

Université de Montréal

Ce mémoire intitulé :

Rôle de l'acide urique dans la défaillance d'organes suite au choc hémorragique : une avenue
thérapeutique?

Faculté de Médecine

Présenté par :

Dr. Francois Khazoom

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de Maître ès
sciences (M. Sc.) en Sciences biomédicales option Médecine expérimentale

Samedi le 2 mai 2020

© Dr. Francois Khazoom, 2020

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Rôle de l'acide urique dans la défaillance d'organes suite au choc hémorragique : une avenue
thérapeutique?

Faculté de Médecine

Présenté par :

Dr. Francois Khazoom

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Martin Sirois (président-rapporteur)

Dr. Emmanuel Charbonney (directeur)

Dr. Martin Albert (co-directeur)

Dr. Olivier Lesur (membre du jury)

Table des matières

<i>Résumé et mots clés</i>	3
<i>Summary and key words</i>	5
<i>Liste des tableaux et figures</i>	7
<i>Liste des abréviations</i>	9
<i>Mise en contexte</i>	12
Chapitre 1 <i>Revue des connaissances</i>	16
1.1 Le choc hémorragique traumatique et ses particularités	16
1.1.1 Pathophysiologie, mécanismes de compensation et de décompensation.....	16
1.1.2 La réponse inflammatoire.....	19
1.1.3 La coagulopathie traumatique	20
1.1.4 Principes de traitement	22
1.2 L'ischémie-reperfusion	23
1.2.1 Dysfonction des pompes ioniques	24
1.2.2 Augmentation du stress oxydatif.....	24
1.2.3 Apoptose, nécrose, alarmines et inflammation.....	27
1.3 Les thérapies anti-oxydantes et anti-inflammatoires	31
1.3.1 Thérapies anti-oxydantes.....	31
1.3.2 Thérapies anti-inflammatoires.....	32
1.3.3 Thérapies anti-alarmines : bénéfices potentiels et défis significatifs.....	33
Chapitre 2 <i>L'Acide Urique en tant qu'alarmine</i>	36
2.1 L'acide urique : un anti-oxydant ou un médiateur pathologique?	36
2.2 L'acide urique et le choc hémorragique	41
2.3 Rôle mitigé dans l'atteinte entéro-hépatique : une opportunité	42
Chapitre 3 <i>Volet fondamental: Impact of uric acid on liver injury and intestinal permeability following resuscitated hemorrhagic shock in rats</i>	47
Chapitre 4 <i>Volet clinique : La circulation de l'Acide Urique chez les patients Sévèrement Traumatisés : une étude pilote prospective (AUSTRA)</i>	73
4.1 Méthodologie	73
4.2 Résultats préliminaires	82
4.3 Discussion	88
Chapitre 5 <i>Conclusion</i>	97
Références bibliographiques	99

Résumé et mots clés

Alors que le choc hémorragique représente la première cause de mortalité précoce chez les patients subissant un traumatisme sévère, la défaillance d'organes est responsable d'une mortalité tardive chez cette population. Les alarmines, molécules libérées en situation d'ischémie-reperfusion et capables d'induire une réponse inflammatoire systémique et locale, représentent potentiellement une cible thérapeutique afin de minimiser la défaillance d'organes post-traumatique. L'acide urique est une molécule pro-inflammatoire et pro-apoptotique libérée en situation de choc hémorragique dont les effets au niveau des organes sont peu investigués. Le premier volet de ce mémoire présente une preuve de concept que l'acide urique joue un rôle clé dans l'atteinte hépatique et intestinale dans un modèle animal de choc hémorragique, et sera présenté sous forme de manuscrit soumis. Le deuxième volet de ce mémoire présente des données préliminaires d'une étude clinique prospective visant à évaluer la cinétique de l'acide urique chez une cohorte de patients traumatisés.

Volet animal

Un choc hémorragique a été induit chez des rats Wistar en retirant du volume circulant titré à une tension artérielle moyenne (TAM) de 30-35 mmHg pendant 60 minutes. Les rats ont été réanimés avec une solution composée de sang retiré et de lactate ringer (1 :1), avec ou sans Uricase, une enzyme recombinante qui métabolise l'acide urique. Les résultats démontrent une diminution significative de plusieurs marqueurs d'hépatolyse (AST, ALT), inflammatoire (ICAM-1, MPO, TNF-alpha, IL-1, Caspase-1) et apoptotique (Caspase-3, -8, Bax/BCL-2, pAKT/AKT) au sein du groupe uricase. L'intervention sur l'acide urique a également pu prévenir l'augmentation de la

perméabilité intestinale suite au choc hémorragique, de même que la translocation de produits bactériens en circulation (LPS).

Volet clinique

Vingt patients subissant un choc hémorragique traumatique ont été recrutés de façon prospective à l'Hôpital Sacré-Cœur de Montréal, dans le cadre d'un projet pilote soutenu par le consortium de trauma du FRSQ. Des prélèvements d'acide urique sérique ont été effectués de façon sérieuse pendant 7 jours. Les critères de faisabilité, notamment les taux de consentement (95%) et d'observance des prélèvements sériés (90% pour le premier prélèvement, 65% pour les prélèvements aux 4 heures, et 73% pour les prélèvements aux 8 heures) ont été jugés acceptables. Les cinétiques d'acide urique étaient reproductibles dans l'ensemble de la cohorte ($R^2 = 0.87$). L'aire sous la courbe était significativement plus élevée chez les patients avec un score de défaillance d'organes plus élevé à 72h ($\text{SOFA} \geq 6$).

Conclusions

Bien que les mécanismes demeurent à élucider, ces travaux démontrent que l'acide urique est important médiateur dans l'atteinte des organes suivant un choc hémorragique. Cette molécule représente potentiellement une cible thérapeutique dont l'objectif ultime est de minimiser la défaillance d'organes suite au choc hémorragique.

Mots clés : Choc hémorragique, traumatisme, alarmines, acide urique, défaillance d'organes.

Summary and key words

While hemorrhagic shock is the first cause of early mortality among severe trauma patients, organ failure leads to late mortality and morbidity in this population. Alarmins, molecules released after ischemia-reperfusion, are able to activate local and systemic inflammatory pathways and potentially represent a therapeutic target to minimize organ failure. Uric acid is a pro-inflammatory and pro-apoptotic molecule released after hemorrhagic shock and its role pertaining to organ failure is incompletely studied. The first part of this thesis presents a proof of concept that uric acid plays a key role in liver and intestinal damage in an animal model of hemorrhagic shock; it will be presented in the format of a submitted article. The second part of this thesis presents preliminary data from a prospective observational clinical study evaluating uric acid kinetics in a cohort of trauma patients.

Animal study

Hemorrhagic shock was induced with blood withdrawal among Wistar rats for a target mean arterial blood pressure of 30-35 mmHg for 60 minutes. Animals were resuscitated with a 1 :1 mix of Ringer Lactate and drawn blood with or without Uricase, a recombinant enzyme that metabolizes uric acid. Results show a statistically significant decrease in hepatocellular damage (plasma AST and ALT), inflammatory markers (ICAM-1, MPO, TNF-alpha, IL-1, Caspase-1) and apoptotic markers (Caspase-3, -8, Bax/BCL-2, pAKT/AKT) among the Uricase group. The intervention on uric acid also prevented increased intestinal permeability and bacterial product (LPS) translocation.

Clinical study

Twenty patients sustaining major trauma with hemorrhagic shock were prospectively recruited at Montreal Sacré-Cœur Hospital, in the context of a pilot study funded by the FRSQ trauma consortium. Uric acid concentration was determined serially for 7 days after trauma. Feasibility criteria, notably consent rate (95%), sampling observance rate (90% for first sample, 65% for samples every 4 hours, and 73% for samples every 8 hours) were considered acceptable. Uric acid kinetics were reproducible among the entire cohort ($R^2 = 0.87$). The area under the curve was significantly increased among patients with higher sequential organ failure assessment score at 72h (SOFA \geq 6).

Conclusions

Although mechanisms remain to be elucidated, these studies show that uric acid is an important mediator for the development of organ damage after hemorrhagic shock. This molecule potentially represents a therapeutic target with the ultimate goal of minimizing organ failure after hemorrhagic shock.

Key words : Hemorrhagic shock, trauma, alarmins, uric acid, organ failure.

Liste des tableaux et figures

Tableaux

Tableau 1 article : Physiological variables for the protocol

Tableau 4.1: le Sequential Organ Failure Assessment Score (SOFA)

Tableau 4.2: caractéristiques de base de la cohorte

Tableau 4.3 : Taux de consentement

Tableau 4.4 : Taux d'observance des prélèvements

Figures

Figure 1.1: mécanismes de compensation physiologiques suite au choc hémorragique. Peitzman et al, 1995. Licence d'autorisation obtenue avec RightLink.

Figure 1.2: Réversibilité du choc hémorragique selon la durée initiale du choc. Peitzman et al, 1995. Licence d'autorisation obtenue avec Rightslink.

Figure 1.3: survie suite au choc hémorragique selon la quantité de réanimation. Peitzman et al, 1995. Licence d'autorisation obtenue avec Rightslink.

Figure 1.4: réponse inflammatoire (SIRS) et anti-inflammatoire (CARS) suite à un traumatisme. Brochner et al, 2009. Licence d'autorisation obtenue avec Rightslink.

Figure 2.1: Activation de l'inflammasome par l'acide urique cristalline. El-Ridi et al, 2017. Licence d'autorisation obtenue avec Rightslink.

Figure 2.2 : Activation du récepteur RAGE par l'acide urique soluble, résultant en l'expression de protéines d'adhésion des cellules immunitaires (VCAM, ICAM), de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF-alpha) et d'HMGB1. Cai et al, 2017. Licence d'autorisation obtenue avec Rightslink.

Figure 1 article : Hemodynamic, resuscitation parameters and weight.

Figure 2 article: Plasma and liver uric acid.

Figure 3 article: Hepatocellular injury, apoptosis and cell survival.

Figure 4 article: Liver inflammation.

Figure 5 article: Endotoxemia, intestinal permeability studies.

Figure 6 article: In-vitro HT-29 junctional protein expression and supernatant UA concentration.

Figure 4.1 : Devis de l'étude, critères d'inclusion et d'exclusion.

Figure 4.2 : Collecte des données incluant les prélèvements d'acide urique, les prélèvements standards, les données démographiques, hémodynamiques, interventionnelles et portant sur la défaillance d'organe.

Figure 4.3: Taux de recrutement des patients

Figure 4.4 : courbes individuelles d'acide urique.

Figure 4.5 : courbes d'acide urique selon le SOFA à 72h

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AIS : Abbreviated Injury Score

AKT : Protéine Kinase B

ALT: Alanine Aminotransférase

APACHE II : Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II score

ARDS : Acute Respiratory Distress Syndrome

AST : Aspartate Aminotransférase

ATLS : Acute Trauma Life Support

ATP : Adénosine Triphosphate

AU : Acide Urique

AVC : Accident Vasculaire Cérébral

BAX : Bcl-2-Associated X protein

BCL-2 : B-cell Lymphoma-2 protein

BH4 : Tetrahydrobioptérine

BM : Blessure Médullaire

CARS : Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome

CCI : Charlson Comorbidity Index

COVID-19 : Coronavirus Disease 2019

DAMPS : Danger-Associated Molecular Patterns

DCR : Damage Control Resuscitation

ED : Emergency department

eNOS : endothelial Nitric Oxide Synthase

FiO₂ : Fraction of Inspired Oxygen

HIF : Hypoxia Inducible Factor

HMGB1 : High Mobility Group Protein B1

ICAM-1 : Intercellular Adhesion Molecule 1

IFN : Interferon

IL : Interleukin

iNOS : Inducible Nitric Oxide Synthase

ISS : Injury Severity Score

IV : Intraveineux

LPS : Lipopolysaccharide

MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein 1

MODS : Multi Organ Dysfunction Syndrome

MPO : Myéloperoxidase

NAD : Nicotinamide Adenine Dinucleotide

NADP : Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate

NFKB : Nuclear Factor Kappa B

NLR : NOD-like Receptor

NLRP-3 : NOD-like Receptor Pysin domain containing 3

nNOS : Neuronal Nitric Oxyde Synthase

NOD : Nucleotide Oligomerization Receptors

NOX : NADPH Oxidase

OR : Operating Room

PAI-1 : Plasminogen Activator Inhibitor 1

PAMPS : Pathogen Associated Molecular Patterns

PaO₂ : Partial Pressure of Oxygen

PFC : Plasmas Frais Congelés

PO : Per Os

pRBC : Packed Red Blood Cells

PRR : Pattern Recognition Receptors

RAGE : Receptor for Advanced Glycation Endproducts

RNS : Reactive Nitrogen Species

ROS : Reactive Oxygen Species

ROTEM : Rotational Thromboelastometry

SAPS II : Simplified Acute Physiology Score II

SIRS : Systemic Inflammatory Response Syndrome

SOFA score : Sequential Organ Failure Assessment score

SRAS : Syndrôme Respiratoire Aïgu Sévère

TCC : Traumatisme craniocérébral

TEG : Thromboelastographie

TIC : Trauma Induced Coagulopathy

TLR : Toll-like Receptor

TNF : Tumor Necrosis Factor

TNFR : Tumor Necrosis Factor Receptor

tPA : Tissue Plasminogen Activator

VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule 1

XO : Xanthine Oxidase

Mise en contexte

Plus de 200000 canadiens sont hospitalisés chaque année en raison de traumatismes multiples, représentant la première cause de mortalité chez les patients entre 0 et 45 ans¹. La mortalité des patients sévèrement polytraumatisés suit une distribution tri-modale, où 50-60% des décès surviennent sur la scène (mortalité immédiate), 15-30% dans les premières 24 heures suivant l'événement (mortalité précoce), et 10-40% après les premières 24 heures suivant le traumatisme (mortalité tardive)². Alors que le traumatisme cranio-cérébral et le choc hémorragique sont majoritairement responsables des pics de mortalité immédiat et précoce, le sepsis et la défaillance d'organes multiples sont les deux principales causes de mortalité tardive chez les patients sévèrement polytraumatisés^{2,3}. En général, la mortalité sur la scène reflète des lésions traumatiques menant à une exsanguination ou un décès neurologique immédiats, où le pronostic est difficilement modifiable étant donné la létalité des lésions. Les taux de mortalité précoce dépendent de la sévérité du traumatisme, de la rapidité du transport pré-hospitalier vers des centres de traumatologie tertiaire et de la qualité de la prise en charge initiale des polytraumatisés, dictée par l'Advanced Trauma Life Support (ATLS). L'ATLS permet de standardiser la prise en charge initiale des polytraumatisés afin de la rendre efficace et sécuritaire, mettant l'accent sur la reconnaissance rapide du choc, la réanimation volumique avec des produits sanguins et le contrôle précoce de l'hémorragie. Malgré ces stratégies contemporaines, jusqu'à 69% des survivants initiaux développeront une défaillance d'organes multiples, laquelle persistera au-delà de 7 jours chez environ 30% des patients, responsable du troisième pic de mortalité tardif³.

L'hypoxie et la nécrose tissulaire, générées à la fois par l'énergie du traumatisme transférée directement aux tissus et par l'ischémie-reperfusion dans un contexte de choc, favorisent la libération d'alarmines, molécules libérées directement par les tissus en souffrance et capables d'activer directement et stérilement le système immunitaire inné, contribuant au syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS) observé chez les polytraumatisés⁴. Le SIRS engendré par ces phénomènes peut s'avérer démesuré et contribuer à la défaillance d'organes multiples et à la mortalité. En effet, plusieurs études ont établi une association entre la magnitude du SIRS et le risque de défaillance d'organes et de mortalité suivant un traumatisme sévère⁵⁻⁸. Cependant, aucune intervention ciblant cette réponse inflammatoire n'a été développée de façon robuste en traumatologie, le soutien des organes (ventilation mécanique, réanimation transfusionnelle, vasopresseurs, hémodialyse) et le traitement des infections tardives demeurant les principales options thérapeutiques. Étant donné l'association entre la magnitude du SIRS et le risque de défaillance d'organes et de mortalité, il est donc possible que le pronostic des polytraumatisés soit en partie dicté dès le début par le degré de libération des alarmines qui initient ces phénomènes; c'est la raison pour laquelle notre groupe s'est intéressé au rôle de l'acide urique, avec la possibilité d'utiliser une intervention pharmacologique lors de la réanimation du choc hémorragique.

L'acide urique, un produit métabolique provenant de la dégradation des purines par l'enzyme xanthine oxydase, est une alarmine avec des effets pro-inflammatoires bien établis⁹. Bien qu'incriminé en tant que médiateur essentiel dans la pathophysiologie de conditions inflammatoires aiguës comme le syndrome de lyse tumorale et la goutte, peu de littérature a étudié son rôle dans le contexte des soins intensifs et des polytraumatisés^{9,10}. Pourtant, sa libération a été décrite non seulement au sein de modèles animaux de choc hémorragique^{11,12}, mais également

chez les patients atteints de sepsis sévère et victimes de traumatismes graves (Étude DYNAMIC, NCT01355042, données non-publiées). Sa libération est probablement liée à l'ischémie-reperfusion et au trauma tissulaire direct qui augmentent la lyse cellulaire, menant à la libération de purines qui doivent être métabolisées en acide urique pour excrétion rénale⁹. Des données publiées par notre laboratoire ont démontré son rôle clair dans l'atteinte inflammatoire et apoptotique des reins et des poumons suite au choc hémorragique¹³. Cependant, la littérature demeure mitigée quant à son rôle dans l'atteinte hépatique et intestinale. Certains modèles animaux, avec une survie limitée à quelques heures, ont démontré un rôle protecteur, alors que d'autres ont démontré un rôle délétère via l'administration d'inhibiteurs de la xanthine oxidase¹⁴⁻²⁰. Par contre, ces études incriminaient non pas l'acide urique en tant que médiateur *direct*, mais bien l'inhibition de la xanthine oxidase et la production de radicaux libres, lesquels ont des effets pro-inflammatoires et pro-apoptotiques. L'acide urique était donc mesuré comme un marqueur de bon fonctionnement des inhibiteurs de la xanthine oxidase administrés pour diminuer la production de radicaux libres, et non comme médiateur direct.

Ces controverses forment donc la base de mon sujet de maîtrise : une opportunité non seulement d'améliorer les connaissances scientifiques portant sur le rôle de l'acide urique dans l'atteinte entéro-hépatique suite au choc hémorragique, mais surtout de contribuer à la transition clinique de ces concepts et ultimement d'améliorer le pronostic des patients sévèrement traumatisés. Ce mémoire portera sur le rôle de l'acide urique en tant que médiateur et cible thérapeutique dans la défaillance d'organes multiples suite au choc hémorragique traumatique. En premier lieu, une révision des concepts essentiels au développement de la réponse inflammatoire systémique et de la défaillance d'organes chez les polytraumatisés fera l'objet des Chapitres 1 et 2. Le Chapitre 1

abordera les concepts de choc hémorragique traumatique et ses particularités. Les mécanismes d'ischémie-reperfusion et d'activation du système immunitaire seront décrits, de même que les cibles thérapeutiques cytoprotectrices étudiées. Le Chapitre 2 portera sur l'acide urique en tant qu'alarmine capable d'induire une réponse inflammatoire systémique et de contribuer à la défaillance d'organes dans un contexte de choc hémorragique traumatique. Le reste du mémoire sera consacré à mes travaux de recherche, qui comportent un volet pré-clinique étudiant le rôle actif de l'acide urique dans l'atteinte hépatique et intestinale, et un volet clinique visant à caractériser la cinétique de l'acide urique sérique suite au choc hémorragique traumatique. Le Chapitre 3 présentera donc la méthodologie et les résultats de mon projet préclinique sous forme de manuscrit soumis. Le Chapitre 4 présentera la méthodologie et les résultats préliminaires d'une étude pilote prospective visant à déterminer la cinétique de l'acide urique suite au choc hémorragique traumatique et dont le recrutement est toujours en cours à l'écriture de ce mémoire. Le Chapitre 5 présentera une discussion des résultats présentés dans ce mémoire. Le Chapitre 6 conclura le mémoire.

Chapitre 1 Revue des connaissances

1.1 Le choc hémorragique traumatique et ses particularités

1.1.1 Pathophysiologie, mécanismes de compensation et de décompensation

L'état de choc est défini comme l'incapacité à répondre aux besoins métaboliques au niveau cellulaire en raison d'une délivrance en oxygène et d'une élimination métabolique insuffisantes²¹.

D'un point de vue hémodynamique, le choc hémorragique cause une diminution de la perfusion tissulaire en diminuant le volume circulant, engendrant une diminution du retour veineux au niveau cardiaque^{21,22}. Le débit cardiaque étant directement proportionnel au retour veineux, une perte de volume circulant significative mène à une diminution du débit cardiaque et de la perfusion tissulaire. Jusqu'à un certain point, des mécanismes physiologiques permettent de compenser ces phénomènes (figure 1.1): 1) l'activation du système sympathique et l'inhibition du système parasympathique augmentent la fréquence cardiaque, la contractilité cardiaque et le tonus vasculaire au niveau des organes non-essentiels (peau, système gastro-intestinal); 2) l'activation du système rénine/angiotensine/aldostérone augmente le tonus vasculaire et permet de compenser la perte du volume circulant en augmentant la rétention hydrosodée; 3) le mouvement liquidien permet d'augmenter le volume circulant via les fluides interstitiels; 4) l'autorégulation circulatoire permet de préserver la perfusion des organes essentiels tels le cœur et le cerveau au détriment des autres organes^{21,22}. De façon pragmatique, ces mécanismes de compensation maintiennent les patients en vie jusqu'à ce que des mesures de réanimation et de contrôle hémorragique soient mises en place. L'état de choc devient donc réversible si les patients sont traités adéquatement et dans un délai raisonnable. Peitzman et al ont démontré au sein d'un modèle murin de choc hémorragique que, pour un même déficit en volume circulant, la durée du choc (>1 heure) pouvait le rendre

irréversible malgré une réanimation volumique standard (figures 1.2 et 1.3), d'où le célèbre *golden hour* fréquemment cité en traumatologie²². L'hypoperfusion prolongée mène à une ischémie et éventuellement à une mort cellulaire qui aura plusieurs effets délétères : 1) dysfonction générale des tissus, notamment du système cardiovasculaire, des reins, du système nerveux central, du système gastro-intestinal (barrières muqueuses, fonction hépatique); 2) dysfonction microcirculatoire menant à une perte du tonus vasomoteur compensatoire et à une perte d'autorégulation des organes essentiels; et 3) libération d'alarmines et activation d'une réponse inflammatoire, exacerbant les lésions tissulaires et la perte du tonus vasomoteur²². Une autre limite de ces mécanismes est évidemment l'incapacité à compenser complètement pour une perte de volume circulant importante (>40%)²². Ceci est bien illustré par les classes du choc hémorragique, où la perte de >40% du volume circulant mène à une compensation maximale, sans toutefois maintenir une perfusion tissulaire adéquate²¹.

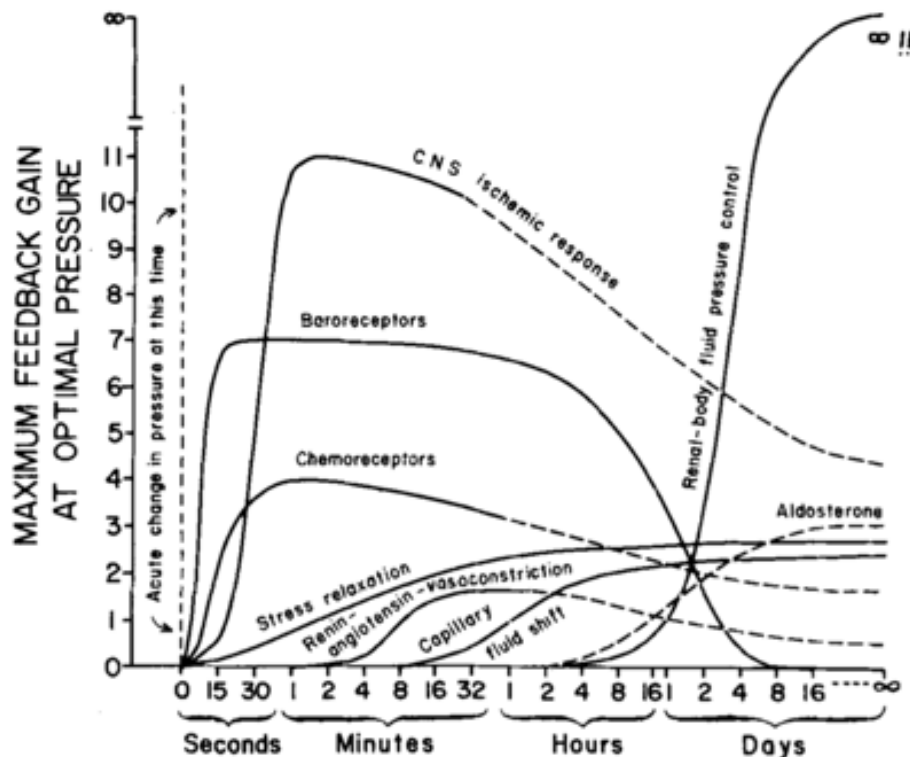


Figure 1.1: mécanismes de compensation physiologiques suite au choc hémorragique. Peitzman et al, 1995. Licence d'autorisation obtenue avec RightLink.

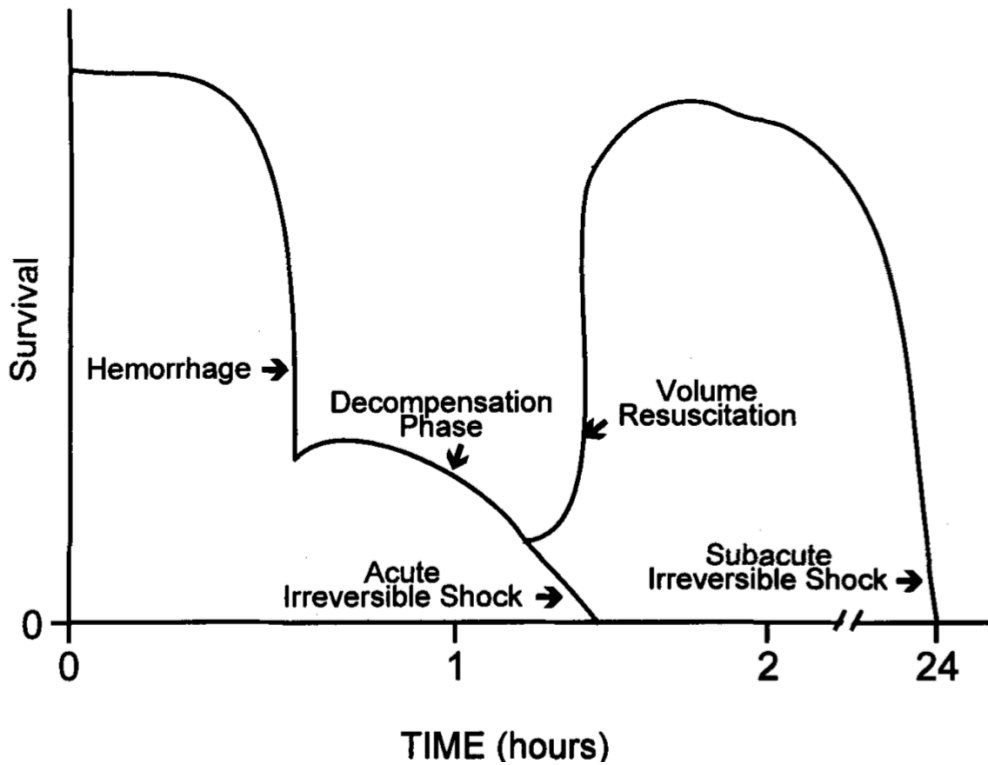


Figure 1.2: Réversibilité du choc hémorragique selon la durée initiale du choc. Peitzman et al, 1995. Licence d'autorisation obtenue avec Rightslink.

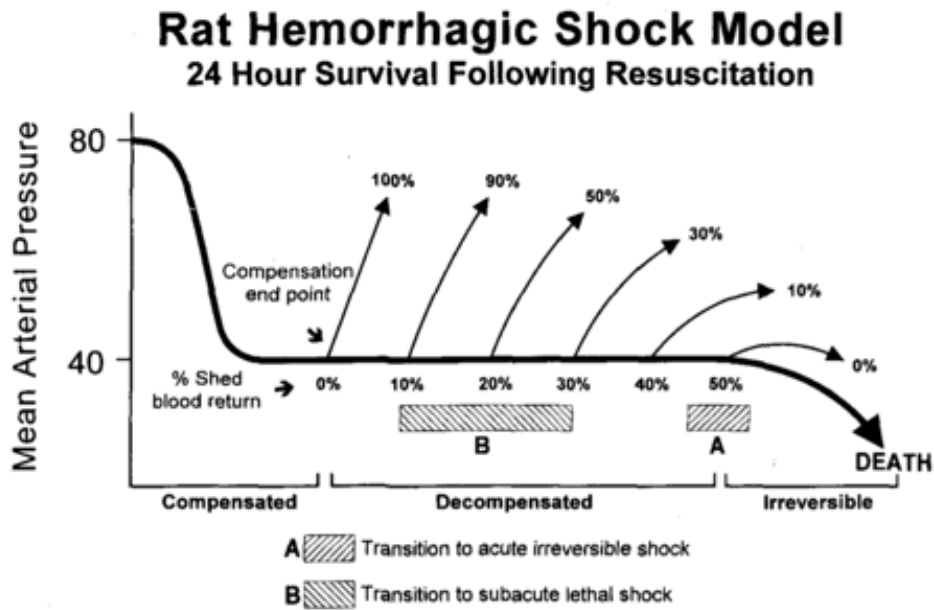


Figure 1.3: survie suite au choc hémorragique selon la quantité de réanimation. Peitzman et al, 1995. Licence d'autorisation obtenue avec Rightslink.

1.1.2 La réponse inflammatoire

Outre les mécanismes de compensation cités ci-haut, le choc hémorragique traumatique se distingue par le développement d'une réponse inflammatoire importante et d'une coagulopathie traumatique^{8,23}. Les patients polytraumatisés subissent une forme extrême de lésions tissulaires, qu'elles soient directement causées par l'énergie du traumatisme (lésion tissulaire directe) ou par l'hypoperfusion systémique dans un contexte de choc (lésion d'ischémie-reperfusion). La réponse inflammatoire systémique est initiée par la libération d'alarmines suite à l'hypoxie cellulaire et au traumatisme tissulaire, molécules définies par leur libération en situation de souffrance cellulaire et leur capacité à activer directement le système immunitaire inné⁴. Ceci induit la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF-alpha, IL-1B, IL-6) qui activent davantage les cellules immunitaires et permettent leur migration à l'intérieur des tissus via l'augmentation des protéines d'adhésions (ICAM-1, VCAM), causant davantage de dommages au niveau microvasculaire et tissulaire^{22,24,25}. La cascade du complément, composante essentielle du système immunitaire inné, est également suractivée suite au polytraumatisme et au choc hémorragique; cette *activation du complément traumatique* a été impliquée dans la défaillance d'organes post-traumatique et constitue potentiellement une cible thérapeutique modifiable²⁶⁻²⁹. De façon paradoxale, cette activation mal-adaptée de la réponse inflammatoire systémique initie une transition vers un phénotype anti-inflammatoire (CARS : Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome) dans les jours suivant le traumatisme et augmente la susceptibilité des patients aux infections tardives (figure 1.4). Tous ces phénomènes contribuent donc à la progression vers l'irréversibilité du choc et la défaillance d'organes multiples observée chez les polytraumatisés.

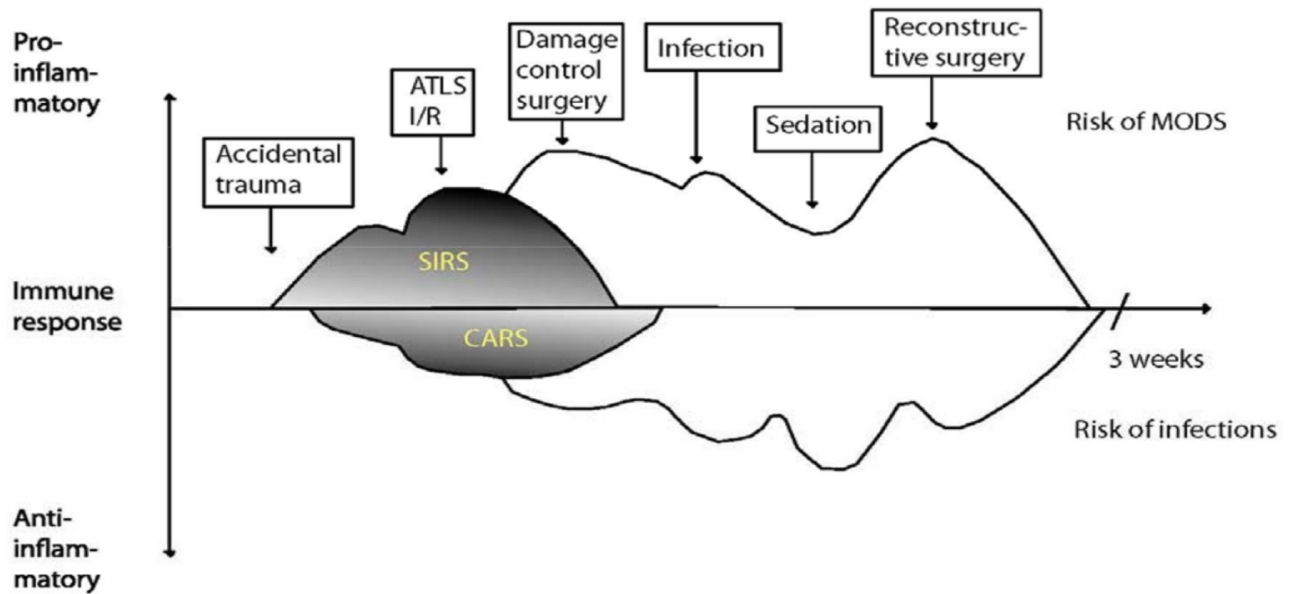


Figure 1.4: réponse inflammatoire (SIRS) et anti-inflammatoire (CARS) suite à un traumatisme. Brochner et al, 2009. Licence d'autorisation obtenue avec Rightslink.

1.1.3 La coagulopathie traumatique

Jusqu'à 25% des patients sévèrement polytraumatisés arrivent en milieu hospitalier avec une coagulopathie induite par le traumatisme (*trauma induced coagulopathy, TIC*), une entité distincte causée en majeure partie par le traumatisme tissulaire direct, l'hypoperfusion généralisée et entretenue par l'inflammation systémique qui en découle³⁰. Cette condition est associée à une augmentation de mortalité chez les polytraumatisés et résulte d'un déséquilibre entre les facteurs pro-coagulants, dont l'objectif est la cessation de l'hémorragie au niveau macrovasculaire, et l'effet anticoagulant dont l'objectif est de préserver la perfusion des organes en inhibant la thrombose microvasculaire, en plus de leurs effets cytoprotecteurs et anti-inflammatoires^{30,31}. Les mécanismes impliqués reposent sur: 1) l'activation de la protéine C (effets anti-inflammatoires et cytoprotecteurs, mais aussi anti-coagulants; 2) la dysfonction endothéliale et l'auto-héparinisation

(libération systémique d'héparan sulfate); 3) l'hyperfibrinolyse via l'activation du tPA (*tissue plasminogen activator*) et l'inhibition du PAI-1 (*platelet activator inhibitor 1*); 4) la consommation excessive des plaquettes menant à une dysfonction plaquettaire; 5) l'activation de la cascade de coagulation menant à une dysfonction des facteurs de coagulation³¹. Or, l'inflammation systémique et la coagulopathie induite par le trauma sont intimement liés^{23,32-34}. Par exemple, l'activation de la protéine C présente des effets anti-inflammatoires et cytoprotecteurs potentiellement bénéfiques, mais son effet anticoagulant est un contributeur majeur à la coagulopathie traumatique³³. De plus, la libération de cytokines pro-inflammatoires tels l'IL-1B et l'IL-6 favorise un phénotype fibrinolytique en activant le tPA et l'urokinase³³. L'inflammation systémique contribue également à la dysfonction endothéliale à l'autohéparinisation^{31,35}. À cet effet, Darlington et al ont démontré une corrélation positive entre la libération de certaines cytokines pro-inflammatoires et le développement d'une coagulopathie au sein d'un modèle murin de polytrauma et de choc hémorragique³². La libération d'HMGB1 (*High Mobility Group Box 1*) est également corrélée à la coagulopathie traumatique au sein de modèles animaux et chez les polytraumatisés, soit par un effet direct ou indirect via l'activation du système immunitaire inné et l'inflammation systémique qui en découle^{36,37}.

Cliniquement, il devient intuitif que ces deux particularités du choc hémorragique traumatique s'entretiennent mutuellement : la coagulopathie complique le contrôle hémorragique, ce qui augmente la blessure d'ischémie-reperfusion, causant davantage d'inflammation systémique. À l'inverse, l'inflammation systémique (IL-1B, IL-6) est en mesure d'activer l'hyperfibrinolyse et l'autohéparinisation (via la dysfonction endothéliale), favorisant une coagulopathie pouvant rendre futile tout contrôle hémorragique chirurgical. L'importance de cette interaction

inflammation/coagulation justifie donc le développement de nouvelles avenues thérapeutiques visant à contrer cette inflammation mal-adaptée.

1.1.4 Principes de traitement

Le traitement d'un polytraumatisé en choc hémorragique comprend la phase de réanimation initiale, le contrôle de l'hémorragie et le traitement des complications subséquentes (infections, défaillance d'organes multiples, etc) aux soins intensifs. Les principes de réanimation initiale suivent le concept de *Damage Control Resuscitation (DCR)*. Ceci consiste en la prévention de l'hypothermie, la diminution des cibles tensionnelles jusqu'au contrôle hémorragique définitif (selon le mécanisme et les lésions associées), le contrôle hémorragique précoce, la minimisation des crystalloïdes, l'utilisation d'un protocole de transfusion massive avec des ratios pRBC : PFC : plaquettes prédéfinis de 1 :1 :1, l'utilisation de mesures "point of care" de la coagulation (TEG ou ROTEM) et l'utilisation de compléments thérapeutiques tels l'acide tranexamique, un agent anti-fibrinolytique qui vise à pallier à la coagulopathie traumatique³⁸⁻⁴⁰. Ces principes de réanimation visent l'équilibre entre la minimisation de l'hypoperfusion tissulaire et l'hémostase en prévision d'un contrôle hémorragique définitif. Ils ne ciblent pas directement la réponse inflammatoire initiale qui peut s'avérer mal-adaptée et engendrer une défaillance d'organes tardive ainsi qu'une susceptibilité au sepsis, laquelle peut survenir indépendamment de la qualité de la prise en charge initiale. L'étude des mécanismes d'inflammation en traumatologie représente donc une opportunité d'améliorer le pronostic des patients polytraumatisés, en caractérisant de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

1.2 L'ischémie-reperfusion

L'ischémie-reperfusion représente un concept clé qui favorise les mécanismes d'inflammation décrits ci-haut. En général, l'ischémie est définie comme un apport tissulaire en oxygène inadéquat pour répondre aux besoins métaboliques. Dans le cas du choc hémorragique, ceci est la conséquence de l'insuffisance circulatoire liée à la perte volémique et le taux abaissé du transporteur de l'oxygène (l'hémoglobine). La blessure de reperfusion résulte des efforts (physiologiques ou interventionnels) déployés afin de rétablir l'apport en oxygène aux tissus. La reperfusion en territoire ischémique augmente paradoxalement la blessure tissulaire via l'activation de cascades inflammatoires et apoptotiques. Ici, l'accent sera mis sur la blessure d'ischémie-reperfusion dans un contexte de choc hémorragique; d'autres exemples cliniques existent, tels l'ischémie cardiaque lors d'un infarctus du myocarde et la reperfusion lors d'une revascularisation par angioplastie, ou bien l'ischémie cérébrale causée par un AVC et la reperfusion induite par la thrombolyse. En choc hémorragique, l'ischémie tissulaire résulte de l'état de choc, alors que la reperfusion résulte de la réanimation liquidienne/transfusionnelle. L'ischémie engendre une transition du métabolisme aérobie vers le métabolisme anaérobie. Cela diminue l'efficacité de la synthèse d'ATP et de la chaîne de transport des électrons au niveau de la mitochondrie, engendrant une déplétion cellulaire d'ATP. La déplétion d'ATP induit plusieurs phénomènes, notamment: 1) une dysfonction des pompes ioniques, 2) l'augmentation du stress oxydatif, 3) l'augmentation de l'apoptose et 4) la libération d'alarmines menant à l'activation des cascades inflammatoires⁴¹.

1.2.1 Dysfonction des pompes ioniques

La pompe ionique Na/K ATPase est dépendante de l'ATP afin de créer un gradient ionique à travers la membrane cytoplasmique. Normalement, cette pompe transporte les ions sodium et potassium contre leurs gradient de concentration vers l'extérieur et l'intérieur de la cellule, respectivement. La déplétion en ATP causée par l'ischémie diminue l'activité de la pompe Na/K+ ATPase et engendre une augmentation de sodium à l'intérieur de la cellule. Cette accumulation de sodium intracellulaire cause non seulement un œdème cellulaire, mais diminue également l'activité de deux canaux ioniques, le canal Na^+/H^+ et Na/Ca^{2+} , dont les fonctions respectives sont de transporter les ions H^+ et Ca^{2+} à l'extérieur de la cellule. Alors que l'accumulation des ions Na^+ et Ca^{2+} en intracellulaire créent un gradient osmotique et favorise l'œdème cellulaire, l'accumulation des ions H^+ cause une acidose intracellulaire et induit une dysfonction des enzymes, des ribosomes et ultimement une diminution de la synthèse des protéines. Tous ces phénomènes résultent en la désintégration de la membrane cytoplasmique menant à une nécrose cellulaire⁴¹.

1.2.2 Augmentation du stress oxydatif

La phase de reperfusion, causée principalement par les efforts physiologiques et la réanimation chez les traumatisés, vise à rétablir l'apport en oxygène aux tissus ischémiques. Dans un contexte d'ischémie pré-existante, l'apport en oxygène peut paradoxalement augmenter la lésion tissulaire; ceci se fait principalement par l'augmentation du stress oxydatif qui provient en majeure partie de l'activité d'enzymes, notamment la Xanthine Déhydrogénase/Oxydase, la NADPH Oxydase et la chaîne de transport des électrons^{41,42}.

Les enzymes xanthine déhydrogénase et xanthine oxydase

Le système Xanthine Déhydrogénase et Xanthine Oxydase joue un rôle important dans le métabolisme des purines et la formation de radicaux libres suite à l'ischémie-reperfusion. Ces deux enzymes sont capables de métaboliser l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique, substance produite pour élimination rénale. En situation non-ischémique, ces réactions d'oxydation se produisent davantage par l'enzyme Xanthine Déhydrogénase, qui utilise le NAD en tant que receveur d'électron, minimisant la formation de radicaux libres. En situation d'ischémie, la déplétion en ATP et l'augmentation du calcium intracellulaire favorise l'activité de l'enzyme Xanthine Oxydase qui devient prédominante et produit les radicaux libres O_2^- et H_2O_2 . Cette voie enzymatique a fait l'objet de plusieurs investigations en ischémie-reperfusion et en choc hémorragique avec des bénéfices démontrés par certaines études^{14-16,18,20}, mais demeurant non-reproductibles à travers la littérature¹⁹. L'une des explications est que la xanthine oxydase peut également augmenter la synthèse du NO, démontré comme protecteur avec ses effets vasodilatateurs et anti-inflammatoires. De plus, la littérature suggère de plus en plus que l'acide urique, produit métabolique final de cette enzyme, est lui-même une molécule pro-inflammatoire et pro-apoptotique avec un rôle prépondérant dans l'ischémie-reperfusion menant au dommage des organes (voir section l'acide urique en tant qu'alarmine)^{41,42}.

Les enzymes NADPH oxydase (NOX)

Les enzymes NADPH oxydases (Famille NOX) représentent une autre source de radicaux libres en ischémie-reperfusion^{41,42}. Ces enzymes sont exprimées sur les surfaces membranaires des phagosomes des neutrophiles, et au niveau des surfaces endothéliales et épithéliales de plusieurs tissus (poumons, foie, rein, tractus digestif)^{41,42}. Elles utilisent le dioxygène comme receveur

d'électron, formant les radicaux libres $O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2 ^{41,42}. L'hypoxie lors de la phase d'ischémie préalable induit la formation de l'*Hypoxia Inducible Factor (HIF)*, qui active les enzymes NOX^{41,42}. Lors de la reperfusion, l'augmentation de la délivrance en dioxygène fournit le receveur d'électron à ces enzymes déjà suractivées par l'HIF, causant une accumulation excessive de radicaux libres et une utilisation excessive des anti-oxydants endogènes^{41,42}.

Les enzymes NO synthases

L'oxyde nitrique (NO) est synthétisé par les enzymes *nitric oxide synthase* (NOS), présentes sous les formes neuronales (nNOS), endothéliale (eNOS) ou inducible (iNOS). Le NO joue généralement un rôle vasodilatateur, anti-inflammatoire et anti-oxydant; sa synthèse, via la conversion de l'arginine en citruline, nécessite la substance BH_4 qui agit comme co-facteur. En ischémie, l'augmentation des radicaux libres mène à l'oxydation des enzymes NOS et du BH_4 . Ces phénomènes favorisent la formation des radicaux libres H_2O_2 et $OONO^{\cdot-}$ qui contribuent à la charge oxydative, à la dysfonction microvasculaire et aux lésions tissulaires^{41,43}.

La phosphorylation oxydative

La production d'ATP par la phosphorylation oxydative au niveau de la mitochondrie nécessite la réduction du dioxygène^{41,44}. Dans des conditions normales, 95% du dioxygène est réduit de façon tétravalente, produisant deux molécules d'eau; l'autre 5% est réduit de façon univalente, produisant les radicaux libres $O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2 ^{41,44}. Ceux-ci sont ultimement convertis en deux molécules d'eau par les enzymes dismutase, catalase et glutathione peroxydase. Cependant, l'augmentation de la charge oxydative causée par les mécanismes expliqués ci-haut engendre une déplétion des anti-oxydants endogènes, empêchant la neutralisation des radicaux libres formés par

la phosphorylation oxydative^{41,44}. Que ce soit par l'activation des voies d'apoptose ou de nécrose, tous ces phénomènes contribueront à la perte de masse tissulaire fonctionnelle et favoriseront, selon l'étendue des dommages, le développement d'une défaillance d'organes multiples^{41,44}.

1.2.3 Apoptose, nécrose, alarmines et inflammation

La dysfonction des pompes ioniques et l'augmentation du stress oxydatif en lien avec l'ischémie-reperfusion sont en mesure d'activer les voies majeures de l'apoptose et d'induire une nécrose cellulaire. La nécrose cellulaire mène à la libération d'alarmines qui induisent une réponse inflammatoire systémique stérile et contribuent à activer davantage la voie extrinsèque de l'apoptose⁴. La perte de tissu fonctionnel résultant de ces phénomènes contribue à la défaillance d'organes multiples observée chez les polytraumatisés. Leur altération via diverses interventions est donc capitale au développement de nouvelles cibles thérapeutiques.

Apoptose

L'apoptose résulte d'une mort cellulaire programmée dénuée d'inflammation. L'ischémie-reperfusion active les voies majeures de l'apoptose, divisées en cascades extrinsèque et intrinsèque. La cascade extrinsèque est causée par l'augmentation du stress oxydatif, la libération des *Danger Associated Molecular Patterns (DAMPs)* et certaines cytokines capables d'activer le *Death Receptor* (e.g. TNF-alpha), dont la signalisation résulte en l'activation de la caspase-8 (caspase initiatrice de la cascade extrinsèque), puis de la caspase 3 (caspase effectrice commune). La dysfonction mitochondriale causée par l'hypoxie, les radicaux libres et la déplétion en ATP est une étape clé à l'activation de la cascade intrinsèque. Entre autres, cela permet la translocation de la protéine Bax, normalement gardée inactive par la protéine BCL-2, du cytosol jusqu'à la

membrane mitochondriale; Bax agit alors comme un canal qui permet le transport du cytochrome C de la mitochondrie vers le cytosol. Le cytochrome C activera alors la caspase-9 et ultimement la caspase-3, provoquant une mort cellulaire programmée⁴¹⁻⁴⁵.

Nécrose, alarmines et inflammation

Tel que mentionné, la déplétion en ATP cause une dysfonction des pompes ioniques qui résulte en une accumulation d'ions Na⁺, Ca²⁺ et H⁺ dans le milieu intracellulaire. Ces changements induisent un œdème cellulaire et une acidose intracellulaire qui ultimement mènent à une dysfonction cellulaire, une rupture de la membrane cytoplasmique et une mort cellulaire non-programmée⁴². À l'opposé de l'apoptose, la nécrose est un phénomène non-régulé qui induit une réponse inflammatoire locale et systémique, selon l'étendue des dommages⁴. En l'absence de pathogène infectieux, cette réponse inflammatoire stérile est en grande partie générée par les *Danger Associated Molecular Patterns (DAMPs)*, ou alarmines^{4,43}.

Les DAMPS sont des molécules endogènes libérées par un stress cellulaire (ischémique ou mécanique) et capables d'interagir avec des *pattern recognition receptors (PRR)* présents sur les cellules du système immunitaire inné et certaines cellules non-immunitaires (cellules endothéliales et épithéliales)⁴. Elles peuvent être libérées en circulation, soit passivement par les cellules nécrotiques ou dont l'intégrité membranaire est lésée, ou via une sécrétion active induite par la liaison de signaux extracellulaires (TNF, IL-1, IFN, PAMPS ou DAMPS) à différents récepteurs membranaires (TLR, NLR, TNFR); ceci initiant une cascade de signalisation qui favorise activement la production d'alarmines^{4,46}.

Le High Mobility Group Protein B1 (HMGB1) :

L'HMGB1 est l'alarmine la plus étudiée chez les polytraumatisés. Libéré par les cellules en souffrance, l'HMGB1 est détecté en circulation dès les premières 30 minutes et atteint un niveau maximal de 2 à 6h suivant un traumatisme sévère⁴⁷. Les niveaux d'HMGB1 ont été associés à la sévérité du traumatisme, à la défaillance d'organes post-traumatique et à la mortalité³⁶. L'HMGB1 interagit avec différents *Pattern recognition receptors (PRR)*, notamment les récepteurs TLR-2/4/9 et RAGE³⁶. À travers ces récepteurs, il active le système immunitaire inné en favorisant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les cellules immunitaires et augmente l'expression des protéines d'adhésion des neutrophiles/monocytes au niveau endothélial (ICAM-1, VCAM, P-selectine)⁴⁸⁻⁵⁰. Ceci favorise le développement d'une réponse inflammatoire systémique et l'infiltration des cellules inflammatoires au niveau des organes, contribuant probablement à la défaillance d'organes des polytraumatisés³⁶. L'une des caractéristiques distinctes de l'HMGB1 est sa capacité à altérer les barrières épithéliales. Au sein d'un modèle murin de sepsis, l'HMGB1 sécrété dans la bile a été démontré comme un médiateur essentiel de l'augmentation de la perméabilité intestinale et de la translocation bactérienne^{48,50}. Un modèle animal de choc hémorragique et de polytraumatisme a également démontré que l'HMGB1 libéré en circulation par l'intestin pouvait causer des lésions à distance au niveau du parenchyme pulmonaire⁵¹.

Tous ces phénomènes, ainsi que les associations cliniques avec le pronostic des patients, font de l'HMGB1 une cible thérapeutique potentielle. Les modèles animaux ciblant spécifiquement l'HMGB1 ont démontré des bénéfices physiologiques, notamment l'amélioration de la coagulopathie traumatique, l'amélioration de la perméabilité intestinale via l'augmentation des protéines de jonction épithéliales, la diminution de cytokines sériques (IL-6 et IL-10), et une

tendance franche vers une diminution de l'atteinte hépatocellulaire^{37,49}. Malgré ces trouvailles relativement unanimes, aucune étude clinique interventionnelle ciblant spécifiquement l'HMGB1 n'a été initiée en traumatologie jusqu'à ce jour.

L'ADN mitochondrial :

La libération d'ADN mitochondrial en circulation a également été étudiée comme biomarqueur et cible thérapeutique potentielle. D'un point de vue évolutif, les mitochondries des eukaryotes sont dérivées des bactéries; il est intuitif que la rétention de caractéristiques bactériennes explique en partie leur capacité à induire une réponse inflammatoire marquée. Par exemple, l'administration d'ADN mitochondrial chez divers modèles animaux a pu causer des dommages inflammatoires à distance au niveau hépatique et pulmonaire⁵². En traumatologie, l'ADN mitochondrial en circulation a été associé à la sévérité du traumatisme, au développement d'une défaillance d'organes post-traumatique et à la mortalité^{53,54}. Ceci est appuyé par la littérature préclinique qui suggère des effets pro-inflammatoires via l'activation des neutrophiles et l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires^{52,55}. L'administration de molécules visant à diminuer l'ADN mitochondrial en circulation a pu prévenir l'atteinte pulmonaire, rénale et hépatique chez un modèle murin de choc hémorragique⁵⁶.

Autres alarmines :

D'autres substances candidates incluent les *heat shock proteins*, responsables du pliage adéquat des protéines⁵⁷, les protéoglycans/glycosaminoglycans/glycoprotéines, composantes des membranes cytoplasmiques⁵⁸, et les protéines S100, responsables de la régulation du calcium intra-

cellulaire⁵⁹. Toutes ces molécules ont été démontrées comme capables d'activer le système immunitaire inné via différents *PRR* et corrélées à différents issus cliniques en traumatologie⁵⁶⁻⁵⁸.

1.3 Les thérapies anti-oxydantes et anti-inflammatoires

1.3.1 Thérapies anti-oxydantes

Les principes d'ischémie-reperfusion décrits ci-haut ont motivé plusieurs tentatives de cibler la charge oxydative comme complément thérapeutique chez les polytraumatisés et d'autres populations de patients de soins critiques (grands brûlés, sepsis). La vitamine C représente la thérapie anti-oxydante la plus étudiée chez les polytraumatisés. Outre la neutralisation des radicaux libres (ROS et RNS), la vitamine C inhibe le facteur de transcription NF κ B (Nuclear factor kappa B), lequel augmente l'expression des cytokines pro-inflammatoires qui contribuent de façon importante au SIRS. Plusieurs études pré-cliniques ont démontré des bénéfices physiologiques au niveau des organes et de l'inflammation systémique⁶⁰⁻⁶². Au niveau clinique, la plupart des études comportent l'administration d'un *cocktail* d'antioxydants composé de vitamine C, d'alpha-tocopherol et/ou de sélénium⁶³. L'étude la plus significative pour la traumatologie a randomisé 543 patients sévèrement polytraumatisés au traitement standard versus une thérapie antioxydante (Vitamine C et alpha-tocophérol) et a démontré une diminution de l'incidence de la défaillance d'organes sur une période d'observation de 28 jours⁶⁴. Bien qu'une méta-analyse récente des études randomisées n'ait pas démontré de bénéfices au niveau de la mortalité ou d'autres issus cliniques, une analyse de sous-groupe n'incluant que les études avec la vitamine C en monothérapie a démontré une tendance vers une diminution de la mortalité (HR = 0.21, p=0.06)⁶³. Cependant, l'hétérogénéité des cohortes étudiées (sepsis, trauma, chirurgie cardiaque, grands brûlés) et des modalités de traitement antioxydants (vitamine C, sélénium, alpha-tocophérol, mode

d'administration IV ou PO, doses différentes) rendent ces résultats difficilement généralisables à la population spécifique des polytraumatisés et davantage de littérature est probablement nécessaire avant d'implémenter ces pratiques de façon robuste sur le plan clinique. Néanmoins, les thérapies anti-oxydantes représentent une stratégie thérapeutique ciblant les conséquences de l'ischémie-reperfusion.

1.3.2 Thérapies anti-inflammatoires

L'inflammation, autre conséquence de l'ischémie-reperfusion, peut, entre autres, être ciblée par l'administration de médicaments anti-inflammatoires non-sélectifs (e.g. corticostéroïdes) ou sélectifs (e.g. anti-TNF, anti-C1). L'administration de corticostéroïdes a fait l'objet de deux études randomisées en traumatologie non-orthopédique. L'étude *Corticosteroid Randomization After Severe Head Injury (CRASH)* a randomisé 10008 patients avec un traumatisme cérébral (Glasgow Coma Scale < 14) à un placebo versus une infusion de méthylprednisolone pendant 48h. Cette étude a dû être arrêtée lors de l'analyse intérimaire en raison d'une augmentation de la mortalité dans le groupe traitement à deux semaines suivant le traumatisme. Les résultats à 6 mois ont également démontré une augmentation de la mortalité au sein du groupe traitement⁶⁵. Suivant le concept que les patients sévèrement polytraumatisés présentent une réponse inflammatoire potentiellement nuisible et peuvent être à risque d'insuffisance surrénalienne, l'étude HYPOLYTE a randomisé 149 patients avec un traumatisme sévère (ISS > 15) à un placebo ou une infusion d'hydrocortisone. Le groupe traitement présentait une diminution des pneumonies acquises en milieu hospitalier avec une tendance vers un bénéfice accru chez les patients ayant subi un traumatisme cranio-cérébral⁶⁶. Cependant, vu la robustesse de l'étude CRASH et l'incidence élevée du trauma crânien chez les

polytraumatisés sévères contondants, peu de lignes directrices recommandent l'administration de corticostéroïdes dans un contexte de polytraumatisme.

Les autres thérapies anti-inflammatoires potentielles ont été étudiées majoritairement chez des modèles animaux de choc hémorragique et de polytraumatisme, avec peu d'études cliniques interventionnelles complétées jusqu'à ce jour. Quelques modèles murins de choc hémorragique ont démontré une diminution de l'adhésion des neutrophiles au niveau hépatique en utilisant des agents anti-TNF^{67,68}. L'administration d'un anticorps neutralisant le récepteur des interférons de type I a pu produire des bénéfices biochimiques au niveau de l'atteinte pulmonaire et hépatique⁶⁹. En lien avec l'activation du complément bien démontrée chez les polytraumatisés et de son rôle dans l'immunité innée et la coagulopathie traumatique²⁸, la cascade du complément a également été ciblée avec des bénéfices à court terme démontrés au niveau intestinal, rénal, pulmonaire et de la coagulopathie traumatique^{27,70,71}. Cliniquement, une seule étude clinique randomisée comparant le traitement standard à l'administration d'un inhibiteur de C1 chez des patients sévèrement polytraumatisés (ISS de 18 ou plus avec une fracture du fémur ou du bassin) a été initiée. L'étude a dû être arrêtée en raison du faible taux de recrutement (étude monocentrique) et de l'hétérogénéité des patients (NCT01275976)⁷².

1.3.3 Thérapies anti-alarmines : bénéfices potentiels et défis significatifs

Tel que mentionné ci-haut, plusieurs études pré-cliniques ont tenté de cibler différentes alarmines afin de minimiser la réponse inflammatoire systémique résultant d'un choc hémorragique avec ou sans traumatisme^{37,49,56}. Dans un contexte de choc hémorragique traumatique, cibler ces alarmines a le potentiel de présenter plusieurs bénéfices par rapport aux thérapies anti-inflammatoires. Alors

que l'activation du système immunitaire est clairement délétère lorsque mal-adaptée, les polytraumatisés nécessitent sans doute un certain niveau d'activation du système immunitaire à des fins de réparation tissulaire (par exemple, guérison d'une fracture, ou guérison résultant d'une sanction chirurgicale) et, surtout, afin de mitiger le risque de sepsis tardif^{73,74}. Or, la plupart des thérapies anti-inflammatoires tentées au niveau clinique ont certes le potentiel de mitiger cette réponse inflammatoire initiale mal-adaptée, mais elles ont également le potentiel d'augmenter le risque de sepsis tardif et le risque de complications post-traumatiques liées à une non-guérison tissulaire en exacerbant le *Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome (CARS)*⁷⁵.

Étant en amont de l'activation du système immunitaire, les alarmines représentent des cibles thérapeutiques modifiables, avec le potentiel de mitiger non seulement la réponse inflammatoire systémique initiale, mais également le *Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome (CARS)* subséquent⁴. En résulterait une diminution du risque de sepsis tardif et de défaillance d'organes multiples.

Cependant, cibler ces molécules présente de nombreux défis, surtout dans le contexte du choc hémorragique traumatique. Premièrement, leur multiplicité suggère que plusieurs alarmines devraient être ciblées simultanément afin d'espérer des bénéfices anti-inflammatoires⁷⁶. Ensuite, bien que certaines alarmines soient davantage étudiées chez des populations spécifiques (par exemple, l'HMGB1 en traumatologie), rien ne suggère qu'une molécule est particulièrement dominante en termes d'activation du SIRS⁷⁶. En l'absence de molécules franchement dominantes, et en considérant que leur libération est similaire au niveau temporel (au moment de l'insulte), il devient difficile d'établir un traitement ciblant celles-ci⁷⁶. Finalement, rien n'indique que

l'altération de la réponse inflammatoire systémique par une thérapie anti-alarmine potentielle n'aurait pas d'effets anti-inflammatoires délétères, d'où l'importance de l'équilibre entre les phénotypes pro-inflammatoires et anti-inflammatoires⁷⁶.

Chapitre 2 L'Acide Urique en tant qu'alarmine

2.1 L'acide urique : un anti-oxydant ou un médiateur pathologique?

L'acide urique est un produit métabolique provenant de la dégradation des purines adénine et guanine⁹. Les purines sont des nucléotides essentiels à la formation de l'ADN; la principale source exogène provient de la viande animale⁹. L'excès de purines exogènes de même que les purines libérées suite à la mort cellulaire doivent être métabolisées par le système xanthine oxydase et xanthine déhydrogenase⁹. Les produits métaboliques intermédiaires résultent de réactions d'oxydo-réduction successives afin de former l'hypoxanthine, puis la xanthine qui est oxydée en acide urique pour excrétion⁹. Le 2/3 de l'acide urique est excrété par les reins; l'acide urique est librement filtré au niveau des glomérules et 90% est réabsorbé au niveau des tubules rénaux proximaux. Le reste de son excrétion se fait par le tube digestif⁹. Fait intéressant, l'humain et les primates sont les seuls mammifères à avoir perdu l'enzyme uricase au cours de leur évolution, laquelle métabolise l'acide urique en un produit plus soluble pour élimination rénale, l'allantoin^{9,77}.

La perte de cette enzyme au cours de l'évolution de même que sa réabsorption avide au niveau des reins ont suscité de l'intérêt pour des avantages physiologiques de l'acide urique⁷⁸. Par exemple, il est possible que l'acide urique agisse comme antioxydant via la neutralisation des radicaux libres, tels le peroxyde d'azote et le superoxyde⁷⁹. En accord avec cela, de bas niveaux d'acide urique ont déjà été associés à une dysfonction endothéliale au sein de modèles animaux⁹. Le foie est également l'un des plus importants réservoirs d'acide urique; bien qu'il soit possible que cela résulte simplement d'un métabolisme des purines plus important à ce niveau, certains ont suggéré que l'acide urique pouvait agir comme antioxydant hépatique, où le stress oxydatif est parmi les

plus importants^{9,80}. Il a aussi été suggéré que l'acide urique présentait un rôle protecteur contre les infections par certains parasites via la potentialisation de l'acide arachidonique⁹. De plus, l'acide urique est rapporté comme capable d'exercer certains effets antioxydants au niveau du système nerveux central. En effet, l'étude de Yu et al a démontré que l'administration d'acide urique à des cellules neuronales soumises *in vitro* à des conditions d'ischémie pouvait prévenir la production de radicaux libres et la peroxydation⁸¹. Leurs travaux se sont corroborés au sein d'un modèle *in vivo* d'ischémie cérébrale, où le pré-traitement et le post-traitement par administration d'acide urique présentait des bénéfices sur de la taille de l'infarctus cérébral et les tests de comportement post-ACV⁸¹. Cependant, il est important de noter que l'effet osmotique de l'acide urique ait pu induire un bénéfice par d'autres mécanismes, soit en mitigant le phénomène d'œdème vasogénique ou en altérant l'autorégulation cérébrale. Au niveau clinique, certaines études rétrospectives ont suggéré une association entre de hauts niveaux d'acide urique et un meilleur pronostic suite à une ischémie cérébrale, sans toutefois contrôler pour plusieurs facteurs confondants importants, tels la présence ou non d'une revascularisation, le délai de présentation ou les comorbidités⁸². Il a également été suggéré que ce potentiel antioxydant pouvait présenter certains avantages pour différentes conditions neurologiques chroniques tels la sclérose en plaques, la maladie de Parkinson, et la maladie d'Alzheimer⁸⁰. Cependant, l'acide urique nécessite la présence d'autres antioxydant (vitamine C, thiols) afin de neutraliser le peroxyde d'azote et le superoxyde⁷⁹. De plus, ses effets antioxydants sont surtout possibles en milieux hydrophiles⁷⁹. Malgré ces travaux, la littérature demeure relativement mitigée à cet endroit et ne démontre que des associations indirectes; l'hétérogénéité des études ainsi que le risque significatif de biais rend toute conclusion robuste relativement difficile⁸³.

Malgré ces hypothèses lui attribuant des avantages évolutifs, le rôle de l'acide urique dans plusieurs conditions inflammatoires aiguës est bien établi. L'augmentation de l'acide urique au-delà de son seuil de solubilité produit des cristaux d'urate de monosodium, lesquels sont au cœur de la pathophysiologie de l'arthrite goutteuse⁷⁷. Ces cristaux précipitent au niveau des surfaces articulaires et sont en mesure d'agir en tant qu'alarmines et activer plusieurs *pattern recognition receptors* (PRR), notamment les récepteurs membranaires *toll-like receptors* (TLR) et les récepteurs intra-cytoplasmiques de la famille NOD (NLR)⁹. Par exemple, l'activation du récepteur NLR-3 par les cristaux d'urate monosodium induit une cascade de signalisation via la caspase-1 qui mène ultimement à la formation d'IL-1 β et d'IL-18⁹. Ceci augmente la mort cellulaire et le recrutement des cellules inflammatoires au niveau des tissus articulaires, causant une crise d'arthrite aiguë⁹.

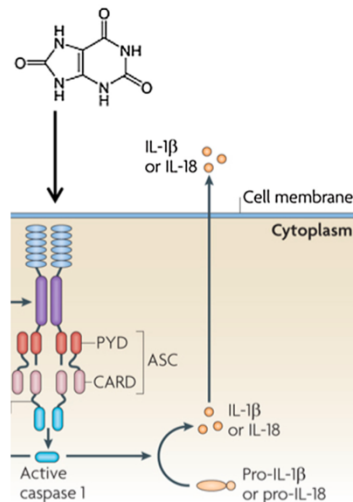


Figure 2.1: Activation de l'inflammasome par l'acide urique cristalline. El-Ridi et al, 2017. Licence d'autorisation obtenue avec Rightslink.

Le syndrome de lyse tumorale représente un autre exemple où l'acide urique joue un rôle clé. Cette condition est causée par la lyse de cellules cancéreuses, qu'elle soit spontanée ou induite par la chimiothérapie¹⁰. Les patients atteints de cancers hématologiques, de par leur fardeau néoplasique élevé, sont particulièrement à risque de développer cette condition¹⁰. Similairement au traumatisme tissulaire direct et à l'ischémie-reperfusion des polytraumatisés, la lyse des cellules

néoplasiques engendre la libération d'alarmines et initie une réponse inflammatoire systémique qui, si démesurée, causera un choc distributif et une défaillance d'organes multiples¹⁰. La libération d'ADN est également favorisée par la lyse cellulaire¹⁰. Ceci mène à une augmentation significative des niveaux d'acide urique via la conversion des purines par la xanthine oxydase. L'hyperuricémie, combinée à une diminution de la perfusion rénale, à une diminution du flow urinaire, à une acidose urinaire engendrée par le choc et à la présence d'autres substances cristallisantes (calcium et phosphate), favorisent la précipitation de cristaux d'acide urique dans les tubules rénaux causant directement une insuffisance rénale aiguë⁸⁴.

Même en l'absence de cristaux, de plus en plus de littérature indique que l'acide urique soluble est un médiateur important dans la pathophysiologie de plusieurs pathologies, notamment l'insuffisance rénale aiguë, certaines pathologies pulmonaires, l'athérosclérose et l'hypertension^{78,84-88}. La plupart de ces phénomènes pourraient être médiés par la capacité de l'acide urique soluble à activer le système immunitaire inné de façon analogue aux autres alarmines. Plusieurs modèles *in vitro* et *in vivo* ont démontré que l'acide urique soluble était en mesure d'activer différents *PRR*, tels le TLR-4 et le NLRP-3, activant une cascade de signalisation via la caspase-1 qui augmente l'expression d'IL-1 Beta et de protéines d'adhésion des neutrophiles (ICAM-1) au niveau de l'endothélium^{89,90}. De plus, il a été démontré que l'acide urique soluble contribue au recrutement accru des monocytes via MCP-1 et à leur activation via un mécanisme dépendant de l'AKT, augmentant la survie et l'activation des cellules immunitaires suite à l'exposition au LPS^{91,92}. L'acide urique soluble cause une altération de l'autorégulation et contribue au stress oxydatif au niveau rénal^{84,88}. La libération d'acide urique est également liée à l'expression d'autres alarmines telles l'HMGB1. Au sein de cellules endothéliales, il a été

démontré que l'acide urique pouvait interagir avec le récepteur RAGE, augmentant l'expression d'HMGB-1, de cytokines pro-inflammatoires et de protéines d'adhésion des cellules immunitaires, perpétuant l'inflammation au niveau endothélial et possiblement au niveau tissulaire^{93,94}.

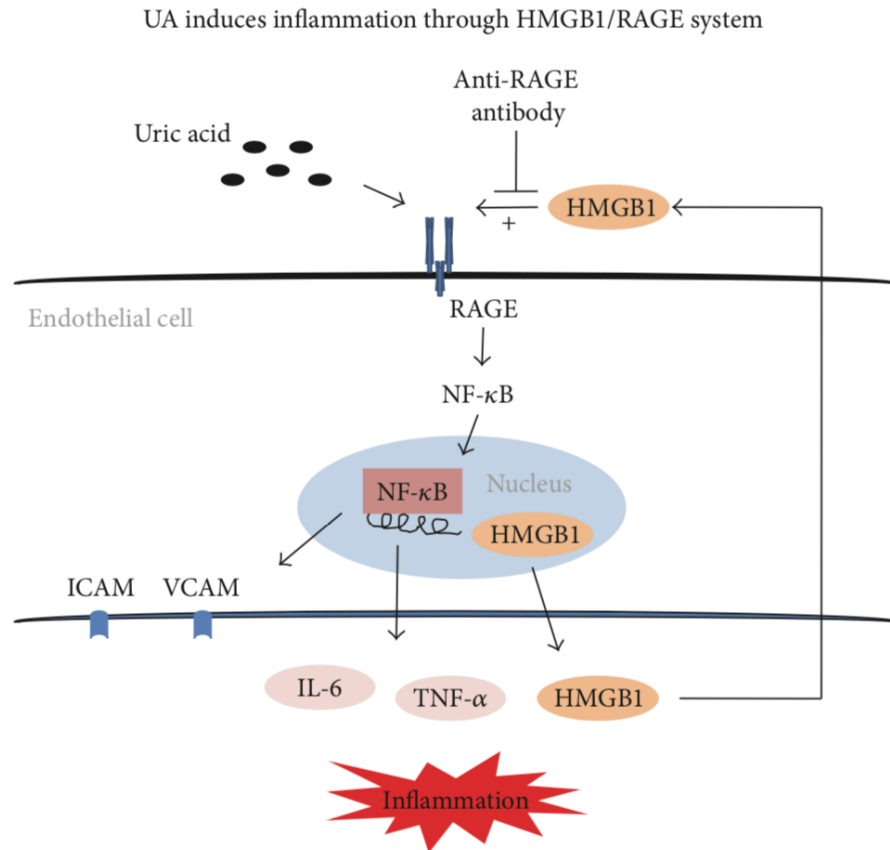


Figure 2.2 : Activation du récepteur RAGE par l'acide urique soluble, résultant en l'expression de protéines d'adhésion des cellules immunitaires (VCAM, ICAM), de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF-alpha) et d'HMGB1. Cai et al, 2017. Licence d'autorisation obtenue avec Rightslink.

Dans le contexte des soins critiques, l'hyperuricémie a été associée à un mauvais pronostic chez des patients atteints de sepsis ou d'ARDS⁸⁸. Akbar et al a démontré qu'un niveau d'acide urique élevé à l'admission était associé à l'insuffisance rénale aiguë (mais avec une interdépendance) et à une augmentation du risque d'ARDS et de la durée de séjour aux soins intensifs⁹⁵. Une étude

rétrospective avec des groupes appariés par coefficient de propension a démontré une diminution du risque de mortalité à court terme chez les patients atteints d'ARDS ayant des niveaux d'acide urique sous les 265 $\mu\text{mol/L}$, et ce de façon indépendante après avoir ajusté pour la plupart des variables ayant un impact significatif sur le pronostic (*Sequential Organ Failure Assessment* score-SOFA, sévérité de l'ARDS, co-morbidités)⁹⁶. Chez les polytraumatisés, des données préliminaires provenant d'une cohorte de l'étude DYNAMIC (NCT01355042) -dont l'objectif principal était de déterminer l'impact des niveaux d'ADN circulant chez les patients atteints de sepsis sévère- ont démontré qu'environ 30% des patients polytraumatisés avaient des niveaux d'acide urique supérieurs aux sujets sains. Cependant, la sévérité du traumatisme et le statut hémodynamique des patients étaient inconnus, raison pour laquelle nous avons dessiné l'étude AUSTRAL (NCT03622632), présentée plus loin. Bien qu'aucune association entre cette hyperuricémie et les variables pronostiques n'ait été démontrée, il est possible que, dans un contexte de choc hémorragique traumatique, une plus grande proportion de patients présente une hyperuricémie potentiellement délétère.

2.2 L'acide urique et le choc hémorragique

Tel que décrit ci-haut, le traumatisme tissulaire direct et l'ischémie-reperfusion dans un contexte de choc favorisent la libération d'acide urique en circulation systémique. Certains modèles animaux ont démontré une augmentation de l'acide urique circulante suite au choc hémorragique^{11,12}. Cependant, ces études ne mesuraient pas l'acide urique en tant que médiateur spécifique, mais bien comme marqueur de bon fonctionnement de l'allopurinol ou de l'adénosine, administrés pour rétablir l'ATP intracellulaire dans l'espoir de prévenir la transition vers le choc irréversible^{11,12}. Ces trouvailles ont stimulé d'autres études à tenter d'élucider les mécanismes

protecteurs de l'inhibition de la xanthine oxydase suite au choc hémorragique. La plupart ont incriminé la production de radicaux libres par la xanthine oxydase et la déplétion cellulaire en adénosine, omettant l'effet potentiellement délétère du pic d'acide urique initial en lien avec l'activation du système immunitaire inné^{11,17,97,98}. Or, tel que mentionné, l'acide urique soluble à lui seul est capable d'induire non seulement un phénotype pro-inflammatoire *in vitro* au sein de cellules épithéliales mais également d'activer le système immunitaire inné *in vivo* et de contribuer aux dommages de différents organes (poumons, reins, système cardiovasculaire). Sa libération en situation de choc hémorragique est donc potentiellement contributive au SIRS et à la défaillance d'organes observés chez les polytraumatisés ayant subi un choc hémorragique. Gilbert et al a démontré que la destruction spécifique de l'acide urique suite au choc hémorragique, en l'absence d'inhibition de la xanthine oxydase mais via l'utilisation d'une uricase recombinante, pouvait prévenir l'inflammation et l'apoptose au niveau des reins, des poumons et au niveau systémique; ceci suggère que l'acide urique soluble circulant représente un médiateur important¹³.

2.3 Rôle mitigé dans l'atteinte entéro-hépatique : une opportunité

Bien que l'acide urique soit de plus en plus reconnu comme une molécule délétère pour plusieurs systèmes (cardiovasculaire, rénal, pulmonaire)^{78,84-88}, son rôle dans l'atteinte hépatique et entérique demeure controversé. De façon analogue aux études de Cromwell et Cowsert, les études portant spécifiquement sur l'acide urique et l'atteinte hépatique suite au choc hémorragique investiguaient davantage le rôle potentiellement délétère de la xanthine oxydase (génération de radicaux libres, dysfonction endothéliale et déplétion en ATP) que celui de l'acide urique lui-même^{14-16,18,19}. Flynn et al a investigué le rôle de l'inhibition de la xanthine oxydase sur la dysfonction microvasculaire et la déplétion en ATP hépatique au sein d'un modèle murin de choc

hémorragique; l'inhibition de la xanthine oxydase a pu prévenir la diminution du débit sanguin hépatique et la déplétion en ATP, probablement en lien avec la dysfonction microvasculaire induite par l'activité de la xanthine oxydase¹⁶. Le même groupe a décrit des trouvailles similaires au niveau intestinal, où l'allopurinol administré avant la réanimation a pu prévenir la dysfonction endothéliale et la diminution du débit sanguin intestinal¹⁵. Matsumura et al a suggéré un rôle protecteur des inhibiteurs de la xanthine oxydase (administrés en pré-traitement) en utilisant un modèle murin d'ischémie-reperfusion hépatique par clampage de la veine porte²⁰. L'étude a démontré une diminution des chimiokines, une diminution de l'infiltration hépatique par les neutrophiles, et une diminution des enzymes hépatiques sériques, utilisés cliniquement comme marqueur de lésion hépatique²⁰. Une seule étude a suggéré un rôle protecteur de l'acide urique sur l'atteinte hépatique suite au choc hémorragique¹⁹. En effet, Tsukada et al a suggéré que l'administration d'acide urique en pré-traitement pouvait prévenir l'atteinte hépatique (diminution des enzymes hépatiques sériques et diminution non-quantitative de la nécrose et de l'infiltration neutrophilique)¹⁹. Une diminution purement qualitative de la nitrotyrosine au niveau du foie a mené les auteurs à conclure que le rôle protecteur de l'acide urique provenait possiblement de sa capacité à neutraliser le peroxy-nitrite, source significative de stress oxydatif¹⁹.

Hormis l'omission du rôle direct potentiel de l'acide urique, ces études demeurent limitées par le moment d'intervention par rapport au choc et à la phase de réanimation, par la durée limitée de l'intervalle entre le choc et les analyses biochimiques (quelques heures), et par le caractère semi-quantitatif des analyses^{14-16,18,19}. En effet, la transition clinique de ces concepts requiert un intervalle temporel d'intervention cliniquement pertinent et reproductible pour une population de patients atteints d'un choc hémorragique. Bien que pertinent pour les lésions d'ischémie-

reperfusion liées aux transplantations, où le moment de l'insulte est prédéfini, les modèles de pré-traitement sont d'une pertinence questionnable pour les patients atteints d'un choc hémorragique, surtout dans un contexte de traumatologie où le traumatisme survient de façon aléatoire dans le temps et où les interventions cliniques ne peuvent avoir lieu qu'une fois l'épisode du choc amorcé. De plus, la défaillance d'organes la plus significative d'un point de vue pronostic est celle qui persiste dans le temps³; la prévention de certains phénomènes tôt dans le processus d'ischémie-reperfusion a certes le potentiel de prévenir une atteinte à plus long terme, mais les modèles évaluant l'insulte microvasculaire et tissulaire à 1h, 2h et même 24h ne peuvent se prononcer sur les effets à long terme de leurs interventions. Pour ces raisons, la littérature portant spécifiquement sur l'acide urique et la voie enzymatique de la xanthine oxydase suite au choc hémorragique demeure incomplète.

Les failles de la littérature actuelle représentent donc une opportunité d'améliorer la compréhension de ces phénomènes, tant au niveau pré-clinique que clinique. Au-delà du paradoxe oxydant/antioxydant⁷⁹, et de par sa capacité à activer le système immunitaire inné via l'activation de différents *PRR*^{89,90,93,94}, ce mémoire postule que l'acide urique lui-même représente une alarmine capable d'induire une réponse inflammatoire systémique et locale. Sa libération en circulation persistant jusqu'à 72h^{11-13,99} et son rôle dans l'inflammation et l'apoptose rénale/pulmonaire en situation de choc hémorragique¹³ représentent des arguments en faveur d'un rôle générateur du SIRS et de la défaillance d'organes observés chez les polytraumatisés en choc hémorragique. Qui plus est, le traumatisme tissulaire direct généralement prépondérant chez les polytraumatisés, menant à de la nécrose cellulaire, pourrait favoriser une libération accrue d'acide urique en circulation systémique¹⁰⁰. Étant donné la controverse au niveau entéro-hépatique¹⁴⁻

^{16,18,19}, le volet fondamental de ce mémoire, présenté au chapitre 3 sous forme de manuscrit accepté (*Journal of Trauma and Acute Care Surgery*), investiguera le rôle de l'acide urique dans l'atteinte entéro-hépatique suite au choc hémorragique.

Les hypothèses sont que l'acide urique contribue à la lésion hépatique suite à l'ischémie-reperfusion en activant différentes cascades inflammatoires (ICAM-1, infiltration neutrophilique, inflammasome, TNF-alpha) et régulatrices d'apoptose (Bax/Bcl-2, AKT, Caspases). L'acide urique étant en mesure d'induire la libération d'HMGB-1⁹⁴, et l'HMGB-1 étant intimement lié à l'altération de la perméabilité intestinale⁴⁸⁻⁵⁰, ce mémoire postule également que l'acide urique affecte la libération *in vivo* d'HMGB-1, la perméabilité intestinale et la translocation de produits bactériens (LPS) qui en découle, potentiellement générateurs de défaillance d'organes¹⁰¹. Ces hypothèses seront investiguées à l'aide d'un modèle murin de survie de choc hémorragique utilisant une intervention pharmacologique (rasburicase, enzyme recombinante qui métabolise l'acide urique en allantoiné, Sanofi) comme complément à une réanimation standard.

Le chapitre 4 présentera une première tentative de transition clinique de ces concepts sous forme de méthodologie détaillée et résultats préliminaires d'une étude pilote prospective (AUSTRAL, NCT03622632). **L'hypothèse principale**, fondée sur la littérature pré-clinique présentée ci-haut, est que l'acide urique circulant est augmenté de façon reproductible suite au choc hémorragique traumatique, principalement dans les premières 72h suivant le traumatisme. **Les objectifs**, basés sur nos résultats pré-cliniques¹³, sont de démontrer notre capacité à mesurer l'acide urique, sa cinétique, son pic et son association avec la défaillance d'organes tardive suivant le traumatisme; il s'agit d'abord et avant tout d'une étude pilote visant la faisabilité de prélèvements sériés, le dernier objectif n'étant qu'exploratoire à ce stade.

Date: 06/20/2020
To: "Francois Khazoom" francois.khazoom@umontreal.ca
From: "The Journal of Trauma" info@jtrauma.org
Subject: Manuscript # JT-D-20-10835R2

Re: JT-D-20-10835R2
"Impact of uric acid on liver injury and intestinal permeability following resuscitated hemorrhagic shock in rats"

Dear Dr. Khazoom:

Thank you again for submitting your work to the *Journal of Trauma*. We are pleased to inform you that your manuscript has been accepted for publication -- congratulations!

As you have provided sufficient and complete responses to your manuscript's initial critiques, we will not request any further revision. Instead, your paper will be processed for production, and a typeset and copy-edited version will be created. You will have the chance to make any final, minor corrections to page proofs prior to print publication.

Please note that we may not proceed with production of your paper until copyright transfer agreements are completed by all of your coauthors. To send reminders to coauthors, please log in to your author profile page and select "Submissions with a Decision" to access the paper above. Under "Action Links," click on "Author Status" to check the status of coauthor responses. You may resend letters or edit email addresses, if necessary.

Once production commences, you will receive page proofs approximately one month prior to print publication. To expedite this process, it is essential that you review proofs within 48 hours and return them to the Journal's publisher via email, fax, or courier.

Thank you again for contributing to the *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*.

Best regards,

Ernest Moore, MD
Editor, *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*

OPEN ACCESS

The *Journal of Trauma* now offers an open access option to the authors of accepted papers. If you would like your accepted article to be open access upon publication, please follow the steps below to complete the process:

1. Notify the journal office via email that you would like this article to be available open access. Please send your Email to info@jtrauma.org. Please include your article title and manuscript number.
2. A License to Publish (LTP) form must be completed for your submission to be made available open access. Please download the form from <http://links.lww.com/LWW-ES/A49>, sign it, and Email the completed form to the journal office.
3. Go to <http://wolterskluwer.qconnect.com> to pay for open access. You will be asked for the following information. If you have not previously used this site to place an order, you will need to register for an account (your login will be different from your Editorial Manager login). When placing your order, please enter exactly as shown:
 - a. Article Title - Impact of uric acid on liver injury and intestinal permeability following resuscitated hemorrhagic shock in rats
 - b. Manuscript Number - JT-D-20-10835R2

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Remove my information/details). Please contact the publication office if you have any questions.

Chapitre 3 Volet fondamental: Impact of uric acid on liver injury and intestinal permeability following resuscitated hemorrhagic shock in rats

François Khazoom MD¹, Sydnée L'Ecuyer MSc^{1,2}, Kim Gilbert PhD³, Marc-André Gagné MSc^{1,3}, Caroline Bouchard³, Christopher F. Rose PhD^{1,2}, Guy Rousseau PhD^{1,3} and Emmanuel Charbonney MD PhD^{1,2,3}

¹ Medicine Faculty, Université de Montréal

² Hepato-Neuro Laboratory, Centre Hospitalier Universitaire de Montréal Research Center, Université de Montréal

³ Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal Research Center

ABSTRACT

Background: Multi-organ failure is a consequence of severe ischemia-reperfusion injury after traumatic hemorrhagic shock, a major cause of mortality in trauma patients. Circulating uric acid, released from cell lysis, is known to activate pro-inflammatory and pro-apoptotic pathways and has been associated with poor clinical outcomes among critically ill patients. Our group has recently shown a mediator role for uric acid in kidney and lung injury, but its role in liver and enteric damage after hemorrhagic shock remains undefined. Therefore, the objective of this study was to evaluate the role of uric acid on liver and enteric injury after resuscitated hemorrhagic shock.

Methods: A murine model of resuscitated hemorrhagic shock was treated during resuscitation with a recombinant uricase, a urate oxidase enzyme (rasburicase, Sanofi), to metabolize and reduce circulating uric acid. Biochemical analyses (liver enzymes, liver apoptotic and

inflammatory markers) were performed at 24h and 72h after hemorrhagic shock. Physiological testing for enteric permeability and gut bacterial product translocation measurement (plasma endotoxin) were performed 72h after hemorrhagic shock. *In vitro*, HT-29 cells were exposed to UA, and the expression of intercellular adhesion proteins (ZO-1, e-cadherin) was measured to evaluate the influence of uric acid on enteric permeability.

Results: The addition of Uricase to resuscitation significantly reduced circulating and liver uric acid levels after hemorrhagic shock. It also prevented hemorrhagic shock-induced hepatolysis and liver apoptotic/inflammatory mediators at 24h and 72h. Hemorrhagic shock-induced enteric hyperpermeability and endotoxemia were prevented with uricase.

Conclusions: After resuscitated hemorrhagic shock, uric acid is an important mediator in liver and enteric injury. Uric acid represents a therapeutic target to minimize organ damage in polytrauma patients sustaining hemorrhagic shock.

Level of evidence: Foundational research

Study type: Animal study

Keywords: Hemorrhagic shock, organ failure, danger-associated molecular patterns, uric acid.

BACKGROUND

Hemorrhagic shock (HS) is a leading cause of severe systemic ischemia-reperfusion in critically injured patients¹. While HS leads to early death, multi-organ dysfunction and sepsis are responsible for late mortality and morbidity among resuscitated survivors^{2, 3}. Aside from organ support and treatment of infections, no interventions have demonstrated to be beneficial in preventing organ dysfunction in injured patients sustaining HS. This unmet clinical need warrants new therapeutic approaches. While wide suppression of the immune system is potentially hazardous in the context of ongoing tissue repair and increased risk of sepsis^{4, 5}, targeting danger associated molecular patterns (DAMPs), key upstream initiators of the sterile inflammatory response observed in injured patients, may prove beneficial^{6, 7}.

Direct tissue damage and ischemia-reperfusion injury lead to uric acid (UA) release from cell death, a molecule resulting from DNA and purine metabolism through the xanthine oxidase (XO) pathway⁸⁻¹⁰. Animal models have demonstrated a peak of circulating UA following HS and these studies aimed at evaluating the potentially protective role of XO inhibition on oxidative stress, microcirculatory dysfunction and ATP depletion¹¹⁻¹³. However, the direct impact of UA on organ damage has not been investigated after HS. UA has been well established as a pro-inflammatory and pro-apoptotic molecule, both as a crystal and a soluble molecule^{8, 14}. *In-vitro* studies have shown that soluble UA could induce a pro-inflammatory phenotype through interaction with Toll-like receptor-4 (TLR4), promoting inflammasome activation (NLRP-3, caspase-1), pro-inflammatory cytokine release (IL-1 β , IL-18) and enhanced endothelial immune cells adhesion proteins (ICAM-1, VCAM)^{14, 15}. UA has also been shown to induce the release of High Mobility Group Box Protein 1 (HMGB1) from endothelial cells, another DAMP associated with distant

organ injury, alteration of mucosal barrier, organ failure and mortality in animal and clinical studies¹⁶⁻¹⁹.

Our group has recently shown that UA metabolization after resuscitated HS, using a recombinant urate oxidase enzyme (uricase) specifically targeting UA, prevented apoptosis and inflammation in lungs and kidneys, as well as TNF- α circulation²⁰. However, the role of UA in liver damage after HS remains undefined. While some animal studies have suggested a protective role for XO inhibition, a short-term model of HS showed a benefit of UA pre-treatment on hepatocellular injury, presumably through antioxidant pathways^{11, 21, 22}.

Furthermore, there is accumulating evidence that the gut represents a driver of systemic inflammation and organ dysfunction via endotoxemia as part of systemic ischemia-reperfusion injury²³⁻²⁶. This argument, with the direct anatomical relationship between the gut and the liver through the portal circulation, makes the evaluation of intestinal damage of paramount importance. We hypothesized that UA liberation after HS could directly impact liver and enteric injury following ischemia-reperfusion. The main objective of this study was to characterize the role of UA in HS-induced liver damage through evaluation of inflammatory and cell death/survival pathways. The secondary objective was to investigate the role of UA on enteric injury after HS and provide some insight into a potential relationship between liver damage and HS-induced intestinal permeability.

METHODS

Animals handling and group allocation

Male Wistar rats weighing 350-450g were used for experiments following approval by the local animal ethics committee. Rats were allowed a 3-days period of acclimatization and managed according to the Canadian Council on Animal Care Guidelines (2020).

Animals were randomly assigned to Sham, hemorrhagic shock (HS) or hemorrhagic shock+uricase (HS+U) the day before the experiments (n=6/group). All three groups underwent general anesthesia, endotracheal intubation and femoral vessels cannulation. Sacrifice was performed at 24h and 72h for a total of 36 animals distributed in 6 groups.

Interventions, HS induction and experimental design

General anesthesia was induced with ketamine and xylazine (60 and 10 mg/kg, respectively) and maintained with isoflurane 1-2%. After intubation with a 16-gauge angio-catheter, animals were ventilated under volume-controlled mode (6ml/kg). Following a 1cm inguinal incision, the femoral artery and vein were dissected and cannulated. Arterial access allowed invasive blood pressure monitoring and blood withdrawal was done through the vein. Pulse oximetry, rectal temperature and electrocardiogram were displayed in real time.

HS was induced as previously described, with blood withdrawal until a mean arterial pressure (MAP) of 30 mmHg was reached, which was maintained for 1 hour²⁰. Animals were then resuscitated to maintain a MAP above 60 mmHg for 1h with a 1:1 mix of Ringer's Lactate and shed blood (kept at 37°C with 0.2ml citrate-dextrose solution, Sigma-Aldrich). In the HS+U group,

uricase (Rasburicase, Sanofi-Aventis) was administered IP (1.5mg/kg) at the beginning of resuscitation²⁰. In the HS+vehicle group, an equal volume of saline 0.9% was administered IP as a placebo. The Sham group underwent all procedures, including general anesthesia for 45 minutes, without HS. After resuscitation, femoral vessels were decannulated and ligated. The skin was closed with absorbable suture. The saturation of the cannulated limb was verified. Animals were weaned from isoflurane, extubated and observed over 24h or 72h, depending on group allocation. Analgesia was provided with subcutaneous buprenorphine (0.05 mg/kg). Among the entire protocol, two rats died due to protocol deviations regarding tight MAP maintenance during shock.

Sacrifice, blood sampling and organ harvesting

Animals were sacrificed by decapitation under sedation with ketamine/xylazine injection IP (60 and 10mg/kg, respectively). Blood was sampled simultaneously and centrifuged at 3000g for 15 minutes. The plasma was aliquoted, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Organs were harvested on ice, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. A 5cm segment of jejunum was harvested 10cm from the pylorus for *ex-vivo* permeability assessment (see below).

Plasma analysis/tissue analysis

Uric acid concentration was measured in plasma and liver parenchyma at 24h and 72h using a fluorescent assay (STA-375 400 assays, Cell Biolabs). Liver tissue homogenization was performed the same way as for western blot (see below). The protocol of the manufacturer was followed as described previously²⁰.

Hepatocellular injury was assessed with duplicated measurement of liver enzymes (ALT, AST) in 200 μ L of plasma at 24h and 72h, using the COBAS c111 automated analyzer system (Roche

Diagnostics).

Plasma endotoxin (LPS) levels were measured in duplicate at 72h, using an enzymatic assay according to the manufacturer protocol (MyBioSource, MBS268498).

Plasma HMGB1 was measured in duplicate at 24h and 72h by ELISA according to the protocol provided by the manufacturer (Elabscience, E-EL-R0505).

Liver Caspases activities

Caspase-1, -3 and -8 activities were measured in duplicate. Liver samples were suspended in lysis buffer and homogenized with sonication. Tissue homogenates were processed as previously described in detail ²⁰. Fluorescence was quantified with spectrofluorometry (Photon Technology International, Lawrenceville, NJ, USA) at appropriate excitation/emission wavelengths (340/435, 365/465 and 365/430nm for caspase-1, -3 and -8, respectively).

Western blot (WB)

Protein markers of apoptosis (Bax), cell survival (Bcl-2, phosphorylated-AKT), inflammation (ICAM-1) and epithelial junctional proteins (ZO-1, E-cadherin) were assessed by WB. Samples (liver or HT-29 cells) were handled according to standard technique as previously described²⁸. Protein expression, probed with primary antibodies for ICAM-1 (Invitrogen, MA5407), E-cadherin (Abcam, ab1416) and Zonula-occludens (Proteintech, 21773-1-AP), was normalized with Beta-Actin (Sigma, A2066-2ML). Proteins such as Bax (Abcam, ab182733), Bcl-2 (R&D systems, MAB8272), phosphorylated-AKT (Cell signalling technology, 4060S) and total AKT (Cell signalling technology, 9272S) were reported as ratios (Bax/Bcl-2; phospho-AKT/AKT).

Myeloperoxidase activity

Myeloperoxidase (MPO) activity was used to quantify neutrophil accumulation in the liver. Tissues were weighted and handled as described elsewhere²⁹. MPO activity was measured using the same method as previously published²⁰. MPO activity was calculated as follows:

$$\text{MPO activity} \left(\frac{\text{IU}}{\text{mg} \times \text{min}} \right) = \frac{\text{Absorbance}_{\text{max}} - \text{Absorbance}_{\text{min}} \text{ (IU)}}{\text{weight of sample (mg)} \times 5 \text{ (minutes)}}$$

Liver TNF- α and IL-1 β concentrations

Liver pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β) were measured in duplicate at 24h and 72h using the ELISA technique. Liver samples were homogenized with the same technique as WB. Using the Lowry method, 200 μ g of proteins was used for measurement of cytokine concentration according to the protocol provided by the manufacturer (Rat IL-1 β /TNF- α , DuoSet Elisa, R&D systems).

Ex-vivo intestinal permeability and intestinal resistance

Small bowel permeability was assessed *ex-vivo* using FITC-dextran permeability with a Ussing Chamber. Using a 5cm segment of jejunum, the mucosa was bluntly stripped from the seromuscular layer and a 1cm² of mucosa was placed in the cassette so that the luminal side of the mucosa faced the chamber with the FITC-dextran solution (4mg/ml). Fluorescence was measured at 30, 60 and 90 minutes in the chamber facing the basolateral side of the mucosa using spectrofluorometry (Cary Eclipse). Alternatively, intestinal transepithelial resistance was measured continuously during the 90 minutes. Chambers were continuously oxygenated to prevent cell death. Results at 90 minutes were reported for comparisons.

In vitro experiments using human intestinal cells (HT-29)

HT-29 cells were cultured between passage 5 and passage 15 in McCoy's medium (Wisent) and 5% Fetal Bovine Serum (FBS, Wisent) and maintained on room air at 37°C with 5% CO₂. A 0.2M solution of soluble UA was prepared with UA sodium salt (SIGMA, U2875-25G) dissolved in 0.2% NaOH medium and filtered with a sterile 0.22µm filter to ensure the absence of crystals. HT-29 cells were divided into 4 groups: 1-Vehicle (NaOH) alone as a control group, 2-UA exposure (UA 5x10⁻⁴M for 18h), 3-UA exposure + Uricase (UA 5x10⁻⁴M for 4h, then Uricase 0.5µg/ml for 14h) and 4-Uricase 0.5µg/ml for 18h alone. Microscopy was performed at the beginning and the end of treatments to confirm the absence of crystals. After three washings with PBS, cells were isolated with centrifugation and adhesion protein expression (ZO-1, E-Cadherin) was assessed by western blot.

Statistical analyses

Based on an effect size of 0.75 (0.6-0.9) from previous data, an alpha error of 0.05 and a power of 0.9, 36 (30-54) animals were needed for the 6 groups (3 experimental groups with two time points). All data were normally distributed and expressed as Mean± Standard Deviation (SD). A one-way ANOVA with Bonferroni post-hoc analysis was performed for homogeneous variance. For heterogeneous variances, a Brown-Forsythe correction with a Games-Howell post-hoc analysis was performed. A *p*-value less than 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Hemodynamic parameters and UA circulation

Physiological variables, including heart rate, MAP, oxygen saturation and temperature are presented in a Table (Supplementary data file 1). Both the HS and HS+U groups had similar MAP patterns, weights, total volumes of withdrawn blood to induce shock and reinfused resuscitation volumes (Fig 1A, B).

Circulating UA levels were significantly induced by HS compared to sham, which was prevented following uricase administration at 24h and 72h (Fig 2A). Similar patterns of UA levels were observed in the liver at 24h without detectable difference at 72h (Fig 2B).

Impact of UA modulation on the liver

The intervention with uricase blunted the HS-induced increase in ALT levels at ~~both at 24h and~~ 72h (Fig 3A). For AST, the effect was marginal in the HS+U group compared to HS at 72h (Fig 3A). At 24h, the same pattern was observed for ALT levels, with no difference for AST levels (Supplementary data file 2).

Apoptosis indicators were assessed using caspase-3 (common pathway effector caspase) and caspase-8 (extrinsic pathway initiator caspase) activities. Other components involved in survival program signalling pathways were Bax/Bcl-2 and pAKT/AKT ratios, respectively. At 72h after HS, uricase prevented a nearly two-fold increase in liver caspase-3 and -8 activities (Fig 3B). Increase in liver Bax/Bcl-2 ratio after HS was also prevented (Fig 3C). HS lead to a significant decrease in liver phosphorylated-AKT/AKT ratio, a protein that promotes cell survival upon phosphorylation; lowering UA with uricase prevented this phenomenon (Fig 3C). The same patterns were observed 24h after HS (Supplementary data file 2).

Regarding inflammation in the liver, MPO enhancement at 24h after HS was completely prevented with uricase (Fig 4A), whereas no difference was observed at 72h (Supplementary data file 2). The adhesion protein ICAM-1 was significantly enhanced by HS at both timepoints, and also prevented by uricase administration (Fig 4A and Supplementary data file 2). Furthermore, uricase completely prevented increases in liver TNF- α and IL-1 β 24h after HS (Fig 4B). Although IL-1 β was not measured at 72h due to its early kinetics³⁰, liver TNF- α showed no difference at 72h (Supplementary data file 2). Caspase-1 activity, part of the inflammasome complex³¹, was significantly induced both at 24h and 72h after HS and completely abolished with UA metabolism by uricase (Fig 4B and Supplementary data file 2).

Impact of UA modulation on intestinal permeability and epithelial adhesion proteins

HS lead to significantly increased plasma endotoxin (LPS) circulation at 72h compared to sham, a phenomenon completely prevented by the administration of uricase during resuscitation (Fig 5A). In line with this finding, both *ex-vivo* intestinal transepithelial resistance and dextran permeability were altered 72h after HS (Fig 5B). The drop in transepithelial resistance, as well as intestinal hyperpermeability following HS, were prevented with uricase. HS-induced circulating HMGB1 was persistently abolished at both timepoints following uricase treatment (Fig 5C).

Additional *in vitro* experiments were performed to investigate how UA could alter intestinal permeability. HT-29 cells treatment with UA decreased junctional protein expression (E-cadherin and ZO-1) by almost half and UA metabolism with subsequent addition of uricase to culture media prevented this phenomenon (Fig 6A). As control measures, no difference was observed between

control and uricase alone regarding the expression of both proteins (Fig 6A). Uricase was confirmed to completely metabolize UA in the culture media, with a final medium UA concentration identical to control (Fig 6B).

DISCUSSION

We have previously shown that UA, released in the circulation as part of HS, contributes to lung and kidney injury in association with systemic inflammation²⁰. This study demonstrates that targeting one specific DAMP during resuscitation, namely UA, directly impacts on enteric organs after HS. We show that UA plays a key role in liver enzyme release (ALT), liver inflammation, regulatory apoptotic and survival signaling pathways, as well as increased enteric permeability following HS. We specifically evaluate the role of circulating UA as a direct mediator for hepatic and enteric injury after HS, given controversial previous experimental data^{11, 21, 32-34}. In the past, most studies pertaining to the UA/XO pathway were performed using XO inhibitors with the theory that decreasing XO activity would decrease oxidative stress^{35, 36}. However, UA levels were either not measured³⁴ or measured not as a direct mediator but rather as a marker of XO inhibition^{11, 35, 36}. In addition, organ injury was assessed relatively early after HS^{11, 21}, and some studies tested pre-treatment strategies^{21, 34, 35}. Although this is relevant to planned procedures such as organ transplantation, this is of questionable relevance to the trauma population, knowing that post-traumatic organ failure is a late phenomenon and that it is impossible to pre-treat a trauma patient before injury occurs^{2, 3}. With time, UA has been well established as a DAMP and has been implicated in numerous inflammatory conditions such as the tumor lysis syndrome, coronary artery disease, gouty arthritis, and morbidity in ICU populations³⁷⁻⁴⁰. Our pharmaceutical strategy (uricase), used as an adjunct to resuscitation, metabolizes UA downstream of XO and therefore

differentiates whether organ damage is related to XO-induced oxidative stress or UA itself. Furthermore, our model was designed to evaluate organ damage with a temporal resolution that is clinically relevant to the trauma population, as we used a rat model of HS with longer survival (24-72h).

Our study shows that HS-induced liver ischemia-reperfusion injury is related to UA circulation as evidenced by decreased ALT levels at both 24h and 72h timepoints in the uricase treated groups. This phenomenon was less clear with AST levels, presumably due to non-hepatic AST sources such as skeletal muscle. Further experiments showed that UA plays a role in hepatocellular regulation of apoptotic pathways through activation of caspases and increased Bax/Bcl-2 ratio. Such phenomena have also been observed kidney tubular cell line after UA exposure⁴¹. Uricase treatment prevented the decreased AKT phosphorylation (pAKT) induced by HS, a marker of one signaling pathway involved in cell survival. This contrasts with the survival benefit and pro-inflammatory profile induced by UA in human monocytes⁴². At least, in the liver parenchyma, our findings are consistent with our previous study on lung and kidney caspases activation²⁰. Although mechanisms remain incomplete, these results suggest either multiple distinct pro-apoptotic effects of UA, or significant cross-talk between the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways.

UA also seems to be involved in liver inflammation following ischemia-reperfusion injury. Decreased liver pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β), ICAM-1 expression and neutrophilic infiltration were observed at 24h when UA was targeted during resuscitation. The fact that MPO and TNF- α were not increased in the parenchyma 72h after HS, despite enhanced ICAM-1 expression, points to a possible bimodal systemic effect. The ischemia effect present in the early

phase of inflammation might decrease with time, while the persistent circulating UA might enhance ICMA-1 endothelial expression. The effect of persistent activation at the level of the immune system or hepatocytes by circulating UA is suggested through caspase-1 activation, a key downstream effector of the NLRP-3 inflammasome complex⁴³. Hence, UA has been shown to promote IL-1 β expression and ICAM-1 expression on renal tubular cells¹⁴. The fact that IL-1 β levels and caspase-1 activities were significantly blunted with uricase suggests that UA contributes to liver ischemia-reperfusion injury through an inflammasome-mediated process. It is possible that the phenomenon is related to local TNF- α activated by inflammation and apoptosis, particularly through the extrinsic apoptotic pathway⁴⁴.

One of the most interesting findings of the present study is the impact on intestinal permeability and resistance. The clinical relevance of intestinal permeability was assessed with measurement of endotoxemia, with the assumption of a digestive tract source in absence of gram-negative sepsis. Consistent with the prevention of HS-induced intestinal hyperpermeability, the intervention on UA prevented the development of endotoxemia 72h after HS, which has been shown to correlate with organ dysfunction in populations sustaining severe ischemia-reperfusion injury such as severe trauma^{23, 45} and cardiac surgery patients^{46,47}. The mechanism by which UA alters intestinal permeability may be related to decreased expression of epithelial contact proteins (E-cadherin and ZO-1) as demonstrated *in-vitro*; indeed, other have demonstrated its impact on the intestinal barrier in hyperuricemic mice⁴⁸. An alternative mechanism may be through promotion of HMGB1 circulation, a DAMP known to cause distant organ damage and to alter mucosal barrier function^{17-19,49}. The fact that our *in-vivo* intervention on UA persistently prevented HMGB1 circulation after

HS supports this mechanism and is consistent with previous *in-vitro* studies showing that soluble UA can induce HMGB1 release¹⁵.

Whether altered intestinal permeability is a driver of systemic inflammation and distant organ damage or merely an injured organ among others is currently undefined. The fact that multiple studies have shown an association between endotoxemia and distant organ failure suggests that increased intestinal permeability, with concomitant endotoxemia, may be a major factor in distant organ failure^{23,45}. Alternatively, one could postulate that gut failure is solely a marker of hypoperfusion severity and may not mechanistically contribute to distant organ injury. Although the direct anatomical relationship between the gut and the liver provides insight into a potential causal relationship, our model cannot answer this question.

We have to acknowledge several limitations of our study. First, our model is limited to a controlled HS survival model with measures up to 72h, without direct tissue injury as sustained by polytrauma patients. Secondly, although our model does present significant hypoperfusion (Delta lactate) and transient renal dysfunction as previously reported^{20,28}, liver dysfunction *per se* was not measured. In addition, histologic assessment of intestine and liver injury, including cellular apoptosis, were not performed. Finally, despite our *ex-vivo* and *in-vitro* approach for the evaluation of intestinal permeability and epithelial junctional protein expression, these findings remain consistent with the *in-vivo* measures of endotoxemia.

Even though targeting UA with uricase consistently prevented the consequences of ischemia-reperfusion injury on the liver and the gut after HS, whether uricase can prevent long-term organ failure and sepsis remains to be explore. Although our findings point to an overall deleterious

effect of UA as part of systemic ischemia-reperfusion injury, caution remains important as beneficial anti-oxidant effects have been suggested in local neuronal ischemia^{50, 51}. Notwithstanding these findings, they do not necessarily apply to injury sustained in HS, as different mechanisms involving other DAMPs or immune mediators could induce distant organ injury.

CONCLUSION

UA released from systemic ischemia-reperfusion injury after HS impacts liver and enteric function, leading to injury through activation of inflammatory and apoptotic pathways and alteration of intestinal permeability. Despite limited knowledge of underlying mechanisms, UA appears to be a key upstream mediator in HS-induced organ injury and could represent a potential therapeutic target in adjunction to standard resuscitation.

AUTHOR CONTRIBUTION

F. K. and EC contributed to the design, the analysis and interpretation of the results. They drafted the manuscript and revised the final version.

S. L., K.G., M.A.G. and C. B. participated in the animal/biochemical procedures and to the revision of the manuscript

C. F. R. and G. R. contributed to the interpretation of the results and reviewed the scientific content of the final manuscript

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge the support of the research center of the Hôpital du Sacré-Coeur and particularly Dr. François Madore, as a former acting director.

We are thankful to the Fonds de Recherche en Santé du Québec, the Clinician-Scientist program and the General Surgery program from the Université de Montréal for allowing Dr. François Khazoom to complete his research training.

We are also thankful to Mélanie Tremblay for her contribution in the measurement of liver enzymes.

CONFLICT OF INTEREST

E. C. received financial support from Sanofi Genzyme Canada for his research program.

FUNDING

This research was funded locally by Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal Research Center and the department of critical care and trauma of the Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal.

REFERENCES

TABLES AND FIGURES

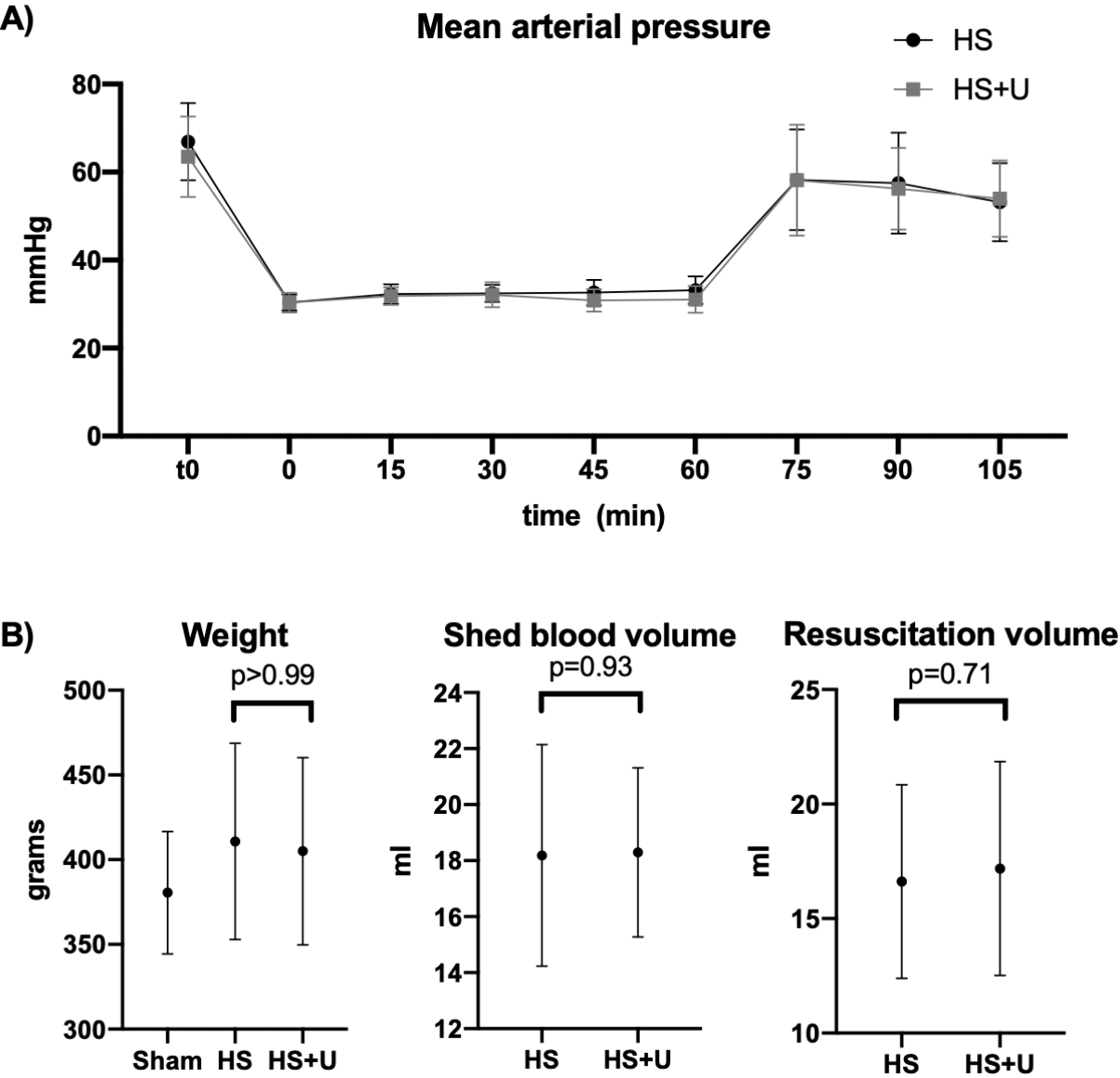


Figure 1: Mean arterial pressure (A), weight (B), Shed blood volume (C) and resuscitation volume (D) among HS and HS + Uricase groups. Expressed as mmHg, grams or ml ± SD.

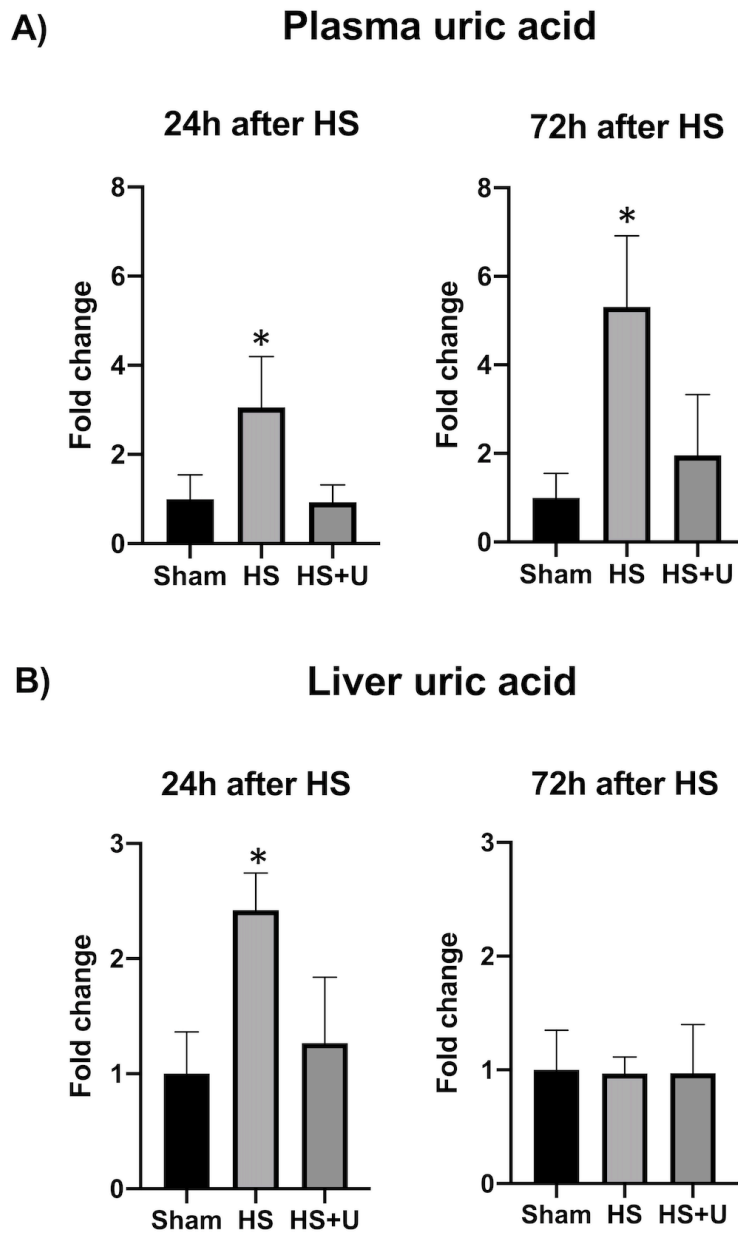


Figure 2: Circulating (A) and liver (B) uric acid concentration 24h and 72h after hemorrhagic shock. Values expressed as fold change \pm SD. * indicates $p < 0.05$ between HS and the two other groups.

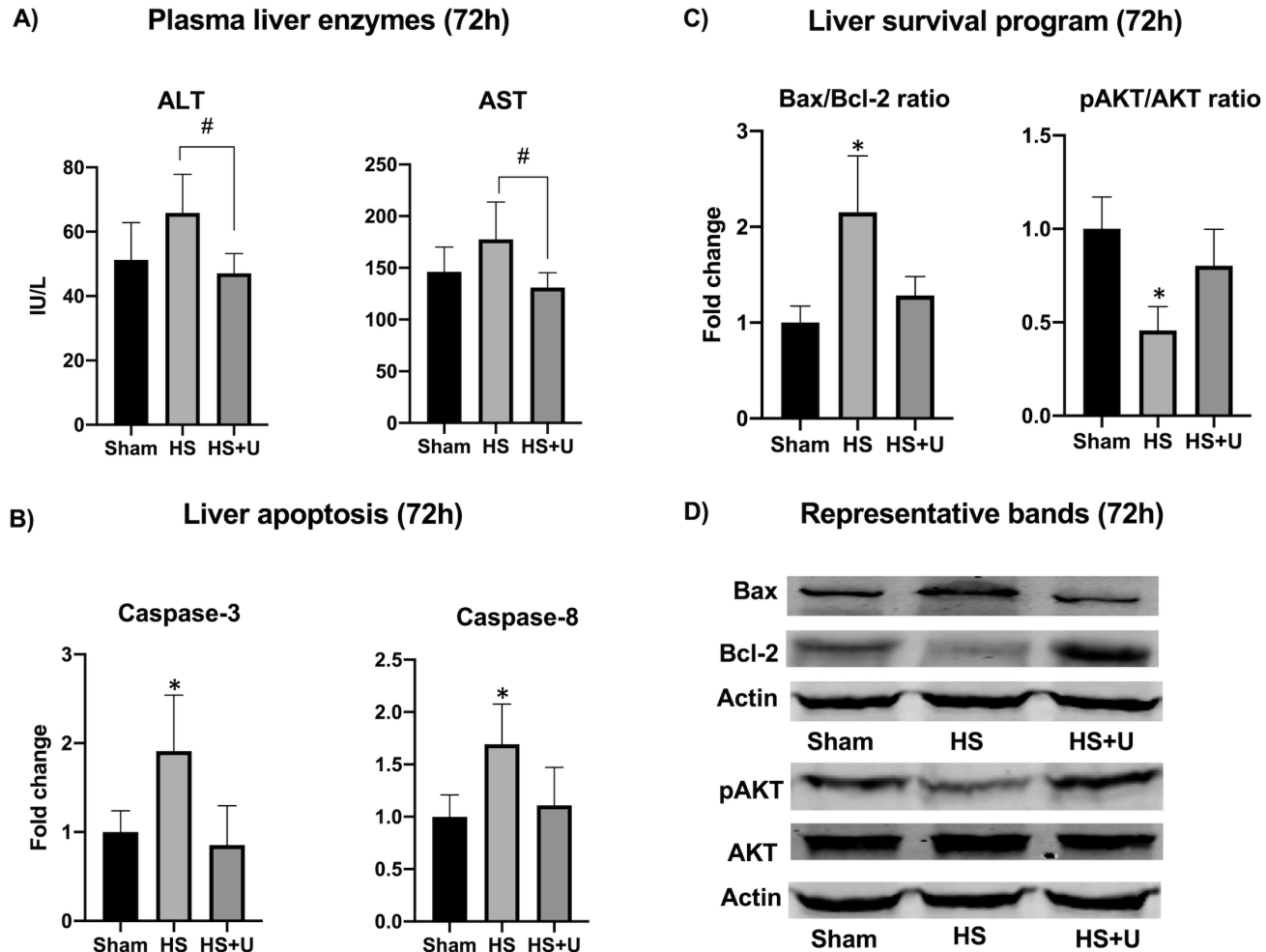
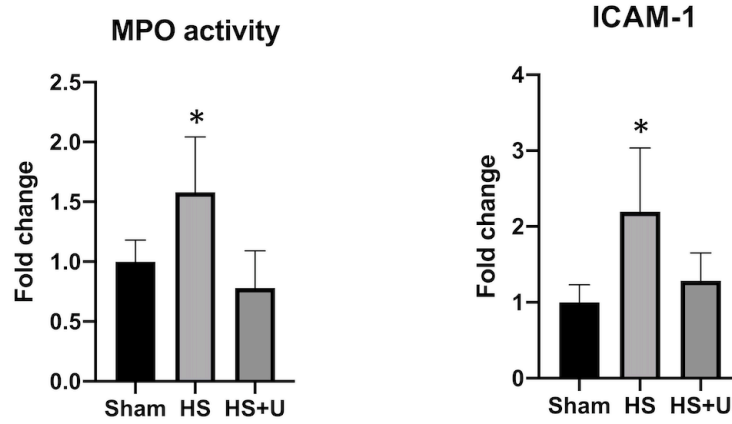
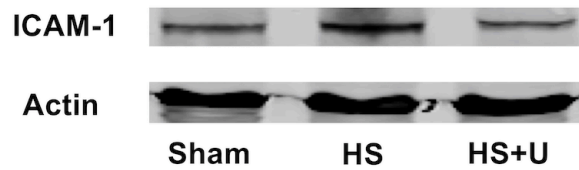


Figure 3: Plasma ALT and AST (A), Caspase-3 and -8 activation (B), Bax/Bcl-2 ratio and pAKT/AKT ratio (C) and representative Western Blot bands (D) at 72h after HS. Values expressed as IU/L or fold change \pm SD. * indicates $p < 0.05$ between HS and the two other groups. # indicates $p < 0.05$ between HS+U and HS group.

A) Liver neutrophil infiltration and ICAM-1 expression (24h)



B) Representative bands (24h)



C) Liver Cytokines and inflammasome (24h)

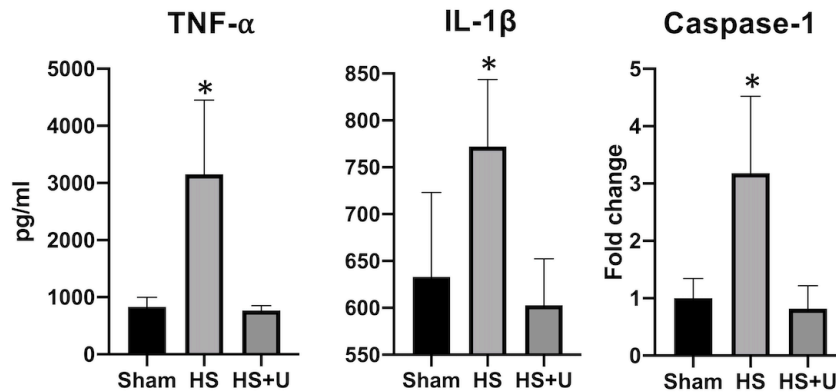


Figure 4: Liver neutrophil infiltration, ICAM-1 adhesion protein expression with representative bands (A), pro-inflammatory cytokine expression related to inflammasome activation and caspase-1 activation (B). Values expressed in fold change or pg/ml \pm SD. * indicates $p < 0.05$ between HS and the two other groups.

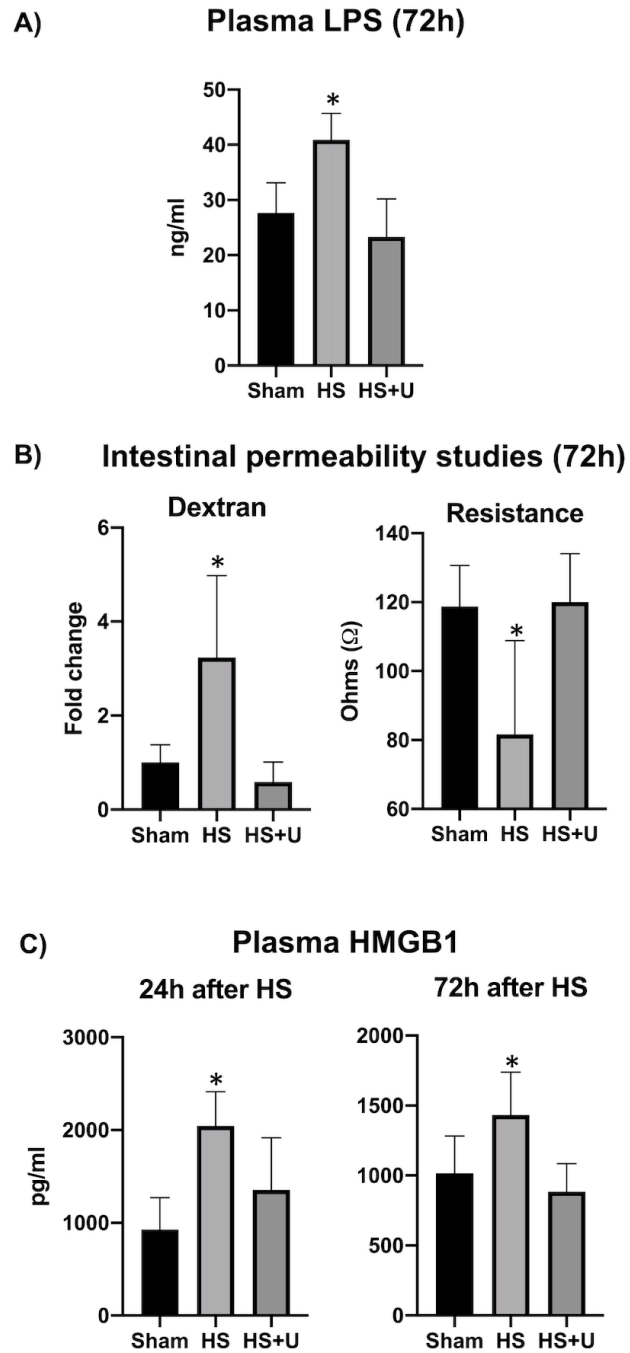


Figure 5: Plasma LPS (A), ex-vivo intestinal permeability studies (B) and plasma HMGB-1 (C). Expressed in ng/ml (A), fold change and Ohms (B) and pg/ml (C) \pm SD. * indicates $p < 0.05$ between HS and the two other groups.

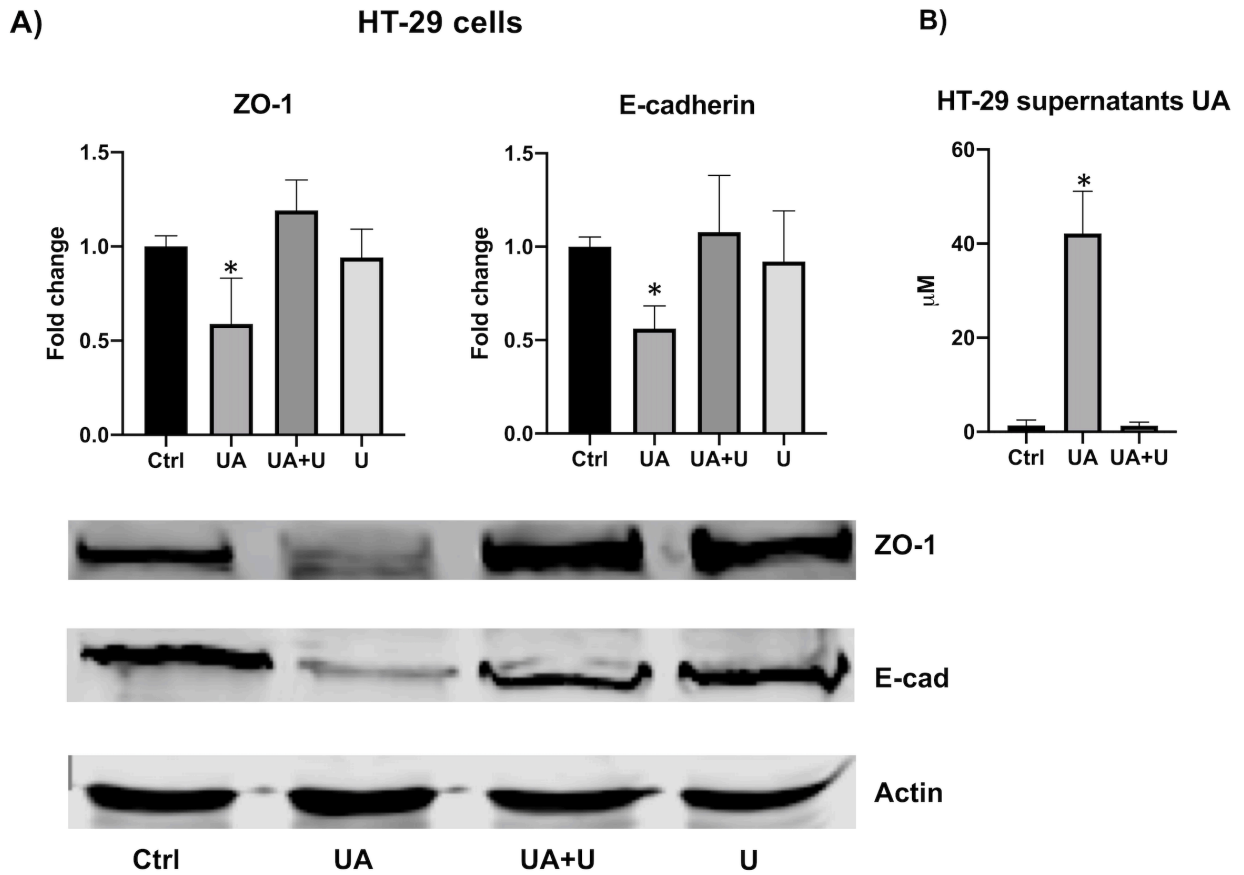


Figure 6. In-vitro HT-29 junctional protein expression (A) and UA supernatants concentrations (B) after UA exposure. Expressed in fold change and $\mu\text{M} \pm \text{SD}$. $n=6/\text{group}$. * indicates $p<0.05$ between the UA group and all other groups.

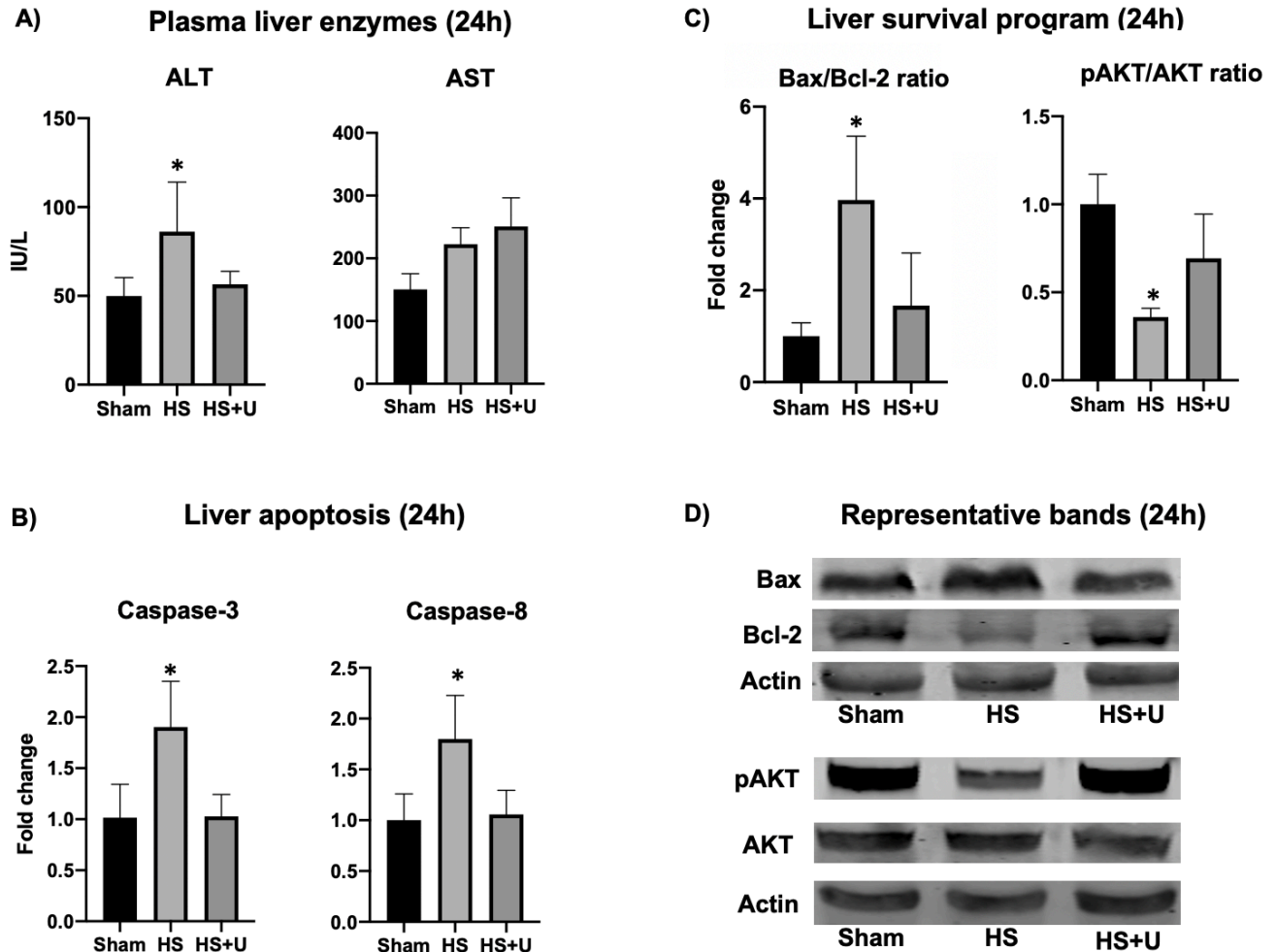
Supplementary data file 1: Table with physiology variables

	Baseline	Shock	Reperfusion
Sham (n=12)			
MAP, mmHg	65.2 (7.6)	64.7 (7.8)	64.7 (7.8)
HR, bpm	238 (19.6)	243 (19.6)	243 (19.5)
Saturation, %	98 (1.2)	98 (1)	98 (1)
Temperature, (°C)	33.8 (1)	34.1 (1)	34.1 (1)
HS (n=12)			
MAP, mmHg	66.9 (6.1)	32.2 (1.8)	56.3 (7.6)
HR, bpm	241 (14.7)	223 (22)	250 (19.6)
Saturation, %	98 (0.7)	97 (1.5)	98 (0.7)
Temperature, (°C)	33.8 (1)	33.4 (1)	33.5 (1.2)
HS + Uricase (n=12)			
MAP, mmHg	63.5 (6.4)	31.2 (1.7)	56.1 (7.4)
HR, bpm	243 (22)	235 (27)	252 (29.4)
Saturation, %	98 (0.7)	98 (1)	98 (1.2)
Temperature, (°C)	34.4 (1)	33.9 (1)	33.9 (1)

All values are represented as means (SD). MAP: mean arterial pressure; HR: heart rate; bpm: beats per minutes. Average values are reported at baseline, during hemorrhagic shock, then during reperfusion until extubation.

Supplementary data file 2: Supplementary material related to Figures 3 and 4.

Supplementary figure 3



A. At 24h, the intervention with uricase (U) blunt HS-induced increase in ALT levels; increased AST levels after HS compared to Sham is not attenuated following uricase intervention.

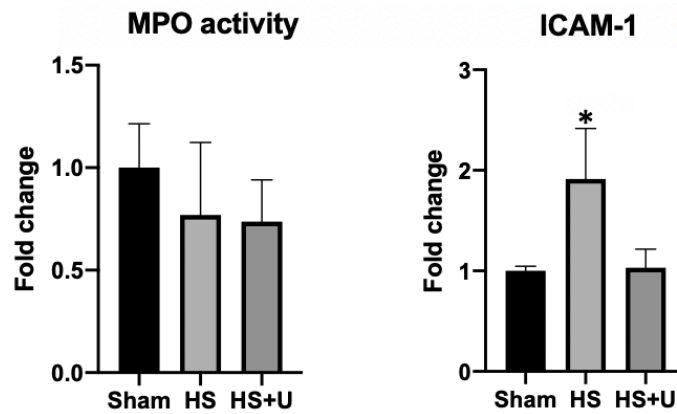
B. At the 24h after HS, uricase prevents a nearly two-fold increase in liver caspase-3 and -8 activities.

C. Increase in liver Bax/Bcl-2 ratio after HS is prevented. HS leads to a significant decrease in liver phosphorylated-AKT/AKT ratio; lowering UA with uricase prevented this phenomenon.

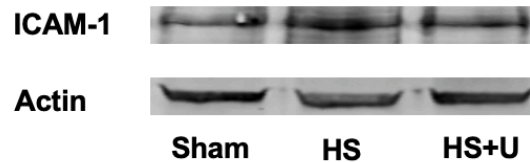
D. Representative Western Blot bands. Values expressed as IU/L or fold change \pm SD. * indicates $p < 0.05$ between HS and the two other groups.

Supplementary figure 4

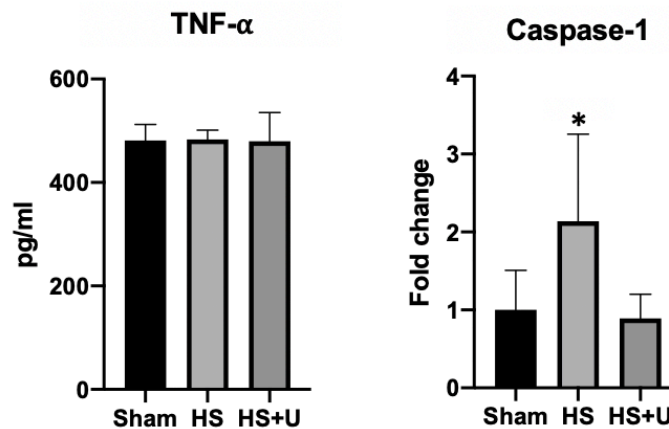
A) Liver neutrophil infiltration and ICAM-1 expression (72h)



B) Representative bands (72h)



C) Liver Cytokines and inflammasome (72h)



A. No differences are observed at 72h for Myeloperoxidase (MPO). The adhesion protein ICAM-1 is significantly enhanced by HS and prevented by uricase administration.

B. Representative Western Blot bands of ICAM-1

C. liver TNF- α showed no difference at 72h; Caspase-1 activity, is significantly induced till 72h after HS and completely abolished with UA metabolism by uricase.

Values expressed in fold change or pg/ml \pm SD. * indicates $p < 0.05$ between HS and the two other group

Chapitre 4 Volet clinique : La circulation de l'Acide Urique chez les patients Sévèrement Traumatisés : une étude pilote prospective (AUSTRALIA).

Étant donné les données préclinique et préliminaires cliniques (Prélèvement de l'étude DYNAMIC, NCT01355042), nous avons dessiné une étude de cohorte, afin de décrire la fluctuation initiale (histoire naturelle) et de déterminer le moment associé à une concentration maximale d'acide urique (pic précoce) après le traumatisme.

4.1 Méthodologie

Objectifs de l'étude:

L'objectif primaire était d'évaluer la faisabilité d'une étude mesurant l'évolution de l'acide urique suivant un traumatisme grave, spécifiquement d'évaluer notre capacité à recruter et à mesurer de manière sérieuse notre biomarqueur. De plus, nous souhaitons évaluer le mode d'obtention de données reproductibles, l'évaluation des intervalles choisis entre les prélèvements et la cinétique de l'acide urique en circulation suivant un choc hémorragique traumatique.

Les objectifs secondaires étaient :

- 1) Établir les déterminants de l'acide urique en circulation suite au choc hémorragique traumatique, incluant la sévérité du traumatisme et du choc.
- 2) Évaluer le potentiel prédictif du degré d'augmentation d'acide urique sérique initial sur la défaillance d'organes multiples subséquente.

Hypothèses :

- 1) En accord avec la littérature pré-clinique, un pic précoce d'acide urique sera détecté dans les premières 24 heures suivant le choc hémorragique traumatique.
- 2) Il est possible que le degré d'augmentation de l'acide urique sérique soit associé à une sévérité plus importante du traumatisme et du choc hémorragique.
- 3) Il est possible que le degré d'augmentation de l'acide urique sérique initial soit associé à une défaillance d'organes multiples subséquente plus importante.

Population étudiée (Fig 4.1):

Une étude prospective observationnelle dont le recrutement est toujours en cours a été mise en place à l'Hôpital Sacré-Cœur de Montréal. Les patients potentiellement candidats à l'étude sont présentement dépistés dès leur arrivée à l'urgence après l'activation de l'équipe de traumatologie (code 111). Les patients respectant les critères nommés ci-bas ont été recrutés. Étant donné que l'objectif primaire est d'évaluer la faisabilité de prélèvements sériés d'acide urique et la cinétique de cette molécule suite à un choc hémorragique traumatique, le nombre de patients nécessaires à la réalisation de l'objectif primaire, basé sur d'autres biomarqueurs, est de 25 patients¹⁰².

Critères d'Inclusion

- 1) Âge \geq 18 ans
- 2) Admission aux soins intensifs
- 3) Intervalle de moins de 3 heures entre le traumatisme et l'arrivée à l'urgence
- 4) Injury Severity Score (ISS) de plus de 16
- 5) Réanimation volumique avec \geq 1L de crystalloïdes ou \geq 1 culot globulaire reçu à l'urgence

Critères d'exclusion :

- 1) Traumatisme médullaire ou traumatisme craniocérébral isolé
- 2) Maladie hématologique
- 3) Chimiothérapie reçue dans 4 semaines précédant le traumatisme
- 4) Traitement d'uricase dans la semaine précédant le traumatisme
- 5) Transfert d'une autre institution

Explications des critères d'inclusion et d'exclusion :

Seuls les patients majeurs (18 ans et plus) ont été recrutés étant donné la nature différée du consentement tel qu'expliqué ci-haut. L'admission aux soins intensifs était nécessaire non seulement pour les soins globaux des patients mais également pour optimiser la faisabilité des prélèvements sériés. Notre groupe ayant déjà démontré une augmentation d'acide urique sérique dès les premières 2 heures suivant un choc hémorragique, un intervalle de moins de 3 heures entre le traumatisme et l'arrivée du patient a été jugé nécessaire afin d'augmenter la probabilité de détecter un pic précoce d'acide urique, sans pour autant devoir exclure trop de patients en raison d'un long transport hospitalier¹³. Un score de sévérité (*Injury severity score*) de plus de 16 a été choisi afin de sélectionner des patients à risque de défaillance d'organes multiples¹⁰³. Les critères de réanimation volumique ont été sélectionnés comme indicateurs de choc selon les standards de l'*Advanced Trauma Life Support (ATLS) 2020*. Les traumatismes cranio-cérébraux et médullaires isolés ont été exclus afin d'éviter d'inclure des patients avec un ISS>16 sans choc hémorragique. Les patients porteurs d'une maladie hématologique ou en traitement de chimiothérapie ont dû être exclus en raison de la possibilité d'un syndrome de lyse tumorale spontané ou induit, ce qui aurait pu altérer les valeurs d'acide urique¹⁰. Bien que rare, les patients ayant eu un traitement d'Uricase

ont dû être exclus pour ne pas altérer les valeurs d'acide urique. Les patients transférés d'une autre institution ont dû être exclus vu la difficulté anticipée d'obtenir les données de la réanimation initiale et vu le délai associé avec le transfert.

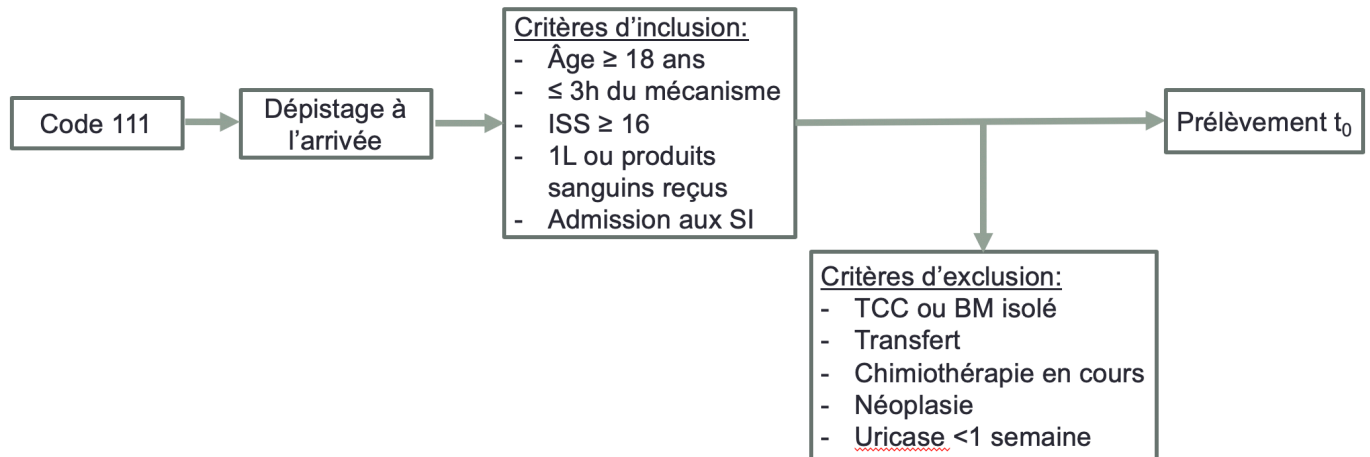


Figure 4.1: Devis de l'étude, critères d'inclusion et d'exclusion. ISS : Injury severity score. SI : soins intensifs. TCC : Traumatisme craniocérébral. BM : Blessure médullaire.

Consentement :

Étant donné le risque minimal de l'étude, la possibilité que les résultats de cette étude contribue à améliorer le pronostic d'une population de patient similaire dans le futur, la nécessité d'obtenir les prélèvements dès l'arrivée chez des patients avec une forte probabilité d'inaptitude à leur arrivée en raison de leur choc hémorragique et de leurs blessures graves, le comité d'éthique de la recherche de l'Hôpital du Sacré Cœur de Montréal a accepté que le consentement se fasse de façon différée. Un proche a été contacté dans les 72 heures suivant le recrutement du patient afin d'obtenir un consentement temporaire. Les explications par rapport au projet étaient transmises verbalement en personne et par l'entremise d'un document explicatif. Au moindre doute du proche, le patient était retiré de l'étude et les prélèvements étaient cessés. Les patients étaient rencontrés

dès qu'ils devenaient aptes afin de confirmer ou refuser leur participation à l'étude. En l'absence de consentement du patient apte, les données recueillies étaient détruites. En cas d'inaptitude prolongée, définie par une inaptitude persistante au congé de l'hôpital, le consentement obtenu par le proche était jugé suffisant.

Collecte des données (Fig 4.2) :

Les données suivantes ont été rapportées avec un formulaire électronique standardisé :

- A) Caractéristiques de base : données démographiques (âge, sexe, poids), co-morbidités chroniques (pulmonaires, cardiaques, hématologiques, endocriniennes, hépatiques, rénales, oncologiques, rhumatologiques) et médication (incluant chimiothérapie, allopurinol, Uricase), Score de co-morbidité de charlson.
- B) Caractéristiques du traumatisme : type (contondant, pénétrant), injury severity score (ISS), Abbreviated injury score (AIS) par zones, heure du traumatisme, heure d'arrivée à l'urgence
- C) Données hémodynamiques : signes vitaux sériés, nombre d'hypotensions (tension artérielle systolique < 90 mmHg), lactates, déficit en base.
- D) Interventions : intubation, interventions aux urgences (drains thoraciques, ceinture pelvienne, thoracotomie), embolisation, chirurgie (incluant temps de clampage vasculaire si applicable), type et quantification de la réanimation volumique (crystalloïdes, produits sanguins, vasopresseurs).
- E) Données de laboratoire : Dosage de l'acide urique sérique chaque 4h pour les premières 20h, chaque 8h de 20 à 60h et chaque jour de 60h à 7 jours. Dosages usuels de la créatinine, enzymes hépatiques, bilirubine, coagulation, électrolytes, formule sanguine.

F) Mesures de défaillance d'organes : calcul du score *sequential organ failure assessment* (SOFA, Tableau 4.1). Les besoins en remplacement rénal, vasopresseurs et les paramètres de ventilation mécaniques ont été rapportés, incluant la durée de ventilation mécanique.

G) Mortalité, durée de séjour aux soins intensifs et durée de séjour hospitalier.

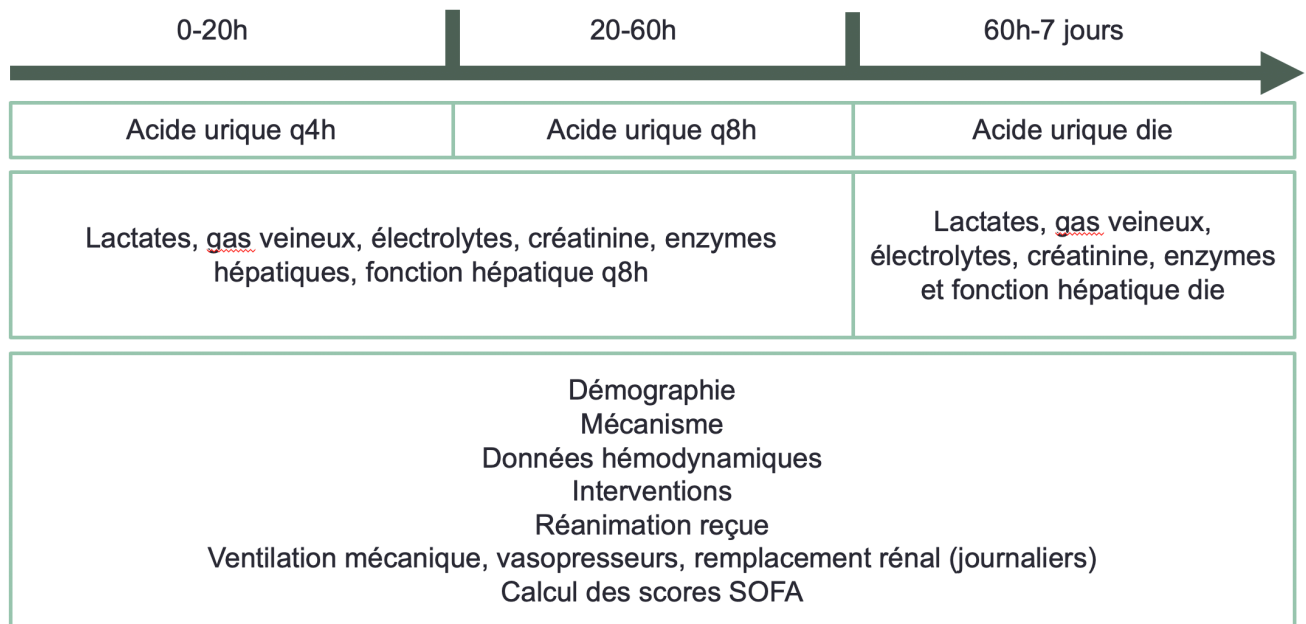


Figure 4.2 : Collecte des données incluant les prélèvements d'acide urique, les prélèvements standards, les données démographiques, hémodynamiques, interventionnelles et portant sur la défaillance d'organe.

Composante	0	1	2	3	4
Respiration :					
Ratio PaO ₂ /FiO ₂	>400	<400	<300	<200	<100
Hématologique :					
Plaquettes x 10 ³ /mm ³	>150	<150	<100	<50	<20
Hépatique :					
Bilirubine, mg/dL	<1.2	1.2-1.9	2.0-5.9	6.0-11.9	>12.10
Cardiovasculaire :				Dopamine 5.1-15	Dopamine>15
Hypotension (mmHg) ou Vasopresseurs (mcg/kg/min)	TAM >70	TAM<70	Dopamine<5 ou Dobutamine	Épinéphrine<0.1 Norépinéphrine< 0.1	Épinéphrine >0.1 Norépinéphrine >0.1
Neurologique :					
Glasgow Coma Scale (GCS) Score	15	13-14	10-12	6-9	<6
Rénal :					
Créatinine (micromol/L)	<110	110-170	171-299	300-440	440
Diurèse				<500cc/jour	<200cc/jour

Tableau 4.1 : le Sequential Organ Failure Assessment score (SOFA),

Issus de faisabilité :

- A) Recrutement : le taux recrutement a été défini par le nombre de patient recrutés initialement, sans tenir compte du consentement, divisé par le nombre de patients éligibles à l'étude.
- B) Consentement : les taux de consentement auprès des proches et de re-consentement auprès des patients ont été répertoriés, définis par le nombre de consentements obtenus divisé par le nombre total de patients inclus.
- C) Prélèvements : les taux d'observance des prélèvements, définis par un intervalle entre chaque prélèvement ne dépassant pas plus de 50% de l'intervalle prévu (ex : pour les prélèvements prévus à chaque 4 heures, un intervalle de plus de 6 heures entre deux prélèvements est considéré non-observant) ont été calculés. Il est à noter que, pour un même patient, une seule déviation de plus de 50% de l'intervalle donné est considéré non-observant.

Issus cliniques :

- A) Défaillance d'organes : Le score de défaillance d'organes SOFA a été calculé de façon quotidienne. Une tentative préliminaire d'association entre les niveaux d'acide urique et la défaillance d'organe persistante à 72 suivant le traumatisme sera faite. Une analyse plus poussée est prévue une fois le recrutement terminé.
- B) Mortalité et durée de séjour : Une fois le recrutement terminé, l'association entre les niveaux d'acide urique et la mortalité à 30 jours/durée de séjour sera explorée.

Analyses statistiques :

- A) Données de faisabilité : Les prélèvements biologiques sont identifiés avec un numéro de référence lié au patient et au temps de prélèvement. Le taux de recrutement est exprimé sous forme de ratio entre le nombre de patients recrutés et le nombre total de patients dépistés présentant tous les critères d'inclusion. Les taux d'observance ont été calculés sous forme de ratio entre les patients ayant eu les prélèvements aux intervalles de temps spécifiés et le nombre total de patients recrutés. Les taux de consentement sont rapportés sous forme de ratio selon la définition ci-haut.
- B) Cinétique d'acide urique : Une courbe d'acide urique globale a été calculée à l'aide d'une régression non-linéaire polynomiale de 3^e degré ($Ax^3 + Bx^2 + Cx + D$). Ensuite, étant donné la variabilité attendue entre les niveaux d'acide urique initiaux de chaque patient, une régression polynomiale de troisième degré a été calculée en fixant les paramètres A, B et C, responsables de la cinétique de la courbe, mais en gardant le paramètre D (l'ordonnée à l'origine) fixe. Un R^2 a été calculé avec cette technique afin d'objectiver la similitude des cinétiques de chacun des patients.
- C) Association avec la défaillance d'organe : tel que mentionné ci-haut, le score SOFA a été calculé de façon quotidienne pour chacun des patients pour les 7 jours. Étant donné qu'un score de 6 et plus est associé à une augmentation importante de la mortalité, de même que la persistance de la défaillance d'organes au-delà de 72 heures, un score SOFA de 6 au 3^e jour a été choisi comme seuil afin de dichotomiser la cohorte. L'aire sous la courbe des premières 72h a été calculée. Des analyses plus poussées, avec un modèle multi-niveau et une régression Cox tenant compte des multiples facteurs confondant (sévérité du choc, sévérité du traumatisme), sont prévues lorsque le recrutement sera terminé.

4.2 Résultats préliminaires

Étant donné que le recrutement des patients est toujours en cours, seules les données portant sur la faisabilité de l'étude, la cinétique globale de l'acide urique, et la cinétique selon le score SOFA seront rapportées.

Données de faisabilité :

Vingt-sept patients répondant aux critères d'inclusion ont été dépistés de manière aléatoire (disponibilité de dépistage dépendant de la présence de l'investigateur) afin de faire partie de la cohorte étudiée. De ceux-ci, 20 patients ont été recrutés entre octobre 2018 et août 2019 (Fig 4.3). Les caractéristiques de base sont présentées dans le tableau 4.2. Vu le délai prévu par le registre de trauma pour le calcul des *Injury Severity Score* (ISS) et des *Abbreviated injury score* (AIS), ceux-ci ne sont pas disponibles au moment de l'écriture de ce mémoire. Les proches de tous les patients recrutés ont été rencontrés dans les 72h suivant le recrutement. Des 20 patients recrutés dans l'étude, 19 (95%) des proches ont accepté la participation à l'étude; l'unique refus de poursuivre l'étude a accepté l'utilisation des prélèvements déjà effectués pour la réalisation de cette étude. Tous les patients dont les proches avaient accepté leur participation à l'étude ont été rencontrés afin d'obtenir une confirmation. De ceux-ci, 14 patients (74%) étaient jugés aptes et ont pu confirmer le consentement de leur proche. Les 5 autres patients n'ont pas pu consentir en raison d'une inaptitude prolongée jusqu'au congé de l'hôpital, ou jusqu'au décès. Aucun refus catégorique de la part des patients inaptes n'a été manifesté (Tableau 4.3).

<i>Variable</i>	<i>N=20</i>
Âge (ans), Moyenne (ET)	49 (16)
Genre M:F, n (%)	16:4 (80:20)
Caucasien, n (%)	17:3 (85:15)
Poids, Moyenne (ET)	84 (20)
CCI, Médiane (range)	1 (2)
Mécanisme contondant, n (%)	15:5 (75:25)
ISS, Moyenne (ET)	NA
<i>Lactate (mmol/L) à l'urgence, Moyenne (ET)</i>	5.5 (2.9)
<i>Déficit base à l'urgence (mmol/L), Moyenne (ET)</i>	5.5 (4.5)
<i>GCS à l'urgence, Médiane (Range)</i>	14 (5-15)
Chirurgie d'urgence, n (%)	13 (65)
<i>Si chirurgie, pertes sanguines ml (min-max) (n=13)</i>	1826 (200-8000)
<i>Score SOFA 1^{er} 24h, Moyenne (ET)</i>	8.3 (2.8)

Tableau 4.2 : caractéristiques de base de la cohorte. ET : écart type. CCI : Charlson comorbidity index. ISS : injury severity score. GCS : Glasgow coma scale. SOFA: Sequential organ failure assessment.

Le prélèvement initial prévu à l'arrivée à l'urgence a été obtenu chez 18 des 20 patients recrutés (90%). Pour les premières 20 heures, où les prélèvements étaient prévus à chaque 4 heures, le protocole a été respecté chez 13 des 20 patients (65%). Pour les 40 heures suivantes, où les prélèvements étaient prévus à chaque 8 heures, le protocole a été respecté chez 14 des 19 patients, soit 74% (tableau 4.4).

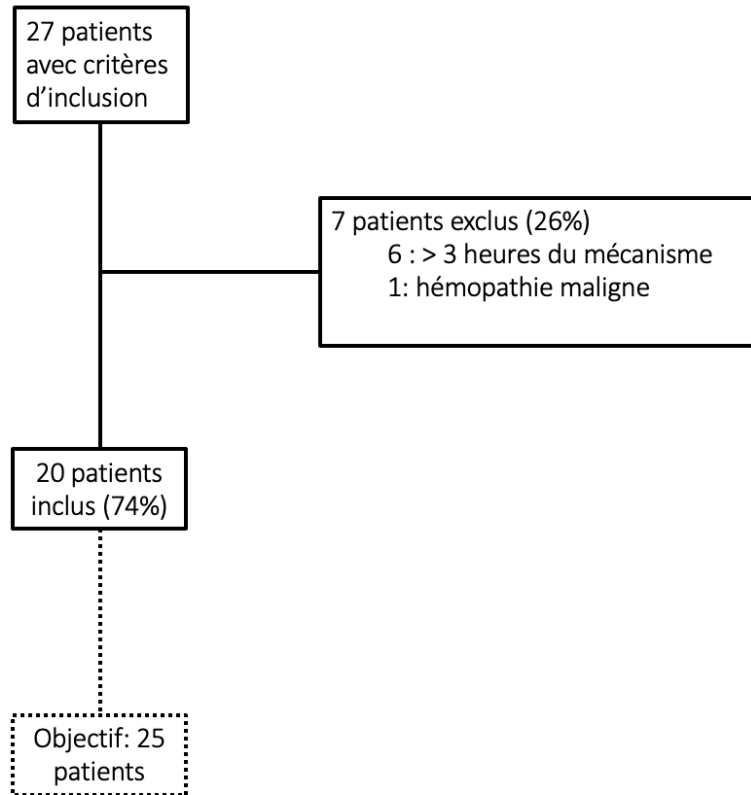


Figure 4.3 : Taux de recrutement des patients

Consentement initial (proche)	Re-consentement patient	Raisons de non-obtention
19/20 (95%)	14/19(74%)	Inaptitude persistente (n=5) Refus (n=1)

Tableau 4.3 : Taux de consentement

Prélèvements	P ₁	P ₁ -P ₅ (q4h)	P ₆ -P ₁₀ (q8h)
Observance	18/20 (90%)	13/20 (65%)	14/19 (73%)

Tableau 4.4 : Taux d'observance des prélèvements

Cinétique de l'acide urique sérique :

Le niveau d'acide urique à l'admission avait une médiane de 393.5 (IQR=143). Huit patients sur 18 prélèvements initiaux (44%) avaient un taux supérieur à 400 μM ($\mu\text{mol/L}$). Les courbes d'acide urique individuelles, des 20 premiers patients, sont présentées dans la figure 4.4. Une courbe globale (noir, gras) a été effectuée à l'aide d'une régression polynomiale de troisième degré, où tous les paramètres de l'équation $Ax^3 + Bx^2 + Cx + D$ ont été fixés. En utilisant cette technique, l'équation $-0.0001262x^3 + 0.04926x^2 - 6.269x + 403.1$, correspondant à la courbe globale (noir, gras), a été obtenue avec un R^2 global situé à 0.41. Cependant, cette technique fixe le paramètre D, communément appelé l'ordonnée à l'origine. En regardant les courbes individuelles de la figure 4.4, il existe une importante variabilité au sein de la cohorte pour la première valeur d'acide urique (moyenne = 414, min=253, max=788), avec des cinétiques non-linéaires qui tendent toutes vers une diminution de la concentration d'acide urique après le traumatisme. Pour cette raison, un R^2 global a été calculé en fixant seulement les paramètres qui déterminent la cinétique globale (les paramètres A, B et C), sans tenir compte des valeurs d'acide urique initiales. Pour ce faire, l'ordonnée à l'origine (paramètre D) a été laissé libre, alors que les paramètres A, B, et C, déterminant la cinétique globale de la courbe, ont été fixés. L'équation $-0.0001208x^3 + 0.04724x^2 - 5.857x + D_{\text{libre}}$ a ainsi été obtenue avec un R^2 global de 0.87, indiquant qu'au sein de cette cohorte préliminaire, 87% de la cinétique globale de l'acide urique sérique suite au choc hémorragique traumatique peut s'expliquer par cette équation. Afin d'évaluer l'association entre les niveaux d'acide urique et la défaillance d'organe, les courbes d'acide urique ont été dichotomisées selon le score SOFA (Fig 4.5). Pour les patients avec un score SOFA de moins de 6, la courbe obtenue est de $-0.0001595x^3 + 0.05640x^2 - 6.206x + 347.6$ ($R^2 = 0.58$), versus $-0.0001105x^3 + 0.04744x^2 - 6.886x + 481.8$ ($R^2 = 0.44$) pour un SOFA de 6 et plus, avec une différence statistiquement

significative entre les deux courbes ($p < 0.0001$, extra sum of square F test). L'aire sous la courbe des premières 72 heures des patients avec un SOFA < 6 est de 29534 vs 38130 pour les patients avec un SOFA ≥ 6 ($p = 0.0001$, test de t). La valeur de créatinine moyenne était de 59 vs 106 micromol/L pour un SOFA < 6 vs SOFA ≥ 6 ($p < 0.05$, test de t). Une analyse multivariée contrôlant pour la composante rénale du SOFA sera effectuée sur la cohorte entière.

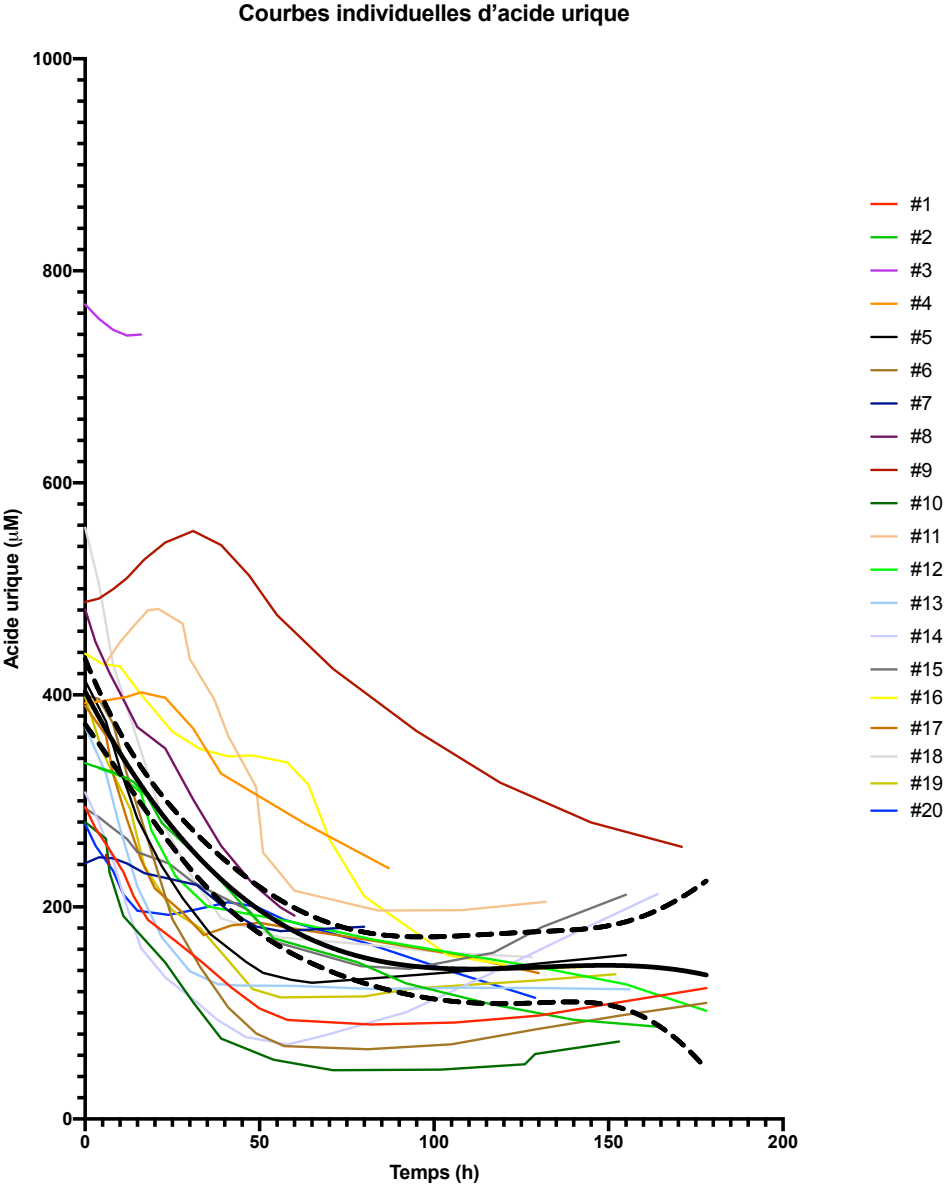


Figure 4.4 : courbes individuelles d'acide urique.

Cinétique de l'acide urique selon le SOFA à 72h

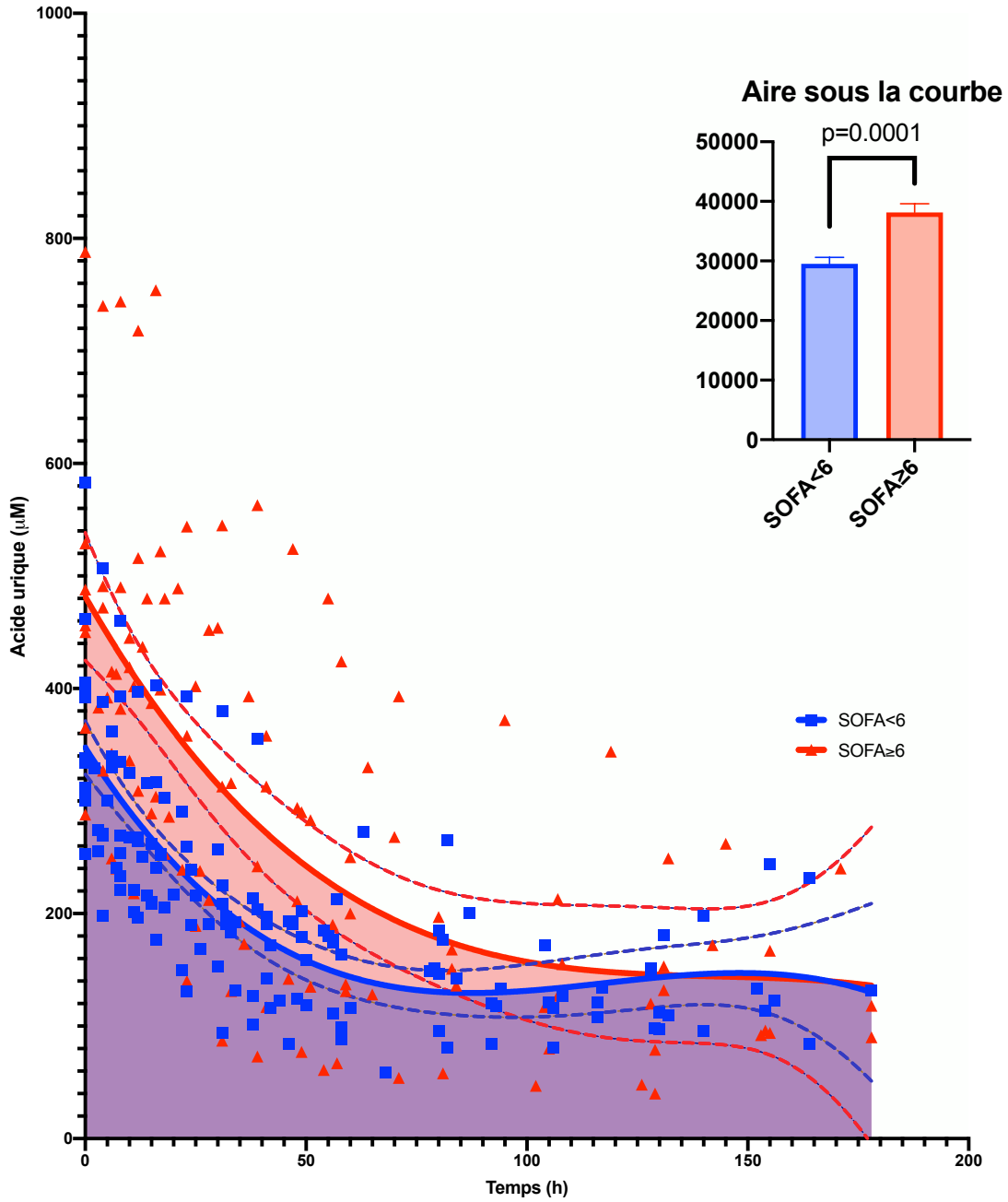


Figure 4.5 : courbes d'acide urique selon le SOFA à 72h

4.3 Discussion

Rationnel

La preuve de concept du rôle délétère de l'acide urique dans l'atteinte des organes suite au choc hémorragique représente un défi de taille nécessitant la remise en question de plusieurs mythes qui, malgré peu de littérature, sont généralement acceptés au sein de la communauté scientifique. Cette étude clinique s'inscrit au sein d'un programme de recherche translationnel où l'acide urique a été démontré comme médiateur clé dans l'atteinte pulmonaire et rénale suite au choc hémorragique chez un modèle animal¹³. De plus, le volet fondamental de ce mémoire suggère que l'acide urique libéré lors du choc hémorragique a également un impact au niveau hépatique et intestinal. Une intervention par métabolisation pharmacologique de l'acide urique prévient plusieurs phénomènes physiologiques liés à l'apoptose, l'inflammation, la libération d'autres alarmines (HMGB1), et à l'altération de la barrière intestinale (perméabilité et circulation d'endotoxines).

Faisabilité du potentiel translationnel

Notre étude clinique prospective observationnelle représente la première application clinique de ces concepts, lesquels ont été établis dans l'environnement standardisé et contrôlé de la recherche préclinique. D'abord, ce projet pilote démontre qu'une telle étude est faisable à plus grande échelle. En effet, des 27 patients potentiellement éligibles qui ont été dépistés, 7 patients ont dû être exclus pour des raisons déjà pré-spécifiées au protocole (délai > 3 heures du mécanisme : 6 patients; hémopathie maligne : 1 patient), pour un taux de recrutement de 74%. L'application du consentement initial par les proches (taux de 95%) et du consentement différé des patients inclus

(taux de 74%) est un autre argument en faveur de la faisabilité de l'étude; en effet, les 6 patients qui n'ont pas confirmé leur volonté de participer à l'étude ont soit refusé de poursuivre les prélèvements (n=1) ou demeuraient inaptes au congé de l'hôpital (n=5). Le seul refus a malgré tout accepté l'utilisation des prélèvements déjà effectués et aucun refus catégorique n'a été manifesté chez les patients inaptes, rendant le consentement obtenu par les proches valide.

Les taux d'observance des prélèvements (90% pour le premier prélèvement, 65% pour les prélèvements aux 4 heures, et 73% pour les prélèvements aux 8h) reflètent non seulement la sévérité des critères d'observance pré-spécifiés par le protocole, mais également le caractère saturé des ressources nécessaires à la prise en charge d'un polytraumatisé avec instabilité hémodynamique. Tel que mentionné, un seul manquement au protocole dans l'intervalle de temps spécifié (premières 20 heures pour les prélèvements aux $4h \pm 2h$; 40 heures suivantes pour les prélèvements aux $8h \pm 4h$) était nécessaire pour considérer un sujet non-observant, rendant les critères d'observance très sévères. Ceux-ci avaient été établis afin d'optimiser la probabilité de détecter une variation d'acide urique sérique lors des premières 60 heures suivant un choc hémorragique traumatique, dans un contexte où cette cinétique était alors complètement inconnue chez l'humain. En dépit de cela, la cinétique globale de l'acide urique suite au choc hémorragique s'est avérée reproductible pour l'ensemble de la cohorte avec un R^2 global de 0.87; ces faibles taux d'observance n'ont donc pas empêché la réalisation de l'un des objectifs primaires. De plus, les premières 24 heures de la prise en charge d'un polytraumatisé avec instabilité hémodynamique sont saturées en termes de tâches et de ressources utilisées, si bien que l'ajout de prélèvements sériés additionnels à la tâche clinique usuelle n'est pas toujours possible et représente un défi important pour l'équipe traitante. À titre d'exemple, 65% des patients ont dû aller en salle d'opération à partir de l'urgence, rendant les prélèvements additionnels difficiles à coordonner. Le

haut taux d'observance du prélèvement initial s'explique par le fait que les polytraumatisés ont en principe toujours des prélèvements à leur arrivée à l'urgence.

Cinétique, association avec la défaillance d'organes et potentiel en tant que biomarqueur

Déterminer la cinétique des alarmines en circulation suite à une insulte est une question importante. En effet, l'objectif ultime est d'évaluer si le biomarqueur potentiel représente également une cible thérapeutique. En effet, une molécule sans cinétique reproductible ne représenterait probablement pas une cible idéale pour tester une intervention systématique dans cette population. Dans le cas de cinétiques reproductibles ou relativement similaires sur une même période de temps, cela ouvre le potentiel de déterminer une fenêtre thérapeutique temporelle où une intervention peut s'avérer efficace. À titre d'exemple fictif, une molécule dont les effets délétères sont proportionnels à sa concentration pourrait être ciblée pendant un intervalle temporel où sa concentration est maximale.

Ces données préliminaires démontrent que l'acide urique en circulation suite au choc hémorragique traumatique présente une cinétique reproductible dans l'ensemble de la cohorte ($R^2 = 0.87$). Tel que mentionné dans les résultats, afin d'évaluer uniquement la variation d'acide urique dans le temps, ce coefficient a été calculé en faisant abstraction du paramètre D de l'équation, lequel ne contribue pas à la cinétique et peut varier selon plusieurs facteurs intrinsèques au patient (poids, masse musculaire, consommation d'alcool, fonction rénale, diète)⁸⁶. Tel qu'illustré dans la figure 4.4, les niveaux d'acide urique de tous les patients, sans exception, étaient élevés à l'arrivée à l'urgence par rapport à leur dernière valeur, laquelle est assumée comme étant proche de leur valeur de base. À noter cependant que les 8 sujets sains de l'étude DYNAMIC (NCT01355042) présentaient un niveau d'acide urique moyen de 160 microM, très proche des dernières valeurs mesurées dans notre cohorte. Ceci suggère que les phénomènes d'ischémie-reperfusion menant à

la libération d'acide urique observés chez les animaux se reproduisent également chez l'humain. Fait intéressant, un pic initial d'acide urique a été détecté chez seulement 4 patients, alors que pour les 16 autres patients la valeur maximale était la valeur initiale, menant à une courbe uniquement descendante sans pic décelé (Fig 4.4). Or, bien que ces données préliminaires ne fassent pas mention du temps entre le traumatisme et la réanimation liquidienne reçue avant le premier prélèvement (analyse qui sera effectuée sur la cohorte entière), il est possible que la libération d'acide urique initiale se fasse rapidement après un traumatisme; ceci pourrait expliquer qu'au moment du premier prélèvement, les patients étaient possiblement déjà sur la pente descendante de leur courbe. En effet, le modèle animal de choc hémorragique utilisé pour guider le critère d'exclusion de >3h du mécanisme permet de caractériser la variation de l'acide urique dans le temps après une blessure d'ischémie-reperfusion systémique, mais il ne permet pas d'étudier ce phénomène avec une blessure tissulaire directe concomitante, laquelle est prépondérante suite à un traumatisme contondant. Il est donc possible que la lésion tissulaire directe, couplée à l'ischémie-reperfusion, accélère la libération de l'acide urique en circulation, menant à ces trouvailles. Malheureusement, étant donné qu'il s'agit de la première étude sur le sujet, ces hypothèses ne peuvent être appuyées par la littérature actuelle.

Bien que préliminaires, l'analyse initiale des premières données suggère que le risque de défaillance d'organe persistant à 72h suivant un choc hémorragique traumatique est associé à une libération accrue d'acide urique en circulation. En effet, les patients avec un score SOFA de 6 et plus sont exposés à davantage d'acide urique circulante dans les premières 72h par rapport aux patients avec un SOFA de moins de 6 (figure 4.5). Il est cependant important concéder que ces analyses ne sont qu'exploratoires et sont loin d'établir l'acide urique comme un facteur prédicteur indépendant de défaillance d'organes. Par leur capacité à engendrer une souffrance cellulaire,

plusieurs autres variables présentes chez les polytraumatisés sont susceptibles de produire non seulement une libération d'acide urique en circulation, mais également de contribuer à la défaillance d'organes et au pronostic des patients. Par définition, il s'agit de facteurs confondants dont ces analyses ne tiennent pas compte. Par exemple, il est raisonnable de penser que la lésion tissulaire directe, qui favorise la libération d'acide urique, est proportionnelle à la sévérité du traumatisme (*Injury Severity Score*), laquelle est fortement associée à la défaillance d'organes chez les traumatisés¹⁰³. La sévérité et la durée du choc, qui augmentent l'ischémie tissulaire et par le fait même la libération d'acide urique¹³, est également associée à la défaillance d'organes et à la mortalité de façon indépendante chez les traumatisés¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. D'autres facteurs confondants potentiels, tels la quantité et le type de réanimation liquidienne¹⁰⁷, l'utilisation de vasopresseurs¹⁰⁸⁻¹¹⁰, le type de chirurgie (clampage vasculaire de certains organes pour des fins d'hémostase, par exemple)¹¹¹ et les comorbidités des patients¹¹² ont tous été associés au pronostic des polytraumatisés. De plus, il est important de mentionner que les véritables valeurs d'acide urique de base des patients, assumées comme étant proches des dernières valeurs obtenues, demeurent non-mesurées. Cependant, cette faiblesse du dessin de notre étude ne peut être résolue, étant donné le caractère aigu et imprévisible d'un traumatisme. Finalement, les patients avec un SOFA \geq 6, et un plus haut taux d'acide urique, avaient également une créatinine plus élevée en moyenne; la diminution de l'excrétion rénale d'acide urique peut expliquer des taux circulants plus élevés d'acide urique. Lors des analyses finales de la cohorte, nous prévoyons prendre en compte ce facteur confondant dans la régression de facteurs prédisposant initiaux, ainsi que de comparer les scores SOFA sans la composante rénale.

Malgré ces limitations, nos trouvailles demeurent concordantes avec la littérature actuelle. En effet, plusieurs études ont investigué l'acide urique en circulation, comme potentiel biomarqueur

prédictif de différents issues cliniques; ceci, au sein de différentes populations traitées aux soins intensifs où l'hypoxie cellulaire et l'ischémie-reperfusion sont prédominantes^{87,95,96,113-116}. Chez une cohorte prospective atteinte de sepsis sévère (144 patients), l'étude d'Akbar et al a démontré une association significative entre l'insuffisance rénale aïgue et l'hyperuricémie (définie par $> 416 \mu\text{mol/L}$) à l'admission aux soins intensifs. Il y avait également une corrélation positive significative entre le score APACHE II et les niveaux d'acide urique à l'admission, de même qu'une tendance non-significative vers un risque d'ARDS accru chez les patients avec une hyperuricémie⁹⁵. À l'aide d'une cohorte rétrospective de 471 patients atteints d'un sepsis sévère, l'étude de Zhu et al a étudié le potentiel prédictif de l'acide urique en circulation mesuré dans les premières 24h suivant l'admission aux soins intensifs. En excluant les patients présentant des facteurs confondants connus (insuffisance rénale, traumatisme, diabète, hypertension), les niveaux d'acide urique mesurés à l'admission ne semblaient pas être associé aux issues cliniques¹¹³. L'acide urique a également été étudié comme facteur pronostic potentiel chez les patients atteints d'ARDS. En sélectionnant une cohorte rétrospective de patients atteints d'ARDS sous ventilation mécanique et en appariant leur cohorte par coefficients de propension, l'étude de Lee et al a démontré une diminution de la mortalité intra-hospitalière chez les patients avec de bas niveaux d'acide urique ($<178 \mu\text{mol/L}$), mesurés 18-24h suivant le début de la ventilation mécanique (OR = 0.254, 95% CI [0.068-0.954], ajusté pour : âge, diabète, alcool, cirrhose, ARDS indirect [sans insulte pulmonaire primaire], scores APACHE II et SOFA, FIO₂, pressions de ventilations, compliance pulmonaire, et hémodialyse continue). Le modèle multivarié démontre que seuls l'acide urique, la FIO₂ et l'hémodialyse continue étaient associés à la mortalité intra-hospitalière de façon indépendante, et non les facteurs traditionnels, tels les scores APACHE II et SOFA, l'âge et les comorbidités⁹⁶. Chez 33 patients atteints d'ARDS primaire recrutés prospectivement, Elshafey et

al a démontré qu'un seuil d'acide urique de $> 500 \mu\text{mol/L}$ à l'admission aux soins intensifs pouvait prédire la mortalité avec une sensibilité de 89% et une spécificité de 80% ($p < 0.001$). Or, ces valeurs étaient près des valeurs prédictive du ratio $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ rapportées par cette même cohorte (sensibilité et spécificité de 100% et 83%, respectivement), qui est traditionnellement utilisé comme valeur pronostique en ARDS⁸⁷. Ces études impliquent donc l'acide urique comme facteur pronostique indépendant chez les patients atteints d'ARDS sévère, mais souffrent de méthodologies faibles^{87,96}. Fait intéressant, surtout dans le contexte du COVID-19 qui sévit au moment d'écrire ce mémoire, l'étude de Wu et al a démontré l'inverse chez les patients atteints du Syndrome de détresse Respiratoire Aigu Sévère (SRAS, pandémie au début des années 2000), où de bas niveaux d'acide urique étaient associés à une augmentation du risque « d'issus catastrophiques », définis par un décès ou une nécessité d'intubation. Les cytokines pro-inflammatoires, telles l'IL-6, l'IL-8 et le TNF-alpha étaient corrélées positivement avec l'excrétion d'acide urique et négativement avec la concentration sérique d'acide urique chez ces patients. Ces trouvailles, complètement opposées à l'étude de Lee et al⁹⁶, peuvent s'expliquer par plusieurs hypothèses : 1) il est possible que les mécanismes d'ARDS, qu'il soit causé par une condition virale, bactérienne, ou inflammatoire soient différents et n'influencent pas les niveaux d'acide urique de la même façon; 2) l'étude ne fait pas mention de la sévérité initiale du SRAS ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$), ni de certaines caractéristiques de base essentielles des patients (comorbidités), mis à part l'âge et le sexe; 3) bien que les fractions d'excrétion du sodium soient similaires entre les deux groupes, l'étude ne fait pas mention de la quantité de réanimation liquidienne reçue, laquelle peut définitivement influencer les niveaux d'acide urique et influencer négativement le pronostic des patients avec une pathologie respiratoire aigue¹¹⁷.

Cependant, lorsque les études ne ciblent pas une population atteinte d'une pathologie spécifique, ces résultats deviennent non-reproductibles. L'étude de Chen et al a utilisé une cohorte rétrospective de 2123 patients admis aux soins intensifs avec différentes pathologies. 1112 patients ont été appariés selon un score de propension et divisés en patients survivants vs décédés (556 patients par groupe). En contrôlant pour les comorbidités et le *Simplified Acute Physiology Score II (SAPS II)*, les niveaux d'acide urique à l'admission ne présentaient aucun facteur pronostic significatif¹¹⁴. De façon analogue aux études portant sur l'ARDS, Aminiahidashti et al a utilisé une cohorte prospective de 120 patients admis aux soins intensifs et a démontré une association entre de hauts taux d'acide urique et le besoin de ventilation mécanique, sans association significative avec la mortalité¹¹⁵. L'étude de Srivastava et al visait à déterminer l'impact de l'acide urique sur le développement et la récupération de l'insuffisance rénale aigue. Pour ce faire, deux cohortes prospectives ont été recrutées : 208 patients sans insuffisance rénale aigue à l'admission et 250 patients avec insuffisance rénale aiguë. Au sein de la première cohorte, visant à évaluer l'impact de l'acide urique sur le développement de l'insuffisance rénale aigue, les niveaux d'acide urique étaient associés à une augmentation du risque d'insuffisance rénale aigue, sans demeurer significatif en contrôlant pour les facteurs confondants (Score APACHE II, âge, diabète). La deuxième cohorte, visant à évaluer la récupération rénale et la mortalité, n'a pas démontré d'association entre les niveaux d'acide urique et la mortalité à court/moyen terme ou le besoin de remplacement rénal à 28 jours¹¹⁸.

Ces études demeurent limitées par plusieurs facteurs. Premièrement, la plupart n'avait pas de critère strict pour la mesure de l'acide urique initiale, et ce qui était considéré comme le niveau d'acide urique « initial » pouvait aller jusqu'à un prélèvement effectué 72h suivant l'admission¹¹⁸.

Or, plusieurs phénomènes extrêmement dynamiques se produisent lors de la prise en charge d'un patient aux soins intensifs, incluant la gestion de la volémie, la variation de la fonction rénale, du statut hémodynamique et respiratoire, et tout cela est susceptible d'affecter les valeurs d'acide urique non pas de jours en jours, mais d'heures en heures. Ceci est bien démontré par nos courbes individuelles d'acide urique, où la variation est la plus marquée dans les premières 48 heures suivant le traumatisme (Fig 4.4). Il est donc possible que le délai établi comme étant acceptable pour effectuer les prélèvements initiaux était trop libéral et ait mené à une hétérogénéité temporelle des valeurs comparées. Deuxièmement, ces études ne considèrent pas la variation de l'acide urique dans le temps comme facteur pronostique potentiel. En accord avec cela, l'étude de Pehlivanlar-Kucuk et al est la seule à avoir considéré la variation de l'acide urique sérique dans le temps pour effectuer leurs analyses. Sans surprise, leur cohorte prospective de 128 patients admis aux soins intensifs a démontré que les niveaux d'acide urique à l'admission n'influençaient pas la mortalité ni pronostic des patients. Cependant, un ratio de 1.5 et plus entre les deux derniers prélèvements d'acide urique (ratio $\text{Acide Urique}_{\text{dernier}}/\text{Acide Urique}_{\text{avant-dernier}}$) avait une spécificité de 96% et une valeur prédictive positive de mortalité de 92.6%¹¹⁶ au sein de cette cohorte. En dépit d'une faible sensibilité (23%), la spécificité et la valeur prédictive positive de 96% et 92.6%, respectivement, sont des données cliniquement utiles. Ces données suggèrent que la variation d'acide urique en circulation dans le temps présente probablement une meilleure valeur pronostique qu'une seule valeur isolée. Troisièmement, les études portant sur les populations de soins intensifs en général, sans cibler de pathologie spécifique (exemple : sepsis, ARDS, polytrauma, hémorragie) se retrouvent avec des populations hétérogènes où les mécanismes d'ischémie-reperfusion, de stress oxydatif et de défaillance d'organes sont différents. Qui plus est, ces études manquent souvent de puissance pour établir des sous-groupes significatifs. Dans ces conditions, il devient difficile de

trouver de nouveaux biomarqueurs pronostiques et de nouvelles cibles thérapeutiques; cela illustre l'importance de cibler une population spécifique présentant une physiologie similaire.

Chapitre 5 Conclusion

Ce mémoire présente un aspect expérimental préclinique et clinique, posant les preuves de concept que l'acide urique représente une cible potentiellement modifiable suite au choc hémorragique traumatique. En utilisant un modèle murin de choc hémorragique et en ciblant l'acide urique pendant la réanimation, les données animales suggèrent que l'acide urique contribue à l'atteinte hépatocellulaire en altérant des cascades régulatrices d'inflammation et d'apoptose. De plus, la destruction pharmacologique de l'acide urique prévient l'altération de la barrière intestinale et la translocation systémique de produits bactériens (endotoxémie), générateurs de défaillance d'organe au sein de plusieurs populations de soins critiques. Ces phénomènes ont été démontrés en utilisant une version recombinante de l'enzyme urate oxydase, métabolisant l'acide urique en circulation et administrée lors de la phase de réanimation; cette stratégie est compatible avec la réanimation clinique des polytraumatisés en choc hémorragique. En ce qui a trait aux limitations de notre modèle animal, décrites plus en détail dans le chapitre 3, ceci concerne essentiellement l'illustration imparfaite d'un polytraumatisme, vu la seule composante hémorragique appliquée.

Le volet clinique de ce mémoire suggère que les observations animales s'accordent également avec la situation clinique du choc hémorragique traumatique. En effet, la cinétique de l'acide urique sérique suite au choc hémorragique traumatique s'est avérée reproductible dans l'ensemble

de la cohorte préliminaire. L'aire sous la courbe des premières 72h était associée à une augmentation du risque de défaillance d'organes subséquent, sans toutefois démontrer d'association indépendante, pour l'instant. Cependant, les limitations de cette étude de petite cohorte (décrites en détail dans la discussion du chapitre 4) sont essentiellement due à la nature pilote et exploratoire du dessin expérimental.

Ces résultats soutiendront les prochaines étapes de ce programme de recherche translationnel. Dans le but de considérer une étude interventionnelle, la valeur prédictive de l'acide urique sérique pour le risque de développement d'une défaillance d'organes (et possiblement du sepsis) devrait être mieux établie. L'approche exploratoire de notre étude de cohorte le suggère, mais ne peut le prouver définitivement. Néanmoins, ces données de faisabilité permettent d'envisager : 1) une autre étude observationnelle, avec des prélèvements moins fréquents (par exemple: initial, à 24 h puis 72h) et un nombre plus élevé de patients, permettant de déterminer l'impact sur certains issus cliniques, tels la défaillance d'organes et le risque de sepsis; 2) une étude pilote interventionnelle, appliquée précocement après la réanimation. Cette dernière nécessiterait un recrutement multicentrique (nombre élevé de patients), étant donné l'hétérogénéité de la population des traumatisés et le nombre de facteurs confondants; 3) une autre étude translationnelle mesurant l'impact des niveaux d'acide urique sur la libération d'autres alarmines, la magnitude du *SIRS* et du phénotype immunosuppresseur (*CARS*) qui en découle. Parallèlement, l'intérêt de notre approche dans d'autres domaines affectés par l'ischémie-reperfusion, qu'elle soit systémique (choc septique, hémorragique, cardiogénique) ou locale (transplantation, ACV, infarctus du myocarde), pourrait être soulevé.

En conclusion, l'acide urique représente un médiateur modifiable afin de mitiger les conséquences de l'ischémie-reperfusion suite au choc hémorragique. Son potentiel en tant que biomarqueur et cible thérapeutique, chez une population de polytraumatisés en choc hémorragique, mérite d'être investigué davantage.

Références bibliographiques

1. Moore L, Evans D, Hameed SM, et al. Mortality in Canadian Trauma Systems: A Multicenter Cohort Study. *Ann Surg.* 2017;265(1):212-217.
2. Sobrino J, Shafi S. Timing and causes of death after injuries. *Proc (Bayl Univ Med Cent).* 2013;26(2):120-123.
3. Shepherd JM, Cole E, Brohi K. Contemporary Patterns of Multiple Organ Dysfunction in Trauma. *Shock (Augusta, Ga).* 2017;47(4):429-435.
4. Manson J, Thiernemann C, Brohi K. Trauma alarmins as activators of damage-induced inflammation. *Br J Surg.* 2012;99 Suppl 1:12-20.
5. Hranjec T, Swenson BR, Dossett LA, et al. Diagnosis-dependent relationships between cytokine levels and survival in patients admitted for surgical critical care. *J Am Coll Surg.* 2010;210(5):833-844, 845-836.
6. Jastrow KM, 3rd, Gonzalez EA, McGuire MF, et al. Early cytokine production risk stratifies trauma patients for multiple organ failure. *J Am Coll Surg.* 2009;209(3):320-331.
7. Partrick DA, Moore EE, Moore FA, Biffl WL, Barnett CC, Jr. Release of anti-inflammatory mediators after major torso trauma correlates with the development of postinjury multiple organ failure. *Am J Surg.* 1999;178(6):564-569.
8. Lenz A, Franklin GA, Cheadle WG. Systemic inflammation after trauma. *Injury.* 2007;38(12):1336-1345.
9. El Ridi R, Tallima H. Physiological functions and pathogenic potential of uric acid: A review. *J Adv Res.* 2017;8(5):487-493.
10. Howard SC, Jones DP, Pui CH. The tumor lysis syndrome. *N Engl J Med.* 2011;364(19):1844-1854.
11. Crowell JW, Jones CE, Smith EE. Effect of allopurinol on hemorrhagic shock. *The American journal of physiology.* 1969;216(4):744-748.
12. Cowser MK, Jr., Carrier O, Jr., Crowell JW. The effect of hemorrhagic shock on blood uric acid level. *Can J Physiol Pharmacol.* 1966;44(5):861-864.
13. Gilbert K, Rousseau G, Bouchard C, et al. Caspase- (8/3) Activation and Organ Inflammation in a Rat Model of Resuscitated Hemorrhagic Shock: A Role for Uric Acid. *The journal of trauma and acute care surgery.* 2018.

14. Flynn WJ, Jr., Pilati D, Hoover EL. Effect of allopurinol on venous endothelial dysfunction after resuscitated hemorrhagic shock. *International journal of surgical investigation*. 1999;1(1):11-18.
15. Flynn WJ, Jr., Pilati D, Hoover EL. Xanthine oxidase inhibition prevents mesenteric blood flow deficits after resuscitated hemorrhagic shock by preserving endothelial function. *The Journal of surgical research*. 1997;68(2):175-180.
16. Flynn WJ, Jr., Hoover EL. Allopurinol plus standard resuscitation preserves hepatic blood flow and function following hemorrhagic shock. *The Journal of trauma*. 1994;37(6):956-961.
17. Mannion D, Fitzpatrick GJ, Feeley M. Role of xanthine oxidase inhibition in survival from hemorrhagic shock. *Circulatory shock*. 1994;42(1):39-43.
18. Matsumura F, Yamaguchi Y, Goto M, et al. Xanthine oxidase inhibition attenuates kupffer cell production of neutrophil chemoattractant following ischemia-reperfusion in rat liver. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 1998;28(6):1578-1587.
19. Tsukada K, Hasegawa T, Tsutsumi S, et al. Effect of uric acid on liver injury during hemorrhagic shock. *Surgery*. 2000;127(4):439-446.
20. Matsumura F, Yamaguchi Y, Goto M, et al. Xanthine oxidase inhibition attenuates kupffer cell production of neutrophil chemoattractant following ischemia-reperfusion in rat liver. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 1998;28(6):1578-1587.
21. Cannon JW. Hemorrhagic Shock. *N Engl J Med*. 2018;378(4):370-379.
22. Peitzman AB, Billiar TR, Harbrecht BG, Kelly E, Udekwu AO, Simmons RL. Hemorrhagic shock. *Curr Probl Surg*. 1995;32(11):925-1002.
23. Palmer L, Martin L. Traumatic coagulopathy--part 1: Pathophysiology and diagnosis. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*. 2014;24(1):63-74.
24. Lu S, Aguilar A, Subramani K, Poulouse N, Ayub A, Raju R. Alteration of cytokine profile following hemorrhagic shock. *Cytokine*. 2016;81:35-38.
25. Brochner AC, Toft P. Pathophysiology of the systemic inflammatory response after major accidental trauma. *Scandinavian journal of trauma, resuscitation and emergency medicine*. 2009;17:43.
26. Yang Z, Aderemi OA, Zhao Q, et al. Early Complement and Fibrinolytic Activation in a Rat Model of Blast-Induced Multi-Organ Damage. *Mil Med*. 2019;184(Suppl 1):282-290.
27. Campbell JC, Li Y, van Amersfoort E, et al. C1 Inhibitor Limits Organ Injury and Prolongs Survival in Swine Subjected to Battlefield Simulated Injury. *Shock (Augusta, Ga)*. 2016;46(3 Suppl 1):177-188.
28. Huber-Lang M, Gebhard F, Schmidt CQ, Palmer A, Denk S, Wiegner R. Complement therapeutic strategies in trauma, hemorrhagic shock and systemic inflammation - closing Pandora's box? *Semin Immunol*. 2016;28(3):278-284.
29. Burk AM, Martin M, Flierl MA, et al. Early complementopathy after multiple injuries in humans. *Shock (Augusta, Ga)*. 2012;37(4):348-354.
30. Niles SE, McLaughlin DF, Perkins JG, et al. Increased mortality associated with the early coagulopathy of trauma in combat casualties. *The Journal of trauma*. 2008;64(6):1459-1463; discussion 1463-1455.
31. Chang R, Cardenas JC, Wade CE, Holcomb JB. Advances in the understanding of trauma-induced coagulopathy. *Blood*. 2016;128(8):1043-1049.

32. Darlington DN, Gonzales MD, Craig T, Dubick MA, Cap AP, Schwacha MG. Trauma-Induced Coagulopathy Is Associated with a Complex Inflammatory Response in the Rat. *Shock (Augusta, Ga)*. 2015;44 Suppl 1:129-137.
33. Dobson GP, Letson HL, Sharma R, Sheppard FR, Cap AP. Mechanisms of early trauma-induced coagulopathy: The clot thickens or not? *The journal of trauma and acute care surgery*. 2015;79(2):301-309.
34. Gruen RL, Brohi K, Schreiber M, et al. Haemorrhage control in severely injured patients. *Lancet*. 2012;380(9847):1099-1108.
35. van Hinsbergh VW. Endothelium--role in regulation of coagulation and inflammation. *Semin Immunopathol*. 2012;34(1):93-106.
36. Cohen MJ, Brohi K, Calfee CS, et al. Early release of high mobility group box nuclear protein 1 after severe trauma in humans: role of injury severity and tissue hypoperfusion. *Critical care (London, England)*. 2009;13(6):R174.
37. Xu L, Zhao K, Shen X, et al. Blockade of Extracellular High-Mobility Group Box 1 Attenuates Systemic Inflammation and Coagulation Abnormalities in Rats with Acute Traumatic Coagulopathy. *Med Sci Monit*. 2016;22:2561-2570.
38. Holcomb JB, Tilley BC, Baraniuk S, et al. Transfusion of plasma, platelets, and red blood cells in a 1:1:1 vs a 1:1:2 ratio and mortality in patients with severe trauma: the PROPPR randomized clinical trial. *Jama*. 2015;313(5):471-482.
39. Shakur H, Roberts I, Bautista R, et al. Effects of tranexamic acid on death, vascular occlusive events, and blood transfusion in trauma patients with significant haemorrhage (CRASH-2): a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2010;376(9734):23-32.
40. Cannon JW, Khan MA, Raja AS, et al. Damage control resuscitation in patients with severe traumatic hemorrhage: A practice management guideline from the Eastern Association for the Surgery of Trauma. *The journal of trauma and acute care surgery*. 2017;82(3):605-617.
41. Wu MY, Yiang GT, Liao WT, et al. Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. *Cell Physiol Biochem*. 2018;46(4):1650-1667.
42. Dorweiler B, Pruefer D, Andradi TB, et al. Ischemia-Reperfusion Injury : Pathophysiology and Clinical Implications. *Eur J Trauma Emerg Surg*. 2007;33(6):600-612.
43. Slegtenhorst BR, Dor FJ, Rodriguez H, Voskuil FJ, Tullius SG. Ischemia/reperfusion Injury and its Consequences on Immunity and Inflammation. *Curr Transplant Rep*. 2014;1(3):147-154.
44. Jassem W, Heaton ND. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury in organ transplantation. *Kidney Int*. 2004;66(2):514-517.
45. Singh R, Letai A, Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(3):175-193.
46. Rider P, Voronov E, Dinarello CA, Apte RN, Cohen I. Alarmins: Feel the Stress. *J Immunol*. 2017;198(4):1395-1402.
47. Peltz ED, Moore EE, Eckels PC, et al. HMGB1 is markedly elevated within 6 hours of mechanical trauma in humans. *Shock (Augusta, Ga)*. 2009;32(1):17-22.
48. Yang R, Miki K, Oksala N, et al. Bile high-mobility group box 1 contributes to gut barrier dysfunction in experimental endotoxemia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009;297(2):R362-369.

49. Yang R, Harada T, Mollen KP, et al. Anti-HMGB1 neutralizing antibody ameliorates gut barrier dysfunction and improves survival after hemorrhagic shock. *Mol Med.* 2006;12(4-6):105-114.
50. Andersson U, Tracey KJ. HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:139-162.
51. Sodhi CP, Jia H, Yamaguchi Y, et al. Intestinal Epithelial TLR-4 Activation Is Required for the Development of Acute Lung Injury after Trauma/Hemorrhagic Shock via the Release of HMGB1 from the Gut. *J Immunol.* 2015;194(10):4931-4939.
52. Zhang Q, Raoof M, Chen Y, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature.* 2010;464(7285):104-107.
53. Simmons JD, Lee YL, Mulekar S, et al. Elevated levels of plasma mitochondrial DNA DAMPs are linked to clinical outcome in severely injured human subjects. *Ann Surg.* 2013;258(4):591-596; discussion 596-598.
54. Yamanouchi S, Kudo D, Yamada M, Miyagawa N, Furukawa H, Kushimoto S. Plasma mitochondrial DNA levels in patients with trauma and severe sepsis: time course and the association with clinical status. *J Crit Care.* 2013;28(6):1027-1031.
55. Zhang Q, Itagaki K, Hauser CJ. Mitochondrial DNA is released by shock and activates neutrophils via p38 map kinase. *Shock (Augusta, Ga).* 2010;34(1):55-59.
56. Aswani A, Manson J, Itagaki K, et al. Scavenging Circulating Mitochondrial DNA as a Potential Therapeutic Option for Multiple Organ Dysfunction in Trauma Hemorrhage. *Front Immunol.* 2018;9:891.
57. Kojima M, Gimenes-Junior JA, Langness S, et al. Exosomes, not protein or lipids, in mesenteric lymph activate inflammation: Unlocking the mystery of post-shock multiple organ failure. *The journal of trauma and acute care surgery.* 2017;82(1):42-50.
58. Babelova A, Moreth K, Tsalastra-Greul W, et al. Biglycan, a danger signal that activates the NLRP3 inflammasome via toll-like and P2X receptors. *J Biol Chem.* 2009;284(36):24035-24048.
59. Joly P, Marshall JC, Tessier PA, et al. S100A8/A9 and sRAGE kinetic after polytrauma; an explorative observational study. *Scandinavian journal of trauma, resuscitation and emergency medicine.* 2017;25(1):114.
60. Zhao B, Fei J, Chen Y, et al. Pharmacological preconditioning with vitamin C attenuates intestinal injury via the induction of heme oxygenase-1 after hemorrhagic shock in rats. *PloS one.* 2014;9(6):e99134.
61. Van PY, Hamilton GJ, Kremenevskiy IV, et al. Lyophilized plasma reconstituted with ascorbic acid suppresses inflammation and oxidative DNA damage. *J Trauma.* 2011;71(1):20-24; discussion 24-25.
62. Hamilton GJ, Van PY, Differding JA, et al. Lyophilized plasma with ascorbic acid decreases inflammation in hemorrhagic shock. *The Journal of trauma.* 2011;71(2):292-297; discussion 297-298.
63. Langlois PL, Manzanares W, Adhikari NKJ, et al. Vitamin C Administration to the Critically Ill: A Systematic Review and Meta-Analysis. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2019;43(3):335-346.
64. Nathens AB, Neff MJ, Jurkovich GJ, et al. Randomized, prospective trial of antioxidant supplementation in critically ill surgical patients. *Ann Surg.* 2002;236(6):814-822.

65. Edwards P, Arango M, Balica L, et al. Final results of MRC CRASH, a randomised placebo-controlled trial of intravenous corticosteroid in adults with head injury-outcomes at 6 months. *Lancet*. 2005;365(9475):1957-1959.
66. Roquilly A, Mahe PJ, Seguin P, et al. Hydrocortisone therapy for patients with multiple trauma: the randomized controlled HYPOLYTE study. *Jama*. 2011;305(12):1201-1209.
67. Maier M, Strobele H, Voges J, Bauer C, Marzi I. Attenuation of leukocyte adhesion by recombinant TNF-binding protein after hemorrhagic shock in the rat. *Shock (Augusta, Ga)*. 2003;19(5):457-461.
68. Marzi I, Bauer M, Secchi A, Bahrami S, Redi H, Schlag G. Effect of anti-tumor necrosis factor alpha on leukocyte adhesion in the liver after hemorrhagic shock: an intravital microscopic study in the rat. *Shock (Augusta, Ga)*. 1995;3(1):27-33.
69. Cagliani J, Yang WL, McGinn JT, Wang Z, Wang P. Anti-interferon-alpha receptor 1 antibodies attenuate inflammation and organ injury following hemorrhagic shock. *The journal of trauma and acute care surgery*. 2019;86(5):881-890.
70. van Griensven M, Ricklin D, Denk S, et al. Protective Effects of the Complement Inhibitor Compstatin CP40 in Hemorrhagic Shock. *Shock (Augusta, Ga)*. 2019;51(1):78-87.
71. Dalle Lucca JJ, Li Y, Simovic M, et al. Effects of C1 inhibitor on tissue damage in a porcine model of controlled hemorrhage. *Shock (Augusta, Ga)*. 2012;38(1):82-91.
72. Karasu E, Nilsson B, Kohl J, Lambris JD, Huber-Lang M. Targeting Complement Pathways in Polytrauma- and Sepsis-Induced Multiple-Organ Dysfunction. *Front Immunol*. 2019;10:543.
73. Tschoeke SK, Ertel W. Immunoparalysis after multiple trauma. *Injury*. 2007;38(12):1346-1357.
74. Vanzant EL, Lopez CM, Ozrazgat-Baslanti T, et al. Persistent inflammation, immunosuppression, and catabolism syndrome after severe blunt trauma. *The journal of trauma and acute care surgery*. 2014;76(1):21-29; discussion 29-30.
75. Thompson KB, Krispinsky LT, Stark RJ. Late immune consequences of combat trauma: a review of trauma-related immune dysfunction and potential therapies. *Mil Med Res*. 2019;6(1):11.
76. Chan JK, Roth J, Oppenheim JJ, et al. Alarmins: awaiting a clinical response. *J Clin Invest*. 2012;122(8):2711-2719.
77. Borghi C. The management of hyperuricemia: back to the pathophysiology of uric acid. *Curr Med Res Opin*. 2017;33(sup3):1-4.
78. Cortese F, Giordano P, Scicchitano P, et al. Uric acid: from a biological advantage to a potential danger. A focus on cardiovascular effects. *Vascul Pharmacol*. 2019;120:106565.
79. Sautin YY, Johnson RJ. Uric acid: the oxidant-antioxidant paradox. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2008;27(6):608-619.
80. Liu D, Yun Y, Yang D, et al. What Is the Biological Function of Uric Acid? An Antioxidant for Neural Protection or a Biomarker for Cell Death. *Dis Markers*. 2019;2019:4081962.
81. Yu ZF, Bruce-Keller AJ, Goodman Y, Mattson MP. Uric acid protects neurons against excitotoxic and metabolic insults in cell culture, and against focal ischemic brain injury in vivo. *J Neurosci Res*. 1998;53(5):613-625.
82. Wang YF, Li JX, Sun XS, Lai R, Sheng WL. High serum uric acid levels are a protective factor against unfavourable neurological functional outcome in patients with ischaemic stroke. *J Int Med Res*. 2018;46(5):1826-1838.

83. Latourte A, Bardin T, Richette P. Uric acid and cognitive decline: a double-edge sword? *Curr Opin Rheumatol*. 2018;30(2):183-187.
84. Shimada M, Johnson RJ, May WS, Jr., et al. A novel role for uric acid in acute kidney injury associated with tumour lysis syndrome. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24(10):2960-2964.
85. Bartziokas K, Papaioannou AI, Loukides S, et al. Serum uric acid as a predictor of mortality and future exacerbations of COPD. *Eur Respir J*. 2014;43(1):43-53.
86. de Oliveira EP, Burini RC. High plasma uric acid concentration: causes and consequences. *Diabetol Metab Syndr*. 2012;4:12.
87. Elshafey M, Mossalam AMA, Makharitha MY, Elewa A. Prognostic role of serum uric acid in acute respiratory distress syndrome patients: a preliminary study. *Egyptian Journal of Chest Diseases and Tuberculosis*. 2015;64(1):197-202.
88. Verzola D, Ratto E, Villaggio B, et al. Uric acid promotes apoptosis in human proximal tubule cells by oxidative stress and the activation of NADPH oxidase NOX 4. *PLoS one*. 2014;9(12):e115210.
89. Xiao J, Zhang XL, Fu C, et al. Soluble uric acid increases NALP3 inflammasome and interleukin-1 β expression in human primary renal proximal tubule epithelial cells through the Toll-like receptor 4-mediated pathway. *International journal of molecular medicine*. 2015;35(5):1347-1354.
90. Gasse P, Riteau N, Charron S, et al. Uric acid is a danger signal activating NALP3 inflammasome in lung injury inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;179(10):903-913.
91. Crisan TO, Cleophas MCP, Novakovic B, et al. Uric acid priming in human monocytes is driven by the AKT-PRAS40 autophagy pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(21):5485-5490.
92. Kanellis J, Watanabe S, Li JH, et al. Uric acid stimulates monocyte chemoattractant protein-1 production in vascular smooth muscle cells via mitogen-activated protein kinase and cyclooxygenase-2. *Hypertension*. 2003;41(6):1287-1293.
93. Rabadi MM, Kuo MC, Ghaly T, et al. Interaction between uric acid and HMGB1 translocation and release from endothelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012;302(6):F730-741.
94. Cai W, Duan XM, Liu Y, et al. Uric Acid Induces Endothelial Dysfunction by Activating the HMGB1/RAGE Signaling Pathway. *Biomed Res Int*. 2017;2017:4391920.
95. Akbar SR, Long DM, Hussain K, et al. Hyperuricemia: An Early Marker for Severity of Illness in Sepsis. *International journal of nephrology*. 2015;2015:301021.
96. Lee HW, Choi SM, Lee J, et al. Serum Uric Acid Level as a Prognostic Marker in Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome. *J Intensive Care Med*. 2019;34(5):404-410.
97. Allan G, Cambridge D, Lee-Tsang-Tan L, Van Way CW, Whiting MV. The protective action of allopurinol in an experimental model of haemorrhagic shock and reperfusion. *British journal of pharmacology*. 1986;89(1):149-155.
98. Cunningham SK, Keaveny TV. Effect of a xanthine oxidase inhibitor on adenine nucleotide degradation in hemorrhagic shock. *Eur Surg Res*. 1978;10(5):305-313.
99. Gilbert K, Rousseau G, Bouchard C, et al. Caspase-(8/3) activation and organ inflammation in a rat model of resuscitated hemorrhagic shock: A role for uric acid. *The journal of trauma and acute care surgery*. 2019;86(3):431-439.

100. Kono H, Chen CJ, Ontiveros F, Rock KL. Uric acid promotes an acute inflammatory response to sterile cell death in mice. *J Clin Invest.* 2010;120(6):1939-1949.
101. Charbonney E, Tsang JY, Li Y, et al. Endotoxemia Following Multiple Trauma: Risk Factors and Prognostic Implications. *Crit Care Med.* 2016;44(2):335-341.
102. Biglari B, Swing T, Child C, et al. A pilot study on temporal changes in IL-1beta and TNF-alpha serum levels after spinal cord injury: the serum level of TNF-alpha in acute SCI patients as a possible marker for neurological remission. *Spinal Cord.* 2015;53(7):510-514.
103. Baez AA. Development of multiple organ dysfunction syndrome in older and young adult trauma patients. *Int J Crit Illn Inj Sci.* 2019;9(1):21-24.
104. Manikis P, Jankowski S, Zhang H, Kahn RJ, Vincent JL. Correlation of serial blood lactate levels to organ failure and mortality after trauma. *Am J Emerg Med.* 1995;13(6):619-622.
105. Richards JE, Scalea TM, Mazzeffi MA, Rock P, Galvagno SM, Jr. Does Lactate Affect the Association of Early Hyperglycemia and Multiple Organ Failure in Severely Injured Blunt Trauma Patients? *Anesth Analg.* 2018;126(3):904-910.
106. Odom SR, Howell MD, Silva GS, et al. Lactate clearance as a predictor of mortality in trauma patients. *The journal of trauma and acute care surgery.* 2013;74(4):999-1004.
107. Brakenridge SC, Phelan HA, Henley SS, et al. Early blood product and crystalloid volume resuscitation: risk association with multiple organ dysfunction after severe blunt traumatic injury. *The Journal of trauma.* 2011;71(2):299-305.
108. Sperry JL, Minei JP, Frankel HL, et al. Early use of vasopressors after injury: caution before constriction. *The Journal of trauma.* 2008;64(1):9-14.
109. Bougle A, Harrois A, Duranteau J. Resuscitative strategies in traumatic hemorrhagic shock. *Ann Intensive Care.* 2013;3(1):1.
110. Hylands M, Toma A, Beaudoin N, et al. Early vasopressor use following traumatic injury: a systematic review. *BMJ Open.* 2017;7(11):e017559.
111. Sadeghi M, Dogan EM, Karlsson C, et al. Total resuscitative endovascular balloon occlusion of the aorta causes inflammatory activation and organ damage within 30 minutes of occlusion in normovolemic pigs. *BMC Surg.* 2020;20(1):43.
112. Wang CY, Chen YC, Chien TH, et al. Impact of comorbidities on the prognoses of trauma patients: Analysis of a hospital-based trauma registry database. *PloS one.* 2018;13(3):e0194749.
113. Zhu HC, Cao RL. The relationship between serum levels of uric acid and prognosis of infection in critically ill patients. *World J Emerg Med.* 2012;3(3):186-190.
114. Chen Q, Huang K, Li L, et al. Serum uric acid on admission cannot predict long-term outcome of critically ill patients: a retrospective cohort study. *Ther Clin Risk Manag.* 2018;14:1347-1359.
115. Aminiahidashti H, Bozorgi F, Mousavi SJ, Sedighi O, Gorji AM, Rashidian H. Serum Uric Acid Level in Relation to Severity of the Disease and Mortality of Critically Ill Patients. *J Lab Physicians.* 2017;9(1):42-46.
116. Pehlivanlar-Kucuk M, Kucuk AO, Ozturk CE, Er MC, Ulger F. The Association Between Serum Uric Acid Level and Prognosis in Critically Ill Patients, Uric Acid as a Prognosis Predictor. *Clin Lab.* 2018;64(9):1491-1500.
117. Wu VC, Huang JW, Hsueh PR, et al. Renal hypouricemia is an ominous sign in patients with severe acute respiratory syndrome. *Am J Kidney Dis.* 2005;45(1):88-95.
118. Srivastava A, Palsson R, Leaf DE, et al. Uric Acid and Acute Kidney Injury in the Critically Ill. *Kidney Medicine.* 2019;1(1):21-30.

