

**THESE DE DOCTORAT DES SCIENCES DE LA VIE
PREPAREE A L'UFR DES SCIENCES SANTE DE DIJON**

École doctorale n°554

Environnement Santé

Doctorat de Sciences de la vie

Par

Mr Dargent Auguste

Rôle du LPS au cours du sepsis : description des taux circulants de LPS par spectrométrie de masse au sein d'une cohorte de patients de réanimation, et perspectives d'épuration extracorporelle par LDL aphérèse

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 16 octobre 2019

Composition du jury :

Pr Paul-Michel MERTES	CHU Strasbourg.....	Président du jury
Pr Laurent ARGAUD	Hospices Civils de Lyon.....	Rapporteur
Pr Bruno LEVY	CHU Nancy	Rapporteur
Pr David MASSON	Université de Bourgogne	Examineur
Pr Philippe SAAS	Université de Franche-Comté	Examineur
Pr Jean-Pierre QUENOT	Université de Bourgogne	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

A Mr le Pr Argaud et Mr le Pr Levy,

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter d'être les rapporteurs de cette thèse. Je vous remercie pour votre lecture attentive et critique de ce travail.

A Mr le Professeur Masson,

Vous avez accepté d'évaluer ce travail. Votre aide bienveillante et efficace m'a été très utile tout au long de cette thèse.

A Mr le Pr Mertes,

Vous avez accepté de faire partie de ce jury et d'évaluer aujourd'hui ce travail.

A Mr le Pr Saas,

Vous avez accepté dès le début de cette thèse de suivre l'évolution de mon travail. Vous l'avez fait avec rigueur et bienveillance et vos questions très pertinentes ont parfois permis d'améliorer ce travail. Aujourd'hui vous acceptez de faire partie de ce jury.

A Mr le Pr Quenot,

Vous avez dirigé ce travail de thèse. Au cours de ce travail, mais aussi tout au long de notre collaboration, vous m'avez transmis énormément... Pendant ces dernières années, vous m'avez poussé à donner le meilleur de moi-même dans la recherche, qui est notre (principale) passion commune. Vous m'en avez donné les moyens, l'énergie, et l'envie ! Dans l'avenir proche, nous allons être séparés par quelques kilomètres, mais je suis sûr que nous resterons « complices » et que nous aurons encore beaucoup de choses à partager. Merci pour votre bienveillance, votre éternelle bonne humeur, et vos aphorismes inoubliables...

Au Dr Laurent Lagrost,

Vous avez été à l'origine des hypothèses biologiques qui sous-tendent cette thèse, mûries au cours des multiples travaux que vous avez menés sur le LPS. Sans votre

expertise, cette thèse n'aurait donc pas pu voir le jour. Je vous remercie donc pour votre soutien dès le début du projet, et vos multiples contributions et avis éclairés.

Au Dr Jean-Paul Pais De Barros,

Jean-Paul, je pense que je n'aurais pas réussi grand-chose sans toi, tant ton expertise et ton talent de pédagogue et d'expérimentateur m'ont été bénéfiques. Aussi, ces années auraient été complètement différentes et bien plus mornes sans ta présence ! Nos conversations « à bâtons rompus », toujours passionnantes, vont vraiment me manquer...

Au personnel de la plateforme de lipidomique,

Comment oublier les moments passés avec vous à la plateforme ! Hélène, tu as eu bien du courage de supporter ma maladresse et mes centaines de tubes « urgents » ! Ton aide m'a été indispensable pour cette thèse... J'ai fait ce que j'ai pu pour compenser mais aucune sucrerie ne peut exprimer ma gratitude ! Loïc, merci également pour ton aide très efficace et discrète, indispensable à la fin de mon travail. Victoria, merci également pour ton éternelle bonne humeur et les moments passés ensemble.

Au Dr Thomas Gautier,

Dès le début, tu as été présent pour m'aider sur la bibliographie. Par la suite, tu as toujours été disponible pour mes questions ! Enfin, je te remercie pour l'aide précieuse que tu m'as apportée pour le transport des échantillons prélevés à Paris.

Au reste de l'équipe LIPNESS,

J'ai beaucoup appris à votre contact, notamment aux réunions ou nos discussions de notre travail et grâce à des commentaires et critiques pertinents. Je garderai de très bon souvenir de l'ambiance de travail qui règne dans cette équipe de haut niveau scientifique, à la fois conviviale et très professionnelle. Je remercie spécialement Alois qui m'a rendu service efficacement quand j'en avais besoin.

A ma famille,

Audrey, tu m'as supporté, à tous les sens du terme, durant des périodes de travail intense : que serai-je sans toi ? Mes parents m'ont transmis leur curiosité insatiable, et tout le monde m'a porté de ses encouragements : merci !

Enfin, je dédie ce travail à mon grand-père chercheur, Marcel Dargent,

Je ne l'ai malheureusement pas connu mais il a su transmettre à travers les générations sa passion, cette soif de savoir et de comprendre qui coule dans mes veines, et que j'espère transmettre à son arrière-petit-fils Marcel.

Table des matières

Abréviations	7
Introduction générale	9
I. Sepsis et endotoxémie.....	9
A. Sepsis et choc septique.....	9
1. Définitions	9
2. Épidémiologie	11
3. Présentation clinique et prise en charge	12
4. Diagnostic et biomarqueurs	13
5. Biomarqueurs et approche « théranostique »	15
B. Endotoxine et endotoxémie	16
1. Historique	16
2. Détection au cours du sepsis	16
II. Le lipopolysaccharide.....	19
A. Bactériologie	19
B. Méthodes conventionnelles de détection (activité biologique)	21
1. Le test LAL	21
2. Endotoxin activity assay (EAA).....	22
C. Détection du LPS par spectrométrie de masse (HPLC/MS/MS)	23
D. LPS et lipoprotéines	26
1. L'hyperlipidémie septique	26
2. Interactions lipoprotéines/LPS.....	26
3. Protéines de liaison et de transfert du LPS	27
4. Modèle du « transport réverse »	28
III. Techniques d'épuration extracorporelle	31
A. Hémo perfusion directe à la polymyxine B	31
1. Principe, données <i>in vitro</i> et précliniques	31
2. Essais cliniques	31
B. Autres méthodes d'épuration extracorporelle du LPS	32
1. Épuration extra-rénale par hémodialyse et hémofiltration	32
2. MATISSE	34
3. CTR (Lixelle).....	34
4. ALTECO	35
5. La plasmaphérèse	35
C. LDL-aphérèse	35
1. L'hypercholestérolémie familiale	35
2. Techniques de LDL-aphérèse	36

Article n°1	39
I. Introduction.....	39
II. Article (tel qu'accepté pour publication dans <i>Intensive Care Medicine</i>)	40
III. Résultats et conclusion	52
Article n°2	55
I. Introduction.....	55
II. Article (soumis dans <i>The Journal of Clinical Investigation</i>)	56
<u>Results and Discussion</u>	61
III. Résultats et conclusion	78
Conclusion générale.....	80
Références.....	81
ANNEXE 1	99

Abréviations

3HM	3-hydroxy myristate
AUC	<i>Area under curve</i>
CRP	<i>C reactive protein</i>
BGN	Bacille Gram-négatif
BPI	<i>Bactericidal permeability-inducing protein</i>
CETP	<i>Cholesteryl ester transfer protein</i>
CIC	Centre d'investigations clinique
CPP	Comité de protection des personnes
CVVH	<i>Continuous veno-venous hemofiltration</i>
CVVHD	<i>Continuous veno-venous hemodialysis</i>
DFPP	<i>Double filtration plasmapheresis</i>
EAA	<i>Endotoxin activity assay</i>
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique
EER	Épuration extra-rénale
EFS	Établissement français du sang
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FiO2	Fraction inspirée en oxygène
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HDL	<i>High density lipoproteins</i>
HER2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
HF	Hypercholestérolémie familiale
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IEC	Inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine
LAL	Lysat d'amœbocytes de limules
LBP	<i>LPS binding protein</i>
LDL	<i>Low density lipoproteins</i>
LDL-c	LDL-cholestérol
LDLR	<i>LDL receptor</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LTA	<i>Lipoteichoic acid</i>
mmHg	Millimètre de mercure
MS	<i>Mass spectrometry</i>
PAM	Pression artérielle moyenne
PAMP	<i>Pathogen associated molecular pattern</i>

PCSK9	<i>Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9</i>
PCT	Procalcitonine
PEI	Polyéthylène imine
PLTP	<i>Phospholipid transfer protein</i>
PMX	Polymyxine
PMX-DHP	<i>PMX direct hemoperfusion</i>
PRR	<i>Pathogen recognition receptor</i>
rhPLTP	<i>Recombinant human PLTP</i>
ROC	<i>Receiving operator characteristic</i>
SOFA	<i>Sequential organ failure assessment</i>
sTREM-1	<i>Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TRC	Transport reverse du cholestérol
VLDL	<i>Very low density lipoproteins</i>
VPN	Valeur prédictive négative
VPP	Valeur prédictive positive

Introduction générale

I. Sepsis et endotoxémie

A. Sepsis et choc septique

Le mot « sepsis » (σῆψις, putréfaction en grec) a été introduit par Hippocrate qui a été un des premiers à décrire ce syndrome clinique. Aujourd'hui, ce terme est associé à la gravité du syndrome clinique et biologique accompagnant une infection, quelle qu'en soit l'origine (dans la quasi-totalité des cas bactérienne, rarement parasitaire ou fongique).

1. Définitions

La nomenclature des syndromes septiques a été standardisée à partir des années 1980, principalement dans le but de faciliter et d'homogénéiser les protocoles de recherche clinique et de traitement (1,2). Ces définitions ont été mises à jour pour la troisième fois en 2016 (définitions « Sepsis-3 ») (3). Ces nouvelles définitions mettent l'accent sur le fait que le sepsis s'associe à des défaillances d'organe qui vont en faire la gravité. Le sepsis est maintenant défini comme « une dysfonction d'organe mettant en jeu le pronostic vital, causée par une réponse inappropriée de l'hôte à l'infection ». La notion de dysfonction d'organe est couramment exprimée dans les études menées en réanimation et aux urgences par un score spécifique, le Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) (4). Ce score est noté de 0 à 24 sur 6 paramètres (Tableau 1). En pratique, le sepsis est défini par une augmentation aiguë du score SOFA de 2 points ou plus (score à 0 chez un patient ne présentant pas de défaillance d'organe chronique) chez un patient présentant une infection probable ou confirmée. Il faut noter que le terme « sepsis sévère » a été abandonné, car considéré comme redondant. Il est aujourd'hui définitivement remplacé par cette nouvelle définition.

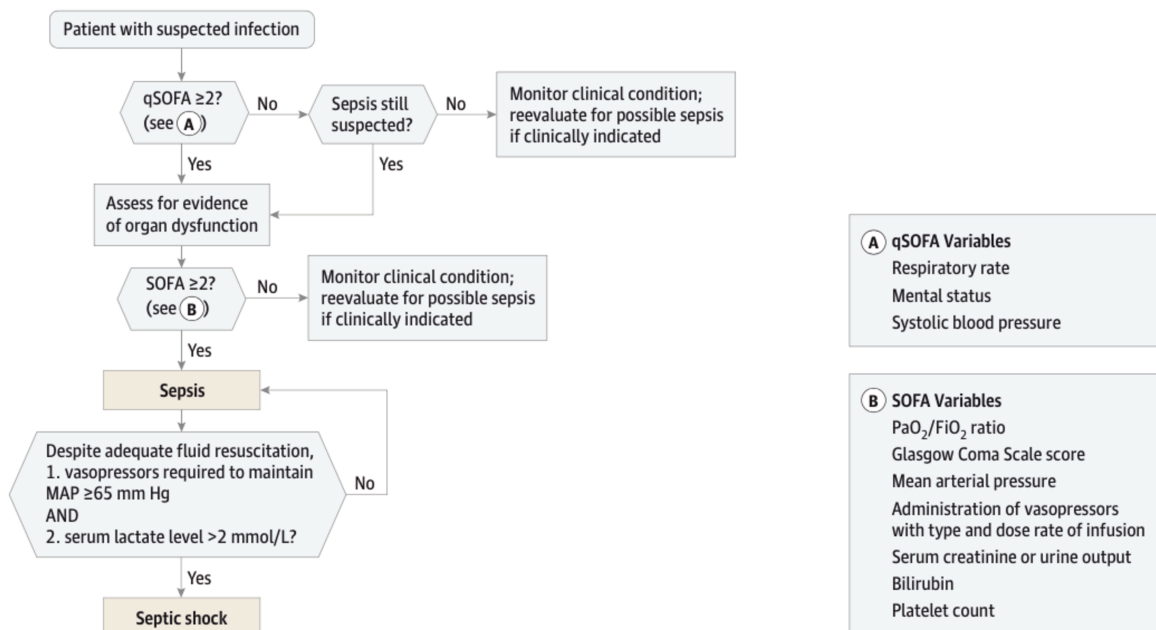
Tableau 1 : Score SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) utilisé pour les définitions du sepsis

Système	Score				
	0	1	2	3	4
Respiration					
PaO ₂ /FiO ₂ , (mmHg)	≥ 400	< 400	< 300	< 200 sous ventilation mécanique	< 100 sous ventilation mécanique
Coagulation					
Plaquettes (10 ³ /μL)	≥ 150	< 150	< 100	< 50	< 20
Foie					
Bilirubine (μmol/L)	< 20	20-32	33-101	102-204	> 204
Cardiovasculaire					
	PAM>70 mmHg	PAM<70 mmHg	Dobutamine (n'importe quelle dose)	Adrénaline ou noradrénaline <0,1 μg/kg/min	Adrénaline ou noradrénaline ≥0,1 μg/kg/min
Système nerveux central					
Score de Glasgow (état de conscience)	15	13-14	10-12	6-9	< 6
Reins					
Créatinine (μmol/L)	< 110	110-170	171-299	300-440	≥ 440
Diurèse (ml/24h)				< 500	< 200

FiO₂ : fraction inspirée en oxygène ; PAM : pression artérielle moyenne ; PaO₂ : pression partielle artérielle en oxygène

L'état de choc septique est défini, en présence d'un sepsis, par une hypotension persistante requérant l'administration de vasopresseurs pour maintenir une pression artérielle moyenne (PAM) ≥ 65 mmHg, associée à un taux sérique de lactate > 2 mmol/L, malgré un remplissage vasculaire adéquat. Ces critères définissent une population ayant actuellement un taux de mortalité d'environ 40% (3). La figure 1 résume ces définitions sous forme d'un algorithme.

Figure 1 : Algorithmme opérationnel représentant les critères cliniques de sepsis et de choc septique (d'après Singer et al. JAMA 2016) (3)



MAP : mean arterial pressure ; qSOFA : quick SOFA ; SOFA : sequential organ failure assessment

2. Épidémiologie

Le sepsis et ses complications sont une des premières causes de mortalité dans les services de soins intensifs et de réanimation (5). Environ 15% des malades hospitalisés en réanimation en France présentent un sepsis, le plus souvent dès l'admission (6). Bien qu'une tendance à l'amélioration du pronostic ait été observée dans la dernière décennie, la mortalité reste très élevée, de l'ordre de 50% pour la mortalité intra-hospitalière du choc septique (5). La durée médiane de séjour hospitalier des malades est d'environ 3 semaines dont 10 jours en réanimation (5). Les coûts associés à cette prise en charge sont donc très élevés.

Chaque année en France, environ 75.000 patients sont hospitalisés dans les services de réanimation (6). L'incidence du sepsis a augmenté de près de 9% par an entre 1979 et 2000 (7) et continue à augmenter (8). Les projections suggèrent un doublement du nombre de cas d'ici 50 ans. Cette augmentation est probablement liée au vieillissement de la population, à la fréquence d'utilisation des thérapeutiques immunosuppressives (dont thérapies anti-cancéreuses) et des dispositifs invasifs.

3. Présentation clinique et prise en charge

La présentation clinique des états septiques sévères dépend bien évidemment de la localisation du foyer infectieux. Les infections respiratoires (pneumopathies) sont de loin les plus fréquentes (54%), suivies des infections intra-abdominales (19% : péritonites, angiocholite notamment), des infections des voies urinaires (14%), des infections de dispositifs intravasculaires et endocardites (13%), de la peau et tissus mous et autres sites (6%) (5). L'infection est microbiologiquement documentée dans moins de 70% des cas.

En dehors des signes cliniques propres à l'infection causale (dyspnée, expectorations et anomalies auscultatoires pour une pneumopathie par exemple), les états septiques sévères sont caractérisés par la présence de signes d'hypoperfusion périphérique associés à des défaillances d'organes, comme évoqué plus haut (§ « 1. Définitions »). Les altérations macro- et micro-vasculaires sont prédominantes dans la physiopathologie du sepsis. L'hypotension artérielle (pression artérielle (PA) systolique < 100 mmHg), causée par la conjugaison d'une hyper-perméabilité vasculaire et d'une vasoplégie (diminution du tonus vasculaire), est de fait l'un des principaux signes d'alerte en présence d'une infection, et constitue la principale défaillance d'organe au cours du sepsis (cf. score SOFA). De même, ces anomalies de perfusion périphérique se traduisent par des signes cutanés : marbrures plus ou moins diffuses selon la sévérité (9), temps de recoloration cutanée allongé au-delà de 3 secondes, cyanose et froideur des extrémités. Ces signes d'hypoperfusion cutanée reflètent assez fidèlement le degré d'hypoperfusion des autres organes qui vont entrer dans le calcul du SOFA et donc définir le diagnostic de sepsis. Ainsi, le sepsis sera retenu s'il existe par exemple, en plus de l'hypotension, une insuffisance rénale, une thrombopénie, une hypoxémie, une altération de la vigilance ou un ictère. Biologiquement, le taux de lactate sérique reflète l'adaptation du métabolisme cellulaire à l'état de choc (10), et il est utilisé pour adapter les thérapeutiques.

Le degré supérieur de sévérité, le choc septique, est atteint en présence d'une hypoperfusion (hyperlactatémie), lorsque l'hypotension persiste malgré une perfusion de solutés de remplissage (sérum salé isotonique par exemple) et nécessite l'introduction de vasopresseurs. Au sein des patients en choc septique, différents niveaux de sévérité coexistent également, même lors du contrôle optimal de la source de l'infection par une antibiothérapie et/ou une prise en charge chirurgicale le cas

échéant. Certains patients présentent une résistance au traitement par noradrénaline avec une vasoplégie réfractaire. Il s'ensuit rapidement un état de défaillance multi-viscérale irréversible conduisant rapidement au décès. Nous avons mené un premier travail aboutissant à la conclusion que la profondeur de la résistance aux catécholamines (représentée par la dose administrée pour un objectif tensionnel donné) est corrélée au risque de décès à très court terme (11) (Annexe 1). Ce critère de dépendance à une forte dose de noradrénaline définit une population de gravité maximale en état de choc réfractaire qui représente la plus grande partie de la mortalité précoce (dans les 3 premiers jours) du choc septique.

La prise en charge thérapeutique est finalement assez simple et repose sur l'administration d'une antibiothérapie adaptée au foyer suspecté le plus précocement possible (12), le contrôle de la source si possible (chirurgie en cas de péritonite par exemple) et enfin des traitements de support hémodynamique visant à corriger l'hypovolémie (remplissage vasculaire par solutés cristalloïdes) et la vasoplégie (13) (vasopresseurs, la noradrénaline étant indiquée en première intention) (14). Les défaillances d'organe sont prises en charge par des traitements de suppléance si besoin : ventilation mécanique pour la défaillance respiratoire, épuration extra-rénale pour l'insuffisance rénale aiguë... A l'heure actuelle, il n'existe pas encore de traitement visant à moduler la réponse de l'hôte, après l'échec de nombreux essais thérapeutiques ciblés sur la cascade inflammatoire caractérisant le sepsis (15). Notamment, la protéine C activée, inhibitrice physiologique de la coagulation, a été un des seuls traitements développés spécifiquement pour le sepsis à obtenir une autorisation de mise sur le marché (AMM) en montrant une diminution de la mortalité chez des patients en sepsis sévère (16). Cette AMM a été retirée car les essais contrôlés supplémentaires demandés par la FDA (Food and Drug Administration) n'ont pas permis de confirmer les résultats de l'étude princeps (16). Il existe tout de même une indication de traitement par corticoïdes au cours des formes sévères de choc septique (13), dont l'efficacité et le mode d'action (dépendant probablement principalement de la voie minéralocorticoïde) restent controversés (17).

4. Diagnostic et biomarqueurs

Le diagnostic de sepsis repose sur l'évaluation clinique qui retrouve des symptômes et signes cliniques compatibles avec une infection accompagnés des signes de gravité

évoqués plus haut. Le diagnostic de confirmation est apporté par les prélèvements microbiologiques qui permettent d'identifier le pathogène par la culture de liquides biologiques normalement stériles. Cependant, l'identification du germe en cause dans l'infection n'est possible que dans deux tiers des cas environ (même en cas de choc septique) (5). De nombreux biomarqueurs ont été évalués pour leur capacité à faire la distinction entre sepsis et états non infectieux. En réanimation, l'antibiothérapie est initiée presque invariablement sur une suspicion (même modeste) d'infection. De ce fait, il existe probablement un surdiagnostic des infections bactériennes chez les patients de réanimation. Une étude récente portant sur plus de 2500 patients traités pour un sepsis en réanimation a révélé que 13% des patients avaient une probabilité post-hoc d'infection « nulle », et 30% de « possible », sur des critères cliniques, radiologiques, biologiques bien définis à l'avance (18). D'ailleurs, les patients traités pour un sepsis mais qui n'avaient rétrospectivement pas d'infection retenue avaient un risque de décès plus élevé (18), ce qui souligne la nécessité d'un marqueur efficace permettant d'augmenter la fiabilité et la précocité du diagnostic.

Les biomarqueurs utilisés en routine sont la protéine C réactive (CRP), la numération des leucocytes et la procalcitonine (PCT). Ce sont des paramètres relativement peu coûteux et disponibles 7 jours sur 7 et 24 heures sur 24. La PCT est globalement plus spécifique des infections bactériennes que la CRP, avec une cinétique plus rapide permettant de suivre l'évolution de l'infection (19), et une bonne valeur prédictive négative (VPN) et positive (VPP) (20). Cependant, une méta-analyse de 18 études réalisées sur la PCT en réanimation a révélé des performances diagnostiques peu satisfaisantes avec une aire sous la courbe ROC (AUC) à 0,78 (21). Idéalement, la valeur d'AUC d'un biomarqueur fiable doit dépasser 0,90 voire 0,95. Ainsi, les performances diagnostiques de la PCT ne sont pas suffisantes pour en faire un biomarqueur unique pour le diagnostic de sepsis, notamment en raison de la proportion non négligeable de faux négatifs.

Parmi de nombreux autres biomarqueurs, le sTREM-1 (*soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1*) a fait l'objet d'une attention particulière ces dernières années en raison d'une spécificité intéressante. Une méta-analyse conduite sur 11 études a retrouvé une AUC à 0,87 avec une sensibilité à 79% et une spécificité à 80% (22). Ces résultats insuffisants n'ont pas permis d'imposer l'utilisation en routine du

sTREM-1 comme biomarqueur. Globalement, les performances de dizaines de biomarqueurs ont été analysées sans pouvoir identifier un candidat robuste (23,24).

Au-delà de ces biomarqueurs protéiques « classiques », les perspectives actuelles s'orientent vers les « omics », famille de domaines de recherche regroupant la génomique, transcriptomique, épigénomique, protéomique, métabolomique, et même lipidomique... Les nouvelles technologies associées aux statistiques à grande dimension permettent d'exploiter et de croiser l'énorme quantité de données obtenues avec ce type d'approche pour en dégager des profils (d'expression génique par exemple) associés à une situation clinique (25).

Récemment, la Food and Drug Administration (FDA) américaine a approuvé un test de « réponse moléculaire de l'hôte » basé sur l'analyse transcriptionnelle de 4 gènes (SeptiCyté LAB), capable de différencier les cas de sepsis de cas d'inflammation stérile avec une AUC de 0,89 (26).

Ces technologies, quoique prometteuses, ne sont pas encore prêtes pour une utilisation en routine, et les biomarqueurs « généralistes » de l'inflammation (PCT et CRP) continuent (et continueront probablement encore longtemps) à être largement utilisés pour conforter de nombreuses décisions diagnostiques et thérapeutiques.

5. Biomarqueurs et approche « théranostique »

Plus que le diagnostic, c'est la réponse thérapeutique adaptée et rapide qui est cruciale au cours du sepsis. Ainsi, le clinicien n'a pas seulement besoin d'un outil permettant de répondre à la question : « ce patient présente-t-il oui ou non une infection bactérienne ? », car en réanimation la balance bénéfice/risque d'un traitement antibiotique sera toujours en faveur du traitement (à la phase initiale du sepsis). En revanche, l'outil diagnostique idéal devrait permettre de détecter un mécanisme physiopathologique sur lequel agir immédiatement en conséquence. C'est le principe de la « théranostique », défini et appliqué d'abord en oncologie avec notamment la détection des récepteurs *Human epidermal growth factor receptor 2* (HER2) sur les tumeurs mammaires qui permet de les cibler avec un anticorps monoclonal (trastuzumab) (27) ; ou encore les inhibiteurs de tyrosine kinases en hématologie. Ce concept, appelé aussi médecine personnalisée ou médecine de précision, représente très probablement l'avenir de la prise en charge de beaucoup de maladies humaines. De même que les différents cancers nécessitent un traitement

différent selon le type histologique et le stade d'évolution de la tumeur, les patients septiques ne sont pas un groupe homogène et le traitement qui leur est proposé ne doit probablement pas l'être non plus (28).

B. Endotoxine et endotoxémie

1. Historique

La découverte des microorganismes par Pasteur au 19^e siècle a redéfini la vision des infections. Le sepsis est alors considéré comme une infection généralisée, systémique, et les termes « d'empoisonnement du sang » ou de septicémie sont alors fréquemment utilisés.

Le terme « endotoxine » a été utilisé pour la première fois (en opposition aux « exotoxines » déjà décrites) en 1892 par le Dr Richard Friedrich Johannes Pfeiffer (29), pionnier allemand de la bactériologie, membre de l'équipe de Robert Koch. Ce concept émerge en fait d'une observation rapportée quelques années plus tôt par l'équipe de Pasteur, alors en concurrence féroce avec Koch. En 1888, Nicolai Gamaleia rapporte en effet que différentes souches bactériennes tuées par ébullition sont toujours capables de provoquer une réaction fébrile chez des lapins inoculés avec cette préparation (30). L'hypothèse est donc formulée qu'il existe un « poison », thermostable, constituant des bactéries, et qui explique une partie de leur pouvoir pathogène. Des expériences de vaccinations animales sont rapidement réalisées et permettent la production d'anticorps anti-endotoxines (31). L'antigène cible de ces anticorps est alors appelé antigène O (pour *ohn kapsel*, « sans capsule » en allemand), qui est donc synonyme d'endotoxine. Plus tard, la nature « glucido-lipidique » de ces molécules est mise en évidence par Boivin (32). On pensait jusqu'alors que l'antigène O était de nature protéique, ce qui est réfuté par les expériences de Boivin ne retrouvant pas d'azote dans cette molécule (32). Le terme lipopolysaccharide (LPS) est finalement utilisé après l'identification de la chaîne polysaccharidique constituant la partie antigénique de l'endotoxine (33).

2. Détection au cours du sepsis

L'événement le plus précoce de la pathogenèse du sepsis est l'interaction des PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*) bactériens avec les PRR (*pattern*

recognition receptors) de l'immunité innée, et notamment les récepteurs TLR (*toll-like receptors*) (34). Le LPS est, de fait, le PAMP le plus étudié et l'un des plus puissants. Le rôle des LPS dans le sepsis humain est parfaitement illustré par la reproduction des signes cliniques de sepsis (fièvre, frissons, tachycardie, hypotension, etc...) après l'administration de faibles doses de LPS (35). Il existe même des cas d'intoxication au LPS donnant un tableau de pseudo-choc septique très complet (36). Les bacilles gram négatifs (BGN) sont les agents pathogènes les plus fréquemment identifiés chez les patients présentant un choc septique (5). Le traitement antibiotique pourrait augmenter la libération de ces molécules (37). La clairance du LPS par le foie après un épisode de sepsis joue un rôle clé dans la résolution de la maladie (38).

En conséquence, la détection de LPS chez les patients septiques constitue un défi majeur et a été documentée dans plusieurs dizaines d'études, résumées dans une méta-analyse (39). A ce jour, la question de la valeur diagnostique et pronostique du LPS reste non résolue en raison des résultats contradictoires de ces études. En effet, certaines études retrouvent des résultats en faveur d'un intérêt de l'endotoxémie dans une population de patients fébriles, avec une spécificité de 96% et une VPN de 99% pour prédire l'évolution vers un sepsis (40,41), et une augmentation du risque de mortalité chez les patients en choc avec des valeurs élevées de LPS (41–43). La valeur pronostique du LPS est apparue particulièrement intéressante dans certaines situations cliniques comme les méningococcémies invasives (44) ou les neutropénies compliquant les hémopathies malignes (41). Dans une étude utilisant l'EAA (Endotoxin activity Assay) chez des patients de réanimation et des volontaires sains, Marshall et al. (45) retrouvaient des résultats similaires : les patients ayant des niveaux élevés de LPS étaient plus à risque de sepsis, présentaient des scores de gravité ainsi qu'un risque de décès plus élevés.

Cependant, d'autres études ont retrouvé des résultats moins encourageants. Une méta-analyse récente (39) a récemment conclu qu'une endotoxémie n'était pas plus fréquemment détectée chez les patients avec une bactériémie à BGN (sauf pour *Pseudomonas* et *Proteus*) que chez les autres patients septiques. Globalement, moins des deux tiers des patients avec une bactériémie à BGN présentait une endotoxémie, et vice versa (46). Ce manque de corrélation avec le diagnostic d'infection à BGN est indépendant de la sensibilité du test LAL (Lysat d'améboocytes de limules, voir § II.B.1.)

utilisé (46). Ces résultats sont décevants car l'identification précoce du germe en cause faisait partie des attentes majeures placées dans cette voie. Une explication probable est le phénomène de translocation à travers la paroi intestinale fragilisée de BGN viables ou uniquement de LPS. Ce concept d'« endotoxémie intestinale » est assez ancien et est avancé pour expliquer l'inflammation chronique constatée dans des maladies comme l'athérosclérose, le diabète ou la cirrhose métabolique (47). Au cours du sepsis, la fragilisation de la barrière hémato-intestinale, nouvellement décrite, pourrait amplifier ce phénomène (48).

De plus, certains travaux ne retrouvent pas d'association entre l'endotoxémie et le risque de survenue de défaillance d'organes ou de décès (49–52), ou alors une association à la mortalité sans corrélation avec les défaillances d'organes (53). Par ailleurs, même dans les études retrouvant une corrélation entre l'endotoxémie et la mortalité, la différence entre les groupes (endotoxémie élevée ou non) dépasse rarement 20% (54).

En réalité, toutes ces données récoltées sur l'endotoxémie au cours du temps sont très difficiles à comparer et à homogénéiser du fait des difficultés inhérentes au dosage de l'activité biologique du LPS. Les préparations de LAL avaient initialement des sensibilités très différentes selon le fabricant, rendant leur interprétation quasi impossible pour certains (55). Ces tests sont encore relativement peu fiables avec une variabilité entre les fournisseurs avec un nombre important de faux positifs et de faux négatifs. Une étude récente a démontré que l'endotoxémie mise en évidence chez des patients dialysés chroniques était en fait attribuable à la présence de β -glucanes (56). Ce facteur n'est quasiment jamais pris en compte dans les études citées plus haut, et représente donc un biais potentiel majeur. Enfin, l'enthousiasme des cliniciens pour la détection et le traitement de l'endotoxémie a été refroidi par de récents essais cliniques négatifs de l'hémo perfusion directe à la polymyxine B (PMX-B) dans le traitement du choc septique (57,58).

Aujourd'hui, le LPS ne peut donc pas prétendre à être un biomarqueur fiable du sepsis, qu'il soit dû à des BGN ou à d'autres pathogènes, ni même à être un marqueur prédictif de sévérité ou de mortalité. Pourtant, cette molécule a bien un rôle central dans les interactions hôte-pathogènes dans un grand nombre (si ce n'est toutes) des pathologies infectieuses bactériennes sans parler des situations d'inflammation chronique comme l'obésité ou l'athérosclérose (59). C'est pourquoi l'intérêt de la

communauté scientifique ne faiblit pas, dans le but améliorer la détection du LPS et de comprendre les mécanismes biologiques à l'œuvre.

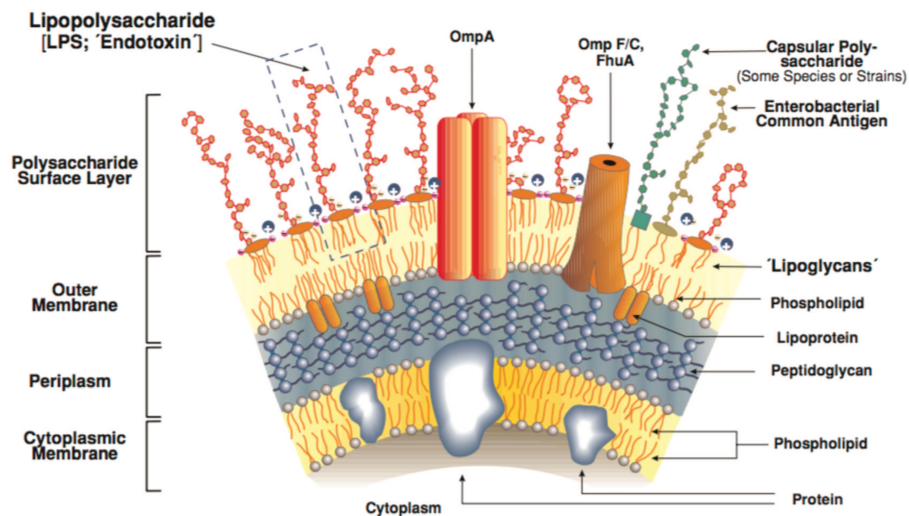
II. Le lipopolysaccharide

A. Bactériologie

Les lipopolysaccharides (LPS) sont des macro-molécules essentielles à la structure de la paroi externes des bactéries à Gram négatif. Le LPS est le principal composant glycolipidique de cette paroi et recouvre environ 75% de sa surface avec jusqu'à 3 millions de molécules de LPS pour une cellule d'*Escherichia coli* (60) (Figure 2). Schématiquement, les LPS comportent trois domaines structuraux (Figure 3) :

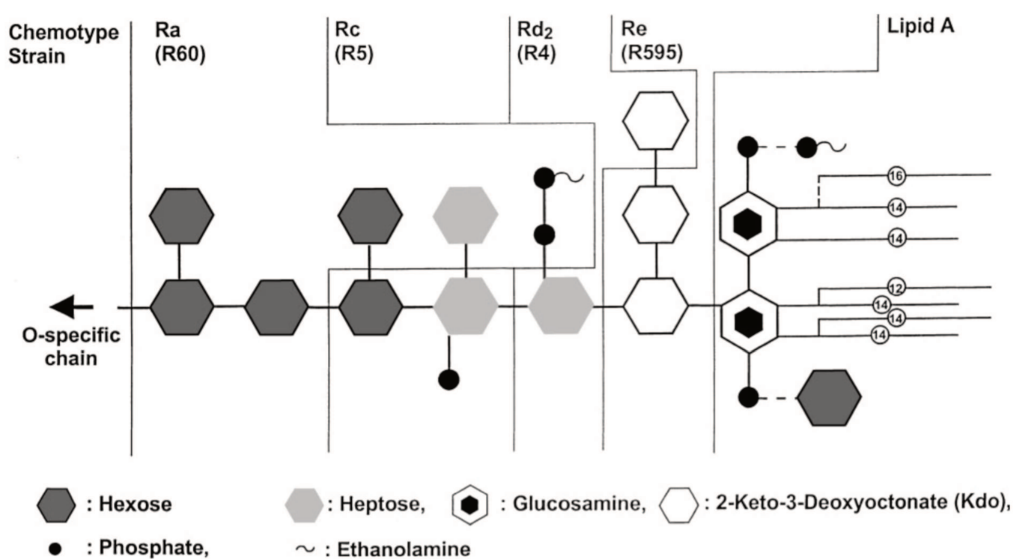
- la chaîne O ou antigène O est une chaîne polysaccharidique, hydrophile
- le noyau oligosaccharidique, composé d'une chaîne de sucres (heptoses et hexoses) plus ou moins longue, se terminant par deux (ou 3) unités KDO (*keto-3-deoxy-octonate*).
- le lipide A, lié au KDO, constitué d'un squelette de di-glucosamine lié à des chaînes acyles. Les acides gras composant ces chaines ont des longueurs variables mais les formes à 12, 14 et 16 atomes de carbone sont les plus communes (Figure 3).

Figure 2 : Schéma de l'enveloppe d'une bactérie à Gram négatif



A l'inverse de la membrane interne constituée d'une bicouche phospholipidique, la membrane externe est très asymétrique avec un feuillet interne composé de phospholipides et un feuillet externe majoritairement composé de LPS. Le lipide A est enchâssé dans la partie lipidique et les chaînes polysaccharidiques sont disposées vers l'extérieur. La partie proximale à la membrane de ces chaînes est fortement chargée négativement, attirant des cations divalents (Mg^{2+} , Ca^{2+}). Les LPS forment également des liaisons spécifiques avec les protéines transmembranaires comme les porines (OmpA, Omp F/C) et le FhuA (*bacterial ferric hydroxymate uptake receptor*).

Figure 3 : schéma de la structure du LPS, d'après Brandenburg et al. 1999 (61)



Le lipide A est la partie la plus spécifique de la molécule. C'est ce composé qui est responsable de l'action pro-inflammatoire puissante du LPS. Ce mécanisme fait intervenir soit une reconnaissance par le complexe TLR4 / MD-2 à la surface des monocytes et des cellules endothéliales (62), soit une activation directe du complément (63).

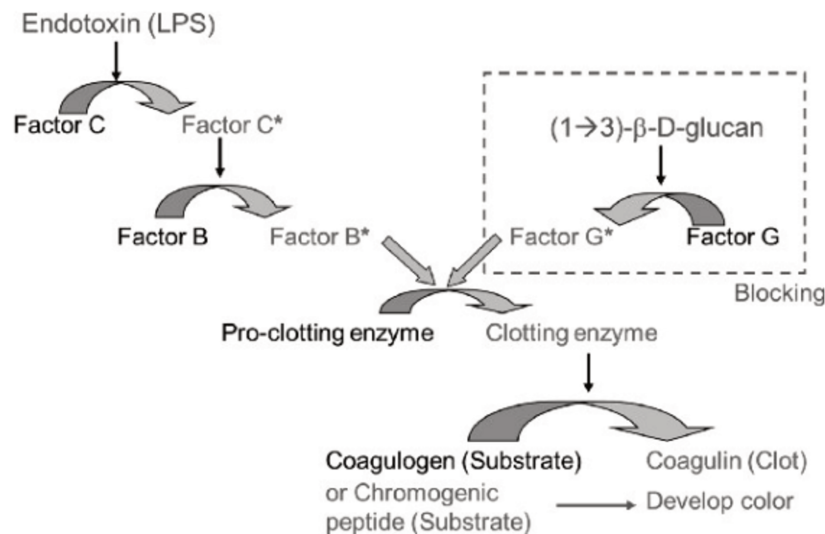
B. Méthodes conventionnelles de détection (activité biologique)

1. Le test LAL

Toujours utilisé comme référence aujourd'hui, le principe du test LAL a été découvert au 19^e siècle par Howell, qui a décrit des phénomènes de coagulation du sang de la limule, un arthropode marin, lorsqu'il est infecté par des bactéries (64). Ce processus est le résultat de l'activation de la coagulase, une enzyme présente dans les amœbocytes de l'hémolymphe de la limule, par le LPS. Cette activation a lieu au terme d'une cascade enzymatique, à l'image de la cascade du complément chez les mammifères. Le LPS active le facteur C, qui lui-même va activer le facteur B, qui convertit ensuite la procoagulase en coagulase (65).

Les tests biologiques utilisant le LAL utilisent la sensibilité de ce réactif pour révéler la présence de LPS. Les premiers tests utilisaient la gélification naturelle ou la turbidité comme mode de révélation du test. Actuellement, la plupart des tests utilisent une version chromogénique du test, remplaçant le coagulogène par un substrat chromogène spécifique de la coagulase, dont le produit du clivage (la paranitroaniline) va donner une couleur jaune dont l'absorbance peut être mesurée à 405 nm par un lecteur optique standard (Figure 4). Les tests de dernière génération utilisent également un chromogène aux propriétés fluorescentes.

Figure 4 : Cascade enzymatique de détection du LPS par le lysat d'amœbocytes de limule (LAL)



Le test LAL est particulièrement sensible à de nombreuses interférences. Dans le plasma notamment, l'activité du LPS est en fait en partie « masquée », principalement par les protéines sériques (66). D'autres facteurs ont une influence comme le pH, les chélateurs (EDTA), l'héparine, les lipides et liposomes. Tous ces facteurs contribuant à diminuer la détection du LPS dans les milieux biologiques par le LAL sont appelés des « inhibiteurs ». De nombreuses techniques ont été essayées pour contourner ce phénomène, mais la dilution (environ 1/10) reste la solution la plus efficace (67). La quantification absolue de l'activité biologique reste délicate en présence de faibles quantités de LPS. Enfin, il existe une source majeure de faux positifs : le β -glucane, un polysaccharide produit par les moisissures, capable d'activer la procoagulase par l'action du facteur G (68) (Figure 4).

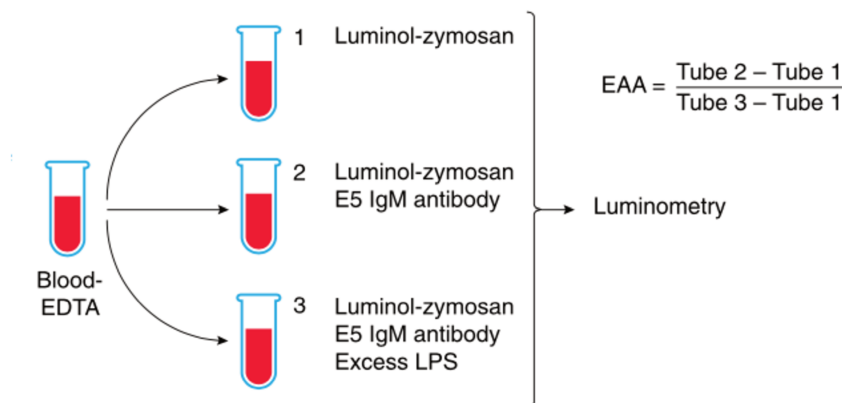
Certains tests (par ex. Endolisa®, BioMerieux) utilisent un principe d'ELISA avec une première étape de liaison par des anticorps dirigés contre l'antigène O puis une lecture par LAL ou facteur C recombinant couplé à un fluorophore.

2. Endotoxin activity assay (EAA)

Le test EAA détecte l'augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène dans le sang d'un sujet en présence de complexes LPS-anticorps (69). Une IgM

monoclonale reconnaissant le noyau saccharidique du LPS est d'abord ajoutée à l'échantillon de sang total du patient. Après incubation, du luminol et du zymosan opsonisé sont ajoutés pour déclencher et révéler le *burst* respiratoire induit par les complexes immuns anticorps-LPS opsonisés par le complément (Figure 5). Ce test permet une détection sensible du LPS sur du sang total sans traitement préalable, en moins de 30 minutes (70).

Figure 5 : principe du test EAA, d'après Munford et al. (59)



Cependant, contrairement à ce que son nom indique, ce test ne mesure pas « l'activité » du LPS. La positivité requiert la formation de complexes immuns avec les anticorps, alors que la présence du lipide A n'est pas requise. La spécificité et l'affinité des anticorps utilisés est sujette à caution d'autant que son épitope est difficile à cibler, d'autres anticorps ayant échoué par le passé, montrant des réactions croisées avec les lymphocytes B par exemple (71). Par ailleurs le résultat est biaisé par l'utilisation de corticoïdes (diminution) ou par la présence d'IL-8 et de TNF (amplification). Ce test n'a jamais été réellement utilisé en pratique clinique. Toutefois, il a récemment été utilisé pour sélectionner les patients septiques inclus dans un essai clinique sur l'épuration extra-corporelle du LPS par la polymyxine B (57).

C. Détection du LPS par spectrométrie de masse (HPLC/MS/MS)

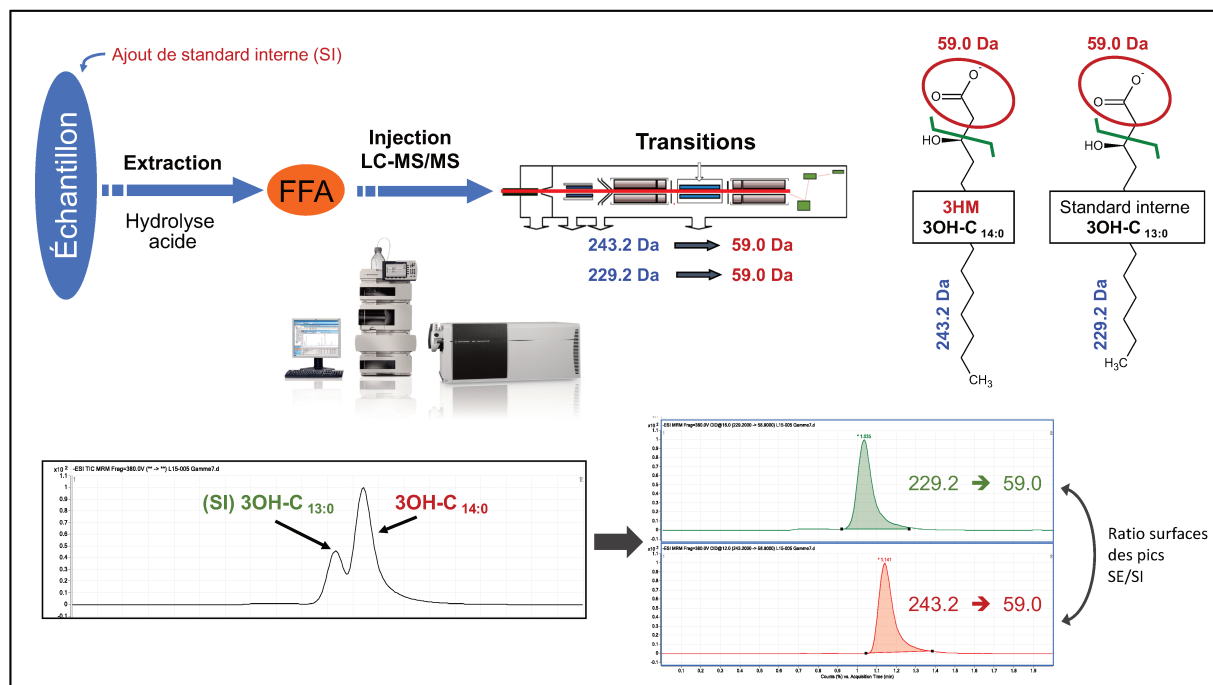
L'acide 3-hydroxy-myristique (3HM) est un acide gras à 14 atomes de carbone hydroxylé en position 3, c'est un composant essentiel du lipide A de la grande majorité des BGN (dont *E. coli*), et le plus abondant. Cet acide gras est spécifique des bactéries

et n'est retrouvé comme les autres acides gras β -hydroxylés, qu'à l'état de traces chez les vertébrés (72). Pour E. coli par exemple, quatre molécules de 3HM sont liées directement à l'ossature de glucosamines (2 liaisons amides, 2 estérifiées) (60).

La détection de 3HM par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse a été réalisée avec succès dès 1978 (73,74). Cependant cette technique souffrait d'une faible sensibilité ainsi que d'un bruit de fond important jusqu'à récemment (75).

Notre équipe a développé ces dernières années une technique plus performante de quantification par chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplée à un spectromètre de masse en tandem (MS/MS) (76). L'analyse nécessite l'ajout d'un standard interne puis une première phase d'hydrolyse acide afin de séparer les acides gras du lipide A. Les acides gras libres sont ensuite extraits avec un solvant organique. La séparation des acides gras est ensuite réalisée dans un système d'HPLC, puis la détection est effectuée à l'aide d'un spectromètre de masse à triple quadripôle (MS/MS). Le principe de cette méthode est détaillé dans la Figure 6.

Figure 6 : quantification du 3-hydroxy-myristate (3HM) par chromatographie liquide haute performance et spectrométrie de masse en tandem (HPLC/MS/MS).



Dans le triple quadripôle, l'azote est utilisé comme gaz de collision. L'ion précurseur a une masse de 243,2 Daltons (Da) pour le 3HM et de 229,2 Da pour le standard interne (SI : 3OH-C13:0) ; l'ion produit par une coupure β de l'extrémité carboxylique est le même pour les 2 avec une masse de 59 Da. Le résultat de la quantification du 3HM est donné par le ratio des surfaces des pics d'abondance du standard « externe » (SE : 3HM) sur celui du standard interne (ratio SE/SI) rapporté à une gamme de concentration connues.

Cette technique a l'avantage d'être insensible aux inhibiteurs présents dans la matrice de l'échantillon. Toutefois, la relation entre la concentration molaire de 3HM mesurée et celle de LPS dans l'échantillon de départ dépend de la stœchiométrie du 3HM des LPS analysés, qui peut varier selon les espèces (de 4 à 8 3HM par LPS, voire plus). De même, le passage de la concentration molaire à la concentration massique de LPS nécessiterait la connaissance de la masse moléculaire des LPS en question. On peut donc uniquement extrapoler la concentration massique d'un LPS particulier de composition connue, qui a par exemple été ajouté dans un milieu.

D. LPS et lipoprotéines

1. L'hyperlipidémie septique

L'infection ou un contact expérimental avec les LPS isolés provoquent un grand nombre de modifications des paramètres biologiques. Les perturbations des paramètres lipidiques en font partie. Le terme « hyperlipidémie septique » a été décrit dès 1959 lors d'une épidémie de choléra, puis dans une population plus variée (77). Des études ont montré que cette hyperlipidémie était essentiellement liée à l'accumulation de VLDL (*very low-density lipoproteins*), mais aussi à d'autres lipides comme les triglycérides, les acides gras libres (78). Ces modifications seraient dues à une diminution du catabolisme et une augmentation de la production des lipoprotéines (79), régulées par la réponse cytokinique à l'infection. Cela suggère que les lipoprotéines jouent un rôle à part entière dans l'immunité innée (80).

2. Interactions lipoprotéines/LPS

L'étude de la distribution biologique du LPS lors d'une injection *in vivo* a mené à découvrir qu'il était en grande partie (>75%) (81) liée à la partie lipidique du plasma, notamment aux lipoprotéines HDL (*high density lipoproteins*) (82) et LDL (*low density lipoproteins*) (83), et que cette interaction se faisait en 2 étapes, la deuxième requérant la présence de sérum (84). Une fois lié aux lipoprotéines, le LPS perd une grande partie de sa capacité pyrogène. La liaison aux lipoprotéines abolit l'effet du LPS sur la mortalité de souris adrénalectomisées (84). En fait, l'affinité du LPS pour les lipoprotéines est si forte que les lipoprotéines peuvent induire un déplacement quasi-complet des LPS liés au récepteurs TLR4 à la surface de monocytes chargés en LPS (85).

Il a été démontré ensuite que même les lipoprotéines ne contenant pas de cholestérol, et notamment les chylomicrons, sont capables de lier et neutraliser l'activité et la mortalité induite par le LPS (86). En réalité, ces découvertes mettent en évidence un « inhibiteur » majeur de la réactivité avec le LAL dans le plasma. Ainsi, les chylomicrons peuvent « absorber » une énorme quantité de LPS (>10 pg/mg), qui devient indétectable par le LAL après incubation (87).

La liaison entre les lipoprotéines et le LPS n'est pas sous la dépendance d'un quelconque récepteur mais plutôt de nature hydrophobe. Les LPS se lient à la

monocouche lipidique des lipoprotéines, via une interaction entre les phospholipides de surface et le lipide A, qui est un glycolipide phosphorylé (88). En comparant la capacité de liaison des LPS avec les différentes lipoprotéines et particules lipidiques, une analyse statistique par régression linéaire a démontré que le seul facteur prédictif de l'affinité était leur teneur en phospholipides (89).

3. Protéines de liaison et de transfert du LPS

Comme évoqué plus haut, il est connu depuis longtemps que l'interaction LPS-lipoprotéines est sous la dépendance de protéines sériques (84). Des protéines interagissant avec le LPS, la mieux connue est sans doute la LBP (*LPS binding protein*). La LBP a un rôle majeur dans l'activation de la réponse inflammatoire par les LPS en formant avec eux un complexe dans le plasma avant de faciliter l'interaction avec TLR4 (90). En milieu aqueux, les LPS forment des agrégats micellaires, voire des vésicules. La LBP facilite le transfert du LPS depuis sa forme micellaire vers CD14 puis TLR4/MD-2 (91), mais aussi vers les lipoprotéines (85). Ainsi, la LBP participerait à la fois à l'activation cellulaire et au catabolisme des LPS, avec un bilan net probablement en faveur de l'activation.

Cependant, le gène de la LBP appartient à la famille LT/LBP (*Lipid transfer/LBP*), codant pour des protéines qui sont toutes capables de lier le LPS. Cette famille comprend notamment la BPI (*bactericidal permeability-increasing protein*), la CETP (*cholesterol ester transfer protein*), et la PLTP (*phospholipid transfer protein*) (92). Notre équipe s'est intéressé particulièrement à la PLTP ces dernières années, et à son rôle dans le catabolisme et l'élimination du LPS (38).

La PLTP est une protéine ubiquitaire ayant la propriété de lier et transférer de nombreux composé amphipathiques, notamment phospholipides, cholestérol, diacylglycérols (93). Elle est notamment retrouvée associée dans le plasma aux complexes protéiques de l'immunité innée (94). La PLTP est bien capable, comme la LBP, de lier les LPS sous forme monomérique à partir d'agrégats pour les transférer sur les lipoprotéines (95,96). Par ailleurs, notre équipe a démontré qu'il existait chez des souris déficientes en PLTP une accumulation de LPS dans la fraction non-lipoprotéique du plasma aux dépens des HDL, ainsi qu'une augmentation des cytokines pro-inflammatoires et une diminution du contenu biliaire en LPS (97). Ces résultats ont été confirmés par d'autres équipes, qui ont retrouvé un important effet

protecteur de la PLTP sur la survie des souris exposées au LPS, qui semble indépendant de la taille des particules de HDL, sur laquelle la PLTP a également une influence (98).

Récemment, notre équipe a mis au point un procédé de fabrication de PLTP humaine recombinante (rhPLTP). Grâce à une collaboration avec l'INRA de Jouy-en-Josas, un modèle de lapins transgéniques exprimant la PLTP humaine, sous la dépendance du promoteur WAP, a été développé. Les lapines sécrètent ainsi de grandes quantités de PLTP dans leur lait, qui peut ensuite être purifiée. Chez les souris déficientes en PLTP, l'administration intraveineuse de rhPLTP a permis d'améliorer drastiquement la survie après injection d'endotoxine, et même lors d'un sepsis poly microbien (ponction-ligature caecale) (99). Chez les animaux ayant reçu la rhPLTP, l'excrétion biliaire de 3HM était fortement augmentée, confirmant le rôle de la protéine dans le transport du LPS vers le foie. Malgré cette augmentation du passage hépatique de LPS, le tissu hépatique des souris ayant reçu la rhPLTP présentait moins de signes d'inflammation (99).

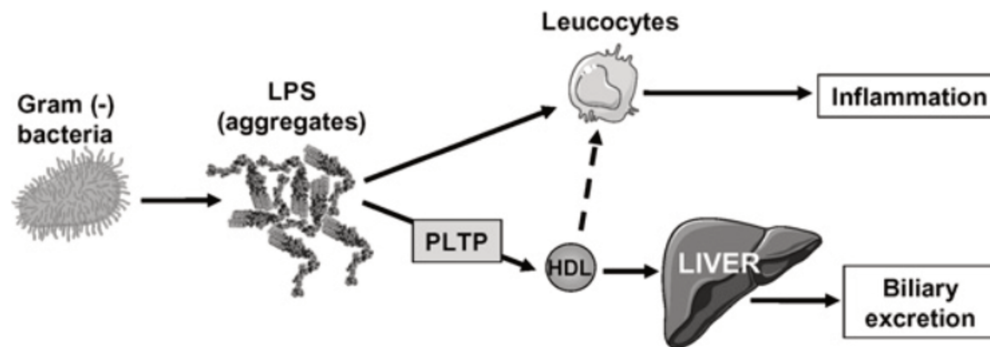
4. Modèle du « transport réverse »

Notre équipe a donc largement contribué à la compréhension du métabolisme du LPS. En résumé ces recherches ont conduit à confirmer :

- l'importance qualitative et quantitative de la liaison des LPS aux lipoprotéines,
- le rôle de protéines de transfert des lipides, dont la principale semble être la PLTP, pour faciliter la désagrégation des LPS et leur prise en charge par les lipoprotéines,
- l'élimination terminale du LPS par le foie via la sécrétion biliaire,
- et enfin le rôle anti-inflammatoire protecteur de cette voie de retour hépatique.

Au total, ces données décrivent une voie alternative à la voie pro-inflammatoire (passant par les leucocytes et cellules endothéliales exprimant TR4) qui conduit au transport du LPS jusqu'au foie via les lipoprotéines pour une excrétion biliaire terminale (Figure 7). Notre équipe a dénommé cette voie « transport reverse du LPS », par analogie au transport réverse du cholestérol (38). En effet, l'organisme n'étant pas capable de cataboliser ces lipides bactériens, l'excrétion biliaire constitue la seule voie d'élimination.

Figure 7 : Transport réverse du LPS, d'après Gautier et Lagrost, 2011 (38)



Devenir du LPS dans l'organisme selon 2 voies principales, inflammation ou excrétion biliaire *via* les lipoprotéines avec l'aide de la PLTP (*phospholipid transfer protein*). La voie d'excrétion est appelée « transport réverse du LPS » en raison de l'homologie avec la voie de transport réverse du cholestérol.

Ce nouveau paradigme ouvre la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le sepsis, visant à augmenter le transport réverse du cholestérol à plusieurs niveaux :

- Le traitement par PLTP recombinante semble extrêmement prometteur au vu des données expérimentales évoquées plus haut (99).
- La voie PCSK9 (*proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*) : récemment, l'arsenal des traitements hypocholestérolémiants s'est enrichi avec les inhibiteurs de PCSK9 sous la forme d'anticorps monoclonaux (evolocumab, alirocumab). PCSK9 est une molécule qui se lie au LDL récepteur (LDLR) dans le cytosol, empêchant son recyclage membranaire après internalisation ; son inhibition augmente de ce fait la densité membranaire des LDLR (100), et diminue le taux de LDL en augmentant le transport réverse « indirect » du cholestérol. Au cours du TRC classique ou « direct », les apolipoprotéines A1 des HDL se lient aux hépatocytes via le récepteur SR-B1 ce qui permet le transfert de cholestérol aux hépatocytes sans que la particule HDL entière soit internalisée (138). Il existe aussi une voie « indirecte » pour le TRC, passant par le transfert des esters de cholestérol sur les LDL par la CETP (cholesteryl ester transfer protein), puis l'internalisation des LDL par les hépatocytes via les LDLR (138). Contrairement au TRC qui passe principalement par les HDL, il

semble que le transport du LPS vers le foie dépende plus des LDL, probablement car l'excrétion des LPS nécessite l'internalisation complète de la particule.

Il a été montré que PCSK9 est surexprimée au cours du sepsis (101), tout comme chez les patients hypercholestérolémiques (102). Dans une cohorte de patients en choc septique, Walley et al. (103) ont montré que les patients présentant une mutation avec perte de fonction de PCSK9 présentent un taux de survie significativement amélioré par rapport aux patients non mutés (72 vs 61% de survie à J28), alors que l'effet inverse était constaté chez les patients présentant une mutation avec gain de fonction (57% de survie). L'inhibition de PCSK9 au cours du sepsis est donc une sérieuse piste thérapeutique qui semble capable d'accélérer le transport réverse du LPS (103). Les résultats précliniques sont malgré tout plutôt mitigés (104).

- Enfin, l'épuration extra-corporelle du LPS apparaît comme une « troisième voie » possible pour shunter la voie naturelle du transport réverse du LPS. Cette voie est particulièrement intéressante car l'incapacité de l'organisme à cataboliser le LPS et d'autres PAMPs contribue probablement à la physiopathologie du sepsis.

En effet, l'élimination des LPS (et des autres PAMPs lipidiques comme l'acide lipoteichoïque (LTA)) par le transport réverse peut être inefficace de plusieurs façons au cours du sepsis :

- il peut être submergé par un inoculum bactérien trop important,
- et/ou primitivement défaillant, un ou plusieurs des maillons de la chaîne du transport réverse faisant défaut : déficit en PLTP, dénutrition avec baisse des lipoprotéines, surexpression de PCSK9, défaillance hépatique, etc...

Cette défaillance pourrait notamment expliquer l'augmentation de la sensibilité au LPS liée au vieillissement (105), et donc la moyenne d'âge élevée des patients atteints de sepsis.

III. Techniques d'épuration extracorporelle

A. Hémo perfusion directe à la polymyxine B

1. Principe, données *in vitro* et précliniques

L'hémo perfusion directe à la polymyxine B (PMX-DHP) est une des techniques les plus anciennes et les plus utilisées. Les polymyxines sont des polypeptides cationiques amphipathiques dérivés de *Bacillus polymyxa*. Les polymyxines B et E (colistine) sont utilisées en pratique clinique comme antibiotique efficace sur les BGN, mais leur usage est limité par une importante toxicité rénale et neurologique. Leur pouvoir antibactérien est lié à leur capacité à lier de façon stable le LPS, de par leur caractère partiellement hydrophobe (106).

L'épuration du LPS présente un intérêt ancien en clinique (traitement du sepsis), mais aussi pour purifier et décontaminer des solutions protéiques dans le domaine des biotechnologies. C'est dans ce contexte que la polymyxine a naturellement été choisie comme ligand dès les années 80. La polymyxine a été fixée d'abord sur des billes polymériques (Sephacrose™) et a montré une grande capacité d'épuration sur des solutions protéiques diverses (107), mais aussi dans des modèles animaux (108). Cependant une étude plus récente révélait que la polymyxine immobilisée sur ces substrats (y compris le dispositif clinique Toraymyxin® sur polystyrène) se libère en réalité du polymère, son action étant fortement diminuée par l'ajout d'un inhibiteur de la PMX soluble (109). Dans cette étude rigoureuse, une diminution du LAL de 25 à 35% seulement était constatée avec les différents dispositifs à la PMX (109).

2. Essais cliniques

Les premières études cliniques ont été menées au Japon sur un dispositif d'hémo perfusion directe (c'est à dire sur sang total) où la polymyxine B est immobilisée sur des fibres de polystyrène (Toraymyxin®, Toray Industries, Japon) (110). Malgré un petit nombre de patients (16 dans la première étude), Toraymyxin obtient le remboursement par la sécurité sociale japonaise. Ce traitement est donc largement utilisé dans ce pays depuis 1994 (111) pour les cas de sepsis sévère et choc septiques, classiquement avec 2 séances de 2 heures séparées de 12 heures. Pendant longtemps, aucun essai randomisé de grande envergure n'était disponible, et

ce traitement n'a pas été adopté par d'autres pays. Le premier essai pilote (n= 35) randomisé européen a été publié en 2005 (112), et retrouvait une amélioration hémodynamique mais sans différence de mortalité, et surtout sans diminution significative du LPS évalué par le LAL. Par la suite, l'essai multicentrique italien EUPHAS (n= 64) a également retrouvé un impact favorable du traitement sur les paramètres hémodynamiques (pression artérielle et doses de vasopresseurs), mais aussi une diminution de la mortalité (113). Les résultats de cet essai ont été critiqués car les inclusions ont été arrêtées prématurément en raison de la positivité de l'analyse intermédiaire. En 2018, les résultats très attendus de l'essai nord-américain EUPHRATES ont été publiés (57). Dans cet essai très bien construit, des patients en choc septique ont été inclus et randomisés entre PMX-DHP (2 séances de 2 heures) et placebo (hémo perfusion « factice »). La particularité de cet essai était de ne sélectionner que des patients chez qui un taux élevé de LPS était détecté, par une technique rapide de chimiluminescence sur sang total évoquée plus haut (EAA), quelle que soit l'origine et/ou la documentation bactériologique du sepsis. Ainsi, 450 patients ont été inclus sur 792 patients ayant passé le test sanguin. Il n'y avait aucune différence significative entre les 2 bras en ce qui concernait la mortalité à 28 jours. De plus, malgré la sélection de patients « endotoxémiques » et la réalisation de 2 séances d'hémo perfusion, aucune différence significative sur le taux de LPS mesuré par EAA n'a été retrouvée... Un autre essai randomisé, sélectionnant des patients en choc septique sur une péritonite (a priori plus à risque d'endotoxémie, mais sans dosage « sélectif »), s'est avéré négatif avec même une augmentation (non significative) de la mortalité dans le bras PMX-DHP (58).

Dans ce contexte, le traitement par PMX-DHP est actuellement dans l'impasse et il paraît peu probable qu'il fasse l'objet d'autres autorisations et/ou recommandations, même si d'autres essais sont en cours.

B. Autres méthodes d'épuration extracorporelle du LPS

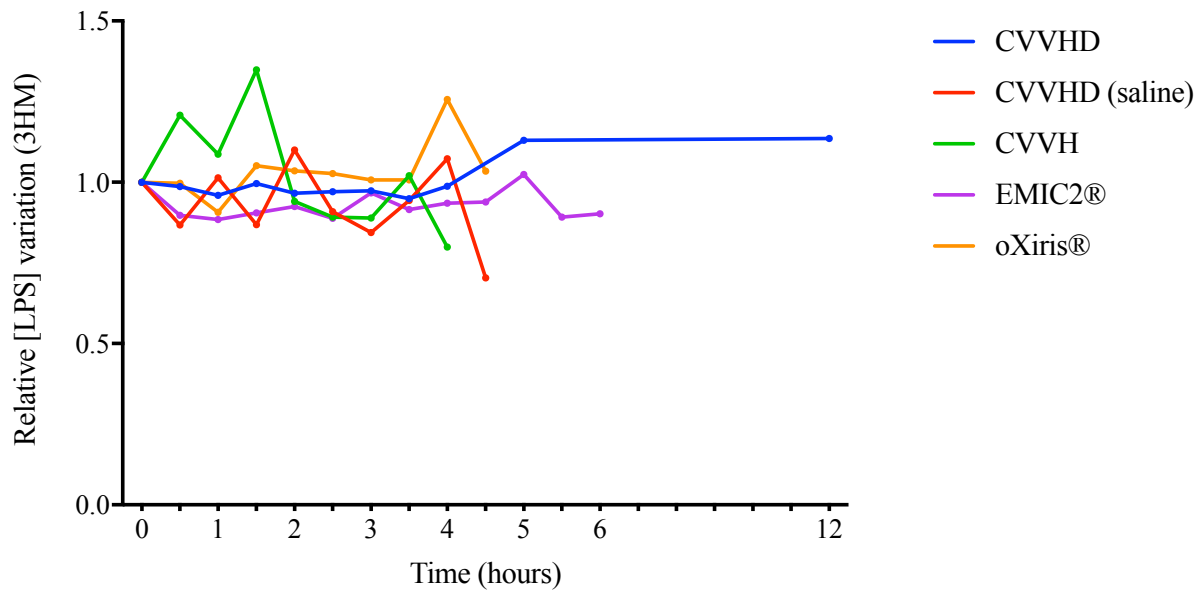
1. Épuration extra-rénale par hémodialyse et hémofiltration

L'intérêt de l'épuration extra-rénale (EER) précoce au cours du sepsis a fait l'objet d'un débat acharné, générant des centaines de publications sur les 20 dernières années.

D'un point de vue clinique, ce débat est en passe d'être tranché, de nombreuses publications récentes suggérant l'absence de bénéfice à réaliser une EER précoce (114,115).

Pour les tenants d'une EER précoce, la détoxification des endotoxines et cytokines, notamment par l'hémofiltration, est un argument physiopathologique majeur et récurrent, encore aujourd'hui. En ce qui concerne le LPS, cet argument est infondé. En effet, sous sa forme monomérique (12 kDa pour *E. coli* O55B5), une molécule de LPS pourrait passer à travers les pores d'une membrane d'épuration extra-rénale (environ 40 kDa). Cependant, en solution aqueuse, les LPS n'existent pas sous cette forme et forment des agrégats micellaires dont la masse peut dépasser 1000 kDa. L'incapacité de l'hémofiltration à épurer le LPS a d'ailleurs été démontrée par des modèles animaux (116). Cependant, les firmes ont développé des membranes spécifiques capables d'associer hémofiltration à haut volume et adsorption de LPS (117) et/ou de cytokines (118). Notamment, l'hémofiltre oXiris® (Baxter, USA) est doté d'une membrane fonctionnalisée avec des molécules d'héparine ainsi qu'une couche de polyéthylène imine (PEI), un polymère cationique dont les charges positives auraient la capacité de lier le LPS, porteur de charges négatives au niveau des phosphates du lipide A (119). Des études cliniques sont en cours (117). Au début de ce travail, nous avons testé cette membrane avec d'autres en utilisant un modèle d'EER continue sur du sang total issu de l'établissement français du sang (2 poches pour un volume d'environ 900 ml), dans lequel du LPS était ajouté et incubé avant de circuler sur un circuit d'épuration clinique (machine Multifiltrate®, Fresenius, Allemagne). La membrane oXiris®, comme les autres membranes y compris à haut *cutoff* (EMIC2®, Fresenius), n'a pas montré d'efficacité dans ce modèle pour diminuer la concentration de LPS estimée par le 3HM (Figure 8).

Figure 8 : Évolution des taux de 3HM au cours du temps dans un modèle d'épuration *ex-vivo* avec sang total humain enrichi en LPS sur machine Multifiltrate® (Fresenius)



Les valeurs de 3HM (3-hydroxy myristate) sont exprimées en valeur relative par rapport à la concentration à T0 (=1). Toutes les séances ont été réalisées avec du sang total humain sauf une avec du sérum salé isotonique (en rouge). Séances CVVHD et CVVH réalisées avec une membrane Polysulfone AV1000 S (Fresenius).

CVVHD : *continuous veno-venous hemodialysis* ; CVVH : *continuous veno-venous hemofiltration*

2. MATISSE

Le système MATISSE (Fresenius, Allemagne) est basé sur les capacités de fixation de l'endotoxine de l'albumine humaine, immobilisée sur des billes de polyméthacrylate dans la cartouche. Des expériences *in vitro* ont montré des résultats favorables, et des études précliniques de phase I ont démontré la sécurité du dispositif (120). Cependant, les résultats d'un essai randomisé sur 145 patients atteints de sepsis sévère ou de choc septique ont été décevants, ne montrant pas d'amélioration significative des défaillances d'organe ni de la survie (121).

3. CTR (Lixelle)

Une autre méthode d'adsorption utilise un adsorbant appelé CTR, qui contient un composé organique hydrophobe (partie liant le LPS) fixée à des billes de cellulose poreuses. Ce dispositif est basé sur le système Lixelle (Kaneka Corporation, Osaka, Japon), qui est utilisé pour adsorber la β 2-microglobuline dans le traitement de l'amylose liée à la dialyse (122). La colonne Lixelle et sa version modifiée CTR ont

toutes deux montré une réduction de la mortalité chez des rats exposés au LPS (123). Cependant, seules deux études préliminaires chez l'homme ont été effectuées, avec des résultats positifs intermédiaires sur les cytokines et l'oxygénation pulmonaire (124).

4. ALTECO

Le système d'adsorption Alteco LPS Adsorber (Alteco Medical, Lund, Suède) est constitué d'un polypeptide synthétique adsorbant le LPS, lié à des disques de polyéthylène poreux. Seules de petites études cliniques négatives ou peu convaincantes ont été menées, ainsi qu'un essai randomisé, négatif et arrêté précocement (125).

5. La plasmaphérèse

La plasmaphérèse consiste à retirer la quasi-totalité du volume plasmatique circulant (environ 3 litres) au cours d'une séance d'une à quatre heures en séparant, *via* une circulation extracorporelle, le plasma des éléments figurés par centrifugation ou filtration. Le volume retiré est compensé par du plasma issu de donneurs ou par de l'albumine humaine selon la situation clinique. D'un point de vue théorique, cette technique pourrait sembler la plus efficace pour extraire un maximum de LPS du compartiment vasculaire. C'est pourquoi la plasmaphérèse a été testée dans certaines indications cliniques et dans des modèles animaux d'endotoxémie (126). Dans les méningococcémies invasives, un type d'infection à diplocoques Gram-négatif (*Neisseria meningitidis*) à l'origine d'une morbi-mortalité dramatique chez des enfants et adultes jeunes, de nombreux cas cliniques et petites séries encourageants ont été rapportés mais aucun essai contrôlé n'a été réalisé (127), et il n'y a quasiment aucune donnée sur la diminution éventuelle de l'activité du LPS.

C. LDL-aphérèse

1. L'hypercholestérolémie familiale

L'hypercholestérolémie familiale (HF) est l'une des maladies héréditaires les plus fréquentes avec dix millions de personnes atteintes dans le monde. L'HF est causée

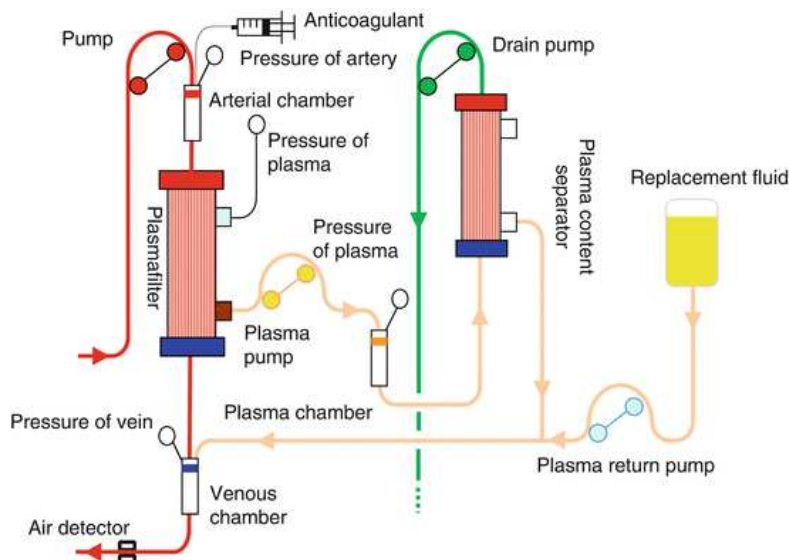
le plus fréquemment par des mutations sur le gène du récepteur aux LDL, mais il a également été décrit que des mutations sur les gènes de l'apolipoprotéine B et de PCSK9 produisent le même phénotype. L'hypercholestérolémie est presque toujours due à une augmentation du taux de LDL-cholestérol (LDL-c), généralement associée à une augmentation des VLDL et à une diminution des HDL. Ces perturbations accélèrent le développement de l'artériosclérose, en particulier coronarienne. L'HF a une prévalence de 1/500 sous forme hétérozygote et 1/1 000 000 sous forme homozygote. Les patients atteints d'HF homozygote décèdent presque tous d'une maladie coronarienne avant l'âge de 30 ans, en l'absence de traitement (128).

Dans les formes d'HF les plus graves notamment homozygotes, les mesures hygiéno-diététiques et les traitements hypolipémiants disponibles sont souvent insuffisants. L'épuration extracorporelle du LDL (LDL-aphérèse) est alors un traitement de choix pour limiter la progression de l'athérosclérose en diminuant le taux de LDL-c au maximum (129). C'est une approche thérapeutique agressive, coûteuse, développée comme traitement de secours et justifiée par la gravité du pronostic de ces patients et par son efficacité sur la survie à long terme dans la forme homozygote (130), avec une régression possible des lésions d'artériosclérose sous traitement (131). Le traitement est réalisé dans l'un des 17 centres référents en France, qui prennent en charge une centaine de patients au total (132).

2. Techniques de LDL-aphérèse

Les échanges plasmatiques ont d'abord été utilisés pour contrôler des cas d'hypercholestérolémie sévères « historiques » (133). Par la suite, un système de plasmaphérèse par double filtration en cascade (DFPP) a été développé au Japon (134). Ce dispositif a permis d'améliorer un peu les résultats obtenus avec la plasmaphérèse classique, et il est toujours disponible aujourd'hui, commercialisé par 2 fabricants (Cascadeflo®, Asahi, Japon ; et Monet®, Fresenius, Allemagne). Le principe est détaillé dans la figure 8. Les performances ont été améliorées avec une diminution du LDLc de 56-62% (132). Cependant, de grandes quantités d'albumine ainsi que des HDL sont également épurés, ce qui peut être délétère.

Figure 8 : Système de plasmaphérèse par double filtration (DFPP)



En rouge, le sang du patient est d'abord filtré par le premier filtre (« plasmafiltre ») avec une membrane à très haut seuil de séparation ou *cutoff* (2 000 kDa) ne gardant que les éléments figurés. En orange, le plasma ainsi filtré passe à travers un 2^e filtre avec une membrane à *cutoff* plus bas (1000 kDa) qui va garder les plus grosses particules dont les lipoprotéines qui vont être évacuées avec l'effluent, en vert. Le liquide filtré est restitué après le plasmafiltre avec un ajout de soluté de substitution pour compenser les pertes.

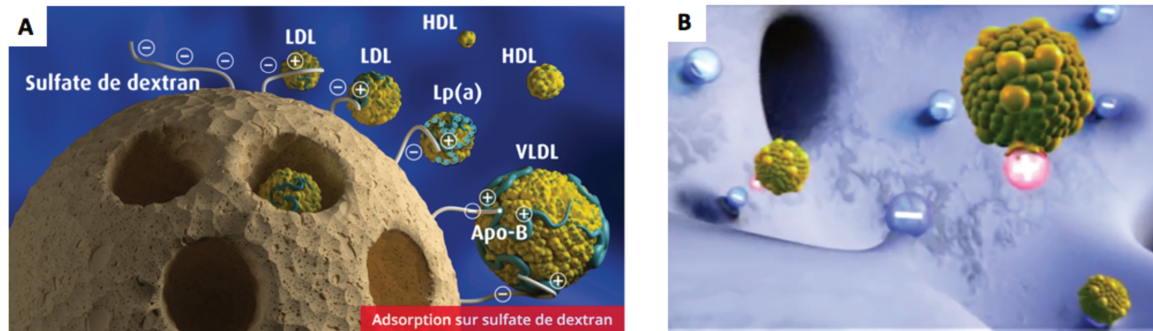
Dès les années 1980, des systèmes d'élimination sélective des LDL utilisant leurs propriétés physico-chimiques ont été développés selon 3 grands principes :

- l'immunoabsorption (TheraSorb™, Miltenyi Biotec, Allemagne) par des anticorps de mouton dirigés contre l'apolipoprotéine B, présente à la surface des LDL (135)
- la précipitation des LDL en milieu acide avec l'héparine dans le système HELP (Heparin-induced Extracorporeal LDL Precipitation, B. Braun, Allemagne).
- la charge électrique du LDLc (Liposorber® et DALI®)

Ces 2 dernières techniques basées sur le principe d'adsorption électrostatique sont les plus utilisées en France, devant la DFPP. Dans le cas de Liposorber® (Kaneka Corporation, Allemagne), les billes sont chargées de sulfate de dextran (figure 9A) (136); pour DALI® (Fresenius, Allemagne), les billes de polyacrylamide sont recouvertes de polyacrylate (figure 9B) (137). Dans les deux cas, de nombreuses charges négatives sont présentes à la surface des billes, et vont attirer et immobiliser les particules de LDL portant des charges positives sur l'apolipoprotéine B affleurant

à la surface. Les VLDL, lipoprotéine A et triglycérides vont également être liés dans une moindre mesure.

Figure 9 : Principe de l'adsorption par les charges négatives de Liposorber® (A) et DALI® (B)



Ces colonnes permettent d'obtenir une excellente efficacité (53-76% de diminution du LDL) et sont disponibles en hémoperfusion directe, permettant de raccourcir les séances (environ 2h). En revanche, ces 2 types de colonnes, de par leurs charges négatives, peuvent activer les bradykinines du plasma, provoquant des réactions anaphylactoïdes exacerbées notamment chez les patients sous inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IEC) (138).

Article n°1

I. Introduction

L'objectif de ce travail était d'utiliser la technique de détection du LPS par spectrométrie de masse (3HM) pour mieux décrire la distribution et l'évolution des taux de LPS chez des patients admis en réanimation, présentant des critères de sepsis ou non, mais aussi chez des personnes volontaires sans pathologie aiguë. Comme on l'a vu plus haut, les travaux descriptifs utilisant le LAL en réanimation ont conduit à des résultats contradictoires et parfois contre-intuitifs. Notamment, l'absence de corrélation franche et reproductible entre la présence de BGN dans les hémocultures et l'activité endotoxine mesurée par le LAL (39). La mesure de la concentration de 3HM permet une quantification plus exacte du LPS circulant car elle permet d'accéder à la plus grande partie du LPS qui est intégrée aux lipoprotéines dans la circulation (81). Notre hypothèse de départ était donc que la quantification du 3HM allait complètement changer la vision de l'endotoxémie et probablement permettre d'obtenir une meilleure corrélation entre les données cliniques (sévérité, bactériémie à BGN) et le taux effectif de LPS. Un autre problème était que, cette technique étant encore assez « jeune », nous ne disposions pas encore de données sur les taux « normaux » observables chez des sujets sains.

Pour répondre à ces différentes questions, nous sommes partis d'une étude clinique observationnelle menée entre 2013 et 2016 dans plusieurs centres de réanimation, et pour laquelle une collection biologique (aliquots de plasma) avait été récoltée et conservée au Centre de Ressources Biologiques Ferdinand Cabanne (CHU Dijon). Cette étude, l'étude IVOIRE, avait pour objectif principal d'évaluer l'impact de la vulnérabilité socio-économique des patients sur la sévérité clinique à l'admission et l'évolution en réanimation. Les échantillons étaient disponibles à l'admission pour les patients inclus à Dijon (n=507) et des prélèvements avaient été réalisés à d'autres temps au cours du séjour. Les critères d'inclusion étaient essentiellement la présence d'une thérapeutique de suppléance d'organe (catécholamines, épuration extra-rénale, ventilation mécanique, oxygénothérapie à haut débit). Cette population présentait l'avantage d'englober différents types de diagnostics, et le cahier de recueil des données (CRF) comprenait ces informations avec classification en critères de

39

syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS), sepsis, sepsis sévère ou choc septique (définitions « Sepsis 2 » en vigueur à l'époque (2)). Les données de bactériologies étaient cependant incomplètes, et un travail de recueil rétrospectif de données a été nécessaire pour les patients qui présentaient une bactériémie (n=60). Afin d'obtenir des données chez des personnes « saines », nous avons procédé au recrutement de volontaires avec l'aide du Centre d'Investigation Clinique (CIC). Sur le plan éthique, l'étude IVOIRE n'étant pas clôturée, nous avons pu faire passer un amendement au comité de protection des personnes (CPP) autorisant le recrutement des témoins pour analyses complémentaires, avec l'édition des formulaires de consentement et d'information correspondants. Nous avons pris soin de sélectionner ces témoins pour que la distribution des âges correspondent à notre cohorte clinique. Les résultats de ce travail sont présentés sous la forme d'un article présenté ci-après, accepté le 10 août 2019 dans le journal *Intensive Care Medicine* (format *Letter to the Editor*).

II. Article (tel qu'accepté pour publication dans *Intensive Care Medicine*)

Improved quantification of plasma lipopolysaccharide (LPS) burden in sepsis using 3-hydroxy myristate (3HM): a cohort study

Auguste Dargent^{1,2}, Jean-Paul Pais De Barros², Elea Ksiazek³, Isabelle Fournel³, Alois Dusuel², Anne Laure Rerole², Hélène Choubley², David Masson², Laurent Lagrost² and Jean-Pierre Quenot^{1,2,3}

1 Médecine Intensive Réanimation, CHU Dijon, 14 rue Paul Gaffarel 21000 Dijon

2 Univ. Bourgogne Franche-Comté, LNC UMR1231, F-21000 Dijon, France ; INSERM, LNC UMR1231, F-21000 Dijon, France ; FCS Bourgogne-Franche Comté, LipSTIC LabEx, F-21000 Dijon, France

3 INSERM, CIC 1432, Module Epidémiologie Clinique, Dijon, France ; CHU Dijon-Bourgogne, Centre d'Investigation Clinique, Module Epidémiologie Clinique/Essais Cliniques, Dijon, France

Corresponding author:

Auguste Dargent, MD

Address: Médecine Intensive Réanimation, CHU Dijon, 14 rue Paul Gaffarel 21000 Dijon

Email: auguste.dargent@chu-dijon.fr

Telephone: +33 03 80 29 37 51

ORCID iD: 0000-0003-1784-1212

Acknowledgements

The authors thank Prof; Marc Bardou, Agnès Maurer and Dr Maxime Luu, at the Centre d'Investigation Clinique Plurithématique (INSERM, CIC-P 1432), for the recruitment of healthy volunteers. The authors also thank Fiona Ecartot (EA3920, University Hospital Besancon, France) for translation and editorial assistance. Finally, the authors thank all the patients and volunteers who agreed to participate in this study.

Dear Editor,

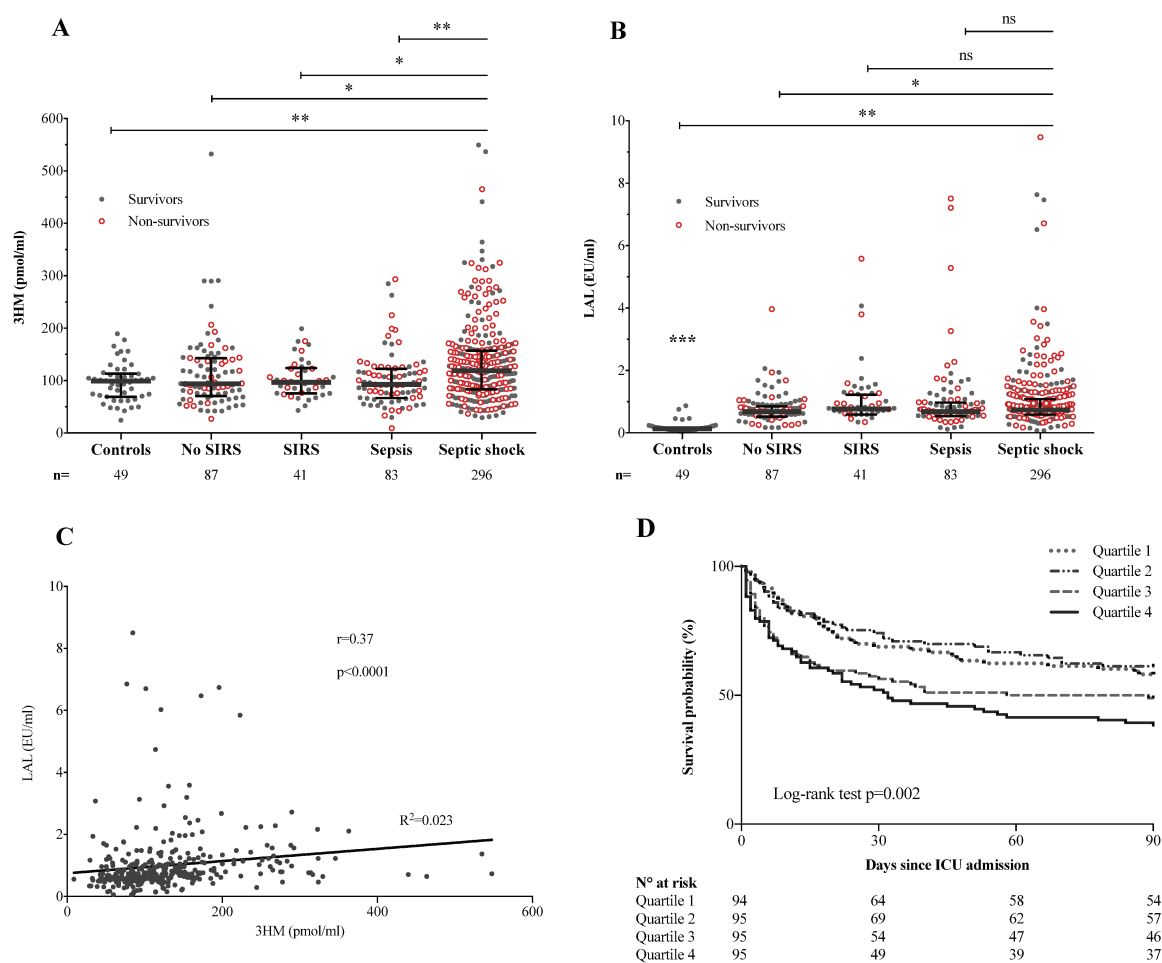
Lipopolysaccharide (LPS) has a pivotal role in sepsis pathophysiology, but its measurement with limulus amoebocyte lysate (LAL) and other bioassays yielded conflicting results in clinical studies [1]. We developed a mass spectrometry method retaining LAL's sensitivity in plasma for LPS quantitation, using a specific compound, 3-hydroxy myristate (3HM). When LPS is spiked in plasma, 3HM concentration remains stable, whereas LAL reactivity is decreasing rapidly over time [2]. In this observational study, we used 3HM to describe LPS concentration in a cohort of critically ill patients and in healthy control subjects.

Samples of 507 patients and 49 control subjects were analysed (methods and characteristics of patients are detailed in supplementary material), independently and blindly from clinical data. Patients were classified as septic (sepsis and septic shock), or non-septic (distribution of patients is detailed in Figure 1A&B). Septic patients had significantly higher 3HM levels when compared to non-septic patients (127 ± 75 vs 112 ± 62 pmol/ml, $p=0.02$). Moreover, 3HM levels were significantly higher in septic shock patients compared to sepsis patients, although they were similar between non-septic patients and controls (Figure 1A). Compared to baseline, 3HM levels decreased by 5-days in septic shock patients, and to a lesser extent in sepsis and non-septic patients (eFigure-1). In patients with Gram negative bacteraemia (GNB), 3HM levels were not significantly higher than in patients without bacteraemia or with non-GNB bacteraemia. LAL levels in septic patients were not significantly different from non-septic patients (1.00 ± 0.98 EU/ml vs 0.87 ± 0.67 EU/ml, $p=0.10$). Nevertheless, all patients' categories had significantly higher levels compared with controls, unlike 3HM (Figure 1B). As previously demonstrated in mice [2], the correlation between 3HM and LAL levels was weak but significant in septic patients (Figure 1C). In septic patients, 3HM levels were significantly lower in survivors compared to non-survivors (130 ± 78 vs 146 ± 71 pmol/ml, $p=0.03$, figure 1A). Ninety-day survival of septic patients was of 58% in the first quartile and 38% in the fourth quartile of 3HM (Figure 1D, $p=0.002$). Our group contributed to demonstrate the pivotal role of lipoproteins [3] and phospholipid transfer protein (PLTP) [4] in the clearance of LPS. We confirmed that both HDL and LDL cholesterol levels were significantly lower in septic patients compared to non-septic patients ($p<0.001$, eFigure-2). PLTP was positively correlated with C-reactive protein ($r=0.64$, $p<0.0001$) and significantly higher in septic compared to non-septic patients (eFigure-2).

3HM quantitation suggests that LPS is present in the circulation of non-septic critically ill patients and "healthy" controls. These results should be confirmed, but could be explained by diet-induced translocation from the gut [5]. We've found that this LPS burden is significantly higher in septic patients, and especially non-survivors. This could be the result of higher bacterial load in these patients, vascular-gut barrier alteration, but also of a decrease in the

LPS clearance capacity, i.e the failure of what we've termed the “reverse LPS transport” pathway involving lipoproteins and PLTP [4]. We believe 3HM quantitation will help to understand sepsis biology and to develop better LPS-oriented therapies.

Figure 1: Distribution of 3HM (**A**) and LAL (**B**) levels in the study subpopulations. Non-septic patients were categorized as per sepsis-2 definitions in SIRS (systemic inflammation response syndrome) or no-SIRS categories. Bars show median with interquartile range. *** (A, controls): $p < 0.001$ value for comparison with each of the other 3 categories; ** < 0.01 ; * < 0.05 ; ns: non-significant. **C:** correlation between 3HM and LAL levels (Spearman's correlation coefficient shown); **D:** survival probability according to quartiles of 3HM in the group of septic patients (i.e. with sepsis or septic shock at admission)



Keywords: Sepsis, Septic shock, endotoxemia, lipopolysaccharide, 3-hydroxy myristate

Compliance with Ethical Standards

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Ethical approval

All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional research committee (comité de protection des personnes (CPP), reference number 2013-A00095-40) and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments.

Funding

The original study was funded by the French ministry of health (Programme Hospitalier de Recherche Clinique regional) grant. The laboratory analyses presented here were supported by a French Government grant managed by the French National Research Agency under the program “Investissements d’Avenir” with reference ANR-11-LABX-0021 (LipSTIC Labex).

References

1. Cohen J (2000) The detection and interpretation of endotoxaemia. *Intens Care Med* 26:S051–S056. <https://doi.org/10.1007/s001340051119>
2. de Barros J-P, Gautier T, Sali W, et al (2015) Quantitative lipopolysaccharide analysis using HPLC/MS/MS and its combination with the limulus amebocyte lysate assay. *J Lipid Res* 56:1363–1369. <https://doi.org/10.1194/jlr.d059725>
3. Wendel M, Paul R, Heller AR (2007) Lipoproteins in inflammation and sepsis. II. Clinical aspects. *Intens Care Med* 33:25–35. <https://doi.org/10.1007/s00134-006-0433-x>
4. Gautier T, Lagrost L (2011) Plasma PLTP (phospholipid-transfer protein): an emerging role in “reverse lipopolysaccharide transport” and innate immunity. - PubMed - NCBI. *Biochem Soc T* 39:984–988. <https://doi.org/10.1042/bst0390984>
5. Erridge C (2011) Diet, commensals and the intestine as sources of pathogen-associated

molecular patterns in atherosclerosis, type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease.
Atherosclerosis 216:1–6. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.02.043>

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Patients and methods

Study population

This study used data from the French multicentre IVOIRE cohort study, an observational study designed to assess the impact of socio-economic deprivation on the severity of illness at ICU admission and on mortality. All patients aged ≥ 18 years admitted to the ICU in 8 participating centres in France and receiving at least one life support therapy for organ failure (e.g. mechanical ventilation, vasopressors or inotropic agents, renal replacement therapy, high flow nasal cannula) were eligible for inclusion. The IVOIRE study received approval from the local Ethics Committee (Comité de Protection des Personnes Est I) under the number 2013/15. It was registered with ClinicalTrials.gov under the identifier NCT01907581. All patients and/or their next of kin were informed and consent was documented in the patients' medical records by the investigator.

The present study is a biological substudy of the IVOIRE cohort, in which only critically ill patients enrolled at the ICU of Dijon university hospital were included. Patients (or their next of kin) were informed and signed an additional, specific consent form authorizing the conservation and utilization of biological samples. Plasma samples were collected on the day of inclusion (< 24 hours since ICU admission, Day 1) and on the fifth day after admission (Day 5). The samples were processed following a strict protocol, 1 hour maximum after sampling, with protocolized centrifugation and immediate freezing at -80°C , then transferred for storage at the biobank facility of Dijon University Hospital (Centre de Ressources Biologiques Ferdinand Cabanne).

Additionally, we recruited 49 healthy ambulatory volunteers to describe normal values of circulating 3HM. Volunteers were recruited with an age distribution matching that of critically ill patients. Each volunteer provided informed consent. Exclusion criteria for volunteers were: recent surgery (<30 days) or dental care (< 72 hours), any current or recent (<30 days) infectious episode with antibiotic therapy, current or recent (<30 days) immunosuppressant therapy including corticosteroids.

LPS analysis

LPS was quantified using a mass spectrometry (LC-MS/MS) patented method (EndoQuant) for detection of 3HM. For this purpose, two aliquots of plasma (50 μl) are spiked with 4 pmol of

internal standard (3-hydroxytridecanoic acid). For total 3HM quantitation, samples were hydrolysed with HCl 8 M for 3 h at 90°C. Free fatty acids were then extracted with hexane/ethyl acetate 3/2 mix, and resuspended in ethanol after vacuum evaporation. Fatty acid separation was performed in an Infinity 1260 HPLC binary system (Agilent) equipped with a ZORBAX SB-C18 C18 50 x 2.1 mm 1.8 µm column (Agilent) set at 30°C. MS/MS detection was performed using a QQQ 6490 triple quadrupole mass spectrometer (Agilent) equipped with a Jet-Stream ESI source. Quantitation of 3OH-fatty acids was performed by negative SRM mode as previously described [1, 2]. The limulus amoebocytes lysate (LAL) assay was also used in parallel (LAL chromogenic endpoint assay, Hycult Biotech). 3HM quantitation and LAL assays were both performed and analysed independently from each other in all patients and controls.

Other analyses

Plasma total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol and triglycerides were analysed with INDIKO® analyser (ThermoScientific, France); plasma cytokines (IL-6, IL8, IL-10, TNFα, IL-1β) were analysed with Milliplex MAP Cytokine Panel kits (Millipore, Billerica) with a LuminexR® apparatus (Bio-Plex 200, BioRad, Germany); phospholipid transfer protein (PLTP) activity was analysed using a specific kit from Sigma Aldrich (France).

Severity of illness assessment

Baseline severity of illness was assessed using the Simplified Acute Physiology Score (SAPS II), and the degree of baseline organ dysfunction was quantified using the Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score [3]. Patients were prospectively classified into subgroups according to the Sepsis-2 definitions (in use at the time of the study design), namely: systemic inflammatory response syndrome (SIRS), severe sepsis, and septic shock [4]. However, for clarity, we used the term “sepsis” in the manuscript to designate severe sepsis patients.

Statistical analysis

Quantitative variables are presented as mean ± standard deviation (SD) or median (Inter-Quartile Range, IQR) as appropriate, and qualitative variables as number (percentage). Analysis of variance was used to compare 3HM levels between the different groups according to sepsis severity and accordingly to level of bacteraemia (no bacteraemia, no GNB, GNB). IL-6 values were log-transformed in order to meet the conditions for ANOVA. Post-hoc analyses were conducted for two-by-two comparisons between subgroups using t test or Wilcoxon test as appropriate. Kaplan-Meier survival curves according to quartiles of 3HM were drawn and compared with a log-rank test. The course of 3HM levels between day 1 and day 5 was assessed using paired t-tests. Correlations between PLTP levels and 3HM, CRP and IL-6 levels, and LAL and 3HM levels, were assessed using Spearman's correlation coefficient. All

analyses were performed using SAS version 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) with a significance threshold set at 0.05.

References

1. Weil D, Pais de Barros J-P, Mourey G, et al (2018) Circulating levels of 3-hydroxymyristate, a direct quantification of endotoxaemia in noninfected cirrhotic patients. *Liver Int* 67:1031. doi: 10.1111/liv.13916
2. Pais de Barros J-P, Gautier T, Sali W, et al (2015) Quantitative lipopolysaccharide analysis using HPLC/MS/MS and its combination with the limulus amebocyte lysate assay. *J Lipid Res* 56:1363–1369. doi: 10.1194/jlr.D059725
3. Vincent JL, Moreno R, Takala J, et al (1996) The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. *Intensive Care Med* 22:707–710. doi: 10.1007/s001340050156
4. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al (2003) 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. In: *Crit. Care Med.* pp 1250–1256

Supplementary Table 1: Comparisons of biomarkers levels between diagnosis categories

	3HM (pmol/ml)		LAL (EU/ml)		Log[IL-6] **		PLTP (pmol/μl/h)		Total cholesterol (mmol/l)	
	Mean [95% CI]	p *	Mean [95% CI]	p *	Mean [95% CI]	p *	Mean [95% CI]	p *	Mean [95% CI]	p *
Controls	96 [77;116]	-	0.16 [-0.08;0.41]	-	-0.82 [-1.42;-0.23]	-	54 [21;87]	-	5.15 [4.34;5.94]	-
No SIRS	115 [101;130]	0.13	0.76 [0.57;0.95]	<0.01	3.36 [2.91;3.81]	<0.01	179 [154;205]	<0.01	9.30 [8.71;9.90]	<0.01
SIRS	104 [83;125]	0.59	1.1 [0.83;1.37]	<0.01	3.94 [3.29;4.59]	<0.01	202 [165;238]	<0.01	9.04 [8.17;9.95]	<0.01
Sepsis	103 [88;118]	0.60	0.98 [0.79;1.17]	<0.01	4.08 [3.62;4.54]	<0.01	242 [216;268]	<0.01	8.01 [7.46;8.71]	<0.01
Septic shock	134 [126;142]	<0.01	1.01 [0.91;1.11]	<0.01	5.51 [5.27;5.75]	<0.01	279 [265;293]	<0.01	6.72 [6.51;7.16]	<0.01

CI: confidence interval

* p-value from analysis of variance with controls as reference

** IL-6 values were log-transformed in order to meet the conditions for ANOVA

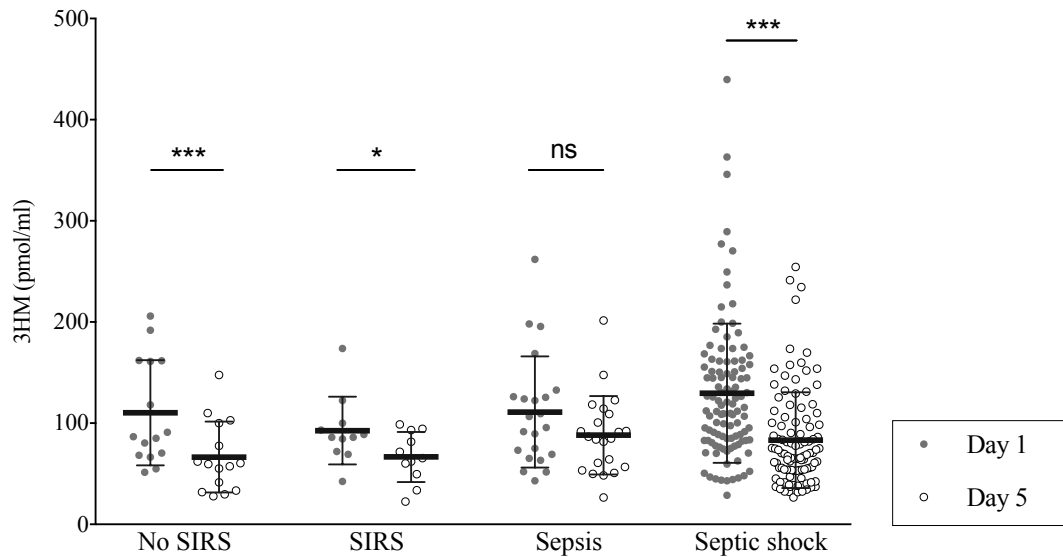
Supplementary Table 2: Characteristics of critically ill patients and control subjects

	Controls n=49	All n=507	No SIRS n=87	SIRS n=41	Sepsis n=83	Septic shock n=296
Age (years)	64.4 ±16	67.5 ±14.5	64.3 ±16.1	62.5 ±15.2	68.5±13.2	68.8 ±14
Women	24 (49)	179 (35)	33 (38)	17 (41)	25 (30)	104 (35)
SOFA	-	9.3 ±3.9	7.3 ±3.6	7.3 ±4	6.2 ±2.6	11.1 ±3.2
SAPS II	-	55.3 ±18.8	51.9 ±17.9	50.5 ±15.7	47.2 ±14	59.2 ±19.6
ICU days	-	9.1 ±14.7	7.7 ±12.2	6.7 ±12	7.5 ±9.3	10.3 ±16.8
Site of infection						
Lung	-	244 (48)	8 (9)	13 (32)	50 (60)	173 (59)
Digestive	-	29 (6)	0 (0)	1 (2)	6 (7)	22 (7)
Urinary tract	-	197 (39)	5 (6)	7 (17)	42 (51)	143 (48)
Other	-	110 (22)	2 (2)	3 (7)	24 (29)	81 (27)
Laboratory values						
Positive blood cultures	-	60 (12)	1 (1)	1 (2)	12 (14)	46 (16)
Of which GNB	-	24 (5)	1 (1)	0 (0)	4 (5)	19 (6)
CRP (mg/L)	4.1 ±6	134 ±112	51 ±61	83 ±75	139 ±104	164 ±116
Il-6 (pg/mL) , median [IQR]	0.6 [0.2;1.6]	80 [28;340]	30 [14;36]	43 [19;132]	51 [17;184]	151 [47;1115]
Total cholesterol (mmol/L)	5.15 ±1.03	7.75 ±3.10	9.30 ±2.84	9.04 ±3.36	8.01 ±3.10	6.72 ±2.84
HDL-cholesterol (mmol/L)	1.67 ±0.44	2.07 ±1.29	2.84 ±1.29	2.58 ±1.29	2.07 ±1.29	1.81 ±1.03
LDL-cholesterol (mmol/L)	3.10 ±0.90	3.88 ±2.33	4.91 ±2.58	4.65 ±2.84	3.88 ±2.07	3.10 ±2.33
PLTP (pmol/μL/h)	54 ±13	249 ±130	179 ±69	202 ±96	242 ±117	279 ±141
Treatment (n, %)						
Invasive ventilation	-	408 (81)	70 (80)	37 (90)	57 (69)	244 (82)
NIV	-	109 (22)	18 (21)	3 (7)	27 (33)	61 (21)
Vasopressors	-	373 (74)	38 (44)	17 (42)	22 (27)	296 (100)
RRT	-	132 (26)	12 (14)	4 (10)	20 (24)	96 (32)
Death (n, %)						
In ICU	-	150 (30)	17 (20)	11 (27)	18 (22)	104 (35)
At 90 days	-	229 (45)	28 (32)	16 (39)	40 (48)	145 (49)

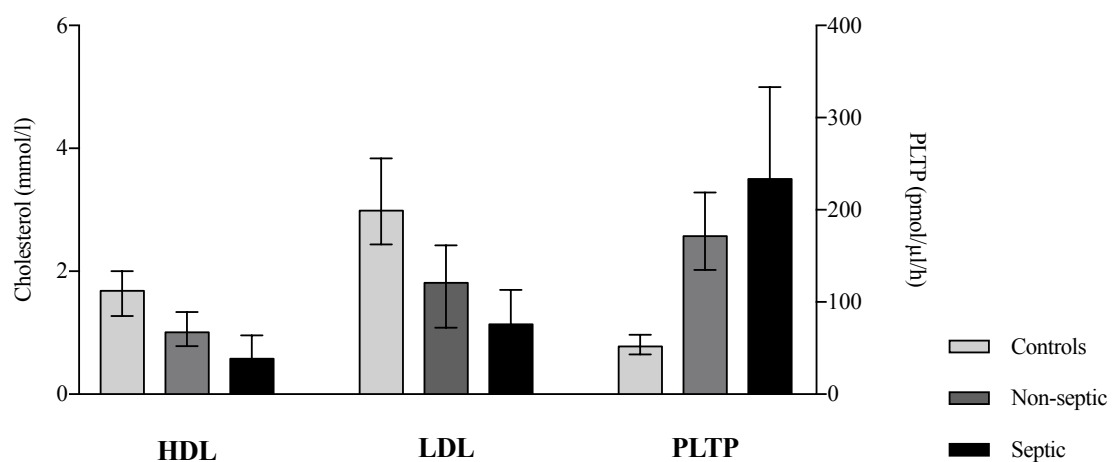
CRP: C-reactive protein; GNB: gram-negative bacteria; HDL: high-density lipoproteins; ICU: intensive care unit; LDL: low-density lipoproteins; NIV: non-invasive ventilation; PLTP: phospholipid transfer protein; RRT: renal replacement therapy; SAPS: simplified acute physiology score; SIRS: systemic inflammatory response syndrome; SOFA: sequential organ failure assessment

eFigure-1: Evolution of 3HM levels at day 5 compared to baseline in 154 patients, according to diagnostic category.

p values for paired t-tests between day 1 and day 5 measurements: *** <0.001, ** <0.01, * <0.05, ns: non-significant (p=0.06 for sepsis patients); SIRS: systemic inflammatory response syndrome



eFigure-2: Distribution of HDL, LDL cholesterol levels and PLTP activity in the study subpopulations. ***: p<0.001



III. Résultats et conclusion

Les résultats obtenus au cours de cette étude furent surprenants à bien des égards. Le test LAL et la quantification du 3HM par spectrométrie de masse sont deux analyses biologiques qui cherchent à étudier par des moyens très différents la présence de la même molécule, le LPS. Cependant, dans la publication princeps décrivant notre méthode de détection du 3HM, notre équipe décrivait déjà une corrélation significative mais imparfaite entre les deux techniques pour le dosage de LPS dans du plasma de souris après injection intra-péritonéale de LPS ($R^2 = 0,39$) (76). Les résultats de notre étude de cohorte confirment une corrélation toujours significative mais encore bien plus faible dans le plasma de patients présentant un sepsis (coefficient de corrélation de Spearman $r = 0,39$; $R^2 = 0,02$). Cela suggère que ces deux grandeurs (activité endotoxine du LAL et concentration de 3HM) donnent des informations très différentes sur le LPS. Alors que la réponse au LAL n'était pas différente entre les patients septiques et non-septiques, le taux de 3HM était significativement plus élevé chez les patients septiques. De même, les patients septiques non-survivants avaient des taux plus élevés de 3HM. En réalité, seuls les patients les plus graves ont un taux de 3HM plus élevé : les patients présentant un choc septique ont des taux de 3HM significativement plus élevés que les patients avec un sepsis sans choc, eux-mêmes ayant des taux non significativement différents des patients non septiques (Figure 1A). Par ailleurs, il n'y avait pas dans notre cohorte de différence significative entre les taux de 3HM des patients avec bactériémie à BGN et ceux des patients avec bactériémie non-BGN ou sans bactériémie. Ce résultat se rapproche de ce qui est connu et décrit dans la littérature pour l'endotoxémie décrite par le LAL (50) (certaines études retrouvant tout de même une concordance avec la présence de BGN (45)). Au total, on ne peut donc pas dire que notre technique de détection par le biais du 3HM apporte une vision vraiment nouvelle de l'endotoxémie au cours du sepsis, qui reste en tant que telle une variable peu pertinente cliniquement.

En revanche, notre étude apporte une information majeure sur la quantité de LPS présente dans la circulation chez des personnes saines, sans pathologie aiguë ou chronique connue pour être associée à une endotoxémie. Ce LPS « physiologique » est très probablement intégré aux lipoprotéines, ce qui explique son absence de réactivité avec le LAL. Ainsi dans notre étude il existe une franche différence entre les niveaux de réactivité au LAL entre les témoins et les patients de réanimation

(septiques ou non), alors que la différence de taux de 3HM est très faible et d'ailleurs non significative (Figure 1A&B). Nous pensons que cela constitue une authentique découverte, très importante pour la compréhension de ce qu'on appelle encore l'endotoxémie. L'endotoxémie ne serait donc pas uniquement une situation pathologique, observée uniquement lors de pathologies infectieuses ou provoquant une majoration de la perméabilité de la barrière intestinale, mais plutôt un phénomène physiologique observable chez tout individu. Si ce phénomène n'a pu être observé et décrit jusqu'ici, c'est parce que nous disposions d'un outil incomplet, le LAL et ses dérivés, incapable de réagir avec le LPS lorsqu'il est associé à d'autres lipides, typiquement lorsqu'il est intégré aux lipoprotéines. Cette association rapide et massive dans le plasma est d'ailleurs un fait connu de longue date, mais qui nécessitait des méthodes lourdes pour être mise en évidence, comme par exemple l'utilisation de LPS radio marqué (81). Notre méthode par spectrométrie de masse permet également de retrouver la totalité du LPS dans un échantillon biologique, contrairement au LAL (76). Le taux de 3HM retrouvé chez les patients en sepsis, même lors d'une bactériémie à BGN, est du même ordre de grandeur que les taux observés chez les témoins, même si il est significativement plus élevé chez les patients en choc septique (96 [77 ;116] vs 134 [126 ;142] pmol/ml). Si l'on admet que le 3HM retrouvé dans le plasma des sujets contrôle correspond bien à du LPS (ce qui devra être confronté à d'autres études), cela introduit un changement majeur dans la vision actuelle de l'immunité anti-infectieuse innée. La « théorie du danger » (139,140) a remplacé la théorie du non-soi, lorsque la voie TLR a été décrite. D'après ce paradigme, des quantités infinitésimales de PAMPs sont nécessaires et suffisantes pour activer le système immunitaire inné, ce qui est vérifié expérimentalement notamment par un modèle d'endotoxémie humaine où 2 ng/kg de LPS intraveineux suffisent à déclencher une réponse systémique complète (141), la dose de 1 microgramme étant létale en intraveineux (142). Cette théorie du danger implique l'existence d'une barrière entre le milieu intérieur et extérieur (y compris la lumière du tube digestif) empêchant la pénétration non seulement des pathogènes vivants mais aussi des molécules de danger (PAMPs), qui sont capables à elles seules de déclencher une réaction systémique fatale.

Or, la concentration de 3HM retrouvée chez les témoins dans notre étude équivaut à plus de 250 nanogrammes de LPS d'E. coli O55:B5 par millilitre de plasma soit plus

de 1000 fois la dose létale, alors même que les niveaux d'activité endotoxine évalués par le LAL restaient indétectables ou proche de la limite (très faible) de détection. Autrement dit, le plasma « tamponne » ou « masque » physiologiquement une énorme quantité de LPS qui ne peut donc pas être détectée par « l'activité biologique » plasmatique du LPS. Ce rôle de tampon du plasma serait donc principalement assuré par les lipoprotéines circulantes, et le LPS présent dans la circulation proviendrait logiquement du tube digestif, qui contient plus de bactéries (BGN en majorité) qu'il n'y a de cellules eucaryotes dans l'organisme entier (143). Le passage de LPS et autres PAMPs à travers la barrière intestinale a déjà été documenté dans des pathologies où il existe une inflammation chronique (47). Dans une étude récente, des sujets obèses ou non-obèses étaient prélevés avant et après un repas normal ou enrichi en graisses (144). Cette étude a démontré un enrichissement des chylomicrons post-prandiaux en LPS (méthode LAL) après un repas riche en graisse, uniquement chez les sujets obèses. Les résultats de notre étude suggèrent que ce passage de LPS pourrait être pratiquement physiologique dans la population générale.

Ainsi, les lipoprotéines et le « transport reverse » du LPS seraient un mécanisme de protection contre le sepsis, capable de réguler des variations rapides des concentrations de PAMPs lors du fonctionnement « normal » de l'organisme (par exemple après un repas riche en graisses) mais aussi lors d'infections aiguës pour protéger l'organisme contre une réaction immunitaire disproportionnée. De fait, c'est plus probablement la défaillance des mécanismes d'adaptation plutôt que la virulence des pathogène eux-mêmes qui expliquent l'apparition du sepsis, comme en atteste la moyenne d'âge et les comorbidités fréquemment rencontrées dans la population âgée qui est concernée (5). A cet égard, l'importance des lipoprotéines dans la protection contre le sepsis pourrait être parfaitement illustrée par la forte association statistique entre une hypocholestérolémie (surtout HDL) à la phase aiguë du sepsis et la mortalité précoce (145). Cette association reflète possiblement une causalité : hypocholestérolémie liée à une dénutrition, à l'âge ou d'autres facteur, conduisant à une baisse des capacités d'absorption des PAMPs et aboutissant enfin à une prédisposition au sepsis et au choc septique. Ainsi, les lipoprotéines pourraient constituer la clé de la prévention et/ou du traitement du sepsis.

Article n°2

I. Introduction

Nous avons vu que les lipoprotéines ont un rôle fondamental dans le transport et l'élimination des LPS. De plus, de nombreux éléments s'accumulent pour suggérer que cette voie est déficiente au cours du sepsis notamment la diminution des récepteurs LDL par surexpression de PCSK9 associée à un mauvais pronostic (101), et la surmortalité associée au déficit en HDL (145). Nous avons déjà montré par ailleurs que des faibles taux de cholestérol (HDL et LDL) en préopératoire d'une chirurgie cardiaque lourde était un facteur de risque de sepsis et mauvais pronostic post-opératoire (146,147). L'inhibition de PCSK9 pourrait augmenter la clairance du LPS par transport réverse en augmentant la densité hépatique des récepteurs LDL. Cette stratégie va faire l'objet d'essais cliniques pour évaluer son efficacité au cours du sepsis (103)(Clinicaltrials.gov : NCT03869073). Dans ce travail, nous avons voulu explorer une voie d'épuration extracorporelle des lipoprotéines. La LDL aphérèse est en effet très efficace pour réduire les taux circulants de LDLc chez des patients atteints d'HF, avec une diminution moindre des triglycérides et du HDLc. Nous avons émis l'hypothèse que la LDL aphérèse permettrait également de diminuer les taux circulants de LPS évalués par le dosage du 3HM. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons commencé par des expériences in vitro en utilisant du plasma humain enrichi en LPS et des billes récupérées en ouvrant une colonne DALI®. Les résultats furent d'abord décevants en utilisant du plasma issu de donneurs de l'établissement français du sang (EFS) (convention avec le laboratoire). Nous avons alors réitéré les expériences en cherchant le moyen d'obtenir du plasma le plus frais possible. Nous avons donc utilisé du plasma récupéré au laboratoire de biochimie du CHU sur des reliquats de tubes prélevés le jour même après réalisation des analyses prescrites. Cette fois-ci nous avons obtenu des résultats reproductibles permettant d'avancer dans nos investigations. Ainsi, il existe probablement dans le traitement du plasma prélevé à l'EFS un ou des facteurs qui nuisent à l'efficacité des billes de LDL aphérèse. Nous avons réalisé des expériences pour le déterminer mais malheureusement sans succès. L'anticoagulation au citrate des poches de plasma a notamment été envisagée

55

mais l'ajout de calcium au plasma (puis le retrait du caillot de fibrine ainsi formé) ne permettait pas de modifier les résultats (données non présentées).

Une fois la méthode mise au point, nous avions besoin de prélèvements de plasma humain répondant à plusieurs conditions : 1. les personnes concernées devaient être exemptes de maladies aiguës susceptibles de modifier la physiologie ; 2. les conditions de prélèvement et de stockage devaient répondre aux conditions imposées par la réglementation en vigueur, c'est à dire visées par le comité de protection des personnes (CPP). C'est pourquoi nous avons choisi de mener l'expérience *in vitro* préalablement mise au point sur les échantillons prélevés sur les témoins de l'étude décrite dans l'article n°1, recrutés dans le cadre de l'étude IVOIRE sur des critères clinique précis (absence de pathologie aiguë, de diabète, etc.) et dans un cadre réglementaire.

En parallèle, il était logique de vérifier notre hypothèse chez des patients hypercholestérolémiques traités par LDL aphérèse. Nous avons donc fait appel au centre spécialisé de l'hôpital de la Pitié Salpêtrière à Paris, sous la responsabilité du Dr Saheb. Grâce à une collaboration efficace, nous avons obtenu des échantillons de plasma pour 77 séances de LDL aphérèse (avant et après la séance), réalisée chez 41 patients.

Enfin, nous avons également à disposition des échantillons de plasma des patients de l'étude IVOIRE, qui nous permettaient de tester *in vitro* notre hypothèse chez des patients en choc septique et porteurs d'une bactériémie à BGN.

Les résultats de ce travail sont présentés sous la forme d'un article présenté ci-après, soumis au journal *The Journal of Clinical Investigation* le 14 août 2019.

II. Article (soumis dans *The Journal of Clinical Investigation*)

Auguste Dargent^{1,2}, Jean-Paul Pais de Barros², Samir Saheb³, Randa Bittar⁴, Wilfried Le Goff⁵, Thomas Gautier², Isabelle Fournel⁶, Anne Laure Rerole², Hélène Choubley², David Masson^{2,7}, Laurent Lagrost^{2,7} and Jean-Pierre Quenot^{1,2}

- 1 Médecine Intensive Réanimation, CHU Dijon, 14 rue Paul Gaffarel 21000 Dijon
- 2 Université Bourgogne Franche-Comté, LNC UMR1231, F-21000 Dijon, France
; INSERM, LNC UMR1231, F-21000 Dijon, France ; FCS Bourgogne-Franche
Comté, LipSTIC LabEx, F-21000 Dijon, France
- 3 Endocrinology Department and Apheresis Center, Hôpital Pitié Salpêtrière,
Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, 83 Bd de l'Hôpital, 75013 Paris, France
- 4 Metabolic Biochemistry Department, Hôpital Pitié Salpêtrière, Assistance
Publique-Hôpitaux de Paris, 83 Bd de l'Hôpital, 75013 Paris, France
- 5 INSERM UMR 1166, Université Pierre et Marie Curie (UPMC Univ Paris 06),
Sorbonne University, Paris, France
- 6 INSERM, CIC 1432, Module Epidémiologie Clinique, Dijon, France ; CHU Dijon-
Bourgogne, Centre d'Investigation Clinique, Module Epidémiologie
Clinique/Essais Cliniques, Dijon, France
- 7 Service de Biochimie médicale, CHU Dijon, 14 rue Paul Gaffarel, 21000 Dijon

Auguste Dargent, MD (ORCID iD: 0000-0003-1784-1212)

Médecine Intensive Réanimation, CHU Dijon, 14 rue Paul Gaffarel 21000 Dijon,
France

Email: auguste.dargent@chu-dijon.fr

Telephone: +33 03 80 29 37 51

Conflict of interest

The authors have declared that no conflict of interest exists.

Abstract

Lipopolysaccharide (LPS) is a key player in sepsis pathophysiology, and its extracorporeal removal might be used as a rescue therapy. However, LPS biology is complex and the reference extracorporeal removal method by polymyxin B (PMX) hemoperfusion yielded conflicting results. Lipoproteins are critical for physiological LPS clearance, as LPS are carried by low density lipoproteins (LDL) to the liver for elimination. We hypothesized that LDL-apheresis can be an alternate pathway for LPS removal. We demonstrated first *in vitro* that LDL apheresis microbeads are almost as efficient as PMX beads to reduce LPS concentration in human plasma spiked with LPS, whereas it is not active in phosphate-buffered saline. We found that PMX was also adsorbing lipoproteins, although less specifically. Then, we found that endogenous LPS of patients treated by LDL-apheresis for familial hypercholesterolemia is also removed during their LDL-apheresis sessions, both with electrostatic-based devices and filtration devices. Finally, LPS circulating in the plasma of septic shock and severe sepsis patients with gram-negative bacteremia was also removed *in vitro* by LDL adsorption, suggesting that LDL-apheresis could be used to treat sepsis. Overall, these results underline the importance of lipoproteins for LPS clearance, making them a prime target to study and treat endotoxemia-related conditions.

Introduction

Lipopolysaccharide (LPS), a component of the outer membrane of Gram-negative bacteria (GNB), is the most widely studied and one of the most potent pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) (1). Although its role was also demonstrated in non-septic conditions like trauma (2), obesity (3) and atherosclerosis (1), LPS is first of all a potent trigger of the innate immune response during GNB sepsis. Septic shock is the most severe presentation of sepsis, and LPS has been considered as a therapeutic target ever since it was recognized (4). After the failure of the first attempts with poorly specific monoclonal antibodies (5), encouraging results were obtained with extracorporeal removal by polymyxin (PMX) B hemoperfusion, developed in Japan (6). Unfortunately, further clinical trials did not confirm the efficacy of this treatment, neither to reduce the LPS levels in the circulation nor to improve clinical outcomes (7). The strong affinity of PMX for the lipid A moiety of LPS is, in fact, dramatically decreased when LPS is spiked in a protein solution, and even more in plasma (8).

Due to its amphipathic properties, LPS is rapidly and massively (more than 75%) bound by plasma lipoproteins (9), partly explaining the low extraction capacity of polymyxin in plasma. In the same way, lipoproteins can also carry other important lipidic PAMPs such as lipoteichoic acid (LTA), a component of gram-positive bacteria cell wall (10). Our group contributed to demonstrate the pivotal role of lipoproteins in the clearance of LPS from plasma during sepsis (11): lipoproteins bind, inactivate (12) and transport LPS molecules to the liver for biliary elimination (13). This underrecognized role of lipoproteins might be an explanation for the hyperlipidemia observed during sepsis. Indeed, sepsis is classically accompanied by a global cytokine-mediated increase of lipoproteins (14), indicating a direct role of lipoproteins in the innate immune response. Accordingly, lipoproteins levels at the onset of sepsis affect the outcome of patients: a low HDL (high-density lipoprotein) level was recently found to be the best prognostic marker for adverse outcomes in a sepsis cohort (15). This corroborates earlier findings by our group showing that low cholesterol levels (both HDL and LDL) is a risk factor of sepsis and poor clinical outcome in patients undergoing cardiac surgery (16, 17). Indeed, LPS is first bound to HDL particles in the circulation, but its elimination requires first PLTP (phospholipid transfer protein)-mediated transfer to LDL (low density lipoproteins) (13), and secondly internalization

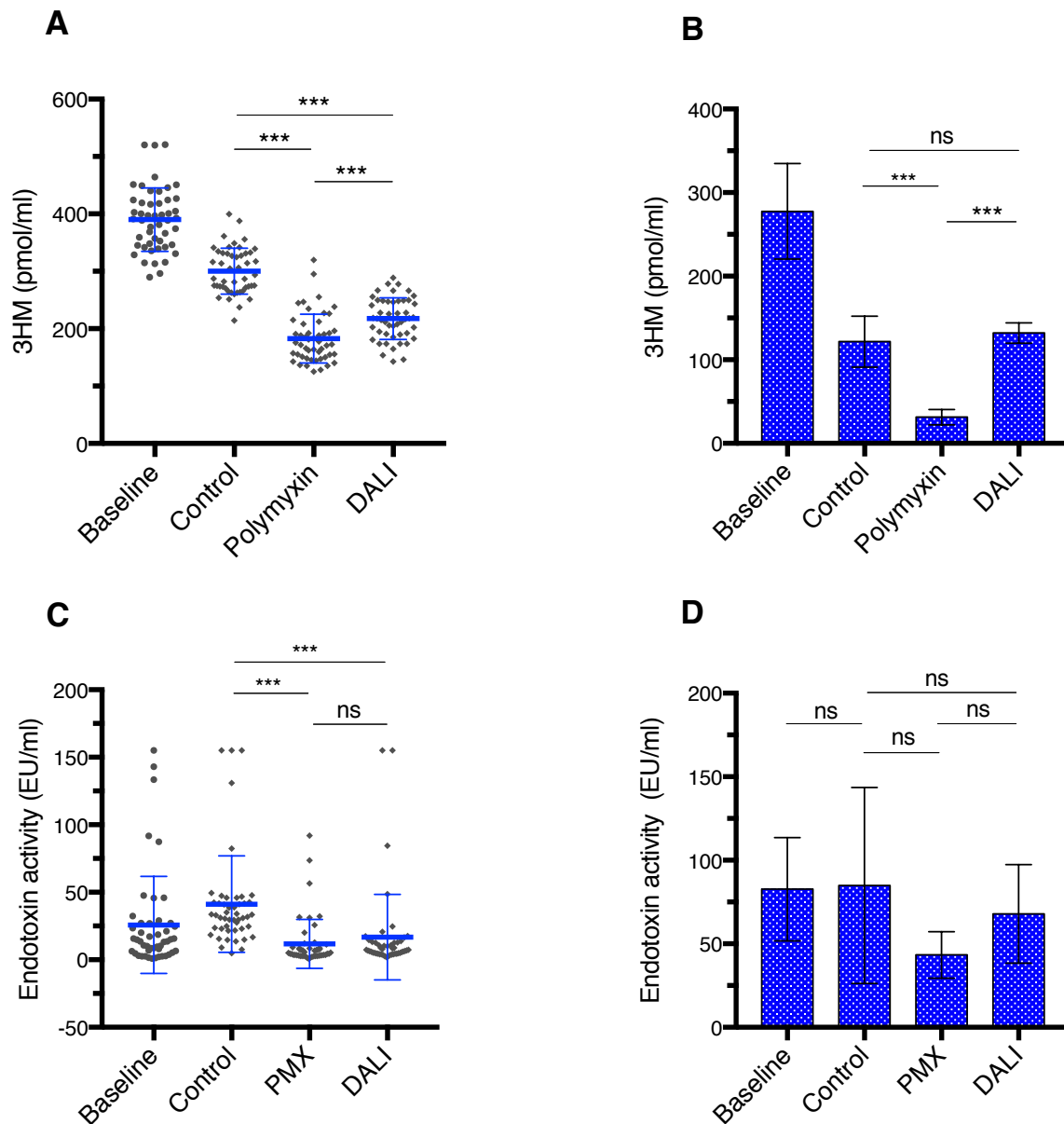
and degradation by hepatocytes via LDL receptor (LDLR-r) (18). We have termed this pathway reverse LPS transport (19) by analogy with cholesterol, and it may bear a critical role during human sepsis. We showed that PLPT-deficient mice had higher sepsis-induced mortality (20) and that recombinant PLTP could restore the biliary excretion capacity and improve survival of the animals (11). The role of LDL-r is showed in human sepsis where patients presenting loss-of-function mutations of the inhibitory protein PCSK9 (Proprotein convertase subtilisin/kexin 9) show increased survival (21) and increased clearance of both LPS (18) and LTA (22). PCSK9-induced LDL-r decrease is a feature shared by patients presenting sepsis-induced organ failure (23) and familial hypercholesterolemia (FH) (24). Patients with severe homozygous FH are successfully treated with extracorporeal LDL apheresis with columns using electrostatic adsorption of LDL particles with a negatively charged surface polymer, attracting the positively charged apolipoprotein B of LDL (25). In the present study, we hypothesized that LDL adsorption can be used to remove LPS from plasma.

Results and Discussion

LPS adsorption by LDL-apheresis microbeads in LPS-spiked healthy volunteers' plasma

To determine if LDL apheresis columns can remove LPS from plasma, we first used plasma samples from 49 healthy volunteers, spiked and incubated for 2 hours at 37°C with 500ng/ml of O55:B5 *E. coli* LPS. Each individual LPS-spiked plasma was then incubated for 2 hours with agitation at 37°C after adding one of 3 different substrates: polymyxin B crosslinked 6% agarose (Separopore® 6B-CL) beads (Endotoxin Affisorbent™, bioWorld, USA), DALI® system polyacrylate microspheres (Fresenius, Germany), and Separopore® 6B-CL (bioWorld, USA) used as control. Control beads were used to normalize the dilution induced by the hydrated substrates (sterile saline was used for priming of all substrates). For this reason, control substrate rather than baseline was used for reference in comparisons. Measurements of LPS were made using 2 different techniques. LAL remains the standard method for measuring endotoxin activity. However LAL relevance in plasma is questioned (26), as there is interference with inhibitors, mainly lipoproteins as detailed earlier. We developed a mass spectrometry method retaining LAL's sensitivity in plasma for LPS quantitation, using a specific compound, 3-hydroxy myristate (3HM). When LPS is spiked in plasma, 3HM concentration remains stable, whereas LAL reactivity is decreasing rapidly over time (27). Thus, 3HM concentration is probably a better indicator of the total amount of LPS in plasma (i.e. including lipoprotein-bound LPS), whereas LAL requires the lipid A moiety of LPS to be exposed. Endotoxin activity and 3HM levels both decreased significantly after incubation with DALI® beads compared to control beads, as well as after incubation with PMX (44.6% and 33.5% of control 3HM levels, respectively, Figure 1A; and 72.8 ±11% and 61 ±13% of control endotoxin activity, respectively, Figure 1C). The experiment was repeated in LPS-spiked phosphate buffered saline (PBS), and showed no effect of incubation with DALI beads, whereas incubation with PMX decreased LPS levels (significantly for 3HM, Figure 1B, non-significantly for endotoxin activity, Figure 1D).

Figure 1: LDL apheresis microbeads are efficiently reducing LPS levels in spiked human plasma, but not PBS.

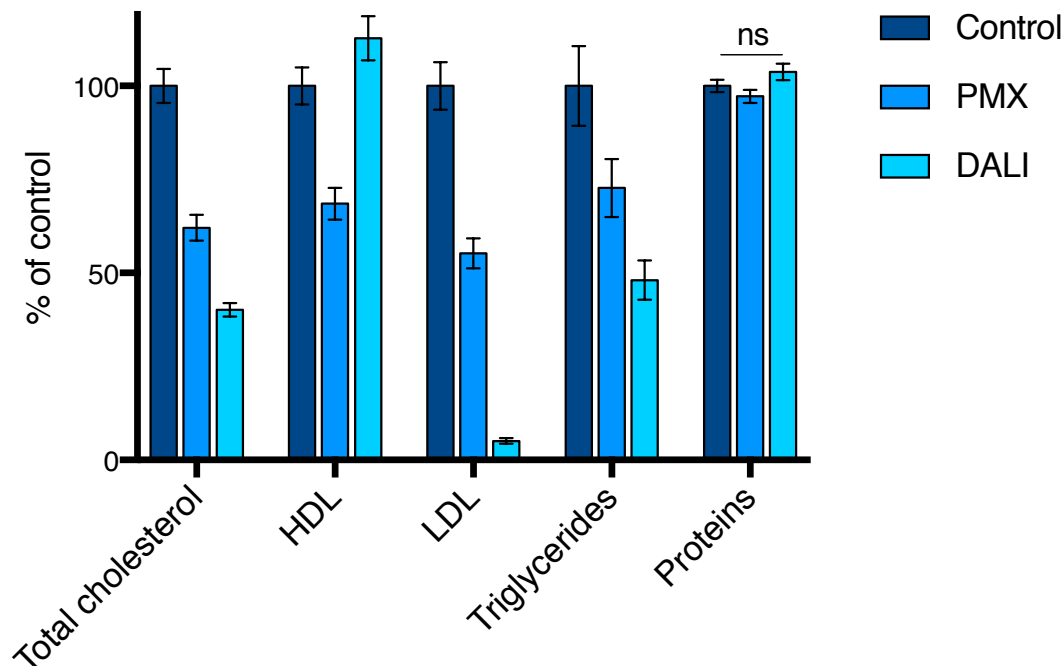


LPS levels are decreasing after incubation with both DALI® and polymyxin (PMX) microbeads in LPS-spiked human plasma from 49 healthy volunteers, as assessed by 3HM levels (A), and LAL (limulus amoebocyte assay) (C). In spiked PBS (n=3), only incubation PMX is reducing 3HM levels (B). LAL decrease with PMX did not reach significance in PBS (D). Data represent mean $\pm$ SD. *** $p < .001$ and ns: $p > 0.05$ by two-tailed paired t-test.

Adsorption of lipoproteins by both DALI and PMX

As expected, incubation with DALI beads led to profound alterations in lipid profile (Figure 2). LDL cholesterol (LDLc) levels were decreasing the most at only 5.1% of control, and HDL levels were not decreasing. As already known from clinical practice of LDL-apheresis (28), triglycerides levels were also markedly reduced with DALI (48.1% of control). More surprisingly, the lipid profile was also altered after incubation with PMX (Figure 2). Compared to DALI, LDLc and triglycerides reduction were more modest (55.3% and 72.7% of control, respectively), but there was also a reduction of HDL (68.5% of control). The dilution factor (based on protein levels variation from baseline) was around 0.75 for all 3 substrates (0.73, 0.77 and 0.75 for PMX, DALI and control, respectively). To our knowledge, the effect of PMX adsorption on global lipoprotein levels reduction is described here for the first time. However, this effect was suggested by a study demonstrating a binding of PMX with radiomarked LDL (29). In this study, hydrophobic interaction between PMX and LDL particles could explain the observed reduction. PMX is indeed an amphiphilic molecule, with a polar (cationic) and a non-polar moiety. Hydrophobic bonds are also critical in the interaction between LPS and PMX (28). The hydrophobic adsorption of lipoproteins by PMX would have 2 consequences: first, it would be a new, underrecognized mode of action of PMX for reducing LPS burden (by adsorbing both the lipoprotein and the LPS molecules bound to the lipoprotein); secondly, it might competitively inhibit PMX's direct binding of LPS in its other forms: bound to monocytes, comprised in intact bacteria or cell wall debris, micelles (1)...

Figure 2: PMX beads are reducing LDL but also HDL cholesterol levels, whereas LDL apheresis beads are mostly efficient in reducing LDL and triglycerides.



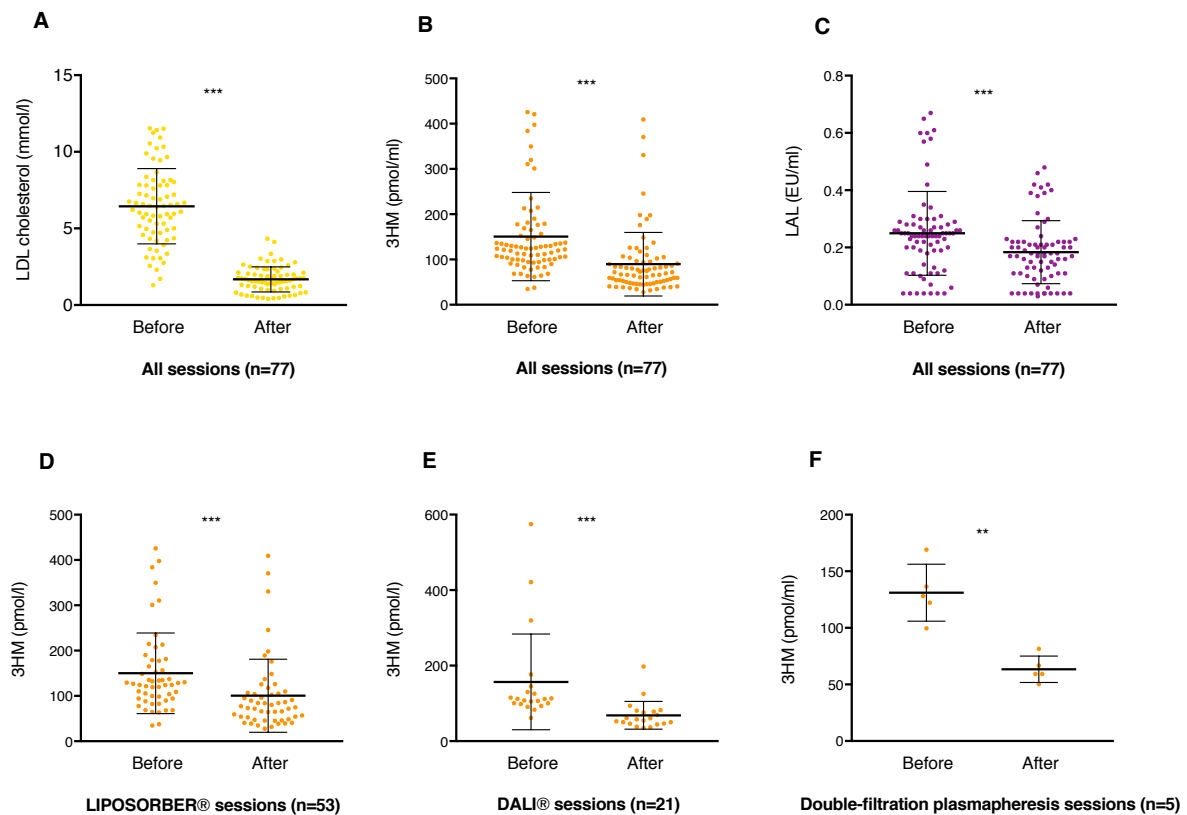
Data represent mean percentage reduction from baseline $\pm$ SEM. All paired comparisons for difference (3 per parameter) were statistically significant (two-tailed paired t-test $p < .05$), except for control and DALI® protein levels (ns: not significant).

Efficacy of clinical LDL-apheresis to remove endogenous LPS from the circulation in patients with familial hypercholesterolemia

To determine if the effect observed in LPS-spiked human plasma could be reproduced in a clinical setting with endogenous endotoxemia, we analyzed samples from patients with familial hypercholesterolemia (FH) undergoing LDL-apheresis sessions. Blood samples were drawn before and after each session. As expected, LDLc was effectively reduced by apheresis techniques down to 26 ± 9 % of baseline (Figure 3A). We analyzed samples from 77 LDL-apheresis sessions performed on 41 individual

patients. Overall, LPS levels decreased between the sample drawn before and after the LDL-apheresis session, as assessed by 3HM (150.6 ± 97 vs 89.7 ± 70 pmol/ml, $p < 0.0001$, Figure 3B) or LAL (0.25 ± 0.15 vs 0.18 ± 0.11 EU/ml, $p = 0.0002$, Figure 3C). We compared the LPS level reduction observed with the different apheresis techniques. Most patients were treated with the Liposorber® system (Kaneka, Japan), using a column filled with microbeads coated with dextran sulfate providing negative charges to attract the apolipoprotein B present at the LDL surface (31). When looking only at the 53 (69%) Liposorber® sessions, 3HM reduction was still significant (150 ± 89 vs 100.5 ± 81 pmol/ml, $p < 0.001$, Figure 3D). The second more frequently used apheresis system was the DALI® system (Fresenius, Germany). This system is based on the same basic principle of electrostatic adsorption, but uses polyacrylate instead of dextran sulfate (25). In the 19 (25%) DALI® sessions we analyzed, 3HM levels were also reduced (156.8 ± 127 vs 68.4 ± 37 pmol/ml, $p < 0.001$ Figure 3E). The remaining 5 sessions (6.5%) used double-filtration plasmapheresis (DFPP). DFPP takes advantage of the large size of lipoproteins to separate them from other plasma constituents, combining a plasma filter (2 000kDa molecular weight cutoff membrane separating plasma from blood cells) with a second membrane with lower cutoff (1 000kDa) (32). This method is used in patients in whom other systems are not well tolerated or insufficient. In DFPP sessions, 3HM levels were also decreased (131.25 vs 63.4 ± 12 pmol/ml, $p = 0.009$, Figure 3F). Even though few DFPP sessions were analyzed, this result is suggesting that LPS reduction induced by LDL apheresis is due to the removal of lipoproteins themselves and not to a direct fixation of LPS by beads, e.g. by electrostatic interactions, although this can't be ruled out by our results.

Figure 3: LPS levels are decreased after LDL apheresis sessions in patients with familial hypercholesterolemia.



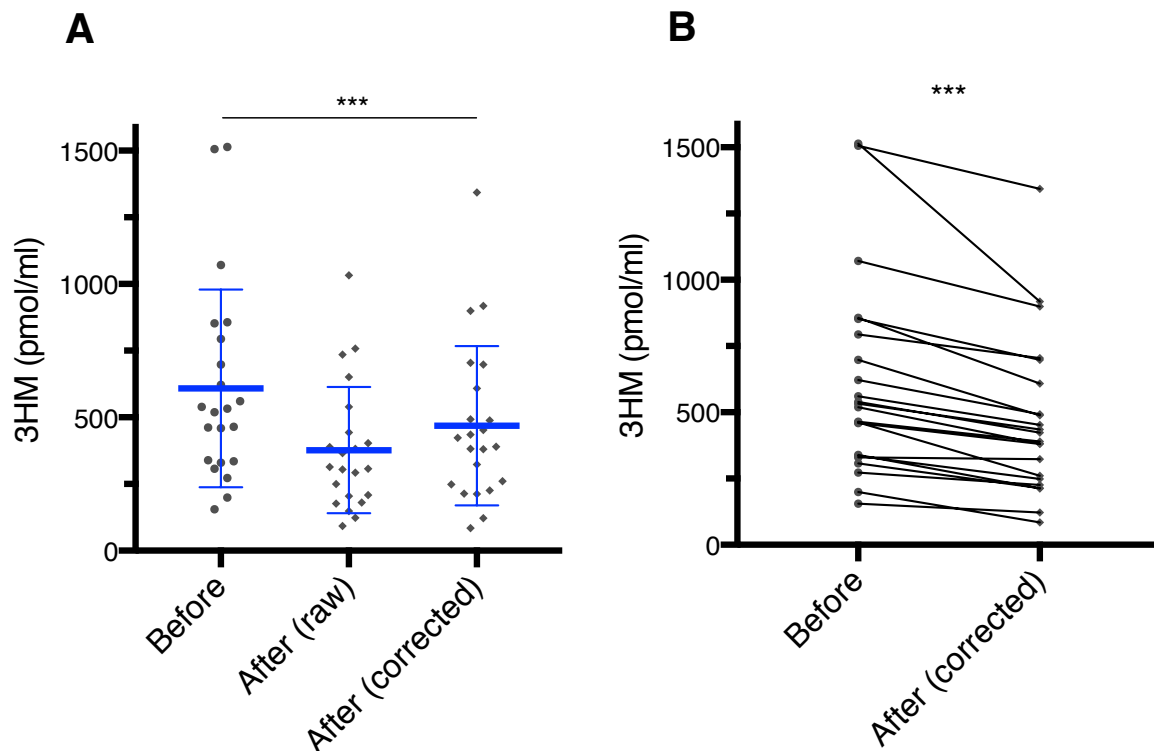
We confirmed the efficacy of these LDL apheresis sessions on LDL cholesterol levels (85,2% reduction) (A). LPS levels were decreasing after 77 LDL apheresis sessions performed in 41 patients, as assessed by 3HM levels (B) and LAL (limulus amoebocyte assay) (C). LPS reduction is significant regardless of the apheresis technique: with LIPOSORBER® (D), DALI® (E) or double-filtration plasmapheresis (F). Data represent mean $\pm$ SD. *** $p<.001$ and ** $p<.01$ by two-tailed paired t-test.

Removal of endogenous LPS in patients presenting severe gram-negative bacteria infections

After demonstrating that LDL adsorption is efficiently removing spiked LPS from healthy human plasma, and that endogenous LPS from FH patients is also removed by LDL apheresis sessions, we sought to determine if endogenous, “pathogen-related” LPS can also be removed from the circulation. To that end, we used plasma from a cohort of critically ill patients recruited in our center. Plasma samples drawn at their admission to the intensive care unit were available for 507 patients, 60 of them with

positive blood cultures, of whom 24 were positive for GNB. Finally, plasma samples (500µl aliquots stored at -80°C) from 22 patients were used (2 consent forms missing). Nineteen of them (86%) presented with septic shock criteria, the 3 other patients had severe sepsis according to sepsis-2 definitions applying at the time of study (33). Each of these samples was incubated as described before for 2 hours at 37°C with DALI® microbeads (200mg of beads for 400µl of plasma), without additional LPS spiking. The small volume of available plasma per patient prevented the use of the agarose control substrate. To make up for the absence of control, the 3HM levels after incubation were corrected for each patient using measured protein dilution factor, averaging 0.83 ± 0.16 . Of note, the protein dilution factor was not significantly different when compared head-to-head with control substrate in previous *in vitro* experiments (Figure 2). The following correction formula was applied to each incubated sample: [corrected 3HM] = [measured 3HM] / [individual dilution factor]. Corrected 3HM levels were significantly decreased by 24% ($p < .0001$, Figure 4) after incubation with DALI® microbeads. This is suggesting that LDL apheresis can also remove LPS circulating during GNB-induced septic shock and sepsis.

Figure 4: LPS reduction by LDL apheresis in the plasma of septic patients with GNB bacteremia.



3HM levels are decreased in the plasma of 22 septic patients with GNB bacteremia, even after correction of the 3HM levels after incubation with protein dilution (A). Before-after comparison shows a significant 24.1% reduction (B). *** $p < .001$ with two-tailed paired t-test.

In conclusion, we demonstrated for the first time that LDL apheresis is a viable alternative to PMX adsorption to remove LPS from circulating plasma. Extracorporeal LPS removal during sepsis is still in the focus of research with many recent and ongoing trials, despite disappointing results obtained with PMX hemoperfusion. LPS levels reduction with PMX hemoperfusion was low or even absent when it was measured in clinical trials (7). Our results show that LDL adsorption is almost as efficient as PMX to reduce LPS concentration in plasma spiked with a high LPS dose, whereas it is not active in PBS. This is indicating that the LPS reduction with LDL apheresis microbeads is indeed mediated by LDL adsorption and not by direct binding of LPS by the beads. On the other hand, we found that PMX could also non-specifically adsorb lipoproteins (probably via hydrophobic interactions), an underrecognized fact

that could account for a part of its efficacy in plasma. Paradoxically, it could also compromise the efficacy of “free” LPS clearance from the circulation by competitive inhibition, and partly explain the poor results obtained with PMX hemoperfusion for septic shock (7, 34). The efficacy of LDL apheresis to remove LPS was confirmed in a cohort of patients undergoing therapeutic LDL apheresis for FH. Endotoxemia is commonly associated with atherosclerosis and hypercholesterolemia (35), and LPS removal could contribute to the reduction in atherosclerosis observed in these patients (36). Lastly, LDL adsorption reduced LPS levels in plasma from septic patients with GNB bacteremia, suggesting that this strategy could also be used to treat sepsis. However, our study does not allow to conclude that the LPS reduction obtained with LDL apheresis can reduce *in vivo* inflammation accordingly, i.e. the removed LPS may already be out of reach of the TLR4 pathway. Overall, these results still confirm the major role of the reverse LPS transport by circulating lipoproteins, making them a prime target to study and treat endotoxemia-related conditions. Our study suggests that LDL apheresis could be readily used during sepsis to remove LPS and potentially other harmful pathogen lipids.

Methods

Detailed Methods are provided in the Supplemental Methods.

Statistics. Data analysis were performed using GraphPad Prism 7. Normally distributed data were analyzed using paired, 2-tailed Student's *t* test. Quantitative variables are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD). All analyses were performed using with a significance threshold set at 0.05.

Study approval. The institutional review board (Comité de Protection des Personnes Est I, Dijon) approved the protocol for the collection of LDL apheresis patients' samples, and considered it to constitute routine clinical practice as no additional samples were drawn. The need for informed consent was waived, but all patients or their relatives were given clear information about the study, and their non-opposition was obtained. Collection of nominative data was approved by the national authority for the protection of privacy and personal data. Plasma samples from septic patients and healthy control subjects originate from a clinical study which received approval from

the local Ethics Committee (Comité de Protection des Personnes Est I) under the number 2013/15.

Author contributions

AD, JPPDB, LL, DM and JPQ were responsible for the study concept and the design of experiments. AD, JPPDB, HC and ALR performed the experiments and LPS analysis. SS recruited LDL apheresis patients. RB, WLG and TG collected plasma samples and biologic parameters, helped with their storage and transfer. IF managed clinical data and statistical analysis. AD, JPPDB, LL, DM and JPQ supervised and drafted the manuscript.

Acknowledgements

The authors thank Pr Christiane Mousson of Dijon University hospital, for her help in obtaining DALI® cartridges. The authors thank Pr Marc Bardou, Agnès Maurer and Dr Maxime Luu, at the Centre d'Investigation Clinique Plurithématique (INSERM, CIC-P 1432), for the recruitment of healthy volunteers. The authors also thank Fiona Ecartot (EA3920, University Hospital Besancon, France) for translation and editorial assistance. This work was supported by a French Government grant managed by the French National Research Agency under the program "Investissements d'Avenir" with reference ANR-11-LABX-0021 (LipSTIC Labex). The cohort study was funded by a French ministry of health (Programme Hospitalier de Recherche Clinique regional) grant.

References

1. Munford RS. Endotoxemia-menace, marker, or mistake?. *J Leukocyte Biol* 2016;100(4):687 698.
2. Charbonney E et al. Endotoxemia Following Multiple Trauma. *Crit Care Med* 2016;44(2):335–341.
3. Boutagy NE, McMillan RP, Frisard MI, Hulver MW. Metabolic endotoxemia with

obesity: Is it real and is it relevant?. *Biochimie* 2016;124:11–20.

4. Besredka A. De l'anti-endotoxine typhique et des anti-endotoxines, en général. *Annales de l'Institut Pasteur* 1906;20:149–154.

5. Bhat N, Bieber M, Chapman C, Stevenson F, Teng N. Human antilipid A monoclonal antibodies bind to human B cells and the i antigen on cord red blood cells.. *J Immunol Baltim Md* 1950 1993;151(9):5011–21.

6. Hanasawa K et al. Novel mechanical assistance in the treatment of endotoxic and septicemic shock.. *ASAIO transactions* 1989;35(3):341 343.

7. Dellinger PR et al. Effect of Targeted Polymyxin B Hemoperfusion on 28-Day Mortality in Patients With Septic Shock and Elevated Endotoxin Level: The EUPHRATES Randomized Clinical Trial.. *Jama* 2018;320(14):1455 1463.

8. Harm S et al. Endotoxin adsorbents in extracorporeal blood purification: do they fulfill expectations?. *Int J Artif Organs* 2014;37(3):222 232.

9. Roth R, Levin F, Levin J. Distribution of bacterial endotoxin in human and rabbit blood and effects of stroma-free hemoglobin.. *Infect Immun* 1993;61(8):3209–15.

10. Levels JH, Abraham PR, van Barreveld EP, Meijers JC, van Deventer SJ. Distribution and Kinetics of Lipoprotein-Bound Lipoteichoic Acid. *Infect Immun* 2003;71(6):3280–3284.

11. Deckert V et al. Recombinant human plasma phospholipid transfer protein (PLTP) to prevent bacterial growth and to treat sepsis. *Sci Rep-uk* 2017;7(1):3053.

12. Vreugdenhil AC et al. Lipopolysaccharide (LPS)-Binding Protein Mediates LPS Detoxification by Chylomicrons. *J Immunol* 2003;170(3):1399–1405.

13. Levels J et al. Lipopolysaccharide Is Transferred from High-Density to Low-Density Lipoproteins by Lipopolysaccharide-Binding Protein and Phospholipid Transfer Protein. *Infect Immun* 2005;73(4):2321–2326.
14. Tripp RJ, Tabares A, Wang H, Lanza-Jacoby S. Altered Hepatic Production of Apolipoproteins B and E in the Fasted Septic Rat: Factors in the Development of Hypertriglyceridemia. *J Surg Res* 1993;55(5):465–472.
15. Cirstea M et al. Decreased high-density lipoprotein cholesterol level is an early prognostic marker for organ dysfunction and death in patients with suspected sepsis.. *J Crit Care* 2017;38(Intensive Care Med 33 1 2007):289–294.
16. Lagrost L et al. Low Preoperative Cholesterol Level Is a Risk Factor of Sepsis and Poor Clinical Outcome in Patients Undergoing Cardiac Surgery With Cardiopulmonary Bypass*. *Crit Care Med* 2014;42(5):1065–1073.
17. Lagrost L, Girard C, Masson D, Bonithon-Kopp C. The authors reply. *Crit Care Med* 2014;42(10):e686–e687.
18. Walley KR et al. PCSK9 is a critical regulator of the innate immune response and septic shock outcome. *Sci Transl Med* 2014;6(258):258ra143-258ra143.
19. Gautier T, Lagrost L. Plasma PLTP (phospholipid-transfer protein): an emerging role in ‘reverse lipopolysaccharide transport’ and innate immunity. *Biochem Soc T* 2011;39(4):984–988.
20. Gautier T et al. Effect of Plasma Phospholipid Transfer Protein Deficiency on Lethal Endotoxemia in Mice. *J Biol Chem* 2008;283(27):18702–18710.
21. Genga K et al. Impact of PCSK9 loss-of-function genotype on 1-year mortality and recurrent infection in sepsis survivors. *Ebiomedicine* 2018;38(Natl Vital Stat Rep 67 5 2018 Jul):257–264.

22. Leung AK et al. Reduced Proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) function increases lipoteichoic acid clearance and improves outcomes in Gram positive septic shock patients. *Sci Rep-uk* 2019;9(1):10588.
23. Boyd JH et al. Increased Plasma PCSK9 Levels Are Associated with Reduced Endotoxin Clearance and the Development of Acute Organ Failures during Sepsis. *J Innate Immun* 2016;8(2):211–220.
24. Cunningham D et al. Structural and biophysical studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia. *Nat Struct Mol Biol* 2007;14(5):413–419.
25. Drager et al. DALI—the first human whole-blood low-density lipoprotein and lipoprotein (a) apheresis system in clinical use: procedure and clinical results. *Eur J Clin Invest* 1998;28(12):994–1002.
26. Gnauck A, Lentle RG, Kruger MC. The Limulus Amebocyte Lysate assay may be unsuitable for detecting endotoxin in blood of healthy female subjects. *J Immunol Methods* 2015;416:146–156.
27. de Barros J-P et al. Quantitative lipopolysaccharide analysis using HPLC/MS/MS and its combination with the limulus amebocyte lysate assay. *J Lipid Res* 2015;56(7):1363–1369.
28. Julius U et al. Comparison of different LDL apheresis methods. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2014;6(5):629–639.
29. Liao W, Florén C-H. Polymyxin B complexes with and cationizes low density lipoproteins The cause of polymyxin B-induced enhancement of endocytotic catabolism of low density lipoproteins. *Biochem Pharmacol* 1993;45(9):1835–1843.
30. Mares J, Kumaran S, Gobbo M, Zerbe O. Interactions of Lipopolysaccharide and

Polymyxin Studied by NMR Spectroscopy. *J Biol Chem* 2009;284(17):11498–11506.

31. Asahi T, Yamamoto T, Kutsuki H. Blood Purification Therapies Using Dextran Sulfate Cellulose Columns Liposorber and Selesorb. *Ther Apher Dial* 2003;7(1):73–77.

32. Agishi T et al. Double filtration plasmapheresis.. *Transactions - Am Soc Artif Intern Organs* 1980;26:406–11.

33. Levy MM et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference.. *Crit Care Med* 2003;31(4):1250 1256.

34. Payen DM et al. Early use of polymyxin B hemoperfusion in patients with septic shock due to peritonitis: a multicenter randomized control trial.. *Intens Care Med* 2015;41(6):975 984.

35. Wiedermann CJ et al. Association of endotoxemia with carotid atherosclerosis and cardiovascular disease Prospective results from the bruneck study. *J Am Coll Cardiol* 1999;34(7):1975–1981.

36. Tatamia R et al. Regression of coronary atherosclerosis by combined LDL-apheresis and lipid-lowering drug therapy in patients with familial hypercholesterolemia: a multicenter study. *Atherosclerosis* 1992;95(1):1–13.

Supplementary materials: supplementary methods

Patients and methods

Healthy volunteers and critically ill patients

We used plasma samples from a biologic collection of a critically ill patients cohort from our medical intensive care unit in Dijon University hospital (IVOIRE study). Patients (or their next of kin) were informed and signed an additional, specific consent form authorizing the conservation and utilization of biological samples. Plasma samples were collected on the day of inclusion (< 24 hours since ICU admission. The samples were processed following a strict protocol, 1 hour maximum after sampling, with protocolized centrifugation and immediate freezing at -80°C, then transferred for storage at the biobank facility of Dijon University Hospital (Centre de Ressources Biologiques Ferdinand Cabanne). The IVOIRE study received approval from the local Ethics Committee (Comité de Protection des Personnes Est I) under the number 2013/15. It was registered with ClinicalTrials.gov under the identifier NCT01907581. All patients and/or their next of kin were informed and consent was documented in the patients' medical records by the investigator. Healthy ambulatory volunteers (n=49) were also recruited in this study to serve as controls. Each volunteer provided informed consent. Exclusion criteria for volunteers were: recent surgery (<30 days) or dental care (< 72 hours), any current or recent (<30 days) infectious episode with antibiotic therapy, current or recent (<30 days) immunosuppressant therapy including corticosteroids.

LDL apheresis samples

Patients were recruited in a national reference center for LDL apheresis in Paris, France. Patients received information of the study goals and gave consent. No additional blood samples were drawn, as the remaining volume of plasma from the routine sample was used for the presented analyses. No further clinical data (other than epidemiologic) were collected.

In vitro microbeads experiments

Individual plasma samples were spiked at a concentration of 500 ng/mL of O55:B5 E. coli LPS (ThermoFisher Scientific, USA), and incubated for 2 hours at 37°C without agitation. Sampling for measurement of LPS, lipid profile and proteins at time 0 (T0) was made after incubation. Each plasma was then added to three different types of microbeads prepared in separated 2ml Eppendorf tubes. Microbeads used were: polymyxin B crosslinked 6% agarose (Separopore® 6B-CL) beads (Endotoxin Affisorbent™, bioWorld, USA), DALI® system polyacrylate microspheres (Fresenius, Germany), and Separopore® 6B-CL (bioWorld, USA) as control. Microbeads were washed the same day with sterile saline (500ml for 10 grams) and stored at +4°C. In each Eppendorf tube, 400µl of plasma was added to 200mg of microbeads (1200µL of plasma per individual sample), following the plasma/substrate ratio used in clinical LDL-apheresis sessions ². Eppendorf tubes were then incubated at 37°C for 2 hours with rotative agitation (25 RPM). Supernatant plasma was sampled after settling of the beads.

LPS analyses

LPS was quantified using a mass spectrometry (LC-MS/MS) patented method (EndoQuant) for detection of 3HM. For this purpose, two aliquots of plasma (50µl) are spiked with 4 pmol of internal standard (3-hydroxytridecanoic acid). For total 3HM quantitation, samples were hydrolysed with HCl 8 M for 3 h at 90°C. Free fatty acids were then extracted with hexane/ethyl acetate 3/2 mix, and resuspended in ethanol after vacuum evaporation. Fatty acid separation was performed in an Infinity 1260 HPLC binary system (Agilent) equipped with a ZORBAX SB-C18 C18 50 x 2.1 mm 1.8 µm column (Agilent) set at 30°C. MS/MS detection was performed using a QQQ 6490 triple quadrupole mass spectrometer (Agilent) equipped with a Jet-Stream ESI source. Quantitation of 3OH-fatty acids was performed by negative SRM mode as previously described ¹. The limulus amoebocytes lysate (LAL) assay was also used in parallel (LAL chromogenic endpoint assay, Hycult Biotech).

Other analyses

Plasma total proteins and cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol and triglycerides were analysed with INDIKO® analyser (ThermoScientific, France).

Statistical analysis

Data analysis were performed using GraphPad Prism 7. Normally distributed data were analyzed using paired, 2-tailed Student's *t* test. Quantitative variables are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD). All analyses were performed using with a significance threshold set at 0.05.

Supplementary material references

1. Drager et al. DALI—the first human whole-blood low-density lipoprotein and lipoprotein (a) apheresis system in clinical use: procedure and clinical results. *Eur J Clin Invest* 1998;28(12):994–1002.
2. de Barros J-P et al. Quantitative lipopolysaccharide analysis using HPLC/MS/MS and its combination with the limulus amebocyte lysate assay. *J Lipid Res* 2015;56(7):1363–1369.

III. Résultats et conclusion

Les résultats de notre étude nous ont permis de confirmer notre hypothèse : la LDL aphérèse est effectivement efficace pour diminuer la concentration de LPS dans le plasma. Nous l'avons d'abord démontré dans un modèle *in vitro* à l'aide de plasma de sujets sains incubé avec du LPS. Ces résultats ont montré que l'efficacité des billes de LDL aphérèse, quoique modeste, reste comparable à celle des billes de PMX dans le plasma avec une diminution de 27,2% et 39,0% respectivement. Ce résultat a ensuite été confirmé dans le plasma de patients hypercholestérolémiques subissant une séance de LDL aphérèse, avec une diminution assez nette de 40,4% du 3HM sur l'ensemble des séances. Cette fois le LPS éliminé par la LDL aphérèse était bien du LPS « endogène », ce qui peut influencer sur l'efficacité de la LDL aphérèse. Enfin, en répétant l'expérience sur le plasma des patients présentant une bactériémie à BGN de l'étude IVOIRE, nous avons observé une diminution là aussi significative de 24%. L'efficacité apparemment supérieure des séances « cliniques » (40%) par rapport aux expériences *in vitro* (27% et 24%) peut s'expliquer de plusieurs façons. Notamment, la congélation préalable des prélèvements utilisés *in vitro* a pu dégrader les lipoprotéines et modifier leurs capacités d'interaction avec le LPS d'une part et avec les billes d'autre part. En effet la dégradation des lipoprotéines lors d'une cryoconservation longue est un phénomène bien décrit (148). Aussi, pour que la LDL aphérèse diminue efficacement la concentration de LPS, il faut évidemment que les LPS soient associés fermement aux lipoprotéines. Ce processus reste mal connu, et lors d'une infection aiguë comme lors d'un ajout externe de LPS *in vitro* (*spike*) il est probable que l'incorporation du LPS aux lipoprotéines ne soit que partielle.

L'autre découverte permise par ce travail est celle de la capacité inconnue jusqu'alors de la PMX à adsorber les lipoprotéines de manière non spécifique. Au regard de l'importance des lipoprotéines dans le transport des LPS, cette découverte revêt une importance particulière. Le mode d'action de la PMX serait donc plus complexe que ce qui était connu jusqu'alors, et impliquerait aussi la diminution des lipoprotéines, y compris les HDL qui sont épargnées par la LDL aphérèse. Or, on l'a vu, ces lipoprotéines ont probablement une importance particulière dans la protection contre le sepsis, au vu de l'association entre la baisse des taux de HDL et la mortalité liée au sepsis (145). Ainsi, la PMX pourrait avoir un effet délétère en diminuant les HDL qui sont les premiers accepteurs (temporellement) du LPS dans le plasma (82).

Notre hypothèse étant vérifiée, la question qui se pose est la suivante : la LDL aphérèse peut-elle remplacer l'hémoperfusion par PMX et devenir un traitement complémentaire du sepsis ? Il est bien évidemment impossible d'y répondre aujourd'hui. On peut néanmoins envisager une limite majeure déjà évoquée plus haut : pour être éliminé par la LDL aphérèse, le LPS doit être déjà incorporé et donc inactivé par les LDL. On peut cependant imaginer contourner cette limite en combinant la LDL aphérèse à l'apport de lipoprotéines « non saturées » par des perfusions de plasma frais par exemple, permettant d'augmenter la capacité de tamponnement du LPS du plasma. Aussi, l'épuration des LDL par LDL aphérèse permettrait de laisser place à de nouvelles particules de LDL endogènes en stimulant la synthèse d'apolipoprotéine B qui remonte rapidement après une séance d'aphérèse par effet rebond (149). Par ailleurs, il faut aussi rappeler que les lipoprotéines lient également d'autres lipides issus des pathogènes, dont le LTA, principal PAMP des bactéries Gram-positives (150).

Au total, nous pensons que ces données sont suffisantes pour supporter la réalisation d'un essai clinique de phase II pour tester l'efficacité et la sécurité d'utilisation de la LDL aphérèse au cours du choc septique.

Conclusion générale

Les travaux que nous présentons ici apportent un éclairage nouveau sur l'endotoxémie et le sepsis. Nos résultats sur les taux de 3HM chez les sujets sains suggèrent le caractère physiologique de la présence de quantités significatives de LPS dans la circulation. Ainsi, l'endotoxémie ne serait plus synonyme de pathologie mais reflèterait une forme de symbiose métabolique avec les bactéries, ce qui constituerait un bouleversement majeur dans notre façon de penser les interactions entre les bactéries et l'immunité de leur hôte. La relation que nous entretenons avec notre microbiote est encore mal comprise, mais il existe déjà des exemples frappants de symbiose métabolique, notamment certaines bactéries capables d'améliorer les performances sportives des coureurs de fond (151). Ce résultat pourrait aussi expliquer les difficultés rencontrées depuis des décennies pour expliquer l'absence de corrélation entre l'endotoxémie et le diagnostic ou la sévérité d'une pathologie infectieuse (notamment à BGN). Si l'on admet que le plasma renferme en permanence une certaine quantité de LPS en cours de transport/dégradation, à l'instar de n'importe quel métabolite physiologique comme l'urée par exemple, alors il devient logique que des variations aiguës de ce paramètre soient beaucoup plus difficiles à interpréter, noyées dans un « bruit de fond » physiologique. Nos résultats devront être confrontés à d'autres travaux, qui devront également déterminer quelle est la nature, l'origine, la toxicité, la cinétique de ce LPS physiologique, et aussi comment différencier ce dernier d'une endotoxémie liée à un germe pathogène, responsable d'une infection aiguë.

Aussi, nous avons confirmé que la LDL aphérèse permet de réduire les taux circulants de LPS. Les implications de cette découverte sont également nombreuses. Cela apporte tout d'abord une nouvelle confirmation de la voie de transport réverse du LPS. Mais surtout, cela ouvre des perspectives très intéressantes sur le traitement et la prévention du sepsis, qui pourraient bénéficier ainsi d'une nouvelle approche radicalement différente.

Références

1. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger PR, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis. Chest. 1992;101(6):1644–55.
2. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. Crit Care Med. 2003;31(4):1250–1256.
3. Singer M, Deutschman CS, Seymour C, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). Jama. 2016;315(8):801.
4. Vincent J, Moreno R, Takala J, Willatts S, a DA, Bruining H, et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. Intensive Care Medicine. 1996;22(7):707–710.
5. Quenot J-P, Binquet C, Kara F, Martinet O, Ganster F, Navellou J-C, et al. The epidemiology of septic shock in French intensive care units: the prospective multicenter cohort EPISS study. Crit Care. 2013;17(2):R65.
6. Brun-Buisson C, Meshaka P, Pinton P, Vallet B, Group E. EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. Intens Care Med. 2004;30(4):580–8.
7. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000. New Engl J Medicine. 2003;348(16):1546–54.
8. Lagu T, Rothberg MB, Shieh M-S, Pekow PS, Steingrub JS, Lindenauer PK. Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to

2007. Crit Care Med. 2012;40(3):754–61.

9. Ait-Oufella H, Lemoine S, Boelle P, Galbois A, Baudel J, Lemant J, et al. Mottling score predicts survival in septic shock. *Intens Care Med.* 2011;37(5):801–807.

10. Levy B, Gibot S, Franck P, Cravoisy A, Bollaert P-E. Relation between muscle Na⁺/K⁺ ATPase activity and raised lactate concentrations in septic shock: a prospective study. *Lancet.* 2005;365(9462):871–875.

11. Dargent A, Nguyen M, Fournel I, Bourredjem A, Charles P, Quenot J-P, et al. Vasopressor Cumulative Dose Requirement and Risk of Early Death During Septic Shock: An Analysis from the Episs Cohort. *Shock.* 2017;49(6):1.

12. Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock; *Crit Care Med.* 2006;34(6):1589–96.

13. Annane D, Renault A, Brun-Buisson C, Megarbane B, Quenot J-P, Siami S, et al. Hydrocortisone plus Fludrocortisone for Adults with Septic Shock. *New Engl J Medicine.* 2018;378(9):809–818.

14. Levy MM, Evans LE, Rhodes A. The Surviving Sepsis Campaign Bundle: 2018 Update. *Crit Care Med.* 2018;46(6):997–1000.

15. Angus DC. The Search for Effective Therapy for Sepsis: Back to the Drawing Board? *Jama.* 2011;306(23):2614–5.

16. Bernard G, Vincent J, Laterre P, LaRosa S, Dhainaut J, Lopez-Rodriguez A, et al. Efficacy and Safety of Recombinant Human Activated Protein C for Severe Sepsis. *New Engl J Medicine.* 2001;344(10):699–709.

17. Suffredini AF. A Role for Hydrocortisone Therapy in Septic Shock? *New Engl J Medicine.* 2018;378(9):860–1.

18. Klouwenberg PM, Cremer OL, van Vught LA, Ong DS, Frencken JF, Schultz MJ, et al. Likelihood of infection in patients with presumed sepsis at the time of intensive care unit admission: a cohort study. *Crit Care*. 2015;19(1):319.

19. HARBARTH S, HOLECKOVA K, FROIDEVAUX C, PITTET D, RICOU R, GRAU GE, et al. Diagnostic Value of Procalcitonin, Interleukin-6, and Interleukin-8 in Critically Ill Patients Admitted with Suspected Sepsis. *Am J Resp Crit Care*. 2001;164(3):396–402.

20. Becker KL, Snider R, Nylen ES. Procalcitonin assay in systemic inflammation, infection, and sepsis; Clinical utility and limitations. *Crit Care Med*. 2008;36(3):941–52.

21. Tang BM, Eslick GD, Craig JC, McLean AS. Accuracy of procalcitonin for sepsis diagnosis in critically ill patients: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2007;7(3):210–7.

22. Wu Y, Wang F, Fan X, Bao R, Bo L, Li J, et al. Accuracy of plasma sTREM-1 for sepsis diagnosis in systemic inflammatory patients: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care*. 2012;16(6):R229.

23. Pierrakos C, Vincent J-L. Sepsis biomarkers: a review. *Crit Care*. 2010;14(1):R15.

24. Singer M. Biomarkers in sepsis. *Curr Opin Pulm Med*. 2013;19(3):305–9.

25. van Engelen T, Wiersinga W, Scicluna BP, van der Poll T. Biomarkers in Sepsis. *Crit Care Clin*. 2018;34(1):139–52.

26. McHugh L, Seldon TA, Brandon RA, Kirk JT, Rapisarda A, Sutherland AJ, et al. A Molecular Host Response Assay to Discriminate Between Sepsis and Infection-Negative Systemic Inflammation in Critically Ill Patients: Discovery and Validation in Independent Cohorts. *Plos Med*. 2015;12(12):e1001916.

27. Cameron D, Piccart-Gebhart MJ, Gelber RD, Procter M, Goldhirsch A, de Azambuja E, et al. 11 years' follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive early breast cancer: final analysis of the HERceptin Adjuvant (HERA) trial. *Lancet*. 2017;389(10075):1195–205.
28. Singer M. Personalizing Sepsis Care. *Crit Care Clin*. 2018;34(1):153–60.
29. Pfeiffer R. Untersuchungen über das Choleragift. *Zeitschrift Für Hyg Und Infektionskrankheiten*. 1892;11(1):393–412.
30. Gamaleia N. Sur la destruction des microbes dans les organismes fébricitants. *Annales de l'Institut Pasteur*. 1888;2:229–45.
31. Besredka A. De l'anti-endotoxine typhique et des anti-endotoxines, en général. *Annales de l'Institut Pasteur*. 1906;20:149–54.
32. Boivin A, Mesrobian L. Contribution à l'étude de la composition chimique des bactéries. *Comptes Rendus de la Société de Biologie*. 1933;(112):76–9.
33. Hartwell JL, Shear MJ, Adams JR, Perrault A. Chemical Treatment of Tumors. VII. Nature of the Hemorrhage-Producing Fraction From *Serratia marcescens* (*Bacillus prodigiosus*) Culture Filtrate. *Jnci J National Cancer Inst*. 1943;
34. Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *New Engl J Medicine*. 2013;369(9):840 851.
35. Greisman SE, Hornick RB. Comparative Pyrogenic Reactivity of Rabbit and Man to Bacterial Endotoxin*. *P Soc Exp Biol Med*. 1969;131(4):1154–8.
36. da Silva TA, Kaulbach H, Chuidian F, Lambert D, Suffredini A, Danner R. Brief report: shock and multiple-organ dysfunction after self-administration of *Salmonella* endotoxin. *New Engl J Medicine*. 1993;328(20):1457 1460.

37. Lepper P, Held T, Schneider E, Böke E, Gerlach H, Trautmann M. Clinical implications of antibiotic-induced endotoxin release in septic shock. *Intens Care Med.* 2002;28(7):824 833.
38. Gautier T, Lagrost L. Plasma PLTP (phospholipid-transfer protein): an emerging role in “reverse lipopolysaccharide transport” and innate immunity. - PubMed - NCBI. *Biochem Soc T.* 2011;39(4):984 988.
39. Hurley JC, Nowak P, Öhrmalm L, Gogos C, Armaganidis A, Giamarellos-Bourboulis EJ. Endotoxemia as a diagnostic tool for patients with suspected bacteremia caused by gram-negative organisms: a meta-analysis of 4 decades of studies. *J Clin Microbiol.* 2015;53(4):1183 1191.
40. van Deventer S, Büller H, ten Cate J, Sturk A, Pauw W. Endotoxaemia: an early predictor of septicaemia in febrile patients. *Lancet.* 1988;1(8586):605 609.
41. Yoshida M, Obayashi T, Tamura H, Tanaka S, Kawai T, Sakamoto S, et al. Diagnostic and prognostic significance of plasma endotoxin determination in febrile patients with haematological malignancies. *Eur J Cancer.* 1994;30(2):145–7.
42. van Langevelde P, Joop K, van Loon J, Frölich M, Groeneveld P, Westendorp R, et al. Endotoxin, cytokines, and procalcitonin in febrile patients admitted to the hospital: identification of subjects at high risk of mortality. *Clin Infect Dis.* 2000;31(6):1343 1348.
43. Levin J, Poore T, Young N, Margolis S, Zauber N, Townes A, et al. Gram-negative sepsis: detection of endotoxemia with the limulus test. With studies of associated changes in blood coagulation, serum lipids, and complement. *Ann Intern Med.* 1972;76(1):1–7.
44. Brandtzaeg P, Kierulf P, Gaustad P, Skulberg A, Bruun J, Halvorsen S, et al. Plasma endotoxin as a predictor of multiple organ failure and death in systemic meningococcal disease. *J Infect Dis.* 1989;159(2):195–204.

45. Marshall JC, Foster D, Vincent J-L, Cook DJ, Cohen J, Dellinger PR, et al. Diagnostic and prognostic implications of endotoxemia in critical illness: results of the MEDIC study. *J Infect Dis.* 2004;190(3):527–534.
46. Hurley J. Does gram-negative bacteraemia occur without endotoxaemia? A meta-analysis using hierarchical summary ROC curves. *Eur J Clin Microbiol.* 2010;29(2):207–15.
47. Erridge C. Diet, commensals and the intestine as sources of pathogen-associated molecular patterns in atherosclerosis, type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease. *Atherosclerosis.* 2011;216(1):1–6.
48. Spadoni I, Zagato E, Bertocchi A, Paolinelli R, Hot E, Sabatino A, et al. A gut-vascular barrier controls the systemic dissemination of bacteria. *Science.* 2015;350(6262):830–4.
49. Venet C, Zeni F, Viallon A, Ross A, Pain P, Gery P, et al. Endotoxaemia in patients with severe sepsis or septic shock. *Intens Care Med.* 2000;26(5):538–44.
50. Bates D, Parsonnet J, Ketchum P, Miller E, Novitsky T, Sands K, et al. Limulus amoebocyte lysate assay for detection of endotoxin in patients with sepsis syndrome. AMCC Sepsis Project Working Group. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 1998;27(3):582–591.
51. Strutz F, Heller G, Krasemann K, Krone B, Müller G. Relationship of antibodies to endotoxin core to mortality in medical patients with sepsis syndrome. *Intens Care Med.* 1999;25(5):435–44.
52. Goldie A, Fearon K, Ross J, Barclay G, Jackson R, Grant I, et al. Natural cytokine antagonists and endogenous antiendotoxin core antibodies in sepsis syndrome. The Sepsis Intervention Group. *JAMA: the journal of the American Medical Association.* 1995;274(2):172–177.

53. Opal S, Scannon P, Vincent J, White M, Carroll S, Palardy J, et al. Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein in patients with severe sepsis and septic shock. *J Infect Dis.* 1999;180(5):1584–1589.
54. Hurley JC, Guidet B, Offenstadt G, Maury E. Endotoxemia and mortality prediction in ICU and other settings: underlying risk and co-detection of gram negative bacteremia are confounders. *Crit Care.* 2012;16(4):R148.
55. Elin R, Robinson R, Levine A, Wolff S. Lack of clinical usefulness of the limulus test in the diagnosis of endotoxemia. *New Engl J Medicine.* 1975;293(11):521–524.
56. Wong J, Zhang Y, Patidar A, Vilar E, Finkelman M, Farrington K. Is Endotoxemia in Stable Hemodialysis Patients an Artefact? Limitations of the Limulus Amebocyte Lysate Assay and Role of (1→3)- β -D Glucan. *Plos One.* 2016;11(10):e0164978.
57. Dellinger PR, Bagshaw SM, Antonelli M, Foster DM, Klein DJ, Marshall JC, et al. Effect of Targeted Polymyxin B Hemoperfusion on 28-Day Mortality in Patients With Septic Shock and Elevated Endotoxin Level: The EUPHRATES Randomized Clinical Trial. *Jama.* 2018;320(14):1455–1463.
58. Payen DM, Guilhot J, Launey Y, Lukaszewicz A, Kaaki M, Veber B, et al. Early use of polymyxin B hemoperfusion in patients with septic shock due to peritonitis: a multicenter randomized control trial. *Intens Care Med.* 2015;41(6):975–984.
59. Munford RS. Endotoxemia-menace, marker, or mistake? *J Leukocyte Biol.* 2016;100(4):687–698.
60. Raetz CR, Whitfield C. LIPOPOLYSACCHARIDE ENDOTOXINS. *Biochemistry-us.* 2002;71(1):635–700.
61. Brandenburg K, Funari SS, Koch MHJ, Seydel U. Investigation into the Acyl Chain Packing of Endotoxins and Phospholipids under Near Physiological Conditions by

WAXS and FTIR Spectroscopy. *J Struct Biol.* 1999;128(2):175–86.

62. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(7):499–511.

63. Fujita T, Matsushita M, Endo Y. The lectin-complement pathway – its role in innate immunity and evolution. *Immunol Rev.* 2004;198(1):185–202.

64. Howell W. Observations upon the chemical composition and coagulation of the blood of *Limulus polyphemus*, *Callinectes hastatus*, and *Cucumaria* sp. . Johns Hopkins University Circular . 1885;43:4–5.

65. LEVIN J, F B. THE ROLE OF ENDOTOXIN IN THE EXTRACELLULAR COAGULATION OF LIMULUS BLOOD. *B Johns Hopkins Hosp.* 1964;115:265–74.

66. Gnauck A, Lentle RG, Kruger MC. The Limulus Amebocyte Lysate assay may be unsuitable for detecting endotoxin in blood of healthy female subjects. *J Immunol Methods.* 2015;416:146–56.

67. Roth R, Levin F, Levin J. Optimization of detection of bacterial endotoxin in plasma with the Limulus test. *J Laboratory Clin Medicine.* 1990;116(2):153–61.

68. Brandenburg K, Howe J, Gutsman T, Garidel P. The Expression of Endotoxic Activity in the Limulus Test as Compared to Cytokine Production in Immune Cells. *Curr Med Chem.* 2009;16(21):2653–60.

69. Romaschin AD, Harris DM, Ribeiro MB, Paice J, Foster DM, Walker PM, et al. A rapid assay of endotoxin in whole blood using autologous neutrophil dependent chemiluminescence. *J Immunol Methods.* 1998;212(2):169–85.

70. Romaschin AD, Klein DJ, Marshall JC. Bench-to-bedside review: Clinical experience with the endotoxin activity assay. *Crit Care.* 2012;16(6):248.

71. Bhat N, Bieber M, Chapman C, Stevenson F, Teng N. Human antilipid A monoclonal antibodies bind to human B cells and the i antigen on cord red blood cells. *J Immunol* Baltim Md 1950. 1993;151(9):5011–21.
72. Kuksis A. Lipid chromatographic analysis, Vol. 3 edited by G.V. Marinetti, Marcel Dekker, New York, Basel, 2nd (revised) ed., 1976, IX + 289 pp., SFr. 115.00, ISBN 0-8247-6357-2. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1978;146(1):181.
73. Maitra SK, Schotz MC, Yoshikawa TT, Guze LB. Determination of lipid A and endotoxin in serum by mass spectroscopy. *Proc National Acad Sci.* 1978;75(8):3993–7.
74. Maitra S, Nachum R, Pearson F. Establishment of beta-hydroxy fatty acids as chemical marker molecules for bacterial endotoxin by gas chromatography-mass spectrometry. *Applied and environmental microbiology.* 1986;52(3):510–514.
75. Szponar B, Kraśnik L, Hryniewiecki T, Gamian A, Larsson L. Distribution of 3-hydroxy fatty acids in tissues after intraperitoneal injection of endotoxin. *Clin Chem.* 2003;49(7):1149–1153.
76. de Barros J-P, Gautier T, Sali W, Adrie C, Choubley H, Charron E, et al. Quantitative lipopolysaccharide analysis using HPLC/MS/MS and its combination with the limulus amoebocyte lysate assay. *J Lipid Res.* 2015;56(7):1363–1369.
77. Gallin JI, Kaye D, O'Leary WM. Serum Lipids in Infection. *New Engl J Medicine.* 1969;281(20):1081–6.
78. Samra J, Summers L, Frayn K. Sepsis and fat metabolism. *Brit J Surg.* 1996;83(9):1186–96.
79. Tripp RJ, Tabares A, Wang H, Lanza-Jacoby S. Altered Hepatic Production of Apolipoproteins B and E in the Fasted Septic Rat: Factors in the Development of Hypertriglyceridemia. *J Surg Res.* 1993;55(5):465–72.

80. Barcia AM, Harris HW. Triglyceride-Rich Lipoproteins as Agents of Innate Immunity. Clin Infect Dis. 2005;41(Supplement_7):S498–503.
81. Roth R, Levin F, Levin J. Distribution of bacterial endotoxin in human and rabbit blood and effects of stroma-free hemoglobin. Infect Immun. 1993;61(8):3209–15.
82. Ulevitch R, Johnston A, Weinstein D. New function for high density lipoproteins. Isolation and characterization of a bacterial lipopolysaccharide-high density lipoprotein complex formed in rabbit plasma. J Clin Invest. 1981;67(3):827–37.
83. Lenten VB, Fogelman A, Haberland M, Edwards P. The role of lipoproteins and receptor-mediated endocytosis in the transport of bacterial lipopolysaccharide. Proc National Acad Sci. 1986;83(8):2704–8.
84. Ulevitch R, Johnston A. The modification of biophysical and endotoxic properties of bacterial lipopolysaccharides by serum. J Clin Invest. 1978;62(6):1313–24.
85. Kitchens RL, Wolfbauer G, Albers JJ, Munford RS. Plasma Lipoproteins Promote the Release of Bacterial Lipopolysaccharide from the Monocyte Cell Surface. J Biol Chem. 1999;274(48):34116–22.
86. Eichbaum EB, Harris HW, Kane JP, Rapp JH. Chylomicrons can inhibit endotoxin activity in vitro. J Surg Res. 1991;51(5):413–6.
87. Harris H, Eichbaum E, Kane J, Rapp J. Detection of endotoxin in triglyceride-rich lipoproteins in vitro. J Laboratory Clin Medicine. 1991;118(2):186–93.
88. Harris H, Grunfeld C, Feingold K, Rapp J. Human very low density lipoproteins and chylomicrons can protect against endotoxin-induced death in mice. J Clin Invest. 1990;86(3):696 702.
89. Parker T, Levine D, Chang J, Laxer J, Coffin C, Rubin A. Reconstituted high-density

lipoprotein neutralizes gram-negative bacterial lipopolysaccharides in human whole blood. Infect Immun. 1995;63(1):253–8.

90. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. Nat Rev Immunol. 2001;1(2):nri35100529.

91. Yu B, Wright SD. Catalytic Properties of Lipopolysaccharide (LPS) Binding Protein TRANSFER OF LPS TO SOLUBLE CD14. J Biol Chem. 1996;271(8):4100–5.

92. Bingle CD, Craven CJ. Meet the relatives: a family of BPI- and LBP-related proteins. Trends Immunol. 2004;25(2):53–5.

93. Lagrost L, Desrumaux C, Masson D, Deckert V, Gamber P. Structure and function of the plasma phospholipid transfer protein. Curr Opin Lipidol. 1998;9(3):203–9.

94. Cheung MC, Vaisar T, Han X, Heinecke JW, Albers JJ. Phospholipid transfer protein in human plasma associates with proteins linked to immunity and inflammation. Biochemistry-us. 2010;49(34):7314–22.

95. Levels J, Marquart J, Abraham P, van den Ende A, Molhuizen H, van Deventer S, et al. Lipopolysaccharide Is Transferred from High-Density to Low-Density Lipoproteins by Lipopolysaccharide-Binding Protein and Phospholipid Transfer Protein. Infect Immun. 2005;73(4):2321–2326.

96. Hailman E, Albers J, Wolfbauer G, Tu A, Wright S. Neutralization and transfer of lipopolysaccharide by phospholipid transfer protein. J Biol Chem. 1996;271(21):12172–12178.

97. Gautier T, Klein A, Deckert V, Desrumaux C, Ogier N, Sberna A-L, et al. Effect of Plasma Phospholipid Transfer Protein Deficiency on Lethal Endotoxemia in Mice. J Biol Chem. 2008;283(27):18702–10.

98. Yu Y, Cui Y, Zhao Y, Liu S, Song G, Jiao P, et al. The binding capability of plasma

phospholipid transfer protein, but not HDL pool size, is critical to repress LPS induced inflammation. Sci Rep-uk. 2016;6(1):20845.

99. Deckert V, Lemaire S, Ripoll P-J, de Barros J-P, Labbé J, Borgne C, et al. Recombinant human plasma phospholipid transfer protein (PLTP) to prevent bacterial growth and to treat sepsis. Sci Rep-uk. 2017;7(1):3053.

100. Walley KR. Role of lipoproteins and proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 in endotoxin clearance in sepsis. Curr Opin Crit Care. 2016;22(5):464–469.

101. Boyd JH, Fjell CD, Russell JA, Sirounis D, Cirstea MS, Walley KR. Increased Plasma PCSK9 Levels Are Associated with Reduced Endotoxin Clearance and the Development of Acute Organ Failures during Sepsis. J Innate Immun. 2016;8(2):211–220.

102. Cunningham D, Danley DE, Geoghegan KF, Griffor MC, Hawkins JL, Subashi TA, et al. Structural and biophysical studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia. Nat Struct Mol Biol. 2007;14(5):413–9.

103. Walley KR, Thain KR, Russell JA, Reilly MP, Meyer NJ, Ferguson JF, et al. PCSK9 is a critical regulator of the innate immune response and septic shock outcome. Sci Transl Med. 2014;6(258):258ra143-258ra143.

104. Berger J-M, Valdes A, Gromada J, Anderson N, Horton JD. Inhibition of PCSK9 does not improve lipopolysaccharide-induced mortality in mice. J Lipid Res. 2017;58(8):1661–1669.

105. Tateda K, Matsumoto T, Miyazaki S, Yamaguchi K. Lipopolysaccharide-induced lethality and cytokine production in aged mice. Infect Immun. 1996;64(3):769–74.

106. Thomas CJ, Gangadhar BP, Surolia N, Surolia A. Kinetics and Mechanism of the Recognition of Endotoxin by Polymyxin B. J Am Chem Soc. 1998;120(48):12428–34.

107. Issekutz AC. Removal of gram-negative endotoxin from solutions by affinity chromatography. *J Immunol Methods.* 1983;61(3):275–81.
108. Cohen J, Aslam M, Pusey C, Ryan C. Protection from Endotoxemia: A Rat Model of Plasmapheresis and Specific Adsorption with Polymyxin B. *J Infect Dis.* 1987;155(4):690–5.
109. Harm S, Harm S, Falkenhagen D, Falkenhagen D, Hartmann J, Hartmann J. Endotoxin adsorbents in extracorporeal blood purification: do they fulfill expectations? *Int J Artif Organs.* 2014;37(3):222–232.
110. Aoki H, Kodama M, Tani T, Hanasawa K. Treatment of sepsis by extracorporeal elimination of endotoxin using polymyxin B-immobilized fiber. *Am J Surg.* 1994;167(4):412–7.
111. FRCPPath DB, FRCP CJ. Endotoxin removal devices for the treatment of sepsis and septic shock. *Lancet Infect Dis.* 2010;11(1):65–71.
112. Vincent J-L, Laterre P-F, Cohen J, Burchardi H, Bruining H, Lerma F, et al. A PILOT-CONTROLLED STUDY OF A POLYMYXIN B-IMMOBILIZED HEMOPERFUSION CARTRIDGE IN PATIENTS WITH SEVERE SEPSIS SECONDARY TO INTRA-ABDOMINAL INFECTION. *Shock.* 2005;23(5):400–5.
113. Cruz DN, Antonelli M, Fumagalli R, Foltran F, Brienza N, Donati A, et al. Early use of polymyxin B hemoperfusion in abdominal septic shock: the EUPHAS randomized controlled trial. *Jama.* 2009;301(23):2445–2452.
114. Barbar SD, Clere-Jehl R, Bourredjem A, Hernu R, Montini F, Bruyère R, et al. Timing of Renal-Replacement Therapy in Patients with Acute Kidney Injury and Sepsis. *New Engl J Med.* 2018;379(15):1431–1442.
115. Gaudry S, Hajage D, Schortgen F, Martin-Lefevre L, Pons B, Boulet E, et al. Initiation Strategies for Renal-Replacement Therapy in the Intensive Care Unit. *New*

116. BELLOMO R, KELLUM JA, GANDHI CR, PINSKY MR, Ondulik B. The Effect of Intensive Plasma Water Exchange by Hemofiltration on Hemodynamics and Soluble Mediators in Canine Endotoxemia. *Am J Resp Crit Care*. 2000;161(5):1429–36.

117. Monard C, Rimmelé T, Ronco C. Extracorporeal Blood Purification Therapies for Sepsis. *Blood Purificat*. 2019;47(Suppl 3):2–15.

118. Gruda MC, Ruggeberg K-G, O’Sullivan P, Guliashvili T, Scheirer AR, Golobish TD, et al. Broad adsorption of sepsis-related PAMP and DAMP molecules, mycotoxins, and cytokines from whole blood using CytoSorb® sorbent porous polymer beads. *Plos One*. 2018;13(1):e0191676.

119. Rimmelé T, Assadi A, Cattenoz M, Desebbe O, Lambert C, Boselli E, et al. High-volume haemofiltration with a new haemofiltration membrane having enhanced adsorption properties in septic pigs. *Nephrol Dial Transpl*. 2009;24(2):421–427.

120. Staubach K-H, Boehme M, Zimmermann M, Otto V. A new endotoxin adsorption device in Gram-negative sepsis: use of immobilized albumin with the MATISSE® adsorber. *Transfus Apher Sci*. 2003;29(1):93–8.

121. Reinhart K, Meier-Hellmann A, Beale R, Forst H, Boehm D, Willatts S, et al. Open randomized phase II trial of an extracorporeal endotoxin adsorber in suspected Gram-negative sepsis; *Crit Care Med*. 2004;32(8):1662–8.

122. Tsuchida K, Takemoto Y, Sugimura K, Yoshimura R, Yamamoto K, Nakatani T. Adsorption of Endotoxin by Beta2-Microglobulin Adsorbent Column (Lixelle): The New Approach for Endotoxemia. *Ther Apher*. 2002;6(2):116–8.

123. Taniguchi T, Hirai F, Takemoto Y, Tsuda K, Yamamoto K, Inaba H, et al. A novel adsorbent of circulating bacterial toxins and cytokines; The effect of direct

hemoperfusion with CTR column for the treatment of experimental endotoxemia*
Crit Care Med. 2006;34(3):800–6.

124. Kono K, Toda S, Hora K, Kiyosawa K. Direct Hemoperfusion With a β 2-Microglobulin-selective Adsorbent Column Eliminates Inflammatory Cytokines and Improves Pulmonary Oxygenation. Ther Apher Dial. 2009;13(1):27–33.

125. Shum H, Chan K, Yan W. Alteco endotoxin hemoadsorption in Gram-negative septic shock patients. Crit Care. 2013;17(Suppl 2):P68.

126. Toft P, Schmidt R, Broechner AC, Nielsen BU, Bollen P, Olsen KE. Effect of Plasmapheresis on the Immune System in Endotoxin-Induced Sepsis. Blood Purificat. 2008;26(2):145–50.

127. Reeves JH. A Review of Plasma Exchange in Sepsis. Blood Purificat. 2002;20(3):282–8.

128. Bambauer R, Bambauer C, Lehmann B, Latza R, Schiel R. LDL-Apheresis: Technical and Clinical Aspects. Sci World J. 2012;2012:314283.

129. Thompson GR, Group H-U. Recommendations for the use of LDL apheresis. Atherosclerosis. 2008;198(2):247–55.

130. Bruckert E, Kalmykova O, Bittar R, Carreau V, Béliard S, Saheb S, et al. Long-term outcome in 53 patients with homozygous familial hypercholesterolaemia in a single centre in France. Atherosclerosis. 2017;257:130–7.

131. Tatamia R, Inoue N, Itoh H, Kishino B, Koga N, Nakashima Y, et al. Regression of coronary atherosclerosis by combined LDL-apheresis and lipid-lowering drug therapy in patients with familial hypercholesterolemia: a multicenter study. Atherosclerosis. 1992;95(1):1–13.

132. SAHEB S, LIONET A, BRUCKERT E. La LDL-aphérèse, principes et indications.

133. de Gennes J, Touraine R, Maunand B, Truffert J, Laudat P. [Homozygous cutaneo-tendinous forms of hypercholesteremic xanthomatosis in an exemplary familial case. Trial of plasmapheresis and heroic treatment]. *Bulletins Et Mémoires De La Société Médicale Des Hôpitaux De Paris*. 1967;118(15):1377–402.
134. Agishi T, Kaneko I, Hasuo Y, Hayasaka Y, Sanaka T, Ota K, et al. Double filtration plasmapheresis. *Transactions - Am Soc Artif Intern Organs*. 1980;26:406–11.
135. Stoffel W, Demant T. Selective removal of apolipoprotein B-containing serum lipoproteins from blood plasma. *Proc National Acad Sci*. 1981;78(1):611–5.
136. Mabuchi H, Michishita I, Takeda M, Fujita H, Koizumi J, Takeda R, et al. A new low density lipoprotein apheresis system using two dextran sulfate cellulose columns in an automated column regenerating unit (LDL continuous apheresis). *Atherosclerosis*. 1987;68(1–2):19–25.
137. Drager, Julius, Kraenzle, Schaper, Toepfer, Zygan, et al. DALI—the first human whole-blood low-density lipoprotein and lipoprotein (a) apheresis system in clinical use: procedure and clinical results. *Eur J Clin Invest*. 1998;28(12):994–1002.
138. Keller C, Grützmacher P, Bahr F, Schwarzbeck A, Kroon AA, Kiral A. LDL-apheresis with dextran sulphate and anaphylactoid reactions to ACE inhibitors. *Lancet*. 1993;341(8836):60–1.
139. Matzinger P. The Danger Model: A Renewed Sense of Self. *Science*. 2002;296(5566):301–5.
140. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol*. 1994;12(1):991–1045.
141. van Eijk LT, Pickkers P, Smits P, van den Broek W, Bouw MP, van der Hoeven JG. Microvascular permeability during experimental human endotoxemia: an open

intervention study. Crit Care. 2005;9(2):R157 64.

142. Sauter C, Wolfensberger C. INTERFERON IN HUMAN SERUM AFTER INJECTION OF ENDOTOXIN. Lancet. 1980;316(8199):852–3.

143. Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. Plos Biol. 2016;14(8):e1002533.

144. Vors C, Pineau G, Draï J, Meugnier E, Pesenti S, Laville M, et al. Postprandial Endotoxemia Linked With Chylomicrons and Lipopolysaccharides Handling in Obese Versus Lean Men: A Lipid Dose-Effect Trial. J Clin Endocrinol Metabolism. 2015;100(9):3427–35.

145. Cirstea M, Walley KR, Russell JA, Brunham LR, Genga KR, Boyd JH. Decreased high-density lipoprotein cholesterol level is an early prognostic marker for organ dysfunction and death in patients with suspected sepsis. J Crit Care. 2017;38(Intensive Care Med 33 1 2007):289–94.

146. Lagrost L, Girard C, Grosjean S, Masson D, Deckert V, Gautier T, et al. Low Preoperative Cholesterol Level Is a Risk Factor of Sepsis and Poor Clinical Outcome in Patients Undergoing Cardiac Surgery With Cardiopulmonary Bypass; Crit Care Med. 2014;42(5):1065–73.

147. Lagrost L, Girard C, Masson D, Bonithon-Kopp C. The authors reply. Crit Care Med. 2014;42(10):e686–7.

148. Ekbom T, Lindholm L, Lanke J, Nilsson-Ehle P. Decrease in high density lipoprotein cholesterol during prolonged storage. Scand J Clin Laboratory Investigation. 2009;56(2):97–101.

149. Ma L, Waldmann E, Ooi EM, Chan DC, Barrett HP, Watts GF, et al. Lipoprotein (a) and Low-density lipoprotein apolipoprotein B metabolism following apheresis in patients with elevated lipoprotein(a) and coronary artery disease. Eur J Clin Invest.

2019;49(2):e13053.

150. Levels JH, Abraham PR, van Barreveld EP, Meijers JC, van Deventer SJ. Distribution and Kinetics of Lipoprotein-Bound Lipoteichoic Acid. *Infect Immun*. 2003;71(6):3280–4.

151. Scheiman J, Lubner JM, Chavkin TA, MacDonald T, Tung A, Pham L-D, et al. Meta-omics analysis of elite athletes identifies a performance-enhancing microbe that functions via lactate metabolism. *Nat Med*. 2019;25(7):1104–9.

VASOPRESSOR CUMULATIVE DOSE REQUIREMENT AND RISK OF EARLY DEATH DURING SEPTIC SHOCK: AN ANALYSIS FROM THE EPISS COHORT

Auguste Dargent,^{*‡} Maxime Nguyen,^{*} Isabelle Fournel,[†]
Abderrahmane Bourredjem,[†] Pierre-Emmanuel Charles,^{*‡}
Jean-Pierre Quenot^{*‡†}, and the EPISS study group

^{*}Department of Intensive Care, François Mitterrand University Hospital, Dijon, France; [†]INSERM CIC1432, Clinical Epidemiology, University of Burgundy, Dijon, France; and [‡]Lipness Team, INSERM Research Center LNC-UMR1231 and LabExLipSTIC, University of Burgundy, Dijon, France

Received 21 Jun 2017; first review completed 6 Jul 2017; accepted in final form 5 Oct 2017

ABSTRACT—Septic shock is the primary cause of death in intensive care units, with about 20% of patients dying in the first 3 days. To design future trials focused on early mortality, we require knowledge of early indicators that can detect patients at high risk of early death from refractory septic shock. The aim of this study was to assess whether the cumulative dose of vasopressors (CDV), calculated as the cumulative dose of epinephrine + norepinephrine, is a predictor of early death (within 72 h) attributable to refractory septic shock (EDASS). This substudy of the EPISS trial was based on 370 patients admitted to a French ICU for septic shock between 2009 and 2011. The area under the receiving operating characteristic curve was calculated for the CDV at 6, 12, 24, 36, and 48 h after vasopressor initiation, and a strategy to predict the risk of EDASS was built based on selected times and thresholds. Among the 370 patients included, 51 (14%) died within the first 72 h with 40 (11%) EDASS. A strategy in two steps (CDV $\geq 800 \mu\text{g/kg}$ at 6 h and/or CDV $\geq 2,600 \mu\text{g/kg}$ at 24 h) was able to predict EDASS with sensitivity of 45%, specificity 97%, positive predictive value 78% and negative predictive value 94%. Overall, our results confirm that early death directly attributable to septic shock could be effectively predicted by the CDV in the first hours of treatment. These results will help to select patients eligible for innovative therapies aimed at improving early mortality in septic shock.

KEYWORDS—Prognosis, refractory septic shock, septic shock, vasopressors

INTRODUCTION

Septic shock remains associated with abysmal prognosis and very high mortality in the intensive care unit (ICU). Accordingly, ICU mortality in France in patients with septic shock reaches up to 39.5%, and in-hospital mortality up to 48.7% (1). More than a third of patients who die from septic shock do so in the first 3 days of disease. Data on the causes of death in septic shock are scarce, especially with particular focus on the timing of death. In a retrospective study, Daviaud et al. (2) showed that most early deaths (0–3 days) in septic shock were attributable to primary infection-related multiorgan failure, after exclusion of mesenteric ischemia, iatrogenic hemorrhagic complications, and more rare causes. This contrasted with late deaths (occurring beyond three days), which are most frequently attributed to end-of-life decisions and secondary infections. This dichotomy corroborates the recent pathophysiologic models dividing mortality of sepsis into two distinct phases according to the state of activation of the immune system (3). Most patients who die within the first 3 days present with a state of persistent

hypotension, refractory to conventional treatment and leading to multiple organ failure. The term “refractory septic shock” (RSS) is often used to describe this condition, which accounts for the abrupt early rise in the sepsis mortality curve. However, as yet, there is no consensual definition of RSS. Although the concept of RSS was first mentioned in the literature since as early as 1965 (4), there are almost as many definitions as publications mentioning it. Nonetheless, resistance to catecholamines is often used to describe RSS, and seems to be one of its hallmarks (5, 6).

The phenomenon of catecholamine resistance is enhanced in refractory shock patients, as demonstrated by Conrad et al. (7). In their study including 51 consecutive patients with septic shock, RSS patients (defined as the inability to sustain systolic blood pressure more than 90 mmHg for more than 24 h without norepinephrine) had a significantly lower mean arterial pressure response to phenylephrine. These results suggested RSS progression might reasonably be predicted in the early phase of vasopressor initiation. Although there are no evidence-based therapeutic options for RSS to date, the identification of high-risk patients is crucial in order to design appropriate trials addressing early mortality attributable to catecholamine resistance. Indeed, defining a concrete threshold indicative of nonresponse to therapy would help to identify patients who could yield the most benefit from new therapies, such as angiotensin II. This new vasopressor agent was recently shown to effectively increase blood pressure in patients with vasodilatory shock, but failed to demonstrate a significant effect on survival (8). In our opinion, this example emphasizes the need for better identification of patients at

Address reprint requests to Auguste Dargent, MD, University Hospital Dijon, France, Hôpital F. Mitterrand, 14 Rue Paul Gaffarel, BP 77 908, 21079 Dijon Cedex, France. E-mail: auguste.dargent@chu-dijon.fr

The complete list of investigators participating in the EPISS study is given in the Appendix.

The authors have no conflict of interest to declare.

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

DOI: 10.1097/SHK.0000000000001022

Copyright © 2018 by the Shock Society

risk of dying due to vasopressor resistance. The main aim of the present study was to investigate the utility of a new metric, namely the cumulative dose of vasopressors (CDV) as a predictor of early death attributable to septic shock, i.e., within 3 days following vasopressor initiation. Secondary objectives were to determine the timing and causes of death from septic shock in our cohort and to identify the best strategy to predict early death.

METHODS

Study population

The study population prospectively included consecutive patients with a diagnosis of septic shock admitted to the ICU of Dijon university teaching hospital, France, between November 2009 and September 2011, in the framework of the Epidemiology of Septic Shock (EPISS) study, previously been reported in detail elsewhere (1). Briefly, 1,488 patients were enrolled in 14 French ICUs between November 2009 and September 2011 with a diagnosis of septic shock, according to the criteria of the Prospective Recombinant Human Activated Protein C Worldwide Evaluation in Septic Shock study (9). The present report deals with patients included in Dijon university hospital only, for whom hourly doses of epinephrine and norepinephrine from introduction to weaning or death were available.

According to French legislation, patients (or their legal representative) were informed that their data were collected for research purposes and consent was obtained from the patient (or next of kin). Collection of nominative data was approved by the national authority for the protection of privacy and personal data, and by the ethics committee of the French Society of Intensive Care.

Endpoints and definitions

The primary outcome of this study was the accuracy of the CDV to predict early death attributable to septic shock (EDASS). Secondary outcomes were the choice of the best time point at which to measure the CDV, and the choice of a clinically meaningful cutoff value for the most accurate marker.

EDASS was defined as fulfillment of the following criteria: death within the first 72 h following vasopressor initiation, ongoing vasopressor therapy at time of death, exclusion of a cause of death other than sepsis. The cause and exact timing of death in the 28 first days following septic shock were retrospectively reassessed by consensus by three senior critical care physicians (A.D., M.N., J.P.Q.), blinded to CDV.

The CDV was defined as the sum of norepinephrine and epinephrine doses, and was measured hourly, with intermediate cumulative totals calculated at 6, 8, 12, 24, 36, and 48 h after vasopressor initiation. Other vasopressors, such as vasopressin or dopamine, were not used, as they were not available in our center at the time of the study.

Statistical analysis

Continuous variables are described as means and standard deviations for normally distributed variables, and otherwise, as median and interquartile range [IQR], and compared with the Student *t* test or nonparametric tests, as appropriate. Categorical variables are expressed as number (percentage) and were compared with the Chi square or Fisher's exact tests as appropriate. Cumulative probabilities of EDASS were described using the Kaplan–Meier method.

To determine the most pertinent predictive time points in terms of discriminatory power, the area under the receiver-operating characteristic (ROC) curve (AUROC) as calculated for the CDV (measured at 6, 8, 12, 24, 36, and 48 h after vasopressor initiation) as predictors of EDASS. For each relevant time-point, the cutoff of CDV was chosen based on the best compromise between the positive predictive value and the specificity. Finally, a strategy to predict the overall risk of EDASS was designed, based on the times and thresholds selected in the previous stage of analysis. The association between EDASS and the selected predictive strategy was assessed in a multivariate logistic regression model adjusted for baseline factors identified as predictors of mortality in the EPISS study multivariate model (namely sequential organ failure assessment (SOFA) score, presence or absence of bacteremia, and age). All analyses were performed using SAS version 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC). All *P* values were two-sided. Results with a *P*-value <0.05 were considered significant.

RESULTS

Study population

Among 404 consecutive patients with septic shock enrolled in Dijon university hospital, 18 patients were excluded from analysis because of unavailable hospital records. Sixteen further patients were excluded due to early end-of-life decisions (Fig. 1). Thereafter, the present study included a total of 370 patients whose baseline characteristics are shown in Table 1. As expected, patients with EDASS presented with significantly higher severity scores (SOFA, simplified acute physiology score II). They also required more mechanical ventilation and renal replacement therapy. The same differences were observed in the characteristics of patients dead before or after day 3 in ICU regardless of death cause, except for immunosuppression (including cancer) which was significantly more frequently present in patients dead after day 3 (supplemental Table 1, <http://links.lww.com/SHK/A653>). A numerically higher proportion of patients with EDASS had corticosteroids than among those without EDASS, but the difference between the two groups was not statistically significant (Table 1). Overall, 51 patients (17%) died within the first 72 h, of whom 40/51 died from EDASS, corresponding to 78.4% of those who died, and 11% of those included overall (40/404). The causes of death of the other 11/51 patients are specified in Fig. 1. Among the 319 patients alive at 72 h, four died from refractory multiorgan failure directly attributable to the initial episode of shock, all four between 72 and 96 h from vasopressor initiation.

Cumulative dose of vasopressors and early death

As shown in Figure 2, the CDV of patients who had EDASS was significantly higher ($P < 0.0001$) at all-time points after the introduction of catecholamines than among those without EDASS. Vasopressor doses were similar in patients alive at 72 h and in those who died from other causes, whereas EDASS patients had higher CDV than both these groups.

The highest AUROC was observed at 24 h (Table 2). However, among the 40 patients with EDASS, 18 EDASS had already occurred before 24 h, hampering the clinical relevance of this time point. With only four EDASS occurring before 6 h and an AUROC of 83% [75%; 92%], 6 h after vasopressor initiation was considered the most clinically relevant early time point to assess CDV. Further evaluation at 8 and 12 h did not improve the AUROC compared with evaluation at 6 h. Based on these results, we proposed a combined two-step strategy, using CDV at 6 h plus CDV at 24 h. The first step at 6 h enables early recognition of patients presenting EDASS. Patients with $CDV \geq 800 \mu\text{g/kg}$ at 6 h were considered at high risk of EDASS. This cutoff yielded a specificity of 99%, sensitivity of 42%, positive predictive value of 83%, and negative predictive value of 93%.

The second step, based on CDV at 24 h, made it possible to improve the diagnostic accuracy for patients whose risk level at 6 h had not (yet) reached the threshold identified by our study to be associated with adverse outcome. With a cutoff of $2,600 \mu\text{g/kg}$ at 24 h, the CDV yielded a specificity of 98%, sensitivity of 64%, positive predictive value of 81%, and negative predictive

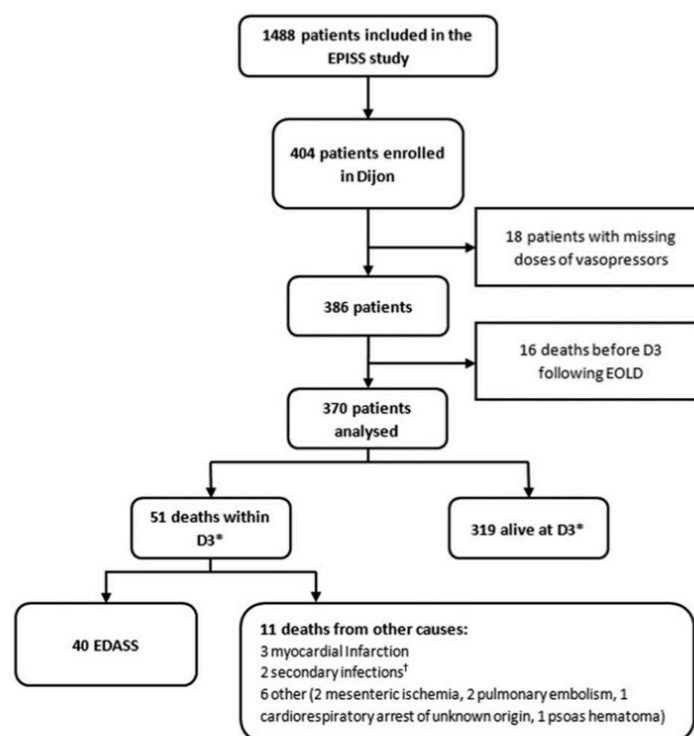


FIG. 1. Flowchart of the population of the present analysis, from the EPISS study. *First 72 h following the vasopressor initiation for the management of septic shock. †Defined as septic episodes distinct from the primary infection for which the patient was enrolled in the study. EDASS indicates early death attributable to septic shock; EOLD, end-of-life decision; EPISS, Epidemiology of Septic Shock study.

value of 97%. Overall, this two-step strategy identified 18 high-risk patients at 6 h, of whom 15 presented EDASS. The second evaluation at 24 h allowed identification of nine further high-risk patients, of whom six subsequently had EDASS at 72 h. At 72 h, 313 (93%) of the patients classified as low risk were still alive (Fig. 3). Overall, the model yielded sensitivity of 53%, positive predictive value of 78%, specificity of 98%, and a negative predictive value of 96%.

Finally, the two-step strategy defined here remained strongly associated with EDASS (odds ratio = 67.3 [95% confidence interval, 17.9–252.2], $P < 0.0001$) after adjusting for baseline SOFA score, bacteremia and age. By multivariate analysis, the addition of corticosteroids to vasopressors did not change the overall results, and corticosteroid therapy was not found to be significantly associated with early death.

DISCUSSION

Our study confirms that the new metric defined in our study, namely early CDV is a strong prognostic factor for mortality attributable to septic shock. The association between vasopressor doses and mortality in sepsis has

previously been described in observational studies. In these studies, only the peak dose of vasopressors was considered with a given threshold such as $1 \mu\text{g/kg/min}$ (10, 11) or $2 \mu\text{g/kg/min}$ (12), regardless of when this threshold was reached. None of these studies recorded vasopressor dose at different time points over the course of disease. On the contrary, our study is the first, to the best of our knowledge, to propose a metric reflecting the cumulative dose of vasopressors based on hourly measurements, and to show the relation between this metric and the specific causes and timing of death. Our study further showed that vasopressor doses were similar in patients alive at 72 h and in patients who had died from other causes, whereas EDASS patients have much higher CDV, whatever the time point. This confirms the strong relation between early death and vasopressor resistance in sepsis. It was recently demonstrated that vasopressor dependency and refractory shock could be predicted by a mean arterial pressure-phenylephrine dose–response curve (7). Our results suggest that the simple calculation of CDV using a two-step strategy at 6 and 24 h of septic shock could predict the same outcome, probably because the CDV reflects the same underlying phenomenon of catecholamine resistance.

TABLE 1. Baseline characteristics of the 370 patients in Dijon from the EPISS cohort included in the current analysis

Clinical characteristics, n (%)	Total (370)	No EDASS (330)	EDASS (40)	P
Age				0.08
<60	105 (28)	97 (29)	8 (20)	
60–70	99 (27)	88 (27)	11 (28)	
70–80	100 (27)	83 (25)	17 (42)	
≥ 80	66 (18)	62 (19)	4 (10)	
Gender				0.84
Men	254 (69)	226 (68)	28 (70)	
Women	116 (31)	104 (32)	12 (30)	
BMI ≥ 30	85 (23)	74 (22)	11 (28)	0.45
Comorbidities				
Immunosuppression (including cancer)	112 (30)	102 (31)	10 (23)	0.44
Chronic heart failure	23 (6)	22 (7)	1 (3)	0.30
Chronic respiratory failure	26 (7)	23 (7)	3 (8)	0.90
Cirrhosis	36 (10)	31 (9)	5 (13)	0.53
Chronic renal failure	34 (9)	32 (10)	2 (5)	0.33
Diabetes	95 (26)	88 (27)	7 (18)	0.21
Mode of admission				0.34
Medical	314 (85)	278 (84)	36 (90)	
Surgical	56 (15)	52 (16)	4 (10)	
SAPS II ≥ 56	170 (46)	134 (41)	36 (90)	<0.0001
SOFA ≥ 11	226 (61)	186 (56)	40 (100)	<0.0001
Type of infection				0.87
Community acquired	208 (56)	186 (56)	22 (55)	
Nosocomial	162 (44)	144 (44)	18 (45)	
Site(s) of infection				
Respiratory tract	220 (59)	199 (60)	21 (53)	0.34
Abdominal	54 (15)	48 (15)	6 (15)	0.94
Urinary	63 (17)	59 (18)	4 (10)	0.21
Bacteremia	55 (15)	45 (14)	10 (25)	0.06
Another site	16 (4)	15 (5)	1 (3)	0.55
At least one identified pathogen	229 (62)	204 (62)	25 (63)	0.93
Corticosteroid therapy	245 (66)	215 (65)	30 (75)	0.21
Epinephrine/dobutamine therapy	87 (24)	77 (23)	10 (25)	0.81
Mechanical ventilation	316 (85)	276 (84)	40 (100)	0.0004
Renal replacement therapy	176 (48)	152 (46)	24 (60)	<0.0001

BMI indicates body mass index; EDASS, early death attributable to septic shock; SAPS, simplified acute physiology score; SOFA, sequential organ failure assessment

Our study enabled us to design a simple predictive model able to select patients at very high risk of mortality. The 6-h time point was chosen as it allowed an initial rapid and early evaluation of patients at high risk of EDASS. The patients with

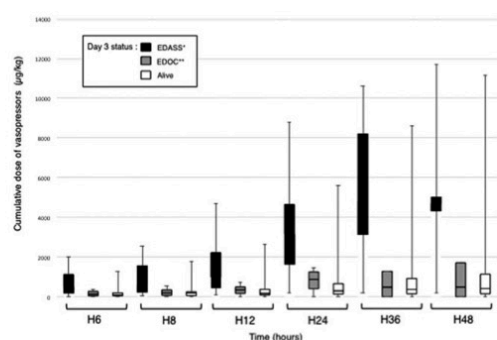


FIG. 2. Association between cumulative dose of vasopressors and early death in septic shock in 370 patients from the EPISS cohort. *EDASS indicates early death attributable to septic shock; †EDOC, early death from other causes. All *P* values comparing EDASS versus alive or other causes were <0.0001. All *P* values comparing alive versus other causes were nonsignificant.

CDV below the first cutoff underwent a second evaluation at 24 h in order to refine their risk and identify any new patients with an increased risk of EDASS. Indeed, at 24 h, 55% of the patients who would subsequently die by 72 h were still alive, and therefore eligible for further therapeutic intervention. The predictive power of our two-step model remained high, even after adjustment for confounders.

For this model, we chose the thresholds (6 and 24 h) based on the best compromise between specificity and positive predictive value, rather than that of the best agreement rate (maximized at 89% with cutoffs at 300 µg/kg at 6 h and 1,300 µg/kg at 24 h), to select the patients at highest risk, with a low false-positive rate in the perspective of proceeding with a new therapeutic approach in these patients. This two-step strategy was chosen in order to best identify high-risk patients (according to the CDV) in order to guide therapy. Efficient and early selection of patients with a high mortality risk in a very short time is a major challenge if we are to test strategies to reduce early mortality in future trials. We believe that this kind of model might be a robust tool for the selection of patients in future clinical trials targeting early mortality attributable to vasopressor resistance. New vasopressors and vasoactive agents are currently under development, and have the potential to address the issue of catecholamine resistance,

TABLE 2. Discriminatory power of the cumulative dose of vasopressors to detect early death attributable to septic shock

Hour	AUROC [95% CI]	Patients at risk (370 patients at H0)	Death by EDASS (40 at D3)	Death from other causes (11 at D3)
6	83% [75; 92]	365	4	1
8	84% [77; 92]	364	5	1
12	86% [78; 94]	358	8	4
24	93% [86; 99]	347	18	5
36	92% [82; 99]	334	28	8
48	85% [58; 99]	327	35	8

AUROC indicates area under the receiver-operating characteristic curve; CI, confidence interval; EDASS, early death attributable to septic shock.

although we currently lack the means to identify patients who might yield the most benefit from these treatments. The recently published Angiotensin II for the Treatment of High-Output Shock-3 study reported that angiotensin II effectively increased blood pressure in patients with vasodilatory shock, but the effect on mortality was not statistically significant (8). In this trial, as in

others, patient selection was based on an arbitrary norepinephrine flow rate cutoff. We think that in the setting of such trials, the early CDV could help to target, earlier and more accurately, the patients in need of additional vasopressor support.

Further studies with longer follow-up are warranted to consolidate these findings and refine cutoffs.

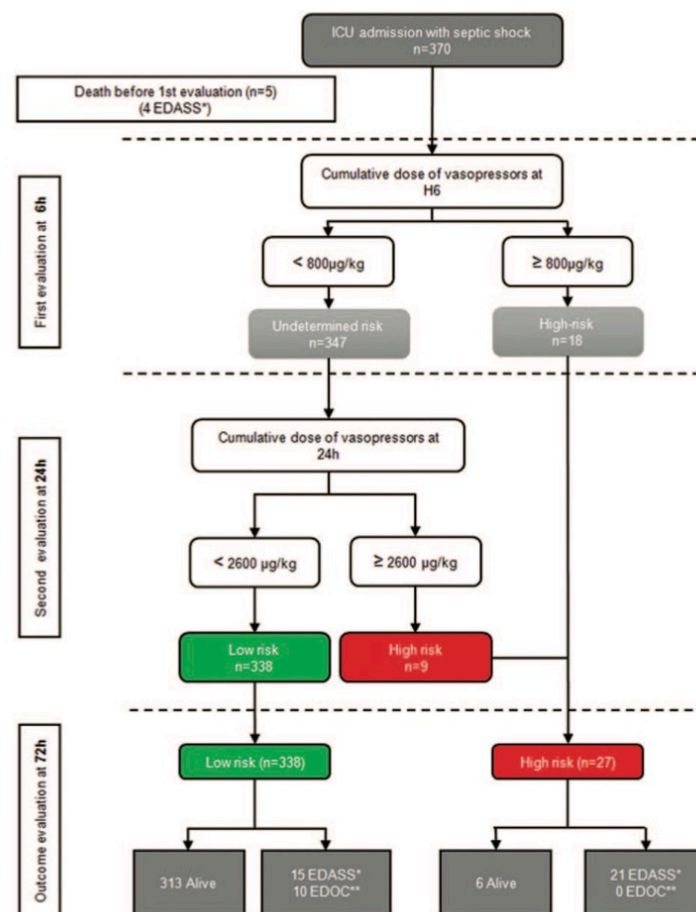


FIG. 3. Defined risk strategy. *EDASS indicates early death attributable to septic shock; †EDOC, early death from other causes.

Study limitations

The absence of consensus regarding the definition of refractory shock was a major impediment to this study. For this reason, we had to use customized criteria to define the “early death” group, although the criteria chosen were very pragmatic. We firmly believe that there is a compelling need to adopt a consensus definition to define this population.

A limitation of this study is the fact that only two vasopressors were taken into account. The findings may therefore not be extrapolated to patients treated with vasopressin, for example. However, previous publications chose to use coefficients for milrinone, vasopressin, and norepinephrine that would convert them to an integer value and thus give each medication equal weight in the calculation of the score (13, 14). This could allow our CDV score to be used in patients where the equivalence can be calculated.

In conclusion, the CDV within the first 6 h following ICU admission is strongly associated with the risk of early death attributable to septic shock. We describe a two-step model, which allows the identification of a very-high risk population in the first 24 h following vasopressor initiation.

Our results propose an original approach to the ill-defined concept of RSS. Although our analysis is limited to the “vasopressor resistance” component, we believe that the population identified by the new strategy described here represents a first step toward a more broadly accepted definition of “RSS.”

REFERENCES

1. Quenot JP, Binquet C, Kara F, Martinet O, Ganster F, Navellou JC, Castelain V, Barraud D, Cousson J, Louis G, et al.: The epidemiology of septic shock in French intensive care units: the prospective multicenter cohort EPISS study. *Crit Care* 17(2):R65, 2013.
2. Daviaud F, Grimaldi D, Dechartres A, Charpentier J, Geri G, Marin N, Chiche JD, Cariou A, Mira JP, Pene F: Timing and causes of death in septic shock. *Ann Intensive Care* 5(1):16, 2015.
3. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D: Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 13(12):862–874, 2013.
4. Blair E, Cowley RA, Tait MK: Refractory septic shock in man. Role of lactate and pyruvate metabolism and acid-base balance in prognosis. *Am Surg* 31:537–540, 1965.
5. Bellissant E, Annane D: Effect of hydrocortisone on phenylephrine—mean arterial pressure dose-response relationship in septic shock. *Clin Pharmacol Ther* 68(3):293–303, 2000.
6. Benedict CR, Rose JA: Arterial norepinephrine changes in patients with septic shock. *Circ Shock* 38(3):165–172, 1992.
7. Conrad M, Perez P, Thivillier C, Levy B: Early prediction of norepinephrine dependency and refractory septic shock with a multimodal approach of vascular failure. *J Crit Care* 30(4):739–743, 2015.
8. Khanna A, English SW, Wang XS, Ham K, Tumlin J, Szerlip H, Busse LW, Altaweel L, Albertson TE, Mackey C, et al.: ATHOS-3 Investigators. Angiotensin II for the treatment of vasodilatory shock. *N Engl J Med* 377(5):419–430, 2017.
9. Ranieri VM, Thompson BT, Barie PS, Dhainaut JF, Douglas IS, Finfer S, Gardlund B, Marshall JC, Rhodes A, Artigas A, et al.: Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock. *N Engl J Med* 366(22):2055–2064, 2012.
10. Brown SM, Lanspa MJ, Jones JP, Kuttler KG, Li Y, Carlson R, Miller RR 3rd, Hirschberg EL, Grissom CK, Morris AH: Survival after shock requiring high-dose vasopressor therapy. *Chest* 143(3):664–671, 2013.
11. Martin C, Medam S, Antonini F, Alingrin J, Haddam M, Hammad E, Meyssignac B, Vigne C, Zieleskiewicz L, Leone M: Norepinephrine: not too much, too long. *Shock* 44(4):305–309, 2015.
12. Jenkins CR, Gomersall CD, Leung P, Joynt GM: Outcome of patients receiving high dose vasopressor therapy: a retrospective cohort study. *Anaesth Intensive Care* 37(2):286–289, 2009.
13. Gaies MG, Gurney JG, Yen AH, Napoli ML, Gajarski RJ, Ohye RG, Charpie JR, Hirsch JC: Vasoactive-inotropic score as a predictor of morbidity and mortality in infants after cardiopulmonary bypass. *Pediatr Crit Care Med* 11(2):234–238, 2010.
14. Wernovsky G, Wypij D, Jonas RA, Mayer JE Jr, Hanley FL, Hickey PR, Walsh AZ, Chang AC, Castaneda AR, Newburger JW, et al.: Postoperative course and hemodynamic profile after the arterial switch operation in neonates and infants. A comparison of low-flow cardiopulmonary bypass and circulatory arrest. *Circulation* 92(8):2226–2235, 1995.

APPENDIX: LIST OF INVESTIGATORS IN THE EPISS STUDY

J.P. Quenot, P.E. Charles, S. Prin, A. Pavon, S. Barbar, University Hospital Bocage, Dijon, France; K. Kuteifan, J. Mootien, P. Guiot, Centre Hospitalier, Mulhouse, France; F. Kara, Centre Hospitalier, Haguenau, France; M. Hasselmann, P. Sauder, F. Ganster, O. Martinet, NouvelHopital Civil, Strasbourg, France; V. Castellain, F. Schneider, HopitalHauteepierre, Strasbourg, France; J.C. Navellou, G. Capellier, Centre HospitalierUniversitaire, Besancon, France; A. Noiro, P. Daoudal, Centre Hospitalier, Vesoul, France; O. Ruyer, M. Feissel, J.P. Faller, Centre Hospitalier, Belfort, France; B. Levy, A. Gerard, J. Perny, P. Perez, HopitalBrabois, Nancy, France; S. Gibot, P.E. Bollaert, D. Barraud, A. Cravoisy, Hopital Central, Nancy, France; A.M. Gutbub, P. Rerat, G. Laplatte, H. Lessire, Centre Hospitalier, Colmar, France; C. Mezher, Centre Hospitalier, Montbeliard, France; J. Cousson, T. Floch, Hopital Robert Debré, Reims, France; G. Louis, J.F. Poussel, Centre Hospitalier, Metz, France.



Titre : Nouvelles approches dans la prévention et le traitement du sepsis

Mots-clés : Sepsis, choc septique, LPS, endotoxine

Résumé

Le lipopolysaccharide (LPS) a un métabolisme complexe, et n'a pas encore pu être utilisé efficacement comme biomarqueur ou cible thérapeutique au cours du sepsis. Nous avons utilisé une méthode de quantification du LPS par le 3-hydroxy myristate (3HM), un composé spécifique, qui permet de détecter le LPS associé aux lipoprotéines dans le plasma. Nous avons dosé les taux de 3HM dans une cohorte de patients admis en réanimation et chez des sujets volontaires sains. Les patients septiques avaient des taux plus élevés de 3HM, de même que les patients non-survivants au sepsis. Des taux substantiels de 3HM étaient aussi retrouvés chez les sujets sains, suggérant que le LPS est étroitement intégré au métabolisme humain. Ensuite, nous avons démontré que l'adsorption des lipoprotéines LDL (*low density lipoproteins*) par LDL aphérèse réduit les taux circulants de LPS, *in vitro* sur du plasma de sujets septiques, mais aussi *in vivo* chez des patients hypercholestérolémiques. Globalement, ces résultats apportent de informations importantes pour la compréhension de l'endotoxémie, et ouvrent des perspectives thérapeutiques d'épuration extracorporelle au cours du sepsis.

Title: New approaches in sepsis prevention and treatment

Keywords: Sepsis, septic shock, LPS, endotoxin

Abstract

Lipopolysaccharide's (LPS) metabolism is complex, and it is still not used as a consistent biomarker or therapeutic target during sepsis. We used a novel LPS quantification method, able to detect lipoprotein-associated LPS in plasma, using 3-hydroxy myristate (3HM), a specific compound. We measured the 3HM levels in a cohort of patients admitted to intensive care and healthy volunteers. Septic patients had higher levels of 3HM, as did non-survivors of sepsis. Substantial levels of 3HM were also found in healthy subjects, suggesting that LPS is

tightly integrated with human metabolism. Then, we demonstrated that the adsorption of LDL (low density lipoproteins) lipoproteins by LDL apheresis reduces the circulating levels of LPS, *in vitro* in the plasma of septic subjects, but also *in vivo* in hypercholesterolemic patients. Overall, these results provide important information for the understanding of endotoxemia, and open therapeutic perspectives for extracorporeal treatment during sepsis.

