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;181:1128-55.
18. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Acute Kidney Injury Work Group. KDIGO clinical practice guideline for acute kidney injury. *Kidney Int Suppl* 2012;2:1-138.
19. Peto R, Pike MC, Armitage P, et al. Design and analysis of randomized clinical trials requiring prolonged observation of each patient. I. Introduction and design. *Br J Cancer* 1976;34:585-612.
20. Gaudry S, Hajage D, Schortgen F, et al. Timing of renal support and outcome of septic shock and acute respiratory distress syndrome: a post hoc analysis of the AKIKI randomized clinical trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2018;198:58-66.
21. Wald R, Bagshaw SM. The timing of renal replacement therapy initiation in acute kidney injury: is earlier truly better? *Crit Care Med* 2014;42:1933-4.
22. Wald R, Adhikari NK, Smith OM, et al. Comparison of standard and accelerated initiation of renal replacement therapy in acute kidney injury. *Kidney Int* 2015;88: 897-904.

Copyright © 2018 Massachusetts Medical Society.

## CLINICAL TRIAL REGISTRATION

The *Journal* requires investigators to register their clinical trials in a public trials registry. The members of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) will consider most reports of clinical trials for publication only if the trials have been registered. Current information on requirements and appropriate registries is available at [www.icmje.org/about-icmje/faqs/](http://www.icmje.org/about-icmje/faqs/).





## Effet de l'inhibition ciblée des interférons de type I sur l'endothélium vasculaire au cours du sepsis

### Résumé

Le sepsis résulte d'une dysfonction de la réponse immunitaire de l'hôte en réponse à une infection, et se caractérise par une hyper-inflammation initiale, à l'origine d'une dysfonction endothéliale. Cette dysfonction endothéliale est fortement impliquée dans la survenue de la coagulation intravasculaire disséminée (CIVD). Toutefois, les mécanismes par lesquels l'hyper-inflammation initiale se complique d'une dysfonction endothéliale et d'une CIVD demeurent mal compris. Notre travail s'est intéressé au rôle des interférons (IFNs) de type I et de leur voie de signalisation sur la dysfonction endothéliale au cours du sepsis.

Nous avons montré que les souris déficientes en récepteur de l'IFN- $\alpha$  (*Ifnar1*<sup>-/-</sup>) étaient protégées face au choc septique induit par ligature et perforation cœcale (CLP), en lien avec une réduction des marqueurs d'inflammation, et de dysfonction endothéliale, aux niveaux aortique et rénal.

Nous avons conforté ces résultats, chez l'Homme, en montrant une corrélation entre l'IFN- $\alpha$  et la présence d'une CIVD. L'IFN- $\alpha$  était également corrélé au niveau plasmatique de microparticules endothéliales circulantes exprimant le CD105. Ces corrélations n'étaient pas retrouvées avec les IFNs de types II et III. Enfin, nous avons montré que les souris présentant un déficit endothélial en *Ifnar1*, ou en sa voie de signalisation *Stat1*, présentent également une protection partielle face au choc septique. Le déficit *Stat1* endothélial était associé à une réduction des marqueurs d'activation endothéliale et de coagulopathie.

Ainsi, notre travail confirme que l'inhibition de la voie de signalisation des IFNs de type I (STAT1), ciblée sur l'endothélium, réduit la dysfonction endothéliale au cours du sepsis, ouvrant des perspectives thérapeutiques centrées sur l'endothélium.

**Mots clés :** sepsis, endothélium, coagulation intravasculaire disséminée, interférons, STAT1

### Résumé en anglais

Sepsis results from a dysregulated host response to infection, characterized by an initial hyperinflammation with subsequent endothelial dysfunction. This endothelial dysfunction is involved in the onset of disseminated intravascular coagulation (DIC). However, molecular mechanisms linking hyperinflammation to endothelial dysfunction are poorly understood. Our work has focused on the role of type I interferons (IFNs) and their signaling pathway on endothelial dysfunction in sepsis.

We have shown that IFN- $\alpha$  receptor-deficient mice (*Ifnar1*<sup>-/-</sup>) were protected against septic shock induced by cecal ligation and puncture (CLP), which was associated with a reduction in markers of inflammation, and endothelial dysfunction, in the aorta and kidneys.

We have confirmed these results in humans by showing a correlation between IFN- $\alpha$  and the presence of DIC. IFN- $\alpha$  was also correlated with the plasma level of circulating endothelial microparticles expressing CD105. These correlations were not found with type II and III IFNs.

Finally, we have shown that mice exhibiting an endothelial deficiency in *Ifnar1*, or in its *Stat1* signaling pathway, also exhibit partial protection against septic shock. Endothelial *Stat1* deficiency was associated with reduced markers of endothelial activation and coagulopathy.

Thus, our work confirms that the inhibition of the signaling pathway of type I IFNs (STAT1), targeted on the endothelium, reduces endothelial dysfunction during sepsis, offering endothelium-targeted therapeutic perspectives.

**Key words:** sepsis, endothelium, disseminated intravascular coagulation, interferons, STAT1