

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE
Ecole doctorale BIOLOGIE SANTE

Année 2011

**Activation endothéliale et sepsis :
Régulation du récepteur endothélial de la protéine C
et
Mécanismes d'action de la protéine C activée**

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie Médecine Santé

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée

et soutenue publiquement par :

Christophe GUITTON

Le 06 avril 2011, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs :

Pr. Delphine BORGEL, Paris

Pr. Jean-Paul MIRA, Paris

Examineur :

Pr. Gilles POTEL, Nantes

Directeur de Thèse:

Dr. Béatrice CHARREAU, Nantes

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS	1
LISTE DES FIGURES	4
LISTE DES TABLEAUX	6
AVANT PROPOS	7
Partie 1] INTRODUCTION GENERALE	8
I) L'endothélium	8
I. A) Description générale	8
I. B) Description histologique	8
I. C) Hétérogénéité des cellules endothéliales	10
I. D) Les grandes fonctions physiologiques de l'endothélium	10
I. D. 1) Angiogenèse /Vasculogénèse	11
I. D. 1. a) La vasculogénèse	11
I. D. 1. b) L'angiogénèse	12
I. D. 2) Tonus vasculaire	12
I. D. 3) Hémostase : Anticoagulation / Procoagulation	13
I. D. 3. a) Endothélium et Hémostase primaire	13
I. D. 3. b) Propriétés pro-coagulantes	14
I. D. 3. c) Propriétés anti coagulantes	16
I. D. 3. d) Propriétés pro-fibrinolytiques	17
I. D. 4) Réponse immune et inflammatoire aiguë : interaction avec les leucocytes	18
I. D. 4. a) L'activation endothéliale de type 1	18
I. D. 4. b) L'activation endothéliale de type 2	20
I. D. 5) Réponse inflammatoire chronique	23
II) Sepsis sévère	24
II. A) Définitions	24
II. A. 1) Le SIRS	25
II. A. 2) L'infection	25
II. A. 3) Le sepsis	25
II. A. 4) Le sepsis sévère	26
II. A. 5) Le choc septique	26
II. B) Epidémiologie	27
II. B. 1) Epidémiologie générale	27
II. B. 2) Principaux facteurs de risques	28
II. B. 3) Principaux sites d'infection au cours du sepsis sévère	28

II. B. 4) Principaux germes en cause au cours du sepsis sévère	29
II. C) Physiopathologie du sepsis sévère	30
II. C. 1) La réponse inflammatoire	30
II. C. 2) La réponse pro coagulante	31
III) Sepsis : endothélium, hémostase et inflammation	33
III. A) Impact clinique	33
III. B) Impact thérapeutique	34
Partie 2] LE RECEPTEUR ENDOTHELIAL DE LA PROTEINE C : EPCR	36
I) Historique	36
II) Description	36
II. A) Structure : du gène à la protéine	36
II. B) EPCR : Propriétés anticoagulantes	38
II. B. 1) EPCR : cofacteur d'activation de la protéine C	38
II. B. 2) EPCR : site de liaison avec le facteur VII/VIIa	39
II. C) Expression et localisation de l'EPCR	40
II. D) La forme soluble d'EPCR	41
II. D. 1) Description de l'EPCR soluble	41
II. D. 2) Facteurs influençant les taux circulants d'EPCR	42
II. D. 2. a) L'haplotype A3	42
II. D. 2. b) Le sexe	43
III) Régulation des formes membranaires et solubles de l'EPCR	43
IV) Fonctions « anti inflammatoires » de l'EPCR	44
IV. A) L'EPCR est primordial au cours de l'inflammation	44
IV. B) EPCR soluble et sepsis	45
IV. B. 1) L'EPCR soluble est augmenté au cours du sepsis sévère	46
IV. B. 2) L'EPCR soluble n'est pas modifié au cours du sepsis sévère	47
IV. B. 3) L'EPCR soluble est sous exprimé au cours du sepsis sévère	48
IV. B. 4) EPCR soluble et sepsis : Synthèse :	48
Partie 3] LA PROTEINE C / PROTEINE C ACTIVEE	50
I) PC/PCa : Structure	50
II) PCa : Activités anti coagulantes et pro fibrinolytiques	51
II. A) PCa : effets Anti coagulants	51
II. B) PCa : effets Pro fibrinolytiques	51
III) La PCa : Effets protecteurs au cours de l'inflammation	52
III. A) Inflammation et système de la PCa	52
III. B) La PCa : Effets cytoprotecteurs	54

III. B. 1) Le récepteur PAR	55
III. B. 2) Role de la PCa dans l'expression des gènes	56
III. B. 3) PCa : Effets sur le rôle de barrière endothéliale	59
III. B. 4) PCa : Effets Anti apoptotiques	60
III. B. 5) PCa : Effets Anti inflammatoire	60
III. C) La PCa : Effets vasculaires et hémodynamiques	61
Partie 4] OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE	63
I) Régulation des formes membranaires et solubles de l'EPCR	64
I. A) Contexte	64
I. B) Objectifs	64
II) Mécanismes d'action de la PCa	65
II. A) Contexte	65
II. B) Objectifs	65
III) Organisation du travail de thèse	66
III. A) Etude clinique	66
III. B) Analyses de laboratoire	66
III. C) Rédaction des articles	67
Partie 5] TRAVAUX, RESULTATS ET PUBLICATIONS	68
I) Article 1 : "Circulating Endothelial Cell Protein C Receptor : Endothelial regulation and cumulative impact of gender and A3 haplotype"	68
I. A) Résumé de l'article	68
I. A. 1) Rationnels et Objectifs du travail	68
I. A. 2) Matériels et Méthodes	68
I. A. 2. a) La culture des cellules endothéliales	68
I. A. 2. b) Utilisation d'une bio collection	70
I. A. 3) Résultats	71
I. A. 3. a) Effet de l'inflammation endothéliale	71
I. A. 3. b) Effet de l'haplotype A3	71
I. A. 3. c) Effet du caractère sexuel	72
I. A. 4) Conclusions	72
I. B) Publication	72
I. C) Manuscrit	73
I. D) Résultats additionnels	84
II) Article 2 : "Early rise in circulating Endothelial Protein C Receptor correlates with poor outcome in severe sepsis"	85
II. A) Résumé de l'article	85
II. A. 1) Rationnels et Objectifs	85

II. A. 2)	Matériels et Méthodes	85
II. A. 3)	Résultats	86
II. A. 3. a)	Comparaison patients septiques / patients inflammatoires et volontaires sains	86
II. A. 3. b)	Analyse des cinétiques à la phase initiale du sepsis	86
II. A. 4)	Conclusions	87
II. B)	Publication	87
II. C)	Manuscrit	88
II. D)	Résultats additionnels	116
II. D. 1)	Impact des hémocultures sur la cinétique de l'EPCR	116
II. D. 2)	Paramètres biologiques simples de l'hémostase	117
 III) Article 3 : “Protective cross talk between activated protein C and TNF signaling in vascular endothelial cells : implication of EPCR, non canonical NF-κB, and ERK1/2 MAP kinases” 119		
III. A)	Résumé de l'article	119
III. A. 1)	Rationnels et Objectifs	119
III. A. 2)	Matériels et Méthodes	119
III. A. 3)	Résultats	120
III. A. 3. a)	Modulation des molécules d'adhésion par la PCa	120
III. A. 3. b)	La voie non canonique de NF- κ B pivot de la régulation de VCAM-1 par la PCa	120
III. A. 3. c)	ERK 1/2 activée par la PCa comme signal anti inflammatoire	121
III. A. 3. d)	Rôle respectif de PAR-1 et EPCR dans le signal de la PCa pour induire VCAM-1	122
III. A. 4)	Conclusions	122
III. B)	Publication	122
III. C)	Manuscrit	123
III. D)	Résultats additionnels	136
III. D. 1)	Induction des molécules d'adhésion par la PCa	136
III. D. 2)	Régulation de VCAM-1 par PCa via les voies NF- κ B, et MAPk	137
Partie 6] DISCUSSION & PERSPECTIVES		139
I)	EPCR : acteur et marqueur de l'inflammation	139
II)	Analyse des mécanismes d'action de la PCa	143
III)	Existe-t-il un avenir pour les traitements anti coagulants ?	144
IV)	L'axe PCa/EPCR : Extension vers d'autres pathologies	145
CONCLUSION		147
TABLE DES REFERENCES		148

ABREVIATIONS

AP-1	Activator Protein 1
AT-III	Anti Thrombine III
CE	Cellule endothéliale
CIVD	Coagulation Intra vasculaire Disséminée
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CML	Cellule Musculaire Lisse
COX	Cyclooxygenase
DAG	Diacylglycerol
ECBM	Endothelial Cell Basal Medium
EPCR	Récepteur endothélial de la protéine C
mEPCR	Forme membranaire de l'EPCR
sEPCR	Forme soluble de l'EPCR
E-Sel	E Selectin
F	Facteur
FAC	Flow Activated Cell Sorter
FT	Facteur Tissulaire
FGF	Fibroblast Growth Factor
GAG	Glycosaminoglycanes
GCPR	Récepteur couplé aux protéines G
HAEC	Human Arterial Endothelial Cell
HUVEC	Human Umbilical Venous Endothelial Cell
IAP	Inhibitor of Apoptosis
ICAM	Intracellular Adhesion Molecule
IFN- γ	Interferon gamma
IL	Interleukine
IL-1R1	IL-1 Receptor 1
IP3	Inositol Tri Phosphate
IRAK	IL-1 Receptor Associated Kinase
kDa	Kilodalton
KHPM	Kininogène de Haut Poids moléculaire
LPS	Lipopolysaccharide

MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MCP	Monocyte chemoattractant Protein
MFI	Intensité Moyenne de Fluorescence
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
MLC	Chaines légères de Myosine
MLCK	kinase des chaines légères de la myosine
NO	Monoxyde d'azote
NOS	NO Synthase
eNOS	Endothelial NO Synthase
NF- κ B	Nuclear Factor Kappa B
PAF	Platelet Activating Factor
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1
PAR	Protease activated Receptor
PC	Protéine C
PCa	Protéine C Activée
PCAM	Platelet Cell Adhesion Molecule
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PK	Prékallikrine
PFA	ParaFormaldehyde
PGI ₂	Prostacycline
PLA-2	Phospholipase A-2
PMA	Phorbol 12- Myristate 13-Acetate
PR-3	Protéinase 3
P-Sel	P Selectine
SIRS	Syndrome de réponse Inflammatoire Systémique
SVF	Serum de veau fœtal
RIP-1	Receptor Interacting Protein-1
SAPS II	Simplified Acute Physiology Score II
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment
Si RNA	Short interfering RNA
TACE	Tumor necrosis factor- α Converting Enzyme
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TIRAP	Toll/IL-1 receptor accessory protein (=MAL)

TM	Thrombomoduline
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
TNFR-1	TNF Récepteur-1
tPA	Tissue Plasminogen Activator
TRADD	TNFR-1 Associated Death Domain
TRAF	TNFR-associated Factor
uPA	Urokinase Plasminogen Activator
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
vWF	Von Willebrand Factor

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Endothélium au sein de la structure du vaisseau sanguin	8
Figure 2 : Tapis cellulaire endothélial	9
Figure 3 : Grandes fonctions des cellules endothéliales	11
Figure 4 : Rôle des CE dans l'hémostase primaire	14
Figure 5: Cascades de la coagulation	15
Figure 6 : Régulateurs de la coagulation	16
Figure 7 : Activation endothéliale de type1	19
Figure 8 : Cascade d'adhésion leucocytaire	20
Figure 9 : Inflammation endothéliale de type 2	21
Figure 10 : Sepsis, sepsis sévère, choc septique et SIRS	24
Figure 11 : Mortalité du sepsis sévère	27
Figure 12 : Réponse inflammatoire au cours du sepsis	30
Figure 13 : Réponse pro coagulante au cours du sepsis	31
Figure 14 : Hémostase et sepsis , retentissement clinique	33
Figure 15 : Structure moléculaire de l'EPCR	37
Figure 16 : Forte homologie EPCR / CMH	38
Figure 17 : Effet de l'EPCR sur la protéine C	39
Figure 18 : Expression d'EPCR et TM en immuno histochimie	40
Figure 19 : Taux d'EPCR solubles en fonction de l'haplotype	42
Figure 20 : Importance de l'EPCR in vivo au cours du sepsis	44
Figure 21 : Taux d'EPCR solubles au cours du sepsis	46
Figure 22 : Expression d'EPCR membranaire in vivo (méningococcémie)	47

Figure 23 : Impact de la Protéine C activée au cours du sepsis chez l'animal	53
Figure 24 : Survie sous PCa au cours du sepsis sévère (Etude Prowess)	54
Figure 25 : Le récepteur PAR	55
Figure 26 : La voie NF- κ B	57
Figure 27 : Rôle de la PCa dans le maintien de la barrière endothéliale	59
Figure 28 : Culture de cellules endothéliales à confluence	69
Figure 29 : Impact de l'haplotype A3 pour la regulation des formes solubles d'EPCR	84
Figure 30 : Taux circulants d'EPCR chez les patients septiques : impact des hémocultures positives	116
Figure 31 : Régulation des gènes induite par TNF et PCa	136
Figure 32 : Induction de VCAM-1 par PCa, Implication des voies MAP Kinases et NK- κ B	137

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Description des défaillances viscérales au cours du sepsis sévère	26
Tableau 2 : Principaux sites d'infection au cours du sepsis sévère	29
Tableau 3 : Principaux types de germes en cause au cours du sepsis sévère	29
Tableau 4 : Principaux gènes régulés par la PCa	58
Tableau 5 : Corrélation entre EPCR et paramètres de l'hémostase chez les patients septiques	117

AVANT PROPOS

Le sepsis sévère, syndrome infectieux avec défaillance d'organe, est un problème majeur de santé publique. En effet, ce syndrome se caractérise par sa forte incidence dans la population générale (et qui ne cesse d'augmenter) et surtout par son importante morbidité et mortalité. Il concerne de près le réanimateur médical qui est amené le plus souvent à prendre en charge ces patients, avec un taux de mortalité en réanimation qui diminue progressivement mais qui reste encore élevé (environ 30%). Grâce à la recherche clinique, la prise en charge a essentiellement progressé ces dernières décennies sur l'antibiothérapie, sur la rapidité, sur l'intensité des soins, et sur la suppléance des défaillances viscérales. La recherche a également permis d'améliorer la compréhension physiopathologique de ce syndrome face à l'agression infectieuse et des réactions biologiques qu'elle induit. L'agent infectieux quel qu'il soit, induit une réaction inflammatoire dont la cellule endothéliale est le pivot. Cette activation endothéliale et le cortège de réactions inflammatoires sont fortement intriqués avec l'hémostase.

Au cours de la transplantation d'organe solide comme la transplantation rénale par exemple, l'endothélium est à l'interface entre le sang circulant du receveur et l'organe transplanté et, est là aussi au cœur de la réaction qui va éventuellement déclencher le rejet (notamment aigu). Cette réaction de rejet passe par une activation endothéliale tout à fait proche de celle du sepsis et associée là aussi à des troubles de l'hémostase (Keven, 2010).

Ces syndromes que ce soit infectieux ou de rejet d'organe transplanté se retrouvent sous l'entité dysfonction endothéliale pour laquelle la recherche reste un enjeu important, pour en améliorer la compréhension et les thérapeutiques.

Il existait une logique à ce que se mette en place ce projet de recherche orienté sur l'activation endothéliale au cours de l'inflammation (et notamment du sepsis) dans une équipe de recherche dont la thématique est l'activation endothéliale et ses marqueurs (au cours de la transplantation d'organe).

Partie 1] INTRODUCTION GENERALE

I) L'endothélium

I. A) Description générale

L'endothélium vasculaire est un tapis monocouche semi-perméable de cellules tapissant l'intérieur de tous les vaisseaux sanguins, lui conférant une position tout à fait particulière entre le sang et la paroi vasculaire, puis les tissus (**Figure 1**). Sa simple description morphologique le rapproche d'un organe à part entière avec un nombre de cellules estimé à plus de 10^{13} éléments, une surface globale estimée à plus de 5000 m² (la valeur de 6 terrains de football) et un poids d'environ 1.5kg (Ait-Oufella, 2010).

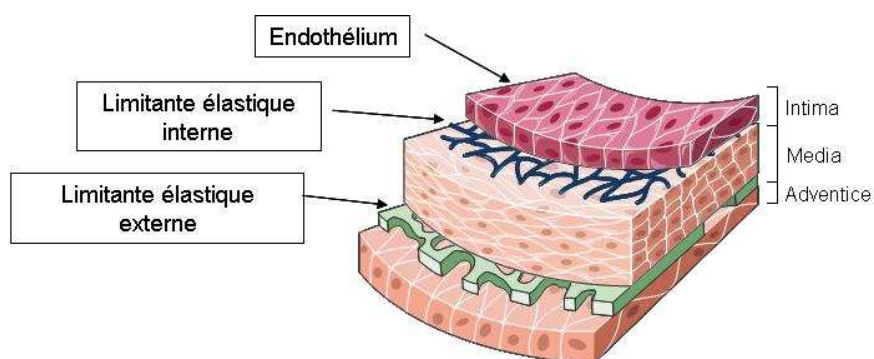


Figure 1 : Endothélium au sein de la structure du vaisseau sanguin

I. B) Description histologique

Ces cellules endothéliales (CE) ont une morphologie particulière. Ce sont des pavés aplatis et allongés, relativement jointifs de 1 à 2 μm d'épaisseur, 100 μm de long par 10 μm de large. Le tapis endothélial, reposant sur la membrane basale, est constitué comme une mosaïque de cellules en losange dont le plus grand axe est orienté dans le sens de la circulation sanguine (**Figure 2**).

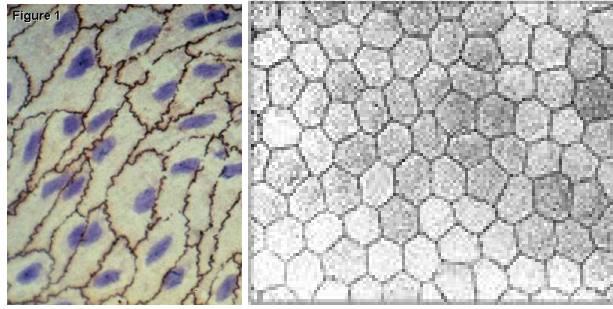


Figure 2 : Tapis cellulaire endothélial

Le tapis cellulaire est recouvert par une fine et très fragile interface : le glycocalyx. Celui-ci correspond à une couche de glycoprotéines, de glycosaminoglycanes (GAG) et de protéoglycanes chargée négativement qui limite le passage des grosses molécules dont les lipoprotéines, et les protéines plasmatiques (Reitsma, 2007). Parmi les GAG, sont concernés notamment l'héparane sulfate et le dermatane sulfate, conférant à l'endothélium des propriétés anticoagulantes. Il existe par contre des petits espaces intercellulaires (20 nm) permettant le passage d'eau et des petites molécules. Ces espaces intercellulaires sont parsemés de complexes protéiques assurant les jonctions et la communication entre les différentes CE («*gap-junction*»).

Ce tapis cellulaire repose sur une membrane basale et une matrice riche en facteurs pro coagulants.

Les CE font donc l'interface entre un contenu nécessitant anti coagulation et un environnement prêt à activer la coagulation.

Enfin, la constitution des CE, éclairée notamment par la microscopie électronique et ses progrès, est marquée par la mise en évidence des cavéoles et des corps de Weibel-Palade. Les cavéoles assurent la transmission des signaux entre l'apex cellulaire et les parties basales ou latérales. Les corps de Weibel-Palade sont des vésicules denses, assurant le stockage de protéines telles que le facteur Von Willebrand (vWF) et la P selectine (P-Sel).

Il est à noter que les propriétés morphologiques et/ou fonctionnelles et/ou histologiques décrites *in vivo* sont modifiées lors de cultures cellulaires *in vitro*, notamment par la disparition de la soumission aux forces de cisaillement. Ces différences fonctionnelles entre *in vivo* et *in vitro* témoignent de la plasticité des CE et doivent inciter à la prudence pour éviter les erreurs d'interprétation des résultats expérimentaux concernant les CE.

I. C) Hétérogénéité des cellules endothéliales

Malgré une origine commune dérivée des cellules mésodermiques, la différenciation cellulaire a conduit à une très grande hétérogénéité des CE, en fonction du type de vaisseaux (artère, veine, capillaire, veine ombilicale), en fonction de la taille des vaisseaux (vaisseau proximal type aortique ou vaisseau distal type artériolaire), et aussi en fonction de l'organe et des tissus (Aird, 2007; Aird, 2007). Cette hétérogénéité si l'on considère l'endothélium comme un organe, devrait conduire à parler non pas d'un *endothelium* mais des « *endothela* ». Ces différences inter cellulaires peuvent être morphologiques (notamment en fonction de l'exposition aux forces de cisaillement), peuvent concerner la perméabilité et les espaces intercellulaires selon le type de vaisseau et les organes impliqués (endothelium continu ou fenestré) et sont aussi le plus souvent fonctionnelles avec des variations de phénotype conséquentes (Auerbach, 1985; Turner, 1987; Aird, 2005). Cette hétérogénéité peut concerner également l'intensité des réponses fonctionnelles aux stimuli (Aird, 2003).

Cette diversité des CE est donc une diversité selon les espèces, les organes, les vaisseaux et leur taille mais aussi selon les individus [exemple, molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)].

Cette hétérogénéité doit là aussi conduire à la prudence quant à l'interprétation des résultats expérimentaux.

I. D) Les grandes fonctions physiologiques de l'endothélium

Contrairement aux croyances historiques qui attribuaient à l'endothélium un simple rôle de « contenant » permettant d'apporter oxygène et nutriments aux organes, ce tapis cellulaire est loin d'être inerte, compte tenu de ses propriétés physiques et biologiques (Busse, 2006). En effet, les CE permettent de maintenir la fluidité sanguine (hémostase), de réguler le débit et la pression sanguine (tonus vasculaire), de contrôler la perméabilité de la paroi vasculaire (extravasation plasmatique), de réguler l'angiogénèse et enfin, d'initier la réponse inflammatoire notamment par diverses interactions cellulaires avec les plaquettes et les leucocytes (**Figure 3**) (Poher, 2007).

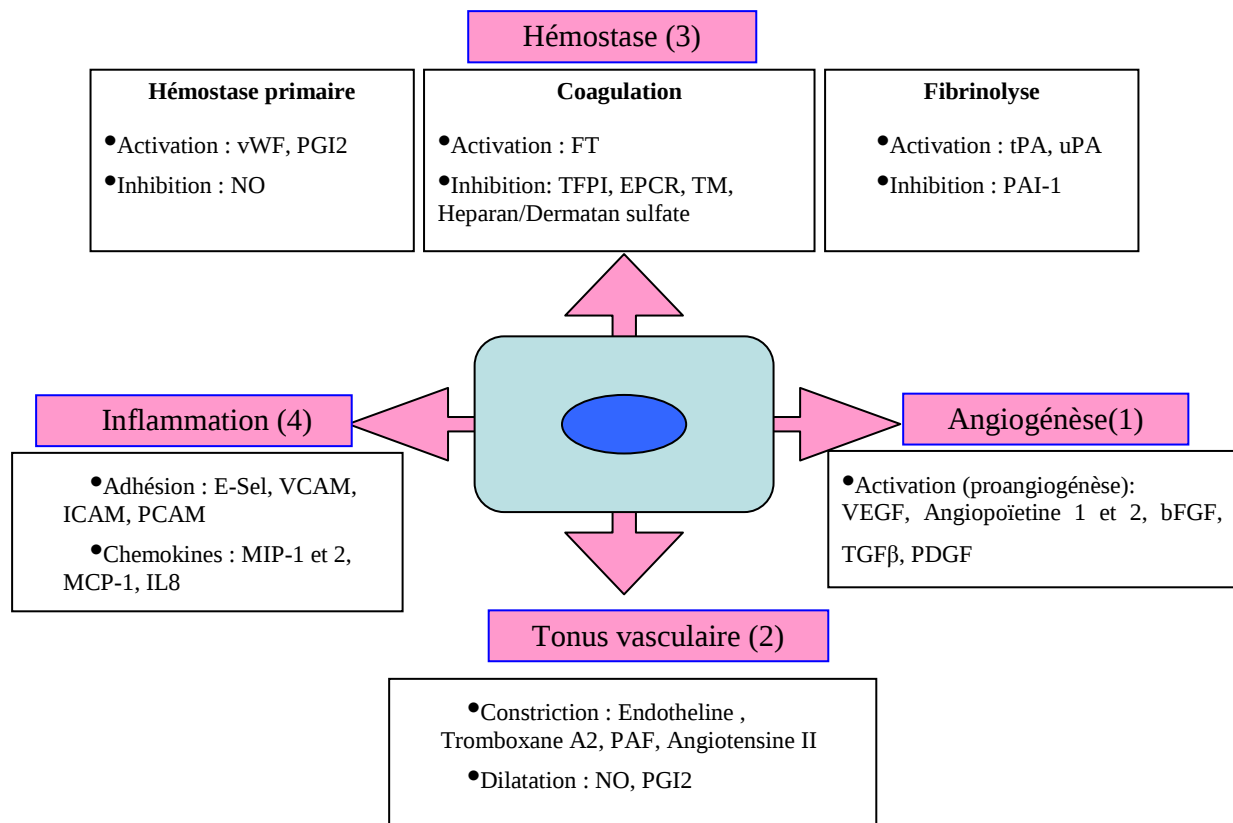


Figure 3 : Grandes fonctions des cellules endothéliales

I. D. 1) Angiogénèse /Vasculogénèse

I. D. 1. a) *La vasculogénèse*

La vasculogénèse est la constitution et l'organisation du réseau vasculaire par les CE au cours de l'embryogénèse.

Les CE sont issues de la différenciation des cellules mésodermes en hémangioblastes qui formeront progressivement les îlots sanguins primitifs, première structure vasculaire formée. Les hémangioblastes se différencient ensuite en cellules souches hématopoïétiques (précurseurs notamment des cellules sanguines circulantes) et surtout pour les cellules les plus périphériques en angioblastes précurseurs des CE.

Sous l'influence de facteurs de croissance (VEGF, bFGF...), les angioblastes et CE migrent sur la matrice, s'organisent en tubules vasculaires pour former des plexus vasculaires qui formeront les vaisseaux embryonnaires (Risau, 1995).

I. D. 1. b) L'angiogénèse

Par opposition, l'angiogénèse ne constitue pas la création d'un réseau vasculaire *de novo*, mais correspond à la formation de vaisseaux sanguins sur un réseau pré existant. Ce mécanisme est bien sur physiologique au moment du développement, lors de la réparation tissulaire, mais peut également être impliqué dans des processus pathologiques tels que le développement tumoral.

Le mécanisme principal est celui d'un bourgeonnement d'un nouveau tube vasculaire sur un vaisseau pré existant, faisant suite à une vasodilatation et une dégradation de membrane basale et de la matrice (Carmeliet, 2005). Ces processus complexes sont médiés par l'interaction entre la matrice et divers types cellulaires [CE, cellules musculaires lisses (CML), fibroblastes, cellules sanguines] ainsi que par de nombreux facteurs pro et anti-angiogéniques impliqués (NO, VEGF, PECAM-1, angiopoïétine-1 et -2, bFGF, IGF-1, PDGF, TGF- β ...).

I. D. 2) Tonus vasculaire

Le tonus musculaire vasculaire entretenu par les CML de la média permettent de maintenir le flux sanguin en régulant le diamètre du vaisseau. A l'état physiologique, le tonus vasomoteur est à l'état de demi-contraction, permettant une régulation soit vers la vasodilatation soit vers la vasoconstriction.

Les CE participent activement à cette régulation du tonus sous l'influence de facteurs mécaniques (forces de cisaillement, tension pulsatile) et/ou biochimiques issus soit de la lumière du vaisseau soit des tissus (Furchgott, 1980). Les CE produisent et libèrent des substances vasodilatatrices telles que le NO (médiateur constitutif) ou la prostacycline (PGI₂) ainsi que des substances vasoconstrictrices telles que l'endotheline, le Platelet Activating Factor (PAF), la tromboxane A₂, et l'angiotensine II. Ces différents médiateurs ont des réactions croisées avec d'autres chaînes fonctionnelles, comme l'adhésion plaquettaire pour la PGI₂, ou l'adhésion des leucocytes pour le PAF.

I. D. 3) Hémostase : Anticoagulation / Procoagulation

Le système hémostatique est un système complexe partagé constamment entre ses deux impératifs, maintenir la fluidité sanguine et être capable de stopper au moins localement une hémorragie. Ce système implique les cellules sanguines circulantes et notamment les plaquettes, les facteurs plasmatiques protéiques et enfin la paroi vasculaire.

De par ses qualités physico-chimiques et biochimiques, l'endothélium est en première ligne face au sang circulant pour éviter qu'il ne thrombose (Bombeli, 1997). En effet, en situation physiologique, l'endothélium participe activement au maintien du flux sanguin avec en surface endoluminale des propriétés anti-agrégantes et anti-coagulantes. Par contre en situation pathologique, notamment en cas de lésion vasculaire, la tendance doit s'inverser avec la nécessité d'un état pro-coagulant au moins localement. L'endothélium, en situation quiescente a donc une tendance anti coagulante alors que le sous endothélium est plutôt pro-coagulant.

Il est classique de séparer de manière artificielle les phases de la coagulation en 3 étapes, l'hémostase primaire, la coagulation au sens propre et enfin la fibrinolyse. Cette séparation est bien sûr caricaturale car ces 3 étapes ne sont pas successives mais plutôt concomitantes, sont étroitement liées et interdépendantes, mais sont différentes en durée et surtout en intensité. De plus l'importance respective des ces différents mécanismes est différente selon les localisations des lésions vasculaires (type de vaisseau artériel ou veineux, taille du vaisseau...).

I. D. 3. a) Endothélium et Hémostase primaire

L'hémostase primaire représente la phase « initiale » de la coagulation, c'est à dire la phase de création du thrombus plaquettaire après la lésion vasculaire. A l'état quiescent, les CE isolent mécaniquement le sang du sous-endothélium, expriment une polarisation négative, séquestrent le vWF (principal médiateur de l'adhésion et l'agrégation) en intracellulaire dans les corps de Weibel-Palade, libèrent du NO, de la PGI2 et expriment l'ADPase, puissants vasodilatateurs et anti-agrégants (**Figure 4**).

En cas de lésion vasculaire, le premier mécanisme enclenché est celui de la vasoconstriction. Le sous endothélium (et sa matrice riche en collagène) est exposé et le

facteur vWF est libéré. Une partie de ce facteur vWF est libérée dans la circulation mais une grande proportion est libérée vers la matrice pour se lier au collagène sous endothélial et y favoriser l'adhésion via les récepteurs glycoprotéiques, puis l'agrégation plaquettaire (associée à l'activation plaquettaire).

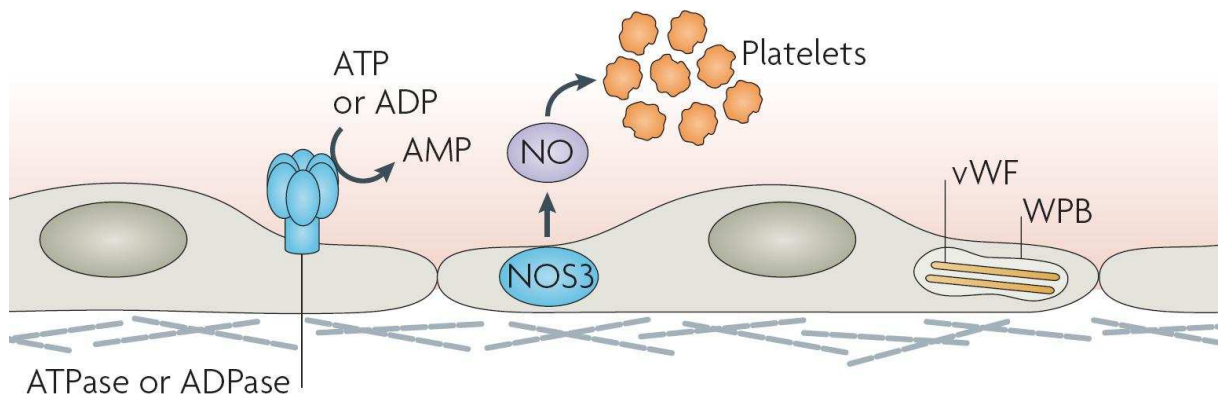


Figure 4 : Rôle des CE dans l'hémostase primaire

D'après Pober (Pober Sessa, 2007)

I. D. 3. b) Propriétés pro-coagulantes

La coagulation proprement dite aboutit à la formation de caillots de fibrine après multiples réactions protéolytiques. Après expression des facteurs pro coagulants comme le facteur tissulaire (FT) dans le sous endothélium ou sur les plaquettes activées, les protéines sériques de la coagulation (VII, X, IX, XI et II) sont respectivement et progressivement activées. Les facteurs (F) V et VIII activés peuvent jouer dans cette chaîne un rôle de cofacteur. L'objectif de cette réaction est la génération de thrombine (FIIa) principal acteur dans la transformation du fibrinogène en monomères de fibrine, qui ont pour capacité de polymériser pour former le caillot, renforçant le thrombus plaquettaire. La thrombine est également considérée comme facteur pivot de par sa dualité d'action, d'une part, d'auto amplificateur de la réaction coagulante et, d'autre part, de régulateur par son effet d'activation des voies anticoagulantes.

Les différentes étapes de la coagulation :

Lors de la lésion vasculaire, le FT est exprimé, fixe le FVII et le rare FVIIa spontané. Le FVII est ainsi activé et s'auto active accélérant la réaction. Le complexe FVIIa/FT a surtout

pour effet d'activer soit le FX directement, soit le FIX, qui une fois activé lui aussi peut activer le FX, initiant la coagulation dite de la « voie extrinsèque », prédominante. Le FX ainsi activé peut ainsi former la thrombine (FIIa). La thrombine a alors pour effet de poursuivre l'activation plaquettaire (et multicellulaire), elle active les facteurs V et VIII, cofacteurs d'activation respectivement du FII par le FX et du FX par le FIX. De plus, la thrombine, active le FXI qui active le FIX, renforçant par cette voie, dite « endogène » la production de thrombine.

Cette voie endogène n'est pas que rétroactive, elle est également liée à des protéines telles que le Kininogène de haut poids moléculaire (KHMP), la prékallikréine (PK) et le FXII. Ces protéines au contact du vaisseau et notamment du sous-endothélium, s'activent en cascade avec là encore des mécanismes d'auto-amplification notamment par le FXIIa (**Figure 5**).

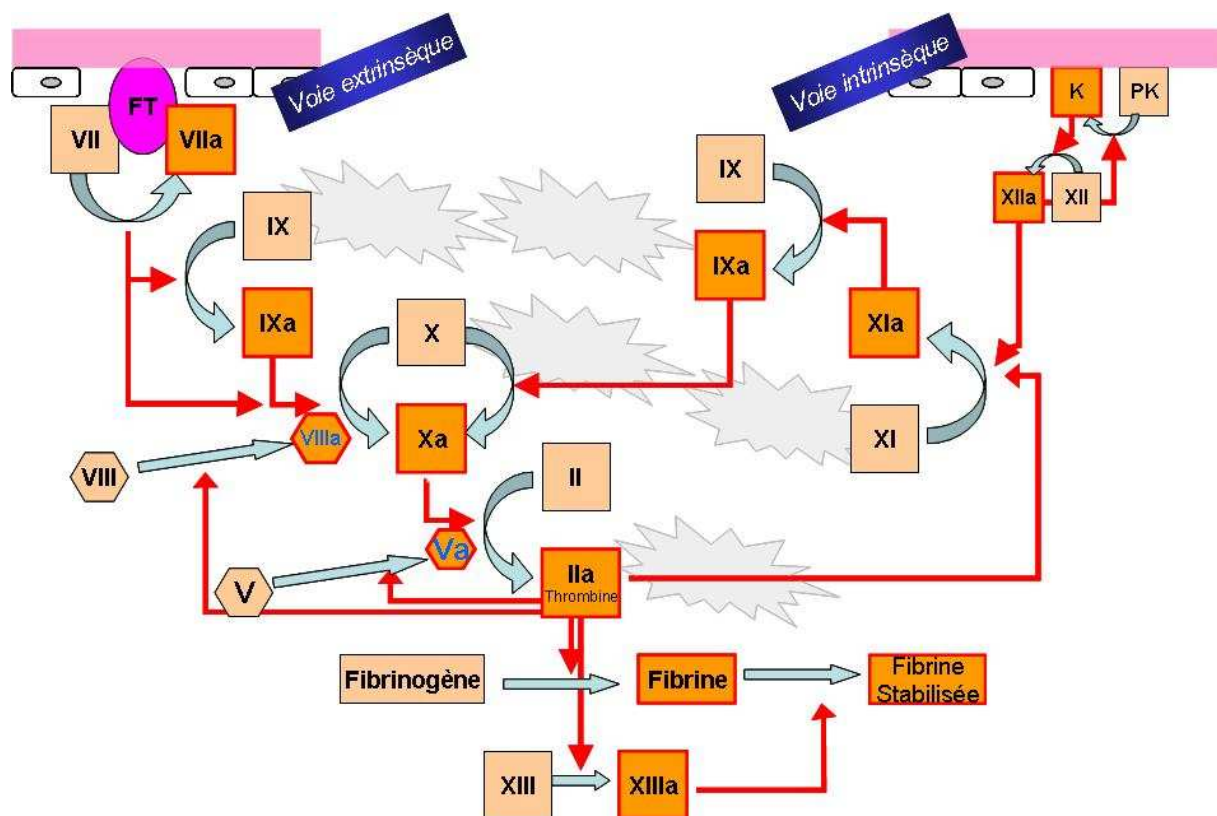


Figure 5: Cascades de la coagulation

I. D. 3. c) Propriétés anti coagulantes

Les propriétés anticoagulantes de l'endothélium consistent essentiellement à limiter la génération de thrombine. Pour cette régulation par les CE, trois facteurs principaux ou systèmes sont impliqués (**Figure 6**).

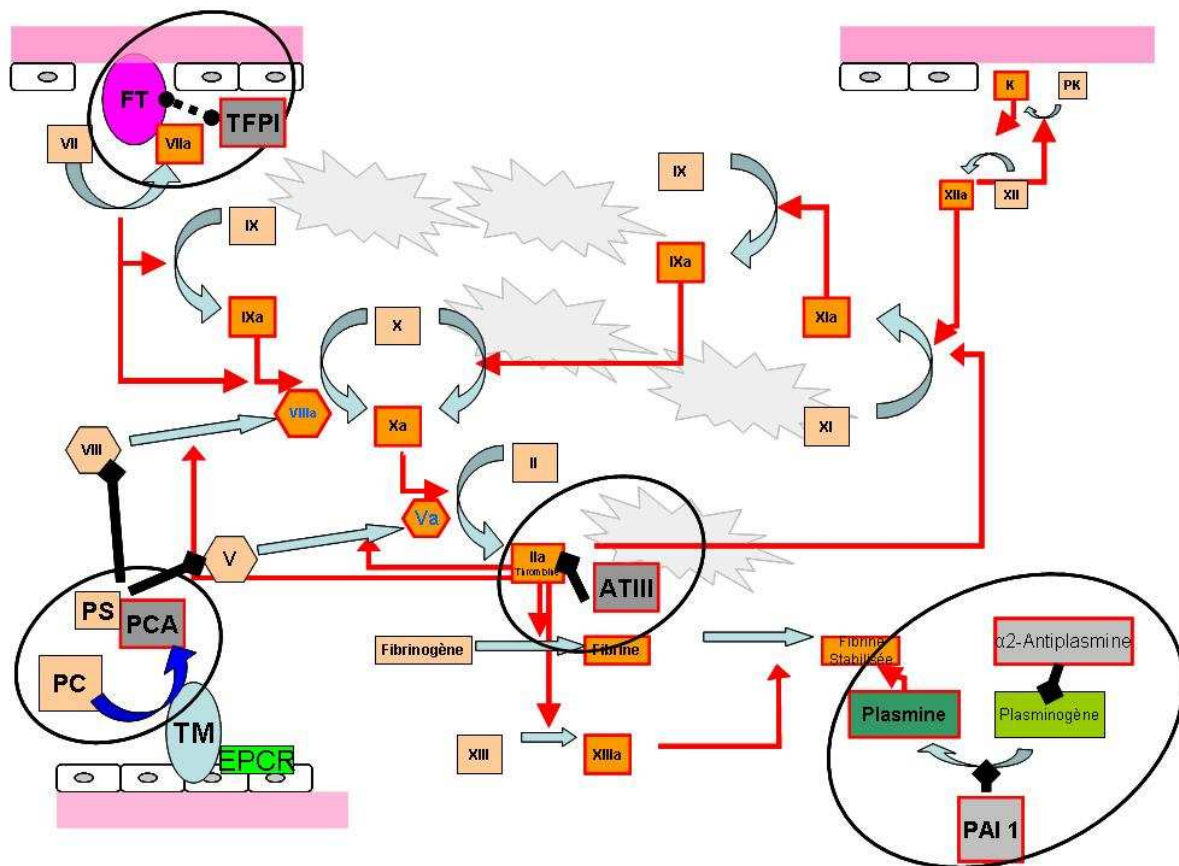


Figure 6 : Régulateurs de la coagulation

Tout d'abord, l'antithrombine III (AT-III) et à un degré moindre d'autres anticoagulants naturels (comme le cofacteur de l'héparine II) sont potentialisés par les GAG (héparane sulfates et dermatane sulfates), protéines du glycocalix. L'AT-III inhibe la thrombine (FIIa) et à un degré moindre les facteurs Xa, IXa, XIa et XIIa.

Le système de la Protéine C (activée) est aussi au centre des systèmes anti coagulants. La thrombomoduline (TM) est exprimée constitutivement à la surface des CE et peut être potentiellement relâchée dans la circulation sanguine. A la surface de la CE, la TM forme un complexe avec la thrombine pour activer le système de la protéine C (PC) en protéine C activée (PCa) qui alors en association avec la Protéine S (PS) devient un puissant système

anticoagulant par inhibition des facteurs V et facteurs VIII. Ce système est accéléré par un cofacteur spécifique, un second récepteur, le Récepteur Endothélial de la Protéine C (EPCR) (cf infra). Ces 2 facteurs Va et VIIIa (cofacteurs de l'activation des facteurs X et II) étant inactivés, la chaîne de production de thrombine fonctionne alors au ralenti.

Enfin, la voie du FT est régulée par son inhibiteur, le système du TFPI. Le TFPI, fixé sur les glycosaminoglycanes forme un complexe avec le facteur Xa, le FT, et le facteur VIIa, bloquant alors l'activité du facteur VIIa vers cette voie extrinsèque.

I. D. 3. d) Propriétés pro-fibrinolytiques

La fibrinolyse est un phénomène physiologique qui doit rester localisé et qui permet la lyse du caillot jusqu'à solubilisation pour rétablir le flux sanguin dans le vaisseau. Le rôle central est tenu par la plasmine, enzyme protéolytique après transformation de son précurseur inactif, le plasminogène (**Figure 6**).

Le plasminogène est principalement activé par l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA). Le tPA est principalement synthétisé par les CE, il est spontanément actif sur le plasminogène et son action est potentialisée par la fibrine. Le système urokinase a essentiellement un rôle tissulaire, extravasculaire.

Deux systèmes inhibiteurs (antifibrinolytiques) contrôlent les systèmes pro fibrinolytiques : α 2-antiplasmine et le système des inhibiteurs de l'activation du plasminogène (PAI-1, 2, 3). PAI-1 est synthétisé par le foie mais est activé au niveau des CE et semble très impliqué au delà de l'hémostase dans l'inflammation.

A l'état quiescent physiologique normal, il n'y a pas de génération de plasmine. Ce n'est que lors de l'apparition d'un thrombus que sont mobilisés les systèmes d'activation du plasminogène et le plasminogène. La plasmine a alors un effet essentiellement local de protéolyse du fibrinogène et/ou de la fibrine, entraînant la production de produits de dégradation de la fibrine et/ou fibrinogène (PDF) et de D dimères (lorsqu'il s'agit de fibrine stabilisée par le facteur XIIIa).

I. D. 4) Réponse immunitaire et inflammatoire aiguë : interaction avec les leucocytes

L'inflammation aiguë est une réponse à l'agression tissulaire, le plus souvent infectieuse qui implique alors une collaboration multicellulaire en vue du recrutement des leucocytes, puis de leur activation. L'objectif est la destruction de l'agresseur et l'élimination des « déchets » avant le processus de réparation ou de cicatrisation.

Au repos, les CE n'interagissent pas avec les leucocytes. Par contre, le processus inflammatoire implique un recrutement rapide (en quelques heures) de leucocytes, initié par l'activation des CE.

Cette activation endothéliale innée peut être séparée en 2 phases, une activation rapide dépendante de molécules préformées (activation endothéliale de type 1 ou stimulation) et une activation plus lente dépendante de l'expression de nouveaux gènes, nécessitant la transcription et la traduction génétique avant l'expression protéique (activation de type 2)

I. D. 4. a) L'activation endothéliale de type 1

Cette réaction d'activation est typique d'une liaison d'un ligand avec un récepteur couplé à une protéine G hétéro-trimérique (GPCR). Cette liaison induit un signal intra cellulaire via la protéine G et sa sous unité α_q . Via ces protéines G, est induite la formation de diacylglycerol (DAG) et surtout la formation intra cellulaire du inositol-triphosphate (IP3). L'IP3 a pour effet, en se liant aux canaux calciques du réticulum endoplasmique, de libérer le calcium en intracellulaire et donc de monter de manière intense et transitoire le taux de calcium intra cytosolique (**Figure 9**).

La fixation au récepteur couplé à protéine G hétéro-trimérique (GPCR) de la surface de la CE, permet également l'activation via la protéine G et sa sous unité $\beta\gamma$ de la protéine intracytoplasmique Rho.

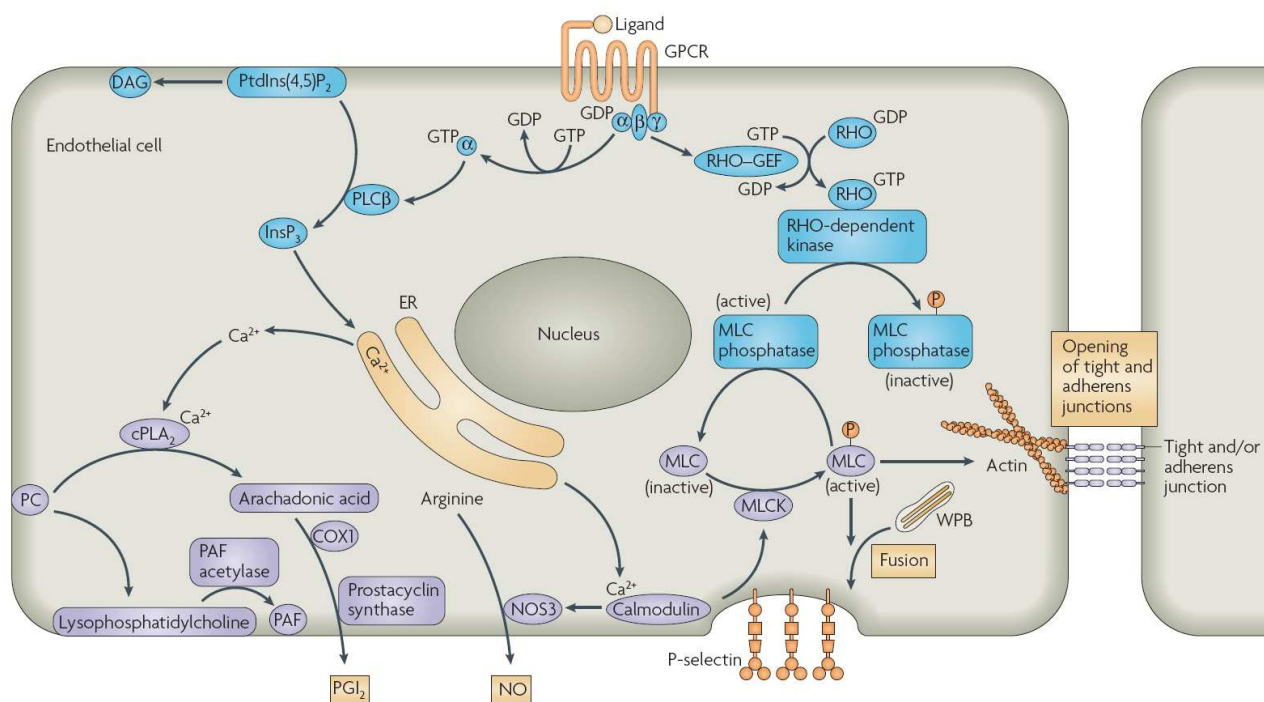


Figure 7 : Activation endothéliale de type1

D'après Pober (Pober Sessa, 2007)

Cette élévation intra-cytosolique du Calcium conduit via la voie de la phospholipase A-2 cellulaire (cPLA-2) et des cyclo oxygénases (COX) à la synthèse de prostacycline, puissant vasodilatateur. Ce Calcium intracellulaire a aussi pour effet via la calmomoduline et la NO-synthase-3 de stimuler la production de NO, puissant vasodilatateur également.

Cette réaction est également marquée par une interaction entre la voie du calcium et la voie Rho. D'un côté, le Calcium se complexant avec la calmomoduline active la kinase des chaînes légères de la myosine (MLCK). De l'autre côté, Rho activée inactive (via la kinase ROCK) la phosphatase des chaînes légères de la myosine qui a pour effet d'inactiver les chaînes légères de la myosine (MLC). L'association, via ces 2 voies, de ces 2 effets, l'activation de MLCK et l'inactivation de la phosphatase des MLC, induit l'augmentation de la forme activée des MLC qui initie la contraction des fibres d'actine. Cette contraction d'actine (reliée aux zones de jonctions intercellulaires) permet la création de points d'ouverture entre les CE. Les protéines plasmatiques peuvent alors s'infiltrer dans ces espaces intercellulaires et constituer une matrice provisoire qui prendra toute son importance dans l'interaction avec les leucocytes.

L'augmentation du Calcium et l'activation de la voie Rho prennent aussi toute leur importance dans le recrutement des leucocytes. En effet, en plus de ce passage protéique, cette activation crée la libération du vWF via les corps de Weibel-Palade ainsi que l'expression de

la P selectine (P-Sel) à la surface luminale de la CE. Dans le même temps, via la voie calcium, cPLA2 est libérée générant une synthèse accrue du facteur d'activation plaquettaire (PAF, platelet activating factor). Le PAF en collaboration étroite avec la P-sel (qui interagit avec la protéine ligand PSG Ligand1) attire les polynucléaires neutrophiles, participe activement à leur adhésion et initie leur extravasation (**Figure 8**).

La migration des neutrophiles au niveau des jonctions intercellulaires dépend également d'interactions avec PECAM1 (platelet endothelial cell adhesion molecule 1 ou CD31).

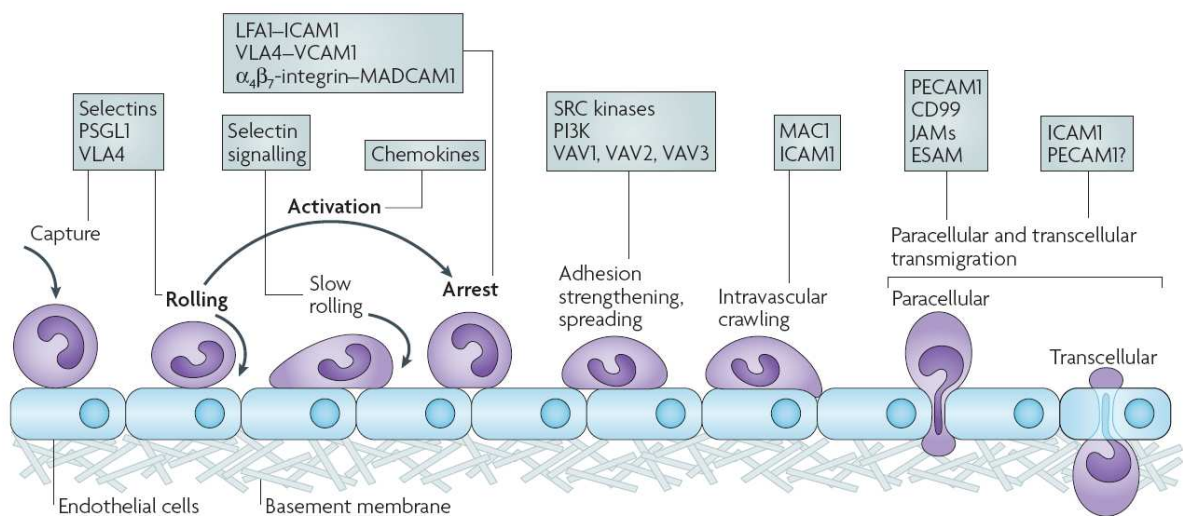


Figure 8 : Cascade d'adhésion leucocytaire

D'après Ley (Ley, 2007)

I. D. 4. b) L'activation endothéliale de type 2

Après une phase de quelques dizaines de minutes (moins de 30 minutes), l'activation de type 1 est progressivement éteinte, notamment par inactivation des GPCR, par auto-régulation, afin d'éviter tout emballement inflammatoire. Intervient alors l'activation de type 2, activation plus lente à se mettre en route, mais activation plus persistante. Cette activation est déclenchée principalement par les leucocytes activés qui sécrètent des cytokines telles que le Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) ou l'interleukine-1 (IL-1)(Pober, 1990).

La voie du TNF- α débute par le couplage avec son récepteur spécifique, le TNF récepteur1 (TNFR1, *TNF Receptor-1*). TNFR-1 se fixe pour former un complexe avec la

protéine TNFR-1 associated death domain (TRADD) qui recrute sérine/thréonine kinase receptor interacting protein 1 (RIP-1) et l'ubiquitine ligase TNFR associated Factor 2 (TRAF-2). Ce complexe initie *in fine* la voie du facteur de transcription facteur nucléaire - κ B (NF- κ B) ainsi que la voie *Activator Protein 1* (AP-1)(Figure 9).

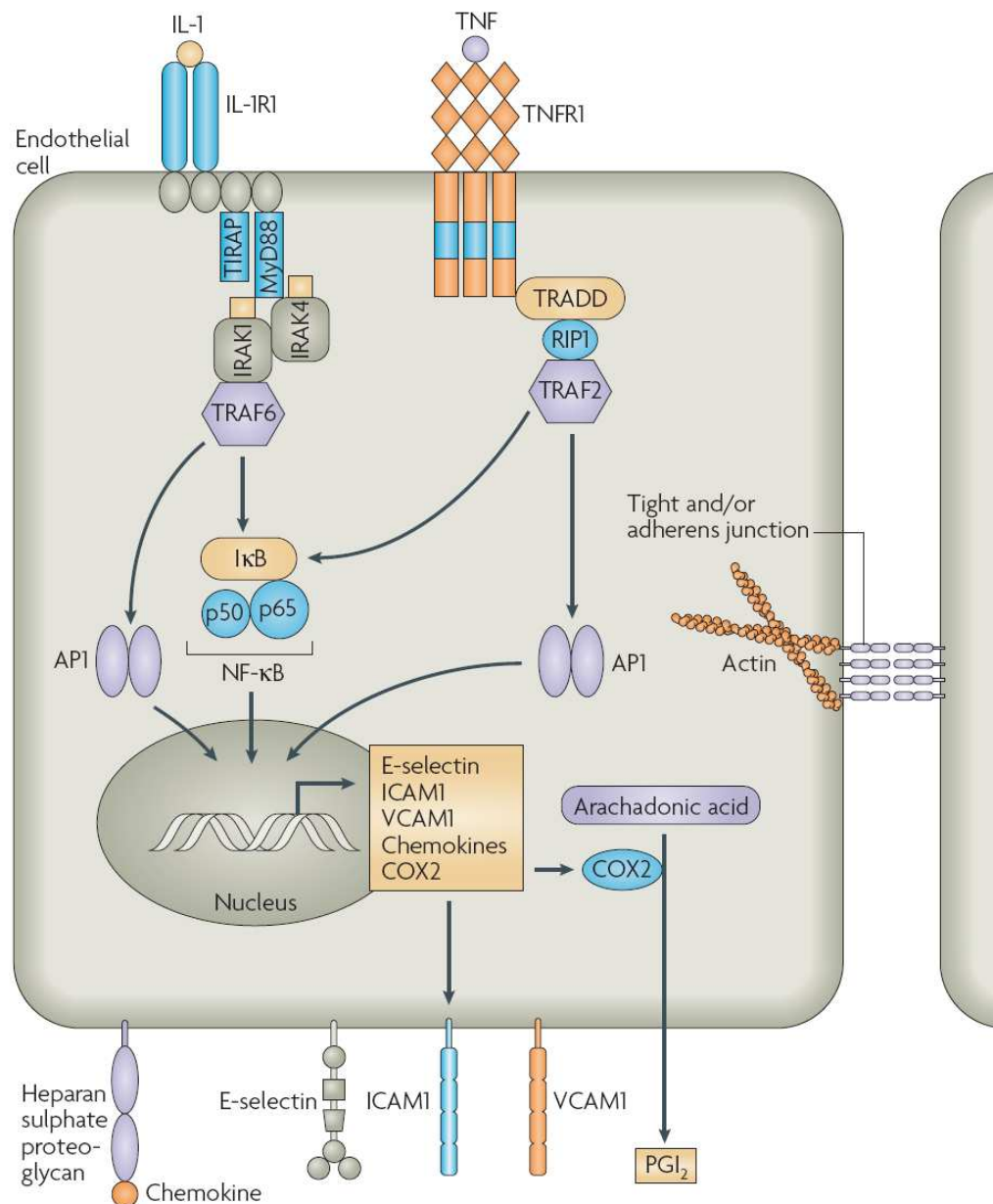


Figure 9 : Inflammation endothéliale de type 2

D'après Pober (Pober Sessa, 2007)

La fixation de IL-1 sur son récepteur spécifique IL-1 receptor-1 (IL-1R1) forme un complexe d'envergure composé de la protéine adaptatrice MyD88, de Toll/IL-1 receptor accessory protein (TIRAP), de IL-1 Receptor associated kinase 1 et 4 (IRAK1-4) et du facteur

TRAF-6. In *fine*, cette voie de signalisation aboutit là encore à l'activation de la voie NF- κ B et AP-1.

L'activation de type 2, par les voies du TNF- α ou par la voie de l'IL-1 aboutit à l'activation de facteurs NF- κ B ou AP-1 qui sont impliqués dans l'initiation de la transcription nucléaire de gènes spécifiques en vue de la synthèse de protéines spécifiques de l'inflammation. Cette synthèse *de novo* nécessite une activation de la machinerie nucléaire transcriptionnelle. La réponse se déroule cette fois-ci non pas en terme de minutes, mais en terme d'heures.

Parmi toutes ces protéines induites par cette activation TNF- α ou IL-1, sont synthétisées, des molécules d'adhésion qui se fixent aux leucocytes, comme E-Selectine (E-Sel), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), et vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). Ces molécules d'adhésion sont capables d'interagir, de se lier avec leurs ligands à la surface des leucocytes. Cette synthèse protéique pro inflammatoire concerne également des chemokynes, des COX2 ainsi que des protéines qui réorganisent les filaments d'actine.

COX-2 de manière plus intense que COX-1 conduit aussi à la production de PGI2 (vasodilatatrice).

La réorganisation des filaments d'actine et de tubuline restructure le cytosquelette pour là aussi ouvrir les jonctions inter cellulaires et permettre la fuite des protéines plasmatiques ainsi que l'extravasation des leucocytes. La « néo matrice » est réputée plus rigide que dans l'activation de type 1 car les jonctions ouvertes permettent le passage de protéines de plus grande taille dont notamment le fibrinogène.

Les chemokynes synthétisées au cours de cette activation de type 2 incluent par exemple l'IL-8 (aussi connue sous CXCL-8). L'adhésion des leucocytes est alors plus soutenue grâce à la conjonction de l'IL-8, du PAF, des protéines d'adhésion E-Sel et P-Sel (**Figure 8**).

On voit donc que l'activation de type 2 conduit aussi à l'augmentation du flux sanguin, à l'augmentation des espaces intercellulaires ainsi qu'au recrutement leucocytaire mais avec une intensité et une durée supérieures.

La réponse de type 2, plus prolongée que la réponse de type 1 n'est pas continue dans le temps mais est programmée pour évoluer. La synthèse de E-Sel s'éteint progressivement notamment avec l'inactivation de AP-1. Ce sont les protéines d'adhésion à cinétique plus lente qui vont prendre progressivement le relais (VCAM-1 et ICAM-1). Ce changement progressif du type de molécule d'adhésion ainsi que l'expression de nouvelles chemokynes

comme le CC-chemokine ligand 2 (CCL2 aussi nommé MCP-1) permet de recruter d'autres types de leucocytes, recrutant un infiltrat plus riche en cellules mononuclées.

La prolongation du stimulus, l'intervention d'autres stimuli tels que l'interferon γ (IFN- γ) peut conduire à des lésions cellulaires allant éventuellement jusqu'à la mort cellulaire endothéliale (Bombeli, 1997; Bombeli, 1997). Enfin, il est difficile de séparer l'inflammation endothéliale avec lésion des CE sans évoquer le lien avec l'hémostase et la mise en jeu de phénomènes pro-coagulants (cf paragraphe **I. D. 3**) page 13).

La fin du processus d'activation de type 2 est médiée par la disparition des cytokines inflammatoires qui survient généralement après la disparition du stimulus, c'est à dire l'éradication du processus infectieux. Il existe malgré tout un rétro contrôle négatif avec un effet anti inflammatoire, notamment bloquant le facteur transcriptionnel NF- κ B.

I. D. 5) Réponse inflammatoire chronique

Quand le stimulus perdure, la CE est impliquée non seulement dans l'immunité innée, mais aussi dans les processus d'immunité adaptative notamment par l'expression des protéines du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et de classe II après stimulation par l'IFN- γ . Les CE peuvent alors jouer le rôle de présentation de l'antigène aux lymphocytes T, ainsi que de synthétiser d'autres cofacteurs chemokiniques, d'autres facteurs cytokiniques ainsi que des facteurs de co stimulation.

De plus, il semble que les CE pourraient jouer un rôle dans l'orientation de la réponse immunitaire Th1/Th2 (Shiao, 2005).

Enfin, les CE jouent un rôle dans la néo angiogénèse nécessaire dans le processus inflammatoire (Monaco, 2004).

II) Sepsis sévère

Le sepsis sévère, entité regroupant les infections graves est un réel problème de santé publique, compte tenu du nombre de patients impliqués chaque année et de la gravité du pronostic. En effet, près de 15% des admissions en réanimation sont le fait d'un sepsis sévère et près de 5% d'un choc septique ; la mortalité est alors de 30 à 40 % (Brun-Buisson, 2004; Vincent, 2006).

II. A) Définitions

La confusion a longtemps persisté entre les termes sepsis, sepsis sévère, choc septique et en parallèle le syndrome inflammatoire généralisé. Ce n'est que de manière récente (depuis 1992), qu'une conférence d'experts de "l'American College of Chest Physicians" et de "the Society of Critical Care Medicine" a statué sur ces définitions (Bone, 1992; Levy, 2003).

La distinction entre ces syndromes de gravité croissante pour les malades, a pour objectif de catégoriser ces patients en groupes homogènes afin de faciliter l'interprétation des résultats concernant la recherche dans ce domaine (**Figure 10**). Cependant, il existe une continuité clinique tout à fait compréhensible lorsqu'on analyse la physiopathologie de ce syndrome.

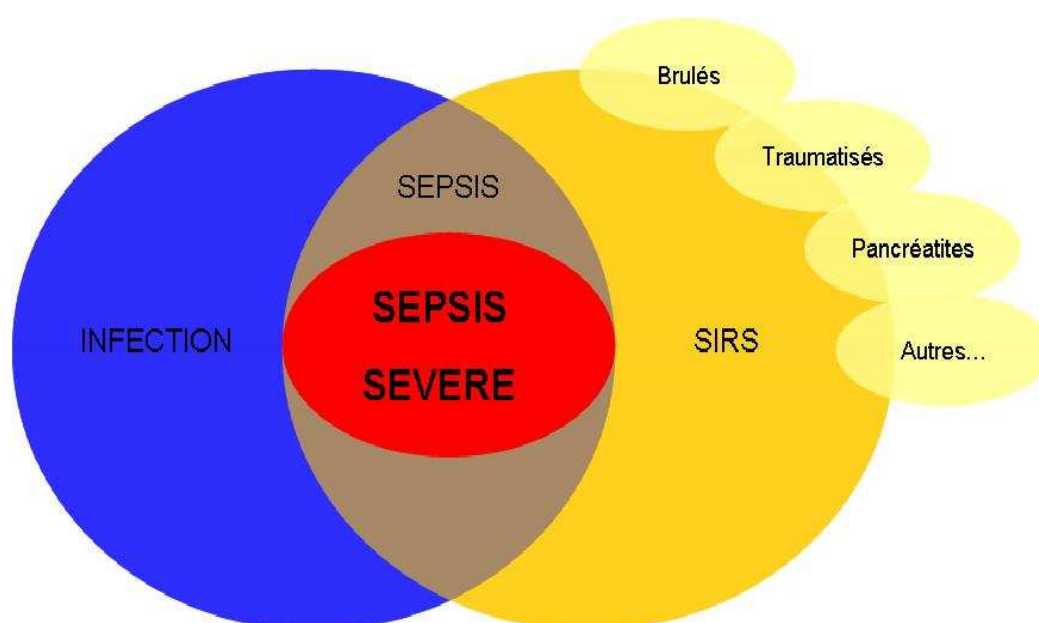


Figure 10 : Sepsis, sepsis sévère, choc septique et SIRS

II. A. 1) Le SIRS

Le Syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS) se définit comme une réponse aspécifique à une agression, infectieuse ou non. Le SIRS se définit plus précisément par l'existence d'au moins deux des anomalies cliniques ou biologiques suivantes :

- Température corporelle $>38^{\circ}\text{C}$ ou $<36^{\circ}\text{C}$,
- Fréquence cardiaque >90 battements par minute,
- Fréquence respiratoire > 20 /minute ou $\text{PaCO}_2 < 32$ mmHg,
- Leucocytose $> 12\,000 /\text{mm}^3$ ou $< 4\,000 /\text{mm}^3$ ou présence de plus de 10% de cellules immatures.

II. A. 2) L'infection

L'infection se définit comme la présence inattendue, anormale, de microorganismes, que ce soit des bactéries, virus, parasites, ou champignons dans un ou des territoires de l'hôte. Le diagnostic s'établit sur l'anamnèse, sur des symptômes ou des signes cliniques et/ ou paracliniques de laboratoire. La source de l'infection est le plus souvent connue avec la présence d'un pathogène dans une zone suspecte d'infection (« infection dite documentée ») mais peut être affirmée de manière indirecte par la présence de pus dans un espace fermé ou l'existence d'un abcès (« infection cliniquement documentée mais microbiologiquement non documentée »).

II. A. 3) Le sepsis

Le sepsis (ou syndrome infectieux) se définit comme une infection documentée ou non associée à une inflammation systémique, un SIRS, c'est à dire au moins 2 signes généraux d'inflammation.

II. A. 4) Le sepsis sévère

Le sepsis sévère se définit alors comme un sepsis associé à une dysfonction viscérale ou d'organe (touchant au moins 1 organe), une hypoperfusion tissulaire ou une hypotension artérielle (**Tableau 1**).

<u>Type de défaillance</u> <u>viscérale</u>	<u>Description</u>
Cardio vasculaire	Hypotension artérielle avec pression artérielle systolique <90mmHg ou Réduction de la pression artérielle d'au moins 40 mmHg malgré remplissage vasculaire adéquate
Rénale	Débit urinaire <30ml/h depuis 1h ou Créatininémie sérique >200µmol/ml malgré hydratation suffisante
Respiratoire	Ratio PaO ₂ /FiO ₂ <250 si défaillance associée ou <200 si défaillance isolée (siège de l'infection).
Hématologique	Taux de plaquettes <50 000/mm ³ ou baisse de 50% dans les 3 jours précédents
Acidose Métabolique	pH <7.30 avec Lactates >2 mmol/l

Tableau 1 : Description des défaillances viscérales au cours du sepsis sévère

II. A. 5) Le choc septique

Le choc septique, stade ultime dans la gravité, se définit comme un sepsis sévère avec une hypotension artérielle persistante malgré un remplissage vasculaire adéquat et nécessitant la mise en place d'amines inotropes ou vasopresseurs.

II. B) Epidémiologie

II. B. 1) Epidémiologie générale

L'analyse de la littérature est difficile à ce sujet compte tenu des incohérences de définitions sur les séries historiques, compte tenu des hétérogénéités des pratiques entre les différents pays et les différents services de réanimation et finalement compte tenu du relatif faible nombre d'études observationnelles. Cette analyse est rendue difficile également selon le mode d'entrée dans ces études, c'est à dire selon que l'on analyse les infections et leur devenir ou selon qu'on analyse les admissions (et séjours) en réanimation. De plus cette analyse est rendue difficile compte tenu de l'évolution des pratiques ainsi que de l'amélioration de la prise en charge qui ont modifié les critères d'admission des patients en réanimation et amélioré le pronostic de cette pathologie au fil des années.

Le sepsis sévère concerne près de 80 000 patients par an en France. Le taux d'attaque du sepsis sévère constitue entre 5 et 20 % des patients admis en unité de réanimation (Annane, 2003; Martin, 2003; Brun-Buisson, 2004). Le taux de mortalité reste assez élevé puisqu'il constitue la première cause de mortalité dans les services de réanimation (en dehors des unités de soins intensif cardiologiques). En effet, la mortalité oscille entre 20 et 65 % selon les séries(**Figure 11**).

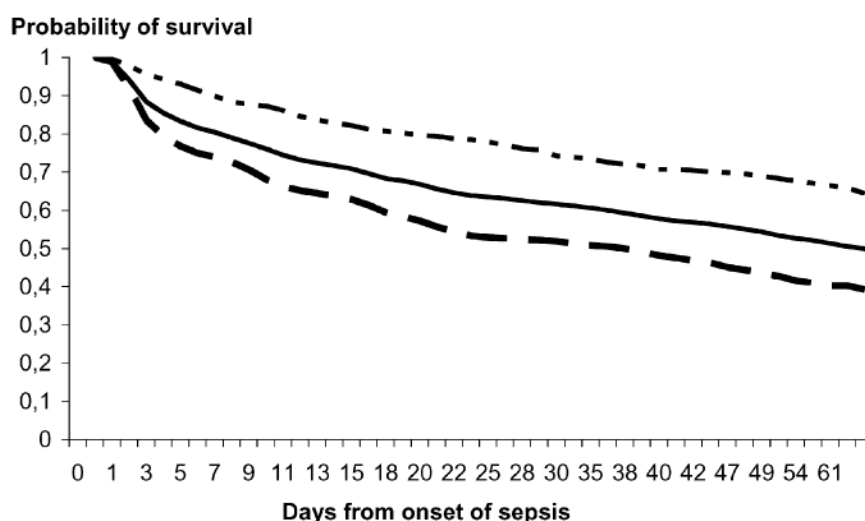


Figure 11 : Mortalité du sepsis sévère

D'après « Episepsis study »(Brun-Buisson, 2004)

Ligne pointillée haute (sans choc septique)/ Ligne pointillée basse (avec choc septique)

Ces sepsis sévères sont en grande majorité (70%) présents dès l'admission laissant 30% de sepsis acquis à l'hôpital. Environ 85% de ces sepsis sévères admis en réanimation sont des infections documentées du point de vue bactériologique.

Compte tenu des progrès dans la prise en charge et l'évolution des populations traitées, l'analyse de l'évolution progressive de ces cohortes montre une augmentation des taux d'incidence (+1.5% par an) du sepsis sévère en réanimation. Ceci est probablement lié aux admissions des personnes de plus en plus âgées et à l'augmentation du nombre de patients immunodéprimés. Ceci n'empêche pas malgré tout une baisse progressive des taux de mortalité au fil des années (Brun-Buisson, 2004).

Du point de vue médico économique, un séjour pour sepsis sévère constitue (aux USA) un coût moyen de 22000 \$ par séjour, avec une durée de séjour de près de 20 jours. Des chiffres comparables ont été retrouvés en France (Adrie, 2005). Le coût total annuel cumulé pour les USA serait de 16.7 milliards de dollars (Angus, 2001).

II. B. 2) Principaux facteurs de risques

Parmi les facteurs de risque qui prédisposent les patients à l'émergence d'un sepsis sévère, sont retrouvés essentiellement l'âge (après la soixantaine), le sexe masculin (Adrie, 2007), une immunodépression (cancer, immunosuppresseurs), des défaillances organiques chroniques (insuffisance rénale chronique, respiratoire....) (Alberti, 2005). Enfin des facteurs de prédisposition génétique ont été clairement identifiés, comme certains polymorphismes (de TNF, de Toll....)(Mira, 1999).

II. B. 3) Principaux sites d'infection au cours du sepsis sévère

Lors du sepsis sévère les infections pleuro-pulmonaires, les infections du site abdominal (notamment péritonéal), les infections du système génito-urinaire et les bactériémies primaires représentent plus de 80 % des infections (**Tableau 2**).

Site d'infection	Fréquence estimée (%)
Respiratoire	20-40
Bactériémie	17-35
Génito-urinaire	9-30
Abdominal	12-30
Os / Tissus mous	5-10
Dispositif invasif	<5
Système nerveux central	<1
Endocardite	<1
Autres	5-10

Tableau 2 : Principaux sites d'infection au cours du sepsis sévère

D'après Angus(Angus, 2001) et Annane (Annane, 2003)

II. B. 4) Principaux germes en cause au cours du sepsis sévère

L'analyse des bactéries en cause sur ces dernières années montre la diminution progressive de l'impact des bactéries gram négatif ainsi que l'émergence probablement encore sous estimée des champignons et virus, notamment compte tenu de l'incidence élevée des sepsis sévères chez les patients immuno-déprimés (**Tableau 3**).

Pathogène responsable d'infection	Fréquence estimée (%)
Bactéries	50-80
Gram +	30-50
Gram -	20-30
Champignons	2-5
Parasites	1-3
Virus	2-4

Tableau 3 : Principaux types de germes en cause au cours du sepsis sévère

D'après Annane(Annane, 2005)

II. C) Physiopathologie du sepsis sévère

Le sepsis sévère est l'exacerbation d'interactions complexes entre un pathogène et son hôte, incluant sa réponse inflammatoire et sa réponse pro-coagulante. Le sepsis « devient » sévère lorsque les réactions de l'hôte sont inadéquates face à l'infection. Notamment, l'endothélium impliqué en première ligne de défense doit garder une réaction adaptée et localisée. Lorsque cette réaction est dépassée et se généralise, cette inadaptation est qualifiée de dysfonction endothéliale.

II. C. 1) La réponse inflammatoire

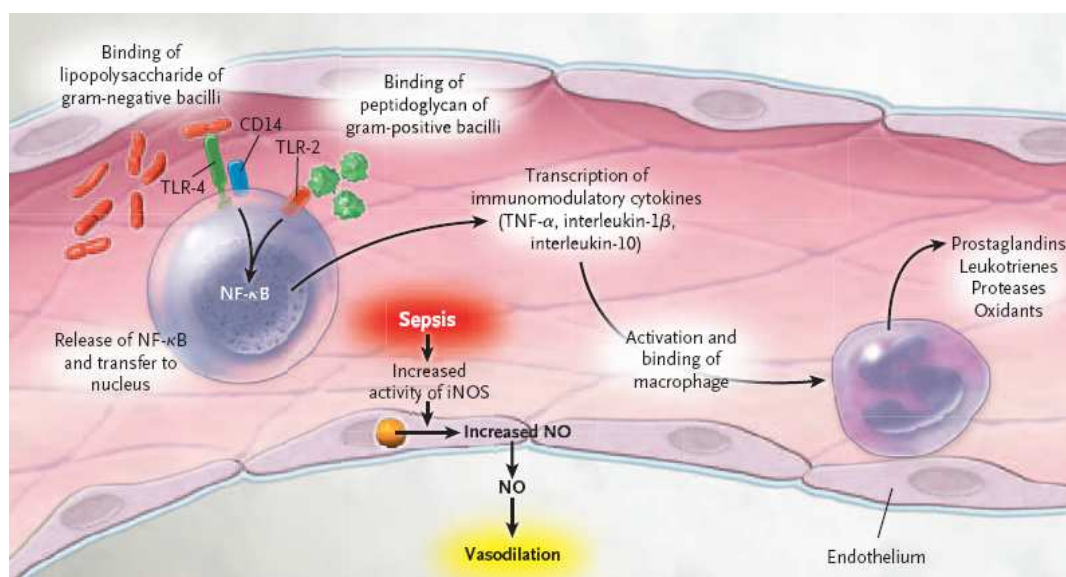


Figure 12 : Réponse inflammatoire au cours du sepsis

D'après Russel(Russell, 2006)

Le système immunitaire inné répond à l'agression infectieuse (reconnue par ses pathogen-associated molecular pattern, PAMP) par une reconnaissance extrêmement rapide par les récepteurs de reconnaissance (comme les Toll like receptors par exemple pouvant reconnaître le LPS). Via des mécanismes de signalisation intracellulaire notamment passant par la voie transcriptionnelle NF-κB, sont synthétisées des cytokines pro inflammatoires comme le TNF-α et l'IL-1β, mais aussi des cytokines anti inflammatoires comme l'IL-10. Des mécanismes proapoptotiques versus les CE sont également mis en jeu.

Par atteinte directe par le germe ou par ces mécanismes indirects pro-inflammatoires notamment cytokiniques, les cellules endothéliales sont lésées et/ ou activées conduisant à la dénudation de l'endothélium (exposant ainsi le sous endothélium) et aussi à l'activation des mécanismes d'adhésion leucocytaire (expression des molécules d'adhésion membranaires mais aussi circulantes)(Figure 12).

De plus ces différents mécanismes d'activation conduisent (cf supra) à libérer diverses substances vasodilatatrices (NO, prostacycline) ainsi qu'à une augmentation de la perméabilité vasculaire. Enfin, ces CE activées peuvent libérer dans la circulation des microparticules qui constituent un des mécanismes de l'exportation à distance des phénomènes inflammatoires et pro-hémostatiques (Meziani, 2010).

II. C. 2) La réponse pro coagulante

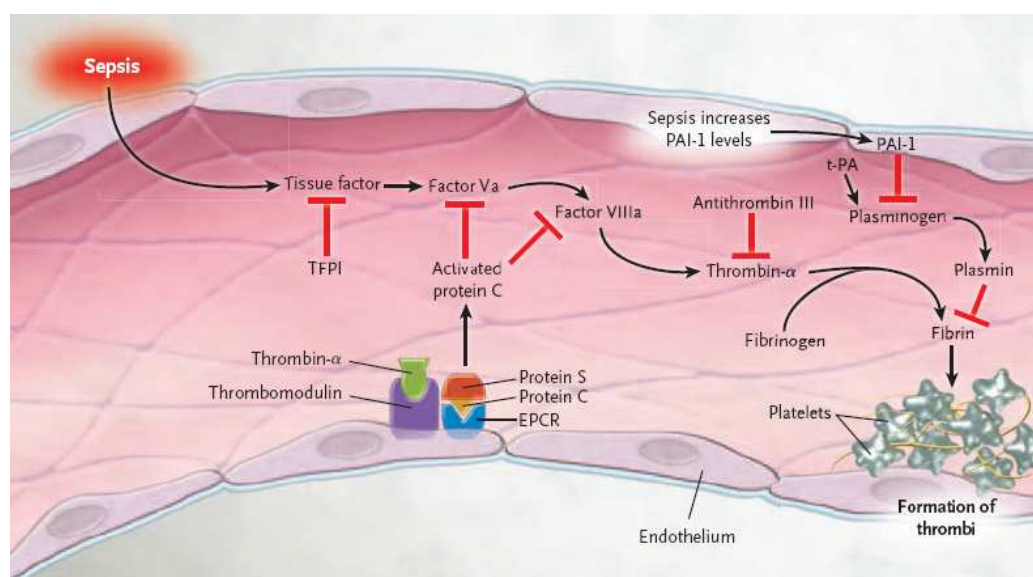


Figure 13 : Réponse pro coagulante au cours du sepsis

D'après Russel(Russell, 2006)

L'autre aspect est bien sûr la modification de la balance anti-coagulation/pro-coagulation vers le versant pro-coagulation. L'initiation de cet état pro coagulant est favorisé par l'expression du FT par les CE activées et/ ou monocytes (Esmon, 2002; Mackman, 2004). Cette activation de la cascade de coagulation (cf paragraphe I. D. 3. b) page 14) conduit à la formation de thrombine qui transforme le fibrinogène en réseau de fibrine (Figure 13). Cet

état pro coagulant est d'autant plus intense que dans les états septiques sévères, les systèmes inhibiteurs (notamment système de la Protéine C, TFPI) sont déprimés. Le système pro fibrinolytique est également freiné, par augmentation de synthèse du facteur PAI-1.

Les micro *thrombi* de la microcirculation amplifient les réactions de dommage endothélial et les réactions inflammatoires induites.

Les réactions pro coagulantes peuvent là encore être « exportées » via les microparticules.

III) Sepsis : endothélium, hémostase et inflammation

III. A) Impact clinique

Depuis près de 20 ans et les travaux de François Fourrier notamment (Fourrier, 1992), l'interaction entre le sepsis sévère (ou choc septique) et les troubles de la coagulation ne sont plus à démontrer. Le stade ultime de cet état pro-coagulant est représenté par l'état de coagulation intra vasculaire disséminée (CIVD) dont le retentissement clinique est majeur (**Figure 14**). Il serait d'ailleurs plus logique d'appeler ce syndrome, le syndrome d'activation systémique de la coagulation.



Figure 14 : Hémostase et sepsis , retentissement clinique

Cette CIVD se caractérise par une séquence, associée à l'inflammation notamment endothéliale, qui se déroule progressivement. Une phase d'activation anormale et aspécifique pro coagulante produit de la thrombine en excès et donc de la fibrine circulante, intra vasculaire. Cette fibrine soluble peut alors provoquer des micro thromboses et/ou un excès de consommation des facteurs d'hémostase pour altérer la micro vascularisation des organes à distance et finalement engendrer l'ultime défaillance multi viscérale.

Les dépôts de fibrine peuvent être retrouvés dans tous les tissus. Ils jouent un rôle déterminant dans l'atteinte viscérale (notamment pulmonaire), par l'atteinte micro thrombotique tissulaire mais cette activation de la coagulation médie également l'atteinte inflammatoire en favorisant la synthèse de protéases et de cytokines. Hormis la détection des signes cliniques (parfois francs), le diagnostic peut être biologique, basé notamment sur l'analyse des produits de dégradation de la fibrine (PDF ou DDimères).

Cet état d'hypercoagulabilité est associé à un état d'hypo fibrinolyse, expliqué essentiellement par l'excès de synthèse de PAI-1. Des taux élevés de PAI-1 sont d'ailleurs associés à un pronostic péjoratif mais ne sont pas dosables en routine (Pralong, 1989).

Enfin au niveau endothélial, là où ils exercent théoriquement leur action, les anticoagulants naturels dysfonctionnent, à la fois témoignant de l'extension du processus thrombotique et aussi accélérant son extension. Les systèmes du TFPI, de l'antithrombine et surtout de la Protéine C sont déprimés au cours du sepsis sévère.

III. B) Impact thérapeutique

Du point de vue thérapeutique dans le choc septique, hormis les traitements anti infectieux et la gestion des défaillances viscérales (notamment hémodynamique), la plupart des traitements dits adjuvants ont échoué dans l'amélioration du pronostic.

Parmi ces traitements, l'intérêt des corticoïdes à faible dose et de la gestion stricte de la glycémie restent toujours l'objet de controverses (van den Berghe, 2001; Annane, 2002; Sprung, 2008; Preiser, 2009).

Les essais thérapeutiques ayant pour cibles les médiateurs de l'inflammation se sont révélés des échecs. Ainsi des essais thérapeutiques ont été conduits visant à inhiber

l'endotoxine (McCloskey, 1994; Angus, 2000), visant à inhiber le TNF- α ou son récepteur (Abraham, 1995; Fisher, 1996; Abraham, 1997; Abraham, 1998) ou visant à inhiber l'IL-1 (Opal, 1997). Ces essais n'ont pas permis d'améliorer de manière significative la mortalité dans le choc septique.

Compte tenu des progrès sur la connaissance de la physiopathologie dans ce domaine et notamment sur cette intrication étroite entre l'inflammation et la coagulation, les travaux de recherche se sont tournés vers de nouvelles cibles : les inhibiteurs physiologiques de la coagulation (**Figure 6** et **Figure 13**) que sont les systèmes AT-III, TFPI et le système de la protéine C.

Les larges essais cliniques randomisés utilisant AT-III recombinée (Fourrier, 1993; Warren, 2001) ou l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (Abraham, 2003) furent là encore décevants. Malgré des effets patents sur les paramètres de la coagulation au cours du choc septique, le pronostic (c'est à dire la survie) ne fut pas significativement amélioré.

Le système de la protéine C focalise l'attention depuis plus d'une décennie. En effet après des résultats d'études animales assez prometteurs (Taylor, 1987), une étude clinique randomisée de grande envergure (Prowess study) a montré de manière significative une amélioration du pronostic dans le choc septique (Bernard, 2001) lors de l'utilisation de PCa sous forme recombinée à fortes doses. Il s'agissait donc du premier travail qui montrait un résultat significatif pour un traitement « adjuvant » dans la prise en charge du choc septique. Ces travaux sont toujours l'objet de discussions et de controverses. En effet, le premier point controversé est probablement lié au déficit de connaissances (notamment à l'époque) sur les mécanismes d'action anti inflammatoire de la protéine C activée. Ce point justifie l'intense activité de recherche fondamentale dans ce domaine. D'autre part, sans parler du coût de cette molécule, la controverse est intense sur les résultats de l'étude clinique et la balance qui existe entre les éventuels bénéfices (effets anti inflammatoires) et les effets secondaires notamment hémorragiques (effets anti coagulants). Enfin, ces travaux n'ont pour l'heure pu être confirmés dans d'autres études. Notamment, les essais cliniques pour des malades moins graves (« Address study ») ou pour des patients pédiatriques (« Resolve Study ») se sont révélés négatifs (Abraham, 2005; Nadel, 2007).

Partie 2] LE RECEPTEUR ENDOTHELIAL DE LA PROTEINE C : EPCR

La voie de la protéine C, primordiale au cours de l'inflammation endothéliale et notamment dans le sepsis implique donc (cf supra), 2 protéines circulantes, les protéines C et S et 2 récepteurs endothéliaux, la thrombomoduline (TM) et le récepteur endothélial de la protéine C (EPCR). La majorité de nos travaux s'est focalisée sur l'EPCR et notamment son rôle au cours de l'inflammation.

I) Historique

Au cours de travaux majeurs sur l'hémostase et la voie de la protéine C, l'EPCR (CD 201) a été cloné et identifié en 1994 par l'équipe de Charles ESMON (Oklahoma City) comme une protéine de surface des cellules endothéliales ayant pour capacité de se lier à la protéine C, qu'elle soit activée ou non, via les domaines « Gla » vitamine K dépendants et en présence de calcium (Fukudome, 1994; Fukudome, 1995; Esmon, 2010).

II) Description

II. A) Structure : du gène à la protéine

Il s'agit d'une glyco-protéine transmembranaire de type 1 d'un poids moléculaire de environ 46 kda composée de 238 acides aminés (221 pour la forme mature) dont 21 constituent le domaine transmembranaire et 3 un très court domaine intra cytoplasmique (Villoutreix, 1999). Le gène codant pour l'EPCR (*PROCR*) est situé sur le chromosome 20 en position q11:2. Il est d'une taille d'environ 8 kilobases, et est composé de 4 exons séparés par 3 introns (Simmonds, 1999). Le premier exon code pour la région 5' et le peptide signal, les exons 2 et 3 codent pour la plus grande partie du domaine extracellulaire et enfin l'exon 4 code pour le reste de la protéine et la partie 3'.

La structure « crystal » en 3 dimensions a été décrite en 2002 (Bangalore, 1994; Oganessian, 2002). Cette structure protéique est composée de 2 hélices α et de 8 feuilletts β ainsi que des sites d'insertion se conformant notamment pour le domaine Gla de la protéine C (**Figure 15**). Il est à noter que ce récepteur se particularise par une affinité pour la PC strictement identique à celle pour la PC activée ($k_d = 30\text{nM}$).

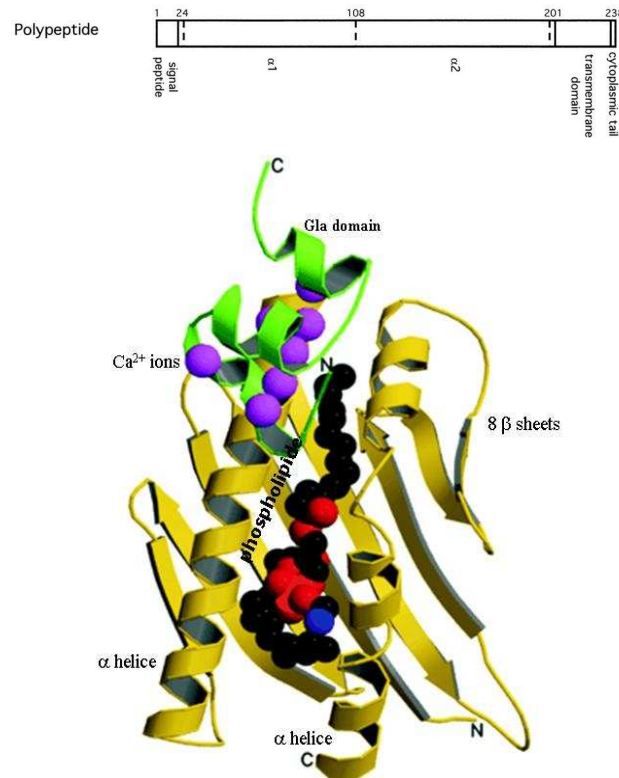


Figure 15 : Structure moléculaire de l'EPCR

D'après Oganessian (Oganessian, 2002)

L'EPCR (en jaune) est composé de 2 hélices α et de huit feuilletts β , avec des sites pour phospholipides (sphères au centre du graphique), pour le domaine Gla de la protéine C (vert) et des ions Ca (sphères mauves)

Comme le montre l'analyse de la protéine et notamment de sa structure, il existe une forte homologie (environ 28% de bases aminées communes) avec la famille CD1 du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (Simmonds Lane, 1999). Cette homologie est surtout conformationnelle avec une structure assez proche laissant un site d'insertion similaire entre ses 2 hélices α (**Figure 16**). Cette homologie pouvait alors faire suspecter une implication de l'EPCR dans des phénomènes inflammatoires ou immunologiques.

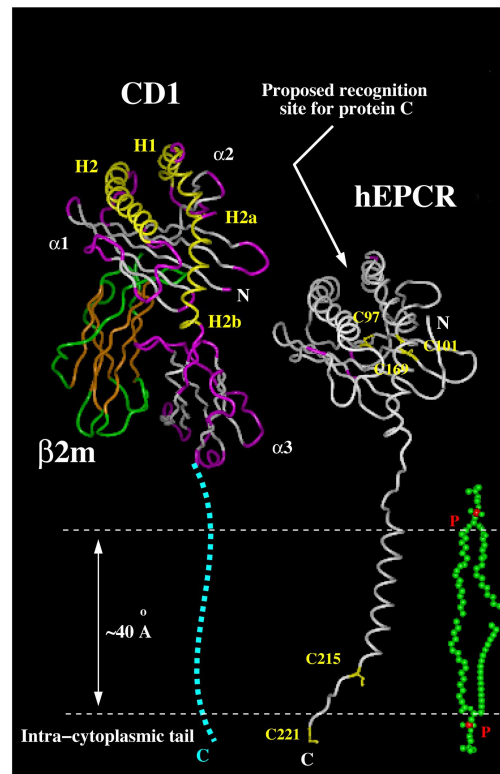


Figure 16 : Forte homologie EPCR / CMH

D'après Villoutreix (Villoutreix, 1999)

II. B) EPCR : Propriétés anticoagulantes

II. B. 1) EPCR : cofacteur d'activation de la protéine C

L'EPCR a été initialement décrit pour sa capacité à lier la PC à la surface de la CE et à augmenter la réaction d'activation de la protéine C par la thrombine. Cette réaction est très nettement accélérée (plus de 1000 fois) par la fixation sur le cofacteur thrombomoduline pour la formation du complexe thrombine-thrombomoduline (IIa/TM). La présence de l'EPCR cofacteur de cette activation par la thrombine accélère encore cette réaction.

En effet, mesuré *in vitro* (**Figure 17**), l'EPCR membranaire endothélial augmente l'activation de PC en PCa de 4 à 8 fois en améliorant notamment l'alignement de la PC avec la thrombine et donc en modifiant significativement la constante de Michaelis-Menten (Stearns-Kurosawa, 1996). Cette activation est augmentée d'un facteur 20 lorsqu'elle est analysée *in vivo* sur des études animales (Xu, 1999; Taylor, 2001).

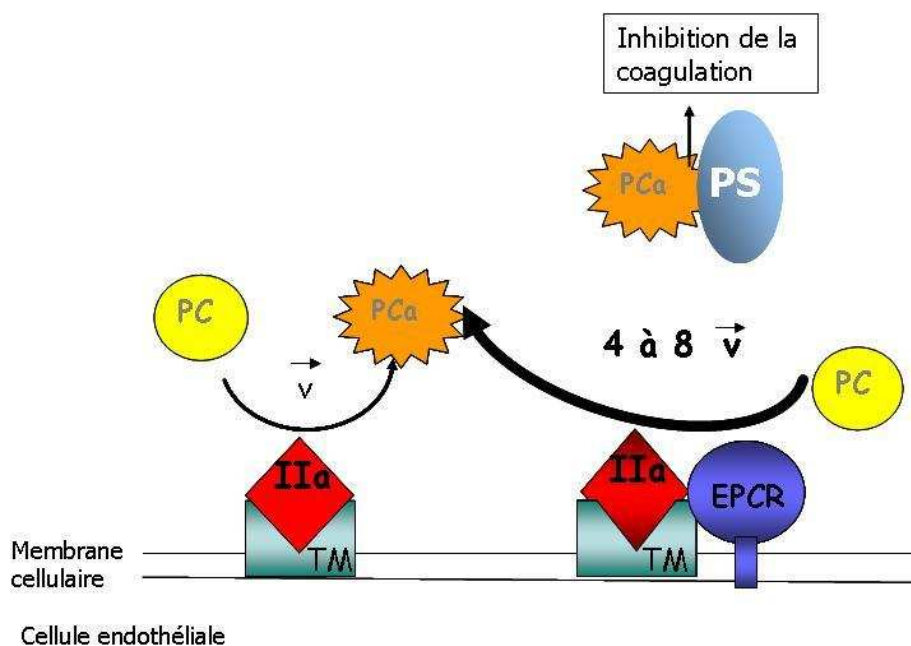


Figure 17 : Effet de l'EPCR sur la protéine C

D'après Esmon (Esmon, 1999)

Le rôle primordial de l'EPCR dans l'anti coagulation n'est plus à démontrer. Ainsi sur des études animales (babouins), lorsqu'on inhibe l'activité de l'EPCR par un anticorps bloquant l'interaction EPCR/PC, l'activation de la PCa induite par la thrombine chute de près de 88% (Taylor, 2001). De plus, chez l'animal, l'invalidation complète pour le gène de l'EPCR (souris KO pour *PROCR*) conduit à la mort intra utérine par thromboses multiples avec dépôts de fibrine dans les trophoblastes.

II. B. 2) EPCR : site de liaison avec le facteur VII/VIIa

Plus récemment, l'EPCR a été montré comme un site de liaison avec le FVII et/ou le FVII activé à la surface de la CE et ce, avec la même affinité (donc en compétition) que pour la PC ou la PCa. La liaison EPCR/FVIIa réduit de manière significative l'effet pro coagulant du FVIIa. Cet effet se manifeste non pas en jouant sur l'activation du FX ou du FIX sur les CE mais en accélérant l'endocytose du facteur VIIa, donc sa clairance et donc en diminuant l'exposition vasculaire et sanguine à ce facteur VIIa qui initie pour bonne partie avec le FT la voie extrinsèque de la coagulation (Preston, 2005; Ghosh, 2007; Nayak, 2009).

II. C) Expression et localisation de l'EPCR

L'expression de l'EPCR est nettement prédominante aux cellules endothéliales des gros vaisseaux (**Figure 18**) et beaucoup plus rare dans les capillaires, en contraste avec la thrombomoduline (Laszik, 1997). Cependant, cette expression n'est pas uniforme selon les organes et les vaisseaux explorés (Nan, 2005). Cette différence d'expression des 2 récepteurs (TM et EPCR) entre les gros vaisseaux et les capillaires n'est pas clairement expliquée mais est peut-être un mécanisme de régulation qui permet de maintenir l'équilibre hémostatique quelle que soit le calibre du vaisseau (Gandrille, 2008).

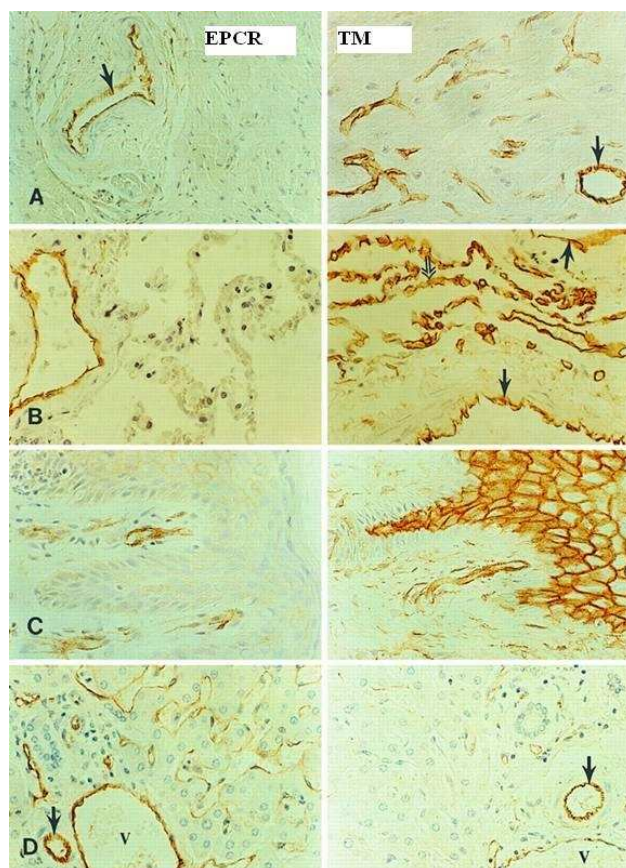


Figure 18 : Expression d'EPCR et TM en immuno histochimie

D'après Laszik (Laszik, 1997).

A gauche marquage EPCR et à droite marquage Thrombomoduline (TM) sur coupes tissulaires autopsiques

A/ myocarde, B/ Poumon C/ Peau D/ Foie

Contrairement aux démonstrations initiales, l'EPCR n'est pas exclusivement exprimé par les CE. Son expression a été confirmée sur des leucocytes de différents types (Monocytes, CD

56 NK, Neutrophiles, Eosinophiles), sur des cellules dendritiques, sur des cellules souches hématopoïétiques ainsi que sur des cellules musculaires lisses (Galligan, 2001; Sturn, 2003; Faioni, 2004; Nick, 2004; Balazs, 2006; Stephenson, 2006; Bretschneider, 2007)

II. D) La forme soluble d'EPCR

II. D. 1) Description de l'EPCR soluble

Une forme soluble d'EPCR (sEPCR) de 43kDa a été décrite présente dans le plasma (Kurosawa, 1997; Kurosawa, 1998). Cet sEPCR, protéine à laquelle manquent donc les parties transmembranaire et intracellulaire, garde les mêmes propriétés de liaison identique à la PC et la PCa (Regan, 1997).

Par contre, cette présentation sous forme soluble lui fait diminuer ses propriétés anticoagulantes. Tout d'abord, l'EPCR soluble rentre en compétition directe avec la forme membranaire pour la fixation avec la PC comme avec la PCa. De plus, la fixation de sEPCR à la PCa (en altérant son site actif) lui fait perdre ses capacités d'inactivation du facteur VA. Enfin, la fixation de sEPCR à la PC empêche alors sa capacité d'activation en PCa par le complexe FIIa/TM (Regan, 1996; Liaw, 2000).

C'est sous l'action des métalloprotéases et notamment de l'ADAM 17 (ou TNF- α *converting enzyme*, TACE) que l'EPCR est clivé au niveau de la membrane cellulaire pour libérer la forme soluble (Xu, 2000; Qu, 2007).

Le clivage métalloprotéasique ne semble pas le seul mécanisme de libération (et/ou régulation) des formes solubles d'EPCR. En effet, il a été démontré que l'EPCR pouvait être clivé par la protéase 3 (PR-3) des polynucléaires neutrophiles (Villegas-Mendez, 2007).

Enfin, la régulation de ces formes solubles passe probablement aussi par des mécanismes plus complexes liés à l'épissage alternatif du gène *PROCR* et à la synthèse d'isoformes de sEPCR notamment chez les porteurs de l'haplotype A3 (cf infra) (Saposnik, 2008).

Si le rôle de la forme membranaire de l'EPCR en situation physiologique est essentiellement le maintien de l'anti coagulation dans le sang circulant, le rôle de la forme

membranaire est moins clair. Elle semble jouer un rôle plutôt pro coagulant. Il est possible que la régulation de cette forme dans les processus pathologiques (comme par exemple le sepsis) influence alors la balance de la coagulation vers le versant pro coagulant en cas de surexpression de la forme soluble.

II. D. 2) Facteurs influençant les taux circulants d'EPCR

II. D. 2. a) *L'haplotype A3*

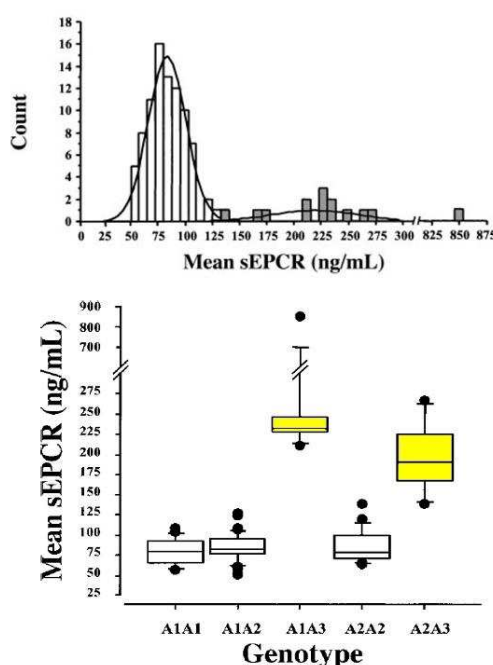


Figure 19 : Taux d'EPCR solubles en fonction de l'haplotype

D'après Saposnik (Saposnik, 2004)

En jaune, porteurs de l'haplotype A3

Les taux moyens d'EPCR soluble sont d'environ 100 ng/ml chez les volontaires sains. Cependant la distribution de ces taux plasmatiques est relativement hétérogène dans la population courante. Près de 80 % de la population a des taux inférieurs à 180 ng/ml alors que 20 % de la population environ exprimerait un phénotype avec des taux plus élevés (entre 200 et 800 ng/ml). Cette distribution est d'allure plutôt bimodale (Stearns-Kurosawa, 2002; Stearns-Kurosawa, 2003) ou trimodale selon les travaux (Uitte de Willige, 2004). Les taux élevés (**Figure 19**) sont clairement corrélés avec l'haplotype A3 (Saposnik, 2004).

L'haplotype A3 correspond à la substitution d'une base Guanosine par Adénosine dans le génome en position 6936, ce qui a pour conséquence la substitution de la serine par de la glycine en position 219 de la protéine EPCR, au niveau transmembranaire. Cette substitution d'acide aminé rendrait la protéine plus sensible au clivage métallo protéasique par l'ADAM 17 (Qu, 2006).

La surexpression de l'EPCR soluble pour les porteurs de l'haplotype A3 s'explique donc par cette sensibilité au clivage ainsi que par l'épissage alternatif.

D'ailleurs, la mise en évidence de cet épissage alternatif avec la génération de l'isoforme peut être utilisée comme outil pour dépister l'haplotype A3 (Simioni, 2006).

Il est actuellement toujours discuté l'impact de l'haplotype A3 dans la population comme facteur de risque favorisant la maladie thrombo embolique (Saposnik, 2004; Uitte de Willige, 2004). Cet haplotype A3 pourrait être associé à la maladie coronarienne (Ireland, 2005) ainsi qu'à des morts fœtales inexplicables (Lavigne-Lissalde, 2005).

II. D. 2. b) Le sexe

Dans au moins 2 cohortes de volontaires sains, les taux circulants d'EPCR ont été retrouvés significativement plus élevés chez les hommes (Stearns-Kurosawa, 2003; Uitte de Willige, 2004). A notre connaissance, aucun travail spécifique ne s'est attaché à analyser plus attentivement ces résultats.

III) Régulation des formes membranaires et solubles de l'EPCR

La régulation de l'EPCR est complexe. Il existe encore des zones d'ombre et des discordances dans l'analyse de l'expression de l'EPCR et sa régulation dans un contexte inflammatoire.

In vitro, la régulation de l'EPCR lors de l'activation des CE n'est pas uniforme selon le type de CE (HUVEC, HAEC....), selon le type d'activation (LPS, TNF- α , IL-1, PMA....),

selon l'organe exploré ou selon le modèle expérimenté (type d'animal) (Gu, 2000; Nan, 2005). On peut tout de même affirmer que, au cours de l'activation endothéliale (notamment LPS ou TNF- α) l'expression membranaire de l'EPCR est généralement « down-régulée » de manière significative. On a pensé longtemps que c'était un des mécanismes importants de la dépression du système de la protéine C au cours du sepsis sévère.

Cette régulation respective des formes membranaires et solubles est complexe et ne peut se résumer à un simple clivage isolé de l'EPCR soluble. En effet, dans ces contextes inflammatoires, sont associés des mécanismes de régulation transcriptionnelle, avec notamment une augmentation « paradoxale » précoce initiale des ARN codant pour l'EPCR (Gu, 2000). Les mécanismes de ces régulations ne sont toujours pas clairement élucidés.

IV) Fonctions « anti inflammatoires » de l'EPCR

IV. A) L'EPCR est primordial au cours de l'inflammation

En plus de ses propriétés anticoagulantes (pour la forme membranaire), l'EPCR a clairement un rôle au cours de l'inflammation aigüe telle que celle rencontrée au cours du sepsis.

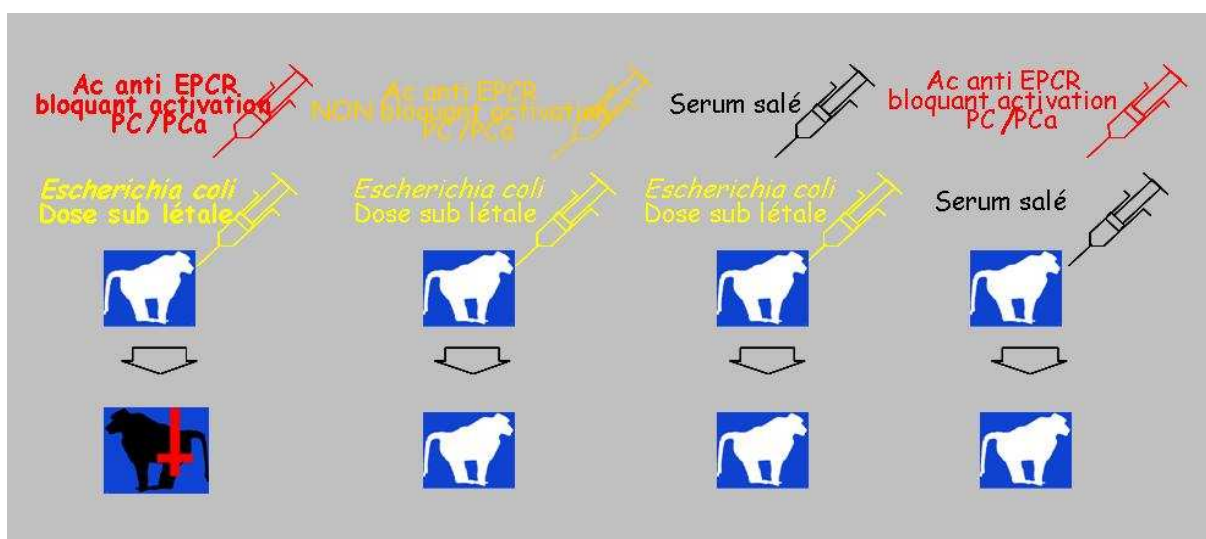


Figure 20 : Importance de l'EPCR in vivo au cours du sepsis

D'après Taylor (Taylor, 2000)

Taylor au cours de travaux sur des modèles de sepsis chez le singe a bien montré le rôle protecteur de l'EPCR face à une infection (modélisée par une dose sub létale d'*Escherichia coli* (**Figure 20**). Des anticorps bloquant l'activation de la PC par l'EPCR transforment une dose sub létale d'*E. coli* en dose létale.

Ces données ont été confirmées sur des modèles de souris très sévèrement déficientes en EPCR et dont la survie est très largement restreinte face à un choc endotoxinique, notamment par aggravation des phénomènes cardiovasculaires (Iwaki, 2005).

Il est probable que le plupart des effets anti inflammatoires de l'EPCR ne peuvent pas être isolés de l'effet de la PCa et notamment passent en fait par l'interaction de la PCa avec l'EPCR et avec les récepteurs de type *Protease activated Receptor* (PAR) à la surface de la cellule endothéliale, ces 3 acteurs étant co-localisés dans des zones types radeaux lipidiques (Bae, 2007). Les effets de la PCa, et notamment les voies d'activation intracellulaire, seront abordés dans le chapitre suivant.

Cependant, il est possible que l'EPCR notamment dans sa forme soluble puisse jouer un rôle plus direct sur les polynucléaires neutrophiles via les PR-3 et les récepteurs leucocytaires MAC-1 très impliqués dans l'adhésion et l'activation leucocytaire (Kurosawa, 2000). Il faut rappeler que PR-3 (cf supra) est impliqué dans la régulation des formes membranaires et solubles d'EPCR (Villegas-Mendez, 2007)

IV. B) EPCR soluble et sepsis

L'EPCR est une protéine particulière du fait de ses 2 formes, membranaire et soluble. Cela rend son exploration *in vivo* difficile. Autant il est maintenant relativement « aisé » de doser l'EPCR soluble circulant dans le sang chez les volontaires sains ou les malades par technique Elisa (commerciale ou non), autant il est difficile d'appréhender l'expression des formes membranaires.

IV. B. 1) L'EPCR soluble est augmenté au cours du sepsis sévère

Dès 1998, une étude (**Figure 21**) avait montré des taux élevés d'EPCR solubles chez les malades septiques tout comme dans un pathologie inflammatoire comme le lupus, en comparaison de volontaires sains (Kurosawa, 1998).

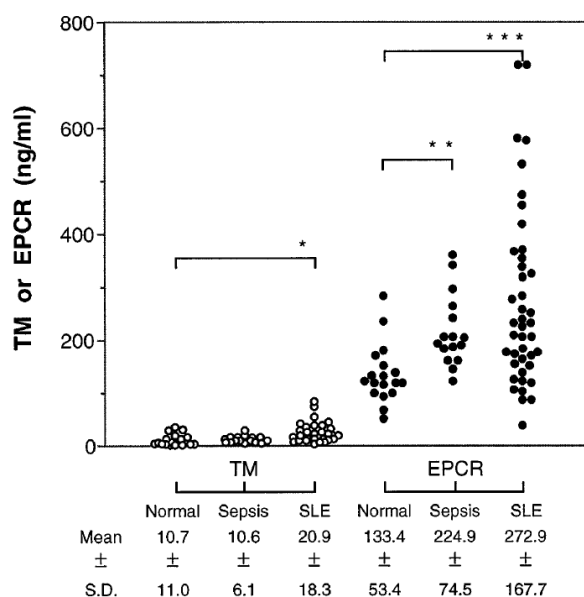


Figure 21 : Taux d'EPCR solubles au cours du sepsis

D'après Kurosawa (Kurosawa, 1998)

Comparaison des taux de TM et d'EPCR solubles pour des volontaires sains (n=18), septiques (n=16) et patients avec lupus (n=42)

P < .05; **P < .001; *P < .0001*

Ces résultats furent corroborés par des travaux beaucoup plus ambitieux concernant une cohorte de 32 patients de réanimation (en sepsis sévère) comparée notamment à 11 volontaires sains. Pour cette cohorte, le taux de sEPCR à l'admission était significativement plus élevé chez les malades septiques [(moyenne+/- ET), 304.6+/-98.2 ng/ml versus 212.4+/-110.3ng/ml, p=0.011]. Ce taux d'EPCR à l'admission n'était pas discriminant comme facteur pronostique, notamment pour prédire la survie (Liaw, 2004).

IV. B. 2) L'EPCR soluble n'est pas modifié au cours du sepsis sévère

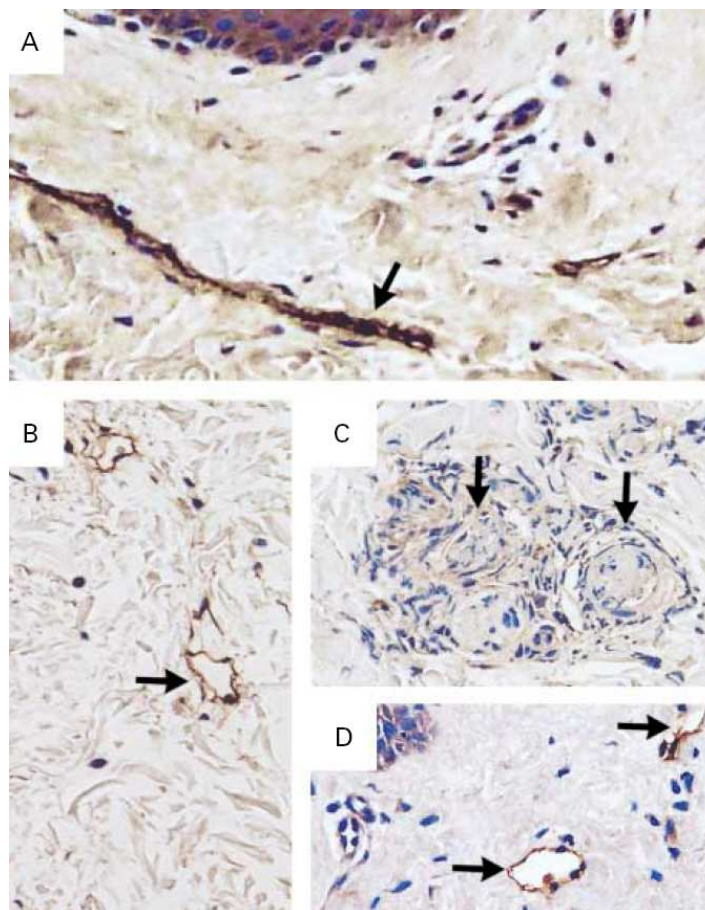


Figure 22 : Expression d'EPCR membranaire in vivo (méningococcémie)

D'après Faust (Faust, 2001)

Biopsie cutanée marquée par un anticorps anti EPCR

A/ Peau normale (X 200) avec marquage intense EPCR.

B/(X 200) C/ (X 400 D/ (X 200) peau avec méningococcémie, réduction du marquage EPCR pour vaisseaux non thrombosés (photo B et D : flèche) ou pour vaisseaux thrombosés (photo C : flèche)

Le *purpura fulminans* au cours de la méningococcémie est un « modèle » exacerbé, violent de dysfonction endothéliale avec hyper activation de la coagulation, et implication forte de la voie de la protéine C activée. Pour la première fois à notre connaissance, un travail a pu explorer de manière simultanée in vivo l'expression des formes solubles (dosages sanguins) et l'expression membranaire (biopsies cutanées de lésions purpuriques avec marquage immunohistochimique) d'EPCR pour 83 enfants atteints de *purpura fulminans* (Faust, 2001). Il n'existait pas de différence significative pour les taux de sEPCR dans le sang

versus les groupes contrôles et ce, quelle que soit la sévérité de l'atteinte (moyenne[min-max] ; 292 [99.9-784] vs 403[150-724], $p=0.35$). Par contre, comme montré dans les travaux *in vitro*, il existait bien une diminution de l'expression membranaire de l'EPCR à la paroi vasculaire (**Figure 22**).

IV. B. 3) L'EPCR soluble est sous exprimé au cours du sepsis sévère

Enfin un travail plus récent s'est attaché à comparer 30 malades en sepsis sévère, à 30 malades avec des défaillances viscérales (comparables) mais non septiques et 30 volontaires sains (Borgel, 2007). Il est noté une baisse significative de l'EPCR soluble chez les malades septiques (comparables chez les non septiques) par rapport aux volontaires sains, [médiane (IQR) ; septiques 79 ng/ml (56-123) versus volontaire sains 119(91-211) ; $p=0.0014$).

IV. B. 4) EPCR soluble et sepsis : Synthèse :

Les travaux concernant les dosages d'EPCR solubles à la phase initiale du sepsis sont encore discordants, montrant selon les publications une augmentation, une stabilité ou encore une baisse des taux par rapport aux volontaires sains. Ceci nécessite la poursuite des explorations. Cependant, quelques hypothèses explicatives peuvent être avancées. Tout d'abord, les cohortes ne sont pas tout à fait identiques quant au recrutement. De plus, on sait que le sepsis sévère est un processus dynamique et bien que la méthodologie de ces travaux ait prévu des inclusions généralement avant la 24^{ème} heure après le début des défaillances viscérales on peut imaginer que le moment du prélèvement sanguin ne soit pas strictement superposable entre ces cohortes. On peut surtout imaginer que ces différences de dosage soient sous l'influence d'autres facteurs comme des différences génétiques, sous l'influence de l'haplotype A3, ou du genre masculin. Il semble se confirmer qu'il existe de grandes différences individuelles entre les taux de base d'EPCR et que cette protéine est finalement, pour sa forme soluble modifiée en faible proportion au moment du sepsis, ce que nous avons essayé de montrer dans nos travaux (cf manuscrits 1 et 2). Ces résultats montrent aussi que l'EPCR est une protéine dont la régulation est complexe et ne repose pas exclusivement sur le clivage métalloprotéasique, mais qu'il existe aussi des mécanismes transcriptionnels.

Enfin, d'autres modes de régulation *in vivo* peuvent intervenir comme l'émission de microparticules qui permettent d'exporter à distance le message membranaire de la cellule endothéliale, et notamment l'expression membranaire (Perez-Casal, 2005; Meziani, 2010).

Partie 3] LA PROTEINE C / PROTEINE C ACTIVEE

Les 3 systèmes inhibiteurs de la coagulation sont le système du TFPI, le système de l'AT-III et celui de la protéine C. Seul le système de la protéine C a montré des résultats encourageants lors d'essais cliniques dans la prise en charge du sepsis sévère, et a permis la commercialisation et l'utilisation de PCa recombinée (Drotrecogin, Lilly) dans la prise en charge du sepsis sévère.

I) PC/PCa : Structure

La protéine C est une glycoprotéine plasmatique d'un poids moléculaire de 62 kDa, zymogène de sérine-protéase. Elle est synthétisée par le foie sous la dépendance de la vitamine K. La PC est composée d'une chaîne légère de 21 kDa, et d'une chaîne lourde de 41 kDa, jointes par un pont disulfure.

Le gène, de 12 kilobases et contenant 9 exons est situé sur le chromosome 2.

La PC est d'abord synthétisée par l'hépatocyte sous forme de précurseur et subit d'importantes actions biochimiques (clivage, hydroxylation, glycosylation, carboxylation) avant d'aboutir à la forme mature.

La PC n'a aucune activité biologique sous cette forme non activée.

La PC est activée par la thrombine à la surface de la CE, en présence de TM et au niveau d'un récepteur spécifique, cofacteur d'activation, l'EPCR. L'activation thrombinique répond à une protéolyse limitée du peptide d'activation, la liaison thrombine-TM accélérant considérablement cette réaction. La PC une fois activée (PCa) circule dans le plasma, avec une demi-vie très brève (inférieure à 30 minutes) (Esmon, 2000; Alberio, 2001).

Les inhibiteurs naturels de la PCa sont l'inhibiteur de la PC (*Protein C Inhibitor*, PCI), l' α 1-antitrypsine (α 1-AT), l' α 2-antiplasmine (α 2-AP) et l'Inhibiteur de la C1 estérase (C1-inh).

II) PCa : Activités anti coagulantes et pro fibrinolytiques

Même s'il est difficile et parfois artificiel de séparer les effets de la PCa sur l'inflammation et sur la coagulation, le rôle de la PCa dans le système coagulation-anti coagulation-fibrinolyse ne sera dans ce document que rapidement abordé pour insister sur les effets cellulaires en lien avec les propriétés anti inflammatoires ou cyto protectrices.

II. A) PCa : effets Anti coagulants

La PCa une fois dissociée du complexe thrombine-thrombomoduline inactive les facteurs FVa et FVIIIa par protéolyse (Marlar, 1981; Walker, 1992).

Cette action est potentialisée par la protéine S, autre glycoprotéine synthétisée entre autre par le foie, et vitamine K dépendante. La protéine S joue le rôle de cofacteur de protéolyse.

La PS circule dans le plasma sous une forme libre, active et sous forme liée à une protéine transporteuse du complément, la C4b binding protein (C4bBP). Le taux de PS libre active dépend donc de cette liaison.

La PC exerce donc une rétroaction négative sur la production de thrombine, selon une cascade d'activation faisant intervenir le complexe thrombine-thrombomoduline comme mécanisme activateur du zymogène synthétisé par le foie, l'EPCR comme modulateur de l'activation et la PS libre comme cofacteur de l'activité anticoagulante .

Les démonstrations cliniques les plus connues (en dehors du sepsis) du caractère anticoagulant de la PC/PCa sont les *purpura fulminans* néonataux dans les déficits congénitaux en protéine C et bien sur le risque de thrombose veineuse favorisé par la résistance du facteur V à la PCa (« FV Leiden ») (Griffin, 1981).

II. B) PCa : effets Pro fibrinolytiques

Simultanément à son action anticoagulante, la PCa démontre une activité pro fibrinolytique. Cette activité relativement lente s'exerce par 2 mécanismes.

Le premier mécanisme est celui d'une inhibition compétitive. La PCa rentre en compétition avec le t-PA pour fixer le PAI-1 (« *Plasminogen Activator Inhibitor-1* »). Il y a donc moins de PAI-1 pour inactiver le t-PA, donc plus de t-PA actif pour dégrader le plasminogène en plasmine et dégrader la fibrine.

Le second mécanisme est une régulation indirecte de la formation de TAFI (*Thrombin Activable Fibrinolysis Inhibitor*). En effet, la PCa diminue par son rôle protéolytique la formation de thrombine qui augmente l'activation du TAFI. Il y a donc une sous expression du TAFI activé, inhibiteur de la fibrinolyse empêchant la fixation du plasminogène sur le réseau de fibrine. Il y a donc diminution du pouvoir anti fibrinolytique joué par la voie du TAFI.

III) La PCa : Effets protecteurs au cours de l'inflammation

III. A) Inflammation et système de la PCa

L'activité de la PC diminue rapidement au cours des états infectieux graves et de la CIVD (Fourrier, 1992; Borgel, 2005). D'ailleurs, les taux de PC et de PCa sont clairement corrélés négativement avec un pronostic péjoratif (Fisher, 2000; Brunkhorst, 2007). La dépression du système de la PC est liée à des mécanismes complexes en relation avec cette réaction explosive au cours du sepsis, qui va générer en excès de la thrombine et toutes les réactions de contrôle qui en découlent. La dépression du système PC/PCa s'explique d'abord par le processus de CIVD et la consommation excessive de tous les facteurs impliqués, par la diminution de la synthèse hépatique (un des premiers organes touchés lors de la défaillance multiviscérale), la dégradation par les systèmes protéasiques et enfin la baisse de la concentration de la protéine S. De plus, au cours de l'inflammation endothéliale, les récepteurs spécifiques, cofacteurs d'activation que sont la TM et l'EPCR sont sous exprimés à la membrane de la CE, diminuant probablement ses capacités d'activation. Bien que « séduisant », ce dernier mécanisme d'action a probablement été sur évalué car les capacités de génération de la PCa semblent finalement relativement maintenues (Liaw, 2004).

Compte tenu de la meilleure compréhension des liens entre hémostasie et sepsis (Levi, 1997), de la démonstration du rôle primordial du système PC/PCa dans ce processus, et de la

démonstration de l'impact de la PCa sur l'inflammation et notamment l'adhésion leucocytaire (Grinnell, 1994; Murakami, 1996), furent débutés des essais thérapeutiques au cours du sepsis chez l'animal. Dès 1987, chez le babouin (**Figure 23**) était montré l'impact de la PCa pour améliorer le pronostic vital au cours de l'infection par bacille gram négatif (Taylor, 1987).

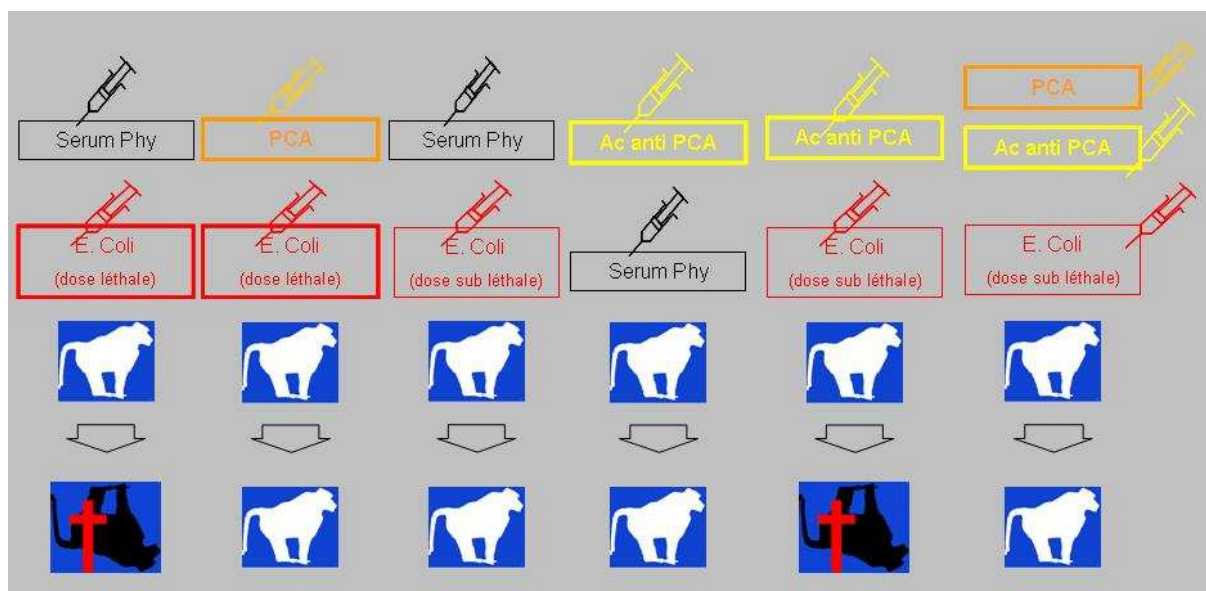


Figure 23 : Impact de la Protéine C activée au cours du sepsis chez l'animal

D'après Taylor (Taylor, 1987)

Après la mise au point d'une forme purifiée recombinante humaine de PCa (drotrecogin alpha) à partir de lignées cellulaires, par les laboratoires Lilly Eli (Yan, 1990), rapidement furent mises en place des essais de phase I et de phase II montrant la relative bonne tolérance de cette molécule et ses effets bénéfiques potentiels sur la coagulopathie au cours du sepsis (Bernard, 2001).

Une étude randomisée contrôlée versus placebo de phase III, « the Protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis (PROWESS) » était conduite par Bernard *et coll.* afin d'évaluer l'efficacité de la PCa recombinée sur la mortalité des patients en sepsis sévère (Bernard, 2001). Comme l'illustre la **Figure 24**, sur un collectif de 1690 patients inclus (850 patients sous PCa et 840 sous placebo), le traitement par PCa recombinée améliorait le risque absolu de mortalité à 28 jours de 6.1% (24.7 % versus 30.8%, $p=0.005$). Dans ce travail, le « prix à payer » était une augmentation relative du risque hémorragique (3.5% versus 2%, $p=0.06$). Ces résultats ont permis la commercialisation aux USA puis en Europe de cette molécule

(Drotrecogin alpha, Xigris®, Lilly Eli) pour la prise en charge du sepsis sévère pour ses formes les plus sévères.

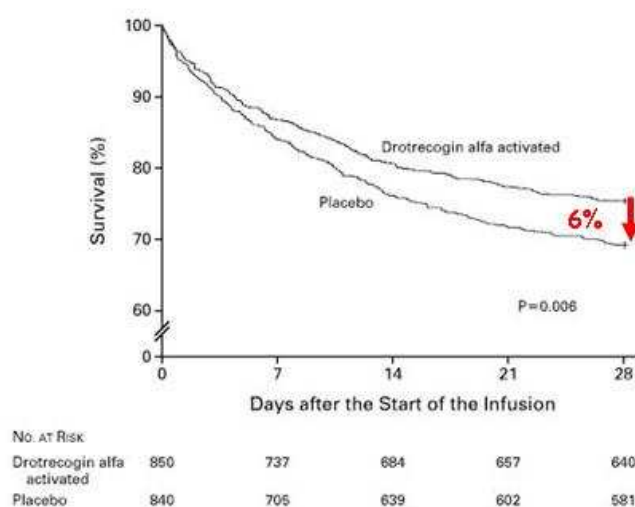


Figure 24 : Survie sous PCa au cours du sepsis sévère (Etude Prowess)

D'après Bernard (Bernard, 2001)

Cependant les résultats de ces travaux sont toujours controversés, quant au design et aux interprétations cliniques, mais aussi, car ils ne pouvaient s'appuyer sur un substratum physiopathologique clair. En effet, ce travail était par exemple, dans l'incapacité de démontrer en dehors des effets sur les paramètres de la coagulation, un effet significatif sur les cytokines de l'inflammation examinées (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 et IL-10) (Dhainaut, 2003).

Ces résultats, malgré la commercialisation du produit, justifiaient de poursuivre les essais cliniques et aussi de poursuivre la recherche afin d'améliorer la compréhension des mécanismes protecteurs de cette molécule, au delà de la coagulation.

III. B) La PCa : Effets cytoprotecteurs

La PCA a des effets protecteurs d'abord, par son rôle direct favorisant la baisse de génération de thrombine, puissant activateur cellulaire de l'inflammation.

Cependant la PCa a des effets directs cellulaires, indépendants de la thrombine, qui vont être rapportés. C'est par l'interaction avec son récepteur spécifique EPCR et le récepteur-effecteur *protease activated receptor-1* (PAR-1), que la PCa agit directement sur les cellules pour exercer une action sur diverses cibles (actions pleïotropiques), avec de multiples effets cyto protecteurs parmi lesquels:

- La modulation de la régulation des gènes
- La protection du rôle de barrière de l'endothélium
- L'activation de la « machinerie » anti inflammatoire
- L'activation du système anti apoptotique.

On voit déjà que la dichotomie « effet sur la coagulation/effet sur la cytoprotection » a un substratum biochimique avec des ligands et des récepteurs différents pour la PCa. Cela permet alors d'envisager des voies de recherche vers des formes de variants de PCa conservant les effets potentiellement anti inflammatoires et dénués d'effet anticoagulant par exemple (Mosnier, 2007).

III. B. 1) Le récepteur PAR

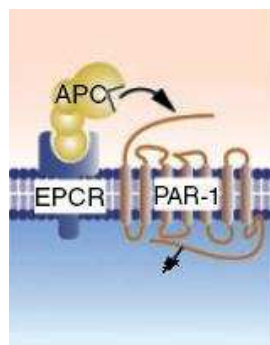


Figure 25 : Le récepteur PAR

D'après Griffin (Griffin, 2007)

Les récepteurs *protease activated receptors* (PAR) sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à des protéines G. Ces récepteurs sont activés par clivage d'une extrémité N terminale extra cellulaire par les domines protéolytiques de certaines protéines. Il y a 4 familles de PAR-1,-2,-3, et -4.

PAR, et en particulier PAR-1 est un récepteur qui peut être clivé, activé à la fois par la thrombine et à la fois par la PCa avec des effets le plus souvent inverses (Ruf, 2004). Les mécanismes régulant ces effets respectifs sont mal compris (Ludeman, 2005; Riewald, 2005).

Les mécanismes anti inflammatoires et cyto protecteurs de PCa passent, en présence d'EPCR, par sa « complexation » avec ce récepteur PAR-1. Grâce à ses propriétés amidolytiques, la PCa clive Par-1 et déclenche des voies de signalisation intracellulaires comme celles des MAP kinases et/ou des PI3 Kinases, qui sont des voies de signalisation préférentielles impliquées dans l'activation TNF- α . Ces mécanismes ont été démontrés à la surface des CE mais aussi d'autres cellules comme les cellules mononuclées, les CML ou encore les cellules neuronales (Riewald, 2002; Domotor, 2003; Feistritzer, 2006; Bretschneider, 2007)

Pour cette nécessaire collaboration, ces 2 récepteurs EPCR et PAR sont regroupés, co localisés avec la TM également sur des zones de « radeaux lipidiques » (Bae, 2007). La dépendance entre PAR-1 et EPCR est encore discutée.

III. B. 2) Role de la PCa dans l'expression des gènes

La PCa régule directement ou indirectement de nombreux gènes. Elle implique une baisse de régulation des gènes codant pour une activité pro inflammatoire et/ou pro apoptotique et inversement sur-régule les gènes codant pour une activité anti inflammatoire et/ou anti apoptotique (**Tableau 4**). Ces effets passent essentiellement par la voie NF-kB, une des voies intra cellulaires préférentielles de l'activation par le TNF- α (Joyce, 2001; Riewald Ruf, 2005). Pourtant, c'est via ce même récepteur PAR-1 qu'à la fois la thrombine et la PCa aux effets opposés, peuvent agir en intra cellulaire. C'est en fonction du contexte (par exemple, lorsque la CE est activée notamment par le TNF- α) que ce récepteur alors activé induit des signaux intracellulaires différents et donc des effets différents (Cheng, 2003; Riewald Ruf, 2005).

Les protéines NF- κ B sont des activateurs transcriptionnels présents dans la cellule sous forme de dimères (**Figure 26**). Les membres de cette famille sont au nombre de cinq : p50 (et son précurseur p105), p52 (et son précurseur p100), c-rel, p65 (aussi appelée relA) et relB.

En l'absence de signaux extracellulaires spécifiques, les dimères NF- κ B sont retenus dans le cytoplasme sous une forme inactive par leur interaction avec les molécules de la famille I κ B. Cette famille de protéines comprend cinq membres : I κ B α , I κ B β , I κ B γ , et les précurseurs p105 et p100, qui ont donc une double fonction. À la suite de diverses stimulations (par le TNF- α notamment), les molécules I κ B sont phosphorylées par un complexe kinase composé de trois sous-unités : deux sous-unités catalytiques (IKK α et IKK β) et une sous-unité régulatrice, NEMO/IKK γ . Ces phosphorylations entraînent l'ubiquitinylation des I κ B puis leur dégradation (par le protéasome 26S), ce qui a pour conséquence de permettre aux dimères NF- κ B d'être transportés dans le noyau où ils se fixent sur les promoteurs de leurs gènes cibles (Zingarelli, 2005).

Deux voies d'activation de NF- κ B ont été caractérisées. La voie dite canonique (induite par les signaux classiques comme le TNF- α) implique NEMO et les kinases IKK α et IKK β , et aboutit à la dégradation complète des inhibiteurs I κ B, libérant des complexes de type p50/p65. La voie alterne (induite par des molécules comme la lymphotoxine β , BAFF et le ligand de CD40) implique les protéines kinases NIK et IKK α , et conduit à la dégradation partielle du précurseur p100, libérant ainsi des complexes de type p52/relB et p52/relA.

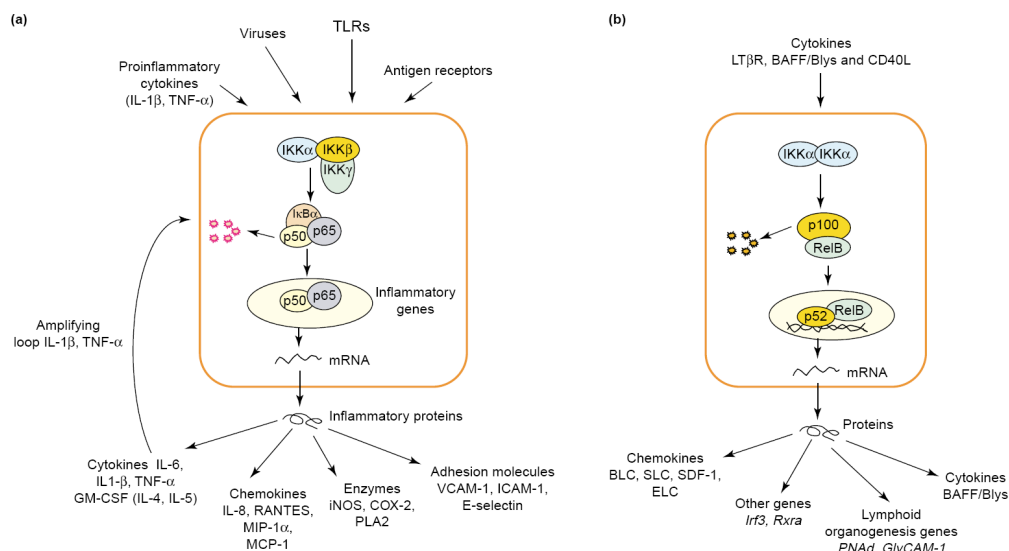


Figure 26 : La voie NF- κ B

D'après Bonizzi (Bonizzi, 2004)

a) Voie classique (canonique) b) voie alterne

Gène	Protéine	Voie Impliquée
Sur régulation par la PCa		
BCL2A1	A1	Apoptose
BMP2	BMP-2	Différenciation
CCL2	MCP-1	Inflammation
Cx3CL1	Fractalkine	Adhésion
CXCL2	MIP-2	Inflammation
DDX21	RNA helicase	Transcription
F3	TF	Coagulation
H-BEGF	HBEGF	Prolifération
IL1R-1	IL1R-1	Inflammation
IL-6	IL-6	Inflammation
IL-8	IL-8	Inflammation
NF-κB-1	NF-κB	Transcription
NF-κB-2	NF-κB-2 p100	Transcription
NOS3	eNOS	Inflammation
NR4A-1	TR-3	Apoptose
NR4A-2	NURR1	Transcription
NR4A-3	NOR-1	Transcription
PCNA	PCNA	Cycle cellulaire
PTGS-2	COX-2	Inflammation
SMAD-3	SMAD-3	Apoptose
TNFAIP-3	A20	Apoptose
Sous régulation par la PCa		
B2M	B2M	Inflammation
BIRC-5	Survivin	Apoptose
CALR	Ro	Inflammation
CMKOR-1	RDC-1	Signaling
CX3CL-1	Fractalkine	Adhésion
EFNA-1	Ephrin-A1	Chemoattraction
ICAM-1	ICAM-1	Adhésion
IL1R-1	IL1R-1	Inflammation
LTB	LT-β	Inflammation
MMP10	MMP-10	Protéolyse
NF-κB-1	NF-κB	Transcription
NF-κB-2	NF-κB-2	Transcription
SELE	E-Sel	Adhésion
SOD-2	Mn SOD	Oxydation
THBS-1	TSP-1	Adhésion
TP-53	p53	Apoptose
VCAM-1	VCAM-1	Adhésion

Tableau 4 : Principaux gènes régulés par la PCa

D'après Mosnier (Mosnier, 2007)

La voie NF-κB est cruciale car elle contrôle un grand nombre de gènes codant pour des cytokines, chemokines, molécules d'adhésion, molécules régulatrices de l'apoptose et de la prolifération cellulaire (Chen, 2004).

III. B. 3) PCa : Effets sur le rôle de barrière endothéliale

La rupture des jonctions entre les CE activées, notamment au moment du sepsis est un des facteurs pivots dans la pathogénie de l'inflammation. En effet, la perte d'intégrité du rôle de barrière mécanique, la perte de continuité entraîne une perméabilité endothéliale accrue, une fuite protéique vers la matrice responsable d'une aggravation hémodynamique et d'une aggravation des phénomènes inflammatoires (McVerry, 2004). Ces processus sont très impliqués dans la sévérité du sepsis, et en particulier dans la pathogénie des défaillances viscérales.

La fixation de la PCa sur le récepteur PAR-1, là-encore de manière dépendante de l'EPCR, induit la sphingosine kinase-1 (SphK-1) qui fait sur exprimer la protéine intracellulaire la sphingosine-1- phosphate (S1P) (**Figure 27**). S1P active son récepteur trans membranaire couplé à des protéines G, le récepteur S1P₁ (Feistritzer, 2005; Finigan, 2005). Ce récepteur induit des voies de signalisation via la famille Rho et les MAP Kinases (dont notamment ERK 1/2) pour réduire la perméabilité endothéliale, restructurer le cytosquelette et le stabiliser.

La thrombine puissant activateur cellulaire a des effets cellulaires inverses, pourtant via le même récepteur. Ces messages cellulaires sont pour cette voie, modulés dans un sens ou l'inverse, en fonction de l'intensité de l'induction de S1P.

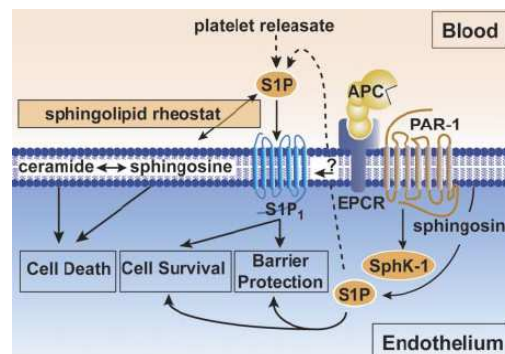


Figure 27 : Rôle de la PCa dans le maintien de la barrière endothéliale

D'après Mosnier(Mosnier, 2007) et Feistritzer(Feistritzer Riewald, 2005)

D'autre part la voie des sphingosines (S1P) ici décrite et induite par la liaison PCa/PAR-1 a également des effets et/ou des interactions avec les voies de l'apoptose et de la survie cellulaire.

III. B. 4) PCa : Effets Anti apoptotiques

L'apoptose est un processus complexe, finement régulé qui amène la cellule jusqu'à la mort programmée, par opposition à la nécrose (Green, 2005). L'effecteur terminal en est le cytochrome c au niveau mitochondrial. Les effets anti apoptotiques de la PCa ont pu être démontrés *in vitro* comme *in vivo* (Bilbault, 2007).

Le signal intra cellulaire repose toujours sur le signal PCa sur PAR-1 en présence d'EPCR au niveau de la membrane cellulaire, notamment endothéliale (Mosnier, 2003).

Les signaux induits sont de 2 ordres. En effet, il existe une régulation directe par un « signaling » non encore clairement identifié vers les 2 voies de l'apoptose cellulaire (intrinsèque et/ou extrinsèque). D'autre part, pour une bonne partie, il existe un effet sur les voies de l'apoptose via l'effet régulateur de l'expression des gènes, par l'effet sur la voie NF-kB (cf **Tableau 4**).

Sur la voie intrinsèque, l'APC module l'expression des molécules pro apoptotiques comme p53 et Bax et maintient l'effet protecteur anti apoptotique de Bcl-2 (Joyce, 2001; Cheng, 2003; Guo, 2004). L'APC agit également sur la voie (extrinsèque) des caspases en inhibant les caspases initiatrices (caspases 8, ou 9) autant que les caspases (3) effectrices (Guo, 2004; Liu, 2004).

III. B. 5) PCa : Effets Anti inflammatoire

Les effets anti inflammatoires démontrés pour la PCa touchent 2 cibles, les CE et les lignées leucocytaires. Ces réactions sont complexes. L'effet de la PCa sur ces cellules passe

essentiellement par l'inhibition de la voie NF- κ B et des cytokines qui en dépendent (**Tableau 4**), via l'activation de Par-1 et EPCR (Opal, 2003).

Les conséquences en sont essentiellement une baisse de l'expression des médiateurs inflammatoires de l'endothélium, et une baisse de l'expression des molécules d'adhésion telles que ICAM-1, VCAM-1 et E-Selectin à la surface des CE (Joyce, 2001; Joyce, 2002; Joyce, 2004).

L'EPCR on l'a vu est exprimé sur une bonne partie de la lignée monocyttaire et macrophagique. Par l'activation PCa /PAR, la PCa entraîne une diminution de l'expression des cytokines induites (IL-1 β et TNF- α) surtout, du fait de l'extinction de la voie NF- κ B. Est également inhibé le relargage de chemokines telles que MIP-1 ou MCP-1 par la lignée monocyttaire (Brueckmann, 2004)

Plus récemment a été montré un effet inhibiteur de la PCa sur la migration leucocytaire des neutrophiles via des intégrines, cette fois-ci indépendamment d'EPCR (Elphick, 2009)

Dans ces mécanismes, il ne faut pas oublier les interactions entre l'EPCR soluble, les PR3 et les intégrines Mac-1 des polynucléaires dont les mécanismes ne sont pas encore élucidés (Kurosawa, 2000).

Au total, ces activités anti inflammatoires de la PCa, qu'il est difficile d'individualiser des propriétés anti apoptotique et de protection de la barrière endothéliale, conduisent en phase d'activation inflammatoire, à diminuer le chimiotactisme, diminuer le « rolling » à la surface des CE, à diminuer l'adhésion leucocytaire et à diminuer l'accumulation cellulaire inflammatoire dans les tissus.

III. C) La PCa : Effets vasculaires et hémodynamiques

La dysfonction endothéliale au cours d'un sepsis occasionne un déséquilibre entre tonus vasoconstricteur (catécholamines, angiotensine, thromboxane....) et vasodilatateur (prostacycline, peptides atriaux natriurétiques, NO, adénosine...). Le tonus vasoconstricteur, la réactivité vasculaire et la sensibilité aux vasoconstricteurs sont diminués au cours du sepsis.

Même si l'essentiel de ce travail s'est focalisé sur les propriétés intracellulaire cytoprotectrices de la PCa, en particulier sur les CE, il faut rapporter que cette molécule a également des mécanismes d'action vasculaires.

L'importance de ces effets avait été suspectée sur les résultats de « Prowess » qui avaient montré une amélioration rapide des défaillances cardio circulatoires chez les malades recevant la PCa. Ces données ont été confirmées par exemple sur des analyses fonctionnelles d'amélioration de la microcirculation sous PCa ou sur des cohortes de patients (De Backer, 2006).

Des études animales chez le rongeur, ont montré que l'utilisation de PCa recombinante d'abord à doses supra thérapeutiques (Favory, 2006), puis à doses thérapeutiques, au cours de chocs endotoxiniques, entraînait une amélioration rapide des paramètres vasculaires et cardiaques. Ces processus sont essentiellement régulés par la voie de la NO synthase endothéliale (via AKt) et la voie TNF- α /NF- κ B (Sennoun, 2009; Sennoun, 2009).

Les démonstrations chez l'homme sont encore pauvres et devront être explorées plus finement avec les résultats des études cliniques à venir (« Etude PROWESS Shock » par exemple).

Partie 4] OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

L'unité INSERM U643 (dirigée jusqu'à récemment par le Pr Souillou), adossée au service clinique de Transplantations Rénales du CHU de Nantes dans le cadre d'un institut (Institut thématique Transplantation-Uro-Néphro, ITUN) a pour centre d'intérêt les « Immuno interventions dans les Allo et Xéno transplantations ». Au sein de cette unité, s'est individualisée l'équipe dirigée par Béatrice CHARREAU dont l'activité de recherche est depuis plusieurs années, centrée sur la cellule endothéliale (« Effecteurs et mécanismes de la dysfonction endothéliale au cours de la transplantation »). En effet, au cours de la transplantation d'organe solide notamment rénale, l'activation et la dysfonction endothéliale participent pleinement à l'initiation et au développement des mécanismes de rejet. L'activation des CE induit le recrutement et l'infiltration des leucocytes dans le greffon autant que des troubles de l'hémostase dans la microcirculation, initiant ainsi les épisodes de rejet aigu. La dysfonction endothéliale est également lourdement impliquée dans le rejet chronique.

Un des axes de recherche de l'équipe est donc l'identification des mécanismes et des effecteurs de la dysfonction endothéliale afin de développer de nouvelles stratégies de prévention ou de traitement des rejets en allo et xéno transplantations.

Par ailleurs, il n'est plus nécessaire de démontrer l'implication forte de l'activation et de la dysfonction endothéliale au cours du sepsis, pathologie majeure dans un service de réanimation. Il semblait alors tout à fait naturel de nouer des collaborations entre l'équipe de Réanimation Médicale du CHU de Nantes (Pr. D. Villers) et l'équipe de recherche dirigée par Béatrice Charreau sur la thématique de la dysfonction endothéliale notamment au cours du sepsis et son intrication avec l'hémostase. Le projet de recherche pour le travail de Master 2 puis de Thèse s'est monté dans le contexte d'un débat passionné sur l'intérêt thérapeutique de la protéine C activée recombinante (drotrecogin alpha, Xigris°, Lilly) après les publications de l'étude randomisée multicentrique (Prowess) montrant l'intérêt de cette thérapeutique au cours du choc septique chez l'adulte (Bernard, 2001) et les travaux de confirmation dans une étude ouverte de tolérance (Vincent, 2005).

Nous avons décidé de travailler dans 2 directions : l'analyse de la régulation des formes membranaires et solubles de l'EPCR et analyser les mécanismes d'action intracellulaires de la PCa recombinante.

I) Régulation des formes membranaires et solubles de l'EPCR

I. A) Contexte

La voie de la protéine C activée et son importance dans le sepsis ont commencé à être explorés dans la décennie 1990-2000. C'est notamment en 1994, qu'a été décrit le récepteur endothélial de la protéine C et son rôle de cofacteur dans l'activation de la protéine C (Fukudome Esmon, 1994). Ce récepteur a été décrit comme une protéine membranaire sur les CE mais aussi comme pouvant libérer une forme soluble, circulante.

En 1998, ont été publiés des résultats préliminaires qui montraient l'élévation des taux sanguins de la forme soluble de l'EPCR au cours du sepsis en comparaison à des volontaires sains et/ou des malades avec une maladie inflammatoire (lupus)(Kurosawa, 1998). En même temps que se mettait sur pieds notre projet, ont été publiés des travaux confirmant des taux significativement élevés d'EPCR chez des malades en sepsis sévère à l'admission (Liaw, 2004).

I. B) Objectifs

La première partie de ce travail de thèse a consisté en la réalisation d'une étude clinique observationnelle sur une cohorte de 40 patients en sepsis sévère. L'objectif (et l'originalité) de ce travail résidait principalement en la réalisation d'une étude cinétique (notamment de l'EPCR soluble) avec des prélèvements sanguins réalisés sur 5 jours consécutifs, dès l'admission et les 4 jours suivants. Cela permettait la constitution d'une sérothèque pour analyse ultérieure. Cette cohorte de malades septiques devait être comparée à 2 autres cohortes, 1 de malades inflammatoires (maladie de Wegener) et une cohorte de volontaires sains. Ce travail avait pour objectif non pas d'analyser un dosage statique d'EPCR à l'admission mais d'analyser des variations de taux avec un aspect dynamique, et de

rechercher les facteurs (liés au patient ou à sa pathologie) qui pouvaient influencer ces cinétiques.

Cette étude devait s'appuyer sur un travail plus fondamental d'analyse concomitante des formes membranaires et solubles de l'EPCR dont la régulation respective est mal comprise. Nous avons pu bénéficier de l'apport d'une bio banque de CE de type HAEC que l'équipe de recherche a constituée depuis des années. Cette banque cellulaire a permis sur des cultures cellulaires endothéliales primaires au repos ou activées par divers stimuli inflammatoires d'analyser la régulation de l'EPCR à la fois sur la membrane cellulaire et dans les surnageants pour les formes solubles. Nous avons voulu caractériser cette régulation et rechercher les facteurs qui l'influençaient. Nous nous sommes notamment intéressés à l'impact dans la régulation *in vitro* du génotype (de l'haplotype A3 et du sexe masculin). En effet, ces 2 facteurs semblaient influencer les taux d'EPCR circulant *in vivo* (volontaires sains).

II) Mécanismes d'action de la PCa

II. A) Contexte

Malgré la publication en 2001 de résultats positifs sur la mortalité quant à l'utilisation de la PCa recombinée (drotrecogin), les débats étaient intenses (et le restent d'ailleurs), en partie devant le peu de travaux expliquant de manière claire les mécanismes d'action de cette molécule au cours de cette phase inflammatoire que représente le sepsis sévère.

II. B) Objectifs

Nous avons mené des travaux *in vitro* visant à évaluer les effets anti inflammatoires cyto protecteurs de la PCa recombinée sur les CE, en analysant notamment les signaux intracellulaires induits. En particulier, nous avons voulu nous focaliser sur les voies de signalisation des PI3 Kinases, des MAP kinases et de NF- κ B induites par le TNF- α et/ou la PCa et les interactions entre ces différentes voies.

III) Organisation du travail de thèse

III. A) Etude clinique

Ma participation directe dans ce travail de thèse a été d'abord de mettre en place l'étude observationnelle clinique (« EPCR sepsis ») dans le service de Réanimation médicale du CHU de Nantes. Ce travail a débuté par l'écriture du projet en collaboration avec Béatrice Charreau et la Direction de la Recherche Clinique (notamment la cellule méthodologique) du CHU de Nantes. Le travail a consisté également en l'obtention des autorisations éthiques, réglementaires et administratives ainsi qu'en la recherche d'une partie du financement. La gestion du protocole dans le service de Réanimation a été placée sous ma responsabilité, en collaboration avec les autres praticiens du service (inclusion, consentement de participation, gestion des prélèvements sanguins pour constitution de la serothèque, « data management »....).

Enfin les analyses statistiques, relativement complexes compte tenu de la méthodologie (cf manuscrit) ont été réalisées en collaboration étroite avec le Pr V. Sébille, responsable de la plateforme de Biométrie au CHU de Nantes et de l'Equipe d'Accueil 4275 («Biostatistique, Recherche Clinique et Mesures Subjectives en Santé»).

III. B) Analyses de laboratoire

Pour les analyses de laboratoire réalisées au sein de l'équipe de recherche, ces travaux ont la particularité d'avoir utilisé un éventail assez large des techniques actuellement à disposition. Sous la direction de Béatrice Charreau, cette équipe de recherche est constituée de membres, doctorants, ingénieurs, ou techniciens, qui manient l'intégralité de ces techniques. Cependant, chacun des membres titulaires a pris plus particulièrement l'expertise dans une des techniques, pour gagner en performance et faciliter l'encadrement et la formation.

Ainsi au cours de ce travail de thèse, j'ai d'abord pu apprendre et maîtriser les techniques de cultures de CE en collaboration avec toute l'équipe.

J'ai pu réaliser l'analyse de l'expression des protéines membranaires et/ou solubles par technique ELISA, ELISA cellulaire, cytométrie de flux, marquage par immunofluorescence et/ou Western Blot, en collaboration avec Béatrice Charreau, Mathias Chatelet, Julie Devallière, Pierre Tonnerre et Nathalie Gérard.

Les extractions d'ADN avec analyses génomiques ont été réalisées en collaboration avec Nathalie Gérard.

Enfin, les autres techniques de biologie moléculaire (extraction d'ARN, PCR, RT-PCR, Taqman°, transfection de gènes reporters, SiRNA....) ont été réalisées en collaboration avec Béatrice Charreau, Thibaud Quillard et Nathalie Gérard.

III. C) Rédaction des articles

La rédaction des 3 articles présentés ici a été réalisée en étroite collaboration et sous la direction de Béatrice Charreau.

Partie 5] TRAVAUX, RESULTATS ET PUBLICATIONS

I) Article 1 : “Circulating Endothelial Cell Protein C Receptor : Endothelial regulation and cumulative impact of gender and A3 haplotype”

par Guitton C, Gérard N, Quillard T, Charreau B.

I. A) Résumé de l'article

I. A. 1) Rationnels et Objectifs du travail

L'EPCR, pour sa forme membranaire, via l'activation de la protéine C, semble avoir un effet négatif sur la coagulation et l'inflammation. Cependant, les facteurs et mécanismes régulant, notamment au cours de l'inflammation, l'expression des formes membranaires et le «relargage» des formes solubles de l'EPCR restent toujours mal connus. Les objectifs de ce travail ont été d'évaluer la régulation simultanée de ces 2 formes (membranaire et soluble) au cours de l'inflammation et notamment d'analyser alors l'impact respectif de l'haplotype A3 et du genre sexuel .

I. A. 2) Matériels et Méthodes

I. A. 2. a) La culture des cellules endothéliales

La technique de culture des CE a été décrite il y a de nombreuses années et a permis de faire progresser de nombreux travaux fondamentaux *in vitro* (Jaffe, 1973). Au départ décrite pour des CE issues de cordons ombilicaux, la culture de CE a pu être étendue à d'autres types cellulaires, par exemple les HAEC.

Pour la plupart des travaux *in vitro* réalisés dans notre équipe de recherche, des cultures primaires de CE humaines ont été utilisées. Il s'agit de cellules endothéliales d'origine artérielle (HAEC) issues de rebus de chirurgie, provenant de recoupes d'artères au cours de transplantations d'organes.

L'isolement de ces cellules est réalisé à partir de recoupes d'artère de bon calibre (artère rénale et/ou aortique). Les CE sont décollées de la matrice artérielle par action de la collagénase et les CE sont ensuite cultivées, isolées, triées grâce à la technique de billes marquées spécifiquement avec un anticorps anti CD31, spécifique des CE. Ces cellules ont été caractérisées par l'équipe de recherche (Le Bas-Bernardet, 2003), elles expriment des molécules de surface spécifiques de cellules endothéliales (CD31, CD146 et ICAM-2) et des marqueurs d'activation (E-Selectine , VCAM-1) induits par des cytokines .

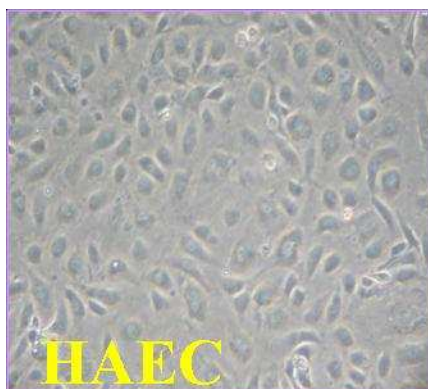


Figure 28 : Culture de cellules endothéliales à confluence

Les cellules sont cultivées en atmosphère humide (37°C, 5%CO₂) en boîtes de Petri traitées préalablement par de la gélatine 1%. Ces cultures se déroulent en milieu spécifique « Endothelial Cell growth Medium » (Kit Promocell, Heidelberg, Allemagne). Ce milieu est supplémenté en serum de veau fœtal 10%, en facteurs de croissance ECGS/C (0.4%), human basic fibroblast growth factor (hbFGF) (1ng/ml), human epidermal growth factor (hEGF) (0.1ng/ml), en hydrocortisone (1µg/ml), en Amphotericine B (50ng/ml), en gentamycine (50µg/ml), en pénicilline (10000U/ml)-streptomycine(10mg/ml) (Sigma-Aldrich Co) et en glutamine (2mM). Les cellules sont amplifiées après traitement avec de la trypsine et sont cultivées jusqu'à confluence (**Figure 28**), et utilisées entre les passages 2 et 5 inclus.

I. A. 2. b) Utilisation d'une bio collection

L'équipe de recherche est au moment de ces travaux à la tête d'une « bio-banque » cellulaire unique de plus de 50 CE issues de recoupes d'artère rénale collectées au moment du prélèvement d'organe (Coupel, 2004). Il s'agit donc d'une banque cellulaire de type Cellules Endothéliales Humaines d'origine Artérielle (HAEC). Ces cellules étaient cultivées à des passages cellulaires entre P2 et P5, jusqu'à confluence et éventuellement activées, par du TNF- α , de l'IL1- β ou de l'Interferon- γ . Des inhibiteurs type Actinomycin D, Cycloheximide et Galardin pouvaient si nécessaires être utilisés en pré-incubation 1 heure avant l'activation par le TNF- α .

Ces cultures cellulaires *in vitro* permettaient d'analyser l'expression membranaire des protéines (notamment l'EPCR) et en même temps l'analyse du surnageant de culture afin d'analyser les formes solubles des protéines libérées dans le milieu de culture. Trente et une de ces CE ont été plus précisément étudiées. De plus, des prélèvements sanguins étaient disponibles pour 18 patients parmi les donneurs d'organe dont sont issus les cultures primaires d'HAEC.

Cette collection permettait donc d'avoir accès de manière concomitante à l'analyse par cellule, notamment pour l'EPCR, du génotype, de l'expression des formes membranaires, des dosages des formes solubles libérées dans le surnageant et des formes solubles analysées dans le sang *in vivo* au moment du don d'organe.

Enfin, des prélèvements sanguins ont été analysés sur une cohorte de 100 volontaires sains (Etablissement Français du Sang).

Du point de vue des techniques de biologie moléculaire, une analyse du génotype par isolement d'ADN était réalisée sur cette collection d'HAEC, notamment pour rechercher l'haplotype A3. Une analyse de l'ARN était réalisée par RT-PCR pour le gène de l'EPCR.

L'expression membranaire de l'EPCR sur les cellules endothéliales était analysée par technique d'ELISA cellulaire, par cytométrie de flux et/ou par Western-blot.

L'analyse de l'expression des formes solubles d'EPCR dans les substrats liquidiens, type surnageant ou sang, a été réalisé par Western-blot ou par technique ELISA (Stago°).

I. A. 3) Résultats

I. A. 3. a) Effet de l'inflammation endothéliale

L'analyse concomitante des formes membranaires et solubles *in vitro* permettait de démontrer que l'inflammation (médiée par LPS, TNF- α , ou IL1- β et non par l'IFN- γ) diminuait significativement l'expression membranaire d'EPCR à la surface des CE. Dans le même temps un relargage progressif des formes solubles d'EPCR était constaté, sans qu'il soit augmenté par la stimulation inflammatoire (notamment par le TNF- α).

Sur 45 cellules de la bio collection de CE dont le génotype était disponible, 7 étaient porteuses de l'haplotype A3. Parmi les 45 CE, 31 ont eu une exploration concomitante de l'expression des formes membranaires et solubles de l'EPCR. Cette analyse montrait l'importante variabilité de l'expression de ces 2 formes d'EPCR et ce, quel que soit l'haplotype A ou A3. Il ne semblait pas exister de corrélation directe entre l'expression membranaire et la libération dans le surnageant.

I. A. 3. b) Effet de l'haplotype A3

Pour 18 des 31 cellules explorées en détail, des prélèvements sanguins (collectés au moment du don d'organe) étaient disponibles pour dosage de l'EPCR soluble dans le sang. De façon cohérente avec la littérature, les taux sanguins de sEPCR étaient significativement plus élevés chez les porteurs de l'haplotype A3 par rapport aux autres haplotypes. Par contre, entre ces 2 groupes d'haplotypes, il n'existait pas de différence d'expression membranaire ou des taux de sEPCR dans les surnageants de culture cellulaire *in vitro*. La stimulation endothéliale par le TNF- α avait un effet exclusif sur l'expression membranaire en la diminuant sans effet sur le relargage des formes solubles, quelque soit l'haplotype. Ces analyses confirmaient la grande variabilité de l'expression basale ainsi que des réponses à la stimulation endothéliale.

I. A. 3. c) Effet du caractère sexuel

Les hommes avaient des taux sanguins de sEPCR significativement plus élevés (mesurés sur la cohorte de volontaires sains et confirmés sur la cohorte de donneurs d'organes). Par contre, il n'existait pas non plus de différence liée au sexe sur l'expression membranaire d'EPCR par les cellules ou les taux de sEPCR dans les surnageants. Ces données confirmaient encore l'absence de corrélation (au moins *in vitro*) entre les taux plasmatiques et l'expression endothéliale. Il n'existait pas non plus d'influence importante du sexe sur la régulation par le TNF- α des formes membranaires et solubles de l'EPCR.

Au total, ces données confirmaient que le caractère sexuel (masculin) et le portage de l'haplotype A3 exerçaient une influence forte et indépendante sur les taux circulants d'EPCR mais que ces 2 caractéristiques avaient également un impact cumulatif.

I. A. 4) Conclusions

Ces travaux démontrent que le sexe est un facteur majeur associé à l'haplotype A3 pour déterminer les taux circulants d'EPCR dans le sang dans des conditions basales physiologiques.

In vitro, l'inflammation diminue l'expression membranaire d'EPCR en conservant la production de formes solubles.

I. B) Publication

Cet article a été accepté pour publication dans Journal of Vascular Research [**J Vasc Resarch 2011 ; 48 : 336-346**].

Circulating Endothelial Cell Protein C Receptor: Endothelial Regulation and Cumulative Impact of Gender and A3 Haplotype

Christophe Guitton^{a,c} Nathalie Gérard^{a,c} Thibaut Quillard^{a,c}
Béatrice Charreau^{a,c}

INSERM UMR643, ^aInstitut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, et ^bService de Réanimation Médicale, ^cCHU de Nantes, Faculté de Médecine, Université de Nantes, Nantes, France

Key Words

Endothelial cells · Endothelial cell protein C receptor · Inflammation · Tumor necrosis factor- α · Ectodomain shedding

Abstract

Background: The endothelial cell (EC) protein C receptor (EPCR) negatively regulates coagulation and inflammation. Factors and mechanisms regulating the expression of cell-bound EPCR and the release of soluble (s) EPCR are still unclear. **Methods:** We investigated the reciprocal regulation of membrane-bound and sEPCR upon inflammation using primary cultures of vascular EC. The impact of 2 parameters, gender and EPCR gene A3 haplotype, on sEPCR plasma basal level and endothelial expression was examined by Elisa and flow cytometry. **Results:** Exposure of EC to tumor necrosis factor α causes a rapid downregulation of membrane-associated EPCR expression without affecting markedly the spontaneous release of sEPCR by EC. In a cohort of 100 healthy donors, we show that males express significantly higher basal sEPCR in plasma than females (194 ± 12 vs. 145 ± 9 ng/ml, respectively, $p < 0.01$). Both gender and EPCR A3 haplotype affect sEPCR plasma levels but have no apparent effect on EPCR expression by EC. No quantitative correlation between cellular expression and circulating blood sEPCR

was observed, suggesting that endothelial expression may not reflect the plasma level. **Conclusion:** Male gender is another parameter with A3 haplotype associated with elevated sEPCR levels in blood, and both parameters may contribute to selective regulatory mechanisms of EPCR release upon inflammation.

Copyright © 2011 S. Karger AG, Basel

Introduction

The protein C (PC) anticoagulant pathway is a major system that prevents blood coagulation; its impairment is known to influence vital outcome in severe inflammatory diseases such as sepsis [1, 2]. This pathway involves 2 circulating proteins, PC and protein S [3], and 2 endothelial receptors, thrombomodulin [4] and the endothelial cell (EC) protein C receptor (EPCR). Conversion of PC to activated PC is initiated by thrombin bound to thrombomodulin on EC surfaces. Binding to EPCR increases the rate of PC activation by thrombin-thrombomodulin complexes [5]. Once activated, PC has anticoagulant effects but also exhibits anti-inflammatory [6, 7] and antiapoptotic effects [8, 9]. Recent findings demonstrate that EPCR also serves as a cellular binding site for factor VII/factor VIIa [10]. Factor-VIIa-EPCR binding re-

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2011 S. Karger AG, Basel
1018–1172/11/0484–0336\$38.00/0

Accessible online at:
www.karger.com/jvr

Dr. Béatrice Charreau
INSERM UMR643
30, boulevard J.-Monnet
FR-44093 Nantes Cedex 01 (France)
Tel. +33 2 40 08 74 16, Fax +33 2 40 08 74 11, E-Mail Beatrice.Charreau@univ-nantes.fr

duces factor VIIa coagulant activity and facilitates factor VIIa endocytosis and clearing from vessels [11].

EPCR (CD201) is a 46-kDa type I transmembrane protein, which is expressed mainly on the luminal surface of EC from large vessels and which is homologous to major histocompatibility complex class I/CD1 family proteins [12]. Disruption of the *EPCR* gene in mice causes placental thrombosis and early embryonic lethality confirming the key role for EPCR in controlling coagulation [13].

In addition to a transmembrane cell-bound form, a soluble form of EPCR (sEPCR) has been described in plasma [14]. sEPCR can be generated by ectodomain shedding [15] mediated by TACE/ADAM17 [16] or/and by alternative mRNA splicing in haplotype-A3-carrying cells [17]. sEPCR binds both PC and activated PC with an affinity similar to that of membrane EPCR [18]. Binding of activated PC to sEPCR interferes with binding of activated PC to phospholipids and inactivation of factor Va. Furthermore, binding of PC to sEPCR does not enhance activated PC generation, suggesting a procoagulant effect of sEPCR [11, 19].

EPCR levels vary in a wide variety of pathophysiological conditions, and the consequences depend partly on whether it is the membrane-associated or soluble form that is affected [14, 20, 21]. While the role of membrane-associated EPCR is clearly antithrombotic and anti-inflammatory in physiological circumstances, the function of the circulating sEPCR remains unclear.

Regulation of circulating sEPCR versus cell-bound EPCR in physiological condition and upon inflammatory disease has not been determined. Although the *EPCR* gene A3 haplotype has recently been found to be a major determinant of sEPCR levels in blood, only few data are yet available concerning its effect on EPCR expression at the EC surface. Moreover, whether other factors affect cellular and circulating EPCR is still unknown. In the present study, we first investigated the reciprocal regulation of membrane-bound EPCR and sEPCR upon inflammation using a collection of primary cultures of vascular EC. Next, the impact of 2 parameters, gender and *EPCR* gene A3 haplotype, that we found to affect sEPCR plasma basal levels were further examined.

Materials and Methods

Cell Culture and Reagents

Forty-five primary cultures of human arterial EC were isolated from organ transplant donors at the time of transplantation and characterized as we previously reported [22]. For activation, confluent EC monolayers were cultured with human tumor ne-

crosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β or interferon (IFN)- γ (both from R&D Systems, Lille, France). Primary cultures were used between passages 2 and 5. When applicable, cells were pre-incubated with inhibitors for 1 h before incubation with TNF- α . Actinomycin D, cycloheximide and galardin were purchased from Calbiochem (St-Quentin-Fallavier, France).

Blood Sampling

Blood samples from healthy adult blood donors ($n = 100$ individuals) were provided by the Etablissement Français du Sang (Nantes, France) and used as controls. Blood samples from brain-dead transplant donors ($n = 18$) were collected at the time of organ procurement concomitant to EC isolation.

Research Ethics

Informed consent was obtained prior to blood collection and before inclusion in this study for the collection and storage of cells, isolation of DNA and determination of gene polymorphisms. The study was approved by the local medical and ethical committee (Nantes University Hospital, France).

DNA Isolation and EPCR Genotyping

Genomic DNA was extracted from cultured EC (3×10^6 cells) using the proteinase K/phenol-chloroform method. The frequency of the A3 haplotype of the *EPCR* gene was screened using the -1651(C/G) polymorphism. The upstream primer 5'-GCT-GAAATTTTGTATTCTGTCC-3' and the downstream primer 5'-CCAGTATAATGGCTACATTTTACC-3' were previously described [21].

RNA Analysis and RT-PCR

RNA was isolated using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, Calif., USA) and treated with Turbo DNase® (Ambion, Austin, Tex., USA) before reverse transcription (RT). Semiquantitative PCR for EPCR and GAPDH was carried out for 25–30 and 20 cycles, respectively, as follows: 94°C for 30 min, 60°C for 30 min and 72°C for 30 min, with a final extension at 72°C for 3 min. PCR primers were: sense EPCR4993For 5'-CCCAGACACCA-ACACCACG-3', antisense EPCR7320Rev 5'-GTCTGTCTTTG-GAGGATGGGCC-3' for EPCR, and sense 5'-TCATCCCTG-CCTCTACTG-3', antisense 5'-CACCACCCTGTTGCTGTA-3' for GAPDH. PCR products were separated on a 1.5% agarose gel in the presence of ethidium bromide.

Quantitative PCR was performed using the ABI Prism 7700 and 7900 sequence detection application program (PE Applied Biosystems, Foster City, Calif., USA). Relative expression was calculated according to the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, as previously described [23]. Custom primers for EPCR (for EPCR1U: 5'-GCGGAA-AACACGAAAGGGAG-3' and EPCR1L 5'-CAGTGGGCAGATGTGGGAGA-3') were obtained from MWG (High Point, N.C., USA). Primers and probes for the *HPRT* gene were purchased from Applied Biosystems (HPRT; Hs99999909_m1).

Elisa Assays for Membrane-Bound EPCR and sEPCR

For cellular Elisa, EC were grown to confluence and then treated with cytokines on 96-well plates. After treatment, cells were fixed in glutaraldehyde. EPCR detection was achieved using anti-EPCR goat IgG (R&D Systems) at 5 μ g/ml and revealed using peroxidase-labeled anti-goat antibodies (Serotec, Martinsried, Germany). Quantification of sEPCR in plasma samples and cul-

ture supernatants was carried out using Elisa kits (Asserachrom, Stago-Diagnostica, France), performed in duplicates according to the manufacturer's instructions.

Fluorescence-Activated Cell Sorting Analysis

After treatment, EC were harvested and incubated with primary antibodies (10 μ g/ml) for 30 min at 4°C. Monoclonal antibody against human vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) and polyclonal goat anti-EPCR antibodies were from R&D Systems. Then, cells were stained (30 min, 4°C) with a FITC- or PE-labeled secondary IgG F(ab')₂ antibody (Jackson Laboratories, West Grove, Pa., USA). Irrelevant isotype-matched antibodies were used as negative controls.

Western Blot Analysis

Cell lysis was performed in lysis buffer containing 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ and 1% Nonidet-40 in the presence of protease inhibitors (Protease Inhibitor Cocktail; Sigma, St-Quentin-Fallavier, France). Immunoblotting was performed using anti-EPCR, anti-VCAM-1 or anti-tubulin or anti-HLA-E primary antibodies (R&D Systems) and appropriate peroxidase-conjugated secondary antibodies and detected using enhanced chemiluminescence ECLTM analysis system (Amersham). For culture supernatant analysis, total protein gel staining was performed before blotting using SYPRO[®] Ruby (Sigma) to ensure equal protein loading. Staining was performed following the manufacturer's instructions and was detected using an UV transilluminator.

Statistical Analysis

Results from *in vitro* studies are expressed as means $\pm$ SD. Data were analyzed using Prism 4.0 software (Graph Pad), and statistical significance was determined using InStat 3.0 (Graph Pad). Group comparisons were made using two-tailed Student's *t* test, and analysis of variance when more than two conditions were compared. *p* values <0.05 were considered to be statistically significant.

Results

Inflammation Downregulates Cell-Bound but Has No Effect on EPCR Shedding by Vascular EC

While regulation of membrane EPCR has been already documented [5], only few data are available concerning the regulation of its soluble form in normal and pathological conditions. Therefore, in the present study, the coordinated expression of both membrane and soluble forms of EPCR was concomitantly investigated on cultured vascular EC. Firstly, we confirmed that inflammation mediated by lipopolysaccharide, TNF- α or IL-1 β decreases EPCR at the EC surface while no change was found in response to IFN- γ (fig. 1a–c). The decrease was significant at 6 h and rose to a maximum (25–30% of basal level) at 24 h. Mechanistically, RT-PCR analysis demonstrates that decreased EPCR expression by TNF- α results from a downregulation at the mRNA level (fig. 1d).

In parallel experiments, quantification of sEPCR in the culture supernatants demonstrates a spontaneous, time-dependent release of sEPCR by unstimulated cultured EC that reach a plateau level (5-fold increase, as compared to control, *p* < 0.01) at 8 h. Interestingly, TNF- α did not significantly affect the time course and the rate of sEPCR release (fig. 2a). The failure of TNF- α to regulate the shedding of EPCR from EC culture was confirmed by Western blots performed on culture supernatants (fig. 2b). Release of soluble HLA-E was used as a positive control for EC activation [24] and equal protein loading was confirmed by SYPRO staining. We also found that both inhibition of transcription with actinomycin D and inhibition of metalloproteinases using galardin abrogate the production of sEPCR by both resting and activated EC (fig. 2c). Together, these data indicate first that reduced EPCR surface expression on cytokine-activated EC does not result from an enhanced EPCR shedding, suggesting that inflammation does not trigger major changes in circulating sEPCR production.

Variability of EPCR Expression at the Endothelial Level and Impact of EPCR A3 Haplotype

To further investigate factors and biological parameters affecting the expression and release of EPCR, we used a collection of primary cultures of vascular EC isolated, in our center, from brain-dead organ transplant donors at the time of organ procurement for kidney transplantation [24]. Our biocollection includes EC cultures available for polymorphism/phenotype comparative studies as well as the corresponding sera and plasma collected at the time of EC isolation.

Elevated levels of plasma sEPCR have been previously associated with the A3 haplotype of the *EPCR* gene [20, 25]. Consequently, the impact of the *EPCR* haplotype on EC expression and release was investigated further. The frequency of the A3 haplotype of the *EPCR* gene was screened using the –1651(C/G) polymorphism as previously reported [21] and as illustrated figure 3a. We found that 7 out of the 45 EC donors carry 1 A3 allele (A1/A3 or A2/A3). No A3/A3 homozygous carrier was found in our cohort. Endothelial expression of cell-bound and soluble forms of EPCR was investigated by flow cytometry and Elisa, respectively. A comparative analysis of 31 (out of the 45 cultures available) independent EC cultures, including cultures from the 7 A/A3 individuals, is shown in figure 3b. EPCR expression at the cell surface for the 31 samples is shown in increasing order. These data highlight the variability of endothelial expression of EPCR at the cell surface and as soluble form for the individuals of the co-

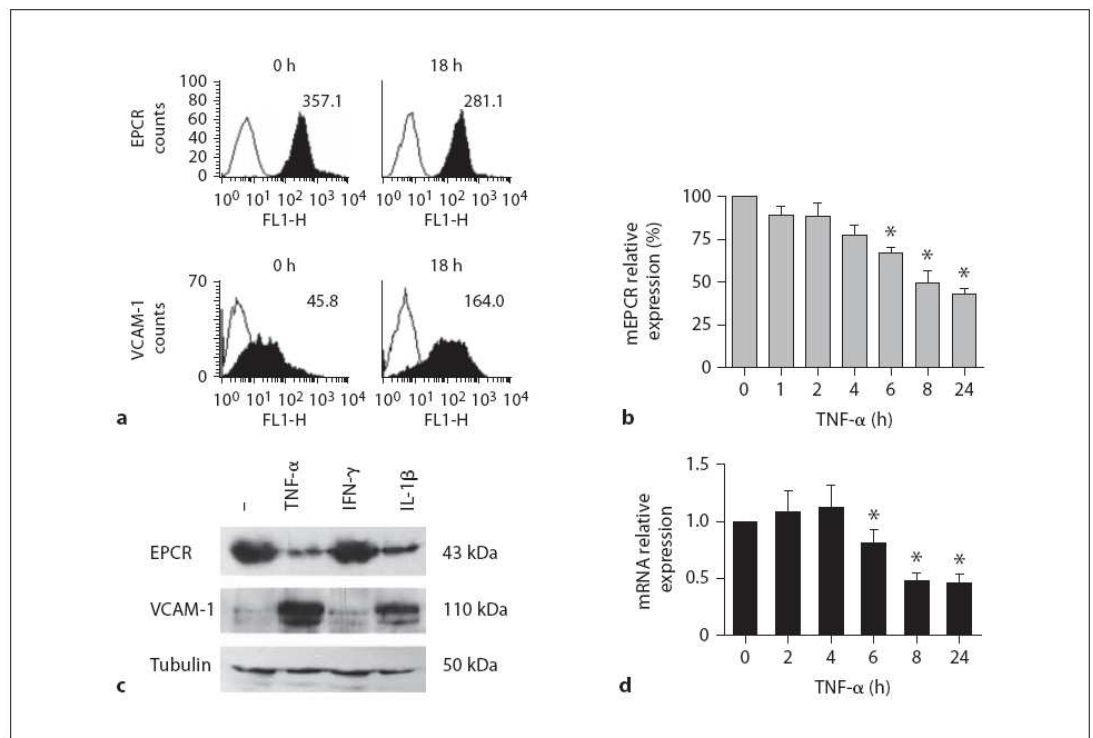


Fig. 1. Regulation of membrane EPCR on vascular EC upon inflammation. **a** Fluorescence-activated cell sorter analysis showing EPCR and VCAM-1 (black histograms) expression on EC treated with or without lipopolysaccharide (5 ng/ml) for 18 h. Iso-type-matched controls are shown as controls (white histograms). Values indicated are the medians of fluorescence intensity. **b** Time course analysis of membrane (m) EPCR expression on EC surface in response to TNF- α investigated by cellular Elisa. Relative expression was calculated using the optical density values, and re-

sults are expressed as percentages of untreated cells; * $p < 0.05$ versus control. **c** Immunoblots for EPCR and VCAM-1 expression in lysates from EC treated with medium, TNF- α (100 U/ml), IFN- γ (100 U/ml) or IL-1 β (5 ng/ml) for 24 h. Blots were reprobbed with an antitubulin antibody to ensure equal loading. **d** EPCR mRNA steady-state levels analyzed by real-time quantitative RT-PCR. Relative expression was calculated using $2^{-\Delta\Delta C_t}$ after normalization to the housekeeping gene; * $p < 0.05$ versus control. All results are representative of at least 3 independent experiments.

hort. This variability was similarly observed in both the A/A3 and A/A groups. Our results also indicate that the EPCR A/A3 haplotype does not correspond to a significant change in EPCR expression and release by EC compared to the EPCR A/A haplotype. Thus, these data further suggest a lack of positive or negative correlation, at the cell level for each individual, between membrane EPCR and sEPCR levels in EC supernatants. Indeed, the highest expression at the cell surface seems not associated with the highest or the lower release in cell culture supernatant.

Differential Impact of EPCR A3 Haplotype on Circulating Blood sEPCR and on Cellular Expression

Next, we sought to determine whether circulating sEPCR levels in blood reflect membrane EPCR expression on EC. To address this question, we sought to deter-

mine whether endothelial expression may correlate with circulating sEPCR in blood samples from the same individuals. For comparison, sEPCR was quantified in blood samples from 18 EC donors, and then individuals were divided into 2 groups according to EPCR haplotype (A/A vs. A/A3). Consistently with previous reports [17, 20], significantly higher plasma levels of sEPCR were found in individuals with 1 A3 allele (176.4 ± 38.5 ng/ml) as compared to those carrying the A1/A2 haplotype (57.4 ± 40.6 ng/ml; fig. 4a, $p < 0.05$). Membrane and soluble forms of EPCR from EC cultures issued from A/A3 and A/A haplotype-carrying individuals were quantified by flow cytometry and Elisa assays, respectively. No significant difference in the level of EPCR on EC surface in A/A (mean of fluorescence intensity, MFI: 262 ± 52 , $n = 24$) and A/A3 (MFI: 269 ± 65 , $n = 7$) individuals was observed

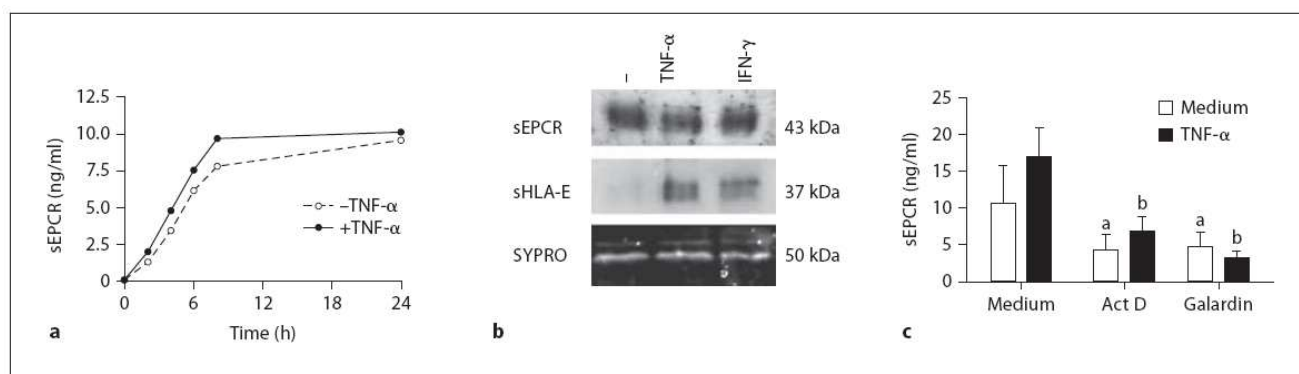


Fig. 2. Release of sEPCR by vascular EC upon inflammation. **a** Time-dependent release of sEPCR in supernatants from EC cultured with or without TNF- α and assessed by Elisa performed in triplicates. **b** Immunoblots for sEPCR in culture supernatants from EC treated for 24 h with cytokines TNF- α (100 U/ml) or IFN- γ (100 U/ml). For comparison, blots were reprobed with an anti-HLA-E antibody. Before blotting, gel was stained with SYPRO

Ruby to ensure equal protein loading (lower panel). **c** Quantification of sEPCR by Elisa in culture supernatants from EC preincubated with actinomycin D (Act D, 0.2 U/ml) or galardin (100 U/ml) and then treated with or without TNF- α for 24 h; ^a $p < 0.05$ versus untreated cells, ^b $p < 0.05$ versus TNF-treated controls. EC used for these experiments carry the *EPCR* A/A haplotype. All results are representative of 3 independent experiments.

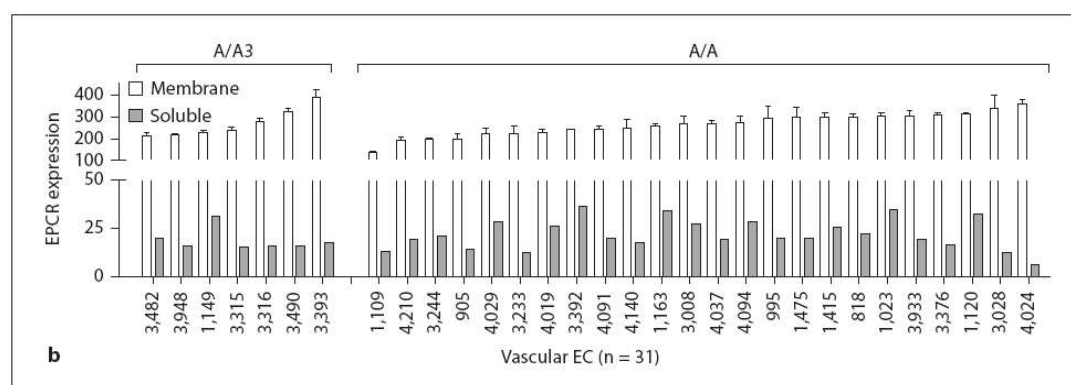
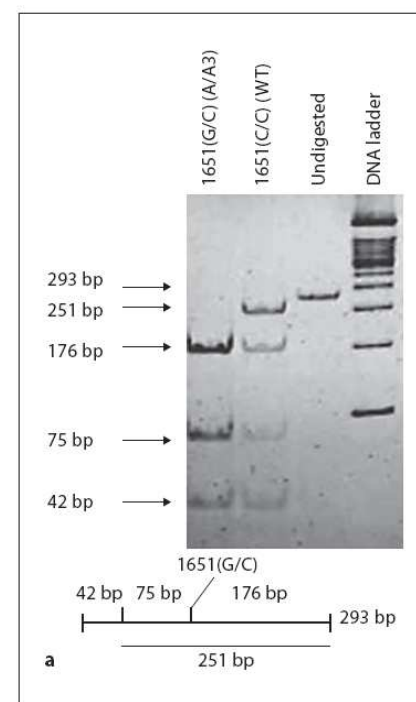
(fig. 4b). Similarly, no difference was found in sEPCR levels in EC supernatants from non-A3 (22.3 ± 7.7 ng/ml, $n = 24$) and A3 (18.6 ± 5.7 ng/ml, $n = 7$) subjects (fig. 4c). Although these results remain to be confirmed in a larger cohort, our findings already indicate that elevated sEPCR plasma levels in A3 individuals may not correlate with higher endothelial expression of EPCR. Then, we investigated whether the *EPCR* haplotype may affect EPCR regulation upon cytokine stimulation and release in cell supernatant. The selective regulatory effect of TNF- α of membrane versus soluble forms of EPCR was further confirmed in this cohort of EC with no difference between A/A and A/A3 haplotypes (fig. 4d-f). A summary of the results issued from 7 individuals with the A/A3 *EPCR* haplotype versus 24 individuals with the A/A *EPCR* haplotype is shown in figure 4e. Data are expressed as means $\pm$ SD of sEPCR levels in culture supernatants for A/A3 and A/A populations according to treatment (with or without TNF). The results illustrated in figure 4f show sEPCR rates in the individual corresponding culture supernatants 24 h after culture in medium alone or in medium supplemented with recombinant human TNF. This representation clearly underlines the variability of sEPCR rates according to cell/individual. The variability in the sEPCR rate is similarly observed in both groups (A/A3 and A/A), as also highlighted in figure 3b. To our knowledge, this is the first study documenting, in concomitant experiments, cellular and soluble forms of EPCR in a large panel of primary arterial EC cultures.

Thus, our study supports evidence for a lack of correlation between the *EPCR* A3 haplotype and sEPCR release by arterial EC, at least in culture, either at rest or stimulated with cytokines. Next, first attempts were made to examine whether the *EPCR* haplotype may affect molecular processes controlling the release of sEPCR. Firstly, by RT-PCR analysis, we confirmed the presence of an alternative splicing product (approx. 450 bp) in EC from A3 individuals as described recently [17] (fig. 4g). Next, RT-PCR further indicates that TNF- α similarly downregulates transcripts for regular EPCR and its isoform (fig. 4h).

Male Gender Is Another Parameter That Correlates with Elevated Blood Circulating sEPCR

Although suspected from previously reported cohort studies [26, 27], the real impact of gender on EPCR was not clearly established. Our ongoing clinical study from septic patients suggests that male gender correlates with higher basal sEPCR [Guitton et al., manuscript in revision]. To address this point, plasma sEPCR was quantified by Elisa in 100 healthy donors (50 males and 50 females), and results were analyzed according to gender (fig. 5a). Our data clearly show that males express significantly higher sEPCR than females (194 ± 12 vs. 145 ± 9 ng/ml for males and females, respectively, $p < 0.01$). A similar difference was found in the plasma samples from our cohort of EC donors although these data were not statistically significant due to the limited size of samples ($n = 18$, 10 males, 8 females, fig. 5b). Since no cells or DNA

Fig. 3. Variability of EPCR expression by EC and influence of EPCR haplotype. **a** The frequency of the A3 haplotype of the *EPCR* gene was screened using the -1651(C/G) polymorphism. Wild-type (WT; -1651C/C; A/A) EPCR provides 2 fragments of 75 and 176 bp while the A3 haplotype provides a full 251-bp fragment including the polymorphic site (-1651G/C). **b** Comparative analysis of cell-bound EPCR and sEPCR in cultured EC (n = 31). Membrane EPCR was analyzed by fluorescence-activated cell sorting and expressed as means of fluorescence intensity (white bars). sEPCR were quantified by Elisa (data are expressed in nanograms per milliliter; gray bars). Samples were classified according to EPCR haplotype (A/A3 vs. A/A) and shown in increasing order of cell surface expression. All results are representative of 3 independent experiments.



were available from the healthy donors for EPCR genetic analysis, the incidence of gender on endothelial expression of EPCR was studied in our cohort of EC cultures. A comparative analysis was performed to examine in cultured EC whether gender may control EPCR expression at the cell level. Investigation was conducted using 31 cultures of EC, 14 from females and 17 from males. As shown in figure 5c and d, we found no significant differences of membrane (MFI: 277 ± 57 for females vs. 253 ± 51 for males, respectively) and soluble EPCR levels in EC culture supernatants (21.6 ± 7.4 vs. 21.4 ± 7.6 ng/ml for females and males, respectively). These data further con-

firm the lack of correlation between plasma levels and endothelial expression, at least in vitro.

We also found that gender does not affect TNF-mediated downregulation of cell-bound EPCR. However, a weak but significant downregulation of the soluble form in response to TNF was observed in females but not in males (fig. 5e, f). Finally, when the impact of gender on circulating blood EPCR rates was examined in relation to the *EPCR* A3 haplotype, the result shown in figure 5g strongly supports the hypothesis that gender and *EPCR* A3 haplotype exert independent and cumulative impacts on basal circulating sEPCR levels.

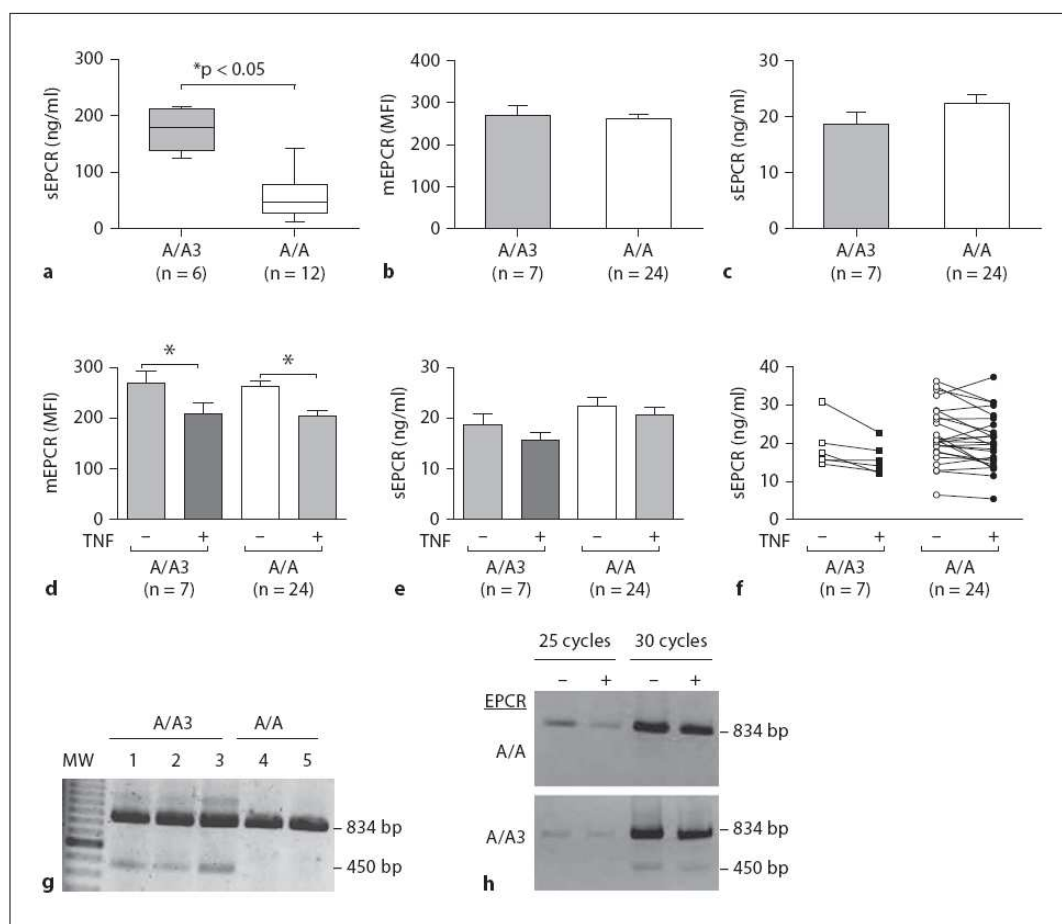


Fig. 4. Impact of EPCR A3 haplotype on blood sEPCR and endothelial expression. For comparison of plasma levels of sEPCR and endothelial expression, individuals ($n = 31$) were divided into 2 groups (A/A3 and A/A) according to their EPCR haplotype. **a** Levels of sEPCR in blood from A/A versus A/A3 individuals as determined by Elisa. Results are shown as box blots. Expression of membrane (m) EPCR (**b**) and sEPCR (**c**) by the corresponding EC cultures was determined by fluorescence-activated cell sorting and Elisa, respectively. **d-f** The regulatory effect of TNF- α was further analyzed in the cohort of EC donors ($n = 31$). Membrane

EPCR was analyzed by fluorescence-activated cell sorting and expressed as means of fluorescence intensity (MFI; **d**). sEPCR were quantified by Elisa 24 h after culture in medium alone or in medium supplemented with recombinant human TNF (**e, f**). Global analysis of the cohort (**e**) and individual regulations (**f**) are shown. **g** RT-PCR analysis showing the full-length (834 bp) and truncated (450 bp) transcripts in A3-carrying EC cultures. **h** Semiquantitative RT-PCR analysis showing the downregulation of both full-length and truncated EPCR mRNA in EC treated with (+) or without (-) TNF for 24 h.

Together, these findings show that male gender is another parameter with the A3 haplotype associated with elevated levels in plasma EPCR in physiological conditions. We anticipate from our preliminary results that both gender and EPCR haplotype may contribute to selective regulation of soluble EPCR upon inflammation. This hypothesis still needs confirmation. Moreover, the mechanisms involved remain to be elucidated.

Discussion

EPCR is a key factor controlling coagulation through the binding of both PC and activated PC. Inhibition of EPCR binding of PC or activated PC was also found to exacerbate the septic response [28, 29]. However, the clinical and functional impact of its soluble counterpart remains to be established. Here, we concomitantly exam-

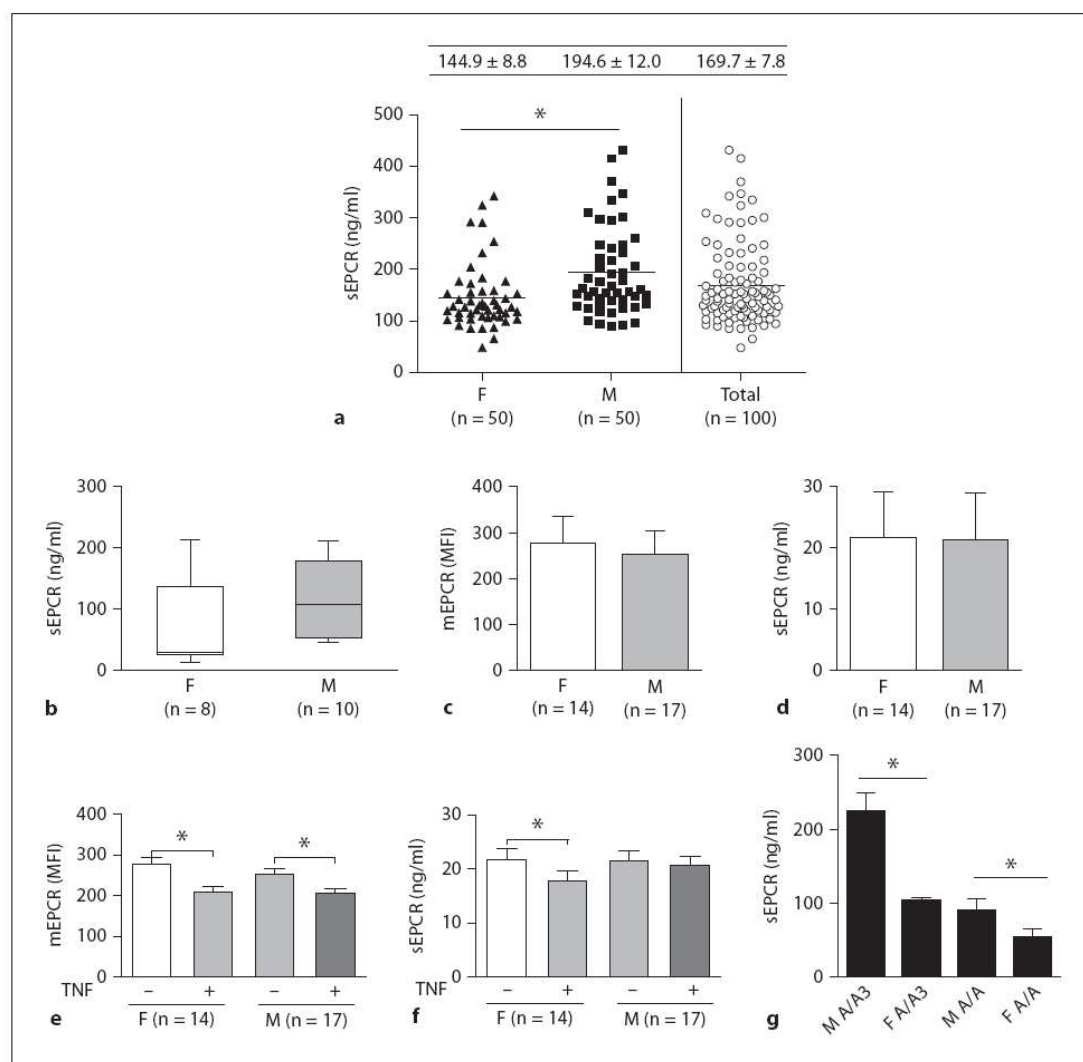


Fig. 5. Impact of gender on blood sEPCR and endothelial expression. **a** Effect of gender on sEPCR in physiological conditions was defined by quantifying sEPCR in blood samples from healthy donors – females (F), $n = 50$; males (M), $n = 50$; total, $n = 100$ – by Elisa; * $p < 0.01$. Mean values $\pm$ SEM are indicated. **b–d** Comparison of plasma levels of sEPCR (**b**) and endothelial expression (**c**, **d**) from the same individuals according to gender. Comparative analysis of cell-bound (m) EPCR (**c**) and sEPCR (**d**) in cultured EC ($n = 31$) according to gender. **e**, **f** The regulatory effect

of TNF- α was further analyzed in the cohort of EC donors ($n = 31$) according to gender. Membrane (m) EPCR was analyzed by fluorescence-activated cell sorting and expressed as means of fluorescence intensity (MFI) $\pm$ SD. sEPCR in the corresponding cell supernatants ($n = 31$) were quantified by Elisa and expressed as mean values $\pm$ SD. **g** Quantitative analysis showing plasma levels of EPCR in A/A and A/A3 individuals according to gender; * $p < 0.05$. Data shown are representative of 3 independent experiments.

ined for the first time the regulation of both cellular and circulating forms of EPCR.

Firstly, our data suggest that the level of sEPCR is tightly controlled even upon inflammation in vivo. This hypothesis is supported by our results obtained using cultured vascular EC. Indeed, we found that in vitro inflam-

mation downregulates the cell surface expression of EPCR without apparently affecting the production rate and kinetic of its soluble form. This result was initially obtained from EC cultures with the EPCR A/A haplotype (fig. 2), and similar data were found on EC with the A/A3 haplotype. Nevertheless, we cannot rule out the possibil-

ity that shedding was higher in the presence of TNF- α , thus compensating the lower number of membrane EPCR molecules in response to TNF stimulation. Indeed, since TNF downregulates membrane EPCR expression, one would expect, as a result, less shedding and therefore lower sEPCR levels. While EPCR is considered as a protective molecule, the function of its soluble form remains to be determined. Functionally, sEPCR bind PC and activated PC with high affinity ($K_d = 75$ nM) [30] and thus may counteract (or balance) the anticoagulant action of membrane-associated EPCR. In previous studies, sEPCR levels in septic patients were found to be significantly higher [14, 31], similar [32] or even lower [33] than in healthy volunteers. These discrepancies may reflect the distribution of the A3 haplotype (15–20%) among the cohorts since this haplotype is associated with higher baseline levels of sEPCR [20].

Our results also indicate that TNF-stimulated EC from either A/A3 or A/A EPCR individuals release similar levels of sEPCR. These findings are somewhere different from the results previously reported by Qu et al. [34]. From our point of view, this discrepancy can be explained as follows: experiments have not been performed on the same vascular cells (human umbilical vein EC vs. human arterial EC) and have used different stimulation (phorbol myristate acetate vs. TNF). Thus, we cannot rule out the possibility that regulation of EPCR may vary according to cell types and stimuli, as also suggested by Qu et al. Finally, the relatively high variability of EPCR expression and release among individuals that we show in the present study (fig. 3b and 4f) may also provide another explanation for these discrepancies. Indeed, our study gives a global analysis of EC cultures from 31 individuals including 7 carrying the A3 haplotype.

Another question that we addressed in this study is whether endothelial surface expression may predict plasma level. Surprisingly our data show no correlation between cell surface and sEPCR release by cultured EC. In other words, EC that express high levels of membrane-bound EPCR do not release high (or even lower) levels of sEPCR in culture supernatants. Furthermore, no correlation was found between endothelial expression and plasma level. Although no definite conclusion can be established given the relatively small sample size, these data may suggest that circulating sEPCR did not result only from EC. Consistently with this hypothesis, several studies demonstrated that other cell types express EPCR including monocytes [35] and smooth muscle cells [36]. However, the ability of these cells to produce sEPCR remains to be demonstrated. Alternatively, it seems likely

that additional cell-specific mechanisms must be invoked in vivo for EC expression that may not occur in vitro.

In regard to parameters affecting sEPCR concentration, our results indicate that male gender is associated with elevated sEPCR compared to the female one. This difference occurs in physiological conditions. This finding results from the analysis of 100 healthy blood donors and still remains to be validated by larger cohorts. Whether males and females respond differently to infection, either in terms of the host response or the eventual outcome, is critically important for both clinical care and the design of future clinical trials of anti-infective therapies. Although data from animal studies strongly suggest that male gender is a risk factor for an adverse outcome from infection, clinical data are still conflicting [37–39]. No difference in EPCR expression (cell-bound and soluble forms) was observed related to gender on cultured EC suggesting that this regulation of sEPCR occurs in vivo. The *EPCR* gene promoter contains several binding sites for several transcription factors including a thrombin response element (CCCACCCC), AP1, AP4 and multiple SP1 and several Ets (E26 transformation-specific sequence) sites [40, 41]. Ets domains are present in essentially all EC-specific gene promoters and play a pivotal role in the determination of endothelial characteristics [42] and emerging data also suggest a broader role for Ets transcription factors in endocrine pathophysiology [4]. Interestingly, Ets1 regulates the expression of some other mediators of coagulation (e.g. thrombin, plasminogen activator inhibitor 1, thromboxane A₂ receptor) [43]. Thus, whether Ets contribute to a gender-specific regulation of EPCR expression in EC should be tested.

Our study further confirms the major impact of the A3 haplotype on the sEPCR baseline level as previously reported [17, 20] and suggest that gender and A3 haplotype have a cumulative impact. We show here that TNF- α downregulates both full-length and truncated transcript corresponding to the EPCR isoform in A3-carrying individuals. Mechanistically, we found that, in the presence of TNF- α , inhibition of RNA synthesis (actinomycin D) strongly promotes the release of sEPCR by EC with the A3 haplotype while inhibition of protein synthesis (cycloheximide) promotes the release of sEPCR by EC with the A/A haplotype suggesting that haplotype-dependent regulatory mechanisms may occur (data not shown). Thus, our in vitro data indicate that a specific posttranscriptional regulation of the EPCR isoform may also occur. In particular, future experiments are needed to explore the molecular impact of A3 haplotype on the increased TNF-dependent release of sEPCR seen in the

presence of inhibitors of the RNA synthesis in the A3 subjects and in the presence of inhibitors of protein synthesis in the non-A3 subjects.

To conclude, we demonstrate here that gender is another key factor with the A3 haplotype that determines sEPCR baseline in physiological conditions. In contrast, our experimental data strongly support the hypothesis that inflammation decreases the cell surface expression of EPCR but preserves the production rate and kinetic of its soluble form. Whether elevated sEPCR in patients correlates with a role for sEPCR in the pathogenesis of inflammatory diseases is still unknown.

Acknowledgments

This work was supported by grants from l'Agence de Bio-médecine, la Société de Néphrologie, Lilly-France. This work was also in part supported by XENOME, an EU-funded Integrated Project in Life Sciences, Genomics and Biotechnology for Health (LSHB-CT-2006-037377) and by a grant from la Fondation de l'Avenir (contract ET8-498). The authors wish to thank Prof. George Karam and the team 'Coordination des prélèvements d'organes et de tissus' (ITUN, CHU de Nantes) for helpful contribution to tissue sample harvesting and Dr. Marianne Coste-Burel (Service de Virologie, CHU de Nantes) for helpful contribution with the blood sample collection.

References

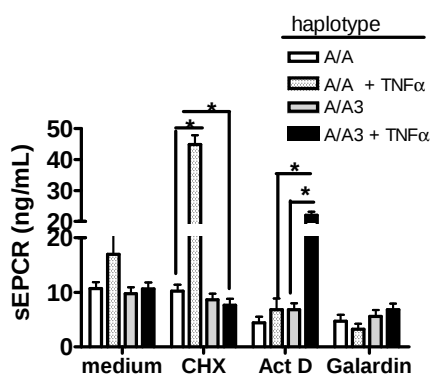
- ▶ 1 Esmon CT: Protein C pathway in sepsis. *Ann Med* 2002;34:598–605.
- ▶ 2 Mackman N: Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1015–1022.
- ▶ 3 Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, Soderstrom K, D'Andrea A, Ogg GS, Lazetic S, Young NT, Bell JI, Phillips JH, Lanier LL, McMichael AJ: HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 1998;391:795–799.
- ▶ 4 Gutierrez-Hartmann A, Duval DL, Bradford AP: ETS transcription factors in endocrine systems. *Trends Endocrinol Metab* 2007;18:150–158.
- ▶ 5 Fukudome K, Esmon CT: Identification, cloning, and regulation of a novel endothelial cell protein C/activated protein C receptor. *J Biol Chem* 1994;269:26486–26491.
- ▶ 6 Joyce DE, Gelbert L, Ciaccia A, De Hoff B, Grinnell BW: Gene expression profile of antithrombotic protein C defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. *J Biol Chem* 2001;276:11199–11203.
- ▶ 7 Riewald M, Petrovan RJ, Donner A, Mueller BM, Ruf W: Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. *Science* 2002;296:1880–1882.
- ▶ 8 Feistritz C, Schuepbach RA, Mosnier LO, Bush LA, Di Cera E, Griffin JH, Riewald M: Protective signaling by activated protein C is mechanistically linked to protein C activation on endothelial cells. *J Biol Chem* 2006;281:20077–20084.
- ▶ 9 Isermann B, Vinnikov IA, Madhusudhan T, Herzog S, Kashif M, Blautzik J, Corat MA, Zeier M, Blessing E, Oh J, Gerlitz B, Berg DT, Grinnell BW, Chavakis T, Esmon CT, Weiler H, Bierhaus A, Nawroth PP: Activated protein C protects against diabetic nephropathy by inhibiting endothelial and podocyte apoptosis. *Nat Med* 2007;13:1349–1358.
- ▶ 10 Ghosh S, Pendurthi UR, Steinoe A, Esmon CT, Rao LV: Endothelial cell protein C receptor acts as a cellular receptor for factor VIIa on endothelium. *J Biol Chem* 2007;282:11849–11857.
- ▶ 11 Lopez-Sagaseta J, Montes R, Puy C, Diez N, Fukudome K, Hermida J: Binding of factor VIIa to the endothelial cell protein C receptor reduces its coagulant activity. *J Thromb Haemost* 2007;5:1817–1824.
- ▶ 12 Laszik Z, Mitro A, Taylor FB Jr, Ferrell G, Esmon CT: Human protein C receptor is present primarily on endothelium of large blood vessels: implications for the control of the protein C pathway. *Circulation* 1997;96:3633–3640.
- ▶ 13 Gu JM, Crawley JT, Ferrell G, Zhang F, Li W, Esmon NL, Esmon CT: Disruption of the endothelial cell protein C receptor gene in mice causes placental thrombosis and early embryonic lethality. *J Biol Chem* 2002;277:43335–43343.
- ▶ 14 Kurosawa S, Stearns-Kurosawa DJ, Carson CW, D'Angelo A, Della Valle P, Esmon CT: Plasma levels of endothelial cell protein C receptor are elevated in patients with sepsis and systemic lupus erythematosus: lack of correlation with thrombomodulin suggests involvement of different pathological processes. *Blood* 1998;91:725–727.
- ▶ 15 Xu J, Qu D, Esmon NL, Esmon CT: Metalloproteolytic release of endothelial cell protein C receptor. *J Biol Chem* 2000;275:6038–6044.
- ▶ 16 Qu D, Wang Y, Esmon NL, Esmon CT: Regulated endothelial protein C receptor shedding is mediated by tumor necrosis factor- α converting enzyme/ADAM17. *J Thromb Haemost* 2007;5:395–402.
- ▶ 17 Saposnik B, Lesteven E, Lokajczyk A, Esmon CT, Aiach M, Gandrille S: Alternative mRNA is favored by the A3 haplotype of the EPCR gene PROCR and generates a novel soluble form of EPCR in plasma. *Blood* 2008;111:3442–3451.
- ▶ 18 Liaw PC, Neuenschwander PF, Smirnov MD, Esmon CT: Mechanisms by which soluble endothelial cell protein C receptor modulates protein C and activated protein C function. *J Biol Chem* 2000;275:5447–5452.
- ▶ 19 Esmon CT: The endothelial protein C receptor. *Curr Opin Hematol* 2006;13:382–385.
- ▶ 20 Saposnik B, Reny JL, Gaussem P, Emmerich J, Aiach M, Gandrille S: A haplotype of the EPCR gene is associated with increased plasma levels of sEPCR and is a candidate risk factor for thrombosis. *Blood* 2004;103:1311–1318.
- ▶ 21 Simioni P, Morboeuf O, Tognin G, Gavasso S, Tormene D, Woodhams B, Pagnan A: Soluble endothelial protein C receptor (sEPCR) levels and venous thromboembolism in carriers of two dysfunctional protein C variants. *Thromb Res* 2006;117:523–528.
- ▶ 22 Coupel S, Leboeuf F, Boulday G, Souillou JP, Charreau B: RhoA activation mediates phosphatidylinositol 3-kinase-dependent proliferation of human vascular endothelial cells: an alloimmune mechanism of chronic allograft nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:2429–2439.
- ▶ 23 Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. *Methods* 2001;25:402–408.
- ▶ 24 Coupel S, Moreau A, Hamidou M, Horejsi V, Souillou JP, Charreau B: Expression and release of soluble HLA-E is an immunoregulatory feature of endothelial cell activation. *Blood* 2007;109:2806–2814.
- ▶ 25 Medina P, Navarro S, Estelles A, Vaya A, Woodhams B, Mira Y, Villa P, Migaud-Fressart M, Ferrando F, Aznar J, Bertina RM, Espana F: Contribution of polymorphisms in the endothelial protein C receptor gene to soluble endothelial protein C receptor and circulating activated protein C levels, and thrombotic risk. *Thromb Haemost* 2004;91:905–911.

- ▶ 26 Stearns-Kurosawa DJ, Burgin C, Parker D, Comp P, Kurosawa S: Bimodal distribution of soluble endothelial protein C receptor levels in healthy populations. *J Thromb Haemost* 2003;1:855–856.
- ▶ 27 Uitte de Willige S, Van Marion V, Rosendaal FR, Vos HL, de Visser MC, Bertina RM: Haplotypes of the EPCR gene, plasma sEPCR levels and the risk of deep venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 2004;2:1305–1310.
- ▶ 28 Taylor FB Jr, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Ferrell G, Chang AC, Laszik Z, Kosanke S, Peer G, Esmon CT: The endothelial cell protein C receptor aids in host defense against *Escherichia coli* sepsis. *Blood* 2000;95:1680–1686.
- ▶ 29 Taylor FB Jr, Peer GT, Lockhart MS, Ferrell G, Esmon CT: Endothelial cell protein C receptor plays an important role in protein C activation in vivo. *Blood* 2001;97:1685–1688.
- ▶ 30 Preston RJ, Villegas-Mendez A, Sun YH, Hermida J, Simioni P, Philippou H, Dahlback B, Lane DA: Selective modulation of protein C affinity for EPCR and phospholipids by Gla domain mutation. *Febs J* 2005;272:97–108.
- ▶ 31 Liaw PC, Esmon CT, Kahnamoui K, Schmidt S, Kahnamoui S, Ferrell G, Beaudin S, Julian JA, Weitz JI, Crowther M, Loeb M, Cook D: Patients with severe sepsis vary markedly in their ability to generate activated protein C. *Blood* 2004;104:3958–3964.
- ▶ 32 Faust SN, Levin M, Harrison OB, Goldin RD, Lockhart MS, Kondaveeti S, Laszik Z, Esmon CT, Heyderman RS: Dysfunction of endothelial protein C activation in severe meningococcal sepsis. *N Engl J Med* 2001;345:408–416.
- ▶ 33 Borgel D, Bornstain C, Reitsma PH, Lerolle N, Gandrille S, Dali-Ali F, Esmon CT, Fagon JY, Aiach M, Diehl JL: A comparative study of the protein C pathway in septic and non-septic patients with organ failure. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176:878–885.
- ▶ 34 Qu D, Wang Y, Song Y, Esmon NL, Esmon CT: The Ser219→Gly dimorphism of the endothelial protein C receptor contributes to the higher soluble protein levels observed in individuals with the A3 haplotype. *J Thromb Haemost* 2006;4:229–235.
- ▶ 35 Galligan L, Livingstone W, Volkov Y, Hokamp K, Murphy C, Lawler M, Fukudome K, Smith O: Characterization of protein C receptor expression in monocytes. *Br J Haematol* 2001;115:408–414.
- ▶ 36 Bretschneider E, Uzonyi B, Weber AA, Fischer JW, Pape R, Lotzer K, Schror K: Human vascular smooth muscle cells express functionally active endothelial cell protein C receptor. *Circ Res* 2007;100:255–262.
- ▶ 37 Fine MJ, Smith MA, Carson CA, Mutha SS, Sankey SS, Weissfeld LA, Kapoor WN: Prognosis and outcomes of patients with community-acquired pneumonia: a meta-analysis. *JAMA* 1996;275:134–141.
- ▶ 38 Eachempati SR, Hydo L, Barie PS: Gender-based differences in outcome in patients with sepsis. *Arch Surg* 1999;134:1342–1347.
- ▶ 39 Adrie C, Azoulay E, Francois A, Clec'h C, Darques L, Schwebel C, Nakache D, Jamali S, Goldgran-Toledano D, Garrouste-Orgeas M, Timsit JF: Influence of gender on the outcome of severe sepsis: a reappraisal. *Chest* 2007;132:1786–1793.
- ▶ 40 Simmonds RE, Lane DA: Structural and functional implications of the intron/exon organization of the human endothelial cell protein C/activated protein C receptor (EPCR) gene: comparison with the structure of CD1/major histocompatibility complex alpha1 and alpha2 domains. *Blood* 1999;94:632–641.
- ▶ 41 Rance JB, Follows GA, Cockerill PN, Bonifer C, Lane DA, Simmonds RE: Regulation of the human endothelial cell protein C receptor gene promoter by multiple Sp1 binding sites. *Blood* 2003;101:4393–4401.
- ▶ 42 Dejana E, Taddei A, Randi AM: Foxs and Ets in the transcriptional regulation of endothelial cell differentiation and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2007;1775:298–312.
- ▶ 43 Nakatsuka H, Sokabe T, Yamamoto K, Sato Y, Hatakeyama K, Kamiya A, Ando J: Shear stress induces hepatocyte PAI-1 gene expression through cooperative Sp1/Ets-1 activation of transcription. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;291:G26–G34.

I. D) Résultats additionnels

Les résultats de ce travail confirment l'impact important de l'haplotype A3 dans la régulation des formes circulantes de l'EPCR. Il est également montré que l'activation des CE par du TNF- α diminue la transcription gènes (formes complètes ou tronquées) de l'EPCR chez les porteurs de l'haplotype A3 ou non (figure 4 g-h de l'article).

Certains résultats n'ont pu être montrés dans cet article et ont été présentés comme « data not shown ». Ainsi, la **Figure 29** rapporte l'exploration de l'impact de l'haplotype A3 dans la régulation des formes solubles de l'EPCR au cours de l'activation endothéliale, dans la phase transcriptionnelle et post transcriptionnelle.



Impact of EPCR A3 haplotype on sEPCR regulation. Quantification of sEPCR by Elisa in culture supernatants from EC issue from A/A and A/A3 individuals. EC were preincubated with cycloheximide (CHX), actinomycin D (Act D) or galardin and then treated with or without TNF (100U/mL) for 24h (* $p < 0.05$). All results are representative of 3 independent experiments.

Figure 29 : Impact de l'haplotype A3 pour la regulation des formes solubles d'EPCR

En présence de TNF- α , l'inhibition de la synthèse des ARN par de l'actinomycine D (Act D) provoque une augmentation de la libération de l'EPCR soluble dans les surnageants de cultures pour les CE porteuses de l'haplotype A3, signant un mécanisme principalement transcriptionnel *in vitro*. L'inhibition de la synthèse protéique par la cycloheximide (CHX) provoque une augmentation des formes solubles dans les surnageants de cultures de CE de type A/A (non porteuses de l'haplotype A3), signant un mécanisme post transcriptionnel. Ces mécanismes respectif en fonction de l'haplotype méritent des explorations complémentaires.

II) Article 2 : “Early rise in circulating Endothelial Protein C Receptor correlates with poor outcome in severe sepsis”

par Guitton C, Gérard N, Sébille V, Bretonnière C, Zambon V, Villers D, Charreau B

II. A) Résumé de l'article

II. A. 1) Rationnels et Objectifs

L'EPCR permet le contrôle de la coagulopathie et des phénomènes inflammatoires au cours du sepsis. Cependant les mécanismes régulant respectivement les formes membranaires et solubles in vivo ne sont toujours pas clarifiés. Même si le rôle des formes membranaires d'EPCR semble mieux explicité, la régulation et les mécanismes d'actions de l'EPCR soluble ainsi que son impact sur le pronostic semblent très peu connus. Nous avons donc voulu analyser non pas de manière statique et ponctuelle mais de manière dynamique la cinétique des taux circulants sanguins d'EPCR solubles au cours des 5 premiers jours du sepsis sévère. Le premier objectif était de comparer les taux à l'admission à des volontaires sains ou à des pathologies inflammatoires non septiques. Le second objectif était de décrire la cinétique de l'EPCR pendant la phase initiale en corrélation avec des paramètres cliniques et le pronostic.

II. A. 2) Matériels et Méthodes

Au cours de ce travail monocentrique dans le service de Réanimation Médicale du CHU de Nantes, une cohorte observationnelle de 40 patients consécutifs en sepsis sévère était analysée. Des dosages sanguins d'EPCR solubles étaient réalisés à la phase initiale du sepsis, c'est à dire à l'entrée en Réanimation et les 4 jours suivants.

Les dosages sanguins étaient réalisés par technique ELISA de manière concomitante.

Les taux à l'admission (J1) étaient comparés à 2 autres cohortes, 1 de 40 volontaires sains et 1 de 25 patients inflammatoires avec une vascularite active.

Enfin, les cinétiques de J1 à J5 étaient analysées ainsi que les facteurs pouvant les influencer. L'analyse statistique a consisté notamment en une analyse uni-variée puis multi-variée pour rechercher les facteurs démographiques, cliniques et évolutifs pertinents ayant une influence sur la cinétique de l'EPCR soluble au cours du sepsis.

II. A. 3) Résultats

Sur 10 mois, 40 patients consécutifs ont été inclus dans cette étude observationnelle. Cette cohorte de patients était assez sévère, 37 étaient en choc septique à l'admission, 40 à J2.

II. A. 3. a) Comparaison patients septiques / patients inflammatoires et volontaires sains

Aucune différence significative n'était notée entre les taux de sEPCR circulants dans les 24 premières heures du sepsis sévère, et les taux de volontaires sains ainsi qu'en comparaison avec les taux de patients porteurs de pathologie inflammatoire type vascularite. Ces taux à J1 étaient surtout marqués par une très grande variabilité inter patients. Une différence significative était retrouvée en fonction du caractère sexuel, avec à J1 là encore des taux plus élevés chez l'homme.

II. A. 3. b) Analyse des cinétiques à la phase initiale du sepsis

L'analyse dynamique de la cinétique des taux d'EPCR circulants sur les 5 premiers jours de prise en charge de ces sepsis sévères était surtout marquée par les très faibles variations pour cette phase initiale (<15%). Cette allure de cinétique à faibles variations était observée indépendamment du taux initial d'EPCR mesuré.

La sévérité (SAPS II, , SOFA, Mc Cabe) et le type d'infection (hémoculture positive, site d'infection) avaient peu d'influence sur la cinétique d'EPCR. Dans les caractéristiques de l'infection, seul le caractère Gram négatif semblait modifier la cinétique.

Par contre, le pronostic évalué par la survie à J28 influençait clairement la cinétique des taux d'EPCR. Les patients avec une évolution péjorative (9 patients décédés) semblaient avoir des taux supérieurs d'EPCR, notamment avec une élévation transitoire mais significative à J2.

Une analyse uni- et multi- variée a confirmé de manière significative que le taux d'EPCR à J2 était un facteur de risque indépendant associé à la mortalité à J28 pour cette cohorte de patients septiques.

II. A. 4) Conclusions

Le sepsis sévère ne provoque que de faibles variations dans la cinétique de l'EPCR circulant. Nos résultats suggèrent par contre que dans cette population une élévation précoce (à J2), transitoire, mais significative pourrait être péjorative suggérant un rôle de biomarqueur pronostique pour l'EPCR circulant au cours du sepsis.

II. B) Publication

Cet article a été accepté en Janvier 2011 pour publication dans **Intensive Care Medicine**.

II. C) Manuscrit

Early rise in circulating Endothelial Protein C Receptor correlates with poor outcome in severe sepsis

Christophe Guitton^{1,2}, Nathalie Gérard¹, Véronique Sébille^{3,4}, Cédric Bretonnière², Olivier Zambon², Daniel Villers² and Béatrice Charreau¹

¹ INSERM, U643, Nantes, F44000 France; CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, ITERT, Nantes, F44000 France; UMR643 Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F44000 France.

² Service de Réanimation Médicale Polyvalente, CHU de Nantes, F44000 France.

³ EA 4275, Faculté de Pharmacie, Université de Nantes, Nantes, F44000 France.

⁴ Plateforme de Biométrie, CHU de Nantes, F44000 France.

Running title: Profiling soluble EPCR upon severe sepsis

Word count for text: 2987

Word count for abstract: 248

Figure count: 3

Table count: 2

Online Resource : 3

Reference count: 36

Corresponding author:

Dr. Christophe GUITTON, M.D.;

Service de Réanimation Médicale Polyvalente ; Hôtel Dieu, CHU de Nantes ; 30 Boulevard Jean Monnet ;

44093 NANTES Cedex 1 ; FRANCE

Phone + 33 2 40 08 73 65 ; Fax + 33 2 40 08 75 50

E-Mail christophe.guitton@chu-nantes.fr

Abbreviations:

APC : activated protein C; EC : endothelial cell; EPCR : endothelial protein C receptor; ICU : intensive care unit; MPA : microscopic polyangeitis; PC : protein C; SAPS : simplified acute physiology score; mEPCR : membrane EPCR ; sEPCR : soluble EPCR; SIRS : systemic inflammatory response syndrome; SOFA : Sepsis-related Organ Failure Assessment; TF : tissue factor; TM : thrombomodulin; TNF α : Tumor necrosis factor-alpha; WG : Wegener granulomatosis.

Key words: soluble EPCR, severe sepsis, gender, infection, survival analysis

Abstract

Purpose : The endothelial protein C receptor (EPCR) negatively regulates the coagulopathy and inflammatory response in sepsis. Mechanisms controlling the expression of cell-bound and circulating soluble (s)EPCR are still unclear. Moreover, the clinical impact of EPCR shedding and its potential value to predict sepsis progression and outcome remain to be established.

Methods : We investigated the time-course of plasma sEPCR upon the 5 first days (D) of severe sepsis in 40 patients.

Résultats : Firstly, no significant difference was observed when comparing sEPCR at admission (D1) to healthy volunteers and to patients with vasculitis. We report that the kinetic profile of plasma sEPCR in patients was almost stable at the onset of sepsis with no change from D1 to D4 and then a significant decrease at D5. This pattern of release was consistently observed whatever the level of sEPCR at D1. Characteristics of patients or of infections (except Gram negative) had no or poor critical influence on sEPCR profile. However, we found that sEPCR kinetic was clearly influenced by patient's outcome (D28 survival). We demonstrate that a significant but moderate ($< 15\%$ of basal level) and transient increase in sEPCR level at Day2 associates with poor outcome at Day28.

Conclusion : Severe sepsis, at the onset, only triggers moderate quantitative changes in plasma sEPCR levels. Our findings suggest that in severe sepsis, an early (at D2), transient but significant increase in circulating sEPCR may be detrimental suggesting that sEPCR could provide an early biological marker of sepsis outcome.

Severe sepsis is associated with systemic inflammation and exacerbated procoagulant state mediated by the Tissue factor (TF) pathway[1-2]. The protein C (PC) anticoagulant pathway is a major system that prevents blood coagulation, its impairment influence vital outcome in sepsis. This pathway involves PC and protein S, and two endothelial receptors, thrombomodulin (TM) and the endothelial cell protein C receptor (EPCR). Conversion of PC to activated PC (APC) is initiated by thrombin bound to TM on endothelial cell (EC) surfaces. Binding to EPCR increases the rate of PC activation by thrombin-TM complexes[3]. APC has anticoagulant effects but also exhibits anti-inflammatory[4-5], and antiapoptotic effects[6-7]. EPCR also serves as a cellular binding site for Factor VII/VIIa[8-9].

EPCR (CD201) is a 46-kilodalton type I transmembrane protein, which is expressed mainly on the luminal surface of EC from large vessels and which is homologous to major histocompatibility complex class I/CD1 family proteins[10]. Disruption of the *EPCR* gene in mice causes placental thrombosis and embryonic lethality confirming the key role for EPCR in controlling coagulation[11].

A soluble form of EPCR (sEPCR) has been described in plasma[12]. sEPCR can be generated by ectodomain shedding[13] mediated by TACE/ADAM17[14] or/and, by alternative mRNA splicing in haplotype-A3-carrying cells[15]. sEPCR binds both PC and APC with an affinity similar to that of membrane EPCR(mEPCR)[16]. Binding of APC to sEPCR interferes with binding of APC to phospholipids and inactivation of factor Va. Furthermore, binding of PC to sEPCR does not enhance APC generation, suggesting a procoagulant effect of sEPCR[9, 17].

EPCR levels vary in a wide variety of pathophysiological conditions, and the consequences depend partly on whether it is the membrane-associated or soluble form that is affected[12,

18-19]. While the role of membrane-associated EPCR is clearly antithrombotic and anti-inflammatory in physiological circumstances, the function of the circulating sEPCR remains unclear.

Regulation of circulating sEPCR upon inflammatory disease has not been determined. Thus, whether sEPCR levels may have a predictive value of sepsis outcome is still unknown. In the present study, we investigated the kinetic of soluble EPCR levels in a cohort of 40 patients with severe sepsis upon the 5 first days in our Intensive Care Unit (ICU). The first objective was to compare sEPCR levels in septic patients at admission to healthy volunteers or to patients with active inflammatory disease. The second aim was to investigate the time course of circulating sEPCR at the onset of severe sepsis in correlation with clinical parameters and outcome at D28.

Patients, Materials and Methods

Study population- We recruited consecutive patients with severe sepsis in a 20 beds Medical ICU (Nantes University Hospital, France). Patients were included using the inclusion criteria according to the ACCP consensus definition for severe sepsis [20] and as described in the Electronic Supplementary Material 1 (**ESM1**).

The exclusion criteria were age younger than 18 years, patients without informed consent, patients not expected to survive more than 48h (moribund) or not expected to survive more than 28 days given preexisting conditions.

We collected baseline characteristics of the patients, including demographic information, severity score at admission, simplified acute physiology score (SAPS), Sepsis-related Organ Failure Assessment (SOFA) at admission and for 4 days, comorbidities, site and type of infection, and hematologic tests. Patients were followed for 28 days and/or until ICU discharge.

Blood collection- Blood was collected from patients within 24h of meeting the definition of severe sepsis (within the first 24 hours after the first organ dysfunction occurred) and daily in the 4 consecutive following days. For that purpose, blood samples were collected in the entrance in ICU (Day 1) and each morning using daily routine blood puncture (Day 2 to Day 5). After centrifugation, samples were immediately frozen as aliquots (-80°C).

This study also included blood samples from patients with active systemic vasculitis (n=25) including Wegener granulomatosis (WG) or microscopic polyangeitis (MPA) that we previously described[21] and blood samples from healthy adult blood donors (n=40) provided by the Etablissement Français du Sang (Nantes, France).

Elisa assays for soluble EPCR - Quantification of sEPCR in plasma samples was carried out using ELISA kits (Asserachrom, Stago-Diagnostica, France).

Research ethics- The study was approved by medical research committee (Nantes University Hospital, France). Informed consent was obtained from the patient/substitute decision-maker before inclusion in this study. All data were anonymous.

Statistical Analysis – The means and SD or the median [IQR], in case of non-normality of the distributions, are reported for continuous variables. The number of patients in each category and the corresponding percentages are given for categorical variables. Non parametric ANOVA was used for the comparison of sEPCR levels at admission between groups.

Multivariate analyses were performed to study the evolution of sEPCR levels over time. To account for the correlation between measurements from the same individual, repeated measures ANOVA using linear mixed models allowing for random effects with restricted maximum-likelihood estimation were used to examine changes in sEPCR levels over time and potential interactions when appropriate (“time effect”), as well as the effect of covariates of interest (“group effect”). Several covariance structures among the repeated measurements (autoregressive, unstructured etc.) were compared using Akaike’s Information Criterion and Schwarz Bayesian Criterion. Random intercept models with autoregressive covariance structures often provided the best fit to the data. Residual analysis was used to evaluate the validity of the models assumptions including normality and homoscedasticity. An iterative stepwise selection procedure was used to select the variables that were significantly associated with the time course of sEPCR levels (variable candidates for the model were those associated with sEPCR evolution in univariate analyses with $p < 0.20$ criterion and subsequently selected in the model using $p < 0.05$ criterion). All measurements were transformed by calculating the natural logarithm and all analyses were adjusted on sEPCR levels at day1 in repeated measures models.

Multivariate analyses were subsequently performed using exact logistic regression and a similar strategy was used with an iterative stepwise selection procedure to select the variables that were significantly associated with day-28 survival, as assessed by the likelihood ratio test. The area under the receiver operating characteristic (ROC) curve was estimated for sEPCR levels at day 2.

Statistical analyses were performed with SAS 9.1 statistical software (SAS Institute, Cary, NC, USA). P-values <0.05 were considered to be statistically significant.

Results

Study population

Between December 2004 and September 2005, 82 patients were admitted for severe sepsis in our Medical ICU, 27 patients were not eligible because they had developed first organ dysfunction more than 24h before and 15 patients refused inclusion or delayed their response after inclusion “dead line”. Thus, the present study includes 40 consecutive adult patients with severe sepsis. Most of them (n=37, 93.5%) were in septic shock at admission but all of them at day 2. The patients ranged in age from 24 to 81 years (58.3 ± 14.4), and 24 (60%) were female. The mean admission SAPS II score was 51 (SD, 21), and the mean SOFA score at Day1 was 10.5 (SD, 3.4). The overall 28-day mortality rate was 22.5 %. Demographic and clinical characteristics of these patients are summarized in **Table 1**. The most common site of infection was pneumonia (27.5%). Infecting organism isolation was available for 35 patients (87.5%) with a Gram-negative bacillus for 18 patients (45%). Hemoculture was positive for 35% of patients.

Soluble EPCR levels in patients with severe sepsis at admission (Day1): comparison with patients with inflammatory disease and healthy volunteers

Soluble EPCR was quantified concomitantly in all samples (n=182 for sepsis and n=65 for healthy controls and vasculitis) using a dedicated Elisa assay. When sEPCR levels were compared at the time of admission (D1), no significant difference (**Figure 1**) was found between patients with severe sepsis (Med [IQR]:115 [145]; Mean $\pm$ SD: 174 ± 117 ng/mL) compared with healthy control subjects (156 [65]; 170 ± 63 ng/mL; p =0.37) and with patients with active systemic vasculitis (WG and MPA)(159[94]; 157 ± 60 ng/mL). As compare to the

healthy controls, sEPCR values in septic patients exhibit larger variability, especially above the median value (115 ng/mL). For further analysis, septic patients will be divided in 2 groups (High sEPCR > 115 ng/mL and Low sEPCR ≤ 115 ng/mL) according to their basal sEPCR levels at Day1.

Time course of soluble EPCR levels at the onset of severe sepsis

A retrospective and concomitant determination of circulating sEPCR was performed on blood samples collected from 40 patients with severe sepsis during the 5 first days in ICU. Quantification of circulating sEPCR in the overall population of patients (**Figure 2a**) mainly showed only slight variations in the sEPCR levels at onset of sepsis. No significant change was observed from D1 to D4 while a significant decrease was found at D5 ($p < 0.05$ versus D1, D2 and D3). Overall changes in sEPCR levels from D1 to D4 were low and remained below 10% of basal (D1) sEPCR rate. Similarly, although significant, decrease at D5 was moderate and around 15% of basal rate.

This pattern of release was consistently observed whatever the level of sEPCR in patients at D1 (**ESM2a**); higher levels (H group) were maintained during the 5-days follow-up (group effect, $p < 0.01$).

Next, uni- and multivariate statistical analysis were performed to identify factors influencing sEPCR kinetics. These parameters were selected according to their relevance to demographics and severe sepsis (early disease severity scores, disease evolution and infection). Variables analyzed include gender, age, outcome at D28, SAPS II, SOFA D1, SOFA D2, Gram staining, site of infection (pneumoniae), septicemia. First that time course of sEPCR release was clearly affected in septic patients according to patient survival at D28 (**Figure 2b**). Univariate analysis showed a significant difference in sEPCR levels (Group effect “GE”, $p = 0.029$), and in kinetics (Time effect “TE” $p = 0.016$) between the 2 groups.

These results were confirmed in multivariate analysis (GE, $p=0.003$ and TE, $p=0.005$). At Day 2 : patients that do not survive over D28 had significantly elevated sEPCR (Med 268[169], mean 268 ± 126) as compared to septic patients that do survive (Med 120[92], mean 143 ± 92 ng/mL; $p<0.01$). Increase at D2 was only transient since sEPCR return to control level at D3.

A difference between males and females was observed in septic patients at D1 (respectively Med 196[149], mean 225 ± 143 *versus* 107[98], 140 ± 84 ng/mL, $p<0.05$) as well as in healthy individuals (respectively Med 177[63], mean 201 ± 67 *versus* 129[41], 145 ± 47 ng/mL, $p<0.05$). Nevertheless, no significant impact of gender on sEPCR profiles was found in our cohort using our statistical analysis model (**ESM2b**) and similar time courses were observed for males and females. Similarly, age had also no influence on sEPCR profile.

Considering variables related to severity of sepsis, SAPS II and Mc Cabe scores had no impact. Interestingly, a weak effect of SOFA score at D1 and D2 was found on sEPCR levels (GE respectively $p=0.045$ and 0.034) but with no significant impact on the kinetic from D1 to D5. To further investigate these results, correlations were examined considering individual time points. Interestingly, a slight correlation was only found between sEPCR D2 and SOFA D2 ($\rho=0.293$, $p<0.05$).

Finally considering parameters related to infection, we found that the presence of a positive blood culture (not shown) or pneumonia as septic localisation (**ESM2c**) had no effect on sEPCR profiles. In contrast, a significant impact of gram negative bacterial infection was observed (**ESM2d**). Univariate analysis showed higher D1-D5 plasma levels (GE $p=0.034$) without clear effect on kinetic (TE $p=0.376$) while multivariate analysis confirmed the influence of gram negative on both, group level and kinetic (GE $p=0.045$ and TE $p=0.005$).

Overall, our findings show only slight variations in the course of sEPCR at the onset of sepsis. It appears that most of parameters affecting basal sEPCR rate have no incidence on the kinetic profile of sEPCR upon sepsis. However, we demonstrated that both level and kinetic of sEPCR are clearly influenced by Gram negative infection and, importantly, by D28 mortality: an early significant increase in sEPCR rate at D2 being associated with a poor outcome.

Consequently, to sustain this conclusion, uni- and multi-variate analyses were performed for eleven parameters (including sEPCR at D2) relevant to D28 mortality in septic patients. These parameters include sEPCR D2, sEPCR D1 H/L, SAPS II, Gender, SOFA score at D1 and D2, Age, McCabe Score, Sepsis localisation (Pneumoniae), septicemia and Gram negative infection. Major findings are reported in **Table 2**. Plasma concentration of sEPCR at D2 was the only variable found significantly associated with D28 mortality in multivariate analysis ($p=0.0095$). Our data indicate that an increase in sEPCR at D2 of 100 ng/mL corresponds to an Odd Ratio of 2.44 [1.22-5.95].

We undertook a specific analysis to further investigate the accuracy of sEPCR value at D2 to predict D28 mortality in our cohort. Sensitivity and specificity are presented in the ROC curve (**ESM3**). The accuracy estimated by area under the ROC curve seemed satisfactory (AUC = 0.819; IC [0.658-0.971]). The moderate size of the samples (dead=9, alive=31) is, however, a limit for further extrapolation.

Discussion

During sepsis, blood coagulation is activated by TF expressed on the endothelium and monocytes/macrophages in response to cytokines[22]. Inflammatory processes can shift the hemostatic balance toward thrombus formation not only by stimulating TF-dependent coagulation but also by inhibiting anticoagulant and fibrinolytic pathways[23]. EPCR is a key factor controlling coagulation through the binding of both PC and APC. Inhibition of EPCR binding of PC or APC was also found to exacerbate the septic response[24-25]. However, clinical and functional impact of its soluble counterpart remains to be established. Here, we examined for the first time the kinetic of plasma sEPCR in a cohort of patients at the onset of severe sepsis.

First, when comparing baseline levels of sEPCR in septic patients at admission we found no significant difference with healthy controls and patients with active vasculitis, although variation among the septic patients was important. In previous studies, sEPCR levels in septic patients were found significantly higher[12, 26], similar[27] or even lower[28], than in healthy volunteers. These discrepancies may reflect the distribution of the A3 haplotype (15-20%) among the cohorts since this haplotype is associated with higher baseline levels of sEPCR[18].

Moreover, we observed here that gender ratio may be another key factor affecting D1 sEPCR in septic patients. A similar difference was found in healthy donors. These results confirm our previous data indicating that gender was a critical parameter determining basal level of sEPCR [29]. Although clinical impact of gender on sepsis outcome is still controversial[30-32], whether males and females differently respond to infection is important for both clinical care and the design of clinical trials. However, probably due to the small size

of this cohort and to relative variability of basal sEPCR levels, this study was unable to demonstrate an impact of gender on the sEPCR time course. Since no DNA samples were available for genetic analysis, the respective impact of EPCR haplotype and gender was not investigated.

Next, profiling sEPCR during the 5 first days of the disease showed no change in the level of sEPCR from D1 to D4 before a significant decrease at D5. Overall variations in sEPCR concentrations remain below 15% of baseline. Interestingly, this kinetic was found consistently in septic patients regardless of basal level and gender. Another interesting observation is that, overall, sepsis only induces a moderate variation of sEPCR plasma level as suggested by initial reports[12, 27]. Together these data suggest that level of sEPCR is tightly controlled even upon inflammation *in vivo*. This hypothesis is comforted by our results obtained using cultured vascular EC. Indeed, we found that *in vitro* inflammation downregulates the cell surface expression of EPCR without affecting the production rate and kinetic of its soluble form (Data not shown and [29]).

All available data concerning simple coagulation disorders were noted (platelet count, Prothrombin time, activated partial thromboplastin time (aPTT) ratio patient/witness, and fibrinogen). The impact of these parameters on sEPCR was examined for each time point using a Spearman test (data not shown). No major correlation was found except for platelet count and aPTT at D4. Considering the type of infection, multivariate analysis highlighted a significant impact of gram-negative infection on both sEPCR level and kinetic. Despite data of sepsis studies large cohorts, the link between severity of coagulation disorders and type of causative microorganism had still remained controversial. [33-34] .

We identified a statistically significant difference between D28 survivors and nonsurvivors in terms of sEPCR levels at D2 compared to baseline. This new finding suggests that sEPCR level at D2 may be an early prognostic marker of adverse outcome in septic

patients. It could also suggest an implication of elevated sEPCR in the pathogenesis of severe sepsis. While EPCR is considered as a protective molecule[24], the function of its soluble form remains to be determined. Functionally, sEPCR bind PC and APC with high affinity ($K_d=75\text{nM}$)[35] and thus may counteract (or balance) the anticoagulant action of mEPCR. On another hand, sEPCR also bind the neutrophil proteinase PR3 with a similar high affinity, this interaction results in the proteolytic degradation of the receptor[36]. Thus, we can speculate that a significant increase in plasma sEPCR may indeed reflect uncontrolled EC activation and/or irreversible EC injury. This pathogenic link remains to be examined in vitro and in vivo. Whatever the mechanism, a functional impairment of the endothelial protein C activation pathway reflected by an increase in sEPCR level will most probably exacerbate the preexisting state of hypercoagulability in septic patients.

It is to notice that death was associated with higher sEPCR level in septic patients at Day 2 but not at the time of death. Five patients died within the 5 first days of the study. Although it seems difficult to draw a firm conclusion from only 5 patients, the available values for the last sEPCR dosage before death showed no significant change.

To conclude, severe sepsis, at the onset, only triggers moderate quantitative changes in plasma sEPCR concentration. Our findings also suggest that in pathological conditions such as severe sepsis, an early (at day2 post admission), transient but significant increase in circulating sEPCR may be detrimental. These new findings suggest that measuring sEPCR at Day2 could provide an early biological marker of sepsis outcome.

Acknowledgments and funding:

This work was supported by grants from l'Agence de Biomédecine, La Société de Néphrologie, l'Association pour le Développement de la Réanimation (ADR, Nantes), Lilly-France. This work was also in part supported by XENOME a EU-funded Integrated Project in Life Sciences, Genomics and Biotechnology for Health (LSHB-CT-2006-037377) and by a grant from la Fondation de l'Avenir (contrat ET8-498).

Authorship:

Contribution: C.G., N.G., O.Z. and C.B. performed research assays and analyzed data; V.S. performed the statistical analysis. D.V. provided critical review of the manuscript; and; B.C. and C.G. conceived and designed the study and wrote the manuscript.

Conflict of interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Legends of Figures

Figure 1. Baseline sEPCR in septic patients and controls. sEPCR was quantified in blood samples from healthy volunteers (n=40), patients with vasculitis (n=25) and in samples from 40 patients with severe sepsis harvested at admission (D1). No significant difference ($p=0.37$). *Individual results are shown, bars represent mean values, dashed lines represent the median value. H; high and L; low referred to sEPCR levels compare to the median value..*

Figure 2. Time-course (from D1 to D5) analysis of sEPCR in septic patients (n=40). sEPCR was measured daily from admission in ICU (D1) to D5. Statistical difference ($p<0.05$) is indicated as # for “group effect” (GE) and \$ for “time effect” (TE). (a) Overall population [TE $p=0.037$, § $p<0.05$ in comparison to D5]. Number of available samples is indicated under box plot for each time point (b) According to outcome at D28, alive (n=31), dead (n=9) [GE $p=0.029$; TE $p=0.016$; * difference at day2, $p<0.01$].

References

1. Esmon CT, (2002) Protein C pathway in sepsis. *Ann Med* 34: 598-605
2. Mackman N, (2004) Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 1015-1022
3. Fukudome K, Esmon CT, (1994) Identification, cloning, and regulation of a novel endothelial cell protein C/activated protein C receptor. *J Biol Chem* 269: 26486-26491
4. Joyce DE, Gelbert L, Ciaccia A, DeHoff B, Grinnell BW, (2001) Gene expression profile of antithrombotic protein c defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. *J Biol Chem* 276: 11199-11203
5. Riewald M, Petrovan RJ, Donner A, Mueller BM, Ruf W, (2002) Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. *Science* 296: 1880-1882
6. Feistritzer C, Schuepbach RA, Mosnier LO, Bush LA, Di Cera E, Griffin JH, Riewald M, (2006) Protective signaling by activated protein C is mechanistically linked to protein C activation on endothelial cells. *J Biol Chem* 281: 20077-20084
7. Isermann B, Vinnikov IA, Madhusudhan T, Herzog S, Kashif M, Blautzik J, Corat MA, Zeier M, Blessing E, Oh J, Gerlitz B, Berg DT, Grinnell BW, Chavakis T, Esmon CT, Weiler H, Bierhaus A, Nawroth PP, (2007) Activated protein C protects against diabetic nephropathy by inhibiting endothelial and podocyte apoptosis. *Nat Med* 13: 1349-1358
8. Ghosh S, Pendurthi UR, Steinoe A, Esmon CT, Rao LV, (2007) Endothelial cell protein C receptor acts as a cellular receptor for factor VIIa on endothelium. *J Biol Chem* 282: 11849-11857
9. Lopez-Sagasetta J, Montes R, Puy C, Diez N, Fukudome K, Hermida J, (2007) Binding of factor VIIa to the endothelial cell protein C receptor reduces its coagulant activity. *J Thromb Haemost* 5: 1817-1824
10. Laszik Z, Mitro A, Taylor FB, Jr., Ferrell G, Esmon CT, (1997) Human protein C receptor is present primarily on endothelium of large blood vessels: implications for the control of the protein C pathway. *Circulation* 96: 3633-3640
11. Gu JM, Crawley JT, Ferrell G, Zhang F, Li W, Esmon NL, Esmon CT, (2002) Disruption of the endothelial cell protein C receptor gene in mice causes placental thrombosis and early embryonic lethality. *J Biol Chem* 277: 43335-43343
12. Kurosawa S, Stearns-Kurosawa DJ, Carson CW, D'Angelo A, Della Valle P, Esmon CT, (1998) Plasma levels of endothelial cell protein C receptor are elevated in patients with sepsis and systemic lupus erythematosus: lack of correlation with thrombomodulin suggests involvement of different pathological processes. *Blood* 91: 725-727
13. Xu J, Qu D, Esmon NL, Esmon CT, (2000) Metalloproteolytic release of endothelial cell protein C receptor. *J Biol Chem* 275: 6038-6044
14. Qu D, Wang Y, Esmon NL, Esmon CT, (2007) Regulated endothelial protein C receptor shedding is mediated by tumor necrosis factor- α converting enzyme/ADAM17. *J Thromb Haemost* 5: 395-402
15. Saposnik B, Lesteven E, Lokajczyk A, Esmon CT, Aiach M, Gandrille S, (2008) Alternative mRNA is favored by the A3 haplotype of the EPCR gene PROCRA and generates a novel soluble form of EPCR in plasma. *Blood* 111: 3442-3451
16. Liaw PC, Neuenschwander PF, Smirnov MD, Esmon CT, (2000) Mechanisms by which soluble endothelial cell protein C receptor modulates protein C and activated protein C function. *J Biol Chem* 275: 5447-5452

17. Esmon CT, (2006) The endothelial protein C receptor. *Curr Opin Hematol* 13: 382-385
18. Saposnik B, Reny JL, Gaussem P, Emmerich J, Aiach M, Gandrille S, (2004) A haplotype of the EPCR gene is associated with increased plasma levels of sEPCR and is a candidate risk factor for thrombosis. *Blood* 103: 1311-1318
19. Simioni P, Morboeuf O, Tognin G, Gavasso S, Tormene D, Woodhams B, Pagnan A, (2006) Soluble endothelial protein C receptor (sEPCR) levels and venous thromboembolism in carriers of two dysfunctional protein C variants. *Thromb Res* 117: 523-528
20. (1992) American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 20: 864-874
21. Coupel S, Moreau A, Hamidou M, Horejsi V, Soulillou JP, Charreau B, (2007) Expression and release of soluble HLA-E is an immunoregulatory feature of endothelial cell activation. *Blood* 109: 2806-2814
22. Esmon CT, (2003) Coagulation and inflammation. *J Endotoxin Res* 9: 192-198
23. Aird WC, (2003) The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood* 101: 3765-3777
24. Taylor FB, Jr., Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Ferrell G, Chang AC, Laszik Z, Kosanke S, Peer G, Esmon CT, (2000) The endothelial cell protein C receptor aids in host defense against *Escherichia coli* sepsis. *Blood* 95: 1680-1686
25. Taylor FB, Jr., Peer GT, Lockhart MS, Ferrell G, Esmon CT, (2001) Endothelial cell protein C receptor plays an important role in protein C activation in vivo. *Blood* 97: 1685-1688
26. Liaw PC, Esmon CT, Kahnemoui K, Schmidt S, Kahnemoui S, Ferrell G, Beaudin S, Julian JA, Weitz JJ, Crowther M, Loeb M, Cook D, (2004) Patients with severe sepsis vary markedly in their ability to generate activated protein C. *Blood* 104: 3958-3964
27. Faust SN, Levin M, Harrison OB, Goldin RD, Lockhart MS, Kondaveeti S, Laszik Z, Esmon CT, Heyderman RS, (2001) Dysfunction of endothelial protein C activation in severe meningococcal sepsis. *N Engl J Med* 345: 408-416
28. Borgel D, Bornstain C, Reitsma PH, Lerolle N, Gandrille S, Dali-Ali F, Esmon CT, Fagon JY, Aiach M, Diehl JL, (2007) A comparative study of the protein C pathway in septic and nonseptic patients with organ failure. *Am J Respir Crit Care Med* 176: 878-885
29. Guitton C, Gérard N, Quillard T, Charreau B, (2010) Circulating EPCR: endothelial regulation and cumulative impact of gender and A3 haplotype, *In press. J Vasc Res* ; doi: 101159/000322582
30. Fine MJ, Smith MA, Carson CA, Mutha SS, Sankey SS, Weissfeld LA, Kapoor WN, (1996) Prognosis and outcomes of patients with community-acquired pneumonia. A meta-analysis. *Jama* 275: 134-141
31. Eachempati SR, Hydo L, Barie PS, (1999) Gender-based differences in outcome in patients with sepsis. *Arch Surg* 134: 1342-1347
32. Adrie C, Azoulay E, Francais A, Clec'h C, Darques L, Schwebel C, Nakache D, Jamali S, Goldgran-Toledano D, Garrouste-Orgeas M, Timsit JF, (2007) Influence of gender on the outcome of severe sepsis: a reappraisal. *Chest* 132: 1786-1793
33. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJ, Jr., (2001) Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 344: 699-709

34. Kinasewitz GT, Yan SB, Basson B, Comp P, Russell JA, Cariou A, Um SL, Utterback B, Laterre PF, Dhainaut JF, (2004) Universal changes in biomarkers of coagulation and inflammation occur in patients with severe sepsis, regardless of causative micro-organism [ISRCTN74215569]. Crit Care 8: R82-90
35. Preston RJ, Villegas-Mendez A, Sun YH, Hermida J, Simioni P, Philippou H, Dahlback B, Lane DA, (2005) Selective modulation of protein C affinity for EPCR and phospholipids by Gla domain mutation. Febs J 272: 97-108
36. Villegas-Mendez A, Montes R, Ambrose LR, Warrens AN, Laffan M, Lane DA, (2007) Proteolysis of the endothelial cell protein C receptor by neutrophil proteinase 3. J Thromb Haemost 5: 980-988

Table 1: Characteristics and outcome of patients with severe sepsis(n= 40), description of infections.

Age, y	58.3 ± 14.4
Gender Ratio :Female, n (%) :	24 (60%)
Intensive Care :Medical / Surgical, n (%):	22 (55%) / 18 (45%)
Mc Cabe : 1 / 2 / 3, n (%)	11 (27%) / 24 (60%) / 5 (13%)
Immuno depression, n (%) Hematology, Cancer, Corticotherapy, HIV, Cirrhosis	23 (57%)
SAPS II	51 ± 21
SOFA score Day 1	10.5 ± 3.4
Septic Shock at inclusion, n (%)	37 (93.5%)
Mechanical ventilation*, n(%)	34 (85%)
Hemodiafiltration*, n (%)	12 (30%)
Hydrocortisone*, n (%)	30 (75%)
Drotrecogin*, n (%)	2 (5%)
Site of Infection, n	
Pneumoniae	11
Abdominal	8
Skin or Soft tissues	6
Bones or Joints	4
Urologic	4
Endocarditis	3
Septicemia	2
Meningitis	1
Pleural empyema	1
Positive blood culture, n (%)	14 (35%)
Results of Gram's staining culture	
Pure Gram-negative	14
Pure Gram-positive	17
Mixed	4
Culture negative	5
ICU length of stay, d	17±13
Mortality, n (%) ICU	12 (30%)
Day 28	9 (22.5%)

ICU: Intensive care unit; SAPS: Simplified Acute Physiology Score; SOFA: Sepsis-related Organ Failure

*Assessment, * during 5 first days of ICU hospitalisation*

Table 2 : Univariate and multivariate analysis of factors associated with mortality at Day 28.

	Odd Ratio	Confidence Interval	p
Univariate analysis			
EPCR D2	1.009	1.002-1.018	0.0095
SAPS II	1.054	1.012-1.107	0.0087
SOFA D1	1.249	0.981-1.642	0.0740
SOFA D2	1.243	1.007-1.598	0.0417
Age	1.054	0.994-1.131	0.0845
Pneumoniae	4.948	0.800-34.047	0.0936
Multivariate analysis			
EPCR D2	1.009	1.002-1.018	0.0095

The odds ratio are expressed for an increase of 1ng/ml for s EPCR at D2, 1 point for SAPS II and SOFA D1, 1 year for age. IC Interval confidence . Factors with $p < 0.20$ are noted.

Figure 1

Guillon C. *et al.*

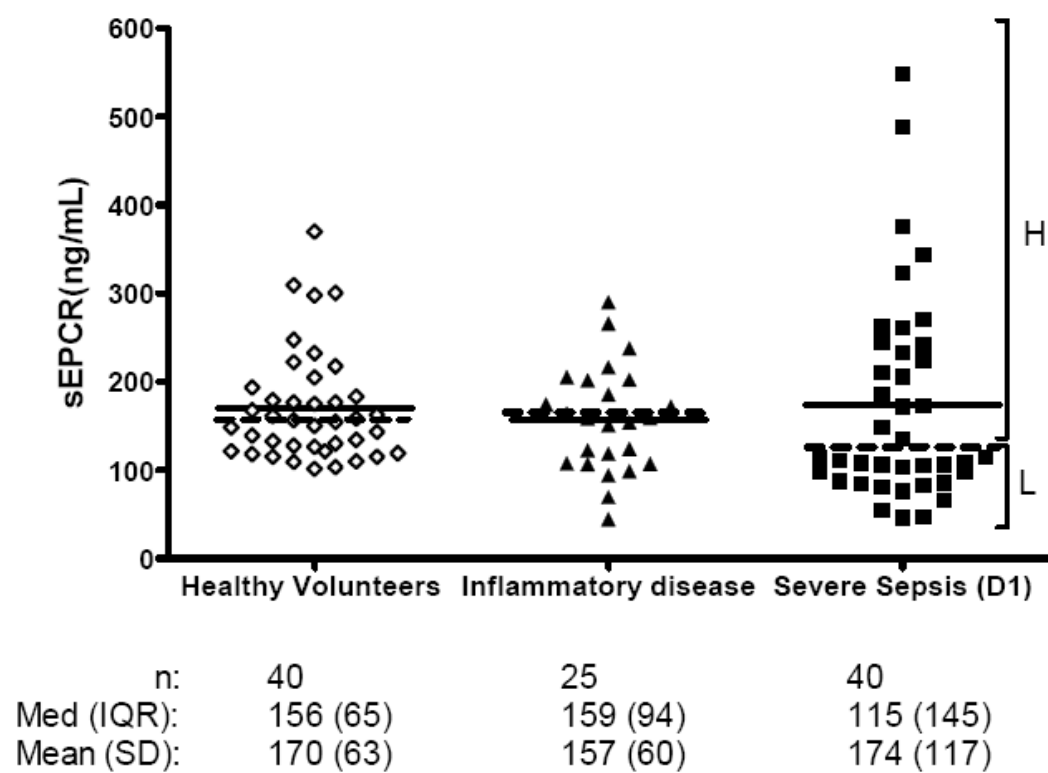
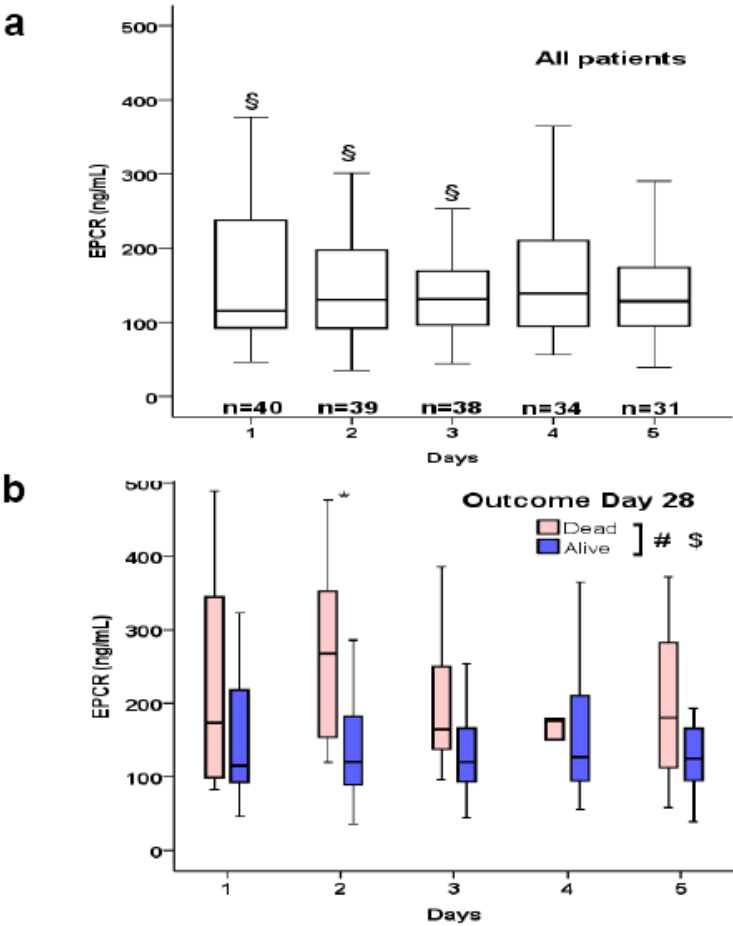


Figure 2

Guillon C. *et al.*



ESM 1 :
Inclusion Criteria :

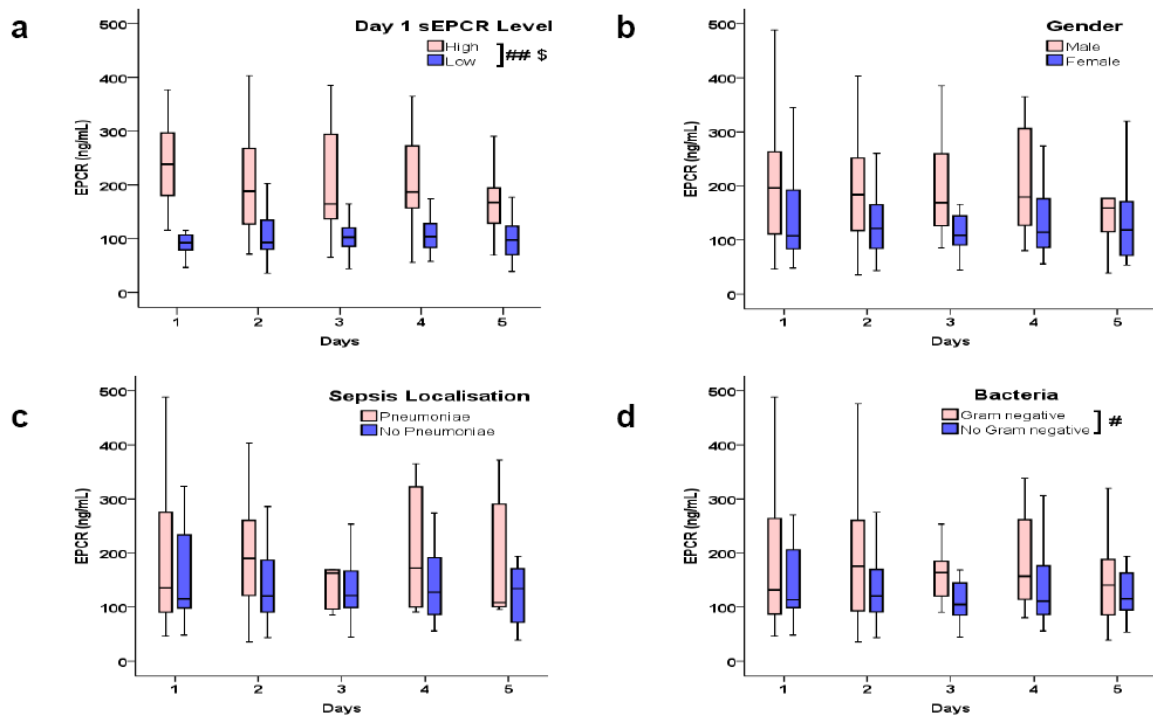
Patients with severe sepsis were included using the following inclusion criteria according to the ACCP consensus definition for severe sepsis

-Suspected or proven infection- Patients had to have a known infection or a suspected infection, as evidenced by one or more of the following: white blood cells in a normally sterile body fluid; perforated viscus, radiographic evidence of pneumonia in association with the production of purulent sputum; and a syndrome associated with a high risk of infection.

- Patients had to meet at least 3 of the following 4 criteria- a core temperature of at least 38°C or below 36°C; a heart rate of at least 90 beats/min, except in patients with a medical condition known to increase the heart rate or those receiving treatment that would prevent tachycardia; a respiratory rate of at least 20 breaths/min or a PaCO₂ of no more than 32 mmHg or the use of mechanical ventilation for an acute respiratory process; a white blood cell count between 12000/ mm³ and 40000/ mm³ or a differential count showing more than 10% immature neutrophils.

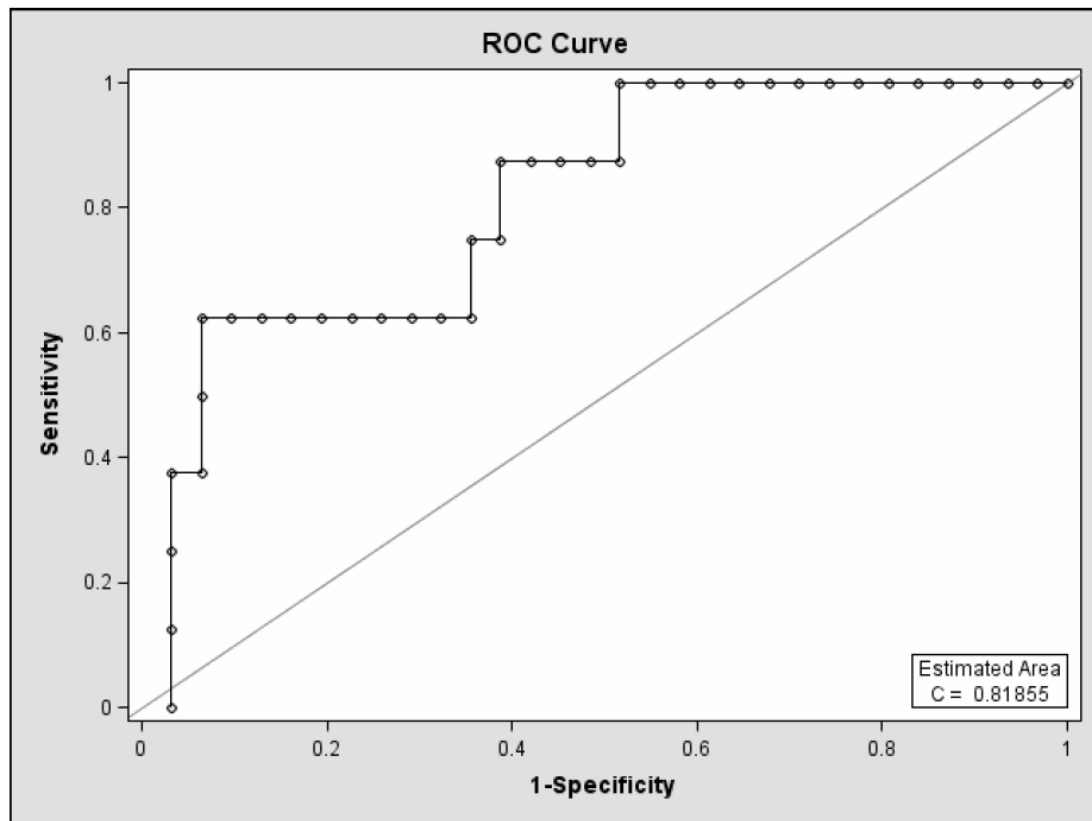
- Criteria for dysfunctional organs or systems- Patients had to meet at least 1 of the following criteria within the 24 hours period immediately preceding enrolment. The onset of the first organ dysfunction had not to precede the inclusion more than 24 hours For cardiovascular system dysfunction, arterial systolic blood pressure had to be no more than 90 mmHg or the mean arterial pressure of no more than 70 mmHg for at least 1h despite adequate fluid resuscitation, adequate intravascular volume status, or the use of vasopressors in an attempt to maintain a systolic blood pressure of at least 90 mmHg or a mean arterial pressure of at least 70 mmHg. For kidney dysfunction, urine output had to be less than 30 mL/ h for 1h and/or serum creatinin concentration more than 200 µmol/ L, despite adequate fluid resuscitation. For respiratory-system dysfunction, the ratio PaO₂/FiO₂ had to be below 250 in the presence of other dysfunctional organs or below 200 if the lung was the only dysfunctional organ. For hematologic dysfunction, the platelet count had to be below 50000/mm³

or to have decreased by 50% in the 3 days preceding enrolment. In the case of unexplained metabolic acidosis, the pH had to be no more than 7.30 and a plasma lactate level above 2 mmol/ L. For hepatic dysfunction, bilirubin above 50 μ mol/ L or alcalin phosphatase more than 3-fold upper limit of the normal reference range were considered. For neurologic dysfunction, coma Glasgow score had to be below 13.



Time-course (from D1 to D5) analysis of sEPCR in septic patients. sEPCR was measured daily in patients (n=40) with severe sepsis from admission in ICU (D1) to D5. For statistical analysis, repeated measures ANOVA using linear mixed models allowing for random effects with restricted maximum-likelihood estimation were used to assess changes in sEPCR levels over time [“time effect” (TE)], as well as the effect of covariates of interest [“group effect” (GE)]. P-values<0.05 were considered to be statistically significant. sEPCR levels are represented with box plot. Data presented are result from univariate analysis. For GE, statistical difference is indicated as # p<0.05 or ## p<0.01. For TE, statistical difference is indicated as \$ p<0.05. The box plots are interpreted as follows: boxes contain the middle 50% of data, line in the box indicate the median, upper and lower hinges indicate respectively the 75th and 25th percentile and “whiskers” indicate minimum and maximum data values.

Time-course analysis of sEPCR in septic patients (a) According to sEPCR level at D1. High level group (n=20) over median (115ng/mL) and Low level group (n=20) [GE p<0.001; TE p=0.04] **(b) According to gender,** Male (n=16), Female (n=24) [GE p=0.341; TE p=0.845] **(c) According to sepsis site,** pneumoniae (n=11) or not (n=29) [GE P=0.278; TE p=0.597] **(d) According to Gram staining bacteria,** Gram-negative (n=18) or not (n=22) [GE p=0.034; TE p=0.376].



The ROC curves of sEPCR Day 2 analyzed for prediction of survival on day 28

II. D) Résultats additionnels

Certains résultats n'ont pu être montrés dans cet article (« data not shown »).

II. D. 1) Impact des hémocultures sur la cinétique de l'EPCR

Parmi les paramètres cliniques liés directement aux caractéristiques de l'infection, seul le caractère Gram négatif des bactéries en cause avait un impact significatif sur la cinétique des taux d'EPCR circulants (Figure ESM 2d). Le site de l'infection (c'est à dire l'existence d'une pneumonie ou non) n'avait pas d'influence significative (figure ESM2c).

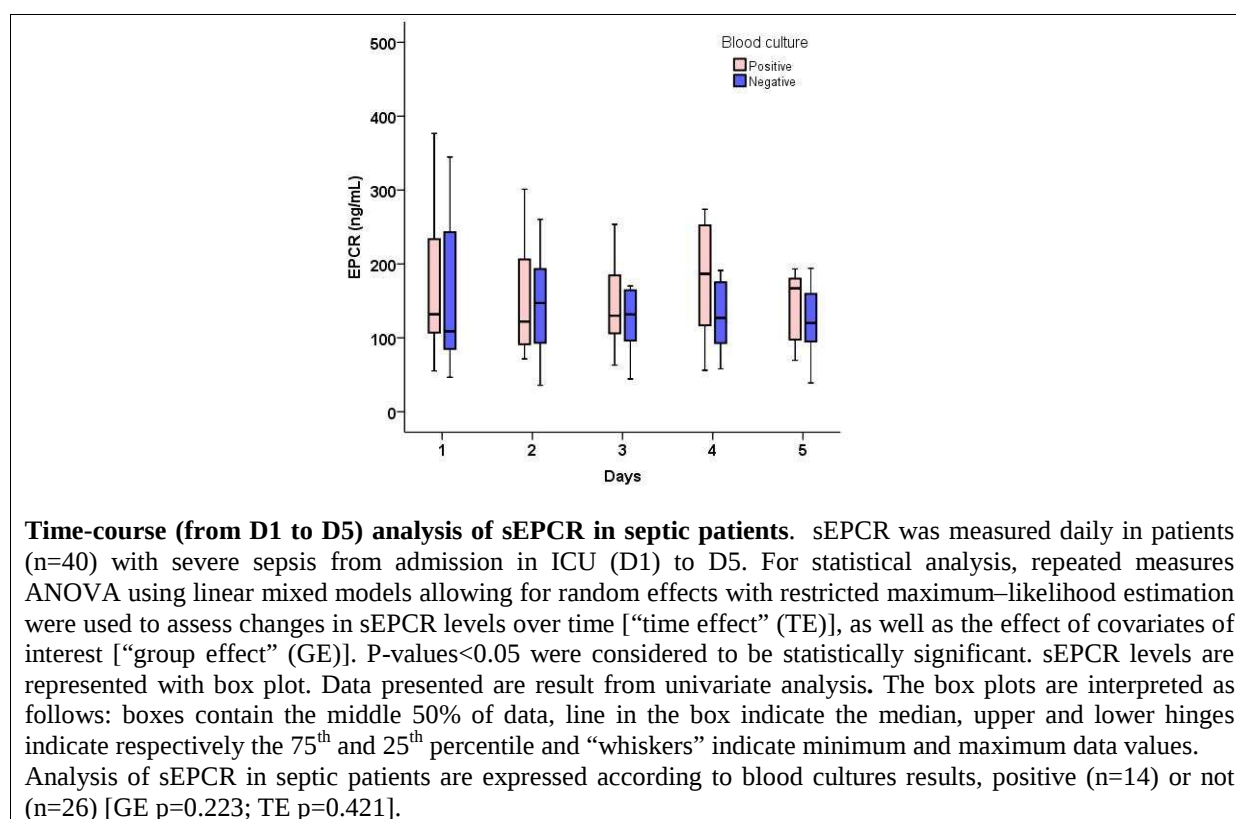


Figure 30 : Taux circulants d'EPCR chez les patients septiques : impact des hémocultures positives
sEPCR était mesuré quotidiennement de D1 à D5. L'analyse statistique était réalisée selon la présence (n=14 patients) ou l'absence (n=26) d'hémocultures positives.

La **Figure 30** illustre que la présence d'une bactériémie ou non n'avait pas non plus d'influence statistiquement significative sur les cinétiques d'EPCR.

II. D. 2) Paramètres biologiques simples de l'hémostase

	n	Mean	SD	Med	IQR	Rho (ρ)	p
Day1							
EPCR	40	174	117	115	90-240		
Plat	40	159550	120725	120000	66750-248500	-0.130	0.425
TP	40	55	22.6	58	42.2-77.8	-0.046	0.779
aPTT	39	1.7	0.9	1.4	1.2-1.8	0.118	0.475
Fib	33	4.9	2.8	4.6	2.9-6.6	-0.062	0.731
Day2							
EPCR	39	169	111	130	91-202		
Plat	39	147744	129203	105000	57000-211000	-0.187	0.253
TP	39	55	19.6	55	42-68	-0.139	0.396
aPTT	35	1.8	0.9	1.5	1.3-2	0.152	0.382
Fib	28	5.3	2.5	5.1	3.6-7.3	-0.308	0.110
Day3							
EPCR	38	162	114	131	96-169		
Plat	38	138026	124640	100500	45750-196750	-0.255	0.122
TP	35	59	20	61	45-72	-0.070	0.690
aPTT	31	1.9	1.1	1.6	1.3-2.1	0.237	0.198
Fib	21	5.2	2.8	5.2	2.6-7.4	-0.153	0.506
Day4							
EPCR	34	177	133	139	93-218		
Plat	31	125741	125734	83000	48000-187000	-0.383	0.033
TP	29	63	16.4	65	49-75	-0.211	0.273
aPTT	22	1.6	0.6	1.4	1.2-1.9	0.520	0.013
Fib	11	3.2	1.4	2.9	1.7-4.4	0.113	0.739
Day5							
EPCR	31	153	101	129	94-177		
Plat	30	130666	120382	108500	42000-178750	0.014	0.939
TP	27	63.2	17.9	64	49-76	-0.051	0.800
aPTT	24	1.6	0.6	1.5	1.1-1.9	0.076	0.725
Fib	11	3.5	1.9	3.1	1.8-5.2	0.081	0.081

Tableau 5 : Corrélation entre EPCR et paramètres de l'hémostase chez les patients septiques

EPCR (ng/mL), Plat : plaquettes ($10^3/L$), TP : Taux de prothrombine (%), aPTT : TCA (ratio patient/témoin), Fib : fibrinogène (g/L). Corrélation de Spearman exprimée par coefficient Rho (ρ). Significatif si $p < 0.05$. Les résultats sont rapportés en moyenne $\pm$ SD et médiane (IQR).

Les paramètres biologiques simples de l'hémostase étaient colligés pour les patients durant les 5 jours d'analyse des cinétiques (**Tableau 5**). Il n'était pas retrouvé de corrélation

significative (mesuré par un test de Spearman) entre ces différents paramètres (Taux de plaquettes, Taux de prothrombine, Ratio TCA patient/témoin et Taux de fibrinogène) et les taux circulants d'EPCR solubles sur des prélèvement sanguins concomitants, notamment pour les premières 48 heures. Seul à J4 était retrouvée une légère corrélation entre les taux d'EPCR et les taux de plaquettes et le TCA, résultat dont la relevance reste discutable.

III) Article 3 : “Protective cross talk between activated protein C and TNF signaling in vascular endothelial cells : implication of EPCR, non canonical NF- κ B, and ERK1/2 MAP kinases”

par Guitton C, Cottureau A, Gerard N, Quillard T, Chauveau A, Devalliere J, Tonnerre P, Charreau B.

III. A) Résumé de l'article

III. A. 1) Rationnels et Objectifs

La protéine C activée (PCa) agit sur de multiples voies de signalisation. Il est démontré que la PCa dans sa forme recombinée inhibe l'induction par le TNF- α des molécules d'adhésion (VCAM-1, ICAM-1, E-Sel...) via un effet sur la voie NF- κ B. La PCa induit positivement l'expression de gènes de molécules anti-apoptotiques (Bcl2, eNOS, Inhibitor of apoptosis (IAP)...). Enfin, la PCa active la voie des MAP kinases (notamment ERK 1/2) via le récepteur PAR-1 en interaction avec EPCR. Les MAP kinases sont également impliquées dans la voie TNF- α pouvant expliquer en partie des effets anti inflammatoires et anti apoptotiques de la PCa. Malgré tout, les mécanismes précis des effets anti inflammatoires de la PCa sont mal connus, surtout son implication respective dans les différentes voies de signalisation.

L'objectif de ce travail est donc d'analyser *in vitro*, sur des cultures primaires d'HAEC comment les effets intracellulaires spécifiques de la PCa modifient les cascades de signalisation induites par le TNF- α , et quelles sont les interconnexions entre ces 2 voies de signalisations induites. L'impact respectif des récepteurs EPCR et PAR est également investigué.

III. A. 2) Matériels et Méthodes

Des cultures primaires de cellules endothéliales (HAEC) ont été utilisées pour des analyses *in vitro* (cf supra). Ces cellules étaient cultivées à des passages cellulaires entre P2 et

P5, jusqu'à confluence, et éventuellement activées par du TNF- α et/ou traitées par de la PCa. Des HUVEC pour les techniques de transfection pouvaient être utilisées.

Des agonistes PAR pouvaient être utilisés ainsi que des inhibiteurs de NF- κ B, des inhibiteurs de ERK, des anticorps bloquants EPCR ou PAR.

Les analyses d'expression protéiques étaient réalisées par Western blot , FACS et kits ELISA.

Des techniques de biologie moléculaire étaient également utilisées, avec notamment des techniques de transfection et d'analyses de « gènes reporter » pour VCAM-1, NF- κ B. Des analyses de l'ARN étaient réalisées par RT-PCR et PCR quantitative, pour le gène de VCAM-1. Enfin ont été utilisées des techniques d'extinction de l'expression par « short interfering RNA » (SiRNA) pour les récepteurs PAR-1 et EPCR.

III. A. 3) Résultats

III. A. 3. a) Modulation des molécules d'adhésion par la PCa

Un pré traitement par PCa diminuait l'expression de 25 à 40% des protéines d'adhésion (VCAM-1, ICAM-1, E-Sel). Cependant, les CE traitées seules par la PCa montraient une surexpression significative (mais plus faible qu'avec du TNF- α seul) de VCAM-1 et E-Sel. Cette régulation de VCAM-1 par la PCa était concentration dépendante, significative dès 0.5 μ g/ml de PCa et maximale après 8 heures de traitement par PCa. Cette surexpression protéique de VCAM-1 était démontrée corrélée à une activation de la transcription du gène VCAM-1.

III. A. 3. b) La voie non canonique de NF- κ B pivot de la régulation de VCAM-1 par la PCa

NF- κ B étant très impliqué dans l'activation de VCAM-1 par le TNF- α , l'hypothèse d'une même implication dans « l'activation » par la PCa a été évaluée.

L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de NF- κ B confirmait l'impact de cette voie dans la régulation de VCAM-1 par le TNF- α et/ou par la PCa. Les inhibiteurs de p38-MAP kinases eux restaient sans effet.

L'activation par le TNF- α seul entraînait une phosphorylation précoce de p65-NF κ B et de I κ B α , avec dégradation de I κ B α . L'activation par la PCa seule entraînait une phosphorylation moins intense, plus tardive de p65-NF κ B sans action sur I κ B α . Ces 2 traitements (par PCa et TNF- α) entraînaient une expression du gène promoteur pour NF κ B (moins intense pour la PCa). De plus, la PCa inhibait la phosphorylation de p65-NF κ B induite par le TNF- α .

La PCa seule activait essentiellement la voie alternative non canonique avec induction transitoire et précoce de TRAF-2, NIK et IKK α/β suivie d'une induction plus tardive de p65-NF κ B et de ses formes phosphorylées.

La PCa surexprimait TRAF-2 (*TNF Receptor Associated Factor-2*) et les formes phosphorylées de p65-NF κ B sans passer par la voie I κ B α .

III. A. 3. c) ERK 1/2 activée par la PCa comme signal anti inflammatoire

L'analyse concomitante des voies des MAP kinases, Akt et NF- κ B était réalisée sur des cellules au repos, activées par PCa seule, TNF- α seule et ces deux traitements. Ces résultats montraient que la PCa seule avait un effet intense et prolongé de phosphorylation des MAP kinases (notamment de ERK1/2) ainsi que sur la phosphorylation de Akt.

Au cours de l'activation TNF- α , un pré traitement par PCa (activant ERK1/2) agissait comme un signal anti inflammatoire avec une nette phosphorylation de ERK1/2, une phosphorylation de Akt sans induction de la voie NF- κ B. Cette contribution significative de ERK était confirmée aussi par la « sur-induction » de VCAM-1 lors d'un traitement TNF-APC en présence d'inhibiteurs spécifiques de ERK qui jouaient le rôle « d'inhibiteurs du signal anti inflammatoire ».

III. A. 3. d) Rôle respectif de PAR-1 et EPCR dans le signal de la PCa pour induire VCAM-1

L'objectif était alors de définir le rôle respectif de PAR-1 (bien connu pour son rôle dans l'effet protecteur de la PCa) et de l'EPCR dans l'effet de la PCa sur l'activation de ERK et la régulation de VCAM-1.

Tout d'abord, PAR-1 grâce à l'utilisation d'agoniste a été démontré comme ayant une action similaire à celle de la PCa sur l'induction de VCAM-1.

Des anticorps bloquant EPCR et/ou PAR-1 ont montré l'extinction de cette induction de VCAM-1 par la PCa.

De plus, l'extinction de l'expression de PAR-1 et/ou d'EPCR par des Si-RNAs a démontré le rôle équivalent de ces 2 récepteurs pour l'induction de VCAM-1 par la PCa, sans effet additif. Cet effet via ces 2 récepteurs a été confirmé passant par l'induction du « signal ERK1/2 ».

Ces analyses ont été confirmées en utilisant des cellules non endothéliales, soit exprimant EPCR sans exprimer PAR-1 (cellules Hela, lignée immortelle de cellules cancéreuses), soit exprimant PAR-1 sans exprimer EPCR (Cellules Jurkat, lignée immortalisée de lymphocytes T). Là encore, les résultats étaient cohérents.

III. A. 4) Conclusions

En conclusion et en résumé, ces différentes données confirmaient la protection cellulaire induite par la PCa durant l'inflammation des CE, et démontraient l'existence d'une signalisation spécifique induite par la PCa, qui diminuait les effets intracellulaires induits par le TNF- α . Ces travaux démontraient que la PCa enclenchait des interactions et des réactions croisées impliquant l'EPCR, les MAP kinases dont ERK1/2 et la voie non canonique NF- κ B.

III. B) Publication

Cet article a été accepté en Janvier 2011 pour publication dans **American Journal of Physiology : Cell Physiology**

III. C) Manuscrit

Protective cross talk between activated protein C and TNF signaling in vascular endothelial cells: implication of EPCR, noncanonical NF- κ B, and ERK1/2 MAP kinases

Christophe Guitton, Alice Cottureau, Nathalie Gérard, Thibaut Quillard, Annabelle Chauveau, Julie Devallière, Pierre Tonnerre, and Béatrice Charreau

Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM), U643, Nantes, France; Centre hospitalier universitaire (CHU) Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation (ITER), Nantes, France; and Faculté de Médecine, Université de Nantes, Nantes, France

Submitted 6 January 2010; accepted in final form 21 December 2010

Guitton C, Cottureau A, Gérard N, Quillard T, Chauveau A, Devallière J, Tonnerre P, Charreau B. Protective cross talk between activated protein C and TNF signaling in vascular endothelial cells: implication of EPCR, noncanonical NF- κ B, and ERK1/2 MAP kinases. *Am J Physiol Cell Physiol* 300: C000–C000, 2011. First published January 12, 2011; doi:10.1152/ajpcell.00003.2010.—Activated protein C (APC) is a natural anticoagulant protease that displays cytoprotective and antiinflammatory activities and has been demonstrated to reduce mortality of patients with severe sepsis. However, APC signaling is not fully understood. This study further investigated the antiinflammatory effects of APC in vascular endothelial cells (EC) and examined the cross talk between APC and TNF signaling. Analysis of the regulatory mechanisms mediated by APC on vascular human EC shows that APC impairs TNF signaling by triggering a preemptive activation of intracellular pathways. We found that APC signaling causes a moderate but significant induction of cell adhesion molecules (CAMs) including VCAM-1 at mRNA and protein levels. Activation of the noncanonical NF- κ B and ERK1/2 are both pivotal to APC signaling leading to VCAM-1 expression. APC upregulates TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2) and phosphorylates NF- κ B p65 at Ser276 and Ser536 independently of I κ B degradation. The ultimate protective antiinflammatory effect of APC in response to TNF is associated with a sustained activation of ERK1/2 and Akt while phosphorylation of NF- κ B p65 is precluded. Inhibitors of ERK (PD98059 and U0126) abolish the antiinflammatory signal mediated by APC. Blocking antibodies and silencing assays also suggest that, in EC, protease-activated receptor 1 and endothelial protein C receptor (EPCR) both conduct ERK activation and VCAM-1 induction in response to APC. To conclude, APC protects EC by attenuating CAM expression during inflammation. APC engages a regulatory cross talk involving EPCR, ERK, and NF- κ B that impairs TNF signaling.

coagulation; endothelium; tumor necrosis factor signaling; protective signaling pathways; inflammation; endothelial protein C receptor

THE ENDOTHELIUM IS A FUNCTIONAL barrier between the vessel wall and bloodstream, which exhibits a variety of important functions, including control of coagulation, fibrinolysis, vascular tone, growth, and immune response (14). It is now clear that dysfunction of the endothelium disturbs a physiological protective regulatory balance, which is a critical factor in the progression of inflammatory and autoimmune diseases, in atherosclerosis, and in transplant rejection (9, 10, 20, 26, 27). The endothelium can be considered as a first link between

inflammation and coagulation since activated endothelium during inflammation represents a surface where proteins involved in both coagulation and the development of inflammation are expressed (1, 12).

Activated protein C (APC) is an anticoagulant protease that elicits cytoprotective and antiinflammatory activities and has been shown clinically to reduce mortality of patients with severe sepsis (3). APC binds to specific receptors mainly expressed on endothelial cells (EC) known as endothelial protein C receptors (EPCR) (19). In vivo, the antiinflammatory effects of APC that are independent of its anticoagulant effects include inhibition of neutrophil adhesion, decreased TNF- α synthesis, and decreased drops in blood pressure (see Ref. 15 for review). APC has multiple effects in tissue culture systems, including regulation of gene expression, limitation in proinflammatory activity, attenuation of inflammatory cytokine and chemokine generation, and upregulation of antiapoptotic genes of the Bcl-2 family of homologs (7, 13, 16, 30).

Mechanistically, APC has multiple signaling effects that may involve multiple receptors and cell signaling pathways. Earlier studies using gene expression analysis suggested that recombinant APC inhibited TNF induction of cell surface adhesion molecules (e.g., VCAM, ICAM, E-selectin) through a regulatory effect on the NF- κ B pathway (16). Some evidence also suggests that recombinant APC also upregulated genes associated with cell survival and protection against apoptosis including Bcl-2 homolog (A1), endothelial nitric oxide synthase (eNOS), and the inhibitor of apoptosis (IAP), and suppression of the apoptosis-associated genes calreticulin and TRMP-2 (16). APC has also been demonstrated to activate the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in EC in vitro. Riewald et al. (28) reported that APC, by interacting with EPCR on EC, induces phosphorylation of MAPK via protease-activated receptor 1 (PAR1) activation. Activation of ERK1 and 2 is a prerequisite for endothelial cell proliferation induced by APC (31). Furthermore, because MAPK are also implicated in the TNF signaling pathway, APC could also modulate inflammation and apoptosis via activation of the MAPK (24, 29). However, the mechanism by which APC exerts antiinflammatory and cytoprotective signaling in endothelial cells is not fully understood.

In the present study, we examined signaling pathways triggering the cross talk between inflammation and coagulation mediated by APC using primary cultures of human arterial endothelial cells (HAEC). How the signaling specificity of APC may change TNF-mediated signaling and the respective

Address for reprint requests and other correspondence: B. Charreau, INSERM U643, ITER, CHU Hôtel-Dieu, 30 Bd Jean Monnet, F-44093 Nantes, France (e-mail: Beatrice.Charreau@univ-nantes.fr).

involvement of EPCR and PAR receptors have been investigated further in EC.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and reagents. Primary cultures of HAEC and human umbilical vein EC (HUVEC) were generated and cultured as we previously reported (9). EC were grown in endothelial basal growth medium (ECBM, Promocell, Heidelberg, Germany) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 0.4% EC growth supplement-heparin, 0.1 ng/ml human epidermal growth factor, 1 ng/ml human basic fibroblast growth factor, 1 μ g/ml hydrocortisone, 50 μ g/ml gentamicin, and 50 ng/ml amphotericin B. For activation, confluent EC monolayers were cultured with human TNF- α (provided by Professor P. Neuman, BASF, Ludwigshafen, Germany). Human recombinant IL-1 β (R&D Systems, Abingdon, UK) was used at 5 ng/ml. Activation experiments were performed in six-well plates using confluent EC monolayers. Cells were deprived for 18 h in EC growth medium supplemented with only 2% FCS before incubation with 100 U/ml recombinant human TNF or APC (from 5 min to 8 h). When applicable, cells were preincubated with inhibitors for 1 h or APC for 8–24 h before incubation with TNF. Synthetic PAR agonist and control peptides (purchased from Peptides International, Louisville, KY) were as follows: PAR1 agonist peptide (ap) 1: SFLLRN-NH₂ (20 and 100 μ M); PAR1 ap2: TFLLR-NH₂ (5 and 10 μ M); PAR2 agonist: 3-mercaptopropionyl-F-Cha-Cha-RKPNDK-amide (10 and 50 μ M); and PAR4 agonist peptide: AYGKE-NH₂ (10 μ M and 50 μ M).

Recombinant human APC [Drotrecogin alfa (activated); Xigris] was kindly provided by Lilly-France. When applicable, experiments involving APC contained 100 nM hirudin (Refludan) to exclude thrombin signaling. Pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC, 10 μ M), U0126 (5 μ M), PD98059 (10 μ M), and MG132 (1 μ M) inhibitors were purchased from Calbiochem (St Quentin Fallavier, France).

Cell lysis and Western blot analysis. Cell lysis was performed on ice in 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, and 1% Nonidet-40 in the presence of the following protease inhibitors: [4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride] (AEBSF), E-64, bestatin, leupeptin, aprotinin, and sodium EDTA (Protease Inhibitor Cocktail; Sigma, St. Quentin Fallavier, France). Protein concentration was determined using bicinchoninic acid protein assay reagent (Pierce, Rockford, IL). Cell lysates (20 μ g) were resolved by SDS-PAGE (12%), and proteins were transferred to nitrocellulose membranes (ECL Hybond; Amersham, UK) using a Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad). Then, membranes were subjected to Western immunoblot analysis using primary antibodies described above and appropriate peroxidase-conjugated secondary antibodies. After incubations and washes, antibody-bound proteins were detected using an enhanced chemiluminescence ECL Western blotting analysis system (Amersham), and the membranes were exposed to Kodak X-Omat LS X-ray film. Blot quantification was performed with a Kodak Digital Science Image Station 440 CF, and densitometry was performed using Multi Gauge software (version 3.0).

Mouse monoclonal antibody directed against human VCAM-1 was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) (clone E-10) (1:1,000 dilution). Rabbit and mouse monoclonal antibodies directed against total and/or phosphorylated form of Akt (Ser473), I κ B α (Ser32), NF- κ B p65 (Ser536, Ser276, Ser468, Lys310), eNOS (Ser1177), p38 (Thr180/Tyr182), ERK1/2 (Thr202/Tyr204), JNK/SAPK (Thr183/Tyr185), phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1), TNF receptor (TNFR)-associated factor 2 (TRAF2), NF- κ B-inducing kinase (NIK), IKK, and RelB were purchased from Cell Signaling Technology (Ozyme, St Quentin Yveline, France) (1:1,000 dilution). Mouse anti-GAPDH antibody was from Chemicon (Val de Fontenay, France) and used (1:5,000 dilution) to quantify total protein. Anti-mouse (1:2,000 dilution) and anti-rabbit (1:1,000 dilution) (both from CST) and anti-goat (1:2,000 dilution: from Serotec) IgG,

horseradish peroxidase were used as a secondary antibodies. When applicable, EC were incubated with blocking anti-EPCR (RCR-252, 25 μ g/ml), anti-PAR1 (ARAP2, 25 μ g/ml), or irrelevant control antibodies (Abs; Zymed, Invitrogen, France) for 20 min at room temperature before incubation with recombinant APC.

ERK activation was measured using a cell-based ERK1/2 ELISA kit that allows the concomitant quantification of phosphorylated (Thr202/Tyr204) and total ERK1/2 [RayBio Cell-based ERK1/2 (activated) ELISA sample kit]. Experiments were performed in triplicate according to the manufacturer's recommendations (Ray-Biotech, Norcross, GA).

Fluorescence-activated cell sorting analysis and immunofluorescence. After treatment, EC were harvested using trypsin-EDTA and washed in PBS, 1% FCS, and 0.1% NaN₃ at 4°C. The cells were incubated with primary polyclonal or monoclonal antibodies (10 μ g/ml in PBS, 1% FCS, 0.1% NaN₃) for 30 min at 4°C. Mouse monoclonal antibodies directed against human VCAM-1, E-selectin (CD62E), ICAM-1 were purchased from R&D Systems (Lille, France), polyclonal goat Abs against EPCR were from R&D Systems, and monoclonal anti-PAR1 (ATAP12) was from Zymed (Invitrogen, France). After washing in PBS-1% FCS-0.1% NaN₃, cells were stained (30 min, 4°C) with a FITC- or phycoerythrin (PE)-labeled secondary donkey anti-goat or goat anti-mouse IgG F(ab')₂ antibody (Jackson Laboratories, West Grove PA). Control staining was with irrelevant isotype-matched antibodies. Fluorescent labeling was measured on 10,000 cells/sample using a FACScalibur and analyzed with CellQuest software (Becton Dickinson, Mountain View, CA). For immunofluorescence, EC were grown to confluence on glass coverslips. After treatment, cultures were washed with PBS, fixed for 20 min in PBS containing 4% paraformaldehyde, and permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 15 min. Cells were washed again with PBS, incubated overnight at 4°C with blocking buffer (5% BSA in PBS), and then incubated with tetramethylrhodamine isothiocyanate-phalloidin (Sigma) or monoclonal anti-p65, anti-phospho-Akt, anti-JNK/SAPK antibodies (from CST, 10 μ g/ml) for 4 h. Slides were rewashed and incubated with PE- or FITC-conjugated goat anti-mouse antibodies (5 μ g/ml, Jackson) and DAPI for 1 h. Slides were washed in PBS, dried, and mounted with ProLong antifade reagent (Molecular Probes). Specimens were examined by immunofluorescence microscopy using a Nikon Diaphot microscope (Nikon, Japan).

Transfections and reporter gene assays. Transfections were performed using lipofectAmine+ reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), and VCAM-1 and NF- κ B promoter-luciferase reporter constructs were kindly provided by Dr. M. Soares (Institut Gulbenkian de Ciência, Oeiras, Portugal). Transfected cells (HUVEC) were incubated with and without APC, hirudin, and TNF (100 U/ml) for the various periods of time. Untreated and TNF-treated EC were used as negative and positive controls, respectively. Cell extracts were obtained using the Promega (Madison, WI) cell culture lysis reagent extraction kit, and luciferase activity was assayed (luciferase assay system, Promega) according to the manufacturer's instructions. Results shown are means $\pm$ SD from four separate experiments performed in duplicate wells, normalized, and are expressed in arbitrary luciferase units.

RNA isolation and RT-PCR. RNA from treated EC was collected by TRIzol extraction (Invitrogen). Genomic DNA was removed by DNase treatment (Roche, Indianapolis, IN), and mRNAs were reverse transcribed into first-strand cDNAs using polydT oligonucleotide and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen). The following oligonucleotides were used in this study as primers in PCR and to design probes: human VCAM-1 forward: 5'-CTCACCTTAATTGCTATG-3' and reverse: 5'-GTTTTCACCTTCTAAGAC-3'; human β -actin forward: 5'-AATCTGGCACCACCTTCTACA-3' and reverse: 5'-CGACGTAGCAGCTTCTCCTTA-3' (Genosys, Sigma, St Quentin Fallavier, France). Target transcripts were amplified in 25 μ l of PCR mix containing 10 $\times$ buffer, 50 mM MgCl₂, 2.5 mM, of dATP, dCTP, dGTP, and dTTP, 100 pmol/ μ l of each primer and Taq DNA polymerase

(Invitrogen). The cycling conditions were as follows: 5 min at 95°C to activate the Taq DNA polymerase, cycles of 1 min at 95°C and 45 s at both 60°C and 72°C—between 18 and 23 cycles were used depending on the primers—and the reaction was finished with 3 min at 72°C and storage at 4°C. PCR products were separated on 1% agarose-gel in the presence of ethidium bromide.

Quantitative real-time PCR. Real-time quantitative PCR (qPCR) was performed in an Applied Biosystems GenAmp 7700 Sequence Detection System using labeled TaqMan probes (Applied Biosystems, Foster City, CA). The following commercial ready-to-use primers/probe mixes were used (Applied Biosystems): VCAM-1 (Hs00365486_m1), hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) was used as an endogenous control to normalize RNA amount. Relative expression between a given sample and a reference sample was calculated according to the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (where C_t is cycle threshold), where the reference represents one fold expression, as previously described (21).

Short interfering RNAs and silencing. Short interfering RNA (siRNAs) were designed, synthesized, and purchased from Ambion

(Applied Biosystems). Cells were transiently transfected with 10 nM of nontargeting (ns) or target-specific siRNAs using LipofectAMINE RNAiMAX reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). The following target-specific siRNAs were used for transfection: EPCR-siRNA-1 targeting the mRNA sequence 5'-GTGGAT-GCCTTCGGGTCA-3' and the ns-siRNA 5'-CTACGTCCAG-GAGCGCACC-3', the PAR1 siRNA targeting the mRNA sequence 5'-GCAATGAGCTGTTTGAAGA-3. The efficiency of silencing determined by Western blots and flow cytometry analyses in each experiment ranged from 70% to >90%.

Statistical analysis. Results are expressed as means $\pm$ SD. Data were analyzed using Prism software (version 4.0; GraphPad), and statistical significance was determined using InStat software (version 3.0; GraphPad). Group comparisons were made using two-tailed Student's *t*-tests, and analysis of variance was used when more than two treatment regimens were compared. When applicable, quantitative variables were compared using nonparametric Kruskal-Wallis test. This analysis was completed with a post hoc Dunn's test. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

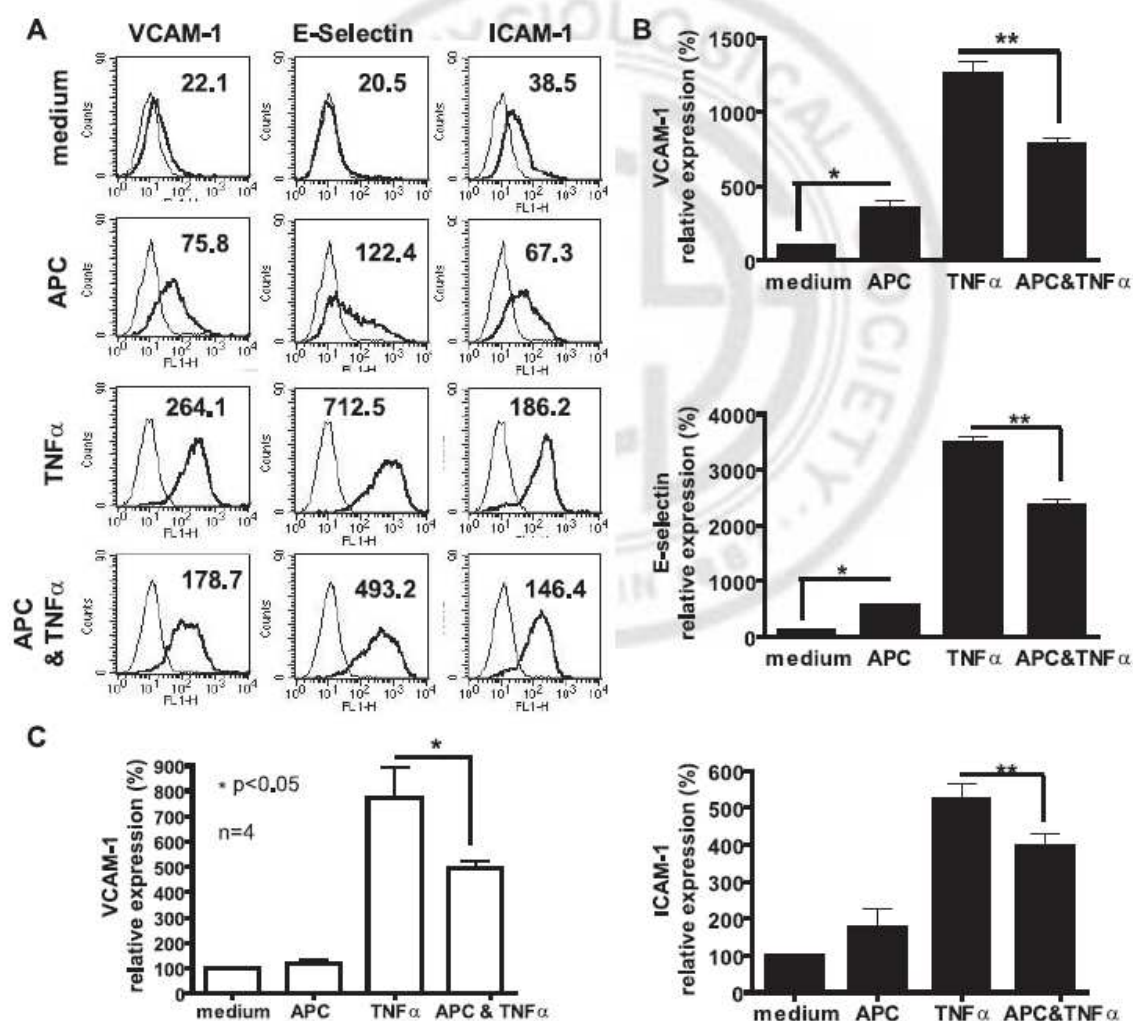


Fig. 1. Regulatory effect of recombinant activated protein C (APC) on cell adhesion molecule (CAM) expression in unstimulated and TNF-activated endothelial cells (EC). A: representative FACS analysis showing the expression of VCAM-1, E-selectin, and ICAM-1 on cultured EC 8 h after incubation with medium alone, TNF-α, APC, or TNF-α following a pretreatment with APC (180 nM) for 16 h. B: quantitative analysis from 4 independent FACS experiments. Results shown are mean values $\pm$ SD; * $P < 0.05$ vs. basal; ** $P < 0.05$ vs. TNF-α. C: quantitative analysis of VCAM-1 expression on EC treated with APC alone (24 h) or APC (16 h) and/or TNF-α (8 h) performed by FACS. Results shown are mean values $\pm$ SD from 4 independent experiments; * $P < 0.05$.

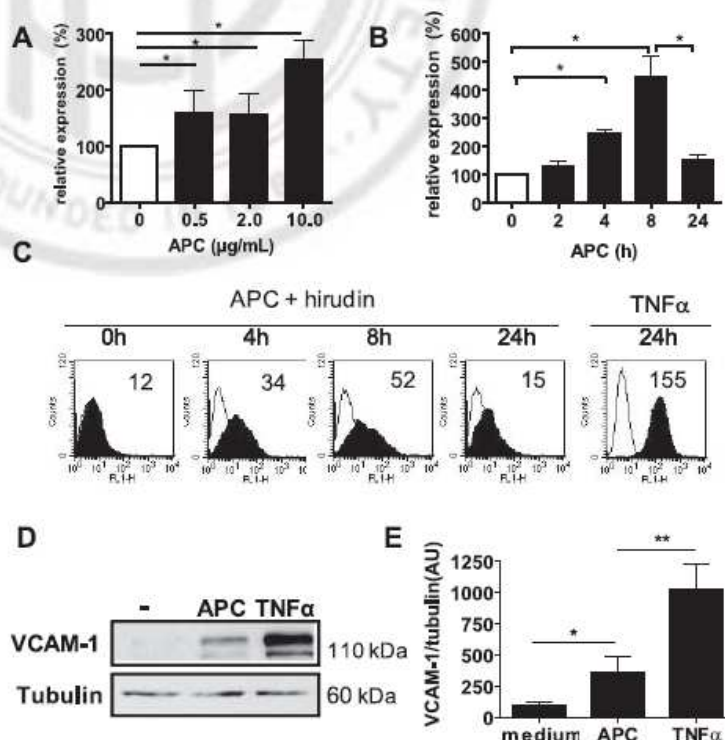
RESULTS

Activated protein C modulates cell adhesion molecule expression in vascular endothelial cells. Earlier studies reported that APC upregulates a broad set of genes encoding protective and anti-inflammatory molecules (7, 13, 16). However, the protective signaling driven by APC is still not fully elucidated. In the present study, a possible crosstalk between TNF and APC signaling was investigated in primary cultures of human vascular EC. Firstly, to test whether APC signaling may interfere with TNF signaling, EC were preincubated with APC and subsequently challenged with TNF- α . Expression of cell adhesion molecules (CAM) was analyzed by flow cytometry. As shown Fig. 1, pretreatment with APC significantly reduces the TNF- α -mediated expression of the CAMs, VCAM-1, E-selectin (CD62E), and ICAM-1 (Fig. 1A). APC reduces by 25–40% the ability of TNF- α to upregulate CAM expression in EC with $37.6 \pm 6.2\%$ of inhibition for VCAM-1, $32.4 \pm 7.9\%$ for E-selectin, and $24.5 \pm 6.8\%$ for ICAM-1 (Fig. 1B, $P < 0.05$ vs. TNF-treated EC). However, we found that EC treated for 8 h with APC alone exhibit a significant increase in VCAM-1 (3.5-fold increase as compared with basal level) and E-selectin (5.5-fold increase as compared with basal level) expression as compared with untreated controls (Fig. 1B, $P < 0.05$ vs. untreated EC). No significant increase was found for ICAM-1. In addition, no increase in VCAM-1 was observed when EC were treated with APC alone for 24 h (Fig. 1C), indicating that APC triggers a transient and selective upregulation of CAMs.

The regulatory effect of APC on VCAM-1 expression was further investigated using TNF- α as a positive control for EC

activation and signaling. As shown in the Fig. 2, the regulatory effect of APC on VCAM-1 expression was concentration dependent (Fig. 2A), significant at 0.5 $\mu\text{g/ml}$ of APC and maximal 8 h after treatment (Fig. 2B). VCAM-1 expression was still observed in the presence of hirudin, indicating that thrombin contamination could not account for the induction of VCAM-1 expression (Fig. 2C). Induction of VCAM-1 protein expression in response to APC was confirmed by Western blot analysis (Fig. 2D). Western blot quantification (Fig. 2E) from three independent experiments confirmed an increased VCAM-1 level in response to APC up to 3.6 ± 0.8 -fold increase of basal level as compared with a 10.2 ± 1.9 -fold increase in response to TNF ($P < 0.05$ vs. untreated EC and TNF-activated EC). Next, RT-PCR assays were performed on EC treated with APC (180 nM) or TNF- α (100 U/ml) for various periods of time (from 2 h to 24 h). TNF- α induced a transient accumulation of high levels of VCAM-1 mRNA in EC (maximum 420-fold increase as compared with basal level) while the transient upregulation in VCAM-1 mRNA mediated by APC was significant but moderate (maximum 50-fold increase as compared to basal level). Thus, RT-PCR assays indicate that an increase in mRNA level correlates with cell surface protein level for VCAM-1 in cells treated with APC (Fig. 3). Using a VCAM-1 gene promoter driven luciferase reporter assay allowed us to establish that APC induces VCAM-1 promoter activity in EC (Fig. 3C). Again, although moderate as compared with activity induced by TNF- α , VCAM-1 promoter activity induced by APC was significant compared with controls ($P < 0.05$). Together, these results strongly suggest that recombinant APC mediates VCAM-1 expression in EC through activation of

Fig. 2. VCAM-1 protein regulation by recombinant APC. A: concentration-response analysis of VCAM-1 surface expression on EC after 8-h treatment with recombinant APC. B: time course analysis of VCAM-1 surface expression on EC after treatment with recombinant APC (180 nM). Results shown in A and B are mean fluorescent intensity (MFI) values $\pm$ SD from 6 (A) and 3 (B) independent experiments; $*P < 0.05$ vs. controls. C: representative FACS analysis showing VCAM-1 expression (filled histograms) after treatment with APC (10 $\mu\text{g/ml}$) in the presence of hirudin (2 $\mu\text{g/ml}$). VCAM-1 expression in response to a 24-h stimulation with TNF (100 U/ml) is shown as a positive control. Negative controls were performed using an isotype-matched control IgG (empty histograms). Specific MFI values are indicated. Results are representative of 3 experiments. D: representative immunoblot out of three showing VCAM-1 protein expression in cell lysates from EC treated with APC (180 nM) or TNF- α (100 U/ml) for 8 h. Blot was probed with anti-tubulin antibodies to ensure equal protein loading in samples. E: quantitative analysis from 3 independent Western blot experiments. Results shown are mean [expressed as arbitrary units (AU)] values $\pm$ SD; $*P < 0.05$ vs. basal; $**P < 0.05$ vs. TNF- α .



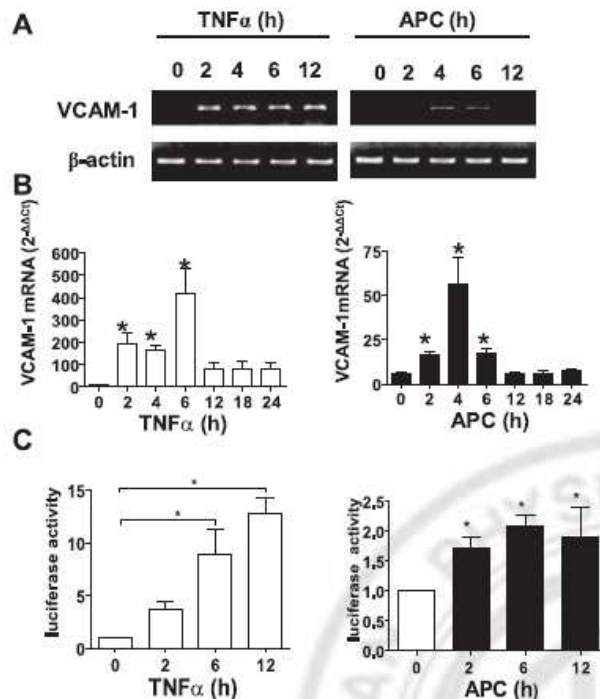


Fig. 3. Effect of APC on VCAM-1 gene transcription. A and B: time course analysis of steady-state VCAM-1 mRNA in cultured EC treated with APC (180 nM) or TNF- α (100 U/ml) performed by semiquantitative RT-PCR (A) and quantified by real-time quantitative PCR (B). Ct, cycle threshold. C: VCAM-1 gene reporter assays. Human umbilical vein EC (HUVEC) were transfected with a VCAM-1 promoter-luciferase reporter construct or an empty vector as a control. Transfected cells were incubated with and without APC (180 nM) and TNF- α (100 U/ml) for the various periods of time. Untreated and TNF- α -treated control EC were used as negative and positive controls, respectively. All treatments were performed in the presence of hirudin (100 nM). After cell lysis, luciferase activity was assayed and normalized according to the manufacturer's instructions. Results shown are means $\pm$ SD from 4 separate experiments performed in duplicate wells, normalized, and are expressed in 5 arbitrary luciferase units; * P < 0.05 vs. control.

VCAM-1 gene transcription. Gene expression profiling, using TaqMan Low Density Arrays targeting immune pathway, indicates that APC also drives a moderate but significant increase in transcript levels for some mediators of inflammation including ICAM-1, E-selectin, and IL-8. These regulations were subsequently confirmed by qPCR (data not shown).

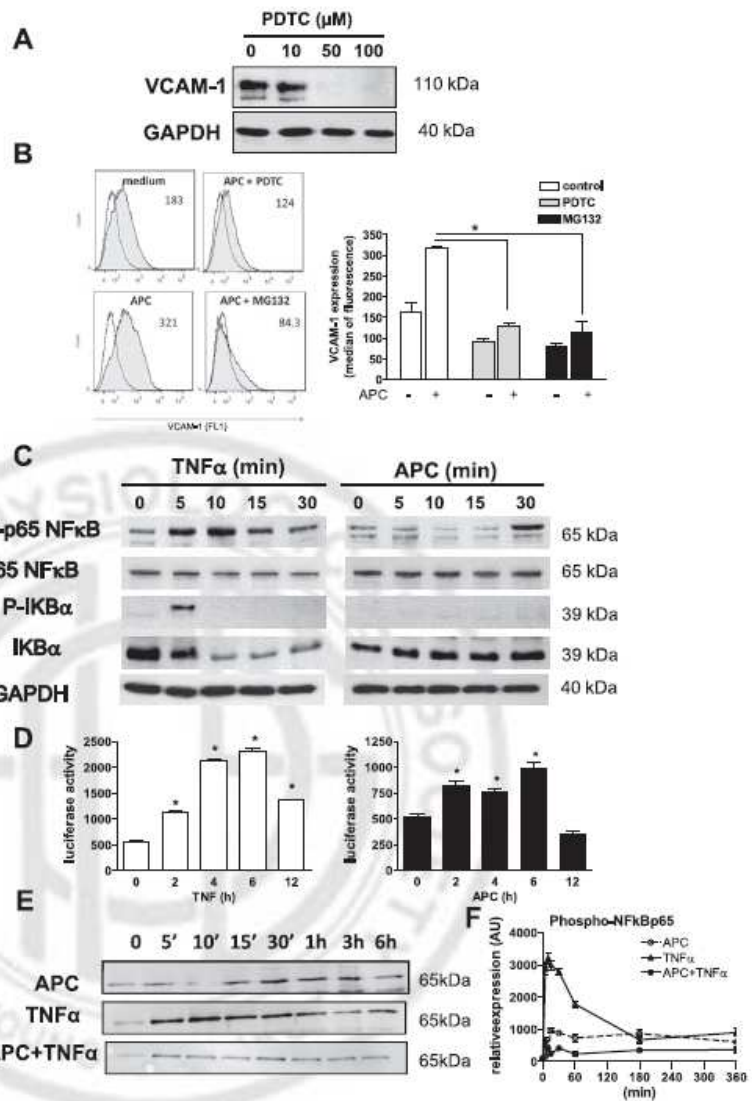
The noncanonical NF- κ B pathway is pivotal in the regulation of VCAM-1 by APC in endothelial cells. Induction of VCAM-1 transcription by TNF- α is, as for the other CAMs E-selectin and ICAM-1, dependent on activation of the transcription factor NF- κ B in EC (8, 32). Therefore, we speculated that NF- κ B may also be involved in CAM regulation by APC. To test this possibility, EC were preincubated with synthetic inhibitors before treatment with APC (Fig. 4). We found that inhibition of NF- κ B using PDTC or MG132 efficiently prevents VCAM-1 expression as measured by Western blot (Fig. 4A) and by flow cytometry (Fig. 4B). Both effects were concentration dependent. Blocking the p38 MAPK with SB203580 has no significant effect (data not shown). To explore further the implication of NF- κ B in the APC signaling, phosphorylation and degradation of RelA/p65 and I κ B α were

analyzed by Western blotting (Fig. 4C). We found that TNF- α , a potent inducer of NF- κ B, promotes a rapid phosphorylation of p65 at Ser536 that correlates with the phosphorylation and degradation of total I κ B α . In comparison, neither phosphorylation at Ser32 nor degradation of I κ B α was observed in response to APC. Nevertheless, a transient decrease in phospho-p65 basal level was found at 10 and 15 min preceding a late induction of the p65 phosphorylation at 30 min. EC were transiently transfected with a synthetic NF- κ B-luciferase reporter derived from *E-selectin* promoter (5) and then challenged with either TNF or APC (Fig. 4D). Gene reporter assays showed that APC has only a modest effect on NF- κ B promoter activity (maximum twofold increase, P < 0.05), whereas TNF drives up to fivefold increase (P < 0.05) in promoter activity. Time course of NF- κ B p65 phosphorylation was examined in EC treated with both APC and TNF (Fig. 4E). We found that APC significantly inhibits p65 phosphorylation mediated by TNF at all time points.

Next, we sought to determine the mechanisms and signaling pathways activated by APC alone to examine how APC signaling may interfere with TNF signaling to downregulate inflammatory gene expression. In Fig. 5, immunoblots further show that APC drives a rapid and transient induction of TRAF2, NIK, and IKK α / β (at 15 min) followed by a late (at 1 h and 3 h) phosphorylation of p65 at Ser276, 463, and 536 and Lys310. Therefore, APC signaling is associated with an activation of the transcription factor NF- κ B via a mechanism that is not associated with the canonical I κ B α phosphorylation/degradation or NF- κ B (i.e., RelA) nuclear translocation, although it affects NF- κ B binding to DNA κ B consensus sequences in the *VCAM-1* and *E-selectin* promoters.

ERK1/2 MAPK is activated by APC and serves as an antiinflammatory signal in endothelial cells. To explore further APC signaling in vascular endothelium, we next examined the effect of APC on phosphorylation of MEK1/2 and ERK1/2 (p42/44) in both resting and TNF-activated EC. As shown Fig. 6A, and consistent with earlier studies (31), intracellular levels of phosphorylated ERK1/2 began to increase 5 min after treatment with APC, peaking at 15 min after treatment, and thereafter gradually decreased to pretreatment levels. We found a parallel increase in phosphorylation of JNK2/3 MAPK with a similar time course, whereas phosphorylation of JNK1 was only significant at 30 min. In contrast, no phosphorylated p38 MAPK was detected in EC treated with APC alone, while in our conditions, p38 was efficiently phosphorylated in response to TNF- α . Moreover, when considering the phosphatidylinositol 3-kinase pathway, we found that phosphorylation of Akt occurred in response to APC but was delayed as compared with those observed in response to TNF and only found at 30 min. Downstream of Akt, phosphorylated eNOS was found preserved in response to APC, while upstream of PDK1, phosphorylation was not affected. APC-mediated cell signaling was confirmed by immunofluorescence (supplemental Fig. S1; Supplemental Material for this article is available online at the Journal website). Figure 6B also indicates that pretreatment with APC deeply inhibited major signaling events triggered by TNF. These changes include an enhanced phosphorylation of ERK1/2 and a sustained phosphorylation of Akt. A quantitative analysis is shown in Fig. 6C. The ability of APC to activate ERK1/2 in resting cells and to enhance ERK activation in TNF-treated cells was also confirmed by measuring activated

Fig. 4. Implication of NF- κ B in the regulatory action of APC. **A:** Western blot analysis of APC-mediated VCAM-1 expression after inhibition of the NF- κ B pathway using pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC). A concentration-response analysis of inhibitor is shown. Blots were re-probed with anti-GAPDH antibodies to ensure equal protein loading. **B:** representative (left) and quantitative (right, from 3 experiments) FACS analysis showing the inhibitory effect of PDTC and MG132 on APC-induced expression of VCAM-1 on vascular EC (gray histograms). For FACS analysis, experimental negative controls were performed using an isotype-matched control IgG (empty histograms). Specific MFI values are indicated. Results are representative of 3 experiments. Quantification was obtained from 3 separate experiments. Controls for statistical analyses are cells treated without the inhibitors (* $P < 0.05$ vs. APC alone). **C:** comparative analysis by Western blots of NF- κ B signaling pathway in EC treated with TNF- α (100 U/ml) or recombinant APC (180 nM). Time course analyses are shown; blots were re-probed with anti-GAPDH antibodies to ensure equal protein loading. **D:** NF- κ B gene reporter assays. HUVEC were transfected with a NF- κ B-luciferase reporter construct or an empty vector as a control. Transfected cells were incubated with and without APC (180 nM), hirudin (100 nM), and TNF- α (100 U/ml) for the various periods of time. Untreated and TNF-treated control EC were used as negative and positive controls, respectively. After cell lysis, luciferase activity was assayed and normalized according to the manufacturer's instructions. Results shown are means $\pm$ SD from 4 separate experiments performed in duplicate wells, normalized, and are expressed in arbitrary luciferase units. **E** and **F:** representative (E) and quantitative (F) analysis of time course phosphorylation of NF- κ B p65 in EC treated with APC (180 nM) and/or TNF (100 U/ml). Data were normalized to GAPDH (not shown).



ERK using a cell-based assay (Fig. 6D, $P < 0.05$ vs. medium; $P < 0.05$ vs. TNF- α). In contrast, phosphorylation of NF- κ B p65 was prevented, confirming that inhibition of NF- κ B activity occurred.

The contribution of ERK to the regulatory functions of APC on VCAM-1 was investigated by employing MEK inhibitors, PD98059 (10 μ M) and U0126 (5 μ M). Treatment of EC with APC enhanced VCAM-1 expression. In the presence of PD98059, the effect of APC was markedly increased at 8 h (Fig. 7). Pretreatment with the other MEK inhibitor, U0126, also augmented VCAM-1 in response to APC ($P < 0.05$ vs. diluents). U0126 and PD98059 alone had no significant effect on VCAM-1 induced by TNF. The inhibitory action of both PD98059 and U0126 on ERK activation was confirmed by Western blots (data not shown). To further confirm the role of ERK in the modulation of VCAM-1 in inflammatory conditions, EC were pretreated with APC in the presence or absence

of inhibitors before stimulation with TNF. As shown in Fig. 7, the APC-mediated downregulation of VCAM-1 in response to TNF was significantly abrogated by PD98059 and U0126 ($P < 0.05$ vs. diluent). The data collectively suggest that ERK is activated by APC and serves as an antiinflammatory signal that suppresses expression of NF- κ B-dependent inflammatory genes probably by inhibiting IKK activity in EC.

PAR1 and EPCR equally mediate APC signaling that triggers VCAM-1 expression. PAR1 has been shown to be a major receptor mediating the protective effect of APC (28). The contribution of EPCR to APC signaling is still poorly defined. Thus, in this study we sought to define the upstream signaling events that account for ERK activation and VCAM-1 regulation in response to APC. First, contribution of the PAR receptors was assessed by analyzing VCAM-1 induction in response to agonists of PAR1, -2, and -4. PAR3 is not significantly expressed by EC (17). Agonist peptides

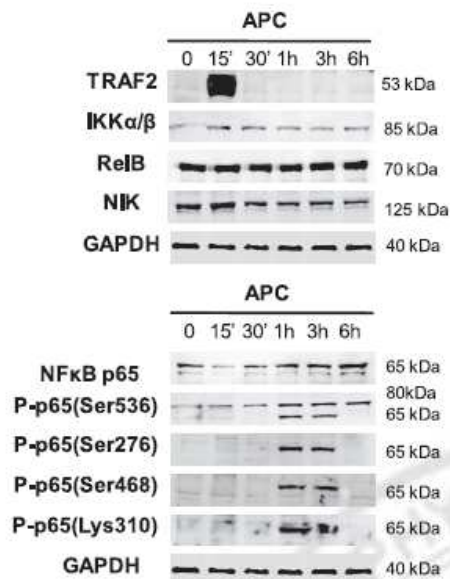


Fig. 5. APC signaling causes phosphorylation of NF- κ B p65. Representative Western blots showing the effect of APC on the NF- κ B pathway. A time course analysis of APC (180 nM) is shown. Immunoblotting was performed using antibodies against total and/or phosphorylated forms of NF- κ B p65 (Ser536, Ser276, Ser468, Lys310), TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2), NF- κ B-inducing kinase (NIK), IKK α / β , and RelB. Blots were reprobed with anti-GAPDH antibodies to ensure equal protein loading.

for PAR1 (PAR1-ap1 and -ap2) efficiently reproduced the induction of VCAM-1 obtained by recombinant APC in EC. In contrast and consistent with previous reports (29), no effect was found by using agonists of PAR2 and PAR4 (Fig. 8A). In experiments using blocking antibodies, VCAM-1 induction was totally suppressed using either anti-PAR1 or anti-EPCR antibodies, suggesting that both receptors equally contribute to APC signaling (Fig. 8B). To confirm this hypothesis, silencing of PAR1 and EPCR was achieved in vascular EC by the use of siRNA. Efficiency of siRNAs to silence EPCR and PAR1 is presented in Supplemental Fig. S2. Figure 8, C and D, further confirms by flow cytometry and by Western blotting, respectively, that silencing PAR1 or EPCR similarly abrogates VCAM-1 expression in response to APC. No additive effect was found by silencing both targets. A quantitative analysis comparing the blocking effect of antibodies and siRNAs is shown in Fig. 8E. Statistical analyses confirmed that antibodies and siRNAs targeting EPCR or PAR1 similarly inhibit the induction of VCAM-1 in response to APC ($P < 0.05$ vs. APC alone). Next, the respective impact of PAR1 and EPCR receptors was investigated in cells that express selectively EPCR or PAR1. As shown in Supplemental Fig. S3, in contrast to EC that express both PAR1 and EPCR, epithelial cells from the HeLa cell line only express EPCR but no PAR1, whereas the Jurkat T cells express PAR1 but not EPCR as determined by flow cytometry (Supplemental Fig. S3A). These cells were used as an experimental model to assess the respective role of PAR1 and EPCR in ERK1/2 activation. Western blots show that APC induces phosphorylated ERK only in cells expressing EPCR (EC and to a lesser extent HeLa) but not in T cells expressing PAR1 but no EPCR (Supplemental Fig. S3B).

Selective silencing of EPCR or PAR1 in EC similarly prevents ERK activation in EC (Supplemental Fig. S3C). Together, these findings sustain the fact that both receptors are required in EC to trigger APC signaling. These data also suggest that APC signaling and regulatory function may also differ according to cell type.

DISCUSSION

The recombinant form of human activated protein C, a natural anticoagulant serine protease, improves the outcome of patients with severe sepsis (3). The protective effect of APC supplementation in patients likely reflects the ability of APC to modulate multiple events implicated in the pathophysiology of sepsis. Indeed, in addition to the control of coagulation, APC also elicits cytoprotective and antiinflammatory activities established in several *in vitro* studies and animal models (18, 29, 30). Here we show that recombinant APC plays a regulatory role in EC by attenuating CAM expression during inflammation. We demonstrate that APC regulates both the noncanonical NF- κ B and ERK1/2 signaling pathways to modulate VCAM-1 expression in resting and activated EC.

Our results indicate that antiinflammatory function of recombinant APC in the presence of TNF- α requires an active phase of cellular signaling and activation of gene transcription in primary vascular EC. Analysis of VCAM-1 gene transcription and protein expression was used to assess the regulatory function of recombinant APC in inflamed endothelium. Although moderate as compared with TNF signaling, we found that APC signaling consistently induces VCAM-1 mRNA and protein. Gene reporter assays indicate that the increase in VCAM-1 mRNA after treatment with APC is due to an increase in the rate of gene transcription.

The transcription factor NF- κ B plays a central role in the regulation of inflammatory and immune responses, control of cell division, and apoptosis. The NF- κ B family of transcription factors is composed of five members sharing a consensus Rel homology domain, i.e., p50, p52, cRel, RelB, and RelA (p65), which is probably the predominant active form in EC (23). NF- κ B proteins form homodimers and heterodimers that can bind κ B DNA motifs in the promoter regions of "NF- κ B-dependent genes."

Activation of the NF- κ B pathway was further demonstrated by the induction of NF- κ B binding site-dependent transcriptional activation in APC-treated cells. These observations suggested that the induction of VCAM-1 genes by APC was at least in part related to activation of the NF- κ B pathway. This was supported by observations showing that the NF- κ B inhibitor PDTC greatly reduced the induction of the VCAM-1 expression by APC. The canonical pathway of NF- κ B activation, through the activation of various receptors, including those for TNF- α or IL-1 β , involves phosphorylation and ubiquitination of I κ B α and its subsequent degradation by the proteasome machinery (6). The activation of NF- κ B by several stress-inducing agents has been reported to involve a reduction in the level of I κ B protein; however, it does not involve phosphorylation and degradation of I κ B α but appears to be related to a reduction in the translation of I κ B mRNA. Not only degradation of I κ B and nuclear translocation of NF- κ B but also posttranslational modifications of NF- κ B, including site-spe-

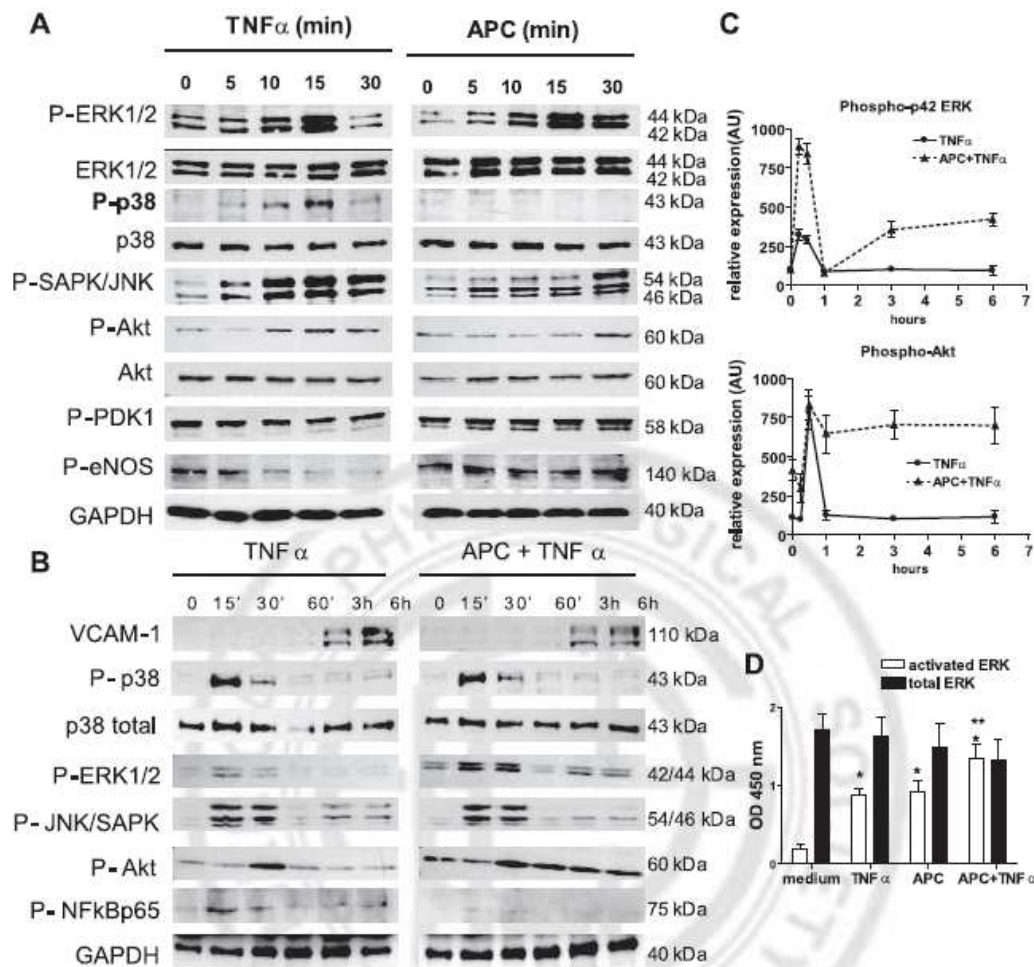


Fig. 6. APC signaling in EC and potential interference between APC and TNF signaling pathways. **A**: Western blots comparing the activity of the MAPKs (ERK1/2, p38, and JNK/SAPK) and the phosphatidylinositol 3-kinase [Akt, phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1), and endothelial nitric oxide synthase (eNOS)] in EC treated with APC (180 nM) or TNF (100 U/ml). **B**: antagonistic effect of APC on TNF signaling in cultured vascular EC. Cells were treated with TNF (100 nM) with or without a preincubation with APC (180 nM) for 8 h. Cell lysates were subjected to Western blotting. Time course analyses are shown; blots were reprobed with anti-GAPDH antibodies to ensure equal protein loading. **C**: quantitative time course analysis of ERK1/2 and Akt phosphorylation in response to APC and/or TNF from 3 independent Western blot experiments. Results were normalized by GAPDH values and are expressed as arbitrary units. **D**: activation of ERK1/2 in response to APC and/or TNF measured by a cell-based ELISA assay; * $P < 0.05$ vs. medium, ** $P < 0.05$ vs. TNF-treated cells. OD, optical density.

cific phosphorylation, particularly p65 phosphorylation, are important for optimal *trans* activation activity of NF- κ B. We found that APC causes neither I κ B phosphorylation nor degradation. Nevertheless, we demonstrated that recombinant APC regulates phosphorylation of p65/RelA at Ser276 in the Rel homology domain and Ser536, which is located on the *trans* activation domain. Thus, phosphorylation of NF- κ B p65 may be implicated in the regulation of VCAM-1, E-selectin, ICAM-1, and IL-8 reported here. Moreover, the phosphorylation status of p65 controls not only its transcriptional activity but also specificity for different subsets of target genes (2) and may at least in part be responsible for the selective induction of gene expression observed in APC-treated cells. Interestingly, induction of the adaptor TRAF2 was found as an early response to APC. TRAF2 recruits antiapoptotic cIAP1 and cIAP2 to the TNFR1 signaling complex through its COOH-

terminal TRAF-N domain and thereby inhibits the activation of effector caspases by TNF- α (25). The stable expression of wild-type TRAF2 completely inhibited TNF-induced cell death, suggesting that TRAF2 phosphorylation is not required for its protective action (4). Whether TRAF2 may account for the antiapoptotic action of APC in EC remains to be examined.

Mechanisms whereby APC may block the activation of NF- κ B by proinflammatory stimuli (i.e., TNF) were then analyzed. We found a major and early effect of APC on ERK1/2 and JNK MAP kinases, whereas no effect was found on p38, suggesting that activation of MAPK is upstream of NF- κ B activation that take place later. As suggested by our results, activation of ERK is required for the induction of VCAM-1 transcription. Indeed, together ERK and JNK trigger AP1 that in coordination with NF- κ B activity is required for VCAM-1 transcription. Thus we speculate that the early acti-

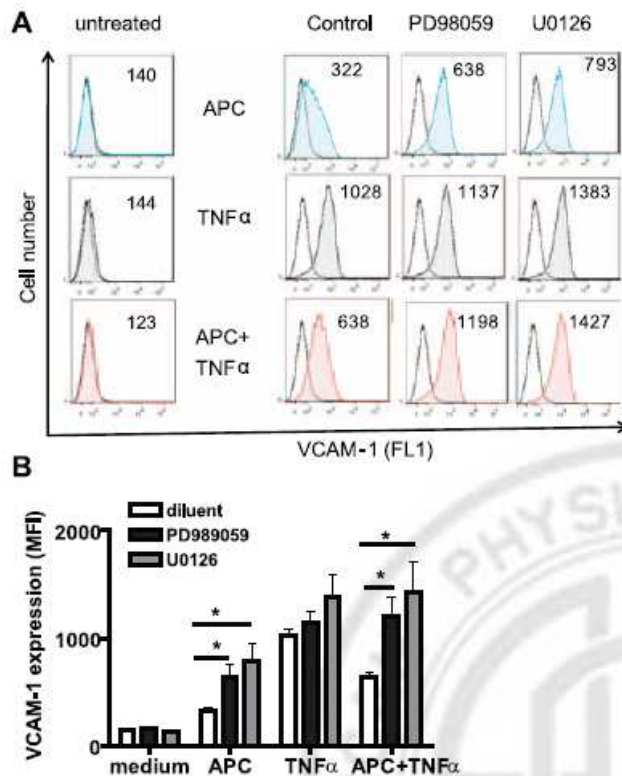


Fig. 7. ERK regulates the modulation of VCAM-1 expression triggered by APC in EC. EC were treated with APC (180 nM) or TNF (100 U/ml) for 8 h or pretreated with APC for 16 h before incubation with TNF for 8 h. Cells were preincubated with inhibitors 1 h before treatment. A: representative FACS analysis of VCAM-1 expression. Mean values of fluorescence intensity are indicated. B: quantitative analysis from 3 separate FACS analysis. Data are expressed as means $\pm$ SD; * P < 0.05 vs. control conditions (treatment with diluents but without inhibitors).

variation of ERK/JNK accounts for the protective effect of APC in EC. However, mechanisms that control temporal and spatial aspects of NF- κ B and ERK signaling and the interplay between kinases and phosphatases that modulate pathway signaling are still unclear (22).

Mechanistically, coagulation and inflammation are intimately linked and cellular signaling by coagulation proteases through protease-activated receptors (PAR) may affect pro- and antiinflammatory responses (11). Some evidence suggests that APC-EPCR complex can translocate from the plasma membrane to the nucleus, where it could modulate gene expression (16). APC bound to EPCR has also been shown to cleave PAR1 and PAR2 (28). Signaling through PAR promotes EC proliferation and mediates at least some of the antiinflammatory effects observed with APC. Silencing EPCR and PAR1 receptors indicates an equal contribution of both receptors in VCAM-1 induction. Depending on cell type, APC induces signaling via the MAPK pathway with phosphorylation of ERK-1/2 that is reported to be PAR1 dependent and EPCR dependent or PAR1 dependent but EPCR independent (24, 28, 31). However, our findings support the concept that EPCR is necessary for ERK1/2 activation for APC signaling in vascular EC.

In summary, our data provide evidence for the existence of a regulatory pathway mediated by APC that impair for the TNF signaling. In the future, it will be important to further determine the mechanisms by which APC desensitizes EC to TNF signaling.

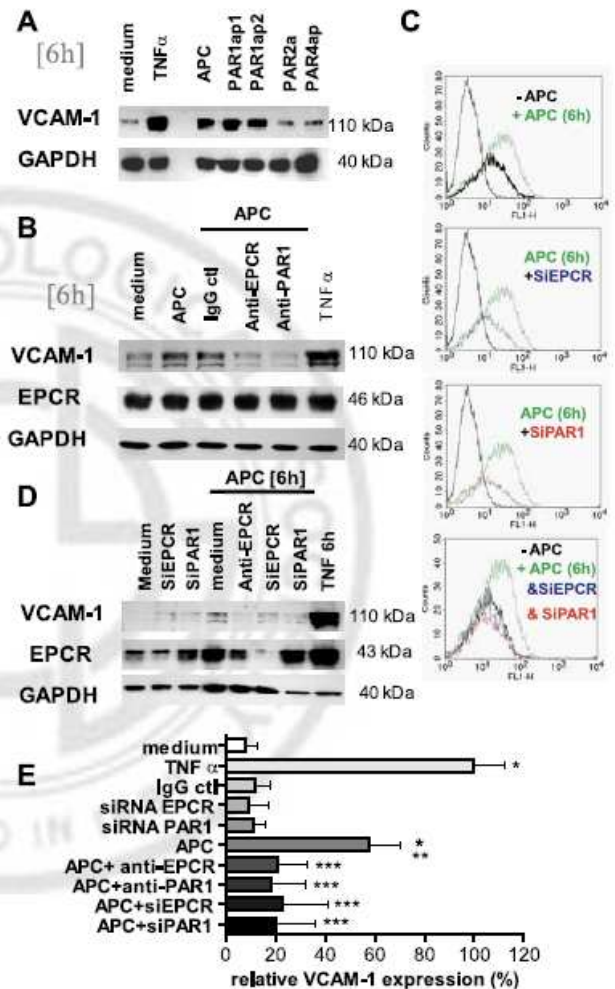


Fig. 8. Involvement of endothelial protein C receptor (EPCR) and protease-activated receptor (PAR) receptors in APC-mediated regulation of endothelial VCAM-1. A: immunoblots showing VCAM-1 and GAPDH expression in cells treated with recombinant APC (180 nM) or PAR agonist peptides (PAR1ap1, PAR1ap2, PAR4ap) or molecule (PAR2a). EC treated with culture medium or TNF- α (100 U/ml) were used as negative and positive controls, respectively. B: immunoblots showing VCAM-1, EPCR, and GAPDH expression in cells treated with recombinant APC (180 nM) in the presence of blocking anti-PAR1 or anti-EPCR antibodies. Cells treated with irrelevant control (ctl) IgG were used as a negative control. C and D: FACS for VCAM-1 (C) and Western blot analysis for EPCR and PAR1 (D) in EC before and after silencing with specific short interfering RNA (siRNA). EC were transfected without siRNA (medium) and with either nontargeting siRNA or siRNA specific for EPCR or PAR1. EPCR and PAR1 protein expression was analyzed 48 h after transfection by Western blot and FACS. EC were incubated for 6 h with recombinant APC (180 nM). E: quantification from 4 independent Western blot analyses. Results are expressed as relative percentages compared with TNF-treated cells. * P < 0.05 vs. medium, ** P < 0.05 vs. TNF- α , *** P < 0.05 vs. APC.

GRANTS

This work was supported by grants from l'Agence de Biomédecine (AO2007), La Société de Néphrologie, Lilly-France. This work was also in part supported by XENOME, an EU-funded Integrated Project in Life Sciences, Genomics and Biotechnology for Health (LSHB-CT-2006-037377), and by a grant from la Fondation de l'Avenir (contract ET8-498).

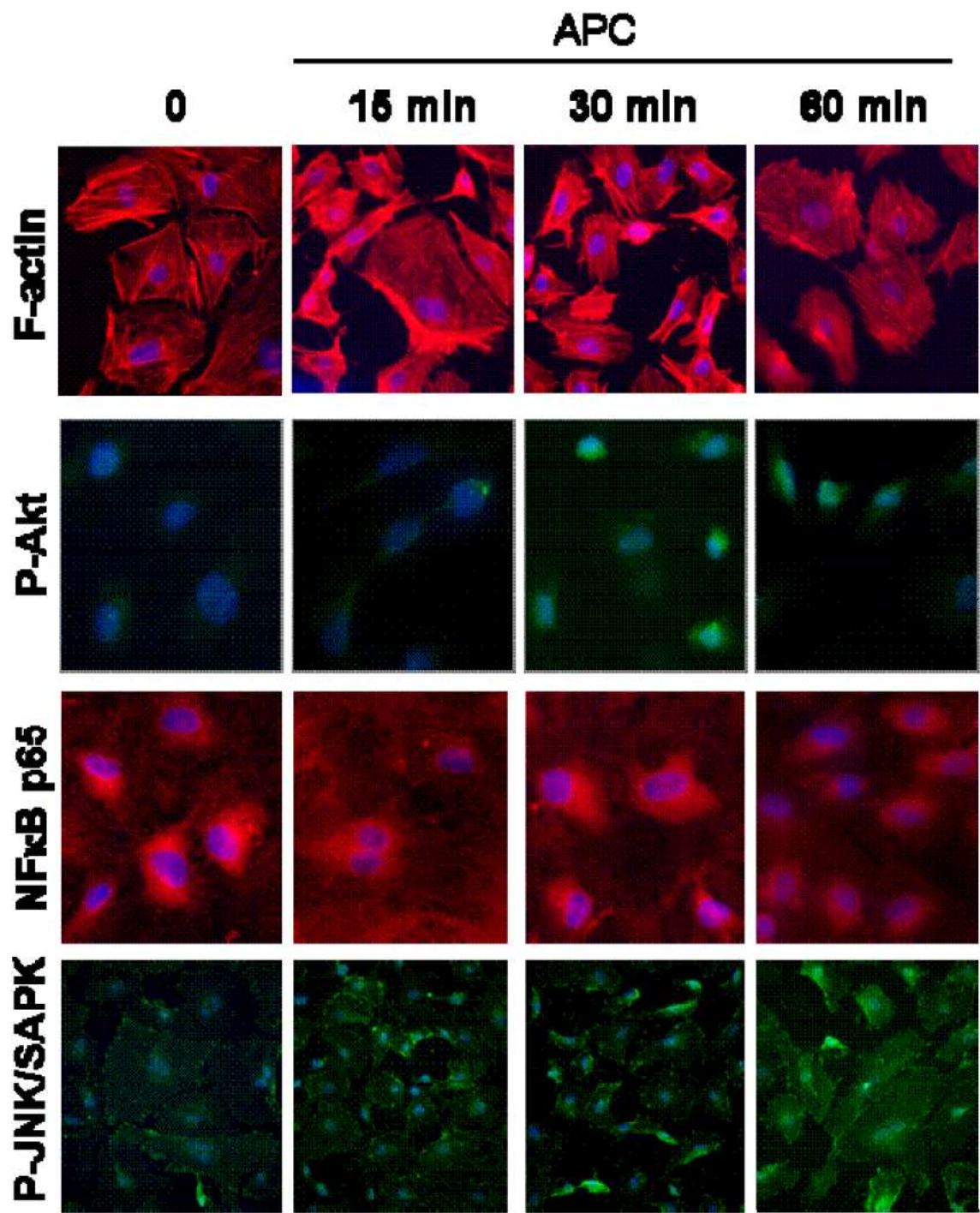
DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s).

REFERENCES

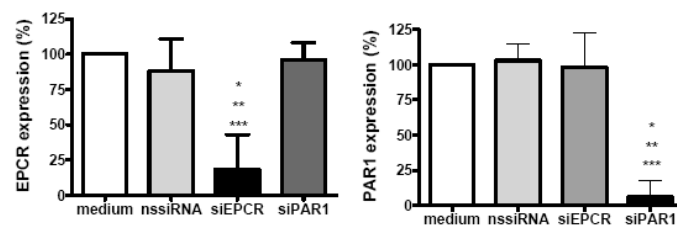
1. Aird WC. Sepsis and coagulation. *Crit Care Clin* 21: 417–431, 2005.
2. Anrather J, Racchumi G, Iadecola C. *cis*-Acting, element-specific transcriptional activity of differentially phosphorylated nuclear factor-kappa B. *J Biol Chem* 280: 244–252, 2005.
3. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJ Jr. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 344: 699–709, 2001.
4. Blackwell K, Zhang L, Thomas GS, Sun S, Nakano H, Habelhah H. TRAF2 phosphorylation modulates tumor necrosis factor alpha-induced gene expression and cell resistance to apoptosis. *Mol Cell Biol* 29: 303–314, 2009.
5. Brostjan C, Anrather J, Csizmadia V, Natarajan G, Winkler H. Glucocorticoids inhibit E-selectin expression by targeting NF-kappaB and not ATF/c-Jun. *J Immunol* 158: 3836–3844, 1997.
6. Chen LF, Greene WC. Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 392–401, 2004.
7. Cheng T, Liu D, Griffin JH, Fernandez JA, Castellino F, Rosen ED, Fukudome K, Zlokovic BV. Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective. *Nat Med* 9: 338–342, 2003.
8. Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J* 9: 899–909, 1995.
9. Coupel S, Leboeuf F, Boulday G, Souillou JP, Charreau B. RhoA activation mediates phosphatidylinositol 3-kinase-dependent proliferation of human vascular endothelial cells: an alloimmune mechanism of chronic allograft nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 15: 2429–2439, 2004.
10. Dimmeler S, Haendeler J, Zeiher AM. Regulation of endothelial cell apoptosis in atherothrombosis. *Curr Opin Lipidol* 13: 531–536, 2002.
11. Esmon CT. Coagulation and inflammation. *J Endotoxin Res* 9: 192–198, 2003.
12. Esmon CT. Inflammation and the activated protein C anticoagulant pathway. *Semin Thromb Hemost* 32, Suppl 1: 49–60, 2006.
13. Frascini N, Bachli EB, Blau N, Leikauf MS, Schaffner A, Schoedon G. Gene expression profiling of inflamed human endothelial cells and influence of activated protein C. *Circulation* 110: 2903–2909, 2004.
14. Gerritsen ME, Bloor CM. Endothelial cell gene expression in response to injury. *FASEB J* 7: 523–532, 1993.
15. Griffin JH, Fernandez JA, Gale AJ, Mosnier LO. Activated protein C. *J Thromb Haemost* 5, Suppl 1: 73–80, 2007.
16. Joyce DE, Gelbert L, Ciaccia A, DeHoff B, Grinnell BW. Gene expression profile of antithrombotic protein C defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. *J Biol Chem* 276: 11199–11203, 2001.
17. Kataoka H, Hamilton JR, McKemy DD, Camerer E, Zheng YW, Cheng A, Griffin C, Coughlin SR. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate thrombin signaling in endothelial cells. *Blood* 102: 3224–3231, 2003.
18. Kerschen EJ, Fernandez JA, Cooley BC, Yang XV, Sood R, Mosnier LO, Castellino FJ, Mackman N, Griffin JH, Weiler H. Endotoxemia and sepsis mortality reduction by non-anticoagulant activated protein C. *J Exp Med* 204: 2439–2448, 2007.
19. Laszik Z, Mitro A, Taylor FB Jr, Ferrell G, Esmon CT. Human protein C receptor is present primarily on endothelium of large blood vessels: implications for the control of the protein C pathway. *Circulation* 96: 3633–3640, 1997.
20. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 105: 1135–1143, 2002.
21. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25: 402–408, 2001.
22. Murphy LO, Blenis J. MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem Sci* 31: 268–275, 2006.
23. Nabel GJ, Verma IM. Proposed NF-kappa B/I kappa B family nomenclature (Abstract). *Genes Dev* 7: 2063, 1993.
24. O'Brien LA, Richardson MA, Mehrbod SF, Berg DT, Gerlitz B, Gupta A, Grinnell BW. Activated protein C decreases tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand by an EPCR-independent mechanism involving Egr-1/Erk-1/2 activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 2634–2641, 2007.
25. Park YC, Ye H, Hsia C, Segal D, Rich RL, Liou HC, Myska DG, Wu H. A novel mechanism of TRAF signaling revealed by structural and functional analyses of the TRADD-TRAF2 interaction. *Cell* 101: 777–787, 2000.
26. Quillard T, Coupel S, Coulon F, Fitau J, Chatelais M, Cuturi MC, Chiffolleau E, Charreau B. Impaired Notch4 activity elicits endothelial cell activation and apoptosis: implication for transplant arteriosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 2258–2265, 2008.
27. Quillard T, Devalliere J, Chatelais M, Coulon F, Seveno C, Romagnoli M, Barille Nion S, Charreau B. Notch2 signaling sensitizes endothelial cells to apoptosis by negatively regulating the key protective molecule survivin. *PLoS One* 4: e8244, 2009.
28. Riewald M, Petrovan RJ, Donner A, Mueller BM, Ruf W. Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. *Science* 296: 1880–1882, 2002.
29. Riewald M, Ruf W. Protease-activated receptor-1 signaling by activated protein C in cytokine-perturbed endothelial cells is distinct from thrombin signaling. *J Biol Chem* 280: 19808–19814, 2005.
30. Stephenson DA, Told L, Beaudin S, Liaw PC. Modulation of monocyte function by activated protein C, a natural anticoagulant. *J Immunol* 177: 2115–2122, 2006.
31. Uchiba M, Okajima K, Oike Y, Ito Y, Fukudome K, Isobe H, Suda T. Activated protein C induces endothelial cell proliferation by mitogen-activated protein kinase activation in vitro and angiogenesis in vivo. *Circ Res* 95: 34–41, 2004.
32. Wrighton CJ, Hofer-Warbinek R, Moll T, Eytner R, Bach FH, de Martin R. Inhibition of endothelial cell activation by adenovirus-mediated expression of I kappa B alpha, an inhibitor of the transcription factor NF-kappa B. *J Exp Med* 183: 1013–1022, 1996.

Supplement Figure S1



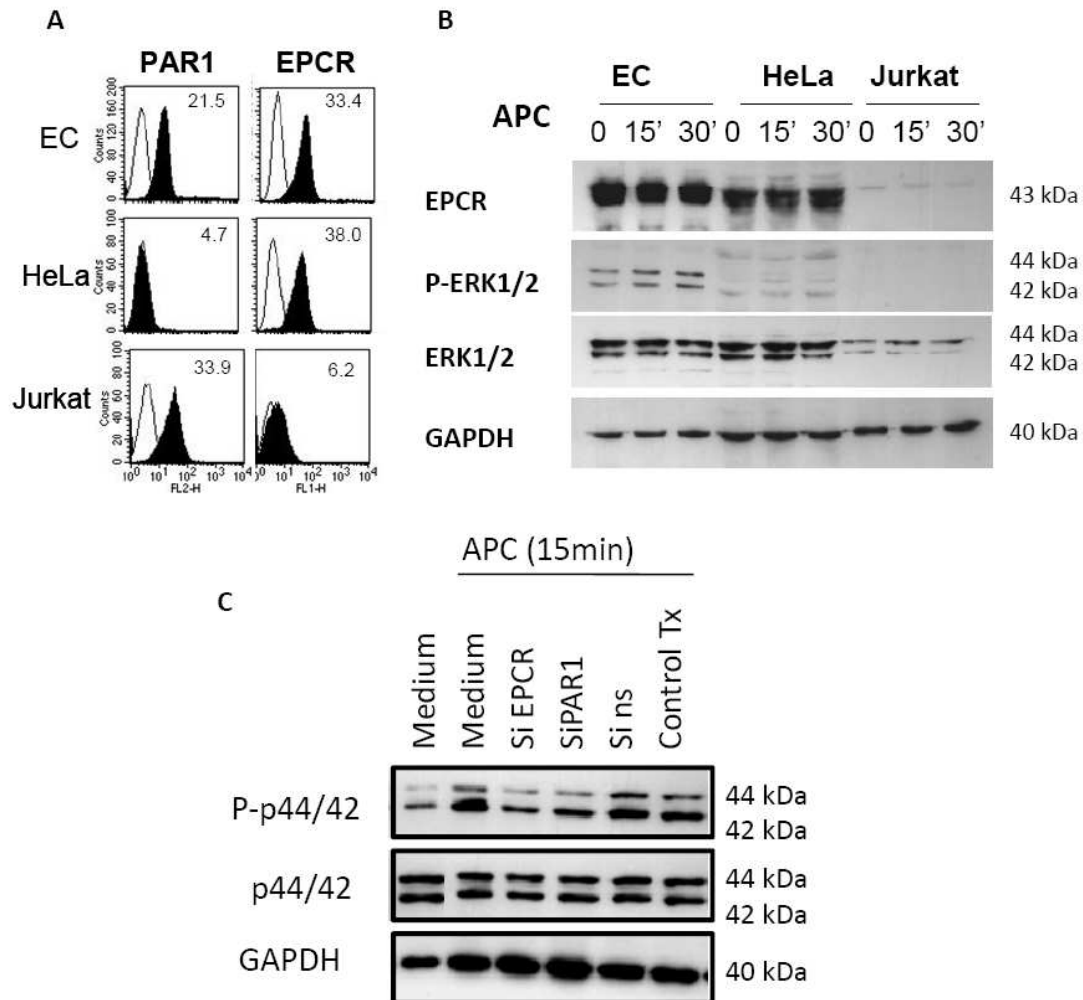
Immunofluorescence studies were performed on EC grown on glass coverslips and treated with recombinant APC (180nM). Immunostaining was performed as described in Materials and Methods. Nuclei are stained using dapi (blue). Original magnification: x40.

Supplement Figure S2



Quantification of EPCR and PAR1 in EC before and after silencing with specific siRNA. EC were transfected without SiRNA (medium) and with either non targeting (nt) SiRNA or SiRNA specific for EPCR or PAR1. EPCR and PAR1 protein expression were analyzed 48h after transfection by western blot and facs. Quantification from 4 independent facs analyses are shown and results are expressed as relative percentages compared to mock transfected cells (medium), * $p < 0.05$ versus medium, ** $p < 0.05$ versus ntSiRNA, *** $p < 0.05$ versus irrelevant SiRNA.

Supplement Figure S3



Respective implication of EPCR and PAR1 receptors on ERK1/2 MAPK activation by recombinant APC. (A) A facs analysis comparing EPCR and PAR1 expression in EC, epithelial HeLa cells and Jurkat T cells. Immunostaining was performed using specific anti-VCAM-1 antibodies (filled histograms) or isotype-matched control IgG (empty histograms). (B) Western blotting showing EPCR expression, phosphorylated and total ERK1/2 in cells treated with recombinant APC. (C) Representatives Western blots showing phosphorylated and total ERK1/2 in EC transfected with non specific (ns) siRNA or siRNA targeting EPCR or PAR1. cells untransfected (medium) and transfected without SiRNA were used as controls. Blots were reprobed with anti-GAPDH antibodies to ensure equal protein loading and are representative of 3 separate experiments.

III. D) Résultats additionnels

Certains résultats n'ont pu être montrés dans cet article (« data not shown »).

III. D. 1) Induction des molécules d'adhésion par la PCa

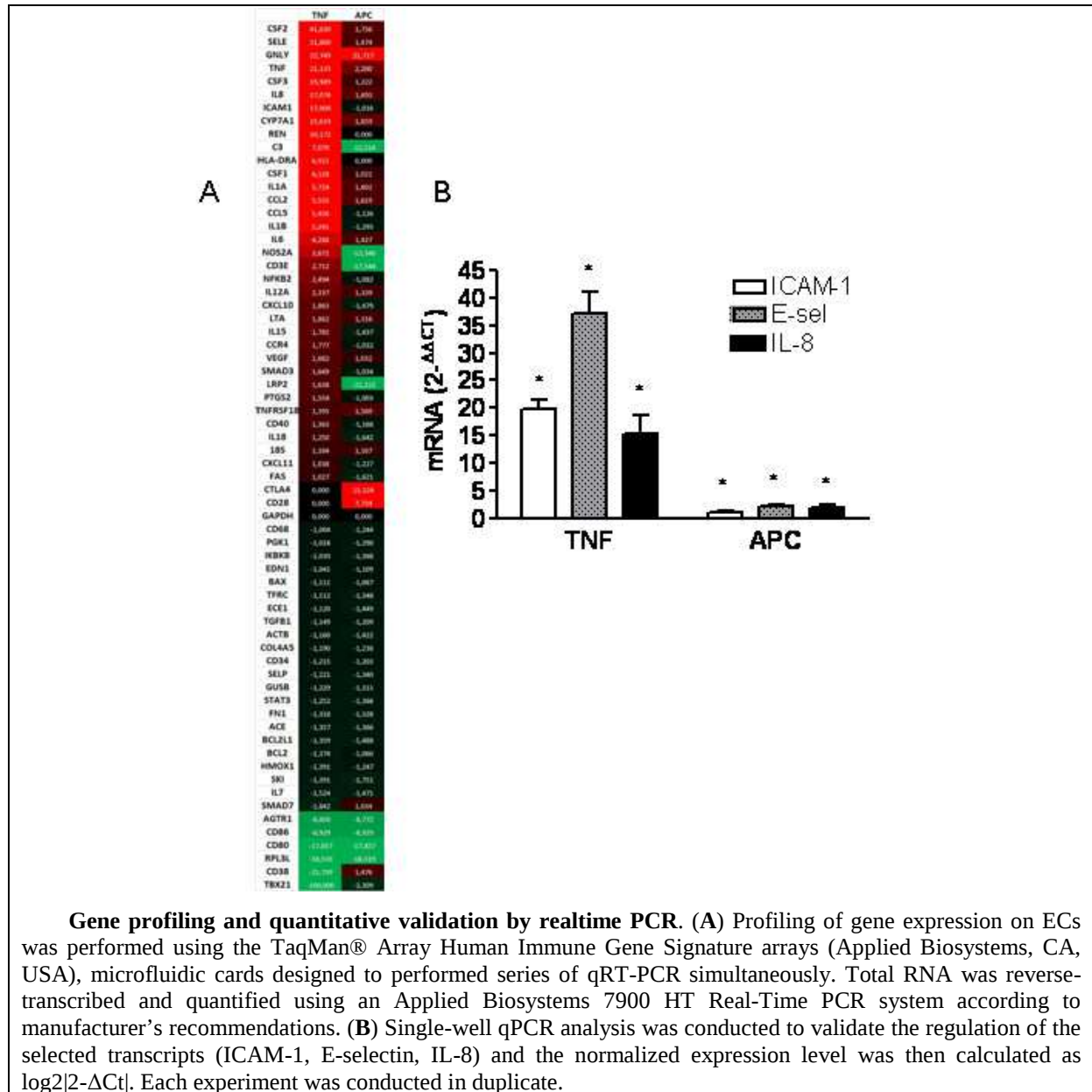


Figure 31 : Régulation des gènes induite par TNF et PCa

Ce travail montrait que la PCa, seule, pour traiter des CE en culture induisait une surexpression (moins intense que pour le TNF- α) des protéines d'adhésion comme VCAM-1, E-Selectine et ICAM-1 (figures 1 et 2 de l'article). L'article affirmait au travers des Figures 2

et 3 que cette surexpression était liée essentiellement à une activité transcriptionnelle des gènes codant pour VCAM-1.

Une analyse de profil de régulation de 96 gènes simultanément (« profil immunologique ») par RT-PCT quantitative (Taqman[®] Low Density Array, Applied Biosystème) était réalisée sous traitement par TNF- α ou par PCa (**Figure 31A**). Pour les gènes transcrits pour les quels une régulation était détectée, une validation par PCR quantitative classique était réalisée (**Figure 31B**). Ces résultats montrent que la PCa, seule, certes de manière nettement moins intense que le TNF- α , induit une augmentation transcriptionnelle significative pour E- Sel , ICAM-1 et aussi IL-8. Les autres données du profil de régulation des gènes induits par PCa n'ont pas encore été exploités plus finement.

III. D. 2) Régulation de VCAM-1 par PCa via les voies NF- κ B, et MAPk

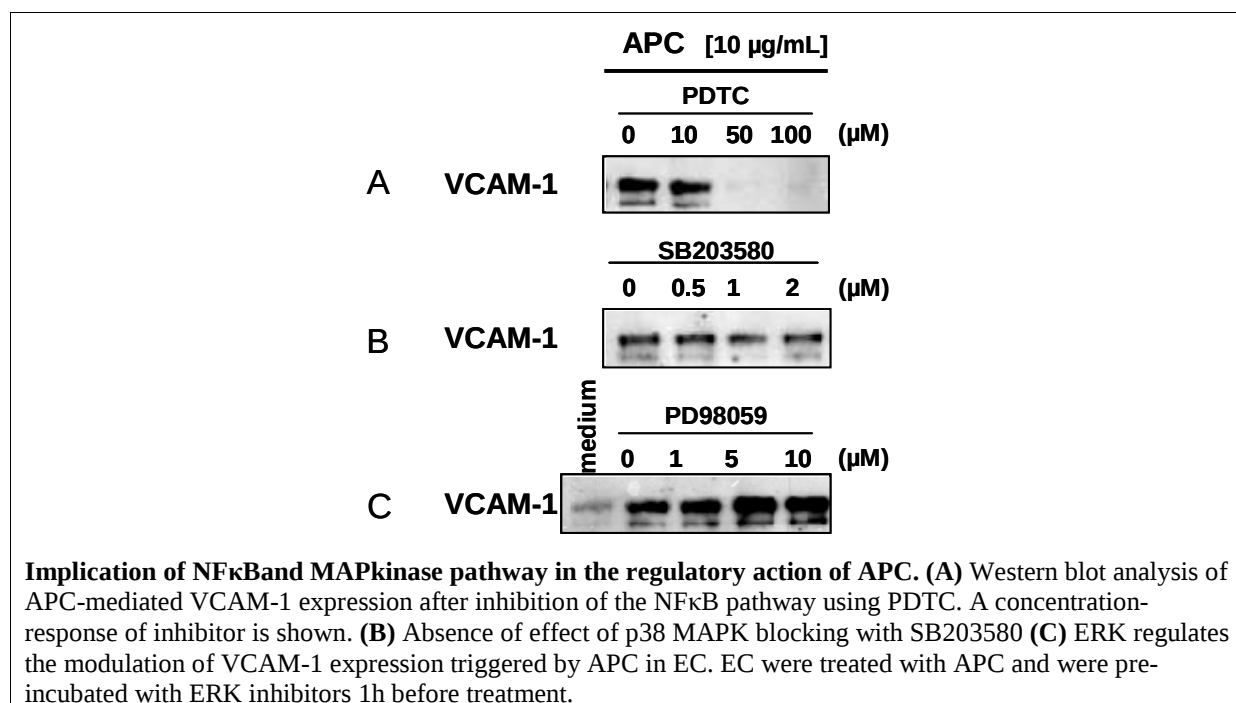


Figure 32 : Induction de VCAM-1 par PCa, Implication des voies MAP Kinases et NF- κ B

Au sujet du rôle des voies NF- κ B et ERK au cours de l'induction de VCAM-1 par la PCa décrites dans l'article (Figures 1 et 2 de l'article), la **Figure 32** complète les données. La démonstration est faite que la voie NF- κ B est primordiale dans cet effet, en utilisant le PDTC, inhibiteur spécifique de cette voie, qui éteint l'induction de VCAM-1 induite par la PCa (**Figure 32A**, rappel de la figure 4A).

Cet effet est indépendant d'une intervention de p38-MAP kinase, car un de ses inhibiteurs spécifiques, SB203580, reste sans effet (**Figure 32B**).

Par contre, la contribution de ERK 1/2 sur la régulation de VCAM-1 par la PCa est démontrée en utilisant des inhibiteurs spécifiques comme PD98059. Cet inhibiteur a pour effet d'augmenter l'induction de VCAM-1 par la PCa, la démonstration étant faite sur des analyses par FACS (Figure 7 de l'article). La **Figure 32C** confirme ces données par Western Blot.

Partie 6] DISCUSSION & PERSPECTIVES

Depuis près d'une vingtaine d'années, la prise en charge des patients avec un sepsis sévère est devenue un enjeu, un enjeu médical compte tenu de l'incidence de ce syndrome et sa gravité, et aussi un enjeu de recherche médicale et scientifique. Le système de la protéine C/Protéine C activée est un des centres d'intérêts majeurs dans ce domaine. En effet, l'activation de la coagulation a montré depuis longtemps son importance et son intrication avec les phénomènes inflammatoires liés au sepsis. Les systèmes anticoagulants, pour contre balancer cet état pro coagulant, ont été considérés dans les voies de recherche. Mais finalement, seul le système de la protéine C a montré des résultats cliniques encourageants pour améliorer la prise en charge des patients graves en choc septique.

De ce fait, les travaux sur l'axe PC/PCa se sont multipliés cette dernière décennie ; nous avons essayé d'y participer et de travailler dans 2 axes :

- Continuer d'explorer le système PC/PCa et ses acteurs
- Analyser les mécanismes d'actions (notamment cellulaires) de la PCa recombinée humaine disponible en thérapeutique, en dehors de ses effets anti coagulants.

I) EPCR : acteur et marqueur de l'inflammation

L'EPCR a montré qu'il était un acteur important dans la voie de la protéine C par son rôle de cofacteur d'activation . Il joue donc un rôle majeur pour l'anti coagulation mais aussi dans la protection contre le sepsis (Taylor, 2000; Taylor, 2001). Ce récepteur se caractérise par la présence concomitante d'une forme membranaire et d'une forme soluble circulante. Le rôle exact joué par cette protéine au cours du sepsis sévère reste toujours difficile à analyser. Les travaux sur la forme membranaire de l'EPCR et ses effets cyto protecteurs en association avec le récepteur PAR-1 semblent conforter sa place de médiateur de l'inflammation. Par contre, la compréhension du rôle exact de sa forme circulante au cours du sepsis est encore relativement pauvre.

Un des points qui permettra d'avancer est une meilleure compréhension de la régulation respective de ses 2 formes *in vivo*. Chez le malade en sepsis sévère, les données sont contradictoires et difficiles d'interprétation. A l'admission, (en général 24 heures au plus après la défaillance viscérale), les taux d'EPCR peuvent être augmentés (Kurosawa, 1998; Liaw, 2004), diminués (Borgel, 2007), ou à des niveaux similaires (Faust, 2001) par rapport à des volontaires sains. Notre série non plus, n'a pas mis en évidence de différence significative entre les patients septiques et les volontaires sains (*Intensive Care Medicine*, sous presse). Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer ces discordances. Tout d'abord, pour la plupart de ces travaux, nous ne disposons que de données ponctuelles, à l'admission. Le sepsis est un processus complexe dynamique, tout comme celui de la coagulation ou des cytokines, qui rend difficile les analyses à un temps donné.

De plus, les taux d'EPCR circulants, nos travaux l'ont montré ou confirmé, sont influencés au moins par le genre sexuel et l'haplotype A3. Les travaux à venir devront prendre en compte ces éléments de manière formelle pour analyser des cohortes de volontaires sains et/ou de malades.

Intérêt d'une étude cinétique :

Il semble plus intéressant d'analyser un processus dynamique durant quelques heures ou quelques jours à la phase initiale. D'ailleurs, cette approche est généralement usitée pour les grands essais cliniques sur le sepsis. Pour Prowess, les taux d'EPCR solubles n'étaient pas disponibles, ils le seront pour la nouvelle étude en cours sur la PCa recombinante dans le sepsis sévère (Prowess shock). Cette approche par analyse des cinétiques des taux d'EPCR pendant les 5 premiers jours du sepsis, pour notre cohorte, a permis de montrer que cette molécule soluble était très faiblement régulée et dépendait surtout des taux initiaux. Ces données ont été confirmées *in vitro*, avec des mesures d'EPCR solubles dans les surnageants qui semblent finalement peu influencées par l'activation endothéliale. Cette approche « cinétique » a permis de démontrer que par contre, les patients décédés avaient un profil particulier, avec une surexpression significative de l'EPCR au 2^{ème} jour. Ce taux mesuré à J2 ressortait comme un facteur indépendant, associé à un pronostic vital péjoratif au 28^{ème} jour.

Ces résultats nécessiteraient tout d'abord une confirmation sur une autre cohorte, de plus grande envergure. L'analyse du génotype et notamment de l'haplotype A3, non disponible dans notre série aurait permis une interprétation plus fine. Cependant ; l'analyse statistique telle qu'elle a été réalisée permettait de rechercher les facteurs influençant le niveau global de

la cinétique ainsi que l'allure (les variations) de la cinétique au fil des jours, et ce, indépendamment du taux initial (potentiellement influencé par l'haplotype). Enfin, une plus grande cohorte permettrait de juger de l'influence des thérapeutiques (entre autres la PCa) sur ces taux d'EPCR et les autres acteurs .

Ces résultats nécessitent également la poursuite des investigations biologiques plus profondes. En effet il semble utile d'approfondir les travaux de recherche sur cette phase de J1 à J2 qui permet, avec une bonne spécificité, de discerner les futurs survivants de ceux qui décèderont du sepsis. Il est ainsi envisagé sur la sérothèque constituée ou sur d'autres travaux, d'isoler ces patients avec cette cinétique particulière, et de tracer entre autres, des profils sériques inflammatoires.

Ce taux à J2, même s'il est bien significativement corrélé à la mortalité à J28, peut pour l'heure difficilement être utilisé comme un outil pronostique. D'abord, le dosage de l'EPCR n'est bien sûr pas disponible en routine. Ensuite c'est le dosage à J2 et la variation entre J1 et J2 qui sont discriminants. Or, l'intérêt d'un marqueur pronostique est sa précocité. Cette élévation à J2 doit plutôt être interprétée comme un marqueur de dysfonction endothéliale et mérite des explorations physiopathologiques complémentaires.

Intérêt d'une étude in vivo concomitante des formes membranaires et solubles

La régulation de l'EPCR soluble est complexe et n'est pas exclusivement liée au clivage par les métallo protéases. Nos travaux sur la cinétique le montrent, de façon surprenante, l'EPCR est faiblement régulée dans le sang. Mais qu'en est-il de la forme membranaire ? Pour l'instant, seul notre travail sur notre banque cellulaire analyse cette double régulation *in vitro* ainsi que les taux sanguins associés et confirme que la régulation des formes solubles est assez faible, par opposition aux formes membranaires significativement « sous régulées » par l'inflammation endothéliale. Cette régulation des formes membranaires et solubles de l'EPCR mérite d'être mieux explorée *in vivo*. A notre connaissance, seul une équipe a pour l'instant publié ce travail observationnel descriptif d'analyse de taux sanguins d'EPCR (entre autres) associés à des marquages immunohistochimiques de biopsies cutanées de zones purpuriques (**Figure 22**) pour des enfants atteints de méningococcémies (Faust, 2001). Les travaux à venir devront envisager une analyse plus fine concomitante des cinétiques des taux d'EPCR en même temps que des analyses des formes membranaires à la paroi des vaisseaux notamment.

Il semble que des travaux soient actuellement en cours. Le principe des biopsies cutanées est bien sur le plus aisé à obtenir pour ces malades septiques graves, poly pathologiques et présentant le plus souvent des troubles de la coagulation contre indiquant des biopsies profondes. Dans d'autres pathologies où l'inflammation et l'hémostase sont très liées et les biopsies tissulaires profondes (rénales...) fréquentes, comme la greffe rénale et son rejet, ou les maladies inflammatoires touchant le rein (lupus, Maladie de Wegener....), des analyses tissulaire seraient plus faciles à obtenir.

Enfin, le genre masculin semble influencer des taux de base d'EPCR solubles circulants plus élevés. Ces résultats sont confirmés sur nos cohortes de volontaires sains et de malades septiques. Cette différence semble cumulative avec celle induite par l'haplotype A3 et ne semble exister que *in vivo*. Ce point nécessite des explorations complémentaires pour expliquer les mécanismes qui influencent la corrélation entre le sexe et les taux circulants d'EPCR. De plus, ce point met en exergue la complexité de la régulation de l'EPCR, au niveau de la CE (régulation par clivage, régulation transcriptionnelle) et la possible régulation par d'autres types cellulaires.

Intérêt de la bio collection

L'équipe de recherche est à la tête d'une bio collection unique qui ne cesse de s'étoffer. En effet, dans cet institut qui fait référence dans le domaine de la transplantation rénale, le moment du don d'organe est l'occasion d'un prélèvement sanguin ainsi que d'un morceau de vaisseau de bon calibre (recoupe chirurgicale) pour la mise en culture des CE. Ceci permet donc pour chaque type cellulaire d'HAEC cultivé, de bénéficier d'un panel de données biologiques qui concernent l'expression protéique sanguine chez le donneur, l'accès au génome, ainsi que l'expression à la cellule endothéliale cultivée *in vitro*. De plus, pour une bonne partie de cette collection, on peut bénéficier du suivi (clinique et biologique) et de prélèvements sanguins pour le ou les receveurs. Il faut considérer que la cohorte de donneurs est une cohorte mélangée de volontaires « sains » avant le prélèvement d'organes, victime d'accidents circonstanciels et de patients « pathologiques » en particulier victimes d'accidents vasculaires cérébraux thrombo emboliques et/ou hémorragiques. Cette bio collection, qui concerne actuellement près de 100 types cellulaires, doit continuer d'être analysée et valorisée. Elle doit permettre de mettre en évidence d'éventuels autres marqueurs associés de

la dysfonction endothéliale et permettre aussi de mieux comprendre la régulation des protéines complexes comme l'EPCR.

Au total, l'EPCR est un acteur important du couple hémostasie/inflammation. Nos travaux ont montré qu'il pouvait être aussi un marqueur de la dysfonction endothéliale.

II) Analyse des mécanismes d'action de la PCa

Il existe maintenant de nombreux arguments pour penser que la PCa a des effets anti inflammatoires indépendants des effets anticoagulants.

Même si les travaux se multiplient, les mécanismes d'action cyto protecteurs de la PCa doivent encore mieux explicités.

De nombreux éléments restent contradictoires. Parmi ceux-ci, le rôle respectif et l'inter dépendance entre les récepteurs PAR et EPCR restent discutés (Bae, 2007; Rezaie, 2010). Nous avons montré que les effets de la PCa *in vitro* sur la CE endothéliale activée ou non, étaient des mécanismes complexes, qui font intervenir les principales voies de signalisation intercellulaires incluant les récepteurs PAR et les protéines G, les voies de signalisation induite par le TNF- α , les voies PI-3 kinases Akt, les voies MAP kinases (en particulier ERK 1/2) et la voie NF-kB. Pour la première fois, nous avons montré que la PCa induit un signal précoce d'induction de ERK 1/2 qui a un effet paradoxal anti inflammatoire lors de l'activation par le TNF- α faisant diminuer l'induction des molécules d'adhésion (VCAM-1). Dans nos travaux, ces effets étaient dépendants de PAR et EPCR.

Ces MAP kinases sont des voies de signalisations complexes, pleiotropiques, impliquées lors de l'activation PCa/PAR/EPCR dans l'inflammation mais aussi la migration, la prolifération, l'angiogénèse laissant présager d'autres centres d'intérêts possibles comme la cancérologie (Uchiba, 2004; Beaulieu, 2007).

Un autre point complexe qui doit encore être mieux investigué, est l'interaction thrombine/PCa. Du point de vue de l'anti coagulation, on sait que la thrombine active la PC, qui en contre régulation inhibe les cofacteurs de la coagulation FV et FVIII et donc diminue la

synthèse de thrombine. Cet effet indirect diminue une partie de l'effet pro inflammatoire induit par la thrombine elle-même.

Cependant, une bonne partie des effets pro inflammatoires de la thrombine sont initiés par la fixation et le clivage du récepteur PAR (en particulier PAR-1), le même qui peut être activé par la PCa. Il y a donc un effet paradoxal de ces 2 protéines sur le même récepteur, induisant des mécanismes de signalisation différents (Rezaie, 2010). Cet effet paradoxal sur le récepteur PAR est mal compris. La plupart des expériences *in vitro* publiées ou décrites (comme dans nos travaux) ont été réalisées avec une activation par le TNF- α ou le LPS et en absence de thrombine (voire sous Hirudine).

De plus, pour la plupart des travaux publiés sur les effets intra cellulaires de la PCa comme dans les nôtres, ces expériences *in vitro* sont réalisées avec des concentrations élevés, supra thérapeutiques de PCa recombinée (généralement de 0.5 à 50 μ g/ml) (Uchiba, 2004; Ludeman, 2005). Il est à rappeler que les taux mesurés dans « Prowess study », étaient en moyenne proches de 50 ng/ml, que 75% des patients avaient des taux inférieurs à 60 ng/ml (Macias, 2002). Ces taux *in vitro* permettent de démasquer et d'analyser les éventuels mécanismes d'action mais leur pertinence reste discutable.

III) Existe-t-il un avenir pour les traitements anti coagulants ?

Après les échecs des autres traitements anti coagulants dans le sepsis (AT-III , TFPI), la PCa recombinée humaine (Drotrecogin alpha, Xigris°, Lilly Eli) pour ses propriétés anti coagulantes, pro fibrinolytiques et anti inflammatoire avait montré une amélioration potentielle dans le pronostic vital au cours du choc septique. Même si ce n'est pas l'objet de ce travail d'analyser toutes ces données (Altaweel, 2009), ces résultats cliniques ont été controversés. Un des points de controverse est bien sur la pertinence des effets protecteurs face à l'importance des effets anti coagulants, et donc des incidents hémorragiques (Eichacker, 2007).

Actuellement, réalisée à la demande des autorités sanitaires et du médicament, se déroule une nouvelle étude contrôlée randomisée (Prowess-shock) pour des patients adultes sévères (choc septique avec au moins 2 défaillances viscérale). Cette étude devrait se terminer dans

les mois qui viennent après plus de 1000 inclusions. Cette étude sera extrêmement intéressante pour les analyses ancillaires qui sont prévues, pour mieux appréhender *in vivo* les mécanismes d'action de la PCa. Mais ce sont bien sur les résultats principaux de cette étude qui sont attendus, sur la balance bénéfice (amélioration de la survie ?) / risques (accidents hémorragiques ?). En cas de nouvel échec de cet essai thérapeutique, cela sonnerait probablement le glas de cette molécule quant à son utilisation en pratique courante dans le sepsis sévère.

Quels que soient les résultats de cet essai, il faudrait poursuivre ces travaux qui permettent de caractériser les effets cellulaires de la PCa, afin d'identifier d'éventuelles nouvelles cibles thérapeutiques peut-être plus fines et moins impliquées dans la coagulation.

Une autre voie de recherche est l'utilisation des protéines PCa sous forme de variants, dénuées des propriétés anti coagulantes mais qui préservent ses propriétés anti inflammatoires. Les études *in vitro* et animales montrent des résultats encourageants dans le choc endotoxinique (Mosnier, 2004; Kerschen, 2007; Mosnier, 2007).

IV) L'axe PCa/EPCR : Extension vers d'autres pathologies

Cette voie PCa/ EPCR/PAR est impliquée dans la plupart des pathologies où sont intriquées au sens large inflammation et activation de l'hémostase.

Une des pistes de travail envisagées concerne l'orage inflammatoire provoqué par le syndrome ischémie-reperfusion, locale ou général.

En effet, l'ischémie-reperfusion « localisée » est un problème majeur dans le cadre de la transplantation d'organe. Ce syndrome est alors à l'origine de phénomènes inflammatoires locaux très intriqués avec l'hémostase (Contreras, 2004; Turunen, 2005; Keven, 2010). Ce syndrome est aussi décrit pour le malade coronarien.

Quant au syndrome d'ischémie reperfusion « général », il concerne le plus souvent la prise en charge des suites d'un arrêt cardio-circulatoire ressuscité. Ce syndrome est à l'origine

d'un orage inflammatoire qui peut aboutir également à la défaillance multiviscérale. Cette pathologie intéresse de beaucoup les services de Réanimation et la recherche dans le domaine, par le nombre de patients concernés et par sa gravité. Des projets sont envisagés pour caractériser la dysfonction endothéliale et notamment l'EPCR dans cette pathologie

D'autres voies de recherche peuvent être envisagées, comme dans les pathologies inflammatoires type vascularite, telles que lupus (Kurosawa, 1998), maladie de Wegener (Boomsma, 2002), comme dans la maladie carcinologique (Bezuhly, 2009), comme dans la protection neuronale (Cheng, 2003) ou encore dans la néphropathie diabétique (Isermann, 2007).

CONCLUSION

Le nombre considérable des publications récentes en recherche clinique et/ou fondamentale sur la thématique de la protéine C activée et de son récepteur EPCR au cours de l'inflammation induite par le sepsis, montre l'importance de cette voie pour la compréhension physiopathologique ainsi que pour l'amélioration des thérapeutiques dans la prise en charge du sepsis sévère et du choc septique.

Ces travaux de thèse ont d'abord permis de mieux décrire la régulation des formes membranaires et solubles de l'EPCR.

Nous avons montré que la régulation des formes membranaires était peu liée à la régulation des formes solubles, et que le sexe masculin était un facteur important influençant (en plus de l'haplotype A3) les taux circulants d'EPCR.

Nous avons démontré que l'EPCR circulant à la phase initiale du choc septique était faiblement régulé, mais pouvait être un marqueur de mauvais pronostic lorsqu'une augmentation significative était notée au 2^{ème} jour de prise en charge.

Enfin, nos travaux sur les effets intra cellulaires de protéine C activée sur l'endothélium ont permis de mieux décrire les voies de signalisation induites. La protéine C activée a montré un effet protecteur quant à la synthèse des protéines d'adhésion (VCAM-1) induites par le TNF- α . Cet effet, dépendant de PAR-1 et EPCR, est induit par une activation précoce et paradoxale des MAP kinases (ERK1/2) et implique des réactions croisées entre les principales voies induites habituellement par le TNF- α (NF- κ B, Akt, MAP kinases).

TABLE DES REFERENCES

- Abraham E., Anzueto A., Gutierrez G., Tessler S., San Pedro G., Wunderink R., Dal Nogare A., Nasraway S., Berman S., Cooney R., Levy H., Baughman R., Rumbak M., Light R. B., Poole L., Allred R., Constant J., Pennington J. and Porter S. (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): 929-933.
- Abraham E., Glauser M. P., Butler T., Garbino J., Gelmont D., Laterre P. F., Kudsk K., Bruining H. A., Otto C., Tobin E., Zwingelstein C., Lesslauer W. and Leighton A. (1997). "*p55 Tumor necrosis factor receptor fusion protein in the treatment of patients with severe sepsis and septic shock. A randomized controlled multicenter trial. Ro 45-2081 Study Group.*" JAMA 277(19): 1531-1538.
- Abraham E., Laterre P. F., Garg R., Levy H., Talwar D., Trzaskoma B. L., Francois B., Guy J. S., Bruckmann M., Rea-Neto A., Rossaint R., Perrotin D., Sablotzki A., Arkins N., Utterback B. G. and Macias W. L. (2005). "*Drotrecogin alfa (activated) for adults with severe sepsis and a low risk of death.*" N Engl J Med 353(13): 1332-1341.
- Abraham E., Reinhart K., Opal S., Demeyer I., Doig C., Rodriguez A. L., Beale R., Svoboda P., Laterre P. F., Simon S., Light B., Spapen H., Stone J., Seibert A., Peckelsen C., De Deyne C., Postier R., Pettila V., Artigas A., Percell S. R., Shu V., Zwingelstein C., Tobias J., Poole L., Stolzenbach J. C. and Creasey A. A. (2003). "*Efficacy and safety of tifacogin (recombinant tissue factor pathway inhibitor) in severe sepsis: a randomized controlled trial.*" JAMA 290(2): 238-247.
- Abraham E., Wunderink R., Silverman H., Perl T. M., Nasraway S., Levy H., Bone R., Wenzel R. P., Balk R., Allred R. and 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): 934-941.
- Adrie C., Alberti C., Chaix-Couturier C., Azoulay E., De Lassence A., Cohen Y., Meshaka P., Cheval C., Thuong M., Troche G., Garrouste-Orgeas M. and Timsit J. F. (2005). "*Epidemiology and economic evaluation of severe sepsis in France: age, severity, infection site, and place of acquisition (community, hospital, or intensive care unit) as determinants of workload and cost.*" J Crit Care 20(1): 46-58.
- Adrie C., Azoulay E., Francais A., Clec'h C., Darques L., Schwebel C., Nakache D., Jamali S., Goldgran-Toledano D., Garrouste-Orgeas M. and Timsit J. F. (2007). "*Influence of gender on the outcome of severe sepsis: a reappraisal.*" Chest 132(6): 1786-1793.
- Aird W. C. (2003). "*Endothelial cell heterogeneity.*" Crit Care Med 31(4 Suppl): S221-230.
- Aird W. C. (2005). "*Spatial and temporal dynamics of the endothelium.*" J Thromb Haemost 3(7): 1392-1406.

- Aird W. C. (2007). "*Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms.*" Circ Res 100(2): 158-173.
- Aird W. C. (2007). "*Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds.*" Circ Res 100(2): 174-190.
- Ait-Oufella H., Maury E., Lehoux S., Guidet B. and Offenstadt G. (2010). "*The endothelium: physiological functions and role in microcirculatory failure during severe sepsis.*" Intensive Care Med 36(8): 1286-1298.
- Alberio L., Lammle B. and Esmon C. T. (2001). "*Protein C replacement in severe meningococemia: rationale and clinical experience.*" Clin Infect Dis 32(9): 1338-1346.
- Alberti C., Brun-Buisson C., Chevret S., Antonelli M., Goodman S. V., Martin C., Moreno R., Ochagavia A. R., Palazzo M., Werdan K. and Le Gall J. R. (2005). "*Systemic inflammatory response and progression to severe sepsis in critically ill infected patients.*" Am J Respir Crit Care Med 171(5): 461-468.
- Altaweel L., Sweeney D., Cui X., Barochia A., Natanson C. and Eichacker P. Q. (2009). "*Growing insights into the potential benefits and risks of activated protein C administration in sepsis: a review of preclinical and clinical studies.*" Biologics 3: 391-406.
- Angus D. C., Birmingham M. C., Balk R. A., Scannon P. J., Collins D., Kruse J. A., Graham D. R., Dedhia H. V., Homann S. and MacIntyre N. (2000). "*E5 murine monoclonal antiendotoxin antibody in gram-negative sepsis: a randomized controlled trial. E5 Study Investigators.*" JAMA 283(13): 1723-1730.
- Angus D. C., Linde-Zwirble W. T., Lidicker J., Clermont G., Carcillo J. and Pinsky M. R. (2001). "*Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care.*" Crit Care Med 29(7): 1303-1310.
- Annane D., Aegerter P., Jars-Guincestre M. C. and Guidet B. (2003). "*Current epidemiology of septic shock: the CUB-Rea Network.*" Am J Respir Crit Care Med 168(2): 165-172.
- Annane D., Bellissant E. and Cavaillon J. M. (2005). "*Septic shock.*" Lancet 365(9453): 63-78.
- Annane D., Sebille V., Charpentier C., Bollaert P. E., Francois B., Korach J. M., Capellier G., Cohen Y., Azoulay E., Troche G., Chaumet-Riffaud P. and Bellissant E. (2002). "*Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock.*" JAMA 288(7): 862-871.
- Auerbach R., Alby L., Morrissey L. W., Tu M. and Joseph J. (1985). "*Expression of organ-specific antigens on capillary endothelial cells.*" Microvasc Res 29(3): 401-411.
- Bae J. S., Yang L. and Rezaie A. R. (2007). "*Receptors of the protein C activation and activated protein C signaling pathways are colocalized in lipid rafts of endothelial cells.*" Proc Natl Acad Sci U S A 104(8): 2867-2872.

- Balazs A. B., Fabian A. J., Esmon C. T. and Mulligan R. C. (2006). "*Endothelial protein C receptor (CD201) explicitly identifies hematopoietic stem cells in murine bone marrow.*" Blood 107(6): 2317-2321.
- Bangalore N., Drohan W. N. and Orthner C. L. (1994). "*High affinity binding sites for activated protein C and protein C on cultured human umbilical vein endothelial cells. Independent of protein S and distinct from known ligands.*" Thromb Haemost 72(3): 465-474.
- Beaulieu L. M. and Church F. C. (2007). "*Activated protein C promotes breast cancer cell migration through interactions with EPCR and PAR-1.*" Exp Cell Res 313(4): 677-687.
- Bernard G. R., Ely E. W., Wright T. J., Fraiz J., Stasek J. E., Jr., Russell J. A., Mayers I., Rosenfeld B. A., Morris P. E., Yan S. B. and Helterbrand J. D. (2001). "*Safety and dose relationship of recombinant human activated protein C for coagulopathy in severe sepsis.*" Crit Care Med 29(11): 2051-2059.
- Bernard G. R., Vincent J. L., Laterre P. F., LaRosa S. P., Dhainaut J. F., Lopez-Rodriguez A., Steingrub J. S., Garber G. E., Helterbrand J. D., Ely E. W. and Fisher C. J., Jr. (2001). "*Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis.*" N Engl J Med 344(10): 699-709.
- Bezuhly M., Cullen R., Esmon C. T., Morris S. F., West K. A., Johnston B. and Liwski R. S. (2009). "*Role of activated protein C and its receptor in inhibition of tumor metastasis.*" Blood 113(14): 3371-3374.
- Bilbault P., Lavaux T., Launoy A., Gaub M. P., Meyer N., Oudet P., Pottecher T., Jaeger A. and Schneider F. (2007). "*Influence of drotrecogin alpha (activated) infusion on the variation of Bax/Bcl-2 and Bax/Bcl-xl ratios in circulating mononuclear cells: a cohort study in septic shock patients.*" Crit Care Med 35(1): 69-75.
- Bombeli T., Karsan A., Tait J. F. and Harlan J. M. (1997). "*Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant.*" Blood 89(7): 2429-2442.
- Bombeli T., Mueller M. and Haeberli A. (1997). "*Anticoagulant properties of the vascular endothelium.*" Thromb Haemost 77(3): 408-423.
- Bone R. C., Balk R. A., Cerra F. B., Dellinger R. P., Fein A. M., Knaus W. A., Schein R. M. and Sibbald W. J. (1992). "*Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine.*" Chest 101(6): 1644-1655.
- Bonizzi G. and Karin M. (2004). "*The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity.*" Trends Immunol 25(6): 280-288.
- Boomsma M. M., Stearns-Kurosawa D. J., Stegeman C. A., Raschi E., Meroni P. L., Kurosawa S. and Tervaert J. W. (2002). "*Plasma levels of soluble endothelial cell protein C receptor in patients with Wegener's granulomatosis.*" Clin Exp Immunol 128(1): 187-194.

- Borgel D., Bornstain C., Reitsma P. H., Lerolle N., Gandrille S., Dali-Ali F., Esmon C. T., Fagon J. Y., Aiach M. and Diehl J. L. (2007). "A comparative study of the protein C pathway in septic and nonseptic patients with organ failure." Am J Respir Crit Care Med 176(9): 878-885.
- Borgel D. and Diehl J. L. (2005). "Mécanismes de l'activation de la coagulation dans le sepsis : rôle du système de la protéine C." Hématologie 11(2): 139-147.
- Bretschneider E., Uzonyi B., Weber A. A., Fischer J. W., Pape R., Lotzer K. and Schror K. (2007). "Human vascular smooth muscle cells express functionally active endothelial cell protein C receptor." Circ Res 100(2): 255-262.
- Brueckmann M., Hoffmann U., De Rossi L., Weiler H. M., Liebe V., Lang S., Kaden J. J., Borggreffe M., Haase K. K. and Huhle G. (2004). "Activated protein C inhibits the release of macrophage inflammatory protein-1-alpha from THP-1 cells and from human monocytes." Cytokine 26(3): 106-113.
- Brun-Buisson C., Meshaka P., Pinton P. and Vallet B. (2004). "EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units." Intensive Care Med 30(4): 580-588.
- Brunkhorst F., Sakr Y., Hagel S. and Reinhart K. (2007). "Protein C concentrations correlate with organ dysfunction and predict outcome independent of the presence of sepsis." Anesthesiology 107(1): 15-23.
- Busse R. and Fleming I. (2006). "Vascular endothelium and blood flow." Handb Exp Pharmacol(176 Pt 2): 43-78.
- Carmeliet P. (2005). "Angiogenesis in life, disease and medicine." Nature 438(7070): 932-936.
- Chen L. F. and Greene W. C. (2004). "Shaping the nuclear action of NF-kappaB." Nat Rev Mol Cell Biol 5(5): 392-401.
- Cheng T., Liu D., Griffin J. H., Fernandez J. A., Castellino F., Rosen E. D., Fukudome K. and Zlokovic B. V. (2003). "Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective." Nat Med 9(3): 338-342.
- Coupel S., Leboeuf F., Boulday G., Souillou J. P. and Charreau B. (2004). "RhoA activation mediates phosphatidylinositol 3-kinase-dependent proliferation of human vascular endothelial cells: an alloimmune mechanism of chronic allograft nephropathy." J Am Soc Nephrol 15(9): 2429-2439.
- De Backer D., Verdant C., Chierago M., Koch M., Gullo A. and Vincent J. L. (2006). "Effects of drotrecogin alfa activated on microcirculatory alterations in patients with severe sepsis." Crit Care Med 34(7): 1918-1924.
- Dhainaut J. F., Yan S. B., Margolis B. D., Lorente J. A., Russell J. A., Freebairn R. C., Spapen H. D., Riess H., Basson B., Johnson G., 3rd and Kinasewitz G. T. (2003).

"Drotrecogin alfa (activated) (recombinant human activated protein C) reduces host coagulopathy response in patients with severe sepsis." Thromb Haemost 90(4): 642-653.

Domotor E., Benzakour O., Griffin J. H., Yule D., Fukudome K. and Zlokovic B. V. (2003). *"Activated protein C alters cytosolic calcium flux in human brain endothelium via binding to endothelial protein C receptor and activation of protease activated receptor-1."* Blood 101(12): 4797-4801.

Eichacker P. Q. and Natanson C. (2007). *"Increasing evidence that the risks of rhAPC may outweigh its benefits."* Intensive Care Med 33(3): 396-399.

Elphick G. F., Sarangi P. P., Hyun Y. M., Hollenbaugh J. A., Ayala A., Biffl W. L., Chung H. L., Rezaie A. R., McGrath J. L., Topham D. J., Reichner J. S. and Kim M. (2009). *"Recombinant human activated protein C inhibits integrin-mediated neutrophil migration."* Blood 113(17): 4078-4085.

Esmon C. (2000). *"The protein C pathway."* Crit Care Med 28(9 Suppl): S44-48.

Esmon C. T. (2002). *"Protein C pathway in sepsis."* Ann Med 34(7-8): 598-605.

Esmon C. T. (2010). *"The discovery of the endothelial cell protein C receptor."* J Thromb Haemost 8(1): 2-5.

Esmon C. T., Fukudome K., Mather T., Bode W., Regan L. M., Stearns-Kurosawa D. J. and Kurosawa S. (1999). *"Inflammation, sepsis, and coagulation."* Haematologica 84(3): 254-259.

Faioni E. M., Ferrero S., Fontana G., Gianelli U., Ciulla M. M., Vecchi M., Saibeni S., Biguzzi E., Cordani N., Franchi F., Bosari S. and Cattaneo M. (2004). *"Expression of endothelial protein C receptor and thrombomodulin in the intestinal tissue of patients with inflammatory bowel disease."* Crit Care Med 32(5 Suppl): S266-270.

Faust S. N., Levin M., Harrison O. B., Goldin R. D., Lockhart M. S., Kondaveeti S., Laszik Z., Esmon C. T. and Heyderman R. S. (2001). *"Dysfunction of endothelial protein C activation in severe meningococcal sepsis."* N Engl J Med 345(6): 408-416.

Favory R., Lancel S., Marechal X., Tissier S. and Neviere R. (2006). *"Cardiovascular protective role for activated protein C during endotoxemia in rats."* Intensive Care Med 32(6): 899-905.

Feistritzer C. and Riewald M. (2005). *"Endothelial barrier protection by activated protein C through PAR1-dependent sphingosine 1-phosphate receptor-1 crossactivation."* Blood 105(8): 3178-3184.

Feistritzer C., Schuepbach R. A., Mosnier L. O., Bush L. A., Di Cera E., Griffin J. H. and Riewald M. (2006). *"Protective signaling by activated protein C is mechanistically linked to protein C activation on endothelial cells."* J Biol Chem 281(29): 20077-20084.

- Finigan J. H., Dudek S. M., Singleton P. A., Chiang E. T., Jacobson J. R., Camp S. M., Ye S. Q. and Garcia J. G. (2005). "*Activated protein C mediates novel lung endothelial barrier enhancement: role of sphingosine 1-phosphate receptor transactivation.*" J Biol Chem 280(17): 17286-17293.
- Fisher C. J., Jr., Agosti J. M., Opal S. M., Lowry S. F., Balk R. A., Sadoff J. C., Abraham E., Schein R. M. and Benjamin E. (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): 1697-1702.
- Fisher C. J., Jr. and Yan S. B. (2000). "*Protein C levels as a prognostic indicator of outcome in sepsis and related diseases.*" Crit Care Med 28(9 Suppl): S49-56.
- Fourrier F., Chopin C., Goudemand J., Hendrycx S., Caron C., Rime A., Marey A. and Lestavel P. (1992). "*Septic shock, multiple organ failure, and disseminated intravascular coagulation. Compared patterns of antithrombin III, protein C, and protein S deficiencies.*" Chest 101(3): 816-823.
- Fourrier F., Chopin C., Huart J. J., Runge I., Caron C. and Goudemand J. (1993). "*Double-blind, placebo-controlled trial of antithrombin III concentrates in septic shock with disseminated intravascular coagulation.*" Chest 104(3): 882-888.
- Fukudome K. and Esmon C. T. (1994). "*Identification, cloning, and regulation of a novel endothelial cell protein C/activated protein C receptor.*" J Biol Chem 269(42): 26486-26491.
- Fukudome K. and Esmon C. T. (1995). "*Molecular cloning and expression of murine and bovine endothelial cell protein C/activated protein C receptor (EPCR). The structural and functional conservation in human, bovine, and murine EPCR.*" J Biol Chem 270(10): 5571-5577.
- Furchgott R. F. and Zawadzki J. V. (1980). "*The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.*" Nature 288(5789): 373-376.
- Galligan L., Livingstone W., Volkov Y., Hokamp K., Murphy C., Lawler M., Fukudome K. and Smith O. (2001). "*Characterization of protein C receptor expression in monocytes.*" Br J Haematol 115(2): 408-414.
- Gandrille S. (2008). "*Endothelial cell protein C receptor and the risk of venous thrombosis.*" Haematologica 93(6): 812-816.
- Ghosh S., Pendurthi U. R., Steinoe A., Esmon C. T. and Rao L. V. (2007). "*Endothelial cell protein C receptor acts as a cellular receptor for factor VIIa on endothelium.*" J Biol Chem 282(16): 11849-11857.
- Green D. R. (2005). "*Apoptotic pathways: ten minutes to dead.*" Cell 121(5): 671-674.
- Griffin J. H., Evatt B., Zimmerman T. S., Kleiss A. J. and Wideman C. (1981). "*Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease.*" J Clin Invest 68(5): 1370-1373.

- Griffin J. H., Fernandez J. A., Gale A. J. and Mosnier L. O. (2007). "Activated protein C." J Thromb Haemost 5 Suppl 1: 73-80.
- Grinnell B. W., Hermann R. B. and Yan S. B. (1994). "Human protein C inhibits selectin-mediated cell adhesion: role of unique fucosylated oligosaccharide." Glycobiology 4(2): 221-225.
- Gu J. M., Katsuura Y., Ferrell G. L., Grammas P. and Esmon C. T. (2000). "Endotoxin and thrombin elevate rodent endothelial cell protein C receptor mRNA levels and increase receptor shedding in vivo." Blood 95(5): 1687-1693.
- Guo H., Liu D., Gelbard H., Cheng T., Insalaco R., Fernandez J. A., Griffin J. H. and Zlokovic B. V. (2004). "Activated protein C prevents neuronal apoptosis via protease activated receptors 1 and 3." Neuron 41(4): 563-572.
- Ireland H., Konstantoulas C. J., Cooper J. A., Hawe E., Humphries S. E., Mather H., Goodall A. H., Hogwood J., Juhan-Vague I., Yudkin J. S., di Minno G., Margaglione M., Hamsten A., Miller G. J., Bauer K. A., Kim Y. T., Stearns-Kurosawa D. J. and Kurosawa S. (2005). "EPCR Ser219Gly: elevated sEPCR, prothrombin F1+2, risk for coronary heart disease, and increased sEPCR shedding in vitro." Atherosclerosis 183(2): 283-292.
- Isermann B., Vinnikov I. A., Madhusudhan T., Herzog S., Kashif M., Blautzik J., Corat M. A., Zeier M., Blessing E., Oh J., Gerlitz B., Berg D. T., Grinnell B. W., Chavakis T., Esmon C. T., Weiler H., Bierhaus A. and Nawroth P. P. (2007). "Activated protein C protects against diabetic nephropathy by inhibiting endothelial and podocyte apoptosis." Nat Med 13(11): 1349-1358.
- Iwaki T., Cruz D. T., Martin J. A. and Castellino F. J. (2005). "A cardioprotective role for the endothelial protein C receptor in lipopolysaccharide-induced endotoxemia in the mouse." Blood 105(6): 2364-2371.
- Jaffe E. A., Nachman R. L., Becker C. G. and Minick C. R. (1973). "Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria." J Clin Invest 52(11): 2745-2756.
- Joyce D. E., Gelbert L., Ciaccia A., DeHoff B. and Grinnell B. W. (2001). "Gene expression profile of antithrombotic protein c defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis." J Biol Chem 276(14): 11199-11203.
- Joyce D. E. and Grinnell B. W. (2002). "Recombinant human activated protein C attenuates the inflammatory response in endothelium and monocytes by modulating nuclear factor-kappaB." Crit Care Med 30(5 Suppl): S288-293.
- Joyce D. E., Nelson D. R. and Grinnell B. W. (2004). "Leukocyte and endothelial cell interactions in sepsis: relevance of the protein C pathway." Crit Care Med 32(5 Suppl): S280-286.

- Keven K., Elmaci S., Sengul S., Akar N., Egin Y., Genc V., Erturk S. and Erbay B. (2010). "Soluble endothelial cell protein C receptor and thrombomodulin levels after renal transplantation." Int Urol Nephrol 42(4): 1093-1098.
- Kurosawa S., Esmon C. T. and Stearns-Kurosawa D. J. (2000). "The soluble endothelial protein C receptor binds to activated neutrophils: involvement of proteinase-3 and CD11b/CD18." J Immunol 165(8): 4697-4703.
- Kurosawa S., Stearns-Kurosawa D. J., Carson C. W., D'Angelo A., Della Valle P. and Esmon C. T. (1998). "Plasma levels of endothelial cell protein C receptor are elevated in patients with sepsis and systemic lupus erythematosus: lack of correlation with thrombomodulin suggests involvement of different pathological processes." Blood 91(2): 725-727.
- Kurosawa S., Stearns-Kurosawa D. J., Hidari N. and Esmon C. T. (1997). "Identification of functional endothelial protein C receptor in human plasma." J Clin Invest 100(2): 411-418.
- Laszik Z., Mitro A., Taylor F. B., Jr., Ferrell G. and Esmon C. T. (1997). "Human protein C receptor is present primarily on endothelium of large blood vessels: implications for the control of the protein C pathway." Circulation 96(10): 3633-3640.
- Lavigne-Lissalde G., Cochery-Nouvellon E., Mercier E., Mares P. and Gris J. C. (2005). "High plasma levels of endothelial protein C receptor are associated with the risk of unexplained fetal death." J Thromb Haemost 3(2): 393-395.
- Le Bas-Bernardet S., Hourmant M., Coupel S., Bignon J. D., Souillou J. P. and Charreau B. (2003). "Non-HLA-type endothelial cell reactive alloantibodies in pre-transplant sera of kidney recipients trigger apoptosis." Am J Transplant 3(2): 167-177.
- Levi M., van der Poll T., ten Cate H. and van Deventer S. J. (1997). "The cytokine-mediated imbalance between coagulant and anticoagulant mechanisms in sepsis and endotoxaemia." Eur J Clin Invest 27(1): 3-9.
- Levy M. M., Fink M. P., Marshall J. C., Abraham E., Angus D., Cook D., Cohen J., Opal S. M., Vincent J. L. and Ramsay G. (2003). "2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference." Crit Care Med 31(4): 1250-1256.
- Ley K., Laudanna C., Cybulsky M. I. and Nourshargh S. (2007). "Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated." Nat Rev Immunol 7(9): 678-689.
- Liaw P. C., Esmon C. T., Kahnamoui K., Schmidt S., Kahnamoui S., Ferrell G., Beaudin S., Julian J. A., Weitz J. I., Crowther M., Loeb M. and Cook D. (2004). "Patients with severe sepsis vary markedly in their ability to generate activated protein C." Blood 104(13): 3958-3964.
- Liaw P. C., Neuenschwander P. F., Smirnov M. D. and Esmon C. T. (2000). "Mechanisms by which soluble endothelial cell protein C receptor modulates protein C and activated protein C function." J Biol Chem 275(8): 5447-5452.

- Liu D., Cheng T., Guo H., Fernandez J. A., Griffin J. H., Song X. and Zlokovic B. V. (2004). "Tissue plasminogen activator neurovascular toxicity is controlled by activated protein C." Nat Med 10(12): 1379-1383.
- Ludeman M. J., Kataoka H., Srinivasan Y., Esmon N., Esmon C. T. and Coughlin S. R. (2005). "PAR1 cleavage and signaling in response to activated protein C and thrombin." J Biol Chem.
- Mackman N. (2004). "Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development." Arterioscler Thromb Vasc Biol 24(6): 1015-1022.
- Marlar R. A., Kleiss A. J. and Griffin J. H. (1981). "Human protein C: inactivation of factors V and VIII in plasma by the activated molecule." Ann N Y Acad Sci 370: 303-310.
- Martin G. S., Mannino D. M., Eaton S. and Moss M. (2003). "The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000." N Engl J Med 348(16): 1546-1554.
- McCloskey R. V., Straube R. C., Sanders C., Smith S. M. and Smith C. R. (1994). "Treatment of septic shock with human monoclonal antibody HA-1A. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. CHESS Trial Study Group." Ann Intern Med 121(1): 1-5.
- McVerry B. J. and Garcia J. G. (2004). "Endothelial cell barrier regulation by sphingosine 1-phosphate." J Cell Biochem 92(6): 1075-1085.
- Meziani F., Delabranche X., Asfar P. and Toti F. (2010). "Bench-to-bedside review: circulating microparticles--a new player in sepsis?" Crit Care 14(5): 236.
- Mira J. P., Cariou A., Grall F., Delclaux C., Losser M. R., Heshmati F., Cheval C., Monchi M., Teboul J. L., Riche F., Leleu G., Arbibe L., Mignon A., Delpech M. and Dhainaut J. F. (1999). "Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study." JAMA 282(6): 561-568.
- Monaco C., Andreaskos E., Kiriakidis S., Feldmann M. and Paleolog E. (2004). "T-cell-mediated signalling in immune, inflammatory and angiogenic processes: the cascade of events leading to inflammatory diseases." Curr Drug Targets Inflamm Allergy 3(1): 35-42.
- Mosnier L. O. and Griffin J. H. (2003). "Inhibition of staurosporine-induced apoptosis of endothelial cells by activated protein C requires protease-activated receptor-1 and endothelial cell protein C receptor." Biochem J 373(Pt 1): 65-70.
- Mosnier L. O., Yang X. V. and Griffin J. H. (2007). "Activated protein C mutant with minimal anticoagulant activity, normal cytoprotective activity, and preservation of thrombin activable fibrinolysis inhibitor-dependent cytoprotective functions." J Biol Chem 282(45): 33022-33033.
- Mosnier L. O., Zlokovic B. V. and Griffin J. H. (2007). "The cytoprotective protein C pathway." Blood 109(8): 3161-3172.

- Murakami K., Okajima K., Uchiba M., Johno M., Nakagaki T., Okabe H. and Takatsuki K. (1996). "*Activated protein C attenuates endotoxin-induced pulmonary vascular injury by inhibiting activated leukocytes in rats.*" Blood 87(2): 642-647.
- Nadel S., Goldstein B., Williams M. D., Dalton H., Peters M., Macias W. L., Abd-Allah S. A., Levy H., Angle R., Wang D., Sundin D. P. and Giroir B. (2007). "*Drotrecogin alfa (activated) in children with severe sepsis: a multicentre phase III randomised controlled trial.*" Lancet 369(9564): 836-843.
- Nan B., Lin P., Lumsden A. B., Yao Q. and Chen C. (2005). "*Effects of TNF-alpha and curcumin on the expression of thrombomodulin and endothelial protein C receptor in human endothelial cells.*" Thromb Res 115(5): 417-426.
- Nayak R. C., Sen P., Ghosh S., Gopalakrishnan R., Esmon C. T., Pendurthi U. R. and Rao L. V. (2009). "*Endothelial cell protein C receptor cellular localization and trafficking: potential functional implications.*" Blood 114(9): 1974-1986.
- Nick J. A., Coldren C. D., Geraci M. W., Poch K. R., Fouty B. W., O'Brien J., Gruber M., Zarini S., Murphy R. C., Kuhn K., Richter D., Kast K. R. and Abraham E. (2004). "*Recombinant human activated protein C reduces human endotoxin-induced pulmonary inflammation via inhibition of neutrophil chemotaxis.*" Blood 104(13): 3878-3885.
- Oganesyan V., Oganesyan N., Terzyan S., Qu D., Dauter Z., Esmon N. L. and Esmon C. T. (2002). "*The crystal structure of the endothelial protein C receptor and a bound phospholipid.*" J Biol Chem 277(28): 24851-24854.
- Opal S. M. and Esmon C. T. (2003). "*Bench-to-bedside review: functional relationships between coagulation and the innate immune response and their respective roles in the pathogenesis of sepsis.*" Crit Care 7(1): 23-38.
- Opal S. M., Fisher C. J., Jr., Dhainaut J. F., Vincent J. L., Brase R., Lowry S. F., Sadoff J. C., Slotman G. J., Levy H., Balk R. A., Shelly M. P., Pribble J. P., LaBrecque J. F., Lookabaugh J., Donovan H., Dubin H., Baughman R., Norman J., DeMaria E., Matzel K., Abraham E. and Seneff M. (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): 1115-1124.
- Perez-Casal M., Downey C., Fukudome K., Marx G. and Toh C. H. (2005). "*Activated protein C induces the release of microparticle-associated endothelial protein C receptor.*" Blood 105(4): 1515-1522.
- Pober J. S. and Cotran R. S. (1990). "*The role of endothelial cells in inflammation.*" Transplantation 50(4): 537-544.
- Pober J. S. and Sessa W. C. (2007). "*Evolving functions of endothelial cells in inflammation.*" Nat Rev Immunol 7(10): 803-815.

- Pralong G., Calandra T., Glauser M. P., Schellekens J., Verhoef J., Bachmann F. and Kruithof E. K. (1989). "*Plasminogen activator inhibitor 1: a new prognostic marker in septic shock.*" Thromb Haemost 61(3): 459-462.
- Preiser J. C., Devos P., Ruiz-Santana S., Melot C., Annane D., Groeneveld J., Iapichino G., Leverve X., Nitenberg G., Singer P., Wernerman J., Joannidis M., Stecher A. and Chiolerio R. (2009). "*A prospective randomised multi-centre controlled trial on tight glucose control by intensive insulin therapy in adult intensive care units: the Glucontrol study.*" Intensive Care Med 35(10): 1738-1748.
- Preston R. J., Villegas-Mendez A., Sun Y. H., Hermida J., Simioni P., Philippou H., Dahlback B. and Lane D. A. (2005). "*Selective modulation of protein C affinity for EPCR and phospholipids by Gla domain mutation.*" Febs J 272(1): 97-108.
- Qu D., Wang Y., Esmon N. L. and Esmon C. T. (2007). "*Regulated endothelial protein C receptor shedding is mediated by tumor necrosis factor-alpha converting enzyme/ADAM17.*" J Thromb Haemost 5(2): 395-402.
- Qu D., Wang Y., Song Y., Esmon N. L. and Esmon C. T. (2006). "*The Ser219-->Gly dimorphism of the endothelial protein C receptor contributes to the higher soluble protein levels observed in individuals with the A3 haplotype.*" J Thromb Haemost 4(1): 229-235.
- Regan L. M., Mollica J. S., Rezaie A. R. and Esmon C. T. (1997). "*The interaction between the endothelial cell protein C receptor and protein C is dictated by the gamma-carboxyglutamic acid domain of protein C.*" J Biol Chem 272(42): 26279-26284.
- Regan L. M., Stearns-Kurosawa D. J., Kurosawa S., Mollica J., Fukudome K. and Esmon C. T. (1996). "*The endothelial cell protein C receptor. Inhibition of activated protein C anticoagulant function without modulation of reaction with proteinase inhibitors.*" J Biol Chem 271(29): 17499-17503.
- Reitsma S., Slaaf D. W., Vink H., van Zandvoort M. A. and oude Egbrink M. G. (2007). "*The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization.*" Pflugers Arch 454(3): 345-359.
- Rezaie A. R. (2010). "*Regulation of the protein C anticoagulant and antiinflammatory pathways.*" Curr Med Chem 17(19): 2059-2069.
- Riewald M., Petrovan R. J., Donner A., Mueller B. M. and Ruf W. (2002). "*Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway.*" Science 296(5574): 1880-1882.
- Riewald M. and Ruf W. (2005). "*Protease-activated receptor-1 signaling by activated protein C in cytokine-perturbed endothelial cells is distinct from thrombin signaling.*" J Biol Chem 280(20): 19808-19814.
- Risau W. and Flamme I. (1995). "*Vasculogenesis.*" Annu Rev Cell Dev Biol 11: 73-91.

- Ruf W. (2004). "Protease-activated receptor signaling in the regulation of inflammation." Crit Care Med 32(5 Suppl): S287-292.
- Russell J. A. (2006). "Management of sepsis." N Engl J Med 355(16): 1699-1713.
- Sapoznik B., Lesteven E., Lokajczyk A., Esmon C. T., Aiach M. and Gandrille S. (2008). "Alternative mRNA is favored by the A3 haplotype of the EPCR gene PROCRA and generates a novel soluble form of EPCR in plasma." Blood 111(7): 3442-3451.
- Sapoznik B., Reny J. L., Gaussem P., Emmerich J., Aiach M. and Gandrille S. (2004). "A haplotype of the EPCR gene is associated with increased plasma levels of sEPCR and is a candidate risk factor for thrombosis." Blood 103(4): 1311-1318.
- Sennoun N., Baron-Menguy C., Burban M., Lecompte T., Andriantsitohaina R., Henrion D., Mercat A., Asfar P., Levy B. and Meziani F. (2009). "Recombinant human activated protein C improves endotoxemia-induced endothelial dysfunction: a blood-free model in isolated mouse arteries." Am J Physiol Heart Circ Physiol 297(1): H277-282.
- Sennoun N., Meziani F., Dessebe O., Cattan V., Collin S., Montemont C., Gibot S., Asfar P., Ramaroson A., Regnault V., Slama M., Lecompte T., Lacolley P. and Levy B. (2009). "Activated protein C improves lipopolysaccharide-induced cardiovascular dysfunction by decreasing tissular inflammation and oxidative stress." Crit Care Med 37(1): 246-255.
- Shiao S. L., McNiff J. M. and Pober J. S. (2005). "Memory T cells and their costimulators in human allograft injury." J Immunol 175(8): 4886-4896.
- Simioni P., Morboeuf O., Tognin G., Gavasso S., Tormene D., Woodhams B. and Pagnan A. (2006). "Soluble endothelial protein C receptor (sEPCR) levels and venous thromboembolism in carriers of two dysfunctional protein C variants." Thromb Res 117(5): 523-528.
- Simmonds R. E. and Lane D. A. (1999). "Structural and functional implications of the intron/exon organization of the human endothelial cell protein C/activated protein C receptor (EPCR) gene: comparison with the structure of CD1/major histocompatibility complex alpha1 and alpha2 domains." Blood 94(2): 632-641.
- Sprung C. L., Annane D., Keh D., Moreno R., Singer M., Freivogel K., Weiss Y. G., Benbenishty J., Kalenka A., Forst H., Laterre P. F., Reinhart K., Cuthbertson B. H., Payen D. and Briegel J. (2008). "Hydrocortisone therapy for patients with septic shock." N Engl J Med 358(2): 111-124.
- Stearns-Kurosawa D. J., Burgin C., Parker D., Comp P. and Kurosawa S. (2003). "Bimodal distribution of soluble endothelial protein C receptor levels in healthy populations." J Thromb Haemost 1(4): 855-856.
- Stearns-Kurosawa D. J., Kurosawa S., Mollica J. S., Ferrell G. L. and Esmon C. T. (1996). "The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex." Proc Natl Acad Sci U S A 93(19): 10212-10216.

- Stearns-Kurosawa D. J., Swindle K., D'Angelo A., Della Valle P., Fattorini A., Caron N., Grimaux M., Woodhams B. and Kurosawa S. (2002). "*Plasma levels of endothelial protein C receptor respond to anticoagulant treatment.*" Blood 99(2): 526-530.
- Stephenson D. A., Toltl L. J., Beaudin S. and Liaw P. C. (2006). "*Modulation of monocyte function by activated protein C, a natural anticoagulant.*" J Immunol 177(4): 2115-2122.
- Sturm D. H., Kaneider N. C., Feistritzer C., Djanani A., Fukudome K. and Wiedermann C. J. (2003). "*Expression and function of the endothelial protein C receptor in human neutrophils.*" Blood 102(4): 1499-1505.
- Taylor F. B., Jr., Chang A., Esmon C. T., D'Angelo A., Vigano-D'Angelo S. and Blick K. E. (1987). "*Protein C prevents the coagulopathic and lethal effects of Escherichia coli infusion in the baboon.*" J Clin Invest 79(3): 918-925.
- Taylor F. B., Jr., Peer G. T., Lockhart M. S., Ferrell G. and Esmon C. T. (2001). "*Endothelial cell protein C receptor plays an important role in protein C activation in vivo.*" Blood 97(6): 1685-1688.
- Taylor F. B., Jr., Stearns-Kurosawa D. J., Kurosawa S., Ferrell G., Chang A. C., Laszik Z., Kosanke S., Peer G. and Esmon C. T. (2000). "*The endothelial cell protein C receptor aids in host defense against Escherichia coli sepsis.*" Blood 95(5): 1680-1686.
- Turner R. R., Beckstead J. H., Warnke R. A. and Wood G. S. (1987). "*Endothelial cell phenotypic diversity. In situ demonstration of immunologic and enzymatic heterogeneity that correlates with specific morphologic subtypes.*" Am J Clin Pathol 87(5): 569-575.
- Uchiba M., Okajima K., Oike Y., Ito Y., Fukudome K., Isobe H. and Suda T. (2004). "*Activated protein C induces endothelial cell proliferation by mitogen-activated protein kinase activation in vitro and angiogenesis in vivo.*" Circ Res 95(1): 34-41.
- Uitte de Willige S., Van Marion V., Rosendaal F. R., Vos H. L., de Visser M. C. and Bertina R. M. (2004). "*Haplotypes of the EPCR gene, plasma sEPCR levels and the risk of deep venous thrombosis.*" J Thromb Haemost 2(8): 1305-1310.
- van den Berghe G., Wouters P., Weekers F., Verwaest C., Bruyninckx F., Schetz M., Vlasselaers D., Ferdinande P., Lauwers P. and Bouillon R. (2001). "*Intensive insulin therapy in the critically ill patients.*" N Engl J Med 345(19): 1359-1367.
- Villegas-Mendez A., Montes R., Ambrose L. R., Warrens A. N., Laffan M. and Lane D. A. (2007). "*Proteolysis of the endothelial cell protein C receptor by neutrophil proteinase 3.*" J Thromb Haemost 5(5): 980-988.
- Villoutreix B. O., Blom A. M. and Dahlback B. (1999). "*Structural prediction and analysis of endothelial cell protein C/activated protein C receptor.*" Protein Eng 12(10): 833-840.
- Vincent J. L., Bernard G. R., Beale R., Doig C., Putensen C., Dhainaut J. F., Artigas A., Fumagalli R., Macias W., Wright T., Wong K., Sundin D. P., Turlo M. A. and Janes J. (2005). "*Drotrecogin alfa (activated) treatment in severe sepsis from the global open-*

- label trial *ENHANCE*: further evidence for survival and safety and implications for early treatment." Crit Care Med 33(10): 2266-2277.
- Vincent J. L., Sakr Y., Sprung C. L., Ranieri V. M., Reinhart K., Gerlach H., Moreno R., Carlet J., Le Gall J. R. and Payen D. (2006). "Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study." Crit Care Med 34(2): 344-353.
- Walker F. J. and Fay P. J. (1992). "Regulation of blood coagulation by the protein C system." FASEB J 6(8): 2561-2567.
- Warren B. L., Eid A., Singer P., Pillay S. S., Carl P., Novak I., Chalupa P., Atherstone A., Penzes I., Kubler A., Knaub S., Keinecke H. O., Heinrichs H., Schindel F., Juers M., Bone R. C. and Opal S. M. (2001). "Caring for the critically ill patient. High-dose antithrombin III in severe sepsis: a randomized controlled trial." JAMA 286(15): 1869-1878.
- Xu J., Esmon N. L. and Esmon C. T. (1999). "Reconstitution of the human endothelial cell protein C receptor with thrombomodulin in phosphatidylcholine vesicles enhances protein C activation." J Biol Chem 274(10): 6704-6710.
- Xu J., Qu D., Esmon N. L. and Esmon C. T. (2000). "Metalloproteolytic release of endothelial cell protein C receptor." J Biol Chem 275(8): 6038-6044.
- Yan S. C., Razzano P., Chao Y. B., Walls J. D., Berg D. T., McClure D. B. and Grinnell B. W. (1990). "Characterization and novel purification of recombinant human protein C from three mammalian cell lines." Biotechnology (N Y) 8(7): 655-661.
- Zingarelli B. (2005). "Nuclear factor-kappaB." Crit Care Med 33(12 Suppl): S414-416.

Activation endothéliale et sepsis : Régulation du récepteur endothélial de la protéine C et Mécanismes d'action de la protéine C activée

L'interaction entre les voies de la coagulation et de l'inflammation est essentielle dans les états infectieux graves. Le système de la protéine C (PC) joue un rôle majeur. Le Récepteur Endothélial de la Protéine C (EPCR), à la surface de la cellule endothéliale (CE) agit comme cofacteur d'activation de la PC par le complexe thrombine-thrombomoduline. La PC activée (PCa) a une activité anticoagulante, anti-apoptotique et anti-inflammatoire. L'EPCR est exprimée sous forme d'une protéine transmembranaire à la surface des CE (mEPCR) mais aussi sous forme soluble (sEPCR).

Ce travail analyse les mécanismes de la régulation concomitante des formes membranaires et solubles de l'EPCR au cours de l'inflammation endothéliale. Nous montrons que l'expression de mEPCR est clairement diminuée sans modifier le relargage de sEPCR au cours de l'activation des CE. Il n'existe pas de corrélation entre l'expression cellulaire et les taux circulants d'EPCR. Le sexe masculin est démontré comme un autre facteur (en plus de l'haplotype A3) associé à des taux circulants élevés d'EPCR et peut-être influençant la régulation d'EPCR au cours de l'inflammation.

De plus, ce travail analyse la régulation de sEPCR dans le sang au cours du sepsis sévère sur une cohorte de 40 patients. La cinétique de l'EPCR ne subit que de faibles variations mais est clairement influencée par la survie à 28 jours. Une augmentation au 2^{ème} jour des taux circulants de sEPCR est associée à un mauvais pronostic.

Enfin, ce travail démontre l'effet protecteur des réactions croisées entre les voies de signalisation induites par la PCa et le TNF dans les CE, via l'implication d'EPCR, de NF- κ B et des MAP kinases (ERK1/2).

Mots clés : Sepsis, Cellules endothéliales, Inflammation, Coagulation, Récepteur endothélial de la protéine C, Protéine C activée, Sexe, Survie

Endothelial activation and sepsis : Regulation of Endothelial Protein C Receptor and mechanisms of action of activated Protein C

The interaction between coagulation pathways and inflammation is essential during severe sepsis. The Protein C (PC) system plays a major role. The Endothelial Protein C Receptor (EPCR), on endothelial cell (CE) surface acts as cofactor of activation of PC by thrombin-thrombomodulin complex. Activated PC (PCa) has anticoagulant, antiapoptotic and anti-inflammatory activities. EPCR is expressed as transmembranous protein (mEPCR) on EC surfaces but also as soluble form (sEPCR).

This work analyses the mechanisms of concomitant regulation of both membranous and soluble forms of EPCR during endothelial activation. We show that mEPCR expression is clearly down-regulated without modifying sEPCR cleavage during CE activation. There is no correlation between cellular expression and circulating levels of EPCR. Male gender is demonstrated to be an other parameter (with haplotype A3) associated with elevated circulating EPCR levels and perhaps contributing to EPCR regulation during inflammation.

In addition, this works analyses the regulation of sEPCR in blood during severe sepsis in a cohort of 40 patients. EPCR kinetic profile is almost stable but is clearly influenced by Day 28 outcome. An increase of sEPCR circulating levels at Day2 is associated with poor outcome.

Last, we demonstrate the protective cross talk between activated protein C and TNF signalling in vascular CE and the implication of EPCR, NF- κ B and MAP kinases (ERK1/2).

Key words : Sepsis, Endothelial cells, Inflammation, Coagulation, Endothelial Protein C Receptor, Activated Protein C, gender, Survival