

L'Autophagie en réanimation

Michaël P. Casaer MD PhD



Sarah Derde PhD
Jan Gunst MD PhD
Greet Hermans MD PhD
Ilse Vanhorebeek MEng PhD

Greet Van den Berghe MD PhD



Katholieke Universiteit Leuven
Department of Cellular and Molecular Medicine
Intensive Care Medicine

Déclaration d'intérêts

- ✓ Subvention de recherche non-conditionnelle de Baxter_SA à la KULeuven pour l'étude: EPaNIC trial
- ✓ Bourse du Fonds de la Recherche Scientifique - Flandre (FWO)
- ✓ Fonds de la recherche clinique UZLeuven.
- ✓ Honoraires de conférencier de Baxter Belgique

L'Autophagie en réanimation

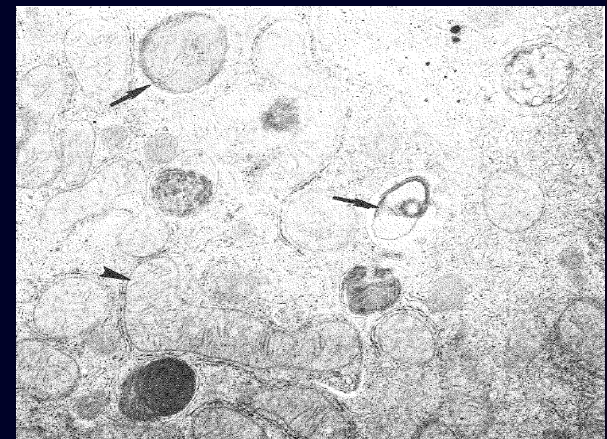


Contenu:

- Joueur clé dans la réanimation?
- Autophagie, hyperglycémie et nutrition
- Traduction dans la clinique?
- Résumé et perspectives

L'Autophagie en réanimation

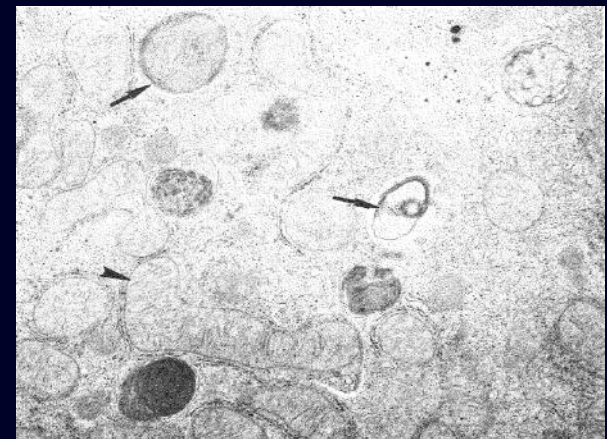
- Recherche Pub Med: “autophagy and (sepsis OR(critical illness) OR (organ failure))”
- 89 *hits*
- Tous publiés après 2000 sauf **un**



Toshihide S. et al. Lab. Invest. ; 1982

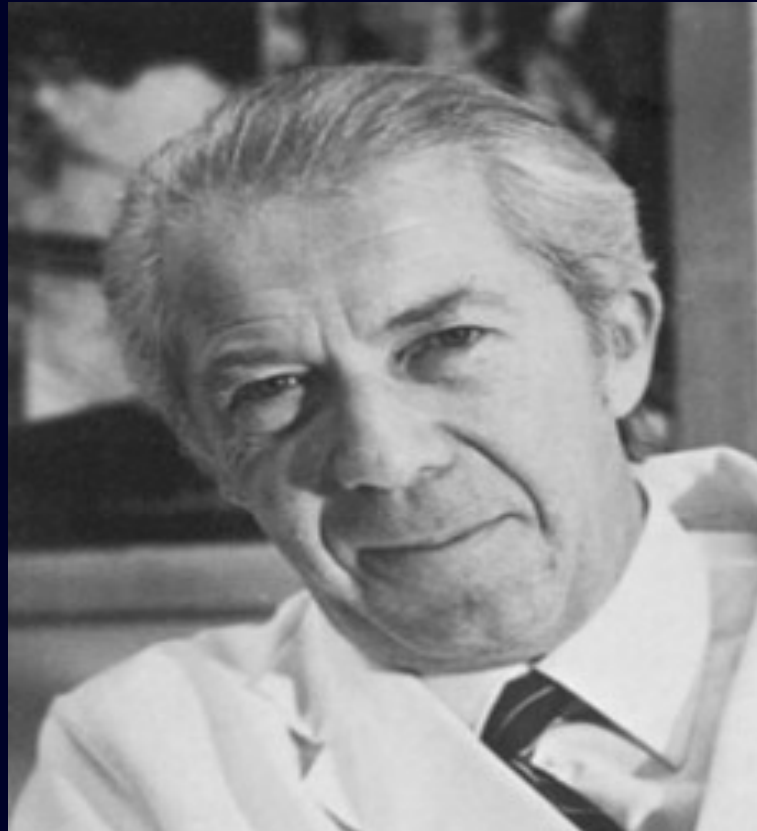
L'Autophagie en réanimation

- Recherche Pub Med: “autophagy and (sepsis OR(critical illness) OR (organ failure))”
- 89 *hits*
- Tous publiés après 2000 sauf **un**
- Filtre: “clinical trial”: **1 hit**
- **Travail en progrès**



Toshihide S. et al. Lab. Invest. ; 1982
Vanhorebeek I. et al. JCEM ; 2011

L'autophagie



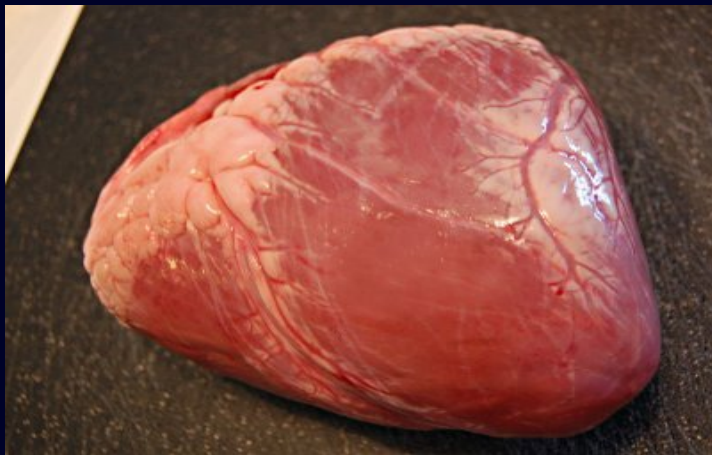
De Duve C. et al. Annu Rev Physiol ; 1966

Activation / inhibition de l'autophagie dans des modèles de maladie critique

M.P.C., K.U.Leuven



L'autophagie et le coeur?



- Cardiomyopathie liée à la desmine:
Élimination des protéines agrégées
- Insuffisance cardiaque hypertensive:
autophagie ++ → mitophagie excessive?
- Insuffisance cardiaque septique:

Rôle dans la **préservation et la récupération de la fonction cardiaque**
ou le contraire?

Rothermel BA. & Hill JA. Circulation Research ; 2008
Hsieh CH. et al. Annals Surgery ; 2011
Piquereau J. et al. Autophagy ; 2013
Subat T. et al. Free Radic. Biol. Med. ; 2012

L'autophagie et les cerveaux?

➤ Maladies neurodégénératives:
Rôle bien établi

➤ Traumatisme cérébral et

➤ Ischémie-réperfusion cérébrale:

L'autophagie est activée +++.
Activation favorable/nuisible?

➤ Défis méthodologiques:

Durée de vie des *knock-outs*
Visualisation des autophagosomes



L'autophagie et l'état septique?



- L'autophagie est impliquée dans l'élimination des micro organismes et la présentation des antigènes.
- L'Autophagie
 - évite les dégâts pulmonaires
 - réduit l'inflammation
 - provoque la coagulopathie et l'inflammation

Yuk JM et al. Exp Mol Med ; 2003

Shahnazari S et al. Curr Opin Microbiol ; 2011

Yen YT et al. Surgery ; 2013

Li W. Biochem Pharmacol. ; 2012

Kambas K. et al. PLOS one ; 2012

Autophagy in critical illness?

- Un rôle clé
- Les signaux des expérimentations s'opposent
- Modèles souvent de courte durée

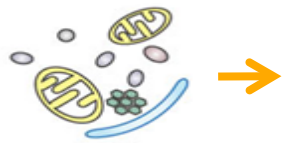
- Partie du **problème**, de la **solution** ou des deux?
- Dépend du moment, de l'organe de la "dose"?

L'analyse de l'autophagie en instantané



Autophagosome « snapshot »

Elimination des dégâts par l'autophagie



isolation
membrane

Atg factors (Atg1)
Beclin1
PI3K class III

Elimination des dégâts par l'autophagie



Atg factors (Atg1)

Beclin1

PI3K class III

Atg12

Atg5 →

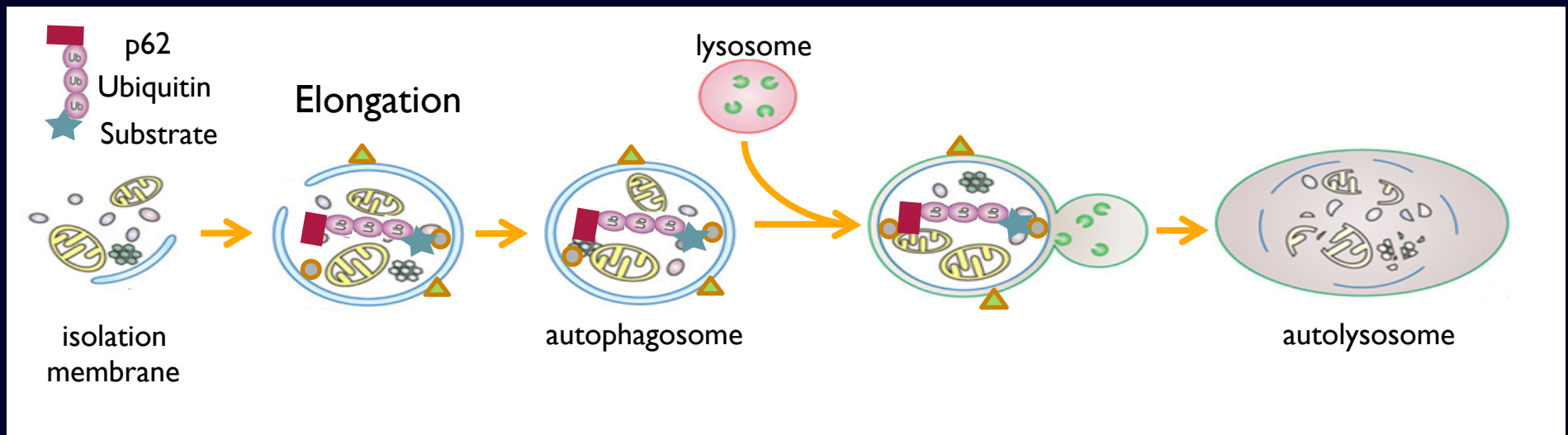
Atg16 →

Atg8
(LC3-I)

Atg12-5/16

Atg8-PE
(LC3-II)

Elimination des dégâts par l'autophagie



Atg factors (Atg1)

Beclin1

PI3K class III

Atg12

Atg5 →

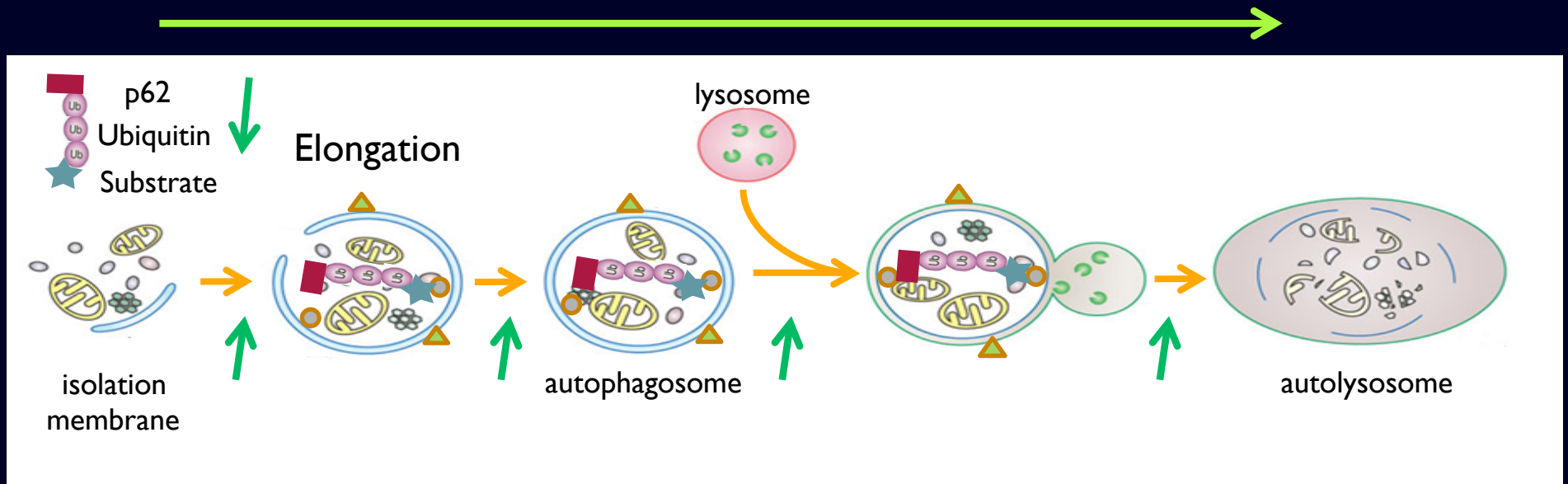
Atg16 →

Atg8
(LC3-I)

Atg12-5/16

Atg8-PE
(LC3-II)

L'autophagie **activée et continue**



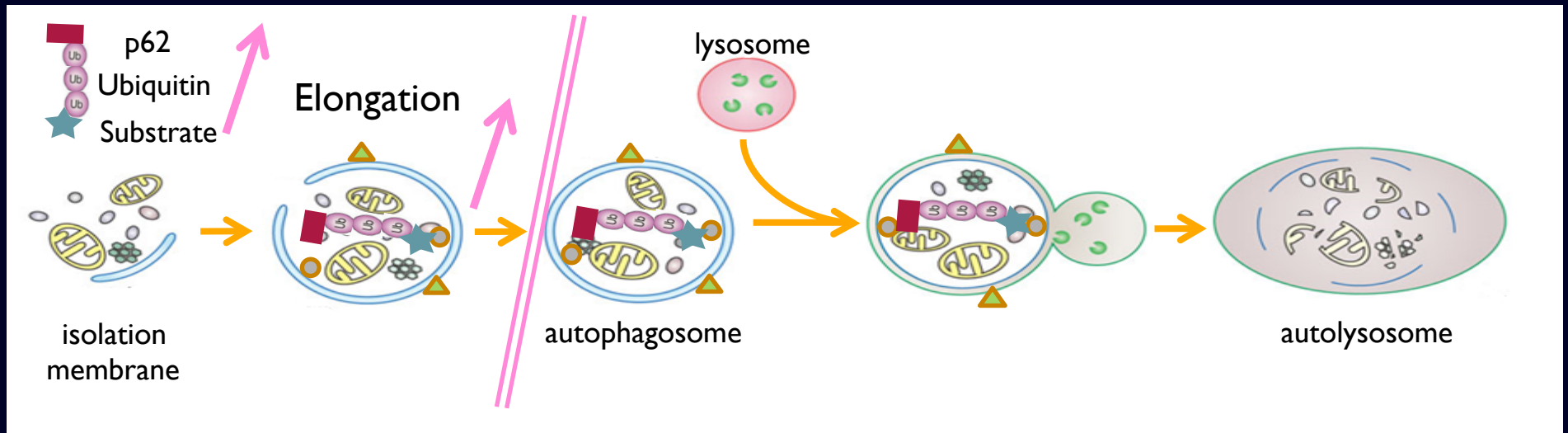
Atg factors (Atg1)
Beclin1
PI3K class III

Atg12 →
Atg5 → Atg12-5/16
Atg16 →
Atg8
(LC3-I) **Atg8-PE**
 (LC3-II)

LC3-II / LC3-I ↑

Masiero E et al. Cell Metab 2009

L'autophagie (activée &) barrée en aval



Atg factors (Atg1)
Beclin1
PI3K class III

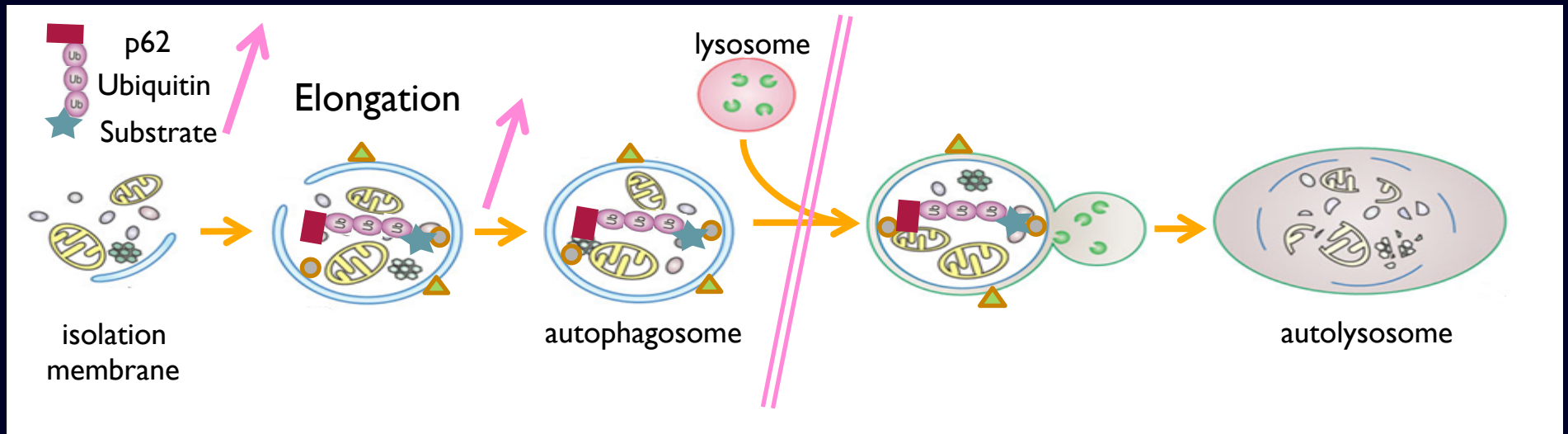
Atg12
Atg5 → Atg12-5/16
Atg16 →
Atg8 (LC3-I) → Atg8-PE (LC3-II)

LC3-II / LC3-I

Masiero E et al. Cell Metab 2009



L'autophagie (activée &) barrée en aval



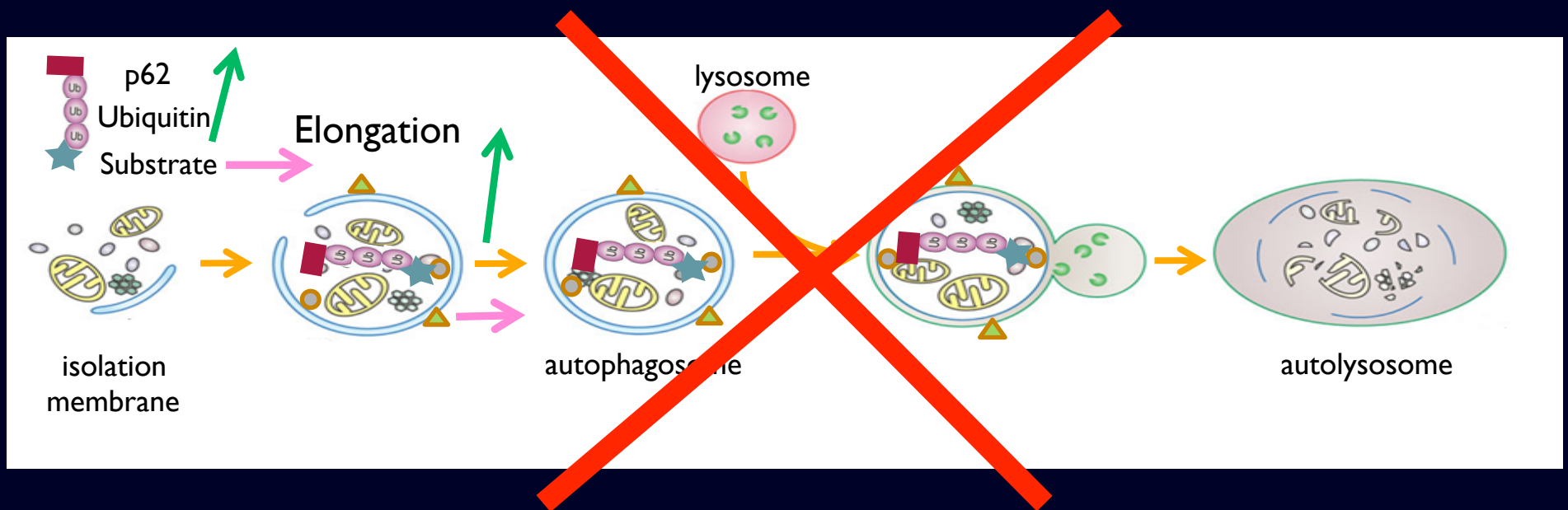
Atg factors (Atg1)
Beclin1
PI3K class III

Atg12 →
Atg5 → Atg12-5/16
Atg16 →
Atg8 (LC3-I) → Atg8-PE (LC3-II)

LC3-II / LC3-I

Masiero E et al. Cell Metab 2009

Différentiation: répéter avec block



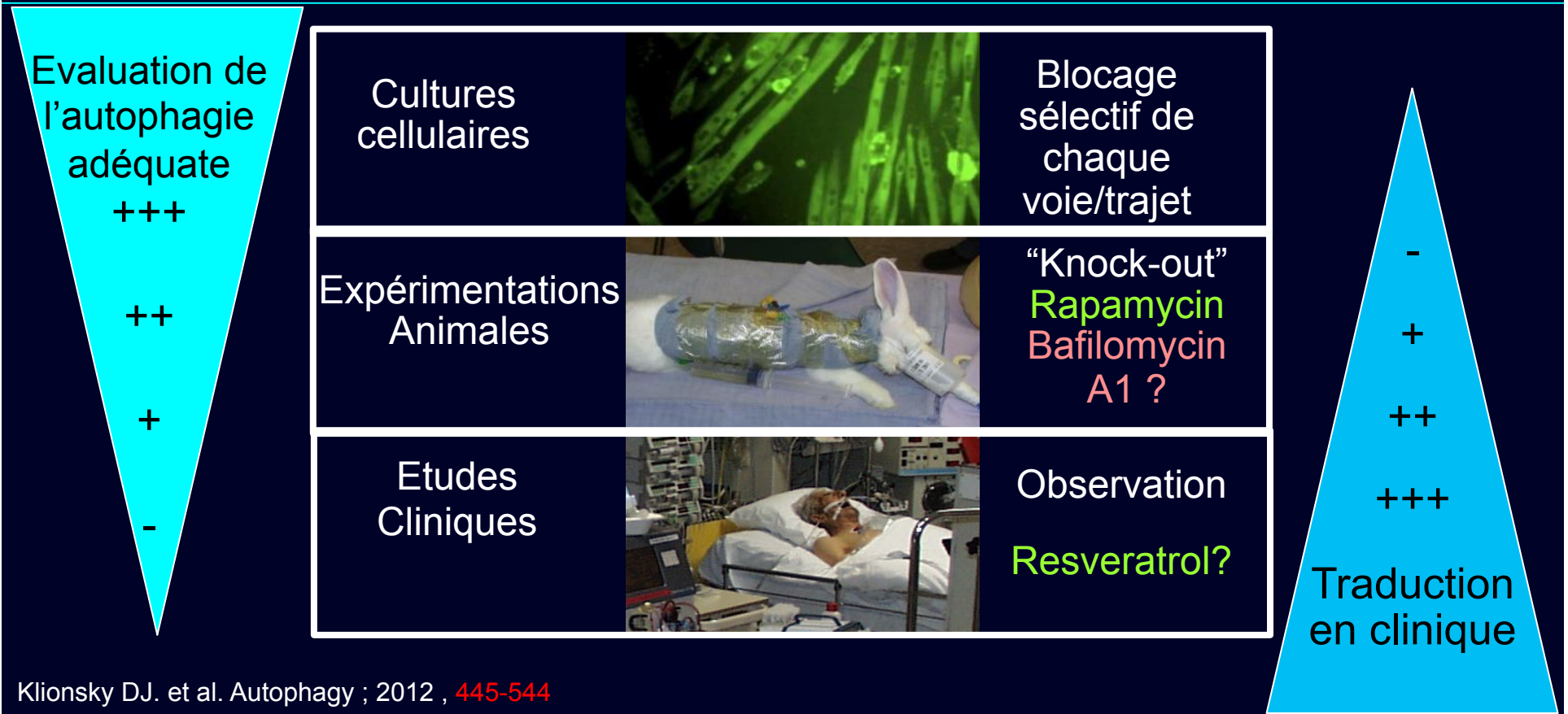
L'analyse de l'autophagie en instantané

Cause ou conséquence?
grand feu → beaucoup de pompiers



Hussain SN. et al. AM J Respir Care Med ; 2010
Clark RSB. et al. Autophagy ; 2008

Investigation de l'autophagie



L'autophagie, l'hyperglycémie et la nutrition aux soins intensifs

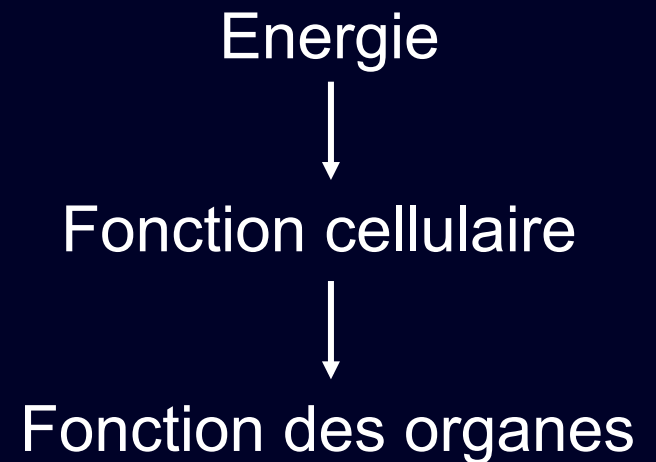
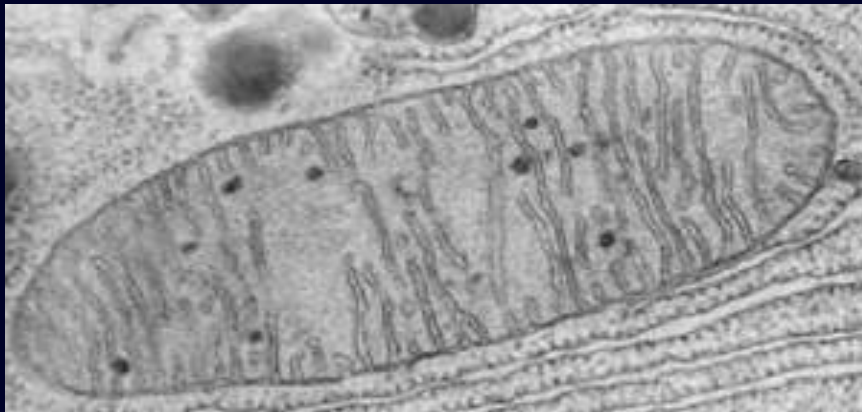
M.P.C., K.U.Leuven



Weekers F et al. Endocrinology ; 2002
Gunst et al. Crit Care Med ; 2013

L'autophagie, l'hyperglycémie et la nutrition aux soins intensifs

M.P.C., K.U.Leuven



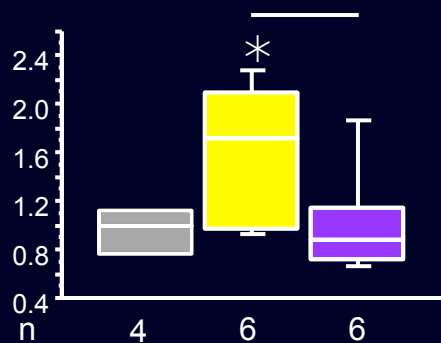
Gunst et al. Crit Care Med ; 2013



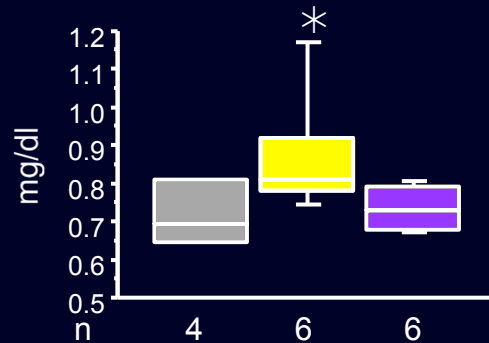
L'autophagie preserve la fonction mitochondriale et renal

M.P.C., K.U.Leuven

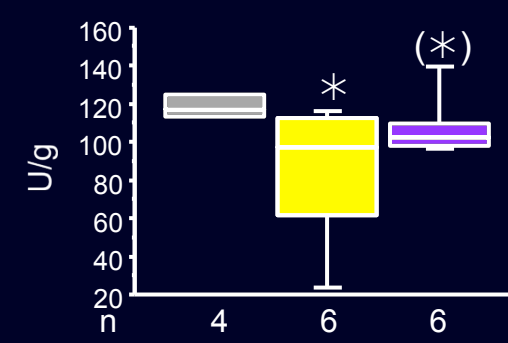
p62 rénale



créatinine



Complexe V activité rénale



- Contrôles
- Malade-Placébo
- Malade-Rapamycin

Boxes indicate median/IQR, whiskers interdecile range

, (): $p \leq 0.05$, $0.05 < p \leq 0.1$ vs healthy

—: $p \leq 0.05$, $0.05 < p \leq 0.1$ between sick groups

Gunst et al. Crit Care Med 2013

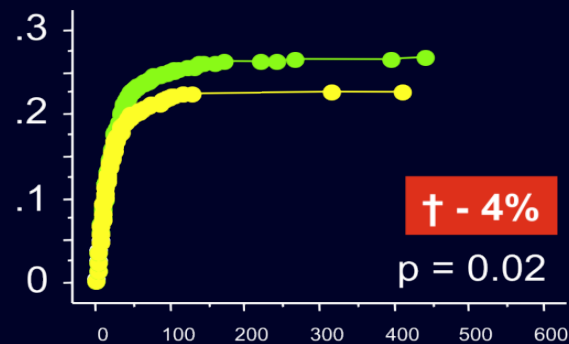
Les bénéfices du contrôle glycémique expliqués par l'autophagie?

M.P.C., K.U.Leuven

Van den Berghe G et al. *DIABETES* 2006, 55: 3151-3159

Cumulative risk for in-hospital mortality

Intention-to-treat
(N = 2748)



Hosp mort **24%** -> **20%**

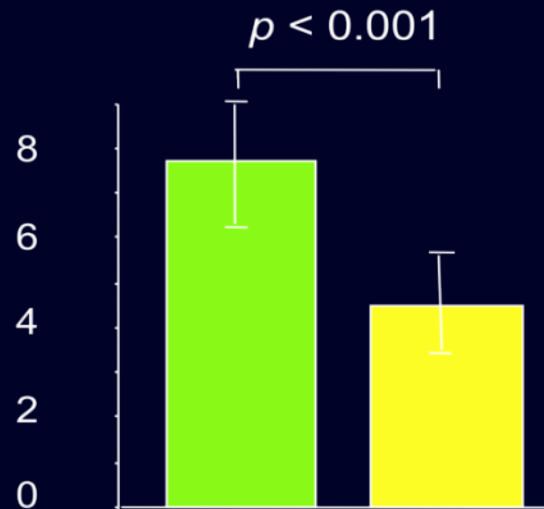
- Conventional
- Intensive

Les bénéfices du contrôle glycémique expliqués par l'autophagie?

M.P.C., K.U.Leuven

Van den Berghe G et al. *DIABETES* 2006, 55: 3151-3159

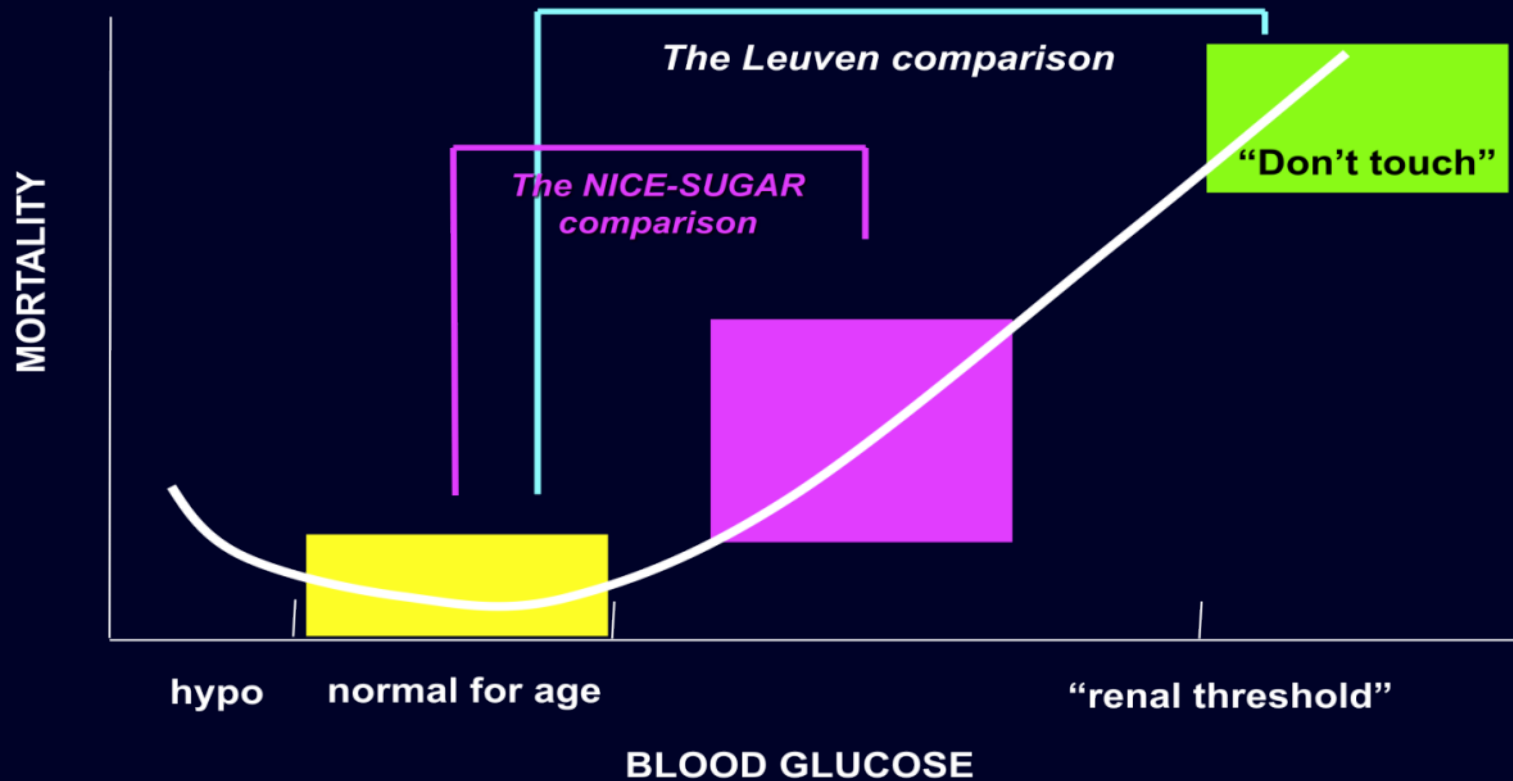
% new kidney injury



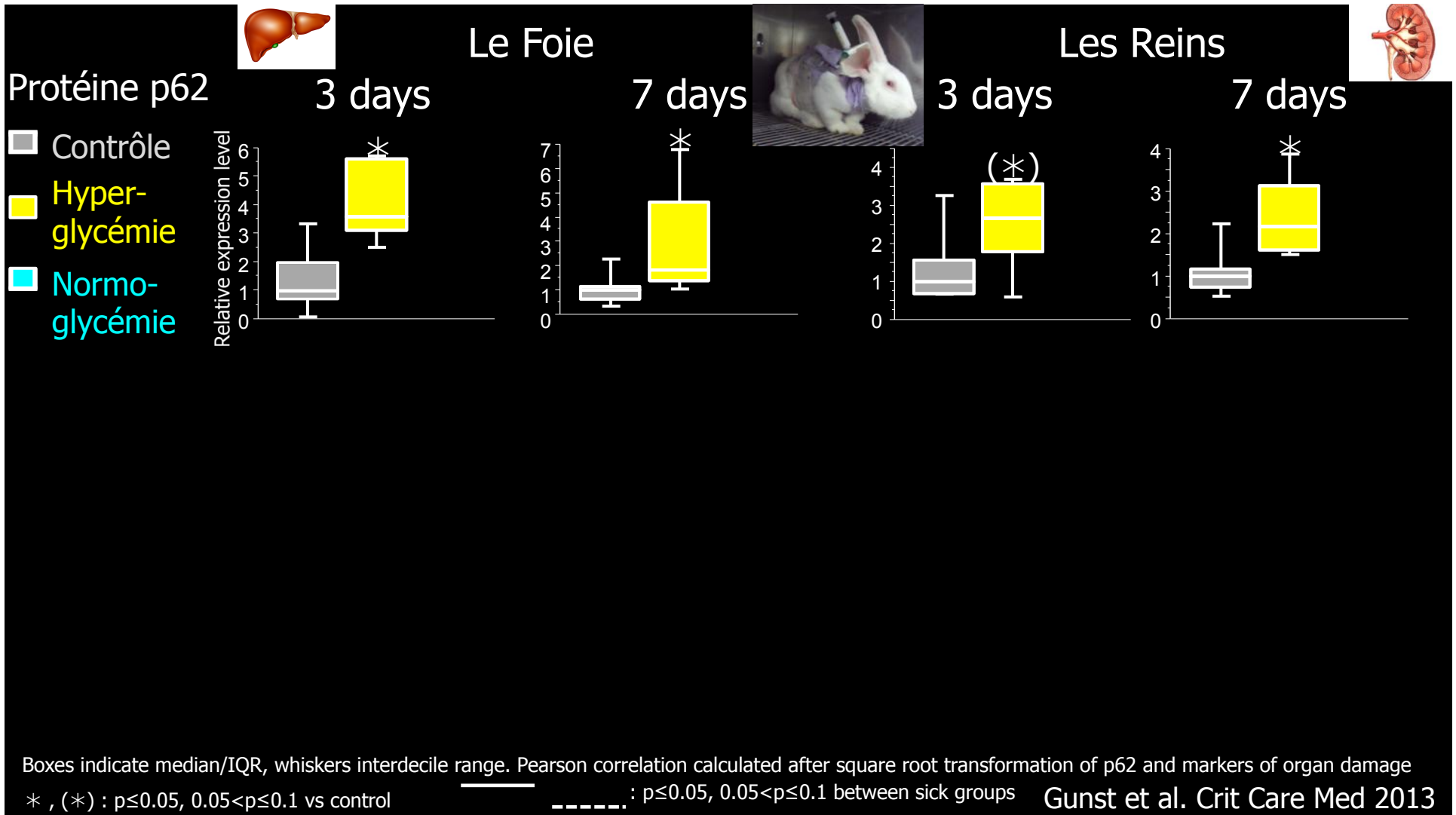
 Conventional
 Intensive

Les bénéfices du contrôle glycémique expliqués par l'autophagie?

M.P.C., K.U.Leuven



Finfer S et al. N Engl J Med 2009; 360: 1283-1297





Le Foie



Les Reins



Protéine p62

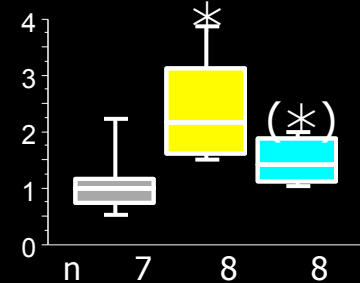
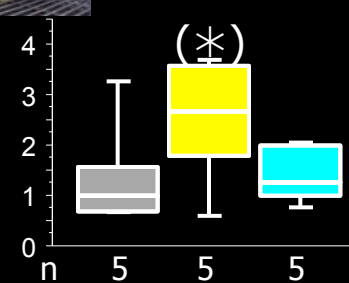
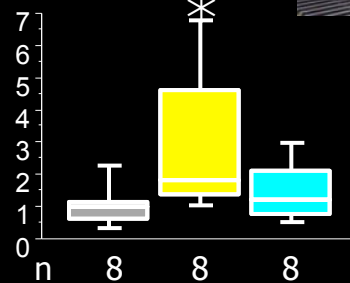
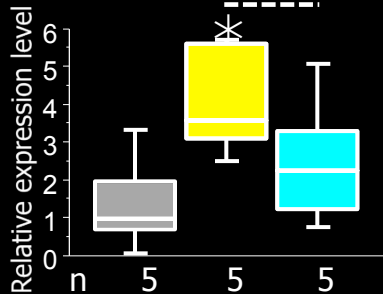
3 days

7 days

3 days

7 days

- Contrôle
- Hyperglycémie
- Normoglycémie



Corrélation p62 (X-axis) avec:

Complex I activ. (U/g liver)

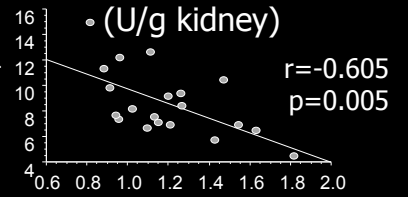
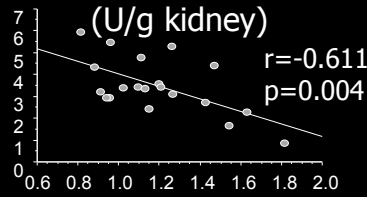
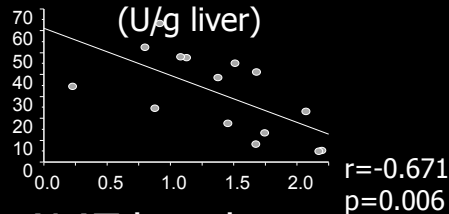
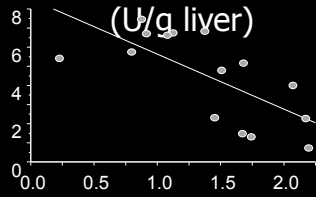
Complex V activ. (U/g liver)

Complex I activ. (U/g kidney)

Complex V activ. (U/g kidney)

Dégâts mitochondriaux

r=-0.692
p=0.004



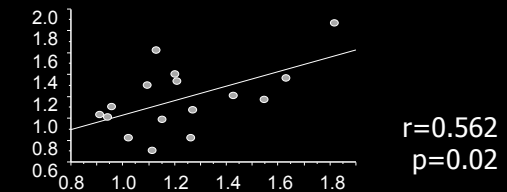
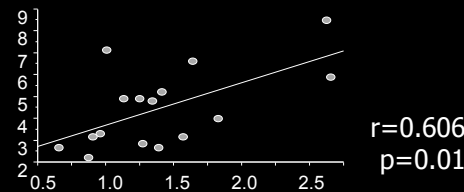
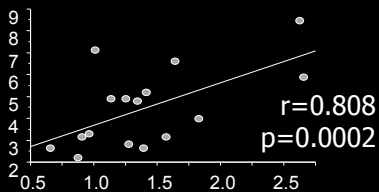
ASAT last day (U/l)

ALAT last day (U/l)

Creatinine last day (mg/dl)

Dégâts Rénaux et hépatiques

r=0.808
p=0.0002



Gunst et al. Crit Care Med 2013

Autophagie et hyperglycémie en clinique



Tissues hépatiques obtenus
post-mortem

Patients hyper-glycémiques

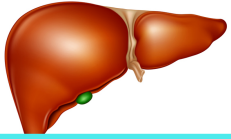
Patients normo-glycémiques

Laparotomies électives (contrôles)

Vanhorebeek I. et al. JCEM 2011

Van den Berghe G. et al. N. Engl. J. Med 2001

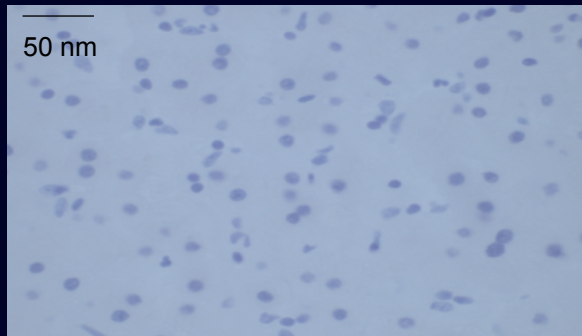
Van den Berghe G. et al. N. Engl. J. Med 2006



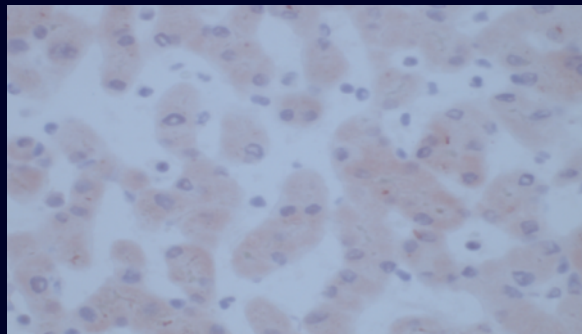
Autophagie et hyperglycémie en clinique

M.P.C., K.U.Leuven

Control



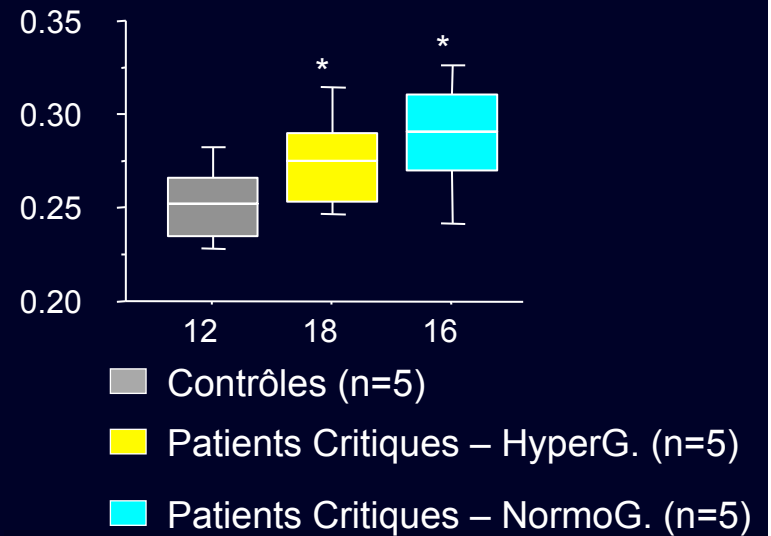
Critically ill



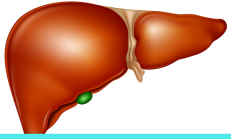
* : $P \leq 0.05$ versus contrôles
: $P \leq 0.05$ HyperG versus NormoG

Le foie

Intensité coloration ubiquitine



Vanhorebeek I. et al. JCEM 2011



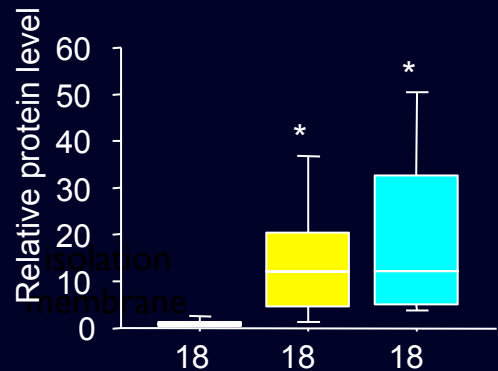
Autophagie et hyperglycémie en clinique

M.P.C., K.U.Leuven

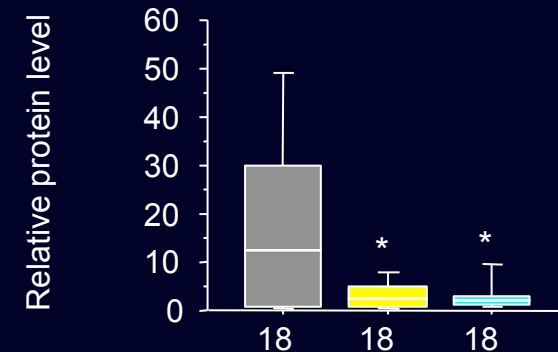
p62

Le foie

LC3-II/LC3-I

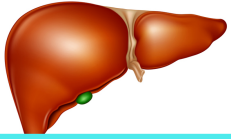


* : $P \leq 0.05$ versus contrôles
: $P \leq 0.05$ HyperG versus NormoG



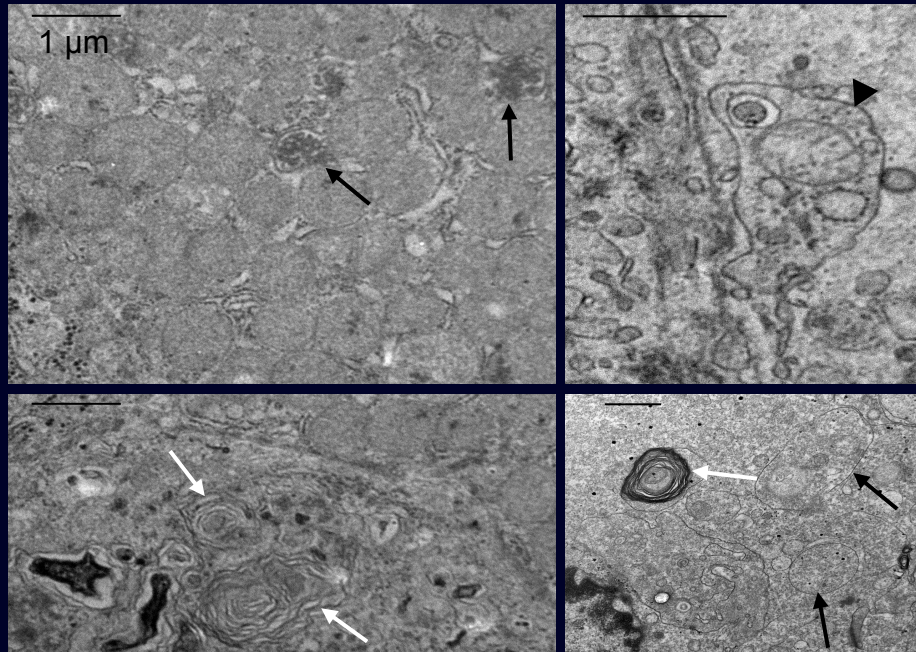
- Contrôles (n=5)
- Patients Critiques – HyperG. (n=5)
- Patients Critiques – NormoG. (n=5)

Vanhorebeek I. et al. JCEM ; 2011



Autophagie et hyperglycémie en clinique

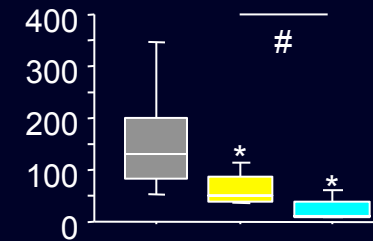
M.P.C., K.U.Leuven



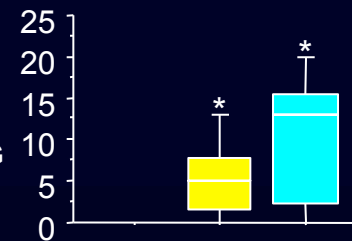
- Contrôles (n=5)
- Patients Critiques – HyperG. (n=5)
- Patients Critiques – NormoG. (n=5)

* : $P \leq 0.05$ versus contrôles
: $P \leq 0.05$ HyperG versus NormoG

Réduction du nombre des vacuoles autophagiques



Augmentation du nombre des structures membraneuses



Vanhorebeek I. et al. JCEM ; 2011

Autophagie et hyperglycémie en clinique

- Résultats (légèrement) opposés?
(plus de autophagosomes chez les normoglycémiques)
- Etude humaine post mortem
(→ autophagie réduite)
- Différences pour la dose de glucose et de l'insuline
pour l'insulinémie et la sensibilité à l'insuline
- ...

Autophagie et hyperglycémie en clinique

Hyperglycémie

Normoglycémie

Hypoglycémie

Glycémie

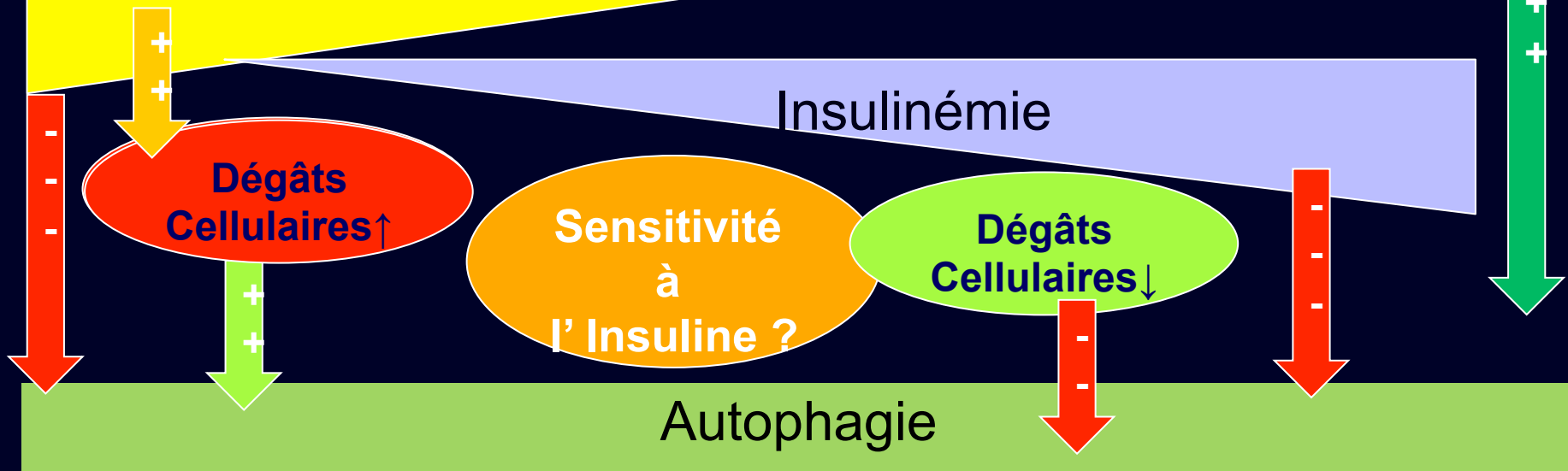
Insulinémie

Dégâts
Cellulaires ↑

Sensitivité
à
l'Insuline ?

Dégâts
Cellulaires ↓

Autophagie

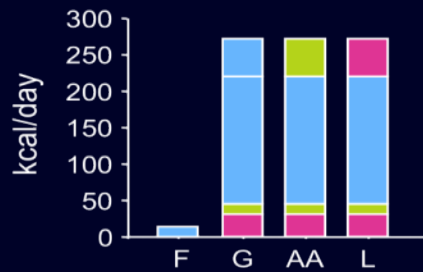


Autophagie et nutrition aux soins intensifs

M.P.C., K.U.Leuven

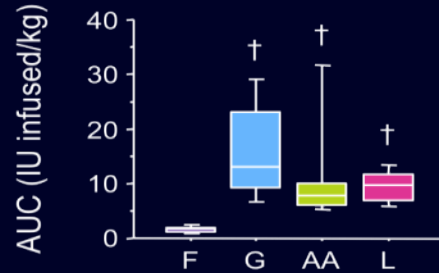


Nutrition administrée



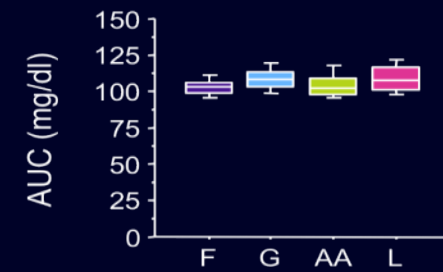
■ glucose
■ Acides Aminés
■ Lipides

Dose d'insuline



■ F: Ajeun
■ G: glucose group
■ AA: amino acid group
■ L: lipid group

Glycémie



Derde S et al. Endocrinology 2012

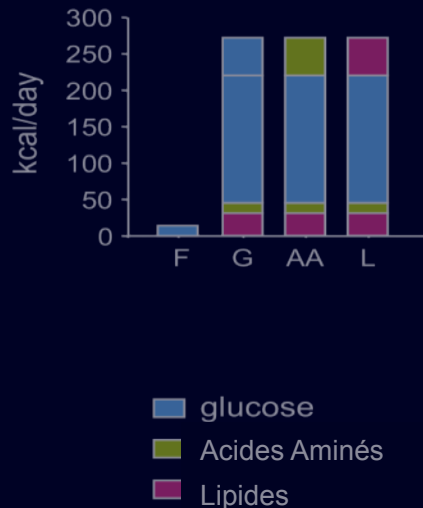
† : $p \leq 0.05$ vs fasted critically ill rabbits



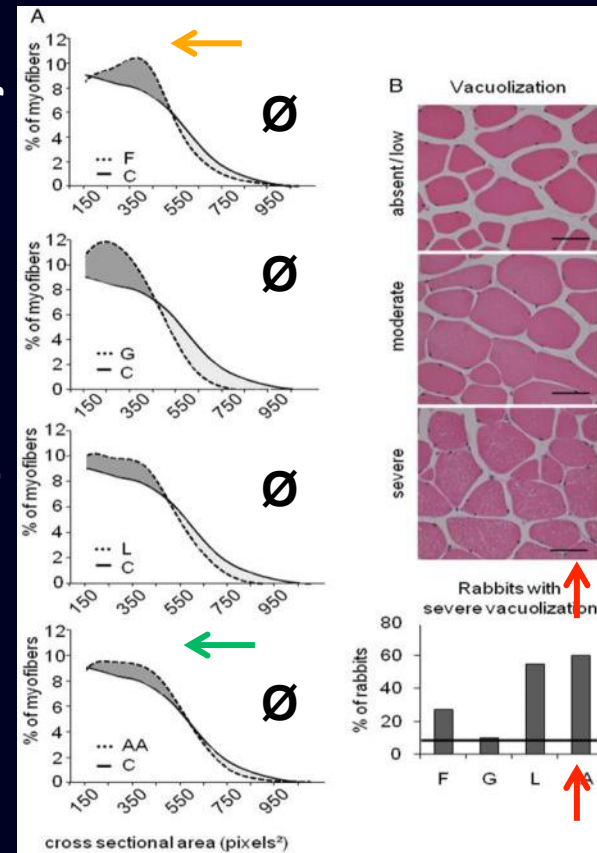
Nutrition: taille préservée à la prix de la qualité



Nutrition administrée




Acides Aminés Lipides Glucose A jeun





Nutrition: taille préservée à la prix de la qualité

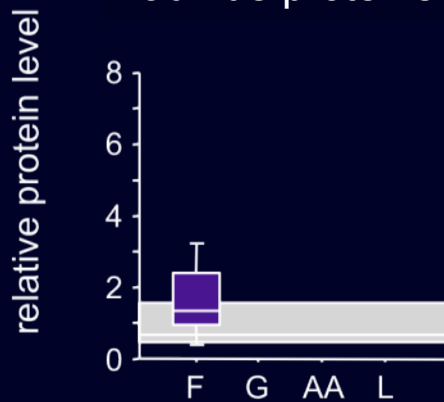
* : $p \leq 0.05$ vs healthy control rabbits
† : $p \leq 0.05$ vs fasted critically ill rabbits
‡ : $p \leq 0.05$ vs critically ill rabbits from the glucose group

healthy reference IQR 

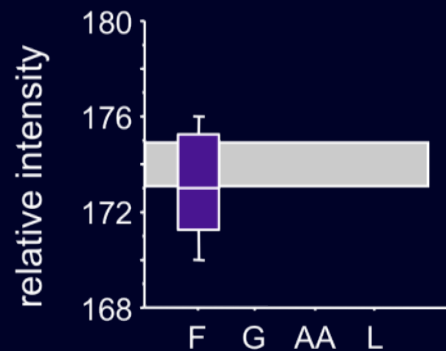
Le muscle



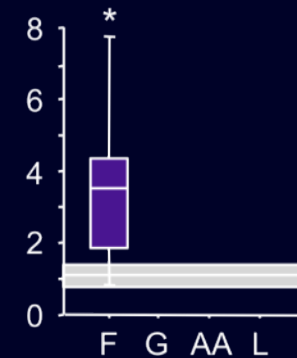
Taux de protéine p62



Coloration de l' ubiquitine: Intensité



LC3-II/LC3-I





Nutrition: taille préservée à la prix de la qualité

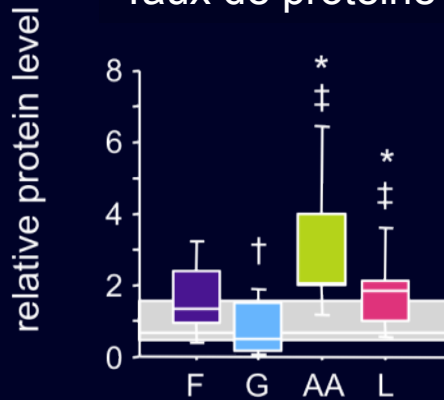
* : $p \leq 0.05$ vs healthy control rabbits
† : $p \leq 0.05$ vs fasted critically ill rabbits
‡ : $p \leq 0.05$ vs critically ill rabbits from the glucose group

healthy reference IQR

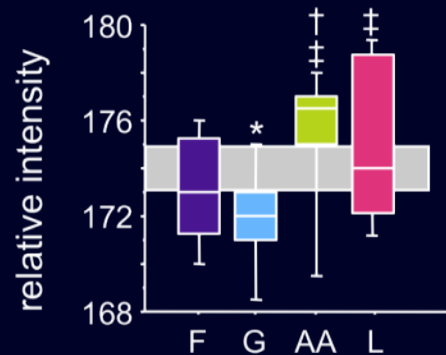
Le muscle



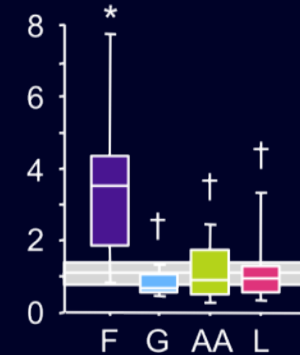
Taux de protéine p62

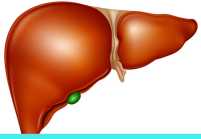


Coloration de l' ubiquitine: Intensité



LC3-II/LC3-I





Autophagie et nutrition aux soins intensifs

M.P.C., K.U.Leuven

La nutrition provoque:

Le foie

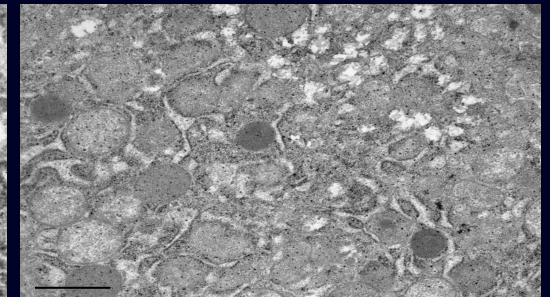
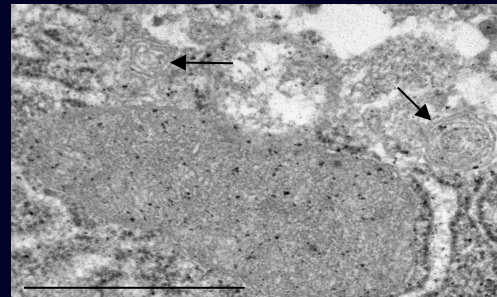
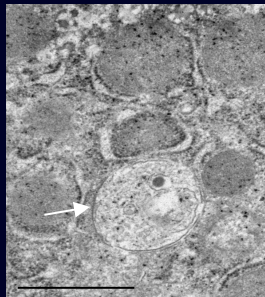
La cytolysse des hépatocytes (ALAT ↑ & ASAT ↑)



Vacuoles autophagiques ↓

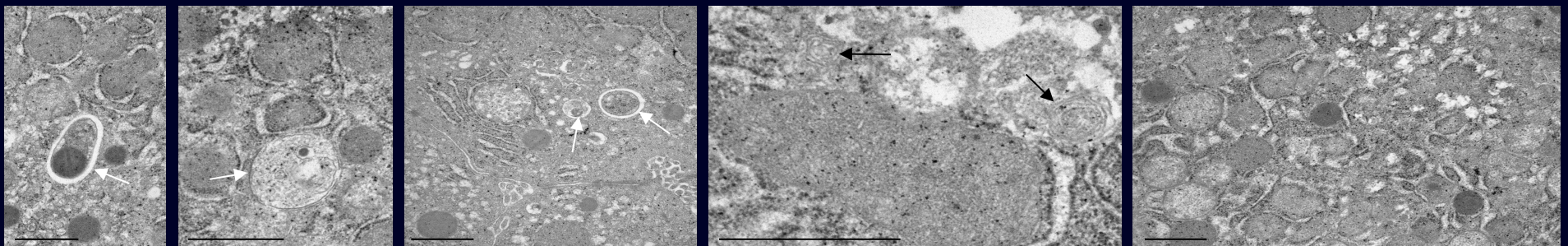
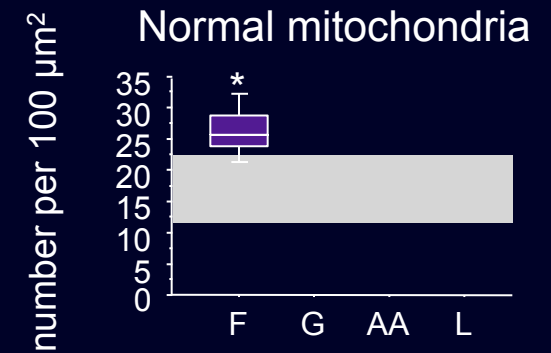
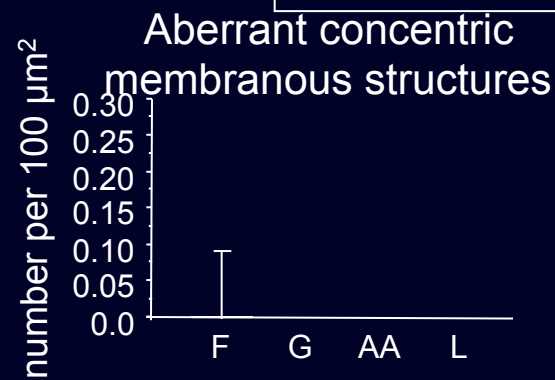
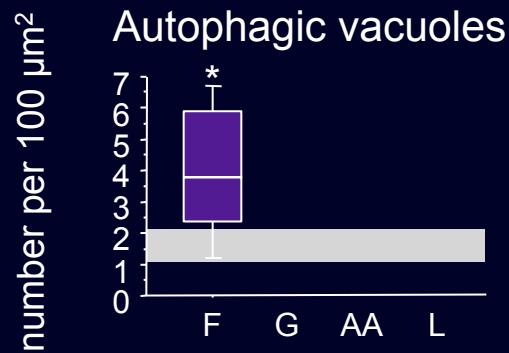
Structures membraneuses aberrantes ↑

Mitochondries Normales ↓




Derde S et al. Endocrinology 2012

Nutrition impairs autophagy in *liver*

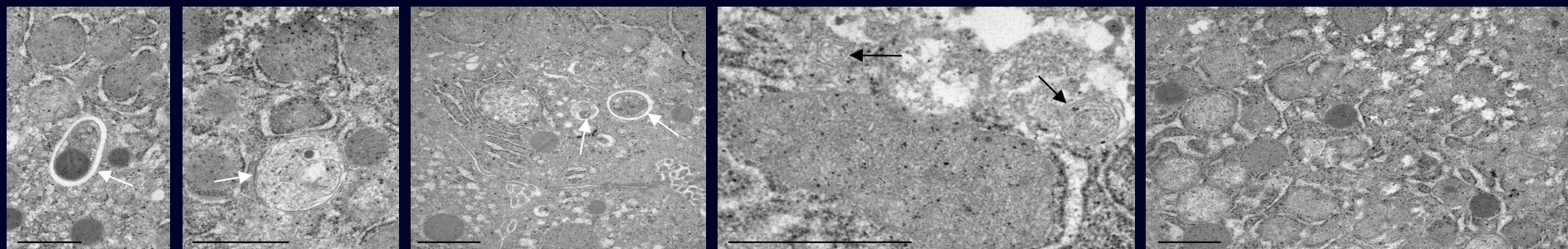
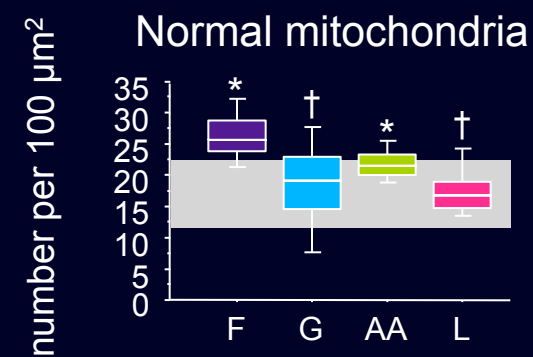
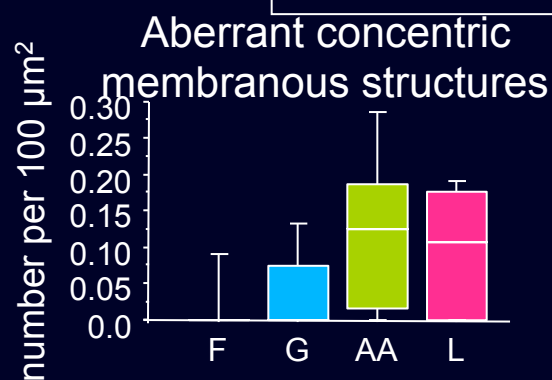
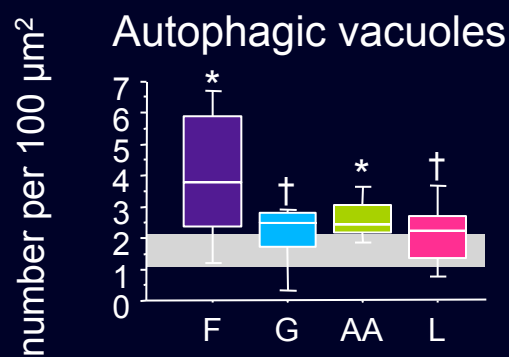


* : $p \leq 0.05$ vs healthy control rabbits
† : $p \leq 0.05$ vs fasted critically ill rabbits

healthy reference IQR 

G.V.d.B., KU Leuven

Nutrition impairs autophagy in *liver*

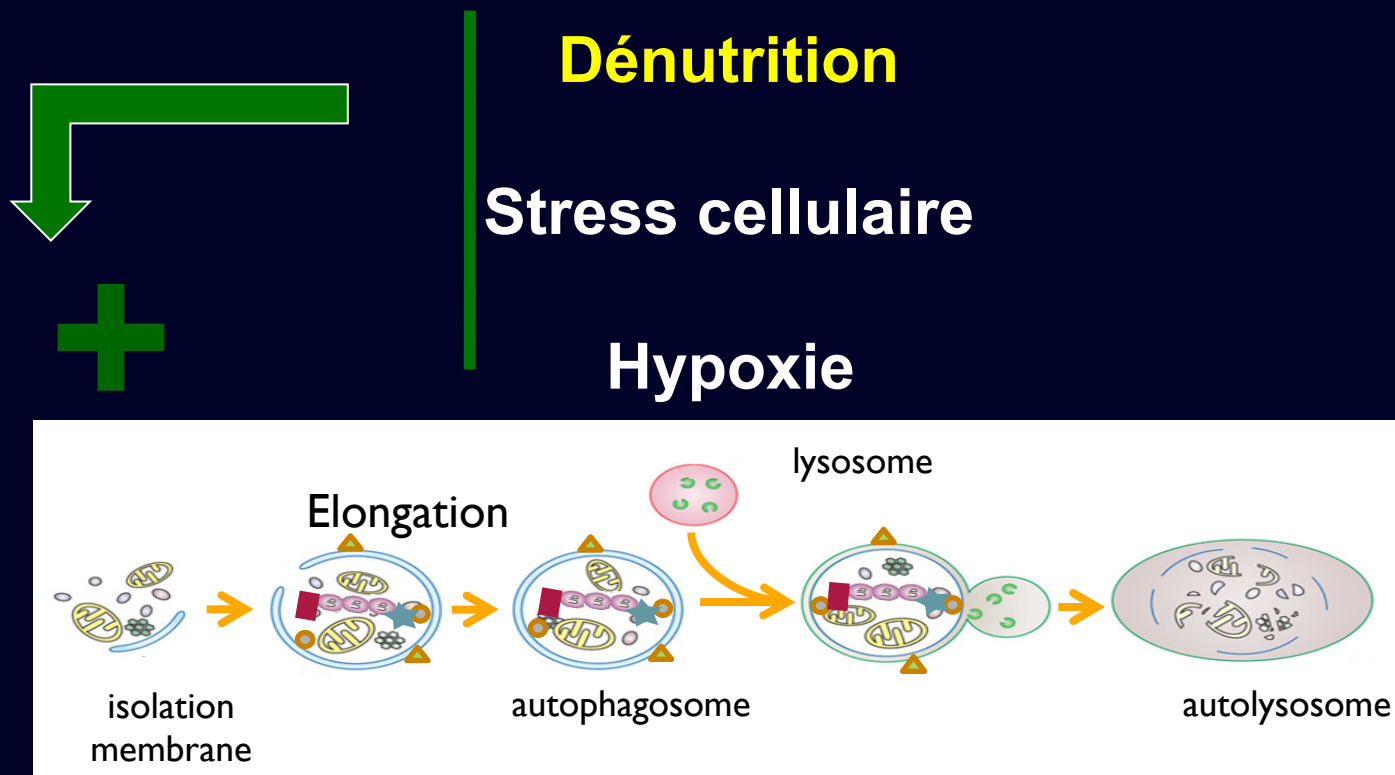


* : $p \leq 0.05$ vs healthy control rabbits
 † : $p \leq 0.05$ vs fasted critically ill rabbits

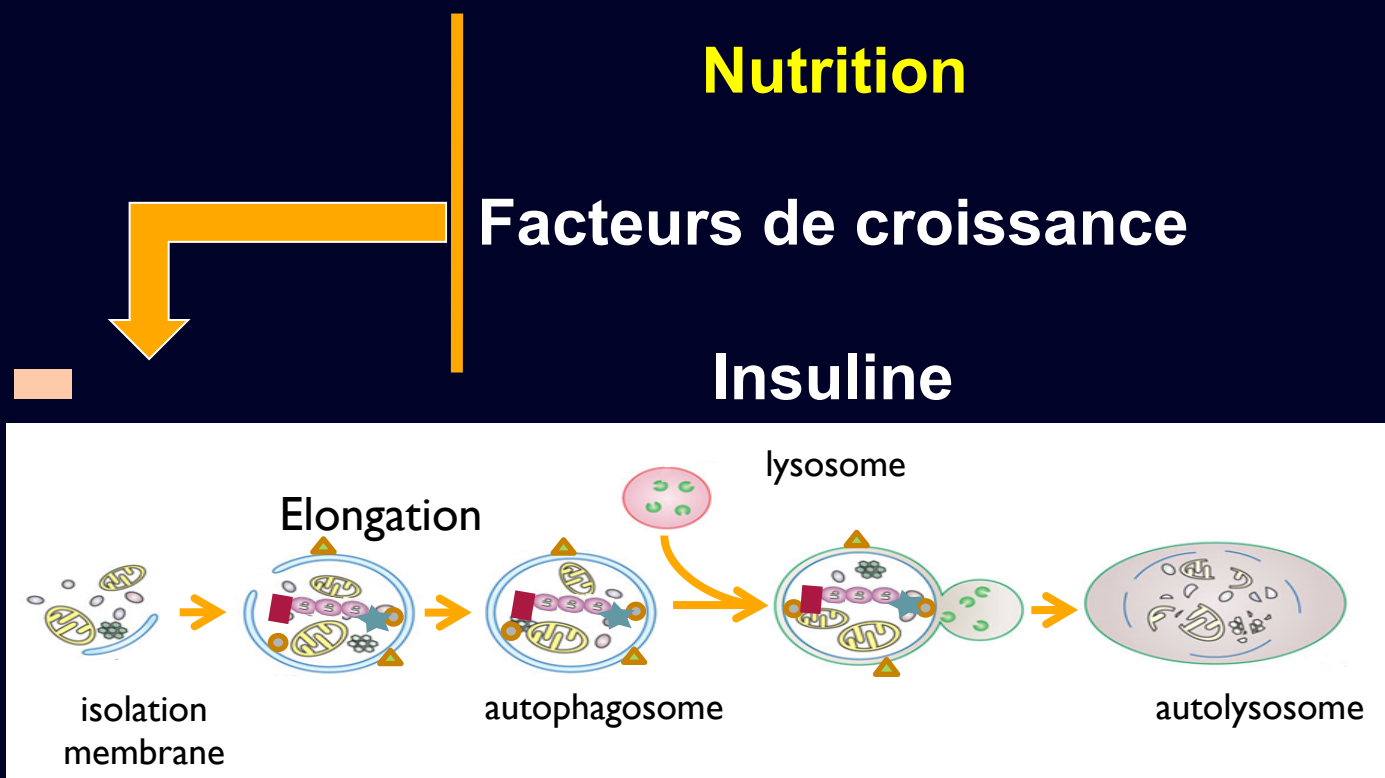
healthy reference IQR

G.V.d.B., KU Leuven

Autophagie aux soins intensifs



Autophagie aux soins intensifs



Traduction dans la situation clinique?



EPaNIC

M.P.C., K.U.Leuven

Hypothèse initiale:

Nutrition parentérale administrée
quand l'entérale ne suffit pas

favorise **la réhabilitation**
aux soins intensifs et après

à condition que **l'hyperglycémie**
et **la suralimentation** soient évitées.

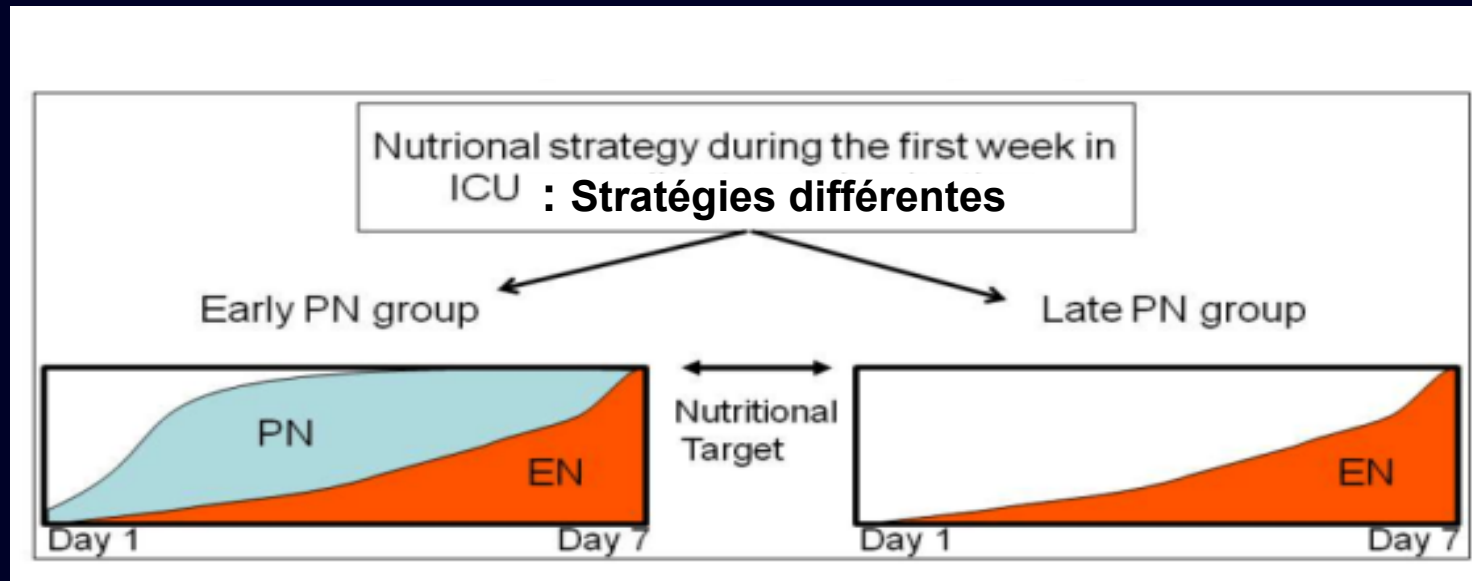


Casaer MP. et al. N. Engl. J. Med 2011

L'autophagie et l'échec de la nutrition parentérale tôt dans la maladie critique

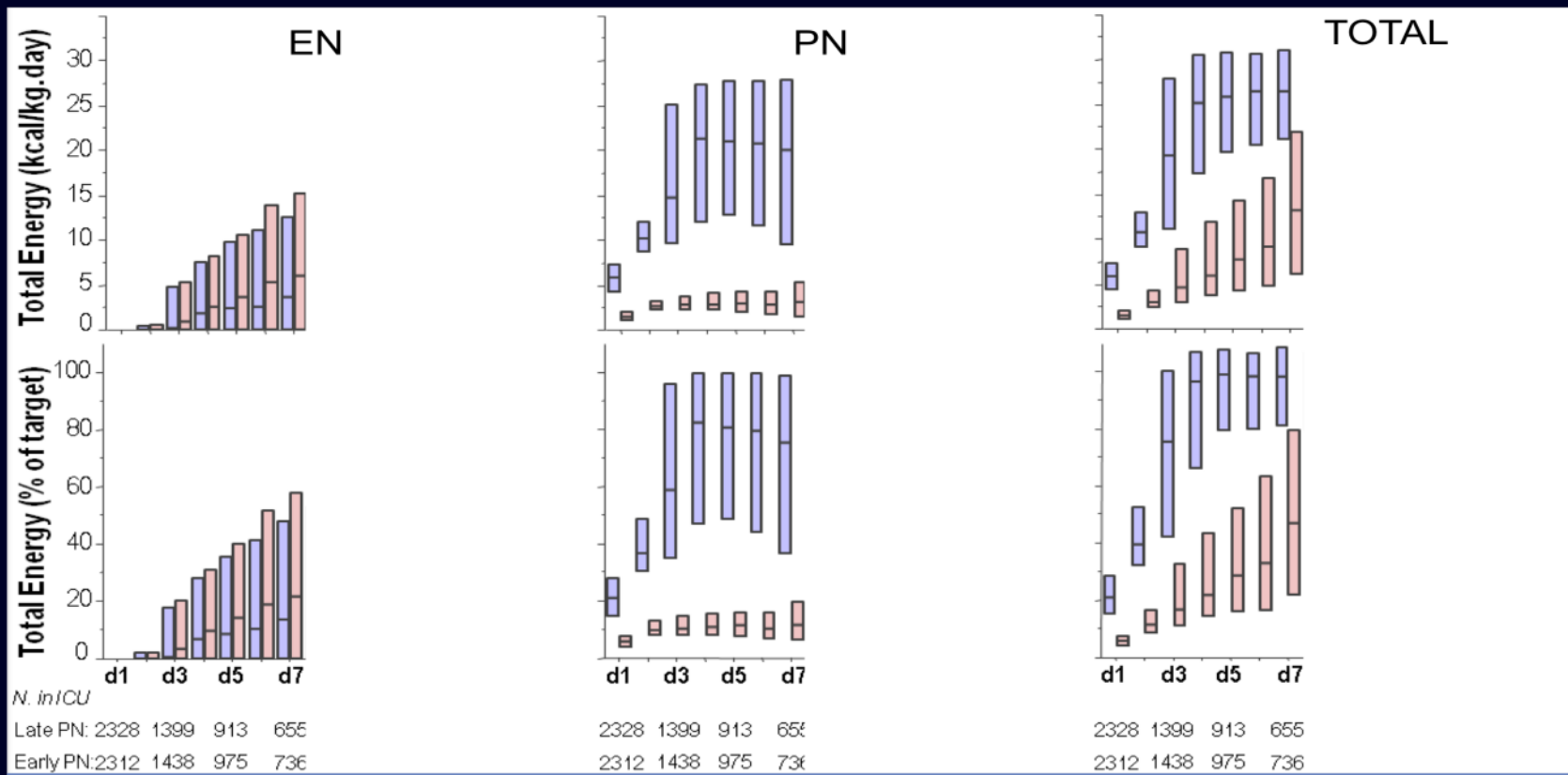
M.P.C., K.U.Leuven

(N=4640)
clinical trials.gov [NCT00512122]

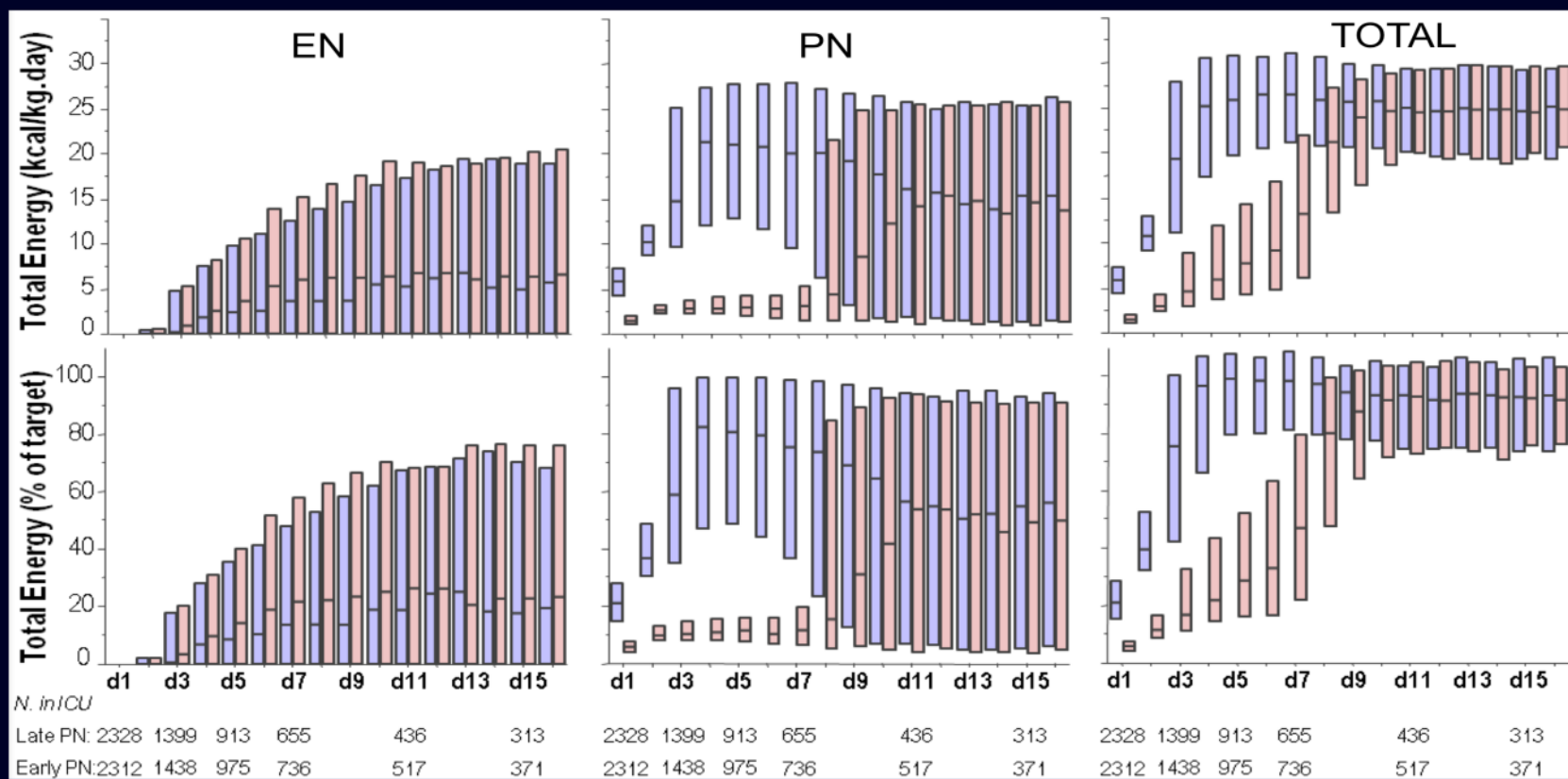


Casaer MP. et al. N. Engl. J. Med 2011

Nutrition administrée



Nutrition administrée



EPaNIC résultats aux soins intensifs

	Late PN	Early PN	
Mortalité à 90 jours	11.2%	11.2%	
Patients avec nouvelle infection en SI	22.8 %	26.2 %	P = 0.008
Poumon ou voie aérienne	16.4 %	19.3 %	P = 0.009
Bactériémie / fongémie	6.1 %	7.5 %	P = 0.05
Infection de plaie	2.7 %	4.2 %	P = 0.006
Thérapie de remplacement rénale jours	7 [3 -16]	10 [5 – 23]	P = 0.008
Durée de séjour aux soins intensifs	3 [2 – 7]	4 [2 – 9]	P = 0.02

EPaNIC results: in hospital

	Late PN	Early PN	
Hospital stay	14 [9 – 27]	16 [9 – 29]	P = 0.004
Functionality at discharge			
6-MWD	Unaffected		
ADL	Unaffected		
Total healthcare costs during hospitalization	- 1110 EUR		P = 0.04
	- 2.300.000 EUR		

Comment ?



Stratégie nutritionnelle et faiblesse musculaire

Effect of tolerating macronutrient deficit
on the development of intensive-care acquired weakness:
a subanalysis of the EPaNIC trial.

Hermans G.* , Casaer MP* , Clerckx B. , Güiza FG , Vanhullebusch T. , Derde S. ,
Meersseman P. , Derese I , Mesotten D. , Wouters PJ , Van Cromphaut S. , Debaveye
Y. , Gosselink R. , Gunst J. , Wilmer A. , Van den Berghe G* . , Vanhorebeek I.*

*equally contributed

Lancet Respiratory Medicine 2013



La faiblesse musculaire des soins intensifs

« ICU acquired muscle weakness (ICU AW) »

M.P.C., K.U.Leuven



Sheean PM. et al. Clin Nutr ; 2013
Tremblay A. et al. Chest ; 2003
Ray DE. et al. Chest ; 2005
Dejonghe B. et al. Crit Care med; 2007
Herridge MS. et al. NEJM ; 2003
Herridge MS. et al. NEJM ; 2011

Associée avec:

- Ventilation prolongée
- Mortalité accrue
- Rééducation incomplète ou retardée
- Coûts supplémentaires

Diagnose: MRC sum score (n = 600)

- 3 Articulations
- 4 membres
- 5 niveaux de force
- Après jour 7
- Au premier réveil
- A l'étage: Jour 7



De Jonghe B. et al., CCM ; 2007
Hermans G. et al., Muscle & Nerve ; 2012



Hermans G. et al. Lancet Resp. Med. ; 2013

Stratégie nutritionnelle et faiblesse musculaire

Late PN Early PN

Faiblesse <i>N tested (1)</i>	34% 305	43% 295	P = 0.03
---	-------------------	-------------------	-----------------

Late PN accélère la récupération
(P = 0.02)

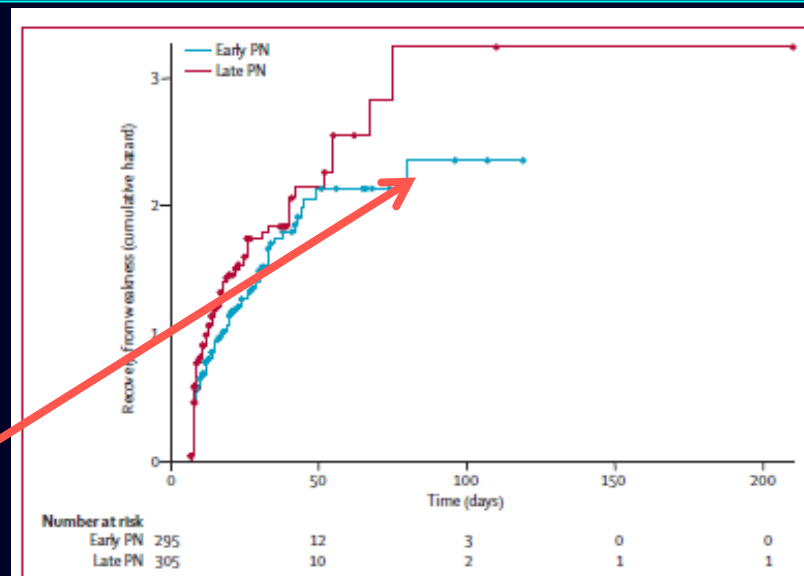


Figure 2: Kaplan-Meier plot for time to recovery from intensive-care unit acquired weakness
Cumulative hazard is equal to the negative logarithm of the survival probability. Dots represent patients who never recovered from weakness and were censored at the time of last measurement. Numbers at risk at any timepoint represent patients not yet recovered from weakness and not yet censored for death or discharge before recovery from weakness. PN=parenteral nutrition.

La dénutrition améliore la force musculaire?

Biopsies musculaires fémorales (jour 8) de

122 patients
20 volontaires

Etudes de l'activation des voies cellulaires de

Synthèse myofibrillaire

Catabolisme myofibrillaire:

- Ubiquitine Protéasome

- Autophagie

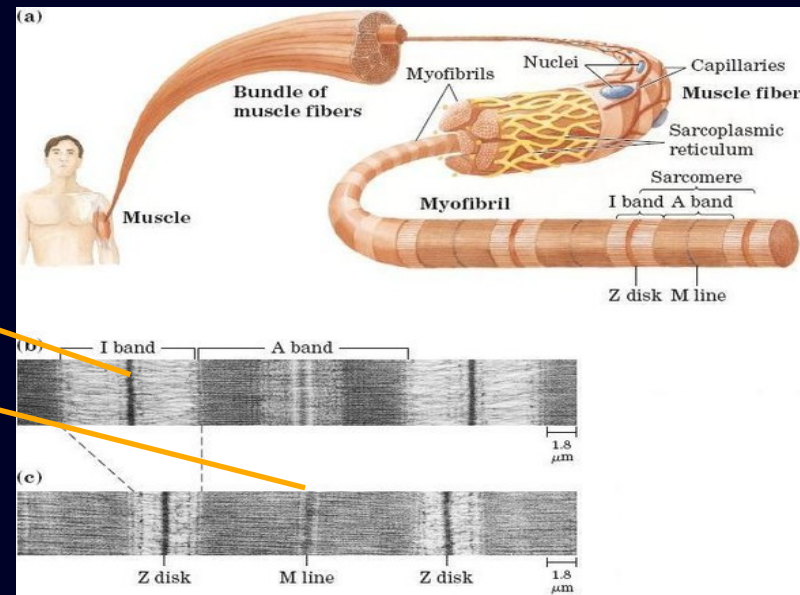




Synthèse myofibrillaire

Protéines myofibrillaires principales:

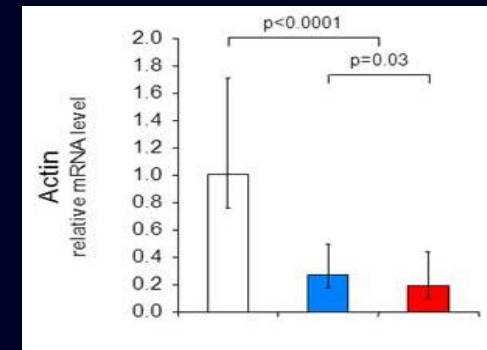
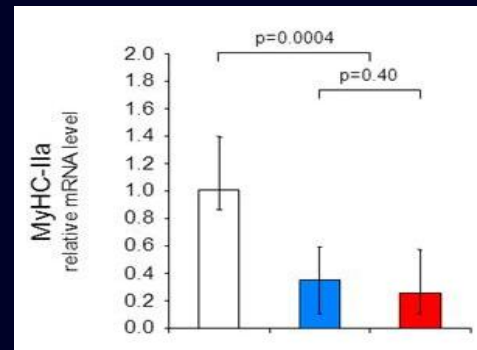
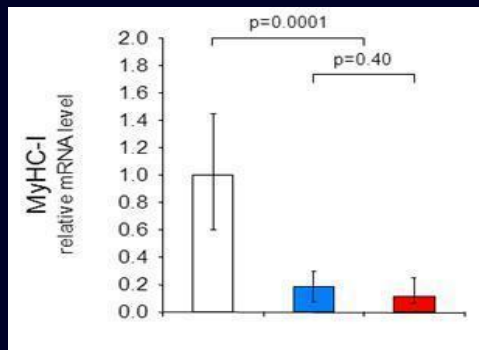
- Actine
- Myosine
 - Type I Myosin Heavy Chain
“marathon”
 - Type II Myosin Heavy Chain
“sprinter”





Synthèse myofibrillaire

M.P.C., K.U.Leuven



□ Control ■ Early PN ■ Late PN

Synthèse

Early PN

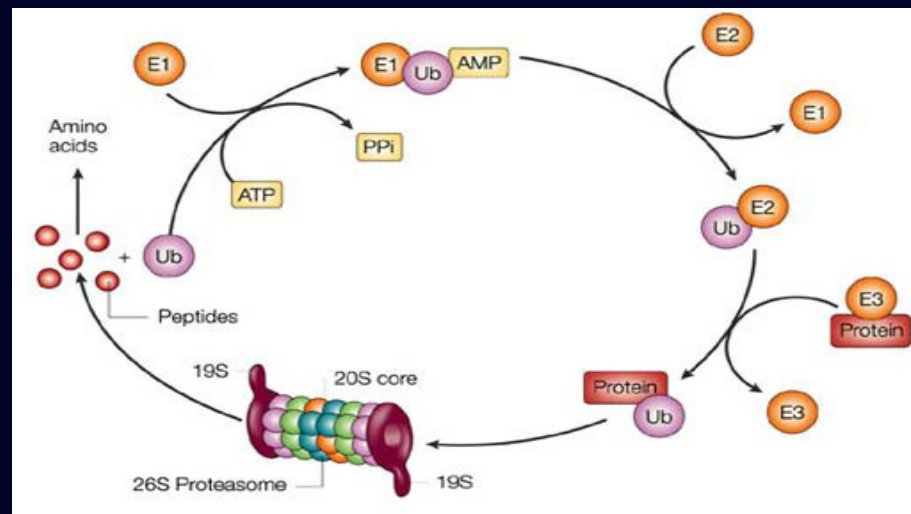
Late PN



Hermans G. et al. Lancet Resp. Med. 2013

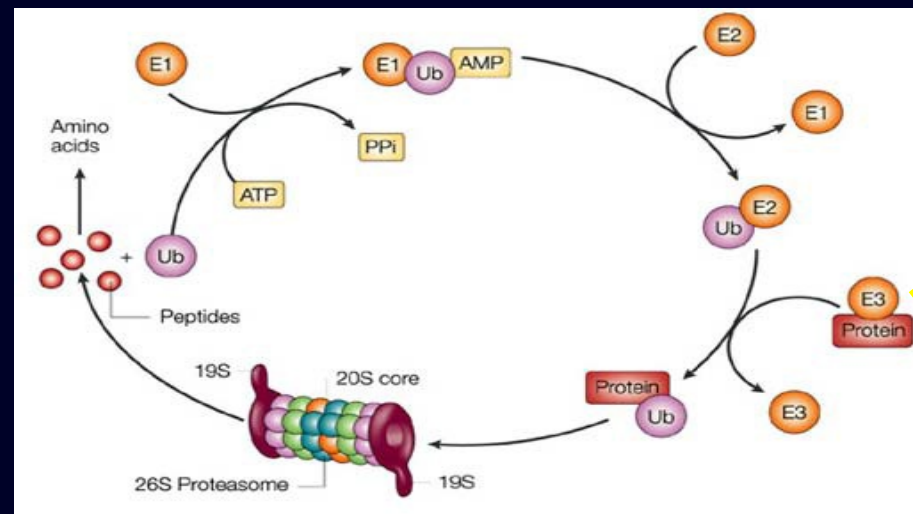


Ubiquitin protéasome





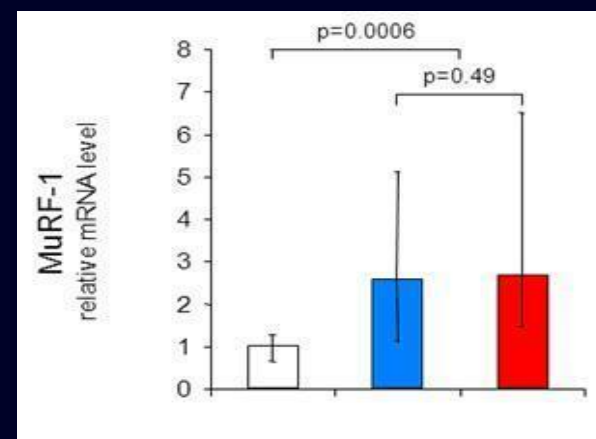
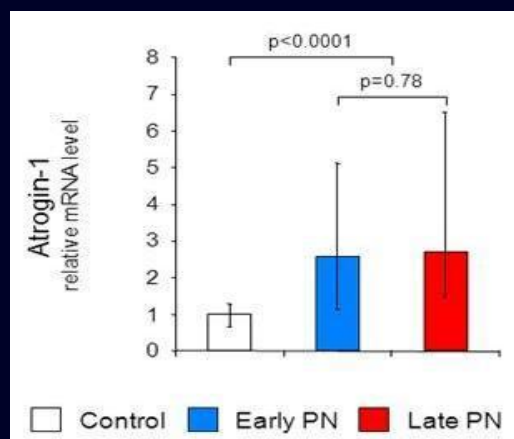
Ubiquitin protéasome



E3 ubiquitine ligases : enzymes spécifiques pour les protéines musculaires: **MuRF-1 and Atrogin-1**



Results : E3 ubiquitin ligase enzymes



Catabolisme

Early PN

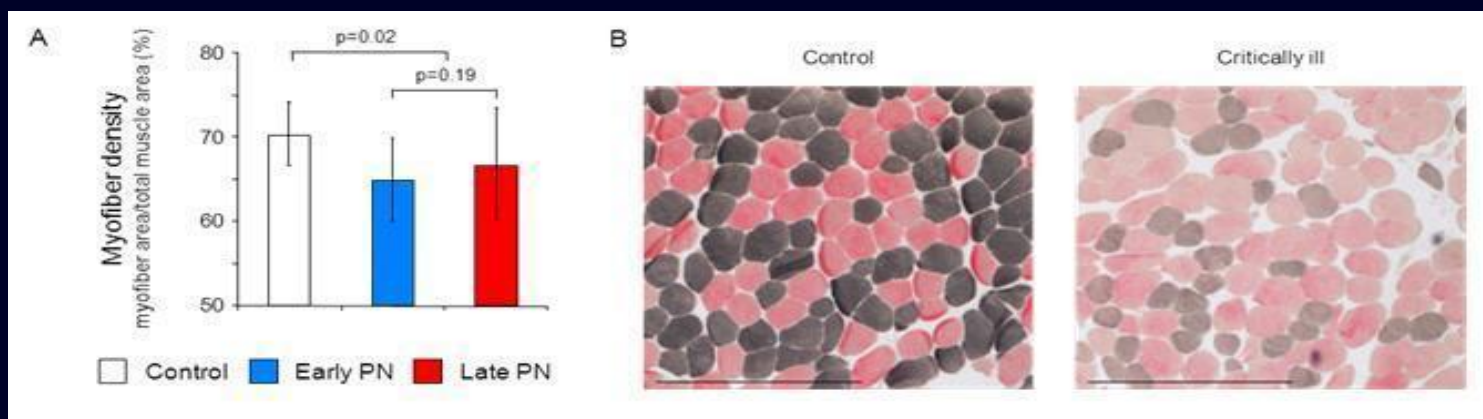
Late PN





Densité des fibres musculaires après une semaine en SI

M.P.C., K.U.Leuven



Densité des fibres musculaires



Late PN



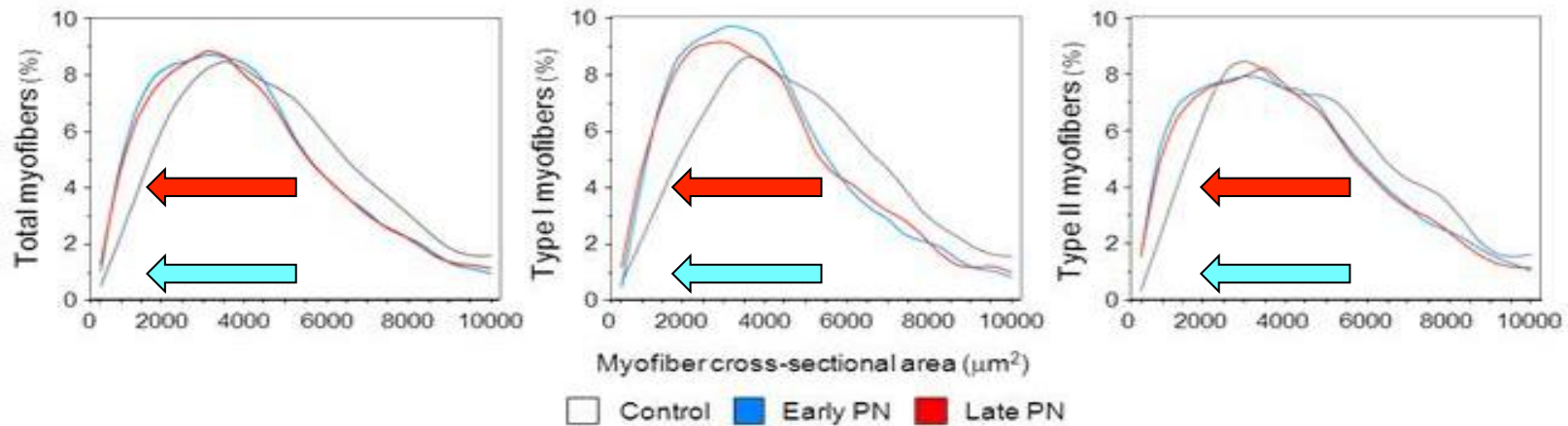
Early PN

Hermans G. et al. Lancet Resp. Med. ; 2013



Taille des fibres musculaires après une semaine en SI

M.P.C., K.U.Leuven



Total

Type I
"Marathon"

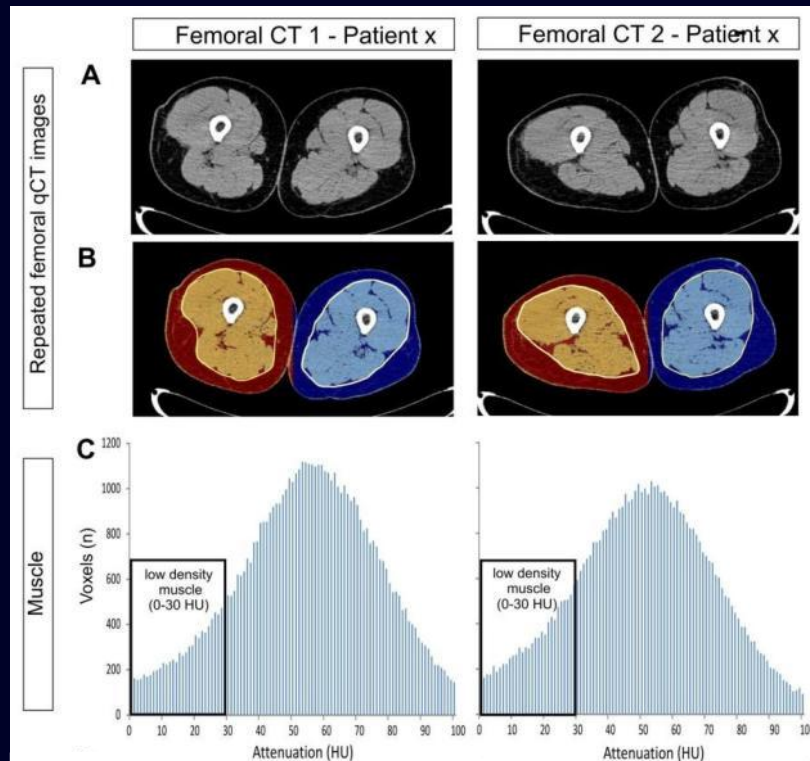
Type II
"Sprint"

Hermans G. et al. Lancet Resp. Med. 2013



Taille des muscles **macroscopique** après une semaine en SI

M.P.C., K.U.Leuven



Perte importante de volume des muscles fémoraux entre jours 2 et 8

Comparable, malgré la nutrition parentérale supplémentaire

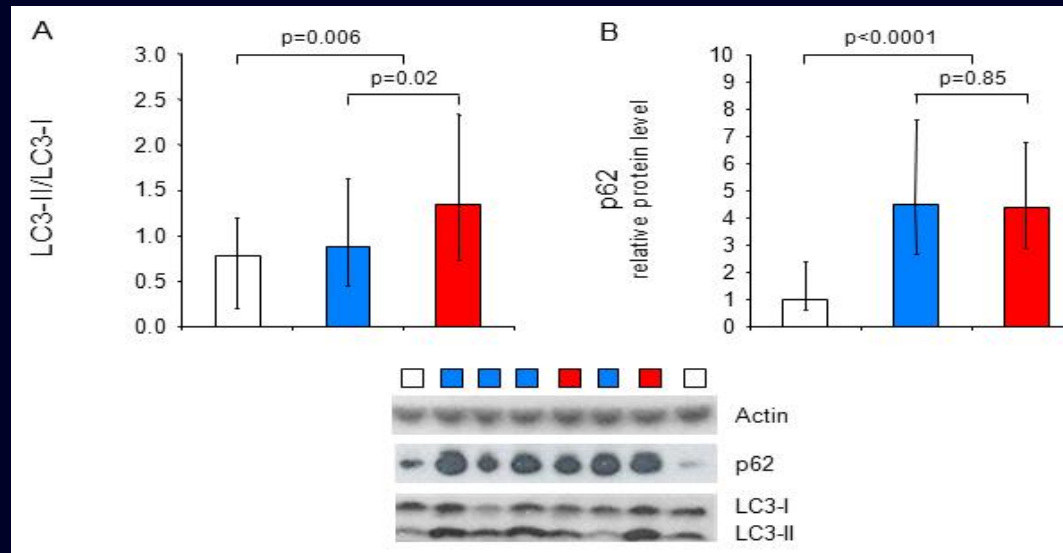
Perte de qualité avec la nutrition parentérale supplémentaire

Casaer MP. & Langouche L. et al. Crit. Care. Med. 2013



Activation insuffisante de l'autophagie pendant la maladie critique

M.P.C., K.U.Leuven



LC3-II / LC3-I

=



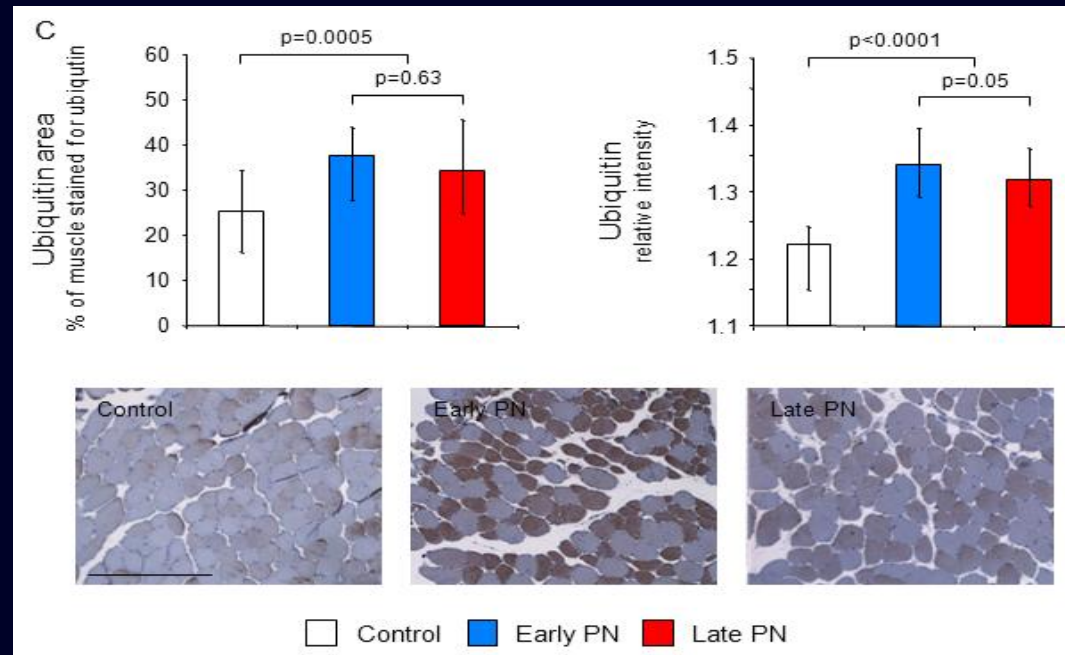
p62 accumulation



Hermans G. et al. Lancet Resp. Med. ; 2013



Inhibition de l'autophagie par la nutrition parentérale supplémentaire



Accumulation de l'ubiquitine



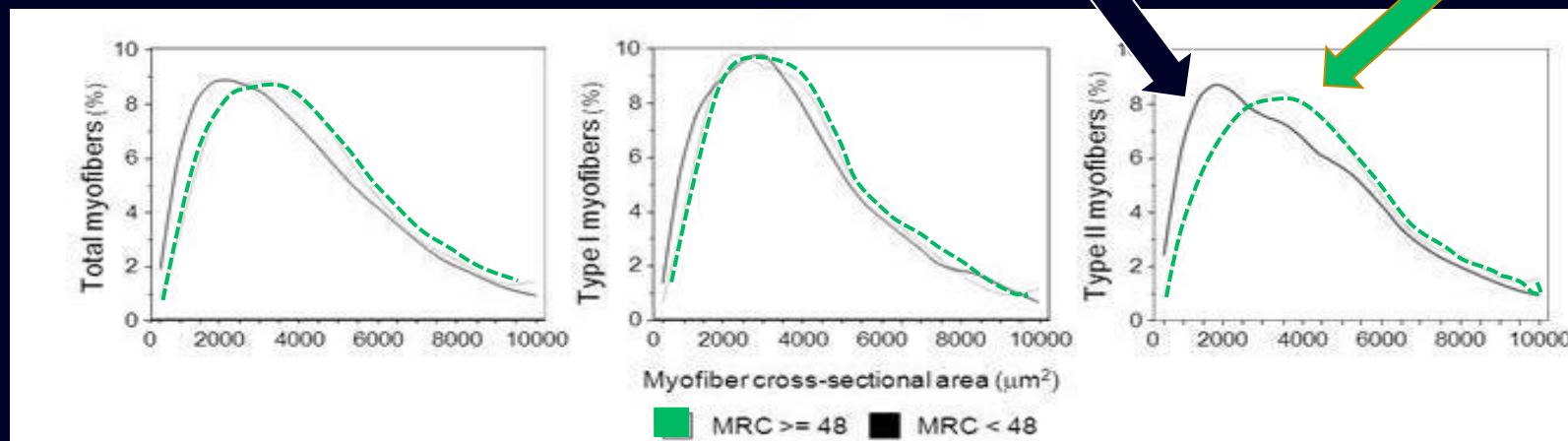


Caractéristiques musculaires de la faiblesse aux soins intensifs (n = 58)

M.P.C., K.U.Leuven

- 14/33 (42%) « Late-PN » développent la faiblesse
- versus 17/25 (68%) patients « Early PN » (p 0.05)

Taille des fibres musculaires chez les faibles comparables aux autres.



Hermans G. et al. Lancet Resp. Med. 2013



Caractéristiques musculaires de la faiblesse aux soins intensifs

M.P.C., K.U.Leuven

- Reduction **LC3-II / LC3-I** [OR 0.94 (0.87 – 1.00), P = 0.05]
(~ suppression de l'autophagie)
- Augmentation de la **densité** [OR 1.07 (1.00 – 1.17), P = 0.04]

Hermans G. et al. Lancet Resp. Med. ; 2013

M.P.C., K.U.Leuven

L'autophagie et l'échec de la nutrition (parentérale) tôt dans la maladie critique

M.P.C., K.U.Leuven

- La **nutrition, les facteurs de croissance et l'insuline** suppriment l'autophagie
 - **La dénutrition** tôt dans la maladie critique améliore l'élimination des dégâts cellulaires via l'autophagie?
- Résultats des expériences animales se traduisent en clinique mais de façon beaucoup plus subtile
 - Le rôle de l'autophagie hépatique, cardiaque, cérébrale... n'est pas facilement établi dans des études cliniques

Conclusion et perspectives

M.P.C., K.U.Leuven

- Indication thérapeutique pour l'activation de l'Autophagie:
 - Comment?
 - Quels patients?
 - Quand?
 - ...

- Obtenir la normoglycémie en soins intensifs:
mieux par la restriction alimentaire
que par l'administration de l'insuline?

M.P.C., K.U.Leuven

Conclusion et perspectives



Merci à tous

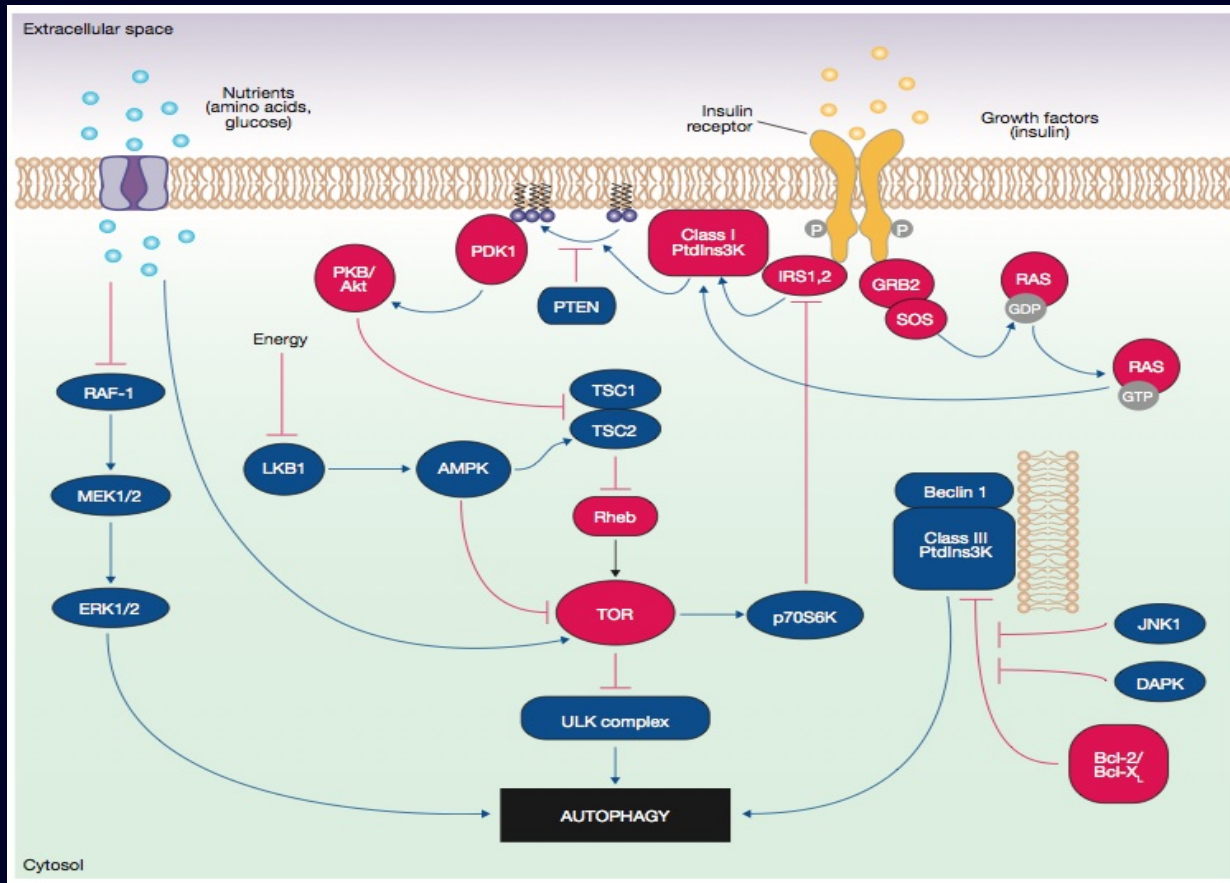


Laboratory and Clinical Department of Intensive Care Medicine

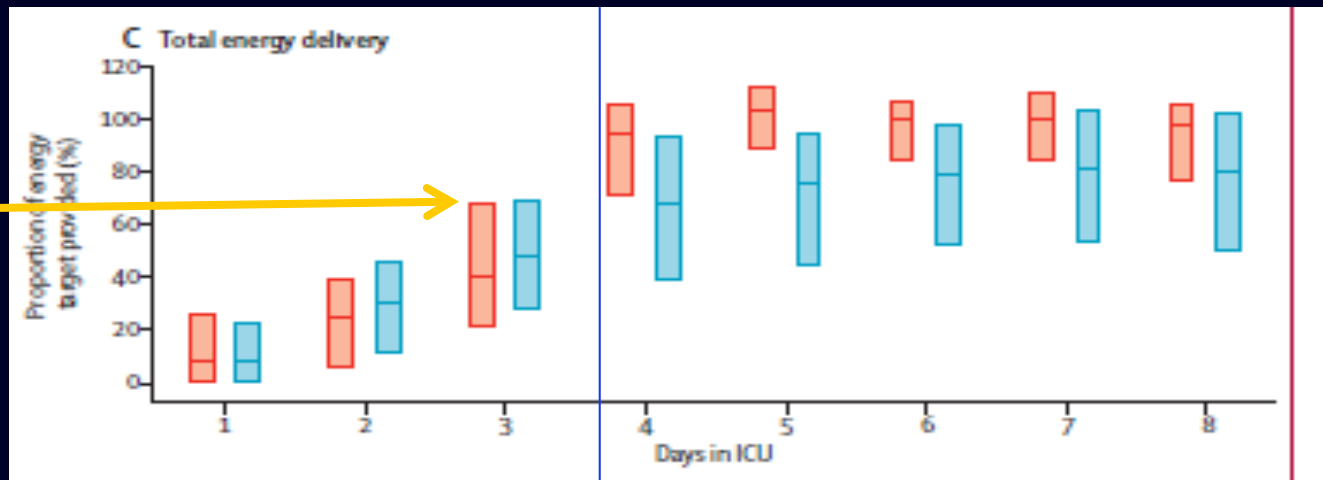


Questions or comments 😊?



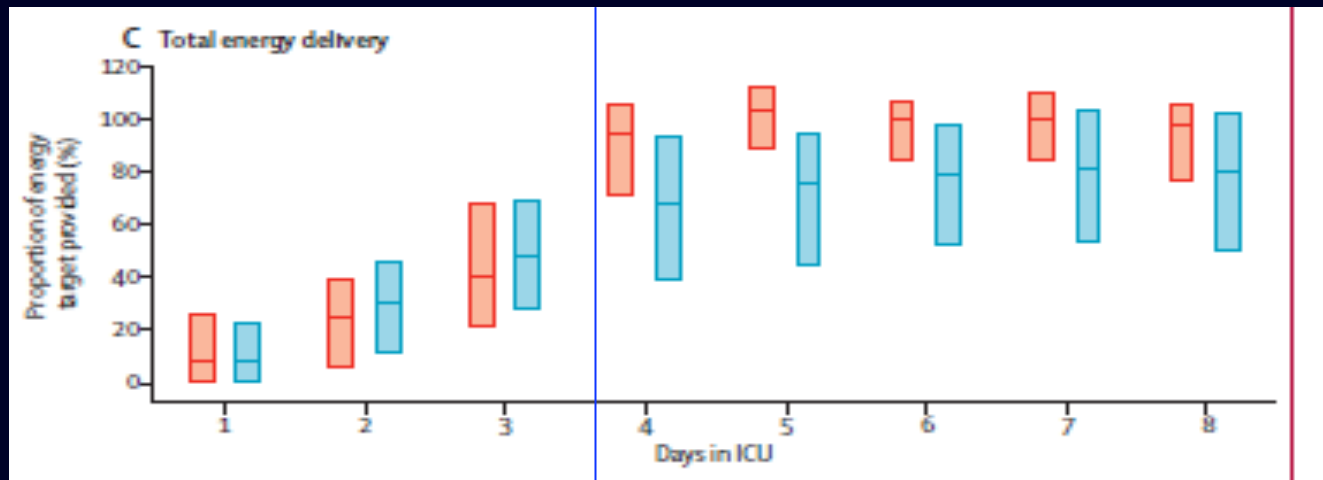


SPN trial: Insufficient EN 3 days after ICU admission



N = 305

SPN trial: Insufficient EN 3 days after ICU admission

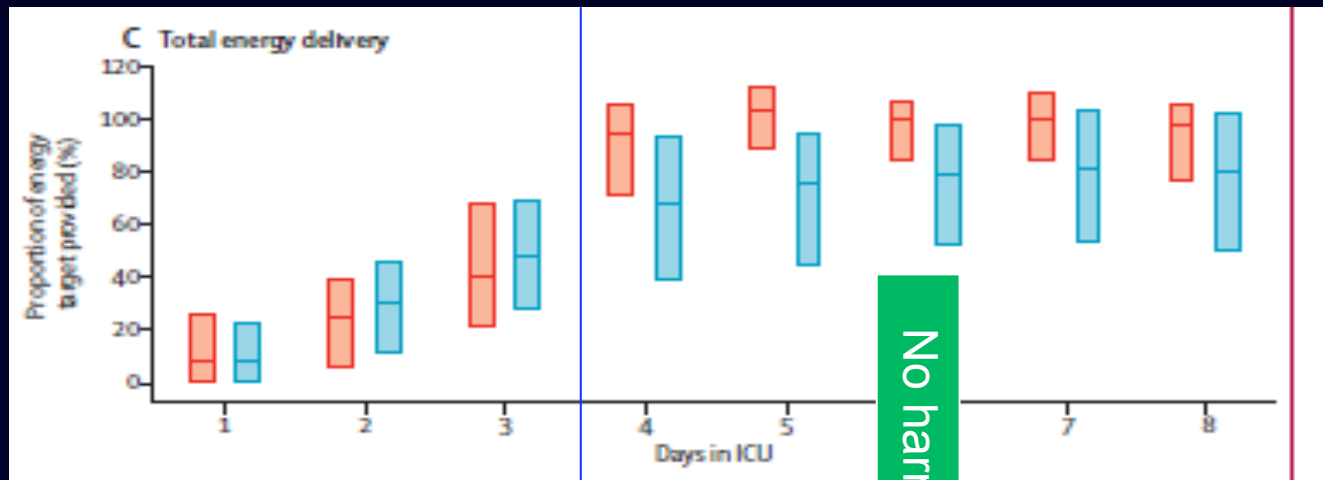


N = 305



Less infections day 9- 28
Less antibiotics

SPN trial: Insufficient EN 3 days after ICU admission



N = 305

Benefit ?

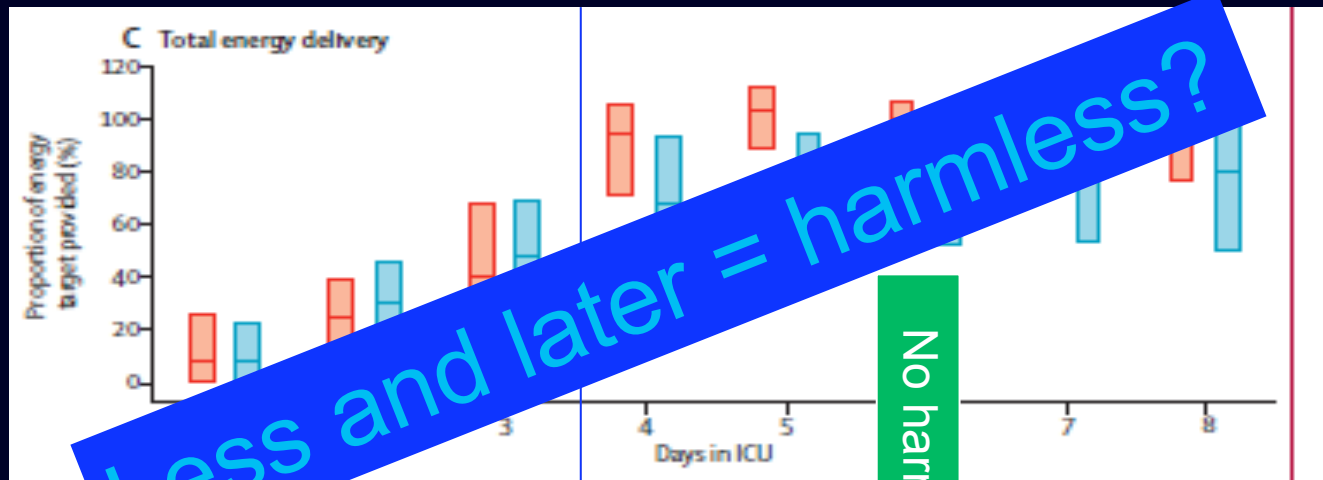
Less infections day 9- 28
Less antibiotics

No data on functional outcome

No additional infections in ICU with SPN
Equal LOS and mortality

Heidegger CP. et al. Lancet ; 2013
Heidegger CP. et al. Lancet Author reply; 2013
Casaer MP. et al. Lancet Letter to Editor ; 2013

SPN trial: Insufficient EN 3 days after ICU admission



N = 305

Less and later = harmless?

No harm

Benefit ?

Less infections day 9- 28
Less antibiotics

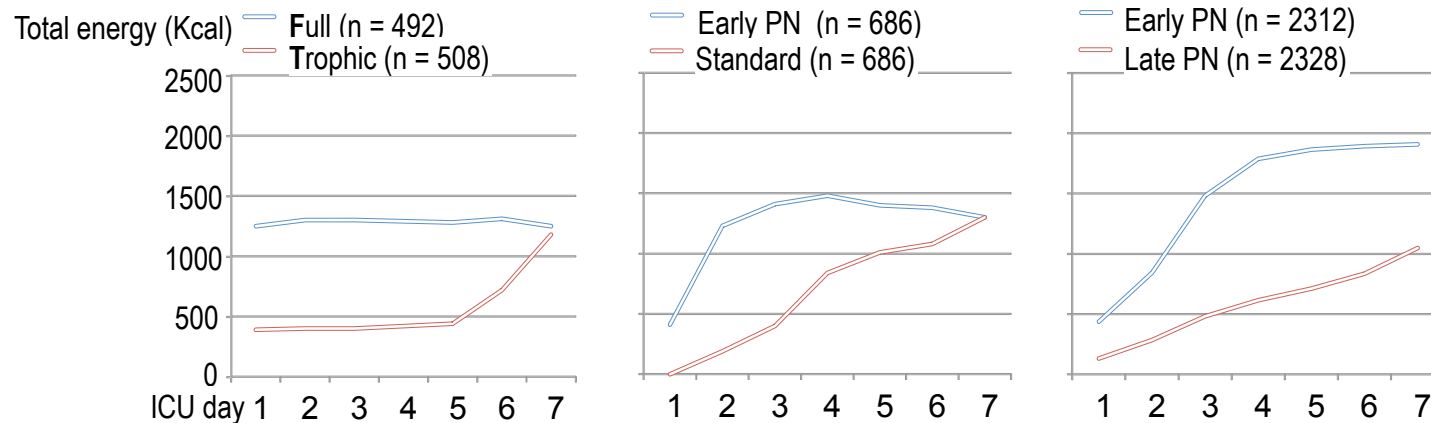
No data on functional outcome

No additional infections in ICU with SPN
Equal LOS and mortality

Heidegger CP. et al. Lancet ; 2013
Heidegger CP. et al. Lancet Author reply; 2013
Casaer MP. et al. Lancet Letter to Editor ; 2013

Summary: Early enhanced nutrition to improve **functional outcome**? No

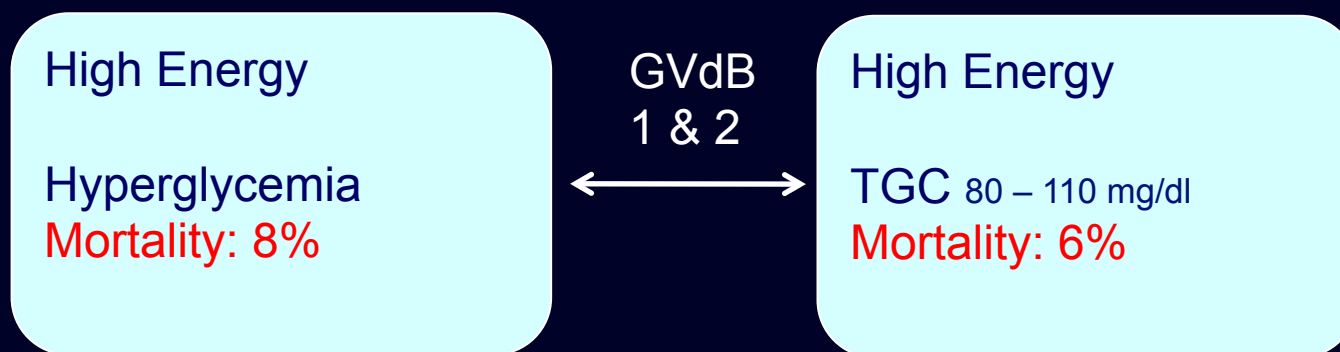
M.P.C., K.U.Leuven



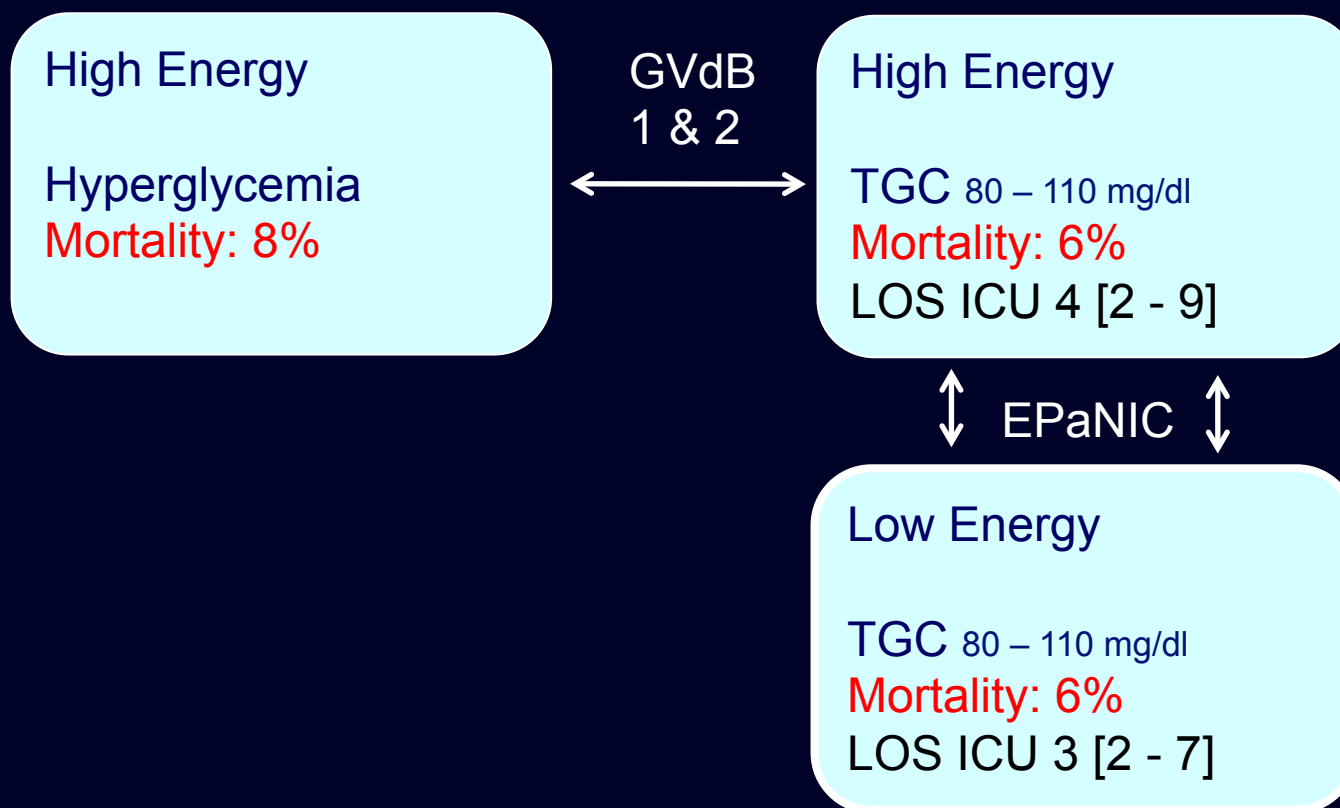
	EDEN trial (T. Rice)	Early PN trial (G. Doig)	EPaNIC trial
Muscle Volume	/	Subjective Global Assessment (SGA)	qCT & Myofiber size Myofiber catabolism
Force	MRC sum at 6 & 12 months	/	MRC Sum in ICU
Function	6 & 12 months: SF-36 6-MWD, MIP, FVC Cognition	RAND-36 status and function at day 60	Discharge: ADL, 6-MWD

M.P.C.,
K.U.Leuven
n

Balance between damage induction & removal



Balance between damage induction & removal



Balance between damage induction & removal

