

**VETAGRO SUP  
CAMPUS VETERINAIRE DE LYON**

Année 2018 - Thèse n°119

***CONSEQUENCES NEURO-MUSCULAIRES DU SEPSIS DANS  
UN MODELE SPONTANE EQUIN***

**THESE**

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I  
(Médecine - Pharmacie)  
et soutenue publiquement le 14 décembre 2018  
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

*PREMONT Antoine*





**VETAGRO SUP  
CAMPUS VETERINAIRE DE LYON**

Année 2018 - Thèse n° 119

***CONSEQUENCES NEURO-MUSCULAIRES DU SEPSIS DANS  
UN MODELE SPONTANE EQUIN***

**THESE**

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I  
(Médecine - Pharmacie)  
et soutenue publiquement le 14 décembre 2018  
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

*PREMONT Antoine*





## Liste des Enseignants du Campus Vétérinaire de Lyon (1er mars 2018)

ABITBOL	Marie	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
ALVES-DE-OLIVEIRA	Laurent	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
ARCANGIOLI	Marie-Anne	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
AYRAL	Florence	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
BECKER	Claire	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
BELLUCO	Sara	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
BENAMOU-SMITH	Agnès	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
BENOIT	Etienne	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
BERNY	Philippe	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
BONNET-GARIN	Jeanne-Marie	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
BOULOCHER	Caroline	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
BOURDOISEAU	Gilles	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
BOURGOIN	Gilles	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
BRUYERE	Pierre	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
BUFF	Samuel	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
BURONFOSSE	Thierry	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
CACHON	Thibaut	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
CADORÉ	Jean-Luc	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
CALLAIT-CARDINAL	Marie-Pierre	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
CAROZZO	Claude	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
CHABANNE	Luc	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
CHALVET-MONFRAY	Karine	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
DE BOYER DES ROCHES	Alice	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
DELIGNETTE-MULLER	Marie-Laure	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
DEMONT	Pierre	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
DJELOUADJI	Zorée	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
ESCRIOU	Catherine	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
FRIKHA	Mohamed-Ridha	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
GALIA	Wessam	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences Stagiaire
GILOT-FROMONT	Emmanuelle	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
GONTHIER	Alain	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
GRANCHER	Denis	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
GREZEL	Delphine	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
HUGONNARD	Marine	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
JANKOWIAK	Bernard	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences Contractuel
JAUSSAUD	Philippe	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
JEANNIN	Anne	DEPT-ELEVAGE-SPV	Inspecteur en santé publique vétérinaire (ISPV)
JOSSON-SCHRAMME	Anne	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences Contractuel
JUNOT	Stéphane	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
KODJO	Angéli	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
KRAFFT	Emilie	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
LAABERKI	Maria-Halima	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
LAMBERT	Véronique	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
LE GRAND	Dominique	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
LEBLOND	Agnès	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
LEDOUX	Dorothee	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences Stagiaire
LEFEBVRE	Sébastien	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences Stagiaire
LEFRANC-POHL	Anne-Cécile	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
LEPAGE	Olivier	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
LOUZIER	Vanessa	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
MARCHAL	Thierry	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
MATEOS	Stevana	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences Contractuel
MOISSONNIER	Pierre	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
MOUNIER	Luc	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
PEPIN	Michel	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
PIN	Didier	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
PONCE	Frédérique	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
PORTIER	Karine	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
POUZOT-NEVORET	Céline	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
PROUILLAC	Caroline	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
REMY	Denise	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
RENE MARTELLET	Magalie	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
RIVES	Germain	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences Contractuel
ROGER	Thierry	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
SABATIER	Philippe	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
SAWAYA	Serge	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
SCHRAMME	Michael	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
SERGENTET	Delphine	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
THIEBAULT	Jean-Jacques	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
THOMAS-CANCIAN	Auréli	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences Contractuel
TORTEREAU	Antonin	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
VIGUIER	Eric	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
VIRIEUX-WATRELOT	Dorothee	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences Contractuel
ZENNER	Lionel	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur



# Remerciements

A Monsieur le Professeur Jean-Jacques LEHOT  
De la Faculté de Médecine Claude Bernard de Lyon,  
Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse.  
Hommages respectueux.

A Madame la Maître de Conférences Sara BELLUCO  
De VetAgro Sup, Campus Vétérinaire de Lyon,  
Qui m'a fait l'honneur d'accepter l'encadrement de ce travail.  
Pour ses précieux conseils, la confiance et la liberté qu'elle m'a m'accorder.  
Pour sa bonne humeur et son enthousiasme même en salle d'autopsie.  
Sincères remerciements.

A Madame la Maître de Conférences Agnès BENAMOU-SMITH  
De VetAgro Sup, Campus Vétérinaire de Lyon,  
Pour avoir accepté de prendre part à ce jury de thèse.  
Pour sa gentillesse et sa disponibilité durant l'année.  
Sincères remerciements.

A Mademoiselle le Docteur Lorna Gueniot,  
Du laboratoire de neuropathologie expérimentale de l'Institut Pasteur,  
Pour son soutien de tous les instants, ses chocolats et ses pauses café.  
Pour m'avoir fait découvrir le monde de la recherche à ses côtés.  
Qu'elle trouve ici l'expression de toute ma gratitude et mon amitié.









# Table des matières

Table des annexes.....	11
Table des figures .....	13
Table des tableaux.....	15
Liste des abréviations .....	17
Introduction .....	21
<b>PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>23</b>
I.    Le sepsis : origine et conséquences cliniques .....	25
I.1 L'agent infectieux et la réponse immunitaire .....	26
I.2 La rupture de l'homéostasie tissulaire et la défaillance multi-organique .....	39
I.3 Le coût économique et humain du sepsis .....	47
II.   Les conséquences neuromusculaires du sepsis.....	50
II.1 Importance des conséquences neuromusculaires pour les patients humains.....	50
II.2 Les mécanismes physiopathologiques de l'encéphalopathie associée au sepsis.....	53
II.3 Les altérations de la fibre musculaire lors de sepsis.....	57
III.  Comment étudier le sepsis ? .....	60
III.1 Les limites des modèles murins de sepsis .....	60
III.2 La nécessité de changer d'approche .....	67
III.3 Une place à prendre pour les modèles spontanés dans l'étude du sepsis.....	69
<b>SECONDE PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE DES CONSEQUENCES NEUROMUSCULAIRES DU SEPSIS D'ORIGINE ABDOMINAL CHEZ LE CHEVAL..</b>	<b>73</b>
I.    Matériel et méthode.....	75
I.1 Objectifs de l'étude .....	75
I.2 Sélection des chevaux .....	75
I.3 Recueil de données cliniques .....	75
I.4 Prélèvements .....	76
I.5 Dosage de cytokines .....	77

I.6 Immunohistochimie du tissu encéphalique .....	78
I.7 Immunofluorescence du tissu musculaire .....	79
I.8 Analyse morphologique .....	81
I.9 Analyse statistique .....	81
II. Résultats.....	83
II.1 Données cliniques, description de la cohorte .....	83
II.2 Evaluation de l'inflammation systémique .....	87
II.3 Evaluation des conséquences cérébrales du sepsis.....	92
II.4 Evaluation des conséquences musculaires du sepsis .....	104
III. Discussion.....	117
III.1 Evaluation des défaillances organiques.....	117
III.2 Evaluation de la réponse immunitaire .....	118
III.3 Réactivité microgliale des chevaux septiques .....	123
III.4 Des altérations fonctionnelles de la cellule musculaire dans le sepsis à explorer..	125
III.5 Points forts et limites de l'étude .....	126
IV. Perspectives .....	128
CONCLUSION .....	131
Bibliographie .....	133
Annexes .....	167

# Table des annexes

Annexe 1 : Critères clinique du score SOFA .....	167
Annexe 2 : Critères cliniques du score qSOFA.....	168
Annexe 3 : Score MODS SGI .....	169
Annexe 4 : Score de défaillance multi-organique utilisé dans notre étude .....	170
Annexe 5 : Anticorps utilisés pour les marquages histologiques.....	171



# Table des figures

<b>Figure 1</b> - Définition du sepsis selon le consensus de 2016 (14) .....	25
<b>Figure 2</b> - Répartition des portes d'entrée de sepsis chez l'Homme (3,18–22).....	26
<b>Figure 3</b> - Les micro-organismes retrouvés lors de sepsis en pourcentage d'après (21).....	28
<b>Figure 4</b> - Activation de la réponse immunitaire.....	30
<b>Figure 5</b> - Modifications de la réponse immunitaire lors du sepsis.....	33
<b>Figure 6</b> - Compartimentalisation de la réponse inflammatoire lors d'une infection .....	37
<b>Figure 7</b> - Altérations microvasculaires lors de sepsis .....	41
<b>Figure 8</b> - Effets du sepsis sur la cascade de coagulation .....	44
<b>Figure 9</b> - Reprogrammation métabolique au cours du sepsis .....	46
<b>Figure 10</b> - Symptômes et neuro-localisation des lésions lors de SAE (228) .....	52
<b>Figure 11</b> - Processus d'activation microgliale.....	54
<b>Figure 12</b> - Etape de réalisation d'une ligature et ponction du caecum (CLP) (d'après (252))	64
<b>Figure 13</b> - Race des chevaux de la cohorte .....	84
<b>Figure 14</b> - Age et sexe des chevaux de la cohorte .....	84
<b>Figure 15</b> - Durée d'évolution des signes cliniques.....	85
<b>Figure 16</b> - Score de défaillance organique.....	85
<b>Figure 17</b> - Paramètres hémato-biochimiques.....	86
<b>Figure 18</b> - Concentration en IL-10.....	88
<b>Figure 19</b> - Intensité de fluorescence pour quelques cytokines.....	89
<b>Figure 20</b> - Intensité de fluorescence pour les cytokines sériques .....	91
<b>Figure 21</b> - Morphologie microgliale dans le cortex occipital .....	92
<b>Figure 22</b> - Surface de marquage dans le corps strié.....	92
<b>Figure 23</b> - Surface de Marquage Iba-1 dans les cortex préfrontal, frontal et occipital.....	93
<b>Figure 24</b> - Surface de marquage Iba-1 dans le cervelet .....	95
<b>Figure 25</b> - Surface de marquage Iba-1 dans le mésencéphale .....	96
<b>Figure 26</b> - Effet du sexe sur la surface de marquage Iba-1 dans le cortex préfrontal.....	96
<b>Figure 27</b> - Effet de l'âge sur la surface de marquage Iba-1 .....	99
<b>Figure 28</b> - Histogrammes des valeurs propres et des pourcentages de variance cumulés ...	100
<b>Figure 29</b> - Représentation du premier plan factoriel.....	102
<b>Figure 30</b> – Cercle des corrélations .....	102

<b>Figure 31</b> - Représentation des plans factoriels de dimension 3 et 4, et 4 et 5.....	103
<b>Figure 32</b> - Surface des fibres musculaires .....	104
<b>Figure 33</b> - Taille des fibres musculaires .....	104
<b>Figure 34</b> - Pourcentages de fibres de taille extrême .....	105
<b>Figure 35</b> - Effet de l'âge sur les fibres de taille extrême .....	105
<b>Figure 36</b> - Cryosection transversale de muscle immunomarquée.....	106
<b>Figure 37</b> - Evaluation de la vascularisation musculaire.....	106
<b>Figure 38</b> – Intensité de fluorescence du marquage Von Willebrand .....	108
<b>Figure 39</b> - Types de fibre .....	108
<b>Figure 40</b> - Typage de fibres musculaires par immunofluorescence.....	109
<b>Figure 41</b> - Evaluation du Protéasome .....	110
<b>Figure 42</b> - Histogrammes des valeurs propres et des pourcentages de variance cumulés ...	111
<b>Figure 43</b> - Représentation des différents plans factoriels .....	113
<b>Figure 44</b> - Cercle des corrélations.....	114
<b>Figure 45</b> - Représentation des individus partiels dans le premier plan factoriel .....	114



# Table des tableaux

<b>Tableau I</b> - Localisation des infections à l'origine de sepsis chez l'Homme (3,18–22) .....	26
<b>Tableau II</b> - Exemples d'essais cliniques de traitements spécifiques contre le sepsis (228)...	61
<b>Tableau III</b> - Composition de la cohorte.....	83
<b>Tableau IV</b> - Concentrations sériques en cytokines.....	87
<b>Tableau V</b> - Nombre de concentrations calculables.....	90
<b>Tableau VI</b> - Résultats de l'analyse de la surface microgliale .....	94
<b>Tableau VII</b> - Effet du sexe sur la surface de marquage Iba-1 .....	97
<b>Tableau VIII</b> - Tableau des coefficients de corrélation canonique.....	100
<b>Tableau IX</b> - Tableau des contributions des groupes de variables aux axes factoriels.....	101
<b>Tableau X</b> - Comparaison des sous-populations du groupe septique .....	107
<b>Tableau XI</b> - Tableau des coefficients de corrélation canonique.....	111
<b>Tableau XII</b> - Tableau des contributions des groupes de variables aux axes factoriels .....	112
<b>Tableau XIII</b> - Tableau des corrélations des groupes de variable .....	115
<b>Tableau XIV</b> - Rôles et fonction des cytokines au cours du sepsis .....	119
<b>Tableau XV</b> - Réactivité microgliale au cours du sepsis selon les espèces .....	123



# Liste des abréviations

< LC : inférieur à la limite de calcul  
°C : degré Celsius  
µg : microgramme  
µL : microlitre  
µmol : micromole  
ADN : Acide Désoxyribonucléique  
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché  
ATIII : Antithrombine III  
ATP : Adénosine Triphosphate  
BHE : Barrière hémato-encéphalique  
bpm : battements par minute  
CAM-ICU Confusion Assessment Method for the Intensive Care Unit  
Cf. : confère  
CIM : Critical Illness Myopathy  
CIP : Critical Illness Polyneuropathy  
CIVD : Coagulation Intravasculaire Disséminée  
CMAP : Compound Muscular Action Potentials, potentiels d'action musculaires composés  
CRP : Protéine-C Réactive  
DAMPs : Danger Associated Molecular Patterns  
DC : Cellule Dendritique  
EEG : Electroencéphalogramme  
EMG : Electromyogramme  
FBXO 32 : F-box only protein 32  
FDA : Food and Drug Administration  
Fig. : Figure  
FiO<sub>2</sub> : Fraction inspirée en dioxygène  
GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor  
Iba1 : ionized calcium-binding adapter molecule 1  
IC : Intervalle de Confiance  
ICUAW : Intensive Care Unit Acquired Weakness

IFN : Interféron  
IL : Interleukine  
IL-1 RA : IL-1 Receptor Antagonist  
iNOS : inductible NO synthase  
kg : kilogramme  
L : litre  
LB : Lymphocyte B  
LPS: lipopolysaccharide  
LT : Lymphocyte T  
LTB4 : Leucotriène B4  
LTH1 : Lymphocyte T Helper 1  
LTH2 : Lymphocyte T Helper 2  
MDSC : Myeloïd-Derived Suppressor Cells  
min : minute  
mL : millilitre  
mmHg : millimètres de mercure  
mmol.L<sup>-1</sup> : millimole par litre  
MODS SGI : Multiple Organ Dysfunction Syndrome with acute Surgical Gastrointestinal disease  
mpm : mouvements par minute  
mTOR : mammalian Target Of Rapamycin  
NA : Non applicable  
NET : Neutrophil Extracellular Traps  
NLR : NOD-Like Receptor  
NO : oxyde nitrique  
NS : Non-significatif  
OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
PA : Activateur du Plasminogène  
PAI 1 : Plasminogen Activator Inhibitor 1  
PAM : Pression Artérielle Moyenne  
PAMPs : Pathogenes Associated Molecular Patterns  
PaO<sub>2</sub> : Pression artérielle partielle en dioxygène  
PNN : Polynucléaires Neutrophiles  
PRR : Pattern-Recognition Receptor

qSOFA : quick SOFA

ROS : Reactive Oxygen Species, espèces réactives de l'oxygène

SAE : Sepsis-Associated Encephalopathy, encéphalopathie associée au sepsis

SIRS : Systemic Inflammatory Response Syndrome, syndrome inflammatoire systémique

SNAP : Sensory Nerve Action Potentials, potentiels d'action des nerfs sensoriels

SNC : Système Nerveux Central

SNP : Système Nerveux Périphérique

SOFA : Sequential [Sepsis-related] Organ Failure Assessment

Tab. : Tableau

TF : Facteur tissulaire

TFPI : Tissue Factor Pathway Inhibitor

TLR : Toll-Like Receptor

TNF : Tumor Necrosis Factor

Treg : Lymphocyte T régulateur

TRIM 63 : tripartite motif containing 63

UFC : Unité formant une colonie



# Introduction

Encore aujourd'hui, au début du XXIème siècle, le sepsis tue une personne toutes les 3 à 4 secondes. Ce syndrome décrit pour la première fois en 1837 par un médecin français, Pierre Piorry, sous le nom de septicémie reste toujours d'actualité (1). Dans les pays développés, il est aussi mortel que l'infarctus du myocarde et touche principalement les personnes âgées et fragiles (2). Dans les pays en voie de développement ce sont les nouveau-nés qui payent le plus lourd tribut avec plusieurs millions de morts par an (3).

Les progrès dans le domaine de la santé humaine et vétérinaire ont permis d'éradiquer certains pathogènes comme les virus de la peste bovine ou de la variole et nous ont doté de moyens efficaces de lutte contre beaucoup d'autres agents étiologiques. Le développement d'outils thérapeutiques anti-infectieux ainsi que le perfectionnement des techniques de réanimation ont amélioré le pronostic des patients atteints de sepsis. Cependant la mortalité reste autour de 20% chez l'homme dans les pays développés (4) et est bien supérieure chez nos animaux domestiques (47% chez le chien (5), 33% dans les sepsis pulmonaires chez le cheval (6)). De plus chez l'homme le sepsis est à l'origine de séquelles chez les survivants qui diminuent leur espérance et leur qualité de vie (7). De nombreux organes peuvent être impliqués en particulier ceux des systèmes nerveux et musculaire menant à des déficits cognitifs et de mémorisation ou à de la faiblesse musculaire.

Bien que notre compréhension des mécanismes physiopathologiques mis en jeu dans ce syndrome s'améliore et que de multiples traitements se sont montrés très efficaces dans les différents modèles murins de la maladie aucun des 80 essais cliniques tentés chez l'homme depuis une trentaine d'année n'a pu aboutir à un traitement utilisable cliniquement (8,9). Les méthodes de recherche et notamment la pertinence des modèles dans ce domaine doivent donc être remises en questions (10) et le développement de nouveaux modèles doit être encouragé.

Dans ce contexte, nos animaux domestiques ont un rôle à jouer. Leur environnement et leur mode de vie sont depuis plusieurs millénaires conditionnés au nôtre. Le développement de

la médecine vétérinaire a mis en lumière dans les dernières années les ressemblances frappantes qui existent entre la pathologie humaine et vétérinaire. Ces ressemblances ont déjà mené à l'utilisation de modèles spontanés vétérinaires dans certains domaines comme la neurologie (11), la cancérologie (12) ou les soins intensifs (13). L'espèce la plus souvent utilisée reste le chien ; cependant d'autres espèces peuvent être envisagées en fonction de leurs caractéristiques physiologiques. Le cheval a un rôle à jouer dans le domaine du sepsis du fait de sa sensibilité naturelle aux infections.

Au cours de ce travail, je me suis intéressé aux conséquences neuromusculaires du sepsis en faisant l'hypothèse que des altérations engendrées lors de la phase aigüe du sepsis sont à l'origine des séquelles au long terme selon un mécanisme physiopathologique commun à tous les mammifères. L'étude se limitera aux lésions neuromusculaires induites lors du sepsis de l'adulte ; les particularités du sepsis néonatal ne seront pas envisagées. Après une étude des données de la littérature chez l'homme et dans différents modèles de sepsis, je présenterai une étude expérimentale, réalisée dans le laboratoire de neuropathologie expérimentale de l'Institut Pasteur, centrée sur des altérations neuromusculaires consécutives à un sepsis d'origine abdominal chez le cheval.



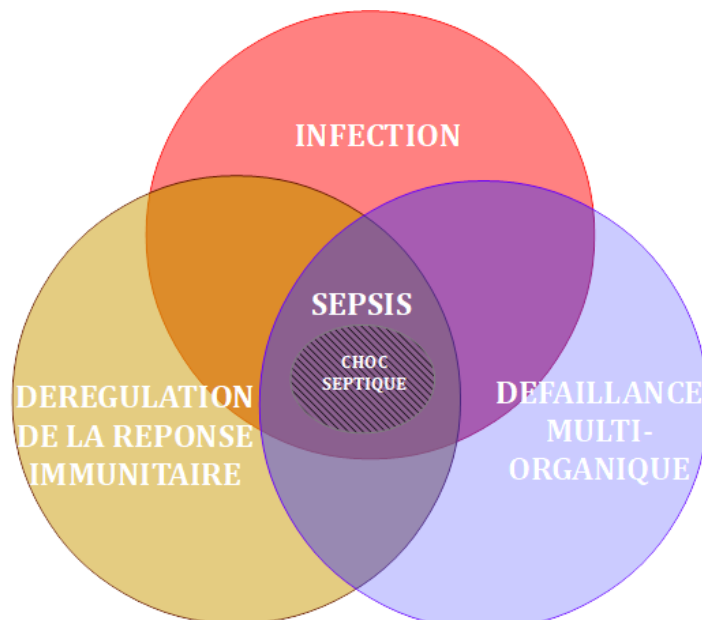
**PREMIERE PARTIE : ETUDE  
BIBLIOGRAPHIQUE**



Le sepsis est un syndrome complexe impliquant de nombreux systèmes de l'organisme et dont la compréhension n'est encore aujourd'hui pas tout-à-fait complète. Dans cette partie je me propose d'expliquer les mécanismes physiopathologiques à l'origine des signes cliniques majeurs chez les patients puis de détailler les conséquences neuromusculaires de ce syndrome avant d'expliquer les grands défis auxquels la recherche fait face dans ce domaine.

## I. Le sepsis : origine et conséquences cliniques

En 2016, le sepsis est défini comme étant un dysfonctionnement organique mortel causé par une dérégulation de la réponse de l'hôte à un agent pathogène (14) (cf. Figure (Fig.) 1). Cette définition met l'accent sur la perturbation de l'homéostasie de la réponse immunitaire ainsi que sur les modifications non immunologiques telles que celles de la coagulation, du système cardiovasculaire, du métabolisme énergétique, du système autonome, du système nerveux et hormonal (15–17). Dans une première partie, l'interaction entre l'hôte et l'agent infectieux sera détaillée. La deuxième partie s'intéressera aux mécanismes à l'origine de la défaillance multi-organique. Enfin la dernière partie mettra en relief les caractéristiques cliniques du syndrome et ses évolutions chez l'homme.



*Figure 1 - Définition du sepsis selon le consensus de 2016 (14)*

## **I.1 L'agent infectieux et la réponse immunitaire**

### **I.1.1 L'origine de l'infection**

L'infection est un point central dans le développement d'un sepsis. Elle se développe à partir d'un point d'entrée primaire et peut être causé par une grande variété d'agents pathogène.

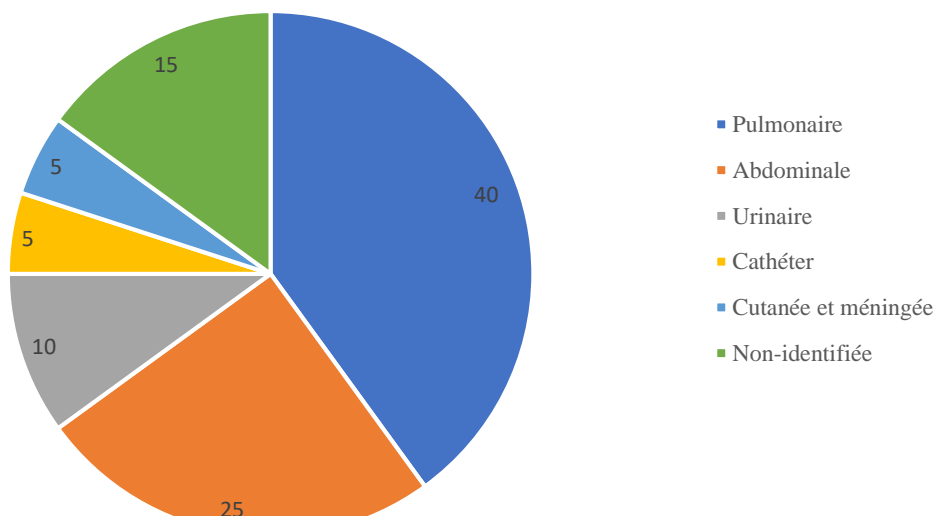
#### **I.1.1.1 Les portes d'entrée**

Chez l'homme plusieurs études ont été réalisées dans différents pays mettant en évidence des résultats parfois légèrement différents (3,18–22). On peut néanmoins estimer une répartition comme présentée dans le tableau 1 et la figure 2.

Les voies d'entrée pulmonaire et abdominale sont les plus représentées. Il est également possible de remarquer que pour un pourcentage non négligeable de cas (15%) aucune origine infectieuse n'a pu être mise en évidence.

*Tableau 1 - Localisation des infections à l'origine de sepsis chez l'Homme (3,18–22)*

<b>Porte d'entrée</b>	<b>Pourcentage des cas de sepsis</b>
<b>Pulmonaire</b>	40%
<b>Abdominale</b>	25%
<b>Urinaire</b>	10%
<b>Cathéter</b>	5%
<b>Cutanée et méningée</b>	5%
<b>Non-identifiée</b>	15 %



*Figure 2 - Répartition des portes d'entrée de sepsis chez l'Homme (3,18–22)*

Chez le cheval aucune étude épidémiologique ne permet de connaître cette répartition. Cependant deux études s'intéressent à la prévalence et à l'origine des endotoxémies dans cette espèce (23,24). Ce terme d'endotoxémie renvoie à la présence d'endotoxine bactérienne dans le sang et est à l'origine d'un syndrome proche de celui du sepsis. En médecine équine les termes de sepsis et d'endotoxémie sont souvent utilisés, à tort, de façon confondue. Ce syndrome endotoxémique a une origine principalement abdominale chez le cheval, on peut donc raisonnablement penser que c'est également la porte d'entrée principale du sepsis dans cette espèce.

#### I.1.1.2 Les résultats microbiologiques

L'origine microbiologique du sepsis est établie dans 60% des cas humains dans la plupart des études (2,18,21,22,25). La majorité des sepsis dans les pays développés sont bactériens avec une proportion généralement légèrement plus importante de bactéries Gram positives (40%) que de Gram négatives (38%) et 18% d'infections mixtes. Les sepsis fongiques sont en forte augmentation et représentent 17% des infections (2,21,25). La répartition des micro-organismes retrouvés lors de sepsis en pourcentage d'après un étude réalisée dans plusieurs unités de soins intensifs européennes (21), est présentée dans la figure 3.

Dans les pays en développement, il est possible de retrouver des sepsis dus à des pathogènes atypiques viraux et parasitaires en plus grande proportion ainsi que d'entérobactéries (26–28). En médecine vétérinaire équine, nous ne disposons pas de ces données bactériologiques récoltées à grande échelle. En revanche, quelques données sont disponibles concernant les affections abdominales pouvant être responsables d'endotoxémie et de sepsis. Une étude réalisée par Johns et al. (29), s'est intéressée à l'incidence de la bactériémie chez des chevaux adultes en diarrhée. Elle a révélé une culture positive dans 29% des cas. Les organismes les plus souvent rencontrés sont *Corynebacterium* et *Streptococcus*. Un effet significatif de cette bactériémie a été mise en évidence sur la survie et la sévérité des signes cliniques. Une deuxième étude s'est intéressée à la translocation de bactéries dans la lymphe mésentérique et le sang après résection et anastomose de la paroi intestinale. Une incidence similaire à celle retrouvée chez les patients humains (11,4% vs 14%) a été mise en évidence (30). L'incidence de la bactériémie était très faible (2,7%). L'organisme le plus fréquemment rencontré est *Escherichia coli* comme cela est le cas chez les poulains (31) et dans d'autres espèces (32,33).

Le nombre limité de chevaux inclus dans ces études et l'absence d'étude dans une population de chevaux septiques rend l'interprétation de ces résultats difficile même s'ils semblent corrélés avec les observations recueillies chez l'homme.

■ Gram positive ■ Gam négative ■ Anaérobies ■ Pathogènes atypiques ■ Champignons

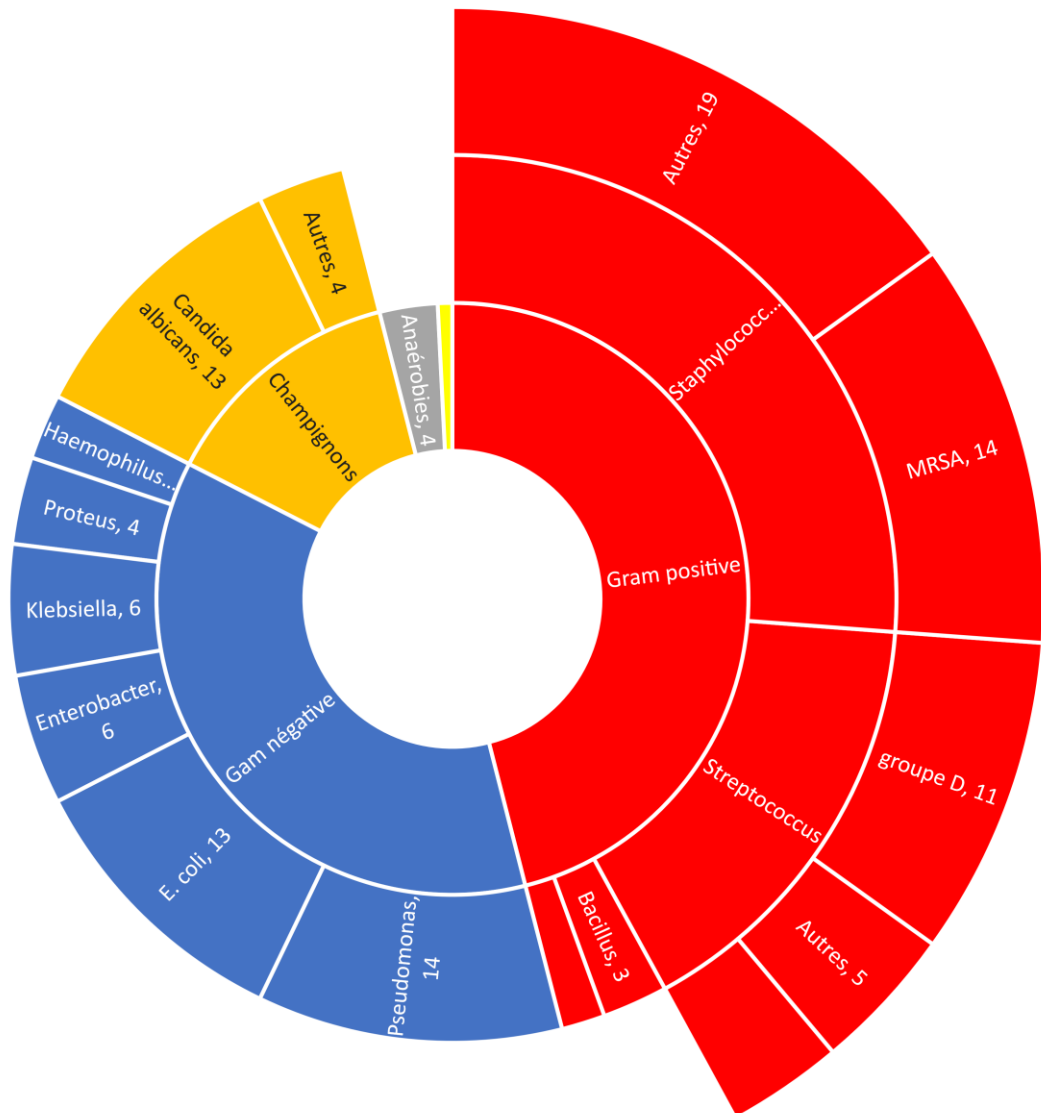


Figure 3 - Les micro-organismes retrouvés lors de sepsis en pourcentage d'après (21)

## I.1.2 Le dérèglement de la réponse immunitaire

Une infection déclenche une réponse de l'organisme à la fois complexe et prolongée mêlant des mécanismes pro-inflammatoires et anti-inflammatoires visant à éliminer l'infection et à assurer la réparation des tissus. Lorsque l'on assiste à une dérégulation de cette réponse, les mécanismes pro-inflammatoires peuvent être à l'origine de dommages tissulaires tandis que les mécanismes anti-inflammatoires entraînent une immunosuppression à l'origine de surinfections (34). Cette partie détaillera les mécanismes de reconnaissance du pathogène, les altérations de la réponse immunitaire qui en découlent puis signalera les différences qui existent entre les compartiments.

### I.1.2.1 La reconnaissance de l'agent pathogène

Dans l'organisme la réponse immunitaire s'organise à la suite de la stimulation des cellules de l'immunité innée par des structures issues des micro-organismes pathogènes appelées *Pathogenes Associated Molecular Patterns* (PAMPs) telles que le lipopolysaccharide (LPS) ou le peptidoglycane mais aussi par des structures endogènes marqueurs de souffrance cellulaire appelées les *Danger Associated Molecular Patterns* (DAMPs) comme les radicaux libres, le potassium, l'acide désoxyribonucléique (ADN) ou les histones. Dans les deux cas ces molécules sont reconnues par des récepteurs cellulaires spécifiques nommés *Pattern-Recognition Receptor* (PRR).

Il existe deux types majoritaires de PRR différents capables de reconnaître spécifiquement ces signaux (35) : les *Toll-Like Receptor* (TLR) et les *NOD-Like Receptor* (NLR).

- Les TLR sont des récepteurs membranaires qui reconnaissent des éléments bactériens viraux ou fongiques. Le TLR 4 par exemple est impliqué dans la reconnaissance du LPS (36). La fixation de leur ligand aboutit à l'activation de voies de transduction qui se terminent par la libération de quatre facteurs de transcriptions principaux : NF- $\kappa$ B, AP-1, IRF 3 et IRF 7 (35). L'action synergique de NF- $\kappa$ B et AP-1 déclenche la transcription de gènes codant des cytokines, chimiokines et peptides antimicrobiens (défensines, cathélicidines) (35). Les IRF permettent la sécrétion des interférons notamment de type 1.
- Les NLR sont des récepteurs intracellulaires capables de lier à la fois des molécules issues de pathogènes mais aussi des signaux de danger. La polymérisation de ces récepteurs couplés à leurs ligands avec des protéines adaptatrices permet la fixation de la procaspase 1 et la formation d'une structure supramoléculaire complexe :

l'inflammasome. Le clivage de la procaspase 1 en caspase 1 par l'inflammasome permet son activation. Elle peut alors à son tour activer par clivage l'Interleukine (IL) 1 et l'IL 18 qui sont les premières cytokines libérées (37,38). Ces mécanismes sont illustrés dans la figure 4.

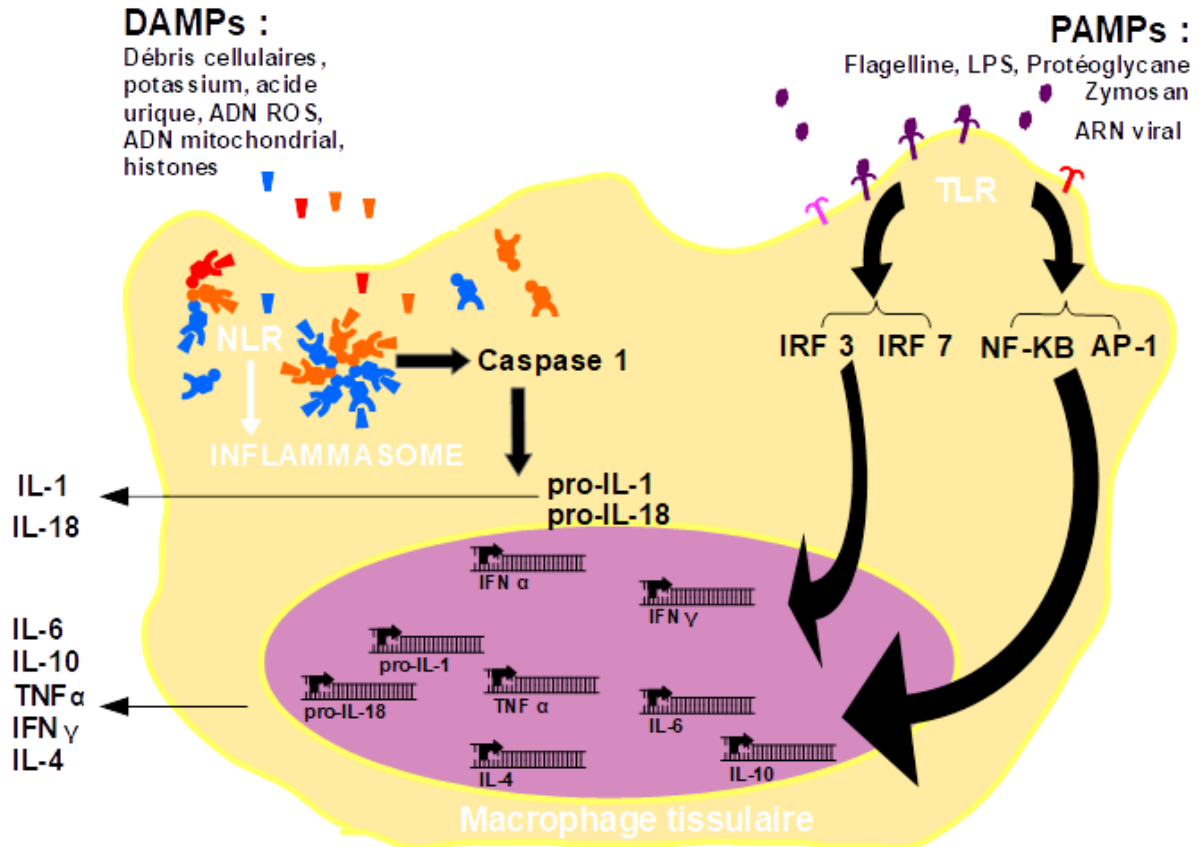


Figure 4 - Activation de la réponse immunitaire

L'initiation de la réponse immunitaire est assurée par la reconnaissance de signaux endogènes et exogènes par les cellules de l'immunité innée via les Toll-Like Receptor (TLR) et les NOD-Like Receptor (NLR). Elle aboutit à la sécrétion de cytokines.

Le type et la quantité de cytokines libérées sont dépendants de nombreux facteurs comme les PRR stimulés, la quantité de pathogènes, la présence d'affections concomitantes, le type cellulaire... (35).

Au cours du sepsis la libération de cytokines est majeure et les concentrations plasmatiques peuvent être très élevées. On retrouve à la fois une production de cytokines pro-inflammatoires à savoir majoritairement le Tumor Necrosis Factor (TNF)- $\alpha$ , l'IL-6 et l'IL1 mais aussi de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 (36,39). Les endotoxines comme le LPS et les exotoxines sont les molécules les plus souvent impliquées dans la stimulation de cette production. Ces toxines sont spécifiques de la souche bactérienne, ainsi le type d'infection



modifie la réponse inflammatoire, la quantité de cytokines présentes et donc la probabilité d'apparition d'un sepsis (36).

Le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 et l'IL-1 sont les plus précocement produites. Le pic de leur concentration plasmatique intervient dans les 2h suivant l'infection (40,41) cependant leurs concentrations ne sont que la « partie émergée de l'iceberg » comme cela est décrit dans l'article de Jean-Marc Cavaillon (42). En effet, une très grande partie des cytokines libérées peut se retrouver associée aux cellules circulantes mais rester néanmoins actives (43,44). Elles vont être à l'origine de vagues secondaires de cytokines et de la production de protéines de la phase aigüe de l'inflammation comme le fibrinogène ou la Protéine-C Réactive (CRP). De plus les dommages cellulaires directement liés à l'infection ou engendrés par l'inflammation libèrent des signaux de danger qui renforcent la production de cytokines et aboutissent à un emballement de l'inflammation (35). Cette dérégulation mène à des concentrations sanguines très élevées pour la plupart des cytokines, communément appelé « tempête cytokinique » (45). La réaction de l'organisme devient disproportionnée et ce déséquilibre est à l'origine de défauts de fonctionnement des organes et d'une immunosuppression qui le rend sensible aux surinfections secondaires.

Bien que des cytokines à la fois pro mais aussi anti-inflammatoires soient produites de façon concomitante dès le début de l'infection (46,47), la résultante lors de la phase aigüe du sepsis conduit le patient dans un état hyperinflammatoire caractérisé par de la fièvre, un hypermétabolisme et un état de choc (48). Ce profil cytokinique est déterminant pour la survie des patients ce qui reflète le rôle central des cytokines dans la physiopathologie du sepsis (49).

#### I.1.2.2 Les altérations des cellules de l'immunité

La dérégulation de la réponse immunitaire au cours du sepsis ne se limite pas à une exacerbation de la production de cytokines mais est également associée à des modifications majeures des cellules de l'immunité.

La première mise en évidence de ces altérations a reposé sur l'observation du phénomène de tolérance aux endotoxines décrit initialement par l'induction d'une fièvre réduite lors d'une seconde injection du vaccin contre la typhoïde (50). En effet les leucocytes sanguins des patients septiques lorsqu'ils sont stimulés par une endotoxine ou un autre PAMPs (51) produisent une quantité beaucoup plus faible de cytokines pro-inflammatoires que des cellules naïves à la fois *in vivo* et *in vitro* (52–54). Cette tolérance est causée par une reprogrammation cellulaire associée à l'augmentation de l'expression de molécules capables d'inhiber les

récepteurs PRR et notamment le TLR 4 qui reconnaît la plupart des endotoxines et exotoxines bactériennes (55,56).

Une autre modification fondamentale du système immunitaire lors de sepsis est l'importante déplétion des cellules dendritiques et lymphocytaires déclenchée par une stimulation des voies de l'apoptose (57–59). Cette déplétion est à l'origine d'une immunosuppression importante qui permet le développement d'infections secondaires expliquant la fréquence élevée de multiples foyers d'infection retrouvés à l'autopsie chez les patients septiques (60).

L'immunosuppression est également accentuée par une modification de la fonction des lymphocytes et des cellules dendritiques avec une augmentation des lymphocytes anergiques et des lymphocytes T régulateurs, une modification des marqueurs membranaires des cellules (augmentation de PD-1 et CTLA-4, diminution de CD28 et IL-7R $\alpha$ ) et une augmentation des cellules myéloïdes suppressives *Myeloid-Derived Suppressor Cells* (MDSC) (48,59,61).

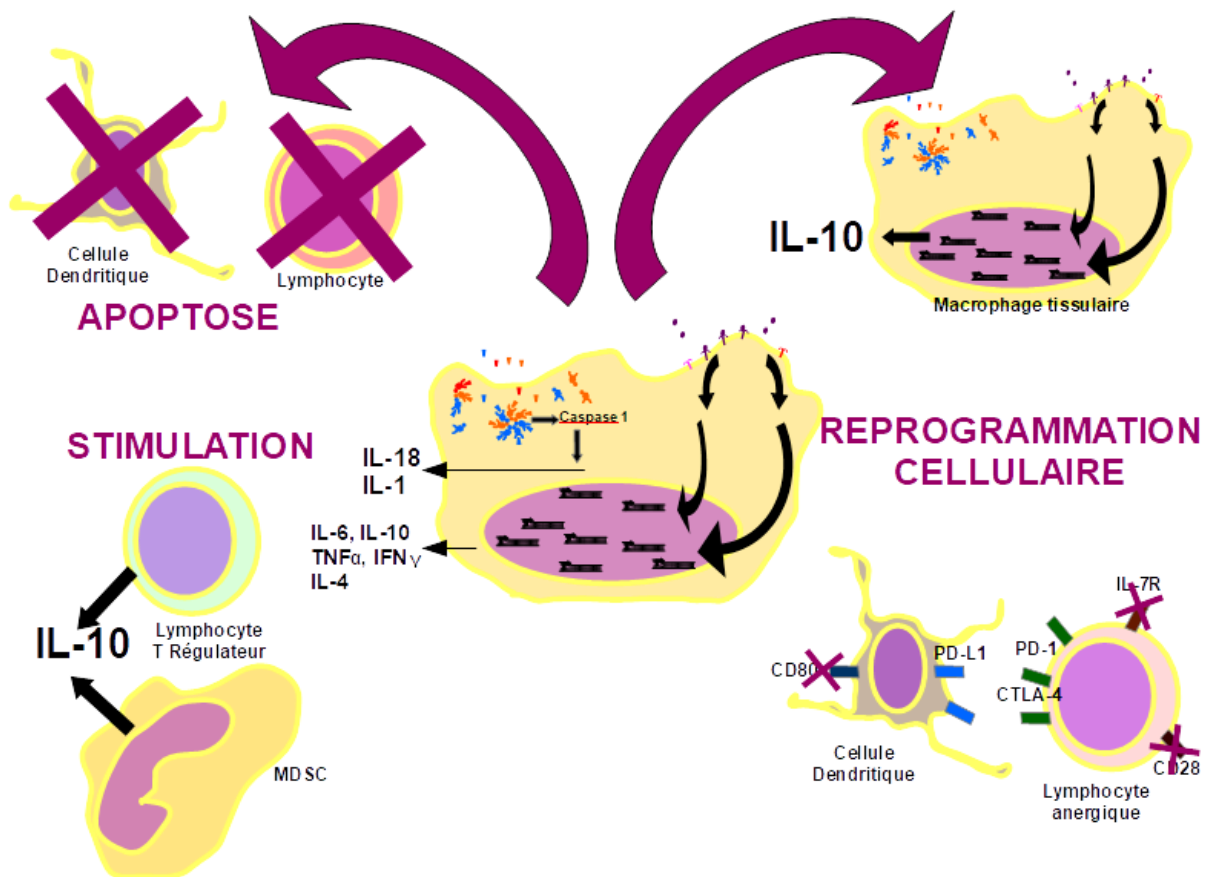


Figure 5- Modifications de la réponse immunitaire lors du sepsis

Les cellules de l'immunité sont fortement modifiées au cours du sepsis. Elles subissent une reprogrammation cellulaire qui modifie leur fonction et leur réponse aux pathogènes. L'équilibre de la réponse est modifié par l'apoptose de certaines populations cellulaires et la prolifération d'autres. L'ensemble de ces altérations se traduit par une immunosuppression marquée.

### I.1.2.3 La compartimentalisation de la réponse immunitaire

Il est à présent évident que les pathogènes sont à l'origine d'une réponse complexe des cellules de l'organisme susceptible d'être déséquilibrée lors du sepsis. Cependant pour appréhender pleinement la complexité de la réponse à l'échelle de l'organisme il est important de comprendre que les mécanismes en jeu sont différents dans le sang et dans les différents organes périphériques. Cet état de faits est à la base de la notion de compartimentalisation (62). L'état inflammatoire des cellules ainsi que les molécules qu'elles produisent sont différents selon les compartiments.

Bien que le compartiment sanguin présente des concentrations très élevées de cytokines, elles résultent majoritairement d'une production périphérique. En effet, par exemple l'IL-6 n'est pas produite par les leucocytes circulants lors de traumatisme (63), d'hémorragie (64) ou de sepsis (65). En revanche elle est produite sur le site d'infection et dans de multiples organes

périphériques lors de sepsis (66–68). Le TNF $\alpha$  peut être produit à la fois par les leucocytes sanguins et dans un grand nombre d'organes comme le cerveau (69,70), les poumons (64), le système urinaire (71) ou l'intestin (72,73) lors de sepsis ou d'inflammation systémique majeure. Chez les patients atteints de défaillance multi-organique et d'un syndrome de détresse respiratoire aigüe, la concentration en TNF $\alpha$  est plus importante dans les capillaires pulmonaires que dans les veines périphériques ce qui démontre que la production de cette cytokine a lieu principalement dans les poumons (74). Dans ces organes, les cellules responsables de la production des cytokines sont majoritairement les macrophages tissulaires mais les mastocytes, cellules de Paneth et des cellules endocrines spécialisées des cryptes intestinales jouent aussi un rôle important en particulier lors de sepsis abdominal (75–77). En effet ces cellules possèdent des granules cytoplasmiques de TNF $\alpha$  préformé (78) libéré rapidement et nécessaire à la mise en place d'une immunité innée efficace lors de péritonite (79,80).

Les cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10, l'*IL-1 Receptor Antagonist* (IL-1 RA) ou les récepteurs solubles du TNF $\alpha$  sont produites en périphérie mais également en grande quantité dans le sang (81–86). La reprogrammation des leucocytes sanguins peut également favoriser la production de ces cytokines au dépend des cytokines pro-inflammatoires (56). Le plasma des patients septiques est donc un milieu immunosuppresseur (87).

Ces données poussent certains auteurs comme Robert Munford et Jérôme Pugin (47) à envisager une hypothèse alternative. Selon eux, la réponse normale de l'organisme face au stress est de limiter l'inflammation systémique. Ils envisagent une coordination entre une inflammation locale et une « anti-inflammation systémique » qui permet une concentration des effecteurs dans le compartiment infecté et qui prévient les dommages induits par l'inflammation. Dans le cas du sepsis, cet état est accentué et déséquilibré menant à une immunosuppression majeure dans le compartiment sanguin qui peut se retrouver ou non dans les organes périphériques et qui coexiste avec des sites d'inflammation locale majeure.

Les disparités de la réponse de l'hôte selon le compartiment ont été bien démontrées. Par exemple, certains auteurs ont décrit l'expression génétique dans différents tissus dans un modèle de sepsis (88). Ils ont montré que les profils d'expression génétique peuvent être soit spécifiques d'organe, soit communs à plusieurs organes soit opposés entre certains organes. Le cerveau a notamment un profil spécifique tandis que la rate et le thymus montrent des profils opposés. De même, la neutralisation du TNF $\alpha$  dans un modèle murin de sepsis abolit la production d'IL-1, IL-6 et IL-12 dans le sang mais n'a aucun effet sur la production d'IL-6 et IL-12 dans le cœur (89). Certains organes, comme les poumons ont une spécificité particulière

quant à leur réponse face au sepsis. Par exemple, on note une présence locale d'une cytokine essentielle à la physiologie pulmonaire : le *Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor* (GM-CSF) qui possède une activité pro-inflammatoire synergique avec le LPS (90,91). Cette spécificité pourrait expliquer que les poumons soient le premier site d'infection et le premier et le plus fréquent organe à défaillir lors de sepsis (18,92–94).

Ainsi aussi bien l'infection que l'inflammation stérile peuvent être disséminées à partir d'un foyer local dans n'importe quel organe et perturber son fonctionnement. Le sang, bien que jouant un rôle tampon, est le lien évident entre les différents compartiments. Quant aux vecteurs responsables de la dispersion de l'inflammation, plusieurs peuvent être envisagés. Les PAMPs et les cytokines notamment le TNF et l'IL-1 sont impliquées mais d'autres molécules peuvent jouer ce rôle comme l'anaphylatoxine C5a issue de l'activation du complément (95) ou la leucotriène B4 (LTB4) (96) ainsi que des cellules et notamment les polynucléaires neutrophiles (PNN) (97–99).

Cependant le sang n'est pas le seul lien permettant la communication entre les compartiments. En effet le rôle du système nerveux dans ce domaine est connu grâce aux travaux du professeur Kevin Tracey. Il a défendu la théorie du réflexe inflammatoire selon laquelle l'inflammation est régulée en temps réel par le système nerveux autonome comme peut l'être la fréquence cardiaque ou la pression artérielle. En effet les systèmes ortho- et parasympathiques sont susceptibles d'influencer le système immunitaire en temps réel et en particulier la réponse inflammatoire à la fois via des voies neuronales et humorales (100). La sécrétion d'adrénaline et de noradrénaline par les glandes surrénales sous l'impulsion du système orthosympathique diminue la production de TNF $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$  et d'IL-12 mais augmente celle d'IL-10 et d'IL-6 par les leucocytes stimulés par du LPS (101–103). De même la stimulation du nerf vague et l'activation des voies cholinergiques parasympathiques inhibent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18) et stimule la sécrétion d'IL10 par les macrophages tissulaires (104). Cet effet est spécifique aux compartiments tissulaires périphériques puisque les monocytes sanguins ne possèdent pas le récepteur à l'acétylcholine responsable de ce dernier (104). Cependant le nerf vague est également un vecteur d'informations sensorielles pour le système nerveux centrale. En effet des fibres afférentes de ce nerf peuvent être stimulées par de faibles concentrations d'IL-1 $\beta$  et d'endotoxines (105,106) mais aussi par le TNF $\alpha$ , des mécanorécepteurs, des chémorécepteurs ou des récepteurs thermiques et osmotiques (107). Ainsi le nerf vague rassemble les voies afférentes et efférentes du réflexe neuro-inflammatoire. Il est complété par l'apport d'afférences via les fibres nociceptives de type C sensibles à la douleur et aux signaux de danger qui sont aussi susceptibles de déclencher le réflexe (108). La

stimulation de ce réflexe entraîne l'action synergique des systèmes ortho- et parasympathiques ainsi que la stimulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien qui mène à la sécrétion d'ACTH de  $\alpha$ -MSH et de cortisol (100).

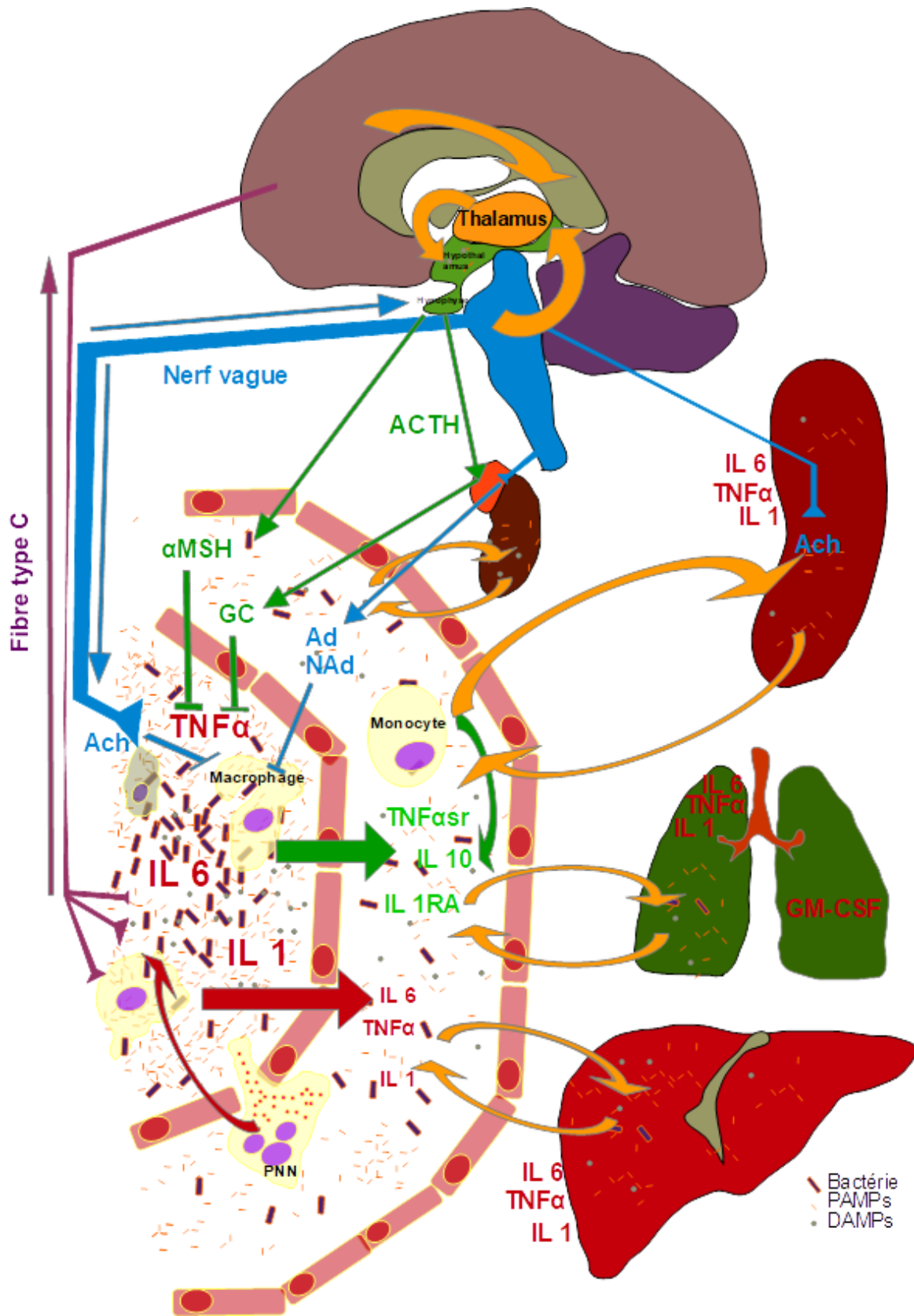


Figure 6 - Compartimentalisation de la réponse inflammatoire lors d'une infection

### **I.1.3 Une lutte nécessaire contre l'infection et l'inflammation**

Les endo- et exotoxines bactériennes constituent la cause principale du dérèglement de la réponse de l'hôte face au pathogène. Les premiers axes du traitement du sepsis visent donc à favoriser l'élimination du pathogène et calmer la réponse inflammatoire.

Pour cela l'antibiothérapie est l'arme centrale. L'importance de la mise en place précoce d'une antibiothérapie adaptée a été démontrée à de multiples reprises chez les patients humains atteints de sepsis (109,110) et est reconnue comme indispensable dans les recommandations des consensus internationaux (14,111,112). La rapidité de la mise en place de l'antibiothérapie est critique (113–115) ; il est recommandé de l'initier dans l'heure qui suit le diagnostic (116). Dans le cas contraire la mortalité augmente de 2% toutes les heures (117). Ce délais est également un facteur de risque pour l'apparition de défaillance organique (118–120). Cependant ce dogme de la « golden hour of sepsis » pose des questions notamment concernant la pertinence des diagnostics réalisés aussi rapidement et la difficulté de mettre en place une antibiothérapie adaptée sans résultats bactériologiques (121). En effet l'importance croissante de l'antibiorésistance complique grandement les thérapies anti-infectieuses et impose une adaptation de l'antibiotique en fonction de ses caractéristiques pharmacocinétiques et pharmacodynamiques au profil de résistance et à la localisation de la bactérie (109). Le choix de l'antibiotique de première intention, l'adaptation en fonction des résultats microbiologiques et les modifications des doses, fréquences et durées d'administration en fonction de l'état hémodynamique du patient sont autant de défis qui peuvent être relevés efficacement non pas par un spécialiste mais par une équipe multidisciplinaire. Ces équipes, dites d'Antimicrobial Stewardship (ABS) sont désormais présentes dans la plupart des unités de soins intensifs (122). Le suivi de l'efficacité du traitement, aidé par l'utilisation de biomarqueurs comme la procalcitonine permet de diminuer l'exposition aux antibiotiques et d'augmenter la survie des patients (123,124).

A l'inverse de l'antibiothérapie, les traitements ciblant la réponse immunitaire se sont montrés décevants et aucun ne fait consensus à l'heure actuelle. Plusieurs stratégies ont été testées. L'une d'elle fut de bloquer la principale endotoxine bactérienne, le LPS, pour favoriser son élimination. L'utilisation d'anticorps anti-endotoxine n'a pas montré d'effet (125). La filtration extracorporelle du sang par des fibres imprégnées de polymyxine B n'a pour l'instant pas rassemblé un niveau de preuve d'efficacité suffisant. Les résultats de deux essais cliniques ont été contradictoires (l'un montrant un effet significativement favorable, l'autre un effet plutôt défavorable du traitement) (126,127). Un troisième essai a montré un effet positif dans un groupe de patients en choc septique réfractaire mais pas dans la population globale (128). Une



autre stratégie a été de diminuer la sécrétion ou l'action des cytokines. L'inhibition de la sécrétion de cytokines par l'utilisation de corticoïdes à dose anti-inflammatoire n'a pas montré d'effets bénéfiques (129–131) et il en est de même pour les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (Ibuprofène) (132). L'utilisation d'inhibiteurs de cytokines pro-inflammatoire comme l'IL-1 (133) ou le TNF $\alpha$  (134,135) n'a pas obtenu de meilleurs résultats. Le blocage de l'anaphylatoxine C5a ou de son récepteur est actuellement à l'essai tout comme l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses (CSM) qui ont montré des effets positifs chez les modèles animaux de sepsis (136). D'autres stratégies visant, elles, à lutter contre l'immunosuppression sont également à l'essai (137). C'est le cas de l'utilisation de molécules immunostimulantes comme le GM-CSF (138), l'Interféron  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) (139) et l'IL-7 (140). De même, des molécules immunomodulatrices connues pour leurs effets favorables sur l'immunité antitumorale sont également à l'étude comme les anticorps anti-PD-1 (137).

Enfin certains auteurs envisagent la stimulation du nerf vague pour diminuer la production de cytokines pro-inflammatoires via le réflexe immunitaire (141).

## **I.2 La rupture de l'homéostasie tissulaire et la défaillance multi-organique**

Au cours du sepsis l'emballement de la réponse de l'organisme aboutit à de nombreuses altérations de son fonctionnement. Toute l'homéostasie de l'organisme est perturbée par des dysfonctionnements systémiques majeurs. Ces derniers sont causés par une altération de la perfusion des organes due à des perturbations hémodynamiques et de la coagulation, mais également par un dysfonctionnement cellulaire dû à des perturbations métaboliques. Ces trois mécanismes seront détaillés dans les trois premières parties puis les potentiels axes thérapeutiques seront présentés dans la dernière partie.

### **I.2.1 Perturbations hémodynamiques**

La diminution de la pression artérielle moyenne (<65 mmHg) est une complication quasi systématique du sepsis (142) qui peut s'aggraver jusqu'à l'état de choc septique lorsque cette pression ne peut être maintenue par une fluidothérapie adaptée et que les perturbations métaboliques entraînent une lactatémie supérieure à 2 mmol.L<sup>-1</sup> (14). Plusieurs mécanismes concomitants expliquent cette hypotension : la vasodilatation, l'augmentation de la perméabilité vasculaire, l'hypovolémie et la baisse de la contractilité ventriculaire (142).

La vasodilatation reste le mécanisme majeur de l'hypotension dans le sepsis (143). Elle advient à la suite de la défaillance des mécanismes de vasoconstriction normaux qui assurent la contraction des muscles lisses vasculaires. Les endotoxines stimulent la sécrétion d'oxyde nitrique (NO) via l'enzyme *inductible NO synthase* (iNOS) (144) et de prostacycline (145,146) par l'endothélium vasculaire et ce sont ces composées qui perturbent la contraction des muscles lisses. D'autres mécanismes existent mais leur importance n'est pas encore démontrée (147). C'est le cas de l'effet de l'adrenomoduline, une hormone vasodilatatrice et cardio-dépressive augmentée dans le sepsis (148,149) et de l'activation du canal TRPV4 qui est associé à une vasodilatation (150).

Au cours du sepsis des facteurs humoraux et cellulaires (PNN essentiellement) perturbent le fonctionnement endothélial (142). En effet, les cytokines, chimiokines et endotoxines libérées activent les cellules myéloïdes et endothéliales. Ceci a pour effet d'augmenter le roulement, l'adhésion et la diapédèse de ces cellules immunitaires. Or ces dernières relarguent au niveau de l'endothélium des médiateurs comme les prostaglandines, des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et des protéases (142,143). Les cellules endothéliales se contractent, les jonctions intercellulaires rompent, ce qui a pour conséquences d'augmenter fortement la perméabilité vasculaire (151). Cette perméabilité induit d'importantes fuites liquidiennes et protéiques, la création d'œdème et d'un troisième secteur (142).

L'hypovolémie est très souvent présente chez les patients septiques du fait de pertes par vomissements ou diarrhée mais aussi via la fièvre et la tachypnée. A cela s'ajoutent les pertes dues à la présence d'un troisième secteur (142). Améliorer la volémie pour restaurer une perfusion suffisante des organes est un point majeur des recommandations thérapeutiques (112).

Enfin, l'hypotension peut être entretenue par une baisse de la contractilité cardiaque liée à un dysfonctionnement cellulaire des cardiomyocytes. Cette affection nommée cardiomyopathie septique est caractérisée par une diminution de la contractilité induite par une baisse des flux de calcium et une perturbation du couplage excitation-contraction (152).

Globalement les perturbations hémodynamiques pendant le sepsis sont causées par une baisse de la précharge et de la postcharge, des dysfonctionnements myocardiques, une redistribution du flux sanguin et des altérations de la microcirculation (153).

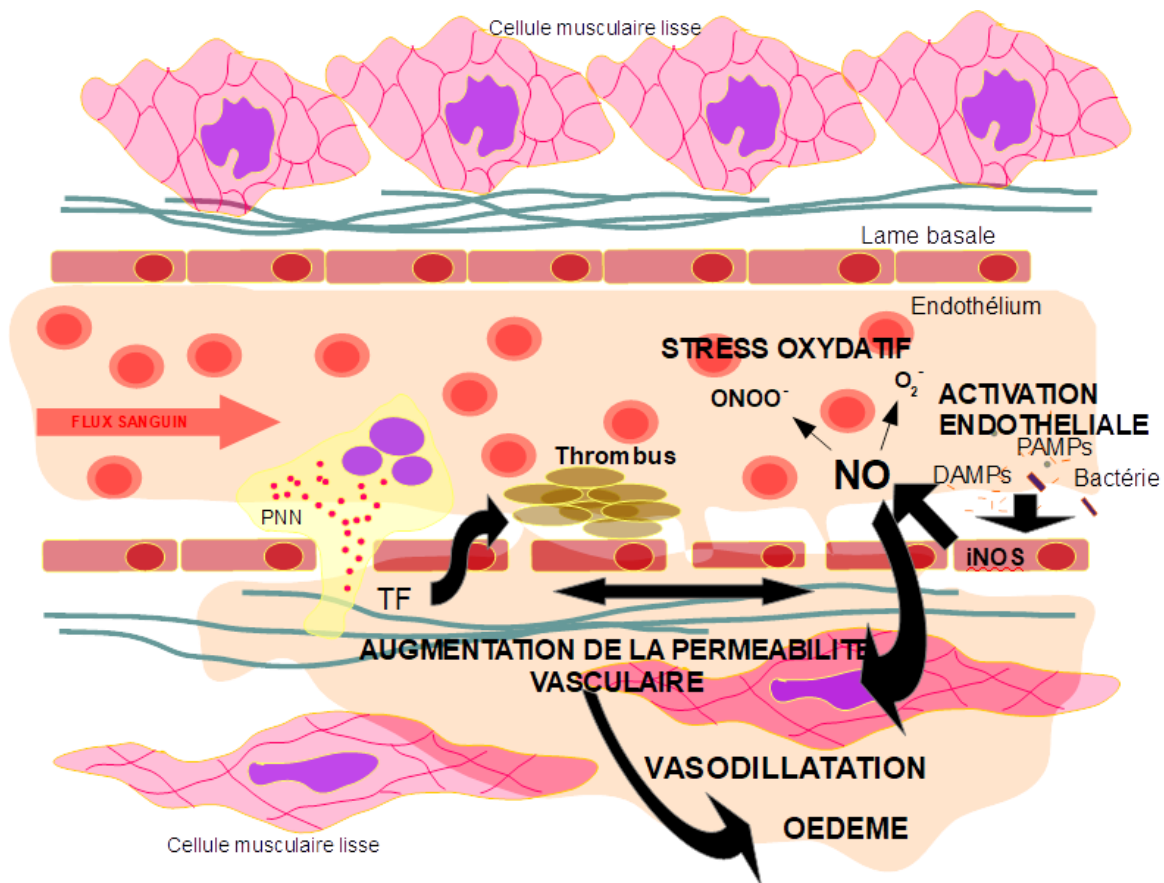


Figure 7 - Altérations microvasculaires lors de sepsis

TF : Facteur tissulaire, PNN : polynucléaire neutrophile

L'endothélium est fortement modifié au cours du sepsis entraînant une forte augmentation de la perméabilité vasculaire.

## I.2.2 Troubles de la coagulation

Les liens étroits entre inflammation et coagulation poussent certains auteurs à rapprocher ces mécanismes et parlent d'immuno-hémostase (154). Dans le sepsis, l'activation des deux cascades est concomitante. Ainsi les altérations de la régulation de l'inflammation sont associées à des troubles de la coagulation (9,143,155). De nombreux stimuli déclenchent l'activation de la cascade de coagulation tandis que les mécanismes anticoagulants sont inhibés et que la fibrinolyse est altérée (156). L'ensemble aboutit à un état pro-coagulant qui s'accroît chez 17% des patients jusqu'à la coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) (157).

### I.2.2.1 Activation de la cascade de coagulation

La cascade de stimulation peut se déclencher en suivant deux grandes voies : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque.

La voie extrinsèque se déclenche en conditions physiologiques suite à une rupture de la barrière endothéliale et au contact entre le facteur tissulaire exprimé au niveau de la lame basale de l'endothélium et la proconvertine ou facteur VII (158). Lesquels, via le facteur X, génèrent la thrombine (facteur II) capable de cliver le fibrinogène en fibrine (151) (cf. Fig. 8). Lors du sepsis, les produits bactériens et les cytokines (principalement le TNF $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$ ) activent les monocytes, les macrophages et les cellules endothéliales qui expriment alors le facteur tissulaire (TF). Les monocytes sécrètent également des particules riches en TF qui entraînent l'agrégation plaquettaire et la formation de fibrine (155). De plus les altérations de l'endothélium évoquées précédemment accentuent le contact entre le TF présent dans la lame basale et le sang (151). Le système d'activation par contact est susceptible de déclencher la voie intrinsèque qui n'est pas impliquée dans les conditions normales d'hémostase. L'activation de cette voie est en revanche fréquente lors d'infection et constitue un mécanisme de lutte contre le pathogène en limitant la propagation de l'infection (154). Cette activation se base sur la fixation du facteur XII sur une surface chargée négativement permettant son changement de conformation et son auto-activation. La suite de la voie se poursuit par le recrutement du facteur XI et de cofacteurs pour aboutir à l'activation du facteur X et l'activation de la thrombine (154,159). Au cours d'une infection et plus particulièrement pendant le sepsis, le facteur XII peut se fixer sur des produits bactériens comme les polyphosphates (160) ou sur l'ADN des polynucléaires neutrophiles sécrétés dans les *Neutrophil Extracellular Traps* (NET) lors de la phagocytose des pathogènes (161,162).

#### I.2.2.2 Défaillance des systèmes de contrôle de la coagulation

La coagulation est régulée par trois mécanismes principaux : l'antithrombine, l'inhibition du facteur tissulaire (TFPI : *Tissue Factor Pathway Inhibitor*) et le système de la protéine C. Ces trois mécanismes sont altérés lors du sepsis (151,155).

L'inhibiteur du facteur tissulaire se lie à la fois au complexe TF-facteur VII et au facteur X à la surface de l'endothélium (163). Les lésions de la barrière endothéliale et notamment la diminution du glycocalyx endothélial perturbent l'action du TFPI (151,164).

L'antithrombine est le principal inhibiteur du facteur X. C'est une protéine négative de la phase aigüe de l'inflammation produite par le foie dont la production diminue sous l'effet des cytokines pro-inflammatoires (165).

La protéine C est activée au niveau de l'endothélium après fixation à son récepteur par la thrombine associée à la thrombomoduline. Elle se lie ensuite à son cofacteur la protéine S puis inactive alors les facteurs V et VIII par protéolyse (166). Au cours du sepsis la production et

l'activation de la protéine C sont diminuées (151,167). La protéine C activée recombinante humaine constitue la seule molécule approuvée par l'agence du médicament américaine (FDA : Food and Drug Administration) pour le traitement du sepsis sévère. Cette autorisation de mise sur le marché (AMM) américaine fait suite à un essai clinique ayant démontré une amélioration de la mortalité à 28 jours (168). Les deux essais suivants (169,170) n'ont réussi à démontrer

aucune amélioration associée au traitement et ont poussé le laboratoire à retirer le médicament du marché.

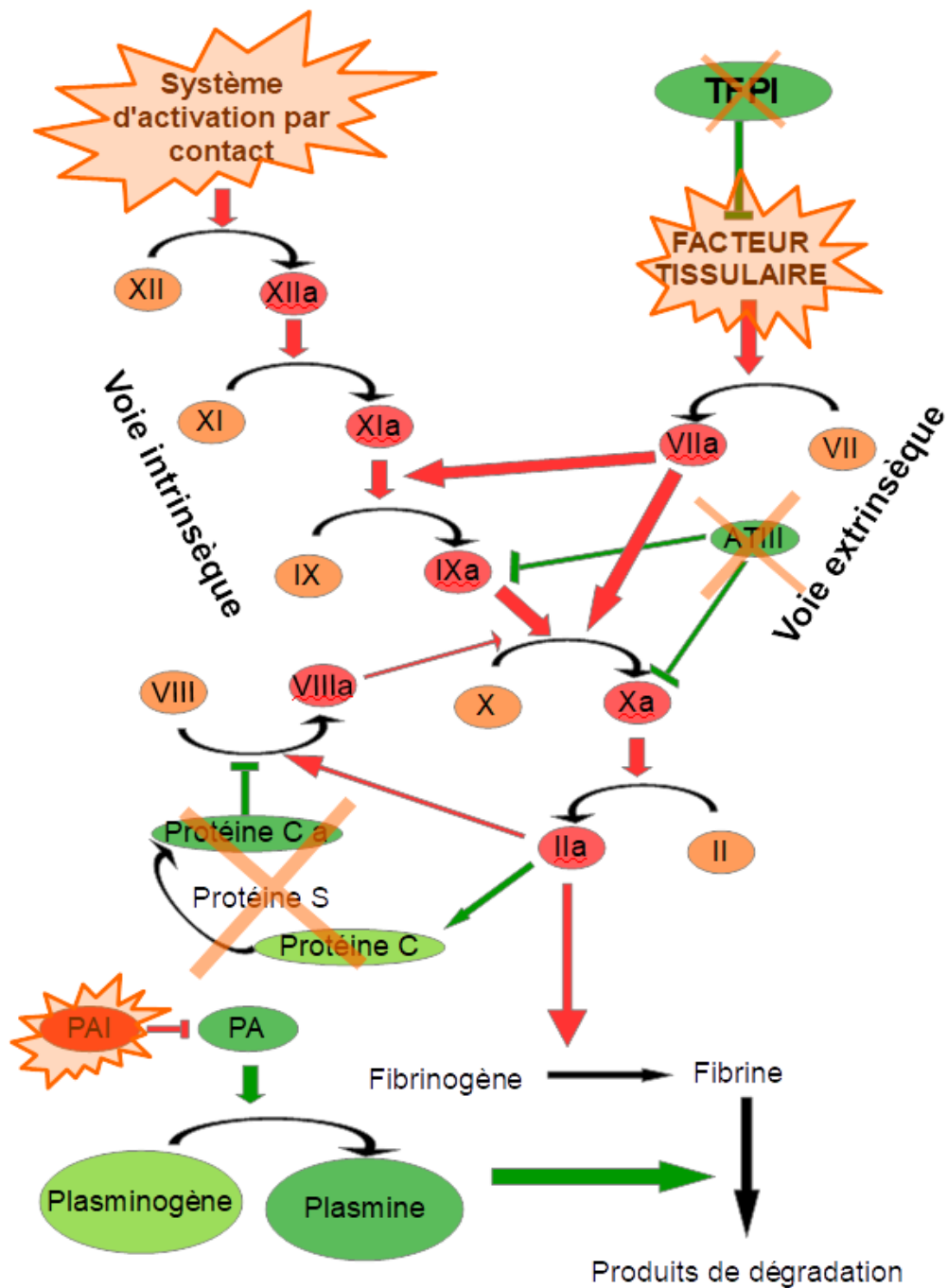


Figure 8 - Effets du sepsis sur la cascade de coagulation

TFPI : Tissue Factor Pathway Inhibitor, ATIII : Antithrombine III, PA : Activateur du Plasminogène, PAI : Inhibiteur de l'Activateur du Plasminogène

Le sepsis a un effet pro-coagulant en augmentant l'activation des deux voies de la cascade de coagulation, en perturbant les mécanismes anticoagulants et en stimulant la fibrinolyse.

### I.2.2.3 Une perturbation de la fibrinolyse

La fibrinolyse est assurée par l'enzyme plasmine issue de l'activation du plasminogène par l'activateur du plasminogène. Le *Plasminogen Activator Inhibitor 1* (PAI 1) est une protéine de phase aigüe de l'inflammation qui inhibe l'activation du plasminogène et donc empêche la fibrinolyse (155). Le TNF $\alpha$  et les endotoxines entraînent une augmentation de sa synthèse par le foie lors de sepsis ce qui diminue la fibrinolyse (171).

### I.2.3 Altérations du fonctionnement organique

Le dysfonctionnement des organes vitaux est toujours présent lors de sepsis et est entré depuis 2016 dans la définition de ce syndrome (14), mais pour autant, toute la pathologie associée n'est pas totalement élucidée (172). Cependant on sait aujourd'hui que ce dysfonctionnement est secondaire à une perte de fonction à l'échelle cellulaire sans lésions tissulaires structurales et sans être systématiquement lié à une augmentation significative de la mort cellulaire (57,172–174).

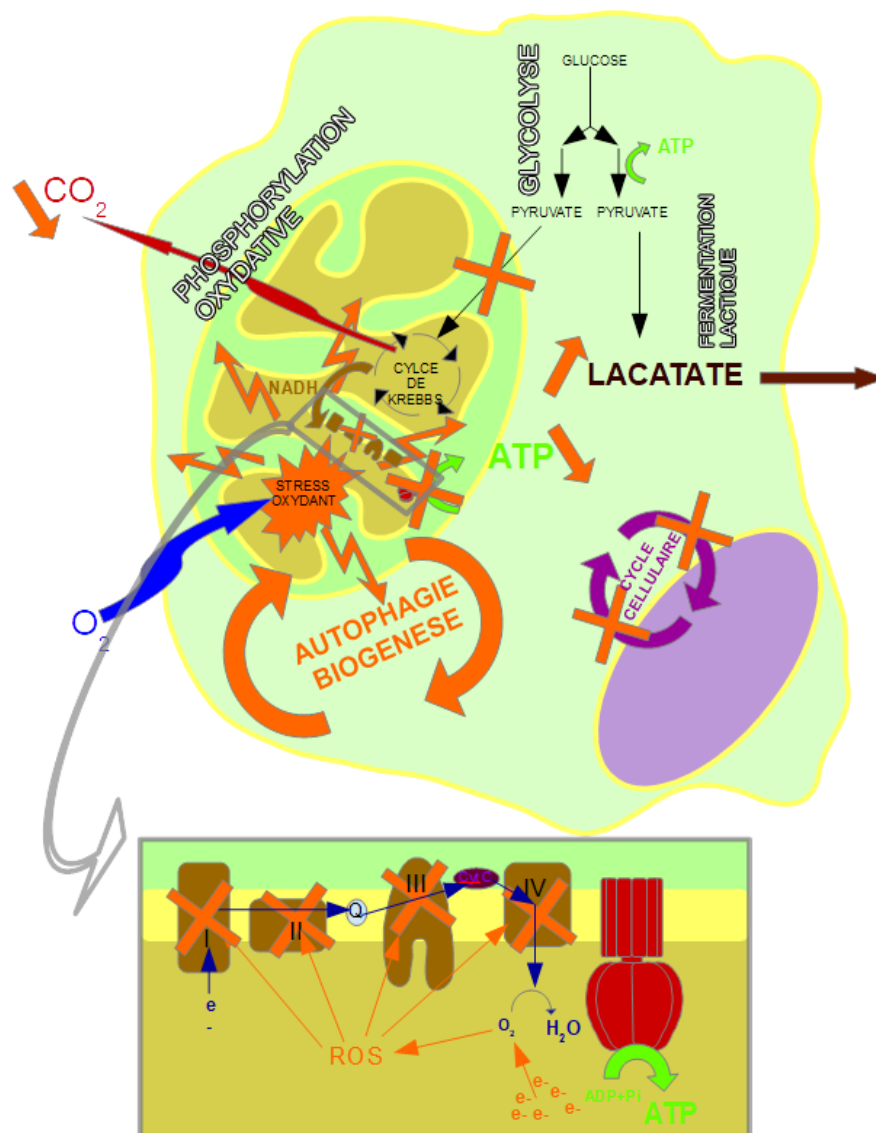
Deux principales causes de la défaillance organique dans le sepsis ressortent actuellement : les perturbations microvasculaires et les altérations du métabolisme cellulaire (172).

Comme cela a été développé précédemment, l'endothélium des capillaires est fortement altéré par les processus inflammatoires et ce qui entraîne des perturbations de la perfusion tissulaire et la formation d'œdème interstitiel important (175). Le sepsis est, en effet, à l'origine d'une forte hétérogénéité de flux sanguin et d'une perte du couplage entre la demande tissulaire en dioxygène et la perfusion (176). La présence d'œdème altère également la perfusion en augmentant la pression veineuse et favorisant la stase veineuse (177). Tout ceci a pour conséquence, la présence de zones d'hypoxie tissulaire mais aussi une augmentation du temps de contact des tissus avec les leucocytes sanguins (178) entraînant une augmentation de l'inflammation locale et du stress oxydatif aboutissant au dysfonctionnement cellulaire (179).

Il a été proposé que le maintien de cellules en hypoxie chronique menait à une adaptation de la cellule visant à diminuer ses besoins en dioxygène (180). Au cours du sepsis une reprogrammation métabolique a lieu comme par exemple dans les cardiomyocytes qui présentent une diminution de la synthèse protéique et de l'activité mitochondriale associées à leur baisse de contractilité (181) ou dans d'autres tissus comme les poumons, le foie, le rein, les muscles et même les cellules immunitaires (172). Cette reprogrammation rassemble plusieurs modifications :

- une transition de la phosphorylation oxydative à la glycolyse pour la génération d'adénosine triphosphate (ATP) (182),
- une diminution de la respiration mitochondriale (183,184),
- une modification de la masse mitochondriale par les processus de mitophagie et de biogénèse mitochondriale (185–187),
- l'arrêt du cycle cellulaire (188).

Cette diminution et réorientation du métabolisme cellulaire est considérée comme une adaptation à l'inflammation systémique permettant de réserver la consommation d'énergie aux



fonctions essentielles, de limiter les lésions cellulaires à la fois des organites, des protéines et de l'ADN ainsi que de maintenir l'équilibre énergétique (189,190).

*Figure 9 - Reprogrammation métabolique au cours du sepsis*

*ATP : Adénosine Triphosphate, ROS : espèces réactives de l'oxygène*

*Au cours du sepsis, le stress oxydant induit d'importantes lésions mitochondriales qui mènent à une réorientation du métabolisme vers le métabolisme glycolytique.*



#### **I.2.4 Nécessité de restaurer l'homéostasie**

Pour lutter efficacement contre le sepsis il est clair, aujourd'hui que combattre l'infection ne suffit pas. En effet, prévenir et traiter la défaillance des organes vitaux est un objectif majeur du traitement du sepsis à la fois en médecine humaine (112) et vétérinaire (191). La première des stratégies vise à restaurer la perfusion correcte des organes en contrôlant la pression artérielle moyenne (objectif de 65 mmHg) et en luttant contre la lactatémie (14,112). Pour cela la fluidothérapie est essentielle et les recommandations en réanimation humaine sont aujourd'hui une perfusion d'au moins 30mL/kg de cristalloïdes dans les 3 premières heures suivant l'admission (112,192). La pression artérielle est précisément monitorée et son maintien est assuré au besoin par l'utilisation de vasopresseur comme la noradrénaline en première intention qui peut être complétée par la vasopressine (112,193). L'effet de faibles doses d'hydrocortisone pour faciliter le contrôle de la pression artérielle chez certains patients n'est pas encore complètement établi car les résultats obtenus sont contradictoires (194–196).

La prévention des thrombi veineux à l'aide d'héparine de bas poids moléculaire est recommandée mais aucun traitement anticoagulant tels que la thrombomoduline ou l'antithrombine n'a montré un niveau de preuve d'efficacité suffisant pour être utilisé (112,193). Le support des fonctions organiques essentielles doit également être assuré par la ventilation mécanique et la dialyse en cas de nécessité (193).

En revanche, à ce jour aucun traitement spécifique de la défaillance multi-organique ne s'est montré efficace malgré de multiples tentatives (197).

### **I.3 Le coût économique et humain du sepsis**

Les mécanismes pathologiques décrits jusqu'ici ont des conséquences cliniques graves. Malgré une compréhension de plus en plus fine de ces derniers, prévenir l'apparition du sepsis et guérir complètement les patients restent des défis primordiaux de notre époque

#### **I.3.1 L'importance majeure et grandissante du sepsis**

D'après l'estimation de l'organisation mondiale de la santé (OMS), le sepsis touche 30 millions de personnes par an dans le monde et cause 6 millions de morts (198). Ces chiffres se basent sur de nombreuses études épidémiologiques réalisées auprès des services de santé des pays les plus développés (2,18,19,21,22,94,199,200) mais la situation dans les pays en voie de

développement est beaucoup plus floue et sans doute beaucoup plus grave (3,201,202). L'OMS a d'ailleurs fait de ce syndrome une priorité de santé publique à l'échelle mondiale (203).

Une étude de Martin et al., s'est principalement intéressée à l'évolution de l'épidémiologie du sepsis aux Etats-Unis entre 1979 et 2000. Les résultats de cette étude montrent une augmentation importante de l'incidence du sepsis dans ce pays passant de 100 à plus de 200 cas pour 100 000 habitants (2). Plusieurs causes sont avancées pour expliquer cette forte augmentation : le vieillissement de la population, l'augmentation des comorbidités (cancer, maladies chroniques, ...), l'augmentation de la fréquence des traitements immunosuppresseurs, l'augmentation de l'antibiorésistance, l'augmentations du nombre de patients atteints du SIDA mais aussi l'amélioration du diagnostic.

En conséquence, les coûts pour le système de santé sont importants puisqu'on les estime entre 25 000 et 50 000€ par patient (25,204–206).

### **I.3.2 L'évolution favorable du pronostic à court terme**

Le pronostic du sepsis s'est amélioré au cours du temps avec un taux de mortalité à l'hôpital passant de 27,8% à 17,9% en 20 ans (2). Bien que ces taux diffèrent beaucoup d'une étude à l'autre en fonction de la localisation et des critères de l'étude, la tendance à la baisse de la mortalité semble se confirmer dans les différents services de soins intensifs modernes (7,20,207–209). Malgré tout, le nombre de personnes mourant de sepsis continue d'augmenter chaque année (25) et le nombre de survivants augmente également (210,211) or leurs séquelles au long terme sont loin d'être négligeables (7,211).

### **I.3.3 La qualité de vie des survivants comme nouvel objectif**

Plusieurs études ont démontré une augmentation importante du risque de mortalité après la sortie de l'hôpital et pendant plusieurs années (212–215). Cette constatation va de pair avec celle de l'augmentation du risque de ré-hospitalisations pour les survivants (7) qui est de 30% 90 jours après la sortie et 63% un an après (215), les causes de ces ré-hospitalisations sont principalement des infections, des insuffisances rénales et des problèmes cardiovasculaires (7). Les patients ont aussi un plus grand de risque de mourir lorsqu'ils sont réhospitalisés après un sepsis qu'après tout autre hospitalisation (216). Il a été démontré chez ces patients la persistance d'un état d'immunodépression, d'une inflammation chronique, et d'une défaillance organique (48,59) comme le montre la réactivation de certaines infections virales (217) et la présence de foyers infectieux non-résolus à la mort des patients septiques (60).

En parallèle de cette diminution de l'espérance de vie des survivants, leur qualité de vie est également altérée principalement par une perte d'indépendance due à des difficultés à réaliser des tâches simples du quotidien comme marcher, s'habiller ou préparer à manger (218). Ces difficultés s'expliquent par des troubles physiques, cognitifs et psychologiques (7). En effet, 28% des survivants souffrent de dépression, 24% d'anxiété et 22% d'un syndrome de stress post-traumatique (219–222). De même, le taux de troubles cognitifs augmente après un sepsis de 10,6% (218). Des troubles neuromusculaires peuvent se manifester par l'apparition chez 36% des patients d'une faiblesse musculaire acquise en réanimation (ICUAW : *Intensive Care Unit Acquired Weakness*) qui a deux composantes : la polyneuropathie de soins intensifs (CIP : *Critical Illness Polyneuropathy*) et la myopathie de soins intensifs (CIM : *Critical Illness Myopathy*) (223–226). Il reste beaucoup à comprendre concernant les mécanismes à l'origine de ces troubles qui constituent un axe de recherche en forte expansion dans le domaine du sepsis (226).

## II. Les conséquences neuromusculaires du sepsis

Comme tous les organes, le système neuro-musculaire est susceptible de dysfonctionner au cours du sepsis. Cependant, les conséquences de ces dysfonctionnements sont démultipliées par son rôle central dans la régulation de toutes les fonctions de l'organisme et leur résolution peut s'avérer particulièrement longue. Dans un premier temps, l'importance clinique et la variété de ces dysfonctionnements seront présentés. Les altérations cellulaires et tissulaires associées au sepsis rencontrées seront ensuite détaillées dans le système nerveux central (SNC) puis dans le système nerveux périphérique (SNP) et dans les muscles.

### II.1 Importance des conséquences neuromusculaires pour les patients humains

#### II.1.1 Deux syndromes de dysfonctionnements neurologiques lors du sepsis

Le système nerveux est classiquement divisé en deux parties, une partie centrale composée de l'encéphale et de la moelle épinière et une partie périphérique qui regroupe nerfs. Le sepsis est susceptible d'impacter le fonctionnement du SNC comme du SNP et des muscles donnant lieu à deux syndromes différents.

L'atteinte du système nerveux central qui conduit à une encéphalopathie associée au sepsis (SAE : *sepsis-associated encephalopathy*) est présente selon les études dans 30 à 70% des cas de sepsis (227). Ce syndrome se base principalement par l'apparition chez les patients d'un état confusionnel aigu ou délirium mais peut se compliquer par un coma (228). Le collège américain et la société américaine de soins intensifs recommandent que tous les patients admis en soins intensifs subissent une évaluation neurologique basée sur des méthodes comme la *Confusion Assessment Method for the Intensive Care Unit* (CAM-ICU) (229). Cette méthode évalue quatre critères de délirium : changement brutal du statut mental, inattention, altération de l'état de conscience, désorganisation de la pensée (230). L'imagerie médicale et notamment l'IRM ne permet pas de mettre en évidence de lésions spécifiques chez ces patients mais est efficace pour exclure d'autres affections (hémorragies, abcès, tumeurs, ...). L'électro-encéphalogramme (EEG) révèle souvent des anomalies dans l'activité électrique du cerveau de ces patients (231,232). Certains biomarqueurs ont été investigués comme le S100b et l'énolase spécifique des neurones mais aucune certitude ne se dégage de ces recherches (233).

Le dysfonctionnement du SNP ou du tissu musculaire aboutit à une faiblesse musculaire nommée ICUAW. Les patients peuvent présenter des signes cliniques variés selon la localisation et la

sévérité de la faiblesse. On peut noter des parésies, paralysies, de l'hyporéflexie, de l'atrophie ou une insuffisance respiratoire (225). Elle peut être divisée en deux composantes cliniques présentes soit isolément soit de façon concomitante : la CIP et la CIM. La première fait référence à un dysfonctionnement du nerf périphérique menant à un défaut de conduction à la fois des motoneurones et des neurones sensitifs. Elle est mise en évidence via un examen électromyographique (EMG) par une diminution de l'amplitude des potentiels d'action musculaires composés (CMAP : Compound Muscular Action Potentials) et des potentiels d'action des nerfs sensoriels (SNAP : Sensory Nerve Action Potentials). La deuxième est un dysfonctionnement des fibres musculaires. L'EMG montre alors une diminution d'amplitude et de durée des CMAP, une diminution de l'excitabilité musculaire et la présence d'une activité électrique spontanée (225,234).

### **II.1.2 Les répercussions de l'altération du système neuro-musculaire sur la mortalité en phase aigu du sepsis**

Pour un patient admis en soins intensifs le delirium est un facteur prédictif important de mortalité. Il est également associé à un temps d'hospitalisation plus long et une durée sous ventilation assistée plus importante (235). De la même façon, l'ICUAW est associée à une durée d'hospitalisation plus élevée, une durée de ventilation mécanique plus importante et une mortalité augmentée à l'hôpital et en soins intensifs (236–238).

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer cet effet sur la mortalité. Tout d'abord, l'ICUAW est à l'origine d'une faiblesse des muscles respiratoires (239) augmentant la nécessité de ventilation mécanique et donc un prolongement de la durée passée en soins intensifs associés à une augmentation de la mortalité. De même le risque d'infection pulmonaire par aspiration est augmenté à la fois par la faiblesse musculaire des muscles pharyngiens (240) et par la diminution des réflexes de toux induite par la SAE (241). Cette atteinte des réflexes est secondaire à des lésions du tronc cérébral (241) qui contrôle l'éveil, un certain nombre de réflexes et les fonctions vitales notamment cardiorespiratoires (233). Lorsque cette région est lésée par la SAE, les patients montrent une variabilité importante de la fréquence cardiaque qui est associée à un mauvais pronostic (242,243). Lors d'une atteinte de la région hypothalamo-hypophysaire c'est tout le système endocrinien qui est impacté et notamment la sécrétion de vasopressine (244) et d'ACTH (245). Ceci contribue à l'apparition de l'état de choc septique et à la mort des patients.

### II.1.3 Des séquelles neuro-musculaires impactant gravement la qualité de vie des patients

Chez les survivants d'un sepsis, il est fréquent de retrouver des séquelles neuromusculaires parfois graves qui impactent fortement la qualité de vie des patients (218). Il a été montré qu'environ 41% des patients ayant survécu à un épisode de sepsis sont incapables d'effectuer un emploi à temps plein (246). La nature de ces séquelles est variable selon la localisation des lésions (228). Certains patients souffrent de troubles sévères de mémorisation ayant pour origine des lésions de l'hippocampe ou du cortex frontal caractérisées par une mort neuronal, une activation microgliale persistante et une augmentation du stress oxydant (233,247). Des troubles cognitifs comme des troubles de la parole sont aussi fréquents lors de lésions corticales (233,248,249). Ces lésions peuvent aussi provoquer l'apparition ou empirer l'évolution de maladies neurodégénératives (218). Des troubles psychologiques sont également fréquents avec 28% des survivants qui souffrent de dépression, 24% d'anxiété et 22% d'un syndrome de stress post-traumatique (219–222). Ces troubles sont associés à des dysfonctionnement de la région de l'amygdale (69,250). La présence d'ICUAW se résout normalement en quelques semaines à quelques mois (251) mais peut dans 28% des cas persister et diminuer la qualité de vie des patients (252).

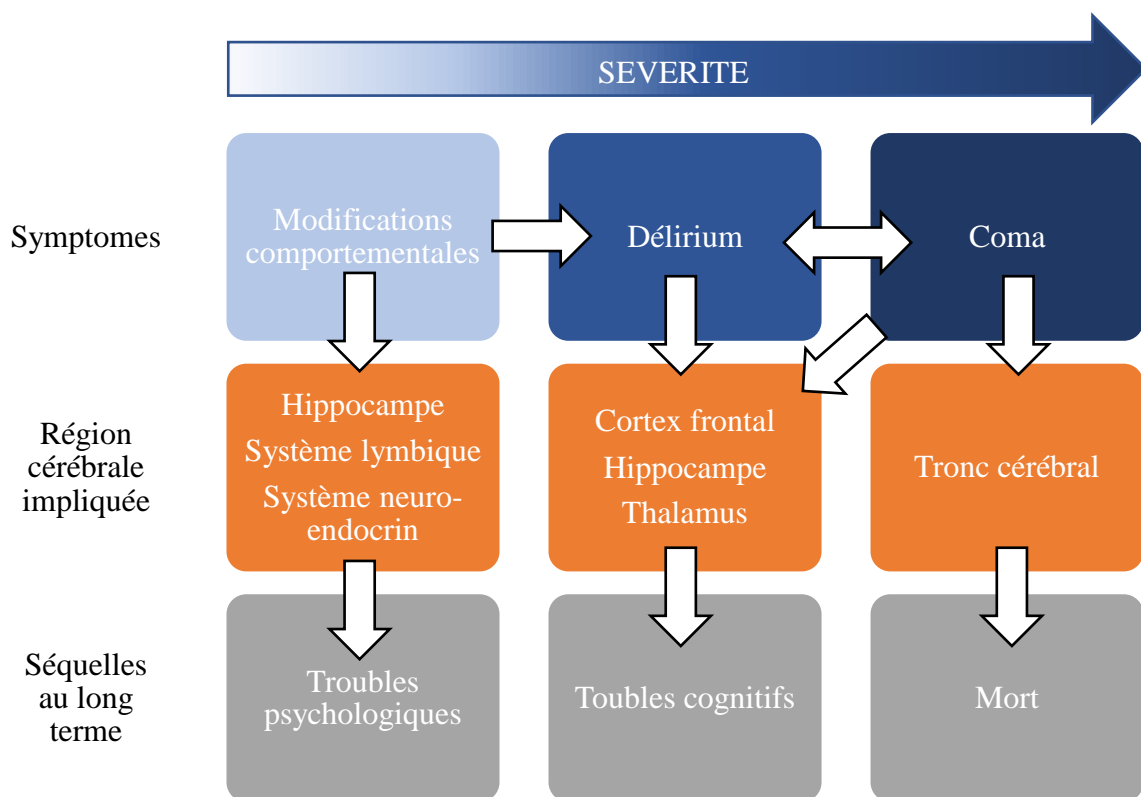


Figure 10 - Symptômes et neuro-localisation des lésions lors de SAE (228)

## **II.2 Les mécanismes physiopathologiques de l'encéphalopathie associée au sepsis**

La SAE est la résultante de trois mécanismes qui seront détaillés dans cette partie : la neuro-inflammation, les perturbations de l'autorégulation cérébrale et l'altération de la neurotransmission.

### **II.2.1 La neuro-inflammation au cours du sepsis**

#### II.2.1.1 La microglie, élément central de la neuro-inflammation

Les cellules microgliales sont des cellules myéloïdes comparables à des macrophages tissulaires mais qui ont une origine embryologique différente car elles proviennent d'une hématopoïèse primitive des cellules du sac vitellin. Elles ont un rôle immunitaire important notamment dans la présentation d'antigènes et la phagocytose mais elles sécrètent également des facteurs neurotrophiques qui sont impliqués dans la plasticité synaptique (253). Elles sont décrites classiquement sous deux formes. La forme au repos possédant une morphologie ramifiée en contact avec de nombreux neurones environnants est capable de repérer les modifications de son microenvironnement. La forme activée est beaucoup plus plastique et possède de nombreux phénotypes adaptés à chaque microenvironnement. Sous cette dernière, les cellules tendent en général, à avoir une morphologie moins ramifiée pouvant aller jusqu'à une forme dite améboïde quasi ronde. Elles peuvent alors déclencher des processus de réparation tissulaire, moduler la réponse immunitaire ou induire la mort d'autres cellules (254). Parmi tous les stimuli susceptibles d'activer les cellules microgliales, les PAMPs et les DAMPs sont les plus importants car ces cellules comme les macrophages possèdent un grand nombre de récepteurs TLR et NLR (255). L'induction des phénotypes principaux des cellules microgliales sont présentés dans la figure 12.

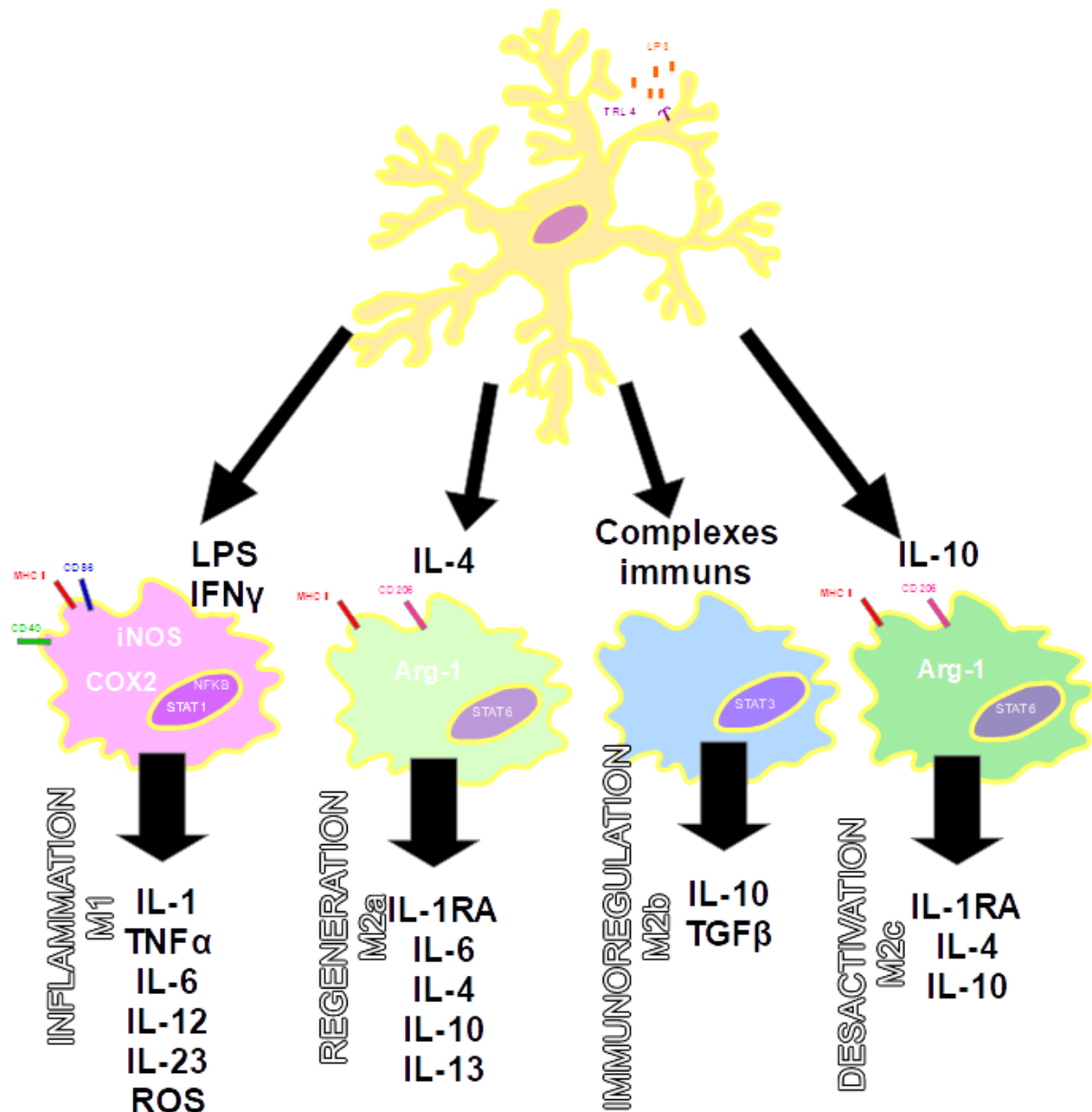


Figure 11 - Processus d'activation microgliale

### II.2.1.2 L'activation microgliale au cours du sepsis

Au cours du sepsis, la microglie est susceptible de s'activer via une stimulation par des endotoxines ou des cytokines pro-inflammatoires. En effet, le lien entre inflammation systémique et activation microgliale a déjà été bien démontré (256–258). Après une injection de LPS chez une souris l'activation microgliale est observée après 6h et persiste au moins pendant 3 jours (après ce délais les résultats sont contradictoires) (259). Pour avoir lieu cette activation nécessite un contact entre la microglie et des signaux tels que les PAMPs ou les DAMPS. Or de façon physiologique la majeure partie de l'encéphale est séparée du



compartiment sanguin par la barrière hémato-encéphalique (BHE). L'activation microgliale est donc déclenchée soit dans les zones dépourvues de BHE c'est-à-dire les organes circumventriculaires. (l'hypothalamus, l'organe subfornical, l'organe vasculaire de la lame terminale, l'organe sous-commissural, l'area postrema, l'épiphyse, la neurohypophyse) soit à la suite d'une rupture de la BHE (260). Cette rupture a été mise en évidence à la suite d'injection de LPS (261), dans des modèles animaux de sepsis (249,262) et chez les patients humains atteints de sepsis (231,263). Les médiateurs inflammatoires tels que les cytokines, le NO ou les prostaglandines entraînent des lésions de l'endothélium, des jonctions serrées, du glycocalyx et des modifications structurelles des pieds des astrocytes qui sont à l'origine de cette rupture de BHE. De plus les cellules endothéliales de la BHE s'activent au contact de ces médiateurs ce qui modifie l'expression de leur transporteurs et déclenche la production de NO et de prostaglandines localement (261).

#### II.2.1.3 Les conséquences de l'activation microgliale sur le fonctionnement neuronal

La microglie est dans le tissu cérébral en constante interaction avec les autres types cellulaires et est considérée comme un acteur majeur dans le développement des dysfonctionnements cognitifs consécutifs à une SAE (264). L'activation de ces cellules aboutit à de profondes modifications de son métabolisme avec une bascule vers un métabolisme glycolytique. Ceci diminue la consommation de dioxygène par les mitochondries et augmente la production de lactate et radicaux libres dérivés de l'oxygène (255). La production de radicaux libres et la libération massive de glutamate par les cellules microgliales activées sont fortement nocives pour la survie neuronale et astrocytaire (265). L'activation microgliale a un impact majeur sur les astrocytes. Lors de lésions cérébrales ce sont ces derniers qui migrent vers la lésion pour assurer la cicatrisation sous le contrôle microglial. Dans les modèles animaux de SAE la prolifération astrocytaire est constamment reportée et associée aux dysfonctionnements cérébraux. En revanche aucune étude de neuropathologie humaine n'a confirmé l'existence de ces lésions chez l'homme (233).

#### II.2.2 Les perturbations de l'autorégulation cérébrale

L'autorégulation cérébrale est le processus qui assure le maintien d'une perfusion cérébrale constante malgré les variations de débit sanguin. Les unités glio-vasculaires composées des cellules endothéliales, de la lame basale, des astrocytes périvasculaires et des péricytes, ajustent la perfusion aux besoins énergétiques des neurones (266). Au cours du sepsis, ce système peut

être défaillant, ce qui entraîne fréquemment des lésions ischémiques et cette défaillance semble précéder l'apparition de SAE (267,268). Le rôle des astrocytes est de réguler l'apport en substrats métaboliques, en eau et en ions des neurones, c'est ce qui s'appelle le couplage neuro-vasculaire (233). Une altération de ce couplage a été décrite au cours du sepsis probablement dû à un excès de production d'acide arachidonique et de NO (269).

### **II.2.3 Les altérations de la neurotransmission**

L'ensemble des processus évoqués jusqu'ici aboutissent à une altération du fonctionnement neuronal qui touche plusieurs systèmes de neurotransmission. L'effet du sepsis a été démontré sur les systèmes cholinergique (270),  $\beta$ -adrénergique (271) et dépendants de l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) (271). Au cours du sepsis, il existe un déséquilibre entre le système dopaminergique et le système cholinergique (272) mais aucune des tentatives pharmacologiques pour rétablir cet équilibre (utilisation de médicaments cholinergiques ou anti-dopaminergiques) n'a abouti (233). En revanche l'utilisation de médicaments agonistes du récepteur GABA comme les benzodiazépines a un effet néfaste sur le pronostic des patients septiques et à l'inverse les  $\alpha$ 2-agonistes comme la dexmédétomidine sont bénéfiques (273). Les mécanismes par lesquels ces voies de neurotransmission sont altérées ne sont pas complètement élucidés mais font probablement intervenir la production de NO et l'augmentation des concentrations sanguines d'acides aminés neurotoxiques comme le tryptophane, la tyrosine ou la phénylalanine (274).

Enfin, comme cela a déjà été évoqué, la libération massive de glutamate est à l'origine d'apoptose neuronal. Ce glutamate est libéré en grande partie par la microglie activée. Ce dernier présente une importante excitotoxicité puisque sa fixation sur son récepteur spécifique NMDA conduit à un influx cytoplasmique de calcium. Il mène alors à la libération par exocytose de granules de glutamate renforçant le cercle vicieux de l'excitotoxicité. L'accumulation de calcium est renforcée lors de défaillance énergétique cellulaire car la diminution de l'ATP disponible empêche le fonctionnement des pompes ioniques, ce qui favorise la dépolarisation des membranes et l'entrée de calcium (233). Le déséquilibre ionique qui s'en suit entraîne la mort de la cellule neuronale.

### **II.3 Les altérations de la fibre musculaire lors de sepsis**

Au cours du sepsis, le système nerveux périphérique peut subir des dysfonctionnements qui persistent parfois sous forme de séquelles. La physiopathologie exacte de ces dysfonctionnements n'est pas complètement connue, mais ils sont associés à de multiples altérations au sein du tissu musculaire qui sont ici détaillées.

#### **II.1 Une modification de la conduction nerveuse**

Chez les patients atteints de CIP, des dommages microvasculaires ont été repérés ainsi que la présence d'œdème qui pourraient entraîner la dépolarisation chronique de la partie terminale des axones des motoneurones (275,276). De plus l'œdème est aussi susceptible de générer une compression du nerf particulièrement lorsque ces derniers passent sous des fascias musculaires (223).

#### **II.2 Une altération de l'excitabilité et de la contractilité musculaire**

De nombreuses modifications dans l'expression des récepteurs et des canaux à la surface de la fibre musculaire ont été observées chez les patients et dans des modèles animaux de sepsis. Tout d'abord la densité de récepteurs à l'acétylcholine au niveau de la jonction neuromusculaire est diminuée et induit une diminution de la sensibilité du muscle à l'acétylcholine (277). Cependant une néo-expression de la forme fœtale du récepteur sur l'ensemble de la fibre a été observée et est interprétée comme une réponse de la fibre à la diminution de la stimulation nerveuse (278,279). L'excitabilité de la fibre musculaire est aussi diminuée par une forte altération de la vitesse de transmission du potentiel d'action musculaire (280). Ce ralentissement est responsable de l'élargissement des CMAP visible à l'EMG. Il est probablement dû à une augmentation de l'inactivation du canal sodique voltage-dépendant  $Na_v1.4$  (223). A ceci s'ajoute une dépolarisation du sarcolemme associée à des modifications des concentrations ioniques (surtout sodium et chlore) (223). Dans un modèle de CLP il a aussi été démontré la néo-expression de canaux non spécifiques appartenant à la famille des connexines (281). Quelques données suggèrent des altérations du couplage excitation-contraction avec notamment une diminution de l'expression du récepteur à la dihydropyridine (DHPR) et du récepteur à la ryanodine RYR1 (282). L'homéostasie calcique est également fortement altérée avec une augmentation de la concentration intracytoplasmique de calcium qui déclenche des perturbations majeures du métabolisme énergétique et protéique (223).

### **II.3 Un dysfonctionnement du métabolisme énergétique**

De fortes modifications du métabolisme énergétique s'opèrent dans la fibre musculaire au cours du sepsis. On observe notamment une réorientation vers la voie glycolytique indépendamment de la perfusion en dioxygène de la cellule. Ceci est nommée l'hypoxie cytopathique et correspond à un défaut de l'utilisation du dioxygène (283). Des lésions mitochondriales importantes ont été mises en évidence par microscopie électronique dans des modèles animaux (284) et un dysfonctionnement mitochondrial dans les muscles a été associé chez l'homme avec un plus mauvais pronostic (183).

Le sepsis entraîne la génération de NO par l'enzyme iNOS et la production de radicaux libres principalement par la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase cytosolique et le complexe I de la chaîne de transmission électronique des mitochondries. L'ensemble génère de la peroxy-nitrite ( $\text{ONOO}^-$ ) qui inhibe les complexes I, III et IV par nitrosylation irréversible et entraîne d'importantes lésions de l'ADN mitochondrial. Le potentiel de la membrane interne mitochondrial est réduit et la production d'ATP par phosphorylation oxydative est stoppée (223,285). Enfin des canaux calcium s'ouvrent sous l'effet de la baisse de potentiel de membrane entraînant une fuite majeure de calcium dans le cytosol. A la suite de ces événements, les voies de l'apoptose peuvent être déclenchées ou bien la biogénèse mitochondriale peut être relancée via l'activation de *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha* (PGC-1 $\alpha$ ) et Superoxyde dismutase 2 (SOD2) (223,285).

### **II.4 Un déséquilibre de la synthèse/dégradation des protéines**

Le sepsis entraîne une fonte musculaire associée à une diminution de la taille des fibres via l'activation de différentes voies de dégradation des protéines et une inhibition de leur synthèse (223). Le stress oxydatif est à l'origine de l'apparition de protéines spécifiques au niveau du réticulum qui marquent un stress de cet organite et qui sont susceptibles d'activer les voies de dégradation des protéines (286). La plus importante voie de dégradation des protéines est la voie ubiquitine-protéasome. L'entrée des protéines dans cette voie est assurée par leur ubiquitinylation via deux ubiquitine-ligases (triptite motif containing 63 (TRIM 63) et F-box only protein 32 (FBXO 32)) fortement surexprimées dans les modèles de sepsis et chez les patients (287,288). L'activité globale du protéasome est aussi augmentée (289). D'autres voies de dégradation des protéines sont probablement impliquées dans la fonte musculaire secondaire

au sepsis comme la voie de la calpaine stimulée directement par l'augmentation du calcium cytosolique ou celle de la caspase 12 (223).

La diminution de la synthèse protéique au cours du sepsis repose principalement sur l'inhibition de la voie Akt/*mammalian Target Of Rapamycin* (mTOR) qui est une voie centrale de l'anabolisme protéique (290).

## **II.5 La diminution des capacités de régénération**

Autour de la fibre musculaire, les cellules satellites jouent un rôle majeur dans l'homéostasie et la régénération du tissu musculaire. Or il a été démontré que le sepsis affecte ces cellules et diminue les capacités de régénération du muscle dans un modèle de CLP murin (291). Cette étude a démontré une apoptose des cellules satellites chez les souris septiques, un dysfonctionnement mitochondrial majeur associé à un fort stress oxydatif. Enfin l'injection de cellules souches mésenchymateuses permet de restaurer ces altérations.

### **III. Comment étudier le sepsis ?**

Malgré l'importance majeure du sepsis en médecine humaine, nos connaissances sur les mécanismes en jeu au cours de ce syndrome restent incomplètes et des questionnements se soulèvent quant à la méthodologie employée. En effet des modèles animaux existent depuis très longtemps mais aucun traitement spécifique n'est aujourd'hui efficace chez l'homme. Dans un premier temps les défis posés aux modèles actuels seront explicités avant de détailler les recommandations faites par certains experts dans ce domaine. Enfin une toute nouvelle approche de ce problème sera proposée.

#### **III.1 Les limites des modèles murins de sepsis**

##### **III.1.1 L'échec de 30 ans de recherche ?**

Il a été montré précédemment que même si la mortalité a diminué depuis 30 ans, aucun traitement spécifique n'est encore disponible aujourd'hui pour le sepsis. Pourtant, depuis 1982, plus de 80 essais cliniques de phase II ou III ont été tentés. La plupart n'ont montré aucune amélioration de la mortalité par rapport au placebo. Quelques-uns se sont montrés bénéfiques pour les patients mais les résultats n'ont pas pu être reproduits. Enfin certains ont mis en évidence des effets néfastes sur le pronostic des patients (292). Le tableau 2 rassemble quelques exemples de ces essais cliniques aux résultats souvent contradictoires.

Une grande majorité de ces essais, et surtout les plus récents, sont organisés à grande échelle, sont multicentriques et impliquent un grand nombre de patients. Malgré ce fort pouvoir discriminant, les résultats statistiques sont décevants. De plus, ils peuvent présenter un danger pour les patients puisque plusieurs essais cliniques ont déjà été interrompus bien avant la fin car la mortalité était significativement plus élevée dans le groupe traité (293).

*Tableau II - Exemples d'essais cliniques de traitements spécifiques contre le sepsis (228)*

Référence	Année	Patients (taille de l'échantillon)	Molécule	Effet sur la mortalité
<b>Corticoïdes</b>				
(129)	1984	Choc septique (59)	Méthylprednisolone	Aucun
(131)	1987	Sepsis ou choc septique (382)	Méthylprednisolone	Négatif
(196)	2002	Choc septique avec insuffisance surrénalienne (229)	Hydrocortisone et fludrocortisone	Positif
(195)	2008	Choc septique (499)	Hydrocortisone	Aucun
(294)	2018	Choc septique (3800)	Hydrocortisone	Aucun
(295)	2018	Choc septique (1241)	Hydrocortisone et fludrocortisone	Positif
<b>Agents anti-LPS</b>				
(296)	1982	Choc septique (212)	Antisérum humain contre E. coli	Positif
(297)	1994	Choc septique bactérie GRAM négative (621)	Anticorps humain anti-LPS	Aucun
(298)	2000	Sepsis bactérie GRAM négative (1090)	Anticorps murin anti-LPS	Aucun
(127)	2015	Choc septique d'origine abdominale	Polymyxine B	Aucun
<b>Agents anti-TLR4</b>				
(299)	2010	Sepsis (300)	Eritoran (antagoniste TLR4)	Aucun
(300)	2013	Sepsis (1961)	Eritoran (antagoniste TLR4)	Aucun
<b>Agents anti-TNF<math>\alpha</math></b>				
(301)	1996	Choc septique (99)	Protéine de fusion neutralisant le TNF $\alpha$	Négatif

(134)	1995	Sepsis (994)	Anticorps murin anti-TNF $\alpha$	Aucun
(302)	1996	Sepsis (564)	Anticorps murin anti-TNF $\alpha$	Aucun
(303)	1998	Choc septique (1878)	Anticorps murin anti-TNF $\alpha$	Aucun
(304)	2004	Sepsis avec forte concentration sérique d'IL-6 (998)	Afelimomab: fragment F(ab') <sub>2</sub> d'un anticorps murin anti-TNF $\alpha$	Positif
<b>Agents anti-IL1</b>				
(133)	1994	Sepsis (893)	IL-1RA humain recombinant	Aucun
(305)	1997	Sepsis ou choc septique (696)	IL-1RA humain recombinant	Aucun
(306)	2016	Sepsis ou choc septique (763)	IL-1RA humain recombinant	Positif
(307)	2018	Sepsis (529)	IL-1RA humain recombinant	Variable selon la concentration plasmatique basale
<b>Anticoagulants</b>				
(168)	2001	Sepsis (1690)	Protéine C activée	Positif
(169)	2005	Sepsis à faible risque de mortalité	Protéine C activée	Aucun
(308)	2007	Enfants avec sepsis (477)	Protéine C activée	Aucun
(170)	2012	Infection, SIRS, choc septique (1697)	Protéine C activée	Aucun
(309)	2013	Sepsis et CIVD (741)	Thrombomoduline	Aucun
<b>Immunostimulants</b>				



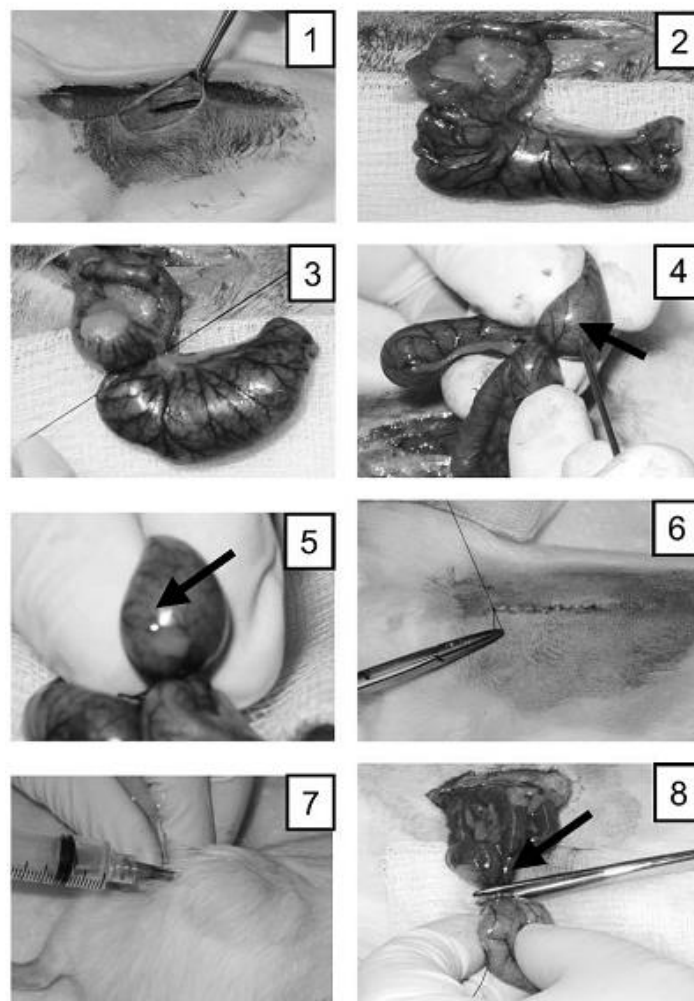
(310)	2003	Sepsis et pneumonie bactérienne (701)	G-CSF	Aucun
(138)	2009	Sepsis et immunosuppression	GM-CSF	Aucun
<b>Autres</b>				
(311)	2013	Sepsis (194)	Lactoferrine	Positif
(293)	2015	Sepsis (305)	Lactoferrine	Négatif
(132)	1997	Sepsis (455)	Ibuprofène	Aucun
(312)	2014	Sepsis et détresse respiratoire (745)	Rosuvastatine	Aucun
(313)	2017	Choc septique, personnes âgées (240)	Levosimendan	Aucun

Ce manque de résultats peut s'expliquer par différentes raisons. La durée inadaptée des traitements est souvent choisie de manière arbitraire (292). L'hétérogénéité des patients recrutés est aussi grandement décriée. En effet, certains traitements semblent efficaces pour certaines catégories de patients et néfastes pour d'autres (307). La définition du sepsis peut s'appliquer à n'importe quelle infection or les profils biochimiques des patients peuvent être très différents amenant ainsi des réponses hétérogènes au même traitement (292). Enfin, l'efficacité des composés testés est bien sûr à remettre en question tout comme la méthodologie avec laquelle ils sont sélectionnés. Par exemple, aucun des anticorps anti-LPS testés n'a montré sa capacité à neutraliser les effets du LPS *in vitro* (297). L'utilisation de modèles animaux pour la recherche préclinique est essentielle pour le développement de nouveaux traitements efficaces contre le sepsis mais ces derniers sont aujourd'hui fortement critiqués au vu des difficultés rencontrées par la recherche translationnelle dans ce domaine. C'est sur cet aspect que le reste de ma réflexion va se concentrer.

### III.1.2 Des modèles peu reproductibles et peu comparables

L'étude préclinique du sepsis se base depuis toujours en très grande majorité sur l'étude de modèles murins. Il faut distinguer d'un côté les modèles de syndrome inflammatoire systémique (SIRS) basés sur l'injection de LPS par voie intraveineuse ou intrapéritonéale et les modèles de sepsis au cours desquels une infection se développe. La différence entre ces deux types de modèles est majeure et la réponse de l'hôte dans ces deux cas de figure diffère totalement en

terme de mortalité et de profil inflammatoire (314). La présence d'un agent infectieux capable de proliférer est essentielle pour parler de sepsis. Le gold-standard est un modèle chirurgicale de péritonite septique basé sur la ligature et la ponction du caecum (CLP : Cecal Ligation and Puncture) mais l'injection intrapéritonéale de fèces, de broyat de caecum ou d'un inoculum bactérien connu est aussi utilisé (315–317). Cependant, il paraît évident au vu de nos connaissances des mécanismes de déclenchement de la réponse immunitaire que la présence de lésions tissulaires à l'origine de signaux de danger modifie le profil inflammatoire de l'hôte. Ces différents modèles de sepsis murin montrent des différences à la fois de mortalité, de cinétique et de profil inflammatoire (315,318,319), ce qui rend la comparaison entre les études



*Figure 12 - Etape de réalisation d'une ligature et ponction du caecum (CLP) (d'après (252))*

- 1) Incision de laparotomie après préparation chirurgicale du site
- 2) Isolement du caecum
- 3) Ligature du caecum sous la valve iléocœcale
- 4) Ponction du caecum
- 5) Pression sur le caecum pour faire sortir des matières fécales
- 6) Fermeture de l'incision en deux couches
- 7) Réhydratation sous cutanée et réveil
- 8) Excision du caecum lors d'une nouvelle laparotomie après 10h

difficile. En plus d'avoir des effets peu comparables entre eux certaines modélisations dont la CLP sont également peu reproductibles. D'importantes variations de mortalité et de concentration en IL-6 et TNF $\alpha$  ont été observées selon la technique utilisée et notamment selon la longueur de caecum ligaturée (320).

A la suite de la procédure, l'utilisation d'antibiotiques et une réhydratation sous-cutanée sont possibles mais pas toujours pratiquées et influencent grandement le résultat de l'expérience (316). De nombreux autres paramètres peuvent altérer les résultats. Les bactéries responsables du sepsis proviennent directement de la flore digestive des animaux qui est donc influencée par l'environnement et l'alimentation. Ceci crée des disparités entre les laboratoires mais aussi dans le temps et oblige à réaliser des tests préliminaires de façon à déterminer la gravité clinique du modèle pour le groupe contrôle (316). De plus les souris étant coprophages, leur flore digestive peut être source de bactéries différentes de celles responsables de sepsis chez l'homme (321). Le choix des animaux peut aussi compliquer la comparaison entre les études et la déduction de résultats fiables et généralisables à l'espèce entière puis à l'homme. Les souris les plus utilisées appartiennent à la souche C57BL/6. Cependant, la très forte homogénéité génétique des souches de souris de laboratoire accentue les différences entre les souches qui répondent différemment au sepsis (322). Par exemple, lorsque l'on s'intéresse à la modulation de l'expression génétique des macrophages exposés au LPS chez 3 souches (C57BL/6, DBA2 et BALB/c) 415 gènes sont modulés de façon similaire mais jusqu'à 960 sont modulés différemment (323). Les lignées transgéniques utilisées pour évaluer l'influence de l'expression d'un gène dans le mécanisme physiopathologique possèdent aussi une information génétique très différente du reste de l'espèce et peuvent notamment posséder des mutations dites passagères qui compliquent l'interprétation des résultats (324).

Il est possible de constater que l'ensemble des investigations autour de la physiopathologie du sepsis chez la souris repose sur des modèles de sepsis abdominaux alors que la porte d'entrée majeure chez l'homme est l'appareil respiratoire (18). Ceci constitue une limitation supplémentaire à la généralisation des résultats à l'ensemble des patients humains.

### **III.1.3 Des particularités spécifiques difficiles à surmonter**

Les débats autour des limites des modèles murins existent depuis longtemps mais c'est un article publié en 2013 par Seok et al. qui a déclenché une forte vague de remise en questions (325). Cet article compare l'expression des gènes des leucocytes sanguins dans des situations de brûlure, traumatisme et endotoxémie humaines avec les modèles murins correspondants et révèle une mauvaise corrélation entre ces modèles et les maladies humaines. D'autres auteurs

ont défendu les modèles murins (326) et en 2015 une nouvelle analyse des données de Seok utilisant des critères d'inclusion différents conclue à une forte corrélation entre modèles murins et réalité clinique (327). Cependant, cette analyse montre que parmi les couples de gènes orthologues dont l'expression est modifiée dans les deux espèces au cours du sepsis, 62% varient dans la même direction. Or dans le cas de non corrélation, la probabilité est de 50%, donc malgré que la corrélation soit significative la représentativité du modèle reste très discutable (328).

Ce défaut de représentativité des modèles de sepsis est à rapprocher des particularités spécifiques fortes de la souris en termes d'immunologie et aux contraintes liées à l'environnement de laboratoire.

Tout d'abord, les expériences d'injection de LPS montrent que la sensibilité des souris aux endotoxines est bien inférieure à celle de l'homme : la Dose Léthale 50% (DL50) du LPS chez la souris est de 1-25 mg/kg (329–331) soit 10 000 fois plus que la dose la plus forte utilisée chez l'homme pour induire un état de choc (41). Cette résistance est illustrée par le fait que pour obtenir une tempête cytokinique comme c'est le cas pour l'homme, il faut associer une laparotomie, une caecotomie, une fracture du fémur et une lésion musculaire (332). De nombreuses différences ont été rapportées entre le système immunitaire de la souris et celui de l'homme (333). Par exemple il est possible de citer des différences dans l'expression des TLR (334) ou encore la formule leucocytaire sanguine (souris : 75-90% lymphocyte/25-10% polynucléaires neutrophiles, homme : 30-50% lymphocytes/50-70% polynucléaires neutrophiles) (335). De même, les souris ne produisent pas de CRP ni d'antitrypsine ou d'IL-8 et ont un système du complément de plus faible activité (328).

Les contraintes imposées par l'environnement du laboratoire sont également à considérer pour évaluer la représentativité du modèle. En effet, les conditions de vie des souris de laboratoire sont sur certains points assez éloignées de leurs préférences physiologiques et sont susceptibles de modifier fortement leur réponse à l'infection. L'exemple le plus marquant est celui de la température. Les souris gardées dans des animaleries à température ambiante (20-22°C) présentent une hypothermie au cours du sepsis (328). A l'inverse si elles sont gardées dans leur zone de confort thermique (30-32°C) (336), les souris présentent de la fièvre et ont une meilleure survie au sepsis (337–339). L'alimentation des souris est donnée *ad libitum* et leur niveau d'exercice est réduit donc la plupart des expériences sont réalisées sur des souris sédentaires souvent en surpoids (340). Le sepsis touche chez l'homme des individus plutôt âgés or la majorités des expérimentations sont réalisées chez des souris (très) jeunes adultes (328) alors que la mortalité du sepsis chez les souris âgées est supérieure (341).

### **III.1.4 Le défi éthique dans la modélisation du sepsis**

Toutes les expérimentations animales doivent faire l'objet d'une réflexion éthique et doivent obtenir l'approbation d'un comité d'éthique. L'expérimentation peut être évaluée par plusieurs méthodes comme par exemple l'appréciation tridimensionnelle de Bateson (342). Cette méthode prend en compte trois éléments : la qualité scientifique, la probabilité de souffrance animale et la probabilité d'obtention de résultats importants pour la médecine. Au vu des connaissances actuelles et des critiques qui entourent notamment le modèle de la CLP chez la souris, cette probabilité est réduite. De plus, cette procédure est fortement traumatisante et douloureuse. Elle est basée sur la création d'une péritonite qui évolue sur une période relativement longue et dont la douleur est difficile à contrôler même avec les meilleurs moyens analgésiques.

Il se pose donc actuellement la question du remplacement ou de l'amélioration de ce modèle par de nouvelles approches expérimentales. Pour augmenter la représentativité du modèle il a notamment été proposé l'utilisation de souris humanisées, c'est-à-dire possédant un système immunitaire humain (343).

## **III.2 La nécessité de changer d'approche**

### **III.2.1 Les nouveaux objectifs de la modélisation du sepsis**

L'échec, au moins partiel, dans la recherche d'un traitement efficace contre le sepsis est avéré et pousse à une remise en question des méthodes employées jusqu'à maintenant. Pour autant, les modèles murins ne sont pas les seuls responsables et les abandonner définitivement serait sans doute une erreur. Pour relever le défi posé, certains encouragent un changement d'approche (344). Jusqu'à présent, les modèles étaient utilisés pour identifier une molécule ou un mécanisme pour ensuite intervenir chez l'homme. Aujourd'hui, il est proposé d'identifier un dysfonctionnement chez l'homme puis trouver un modèle dans lequel ce dysfonctionnement est présent pour tester des hypothèses et des traitements avant de pouvoir enfin intervenir chez l'homme.

Cette approche permet de ne plus traiter le sepsis dans son ensemble mais de le fractionner en dysfonctionnements observés chez les patients. Cela implique d'identifier des populations de patients selon des critères cliniques et des biomarqueurs et de réaliser des essais cliniques plus ciblés pour des molécules avec une indication précise pour des patients bien distincts (292). A

cet effet, le développement de la transcriptomique, protéomique et métabolomique est essentiel (345).

Dans le même temps, il est nécessaire d'améliorer les modèles pré-cliniques et dans ce but, un comité d'expert publiera en janvier 2019 une série de recommandations (346).

La CLP chez la souris n'est plus le seul gold standard et un modèle unique ne permet pas de répondre à toutes les questions. Dans cette optique, il est intéressant de considérer de nouvelles techniques mais aussi de nouvelles espèces pour l'étude du sepsis (328).

### **III.2.2 L'intérêt pour de nouvelles espèces**

La faible sensibilité des souris aux infections constitue une limite majeure pour la recherche pré-clinique sur le sepsis alors que d'autres espèces plus sensibles peuvent être plus intéressantes (10).

- **Le lapin :**

Le lapin est une espèce aussi sensible que l'homme à l'infection qui développe des lésions proches de celles observées chez l'homme (347,348).

- **Le porc :**

Le porc est aussi une espèce à considérer. Les macrophages de cette espèce répondent au LPS de façon beaucoup plus proche de celle des macrophages humains que ceux de la souris. La formule leucocytaire du porc est identique à celle de l'homme et il produit de l'IL-8 comme chimiokine. Les deux espèces sont proches en termes de physiologie. Enfin la taille de cette espèce permet la réalisation de procédures médicales et chirurgicales identiques à celles réalisées chez l'homme comme la mise sous ventilation assistée, la pose de cathéters veineux périphériques ou centraux et de cathéters artériels. Il est donc possible de modéliser les conditions d'un service de réanimation (349). De tels modèles sont déjà utilisés par certaines équipes (350,351)

- **Le mouton :**

L'espèce ovine est une autre possibilité. Des modèles de sepsis d'origine pulmonaire ont déjà été mis en place dans cette espèce par inhalation de bactéries pathogènes (352–355). Ces modèles ont l'intérêt de reproduire l'origine la plus fréquente de sepsis chez l'homme et de permettre de contrôler la bactérie à l'origine du sepsis pour se rapprocher au mieux de la situation clinique. De même, des modèles ovins de péritonite septique existent par injection de fèces (356).

- **Les primates :**

Au vu de leur proximité phylogénétique, les primates pourraient être de bons candidats mais la réponse au LPS des primates non-humains et particulièrement des babouins est assez différente de celle de l'homme (357). En effet le modèle de sepsis chez le babouin est basé sur une bactériémie de  $10^7$  unités formant une colonie (UFC)/kg d'E. coli soit bien plus que ce qui est rencontré cliniquement chez l'homme (10,358). La recherche d'espèces de primates plus sensibles aux infections est en cours actuellement.

### **III.2.3 Des limites majeures à ces nouveaux modèles de sepsis**

De nombreux obstacles empêchent le développement et la généralisation de ces modèles. Le premier est le coût important de ce type d'expérimentations qui nécessitent des structures adaptées et coûteuses. Ces animaux sont également chers à l'achat et à l'entretien. Les outils génétiques tels que les lignées transgéniques *knock-out* (KO) ou les KO conditionnels dits CRE-LOX qui existent chez la souris ne sont pas disponibles pour ces espèces. De la même façon, beaucoup d'outils d'analyse cellulaire ou moléculaire (kit de biologie moléculaire, puces à ADN, système de dosage, anticorps, ...) sont créés pour fonctionner chez la souris et ne sont pas toujours adaptables à d'autres espèces ce qui limite le champ d'investigation. Enfin, l'expérimentation chez les grandes espèces pose également un problème éthique particulièrement pour l'expérimentation sur les primates.

## **III.3 Une place à prendre pour les modèles spontanés dans l'étude du sepsis**

### **III.3.1 Penser la modélisation autrement...**

Les progrès de la médecine humaine ont depuis toujours été accompagnés par les progrès de la médecine vétérinaire. Les découvertes sur la physiologie et la pathologie des animaux domestiques ont nourri depuis Claude Bourgelat la recherche médicale et ont été la source de formidables avancées en médecine humaine. Le séquençage du génome humain puis celui d'espèces domestiques comme le chien ont ouvert la voie à l'étude des maladies héréditaires humaines à travers le prisme de nouveaux modèles animaux non plus expérimentaux mais spontanés. Ce fut le cas par exemple de maladies comme la rétinite pigmentaire ou l'ichtyose (359,360).

Depuis quelques années, le concept de modèle spontané s'élargit à des maladies acquises comme le cancer (12,361,362), l'arthrose (363) ou l'épilepsie (11). Ces modèles sont

particulièrement intéressants car en plus de partager des similarités génétiques avec l'homme, les animaux domestiques vivent dans le même environnement et sont exposés à des facteurs de risque communs (sédentarité, vieillissement, comorbidités, médicaments, exposition à des produits toxiques, ...). Le chien est une espèce particulièrement intéressante en partie car la qualité des soins apportés se rapproche de celle retrouvée dans les hôpitaux humains. En particulier, le développement de services de soins intensifs dans les grands centres hospitaliers vétérinaires en fait un terrain d'expérimentation idéale pour le traitement du choc et en particulier du choc traumatique (13) et du choc septique (364,365). Cependant il est possible de considérer d'autres espèces. L'espèce équine est notamment considérée comme un modèle intéressant de médecine du sport (366). La suite de ce travail s'attachera à explorer son intérêt éventuel dans la problématique du sepsis.

Cependant, pour assurer un rôle dans la recherche fondamentale, la pratique et la recherche vétérinaires doivent s'adapter en assurant une meilleure standardisation des soins, une documentation des cas complète et efficace pour pouvoir développer des études multicentriques à large échelle. Pour cela, il est nécessaire d'obtenir un consensus international en termes de terminologie, de critères diagnostiques et de traitements des maladies en se rapprochant le plus possible de l'état actuel des connaissances en médecine humaine. C'est ce qui a été demandé, en janvier 2018 dans l'*Equine Veterinary Journal* par Wilkins (367), pour le sepsis équin. Dans cet éditorial, il rappelle le changement en 2016 de la définition du sepsis en médecine humaine et demande un consensus autour d'une nouvelle définition du sepsis en médecine vétérinaire équine. Il demande une séparation claire de la définition du sepsis néonatal de celui de l'adulte comme c'est le cas en médecine humaine et des critères diagnostiques applicables dans de grandes études multicentriques.

Augmenter le niveau des connaissances en augmentant la quantité et la qualité des publications vétérinaires à la fois par les structures privées et les écoles vétérinaires permettra de valoriser ses modèles ainsi que les compétences de la profession pour la recherche. Par ce biais, la pratique quotidienne notamment des spécialistes et des grands centres hospitaliers vétérinaires doit s'inscrire dans une vision de santé globale pour que les progrès de la santé des animaux domestiques servent l'amélioration de la santé humaine.

### **III.3.2 Le cheval pour étudier le sepsis ?**

Le sepsis peut être retrouvé chez tous les mammifères et donc, comme l'homme et la souris, le cheval est susceptible de développer un sepsis. Comme cela a été évoqué précédemment, le sepsis équin souffre d'un problème de définition. Le sepsis adulte est encore défini comme un



SIRS associé à une infection (368). Ce terme est peu utilisé dans la littérature et à l'inverse d'autres termes comme celui d'endotoxémie sont fréquemment utilisés. Ce dernier décrit une situation clinique proche du sepsis qui regroupe des altérations cardiovasculaires (vasodilatation périphérique, tachycardie, hémocoagulation), un état d'hypercoagulabilité, un défaut d'oxygénation tissulaire et l'apparition de dysfonctionnements organiques (369). Chez ces animaux on retrouve la présence d'endotoxines dans le sang (24).

Cet état clinique d'endotoxémie est le plus souvent la complication d'un syndrome de colique digestive (c'est-à-dire d'un syndrome de douleur abdominale d'origine digestive) et plus particulièrement lors d'affections qui compromettent l'étanchéité de la barrière intestinale (strangulation, dilatation majeure, perforation). Ces affections sont susceptibles d'être à l'origine d'une translocation bactérienne (370) et donc d'un foyer infectieux. Lors de telles affections, une libération massive de cytokines a été démontrée (371) tout comme la présence de nombreux médiateurs inflammatoires tels que l'augmentation de la SAA (Serum Amyloid A) (372) ou des prostaglandines et thromboxanes (369). Les chevaux qui présentent ces signes subissent une réponse inflammatoire majeure, une possible infection, et sont sujets à une défaillance multi-organique. Ils répondent donc bien à la nouvelle définition du sepsis (14).

On peut donc voir dans l'endotoxémie secondaire à un syndrome de colique, un modèle de sepsis abdominal. Ce modèle est particulièrement intéressant car nous disposons dans l'espèce équine de nombreuses données issues de modèles expérimentaux tels que les injections de LPS ou les modèles de fourbure par surcharge glucidique qui miment en partie cette situation clinique de sepsis. La sensibilité du cheval aux endotoxines est connue et bien supérieure à celle de la souris puisque les doses utilisées sont de l'ordre du microgramme ( $\mu\text{g}$ ) (373,374). La réponse immunitaire secondaire à cette injection est semblable à celle de l'homme. En effet les cinétiques des cytokines à la fois pro et anti-inflammatoires telles que le  $\text{TNF}\alpha$  (375), l'IL-6, l'IL-8 (376) ou l'IL-10 (377) sont similaires à celles de l'homme (378,379). Le phénomène de tolérance endotoxinique a également été prouvé chez le cheval (380,381). De la même manière que chez l'homme ou la souris, il faut faire la distinction entre l'injection de LPS et le sepsis qui n'entraînent pas chez le cheval exactement les mêmes conséquences cliniques. En effet, les injections d'endotoxines n'aboutissent pas à des défaillances organiques graves comme la fourbure à l'inverse des situations d'endotoxémie cliniques ou au modèle de surcharge glucidique (369). Ceci démontre que la situation clinique qualifiée d'endotoxémie requiert la présence nécessaire de bactéries vivantes et donc qu'il s'agit bien d'un sepsis.



**SECONDE PARTIE : ETUDE  
EXPERIMENTALE DES  
CONSEQUENCES  
NEUROMUSCULAIRES DU SEPSIS  
D'ORIGINE ABDOMINAL CHEZ LE  
CHEVAL**



# **I. Matériel et méthode**

## **I.1 Objectifs de l'étude**

Certains chevaux atteints d'affections abdominales sévères développent un état clinique proche de celui des patients humains septiques. Cette étude a pour objectif de confirmer l'existence d'un syndrome septique répondant aux critères définis dans la définition sepsis-3 (382) et de rechercher la présence d'altérations dans le tissu musculaire et cérébral chez des chevaux décédés à la suite d'un sepsis abdominale. Elle s'inscrit dans une démarche de pathologie comparée qui vise à mettre en lumière un mécanisme lésionnel commun entre les mammifères au cours du sepsis.

## **I.2 Sélection des chevaux**

Quinze chevaux présentés à la clinique équine (CISCO) de l'école vétérinaire de Nantes (Oniris) morts ou euthanasiés des suites d'un syndrome de coliques sévère ont été inclus dans cette étude et constituent le groupe septique. Neuf chevaux sains euthanasiés pour des raisons expérimentales autres que cette étude ou morts d'une affection non inflammatoire ou infectieuse ont été recrutés pour constituer le groupe contrôle. Le consentement éclairé des propriétaires de chaque cheval recruté a été obtenu pour la réalisation de prélèvements post-mortem à des fins scientifiques. Malheureusement tous les prélèvements n'ont pas pu être réalisés sur tous les chevaux et certains ont été endommagés au cours du transport.

## **I.3 Recueil de données cliniques**

Pour chacun des 24 chevaux de l'étude, les informations suivantes ont été collectées : sexe, âge, race, activité, anamnèse, examen clinique à l'admission, diagnostic étiologique, poids approximatif.

Dans le cadre de la prise en charge médicale de ces chevaux, des analyses biologiques (hématologie et biochimie) ont été réalisées à l'école vétérinaires de Nantes. Ces données ont également été collectées.

Toutes ces informations ont permis d'établir pour chaque cheval un score clinique traduisant la défaillance multi-organique associée au sepsis. Le score utilisé a été le *Multiple Organ Dysfunction Syndrom with acute Surgical Gastrointestinal disease* (MODS SGI) (383). Cette

méthodologie est également celle utilisée dans les études cliniques humaines et se base sur l'évaluation de la fonctionnalité de plusieurs organes et systèmes. Le score MODS SGI a été modifié pour pouvoir être utilisé avec les données disponibles. En effet, l'évaluation s'est basée sur les données des comptes-rendus cliniques uniquement. Il a manqué une analyse comportementale, un dosage des gaz sanguins artériels et certains autres dosages comme la troponine I ou les acides biliaires. Les scores MODS SGI et MODS SGI modifié sont disponibles en annexe 3 et 4.

## **I.4 Prélèvements**

### **I.4.1 Sang**

Des tubes de sang ont été prélevés par ponction dans la veine jugulaire dans des tubes héparinés ou EDTA chez 18 chevaux (15 du groupe septique et 9 du groupe contrôle). Il s'agit des prélèvements sanguins réalisés en routine lors de l'admission d'un cheval au CISCO. Les sérums et/ou plasmas en excédent ont été congelés rapidement à -20°C. Le sang a été utilisé pour réaliser des dosages de cytokines.

### **I.4.2 Muscle**

Du tissu musculaire a été prélevé dans le gluteobiceps de 18 chevaux (11 du groupe septique et 7 du groupe contrôle) dans les 24h après la mort de l'animal. Chaque prélèvement a été congelé dans l'isopentane refroidi dans l'azote liquide puis conservé à -80°C afin de réaliser des cryosections fines pour la quantification de la vascularisation musculaire, pour le typage des fibres et pour l'étude de la voie du protéasome.

### **I.4.3 Encéphale**

L'encéphale a été prélevé dans les 24h suivant la mort de chaque cheval. Les prélèvements de 12 chevaux du groupe septique et 9 chevaux du groupe contrôle, sur les 24 animaux de l'étude, ont pu être analysés. L'hémisphère cérébral gauche a été placé dans le paraformaldéhyde 10% découpé en 5 tranches transversales. Huit régions anatomiques incluant le cortex préfrontal, le cortex frontal, le thalamus, l'hippocampe rostral, l'hippocampe caudal, le cortex occipital, le mésencéphale et le cervelet ont été isolées et incluses dans un bloc de paraffine pour l'analyse histochimique.

## **I.5 Dosage de cytokines**

### **I.5.1 Objectifs**

Dans le but de caractériser le processus inflammatoire présent chez nos chevaux septiques, nous avons cherché à doser les concentrations de cytokines libres dans le plasma des chevaux de notre cohorte par une technique multiplexe (ou multi-analyte profiling (MAP)).

### **I.5.2 Protocole**

La technologie Luminex® utilisant une technique MAP permet la détection et quantification simultanée de plusieurs dizaines de cytokines secrétées (jusqu'à 100) grâce à l'utilisation de microsphères magnétiques, chacune identifiée par un ratio unique de fluorescence (après une stimulation à 635nm la bille émet deux fluorescences à 658nm et 712nm d'intensité différente), et portant un anticorps spécifique à chaque analyte. La fixation de l'analyte est repérée par la fixation d'un anticorps couplé à un troisième fluorophore. L'acquisition des résultats est réalisée par une lecture en cytométrie en flux. Afin de déterminer les concentrations plasmatiques en différentes cytokines et chémokines dans notre cohorte, nous avons utilisé un kit spécifique à l'espèce équine permettant le dosage de 23 analytes (Equine Cytokine/Chemokine magnetic bead panel, Millipore). Ces cytokines sont : TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17A, IL-18, IFN $\gamma$ , le G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor), le GM-CSF, le *Fibroblast Growth Factor 2* (FGF-2), l'eotaxine, la fractalkine, le *Gamma interferon inducible protein 10* (IP-10), le Growth related gene (GRO), la Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) et la Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted (RANTES).

Une plaque de lecture DropArray™ a été utilisée afin d'augmenter la sensibilité de détection. Cette plaque possède un revêtement hydrophile particulier permettant un meilleur agencement spatial des microsphères magnétiques, ce qui favorise la réaction de fixation antigène-anticorps. Elle permet en outre de n'utiliser que 5 $\mu$ L d'échantillon par puits et 1/5 de réactifs. Brièvement, la plaque DropArray™ est bloquée 30 minutes avec de la BSA (bovine serum albumin) puis rincée, avant de mettre les microsphères magnétiques en contact avec l'échantillon biologique toute une nuit à 4°C. Après rinçage, les anticorps biotinylés de détection sont incubés pendant 1h à température ambiante puis leur signal est amplifié par des anticorps fluorescents de streptavidine incubés pendant 30min. L'analyse par cytométrie a eu lieu immédiatement après préparation de la plaque (Bio-Plex 200®, laboratoires Bio-Rad).

Le choix des cytokines dosées a été basé sur des données bibliographiques et a été limité par les méthodes de dosage disponibles spécifiques à l'espèce équine. Toutes celles choisies sont connues pour subir des variations plus ou moins importantes au cours du sepsis chez des modèles animaux et/ou chez l'homme (cf. Tab. 14).

## **I.6 Immunohistochimie du tissu encéphalique**

Des coupes de transversales fines de 3µm ont été réalisées pour chaque région à partir des blocs de paraffine. Les marquages immunohistochimiques de ces coupes ont été réalisés de façon automatisée à l'aide d'un BOND III (Leica®). L'acquisition a été effectuée à l'aide d'un scanner de lames Axio Scan II.1 (ZEISS®) avec l'objectif 20X. Pour chaque lames les zones anatomiques d'intérêt ont été scannées séparément. Les données provenant des différentes zones de chaque région ont ensuite été rassemblées ou analysées séparément. L'annexe 5 regroupe les anticorps utilisés.

### **I.6.1 Objectifs**

Dans le système nerveux central, la microglie constitue la majorité des cellules de l'immunité innée. Les cellules microgliales sont capables de produire de nombreux radicaux libres, cytokines et chémokines qui peuvent être délétères. Leur activation s'accompagne de modifications importantes de leur morphologie. Elles passent en effet d'une forme au cytoplasme très ramifiée à une forme circulaire dite améboïde (384) et sécrètent alors des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , IL-6 et IL-12 (255). Elles constituent donc un marqueur possible de la neuro-inflammation (385). Cette analyse a pour objectif de rechercher l'activation microgliale.

### **I.6.2 Protocole**

Pour détecter le changement de forme des cellules microgliales, leur récepteur Iba1 a été marqué.

Les coupes ont subi un déparaffinage consistant en 2 bains de xylène de 5 minutes puis 2 bains d'éthanol absolu de 2 minutes. Elles ont été réhydratées dans du PBS 1X pendant 3 fois 5 minutes. Les peroxydases endogènes ont été bloquées par une solution de peroxyde d'hydrogène à 0,3% pendant 20 minutes. Une étape de saturation de 15 minutes à l'aide de BSA 3% a été réalisée. Les lames ont ensuite été incubées avec l'anticorps primaire anti Iba1 pendant 30 minutes. Après trois rinçages de 5 minutes avec du PBS 1X, la solution d'anticorps



secondaire anti-Ig de lapin biotinylés a été laissée pendant 30 minutes d'incubation. Après trois nouveaux rinçage une solution de streptavidine HRP a été déposée et laissée 30 minutes avant de recommencer la procédure de lavage. Une solution de diaminobenzidine (DAB) est ensuite laissée pendant 5 minutes. Après lavage, une contre-coloration des noyaux à l'aide d'hématoxyline est réalisée pendant 10 secondes. Enfin les coupes ont été passées dans des bains successifs de PBS, d'éthanol et de xylène avant d'être montées entre lame et lamelle.

## **I.7 Immunofluorescence du tissu musculaire**

Des cryosections musculaires transversales de 8µm d'épaisseur ont été réalisées. Les images ont été acquises à l'aide d'un scanner de lames Axio Scan II.1 (ZEISS®) avec l'objectif 20X. L'annexe 5 regroupe les anticorps utilisés.

### **I.7.1 Quantification de la vascularisation musculaire**

#### I.7.1.1 Objectifs

Les conséquences vasculaires de l'endotoxémie chez le cheval sont nombreuses (386). Pour examiner la morphométrie du compartiment vasculaire dans les muscles des chevaux septiques, un marquage du facteur de Van Willebrand a été réalisé. Ce facteur est présent à la surface des cellules endothéliales et est susceptible de déclencher la cascade de coagulation. L'objectif de cette analyse est donc de rechercher les altérations morphologiques des vaisseaux dans le tissu musculaire.

#### I.7.1.2 Protocole

Les cryosections ont subies une réhydratation dans une solution de tampon phosphate isotonique (PBS 1X) puis ont été perméabilisées au triton 0,5 % pendant 20 minutes. Après un rinçage dans 3 bains successifs de PBS 1X pendant 5 minutes, une étape de saturation des sites protéiques non spécifiques avec de l'albumine bovine (BSA) diluée à 10% dans du PBS 1X pendant une heure a été réalisée. Les cryosections ont de nouveau été rincées dans le PBS puis ont incubé une nuit à 4°C avec la solution d'anticorps primaires. Cette solution était composée d'anticorps anti-facteur de Van Willebrand, et d'anticorps anti-laminine (constituant majeur de la lame basale). Les cryosections ont de nouveau été rincées puis ont incubé une heure à 37°C avec la solution d'anticorps secondaires. Les cryosections ont finalement été rincées puis montées entre la lame et lamelle à l'aide de Fluoromount® (Interchim).

## **I.7.2 Typage de fibres musculaires**

### **I.7.2.1 Objectifs**

Le sepsis peut être à l'origine de perturbations métaboliques majeures, notamment dans le tissu musculaire comme cela a déjà été évoqué plus haut. Une évaluation fine du métabolisme musculaire nécessite une évaluation qualitative et quantitative des différents types de fibres musculaires qui présentent un métabolisme différent. L'objectif est donc de comparer le métabolisme des muscles des chevaux de l'étude.

### **I.7.2.2 Protocole**

Après, réhydratation les cryosections de muscle ont subi un blocage pendant 1h avec de la BSA 3%. L'incubation avec la solution d'anticorps primaires a duré deux heures à température ambiante. Cette solution était composée d'anticorps anti-chaîne lourde de myosine (MHC) de type 1, anti-MHC de type 2B, anti-MHC de type 2A, et d'anticorps anti-laminine. Après rinçage, les cryosections ont incubé une heure à température ambiante avec la solution d'anticorps secondaires puis ont été montées entre la lame et lamelle à l'aide de Fluoromount® (Interchim).

## **I.7.2 Etude de la voie du protéasome**

### **I.7.1.1 Objectifs**

Les conséquences musculaires du sepsis aboutissent généralement à une amyotrophie via une modification du métabolisme protéique (223). En particulier, la voie du protéasome s'est montrée la plus invariablement altérée. Elle contrôle la dégradation des protéines. La protéine entre dans cette voie de dégradation en subissant une ubiquitinylation par des ubiquitineligases. Ces enzymes sont stimulées chez les patients et dans les modèles connus de sepsis (281,387). Pour étudier cette voie dans les muscles des chevaux septiques, un marquage de ces enzymes tripartite motif containing 63 (TRIM 63) et F-box only protein 32 (FBXO 32) a été réalisé.

### **I.7.1.2 Protocole**

Les cryosections de muscle ont subies une réhydratation dans une solution de tampon phosphate isotonique (PBS 1X) puis ont été perméabilisées au triton 0,5 % pendant 20 minutes. Après un

rinçage dans 3 bains successifs de PBS 1X pendant 5 minutes, une étape de saturation des sites protéiques non spécifiques avec de l'albumine bovine (BSA) diluée à 10% dans du PBS 1X pendant une heure a été réalisée. Les cryosections ont de nouveau été rincées dans le PBS puis ont incubé une nuit à 4°C avec la solution d'anticorps primaires. Cette solution était composée d'anticorps anti-TRIM 63 et FBXO32, et d'anticorps anti-laminine. Les cryosections ont de nouveau été rincées puis ont incubé une heure à 37°C avec la solution d'anticorps secondaires. Les cryosections ont finalement été rincées puis montées entre lame et lamelle à l'aide de Fluoromount® (Interchim).

### **I.8 Analyse morphologique**

L'intégralité de l'analyse des coupes de muscle ou de cerveau a été réalisée grâce à un logiciel gratuit FiJi (NIH, Bethesda, MD, USA(388)) dédié à l'analyse d'images biologiques.

L'analyse des coupes immunomarquées de muscle a été effectuée à l'aide d'une *macro* nommée *MuscleJ* (manuscrit en cours de seconde révision), développée au sein du laboratoire par le Dr. Anne Danckaert. Les caractères morphologiques, quantitatifs et qualitatifs obtenus sont le nombre et la surface des fibres par coupe, le nombre de fibre de chaque type (I, IIA, IIB, IIX), et le nombre de vaisseaux par fibre.

Les images provenant des immunomarquages Iba1 des coupes de cerveaux ont aussi été analysées via le logiciel FiJi. Après une analyse de l'histogramme des intensités afin de détecter le signal spécifique des immunomarquages, la surface occupée par le signal Iba1 est calculée ainsi que la surface entière du tissu observé. Cette méthodologie, entièrement automatisée, permet une fiabilité et une reproductibilité des résultats obtenus bien meilleure par rapport à une analyse manuelle.

Certaines coupes de cerveau ou cryosection de muscle de taille trop importante ou de qualité trop faible n'ont pas pu être analysées par le logiciel.

### **I.9 Analyse statistique**

Les logiciels Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., USA) et R (R Development Core Team (2005). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL : <http://www.R-project.org>) ont été utilisés pour l'analyse statistique des résultats obtenus. Les données ont été analysées par le test de Mann-Whitney ou le test t de Student après évaluation de la normalité de la distribution de l'échantillon à l'aide du test de d'Agostino-Pearson. Les variances ont été comparées avec un

test F. La variabilité des échantillons entre les conditions a été testée par l'analyse de variance à un facteur de Kruskal-Wallis. Certaines données ont également été analysées par des tests t multiples associés à une correction de multiples comparaisons par la méthode de Holm-Sidak. Les données qualitatives, ont été analysés par un test du chi carré ( $\chi^2$ ) ou un test exact de Fisher. La signification statistique est représentée sur les graphiques (\* p <0,05 ; \*\* p <0,01 ; \*\*\* p <0,001 ; \*\*\*\* p <0,0001).

Une Analyse Factorielle Multiple (AFM) de certains groupes de données a été réalisée à l'aide du package FactoMineR du logiciel R. Les données manquantes ont été traitées par une méthode d'imputation itérative à l'aide du package missMDA du même logiciel.

Une recherche de sous-populations a été réalisée par la méthode des k-moyens à l'aide du logiciel R.

## II. Résultats

### II.1 Données cliniques, description de la cohorte

Tableau III - Composition de la cohorte

N° du Cheval	Groupe	Age (années)	Sexe	Race	Diagnostic
2	Septique	12	Femelle	Quarter Horse	Inconnu
5	Contrôle	17	Femelle	Selle français	Contrôle
6	Septique	19	Hongre	Selle français	Inconnu
7	Contrôle		Femelle		Contrôle
8	Septique	8	Femelle	Selle français	Déplacement à droite du colon
9	Contrôle	22	Femelle	Pur-sang	Contrôle
10	Septique	7	Femelle	Selle français	Torsion de colon
11	Contrôle	4	Hongre	Pur-sang	Cheval d'expérimentation
12	Contrôle	5	Entier	Trotteur français	Cheval d'expérimentation
13	Contrôle	4	Entier	Trotteur français	Cheval d'expérimentation
14	Contrôle	3	Femelle	Trotteur français	Cheval d'expérimentation
15	Contrôle	3	Entier	Trotteur français	Cheval d'expérimentation
16	Contrôle	2	Femelle	Trotteur français	Cheval d'expérimentation
17	Septique	12	Hongre	KWPN	Torsion de colon
18	Septique	20	Femelle	Selle français	Étranglement de l'intestin grêle
19	Septique	4	Hongre	Selle français	Typhlocolite
20	Septique	3	Hongre	Poney	Typhlocolite
21	Septique	11	Femelle	Pur-sang	Rupture du caecum
22	Septique	11	Femelle	KWPN	Lacération rectale
23	Septique	8	Entier	Trotteur français	Etranglement intestin grêle
24	Septique	19	Femelle	Poney	Etranglement intestin grêle
25	Septique	16	Femelle	Selle français	Torsion de colon
26	Septique	12	Femelle	Poney	Tumeur intestinale
27	Septique	2	Femelle	Selle français	Torsion de colon

La cohorte de chevaux recrutés pour cette étude représente un groupe d'animaux avec une forte variabilité. Elle est composée de trotteurs français, pur-sangs, selles français, poneys, quater horses et KWPN (cf. Tab. 3). Ils pratiquent principalement une activité de loisir. Un test exact de Fisher a permis de comparer la répartition des races entre les deux groupes (cf. Fig. 13). La race trotteurs français est significativement sur-représentée dans le groupe contrôle ( $p=0,008$ ).

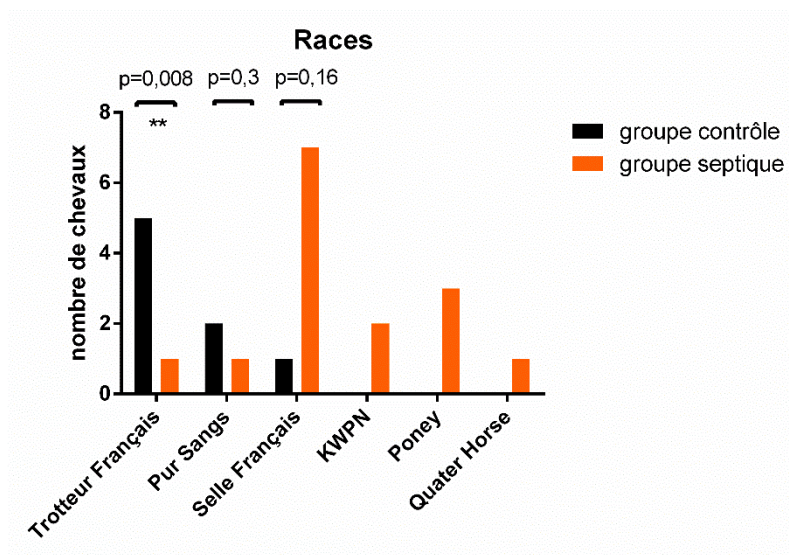


Figure 13 - Race des chevaux de la cohorte

Test exact de Fisher. On observe une surreprésentation de Trotteurs Français dans le groupe contrôle ( $p=0,08$ ).

Les chevaux sont âgés de 2 à 22 ans (cf. Fig. 14). Pour le groupe septique la moyenne est de 11 ans, pour le groupe contrôle elle est de 4 ans. Le test de Mann-Whitney n'a pas permis de mettre en évidence de différence significative entre les médianes des deux groupes ( $p=0,25$ , Intervalle de confiance (IC) à 95% de la différence [-2 :9]). L'âge n'est pas réparti de façon homogène

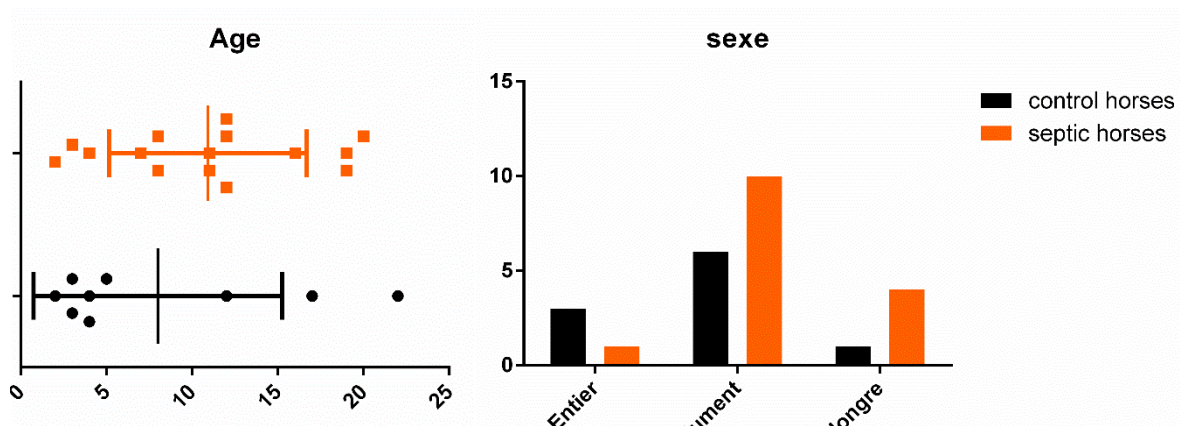


Figure 14 - Age et sexe des chevaux de la cohorte

Test de Mann-Whitney de comparaison des médianes des âges ( $p=0,25$ , Intervalle de confiance (IC) à 95% de la différence [-2 :9]). Test F de comparaison des variances ( $p=0,43$ ). Sont représentés la médiane et l'intervalle interquartile  
Test du Chi carré entre les sexes ( $\chi^2 = 2,92$ ).

dans le groupe contrôle puisque 6 chevaux sur les 10 sont âgés de moins de 5 ans alors que le cheval le plus âgé avait 22 ans. Cependant la comparaison des variances par le test F n'a pas mis en évidence de différence significative ( $p=0,43$ ).

Des mâles non-castrés (entiers), des femelles et des mâles castrés (hongres) ont été inclus dans l'étude. Aucune différence significative de répartition a été mise en évidence à l'aide d'un test du Chi carré ( $\chi^2 = 2,92$ ) (cf. Fig. 14).

Les chevaux du groupe septique ont été présentés à la clinique souffrant d'un syndrome abdominal aigu qui évoluait depuis un temps très variable. Le diagnostic étiologique final a pu être établi dans 13 cas sur 15. Leur survie en hospitalisation varie également ce qui aboutit à une durée d'évolution du sepsis variant de 2 à 216 heures (cf. Fig. 15).

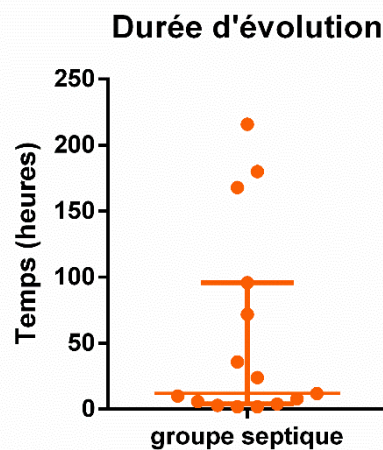


Figure 15 - Durée d'évolution des signes cliniques

Sont représentés la médiane et l'intervalle interquartile

Les données cliniques collectées pendant leur hospitalisation ont permis de calculer un score de défaillance multi-organique, le MODS SGI. Ce score a été développé spécifiquement pour

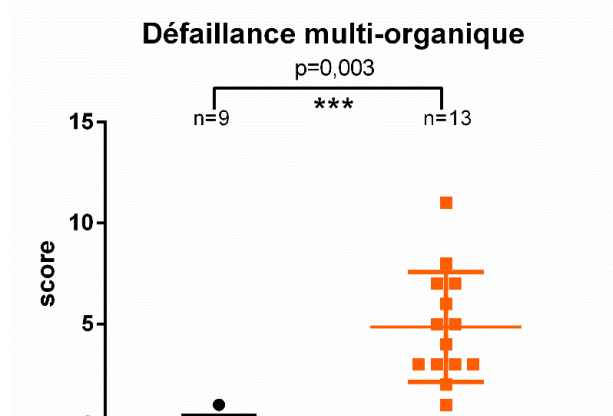


Figure 16 - Score de défaillance organique

Test de Mann-Whitney de comparaison des médianes ( $p=0,003$ ). Sont représentés la médiane et l'intervalle interquartile. Le groupe septique a un score significativement plus élevé.

l'espèce équine (383). Tous les chevaux du groupe septique ont un score non nul attestant d'une défaillance organique. La médiane du score dans ce groupe est de 4,5. Un cheval contrôle s'est vu attribuer un score d'un point. Ce point lui a été attribué en raison d'un taux de créatine kinase plasmatique légèrement augmenté.

Il est donc possible d'affirmer qu'il existe une défaillance multi-organique dans le groupe septique. Pour aller plus loin les paramètres cliniques, biochimiques et hématologiques ont été comparés entre les deux groupes. L'activité de la créatine kinase (CK) et l'hématocrite étaient significativement plus élevés dans le groupe septique d'après un test de Mann-Whitney ( $p=0,006$  et  $p=0,003$  respectivement). Des test F ont révélés des variances significativement plus élevées dans le groupe septique pour les paramètres : albumine, créatinine, CK, hématocrite, plaquettes, leucocytes, PNN (cf. Fig. 17). Ces différences sont dues à la présence dans le groupe septique de quelques individus extrêmes qui modifie la variance sans beaucoup modifier la médiane.

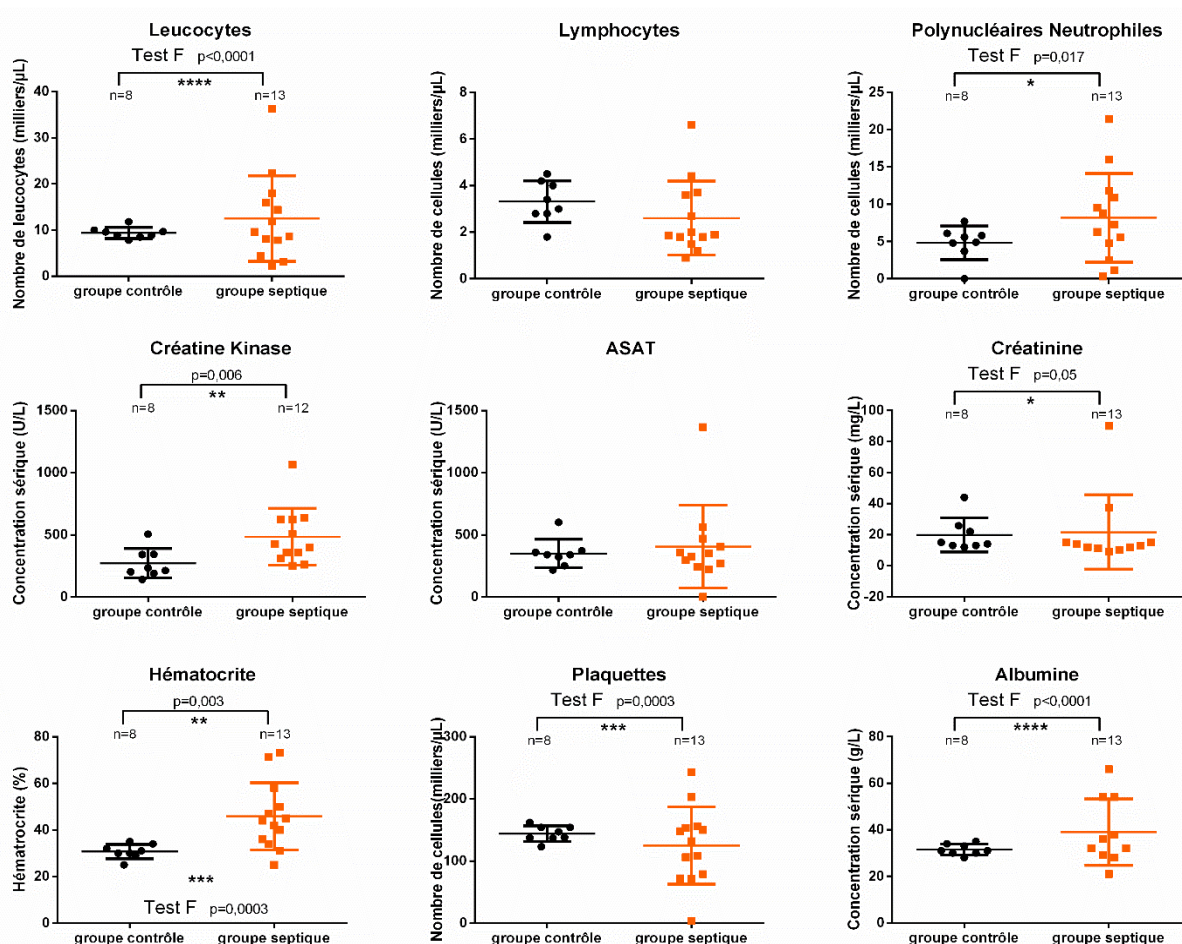


Figure 17 - Paramètres hémato-biochimiques

Test de Mann-Whitney de comparaison des médianes. Test F de comparaison des variances. Sont représentés la médiane et l'intervalle interquartile. L'activité de la créatine kinase (CK) et l'hématocrite sont significativement plus élevés dans le groupe septique. Les variances sont significativement plus élevées dans le groupe septique pour les paramètres : albumine, créatinine, CK, hématocrite, plaquettes, leucocytes, PNN.



## II.2 Evaluation de l'inflammation systémique

Tableau IV - Concentrations sériques en cytokines

Cytokines/ Chémokines sériques	Contrôles (n=8)	Septiques (n=10)	Variation <sup>a</sup>	p-value <sup>a</sup>
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	< LC	<b>5,55</b> (4,48-1024) n=7	↗	*** p=0,0003
<b>IL-6</b>	< LC	<b>23,62</b> (8,48-5556) n=4	↗	*** p=0,0008
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	< LC	<b>14,26</b> (7,41-1549) n=6	↗	** p=0,0016
<b>Fractalkine</b>	< LC	<b>1096</b> (718,1-4909) n=3	↗	** p=0,0018
<b>IL-12</b>	< LC	<b>37,33</b> n=1	↗	** p=0,0053
<b>G-CSF</b>	< LC	<b>541,7</b> (159,7-815) n=4	↗	* p=0,0212
<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	< LC	<b>25,63</b> (25,63-37,33) n=3	↗	* p=0,0430
<b>IL-5</b>	< LC	<b>32,63</b> (30,9-34,35) n=2	↗	* p=0,0149
<b>IL-2</b>	< LC	<b>9,15</b> (5,12-15,22) n=3	↗	* p=0,0212
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	4325 n=1	<b>3529</b> (251,9-6807) n=2	↗	* p=0,0117
<b>IL-8</b>	< LC	<b>66,52</b> n=1	↗	* p=0,0205
<b>IP-10</b>	< LC	<b>57,98</b> (17,01-98,94) n=2	↗	* p=0,0341
<b>GRO</b>	< LC	<b>48,95</b> n=1	↗	* p=0,0144
GM-CSF	< LC	2,42 (1,38-10,03) n=6	Tendance ↗	p=0,0708
RANTES	< LC	3,89 n=1	NS	p=0,7438
MCP-1	137 n=1	435 (168,5-1173) n=4	NS	p=0,1993
IL-18	< LC	12,61 (12,49-79,64) n=3	NS	p=0,1650
FGF-2	19,36 (14,1-25,92) n=3	55,27 (14,1-256) n=7	NS	p=0,1522
Eotaxine	9,495 (8,42-14,8) n=4	12,16 (9,825-91,86) n=7	NS	p=0,1387
IL-13	< LC	< LC	NA	NA
<b>IL-17A</b>	<b>5,76</b> n=1	<b>10,56</b> (5,62-18,65) n=7	↗	** p=0,0048
IL-4	< LC	436,9 (230,1-643,8) n=2	NS	p=0,1387
<b>IL-10</b>	<b>26,72</b> (9,71-31,23) n=3	<b>175</b> (27,76-970,2) n=10	↗	*** p=0,0003

< LC : inférieur à la limite de calcul, NS : non significatif, NA : non applicable, <sup>a</sup> comme toutes les concentrations plasmatiques n'étaient pas calculables, l'analyse statistique a été réalisée sur l'intensité de la fluorescence à l'aide d'un test Mann-Whitney. Les concentrations sont données en pg/mL avec la médiane (et l'IC à 95%)

Les concentrations sanguines des 23 cytokines et chémokines n'ont pas pu être calculées car leur intensité fluorescence était inférieure au point le plus bas de la courbe étalon. Seule l'IL-10 a été calculable pour suffisamment de chevaux dans les deux groupes (3 dans le groupe contrôle et 10 dans le groupe septique) pour permettre une comparaison à l'aide d'un test de Mann-Whitney. Le groupe de chevaux septiques présentait une augmentation significative en médiane de la concentration plasmatique en IL-10 (175 pg/mL ; n=10) comparativement au groupe contrôle (27 pg/mL ; concentrations calculables n=3 ; p=0,049).

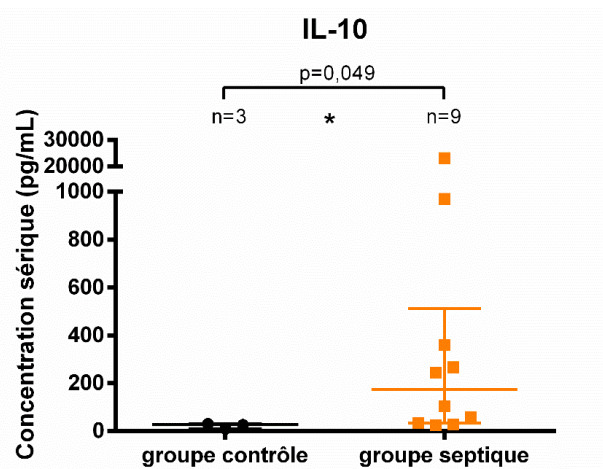


Figure 18 - Concentration en IL-10

Test de Mann-Whitney de comparaison des médianes ( $p=0,049$ ). Sont représentés la médiane et l'intervalle interquartile. La concentration en IL-10 est significativement supérieure dans le groupe septique.

Les intensités de fluorescence inférieures au premier point de la courbe étalon ne permettent pas de déterminer la concentration en cytokine de l'échantillon. Cependant la relation strictement monotone entre l'intensité de fluorescence et la concentration peut être supposée vraie pour les valeurs inférieures (389). Il est donc possible de comparer les intensités de fluorescence entre les deux groupes à l'aide d'un test des rangs et d'en déduire une différence de concentrations entre ces groupes. Il est en revanche impossible de quantifier cette différence. Avec cette méthodologie, les concentrations des 23 cytokines ont pu être comparées et une augmentation significative de l'intensité de fluorescence dans le groupe septique comparativement au groupe contrôle a été observée pour 15 cytokines (cf. Tab. 4).

L'augmentation était la plus marquée pour IL-10, TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , Fractalkine, et IL-12 (cf. Fig. 19). En revanche, les intensités de fluorescence de RANTES, MCP-1, IL-18, FGF-2, Eotaxine, IL-13 et IL-4 étaient similaires entre les deux groupes.

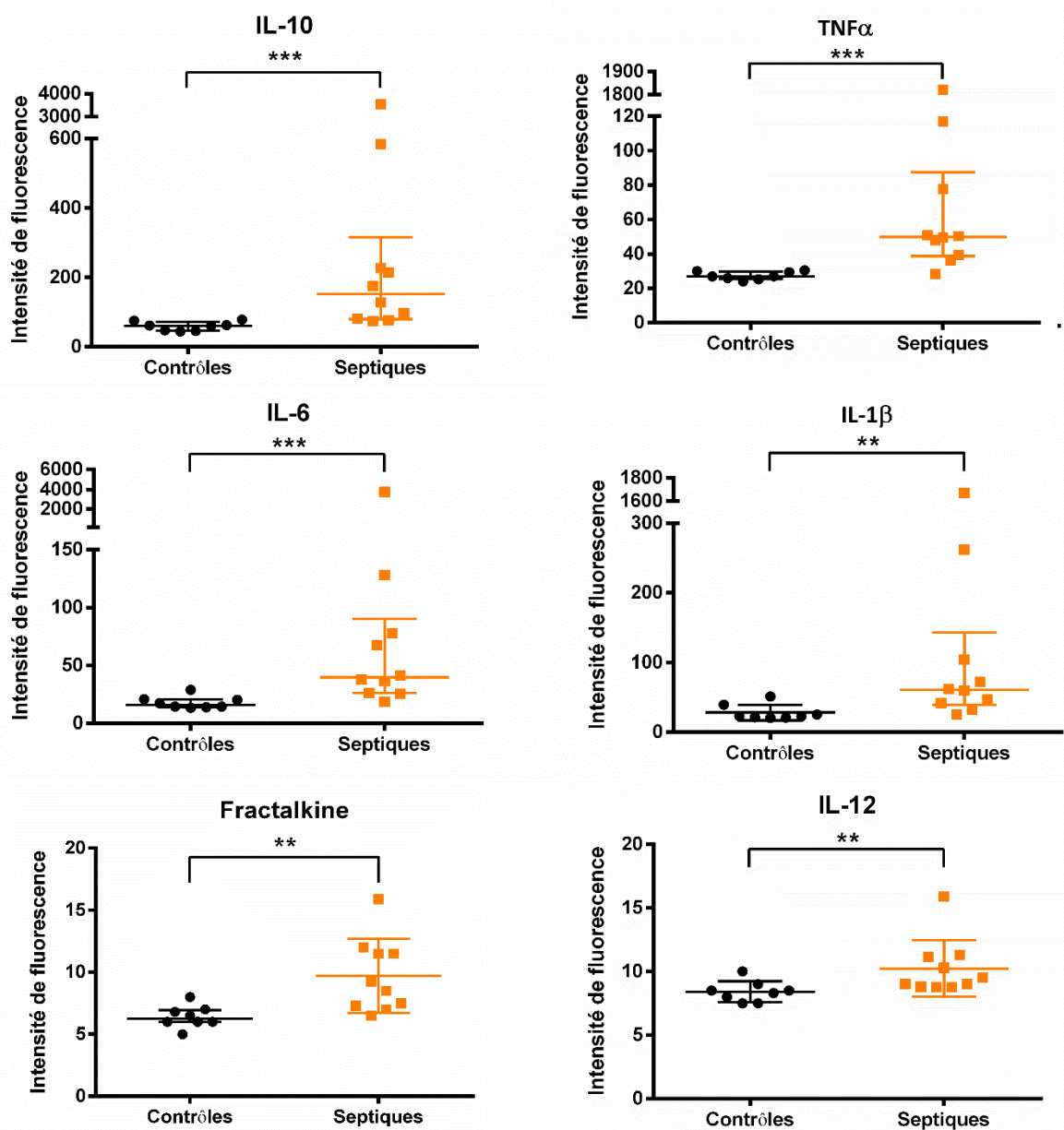


Figure 19 - Intensité de fluorescence pour quelques cytokines

Test de Mann-Whitney de comparaison des médianes. Sont représentés la médiane et l'intervalle interquartile. Les intensités de fluorescence et donc par extension les concentrations des cytokines IL-10, TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , fractalkine et IL-12 sont significativement plus élevées dans le groupe septique.

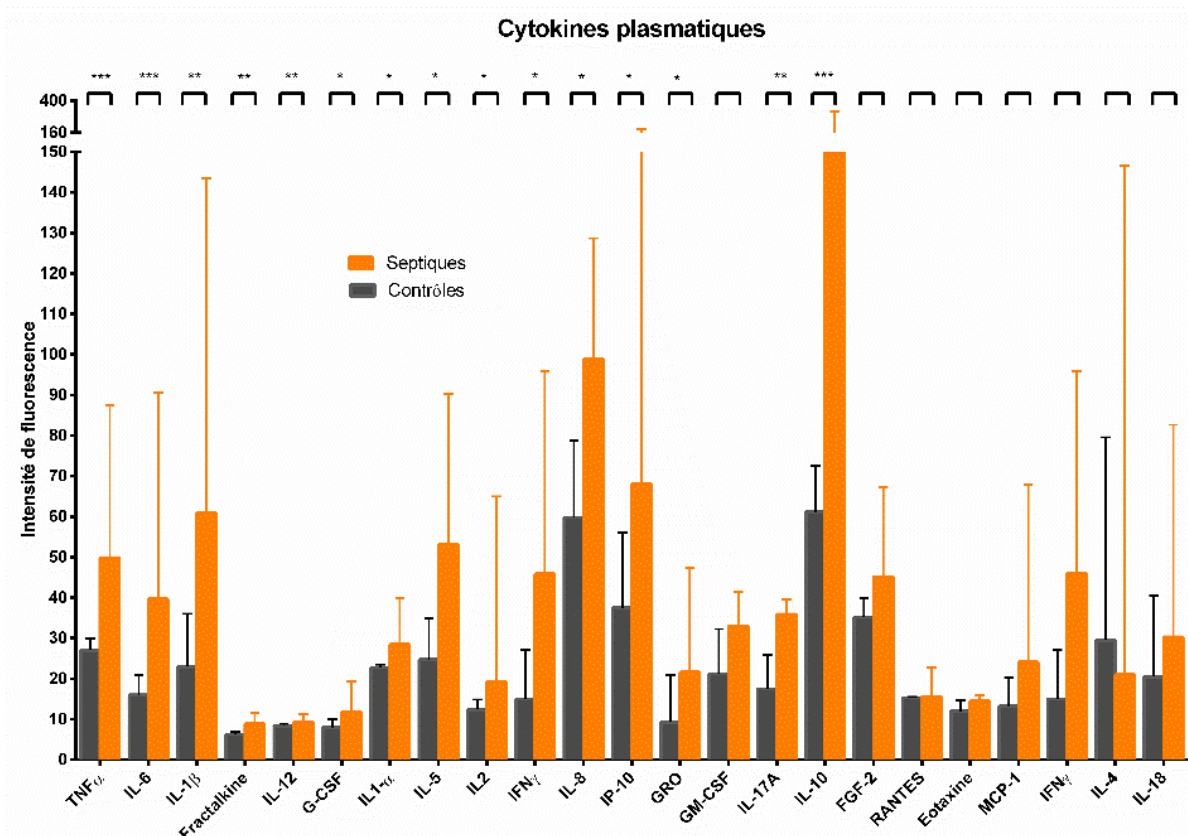
Les concentrations calculables pour les cytokines pro-inflammatoires des chevaux du groupe contrôle sont toutes inférieures à la médiane du groupe septique excepté pour la concentration en IFN $\gamma$  qui a été trouvée fortement augmentée (4325 pg/mL) pour un individu contrôle.

Le nombre de concentrations calculables pour chacune des cytokines a été comparé entre les deux groupes à l'aide d'un test exact de Fisher (cf. Tab. 5). Pour le TNF $\alpha$ , le GM-CSF, l'IL-17A et l'IL-10, le nombre de concentrations calculables était significativement supérieur dans le groupe septique. Ces cytokines ont donc plus de chance d'être détectées dans le sang d'un cheval septique que dans celui d'un cheval contrôle.

*Tableau V - Nombre de concentrations calculables*

Cytokines/ Chémokines sériques	Contrôles (n=8)	Septiques (n=10)	Variation	p-value
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	0	7	↗	***p=0,004
IL-6	0	4	Tendance ↗	p=0,09
IL-1 $\beta$	0	6	↗	* p=0,013
Fractalkine	0	3	NS	p=0,22
IL-12	0	1	NS	p=1
G-CSF	0	4	Tendance ↗	p=0,09
IL-1 $\alpha$	0	3	NS	p=0,22
IL-5	0	2	NS	p=0,48
IL-2	0	3	NS	p=0,22
IFN $\gamma$	1	2	NS	p=1
IL-8	0	1	NS	p=1
IP-10	0	2	NS	p=0,48
GRO	0	1	NS	p=1
<b>GM-CSF</b>	0	6	↗	* p=0,013
RANTES	0	1	NS	p=1
MCP-1	1	4	NS	p=0,31
IL-18	0	3	NS	p=0,22
FGF-2	3	7	NS	p=0,34
Eotaxine	4	7	NS	p=0,63
<b>IL-17A</b>	1	7	↗	* p=0,025
IL-4	0	2	NS	p=0,48
<b>IL-10</b>	3	10	↗	** p=0,007

NS : non significatif, NA : non applicable, Test exact de Fisher.



*Figure 20 - Intensité de fluorescence pour les cytokines sériques*

*Test de Mann-Whitney de comparaison des médianes. Sont représentés la médiane et l'intervalle interquartile. Les intensités de fluorescence et donc par extension les concentrations des cytokines TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , fractalkine, IL-12 le G-CSF, IL-1 $\alpha$ , IL-5, IL-2, IFN $\gamma$ , IL-8, IP-10, GRO, IL-17A et IL-10 sont significativement plus élevées dans le groupe septique.*



## II.3 Evaluation des conséquences cérébrales du sepsis

### II.3.1 Evaluation morphologique

L'observation qualitative des lames a montré que la morphologie des cellules microgliales diffère dans les deux groupes principalement dans la région du cortex occipital. Les cellules paraissent plus ramifiées dans le groupe contrôle.

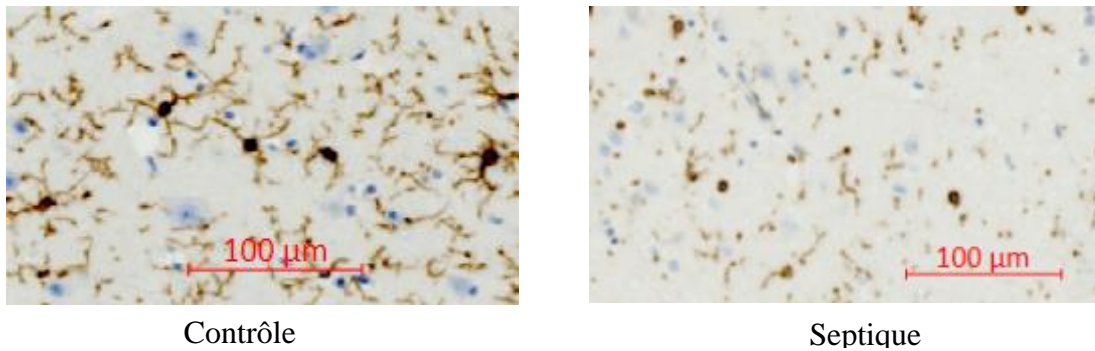


Figure 21 - Morphologie microgliale dans le cortex occipital

Marquage Iba 1 en immunohistochimie. On remarque une diminution de la ramification des cellules microgliales dans le groupe septique et une densité de cellules similaire.

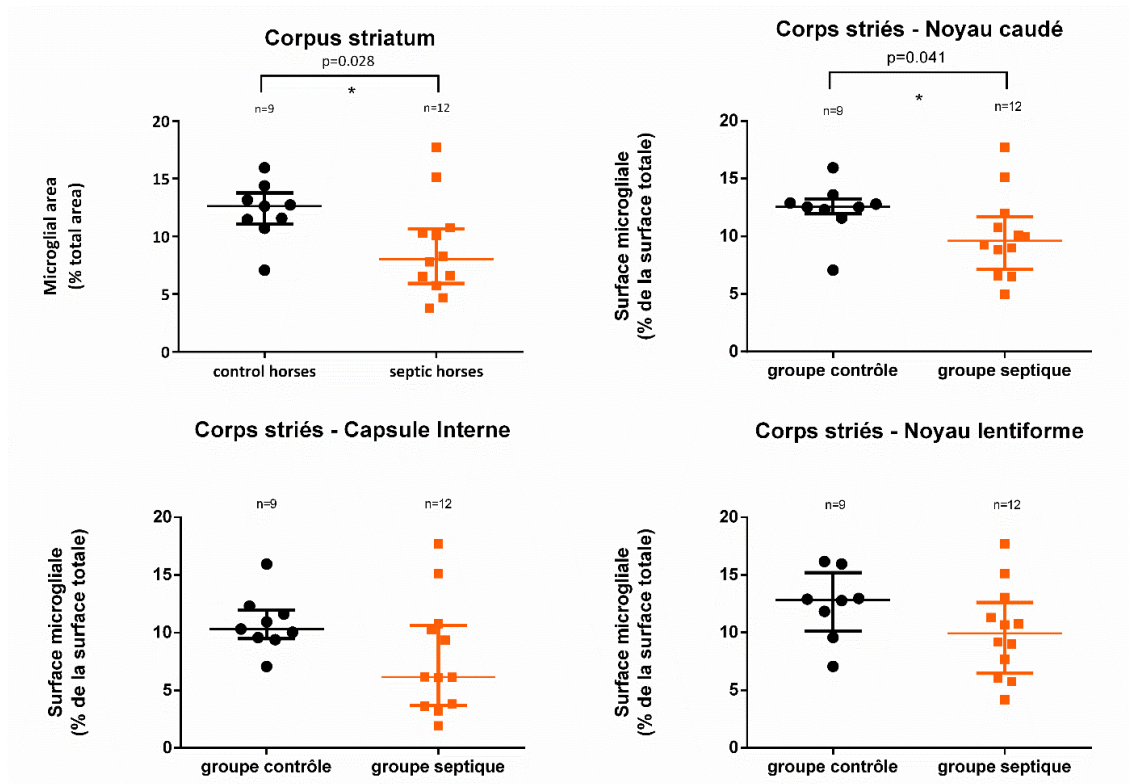


Figure 22 - Surface de marquage dans le corps strié

Test des rangs de Mann-Whitney. Sont représentés la médiane et l'intervalle interquartile. La surface de marquage est significativement inférieure dans le groupe septique dans la région du corps strié et dans la zone du noyau caudé.

### II.3.2 Evaluation morphométrique de la surface microgliale

La surface occupée par les cellules microgliales marquées par immunohistochimie Iba-1 sur les coupes de tissus cérébral (en pourcentage de la surface tissulaire totale) a été quantifiée et les médianes de nos deux groupes dans chaque région ont été comparées. Pour cette comparaison, un test des rangs de Mann-Whitney a été choisi en raison du faible effectif et de la difficulté d'évaluer la normalité des distributions. Les résultats sont présentés dans le tableau 6.

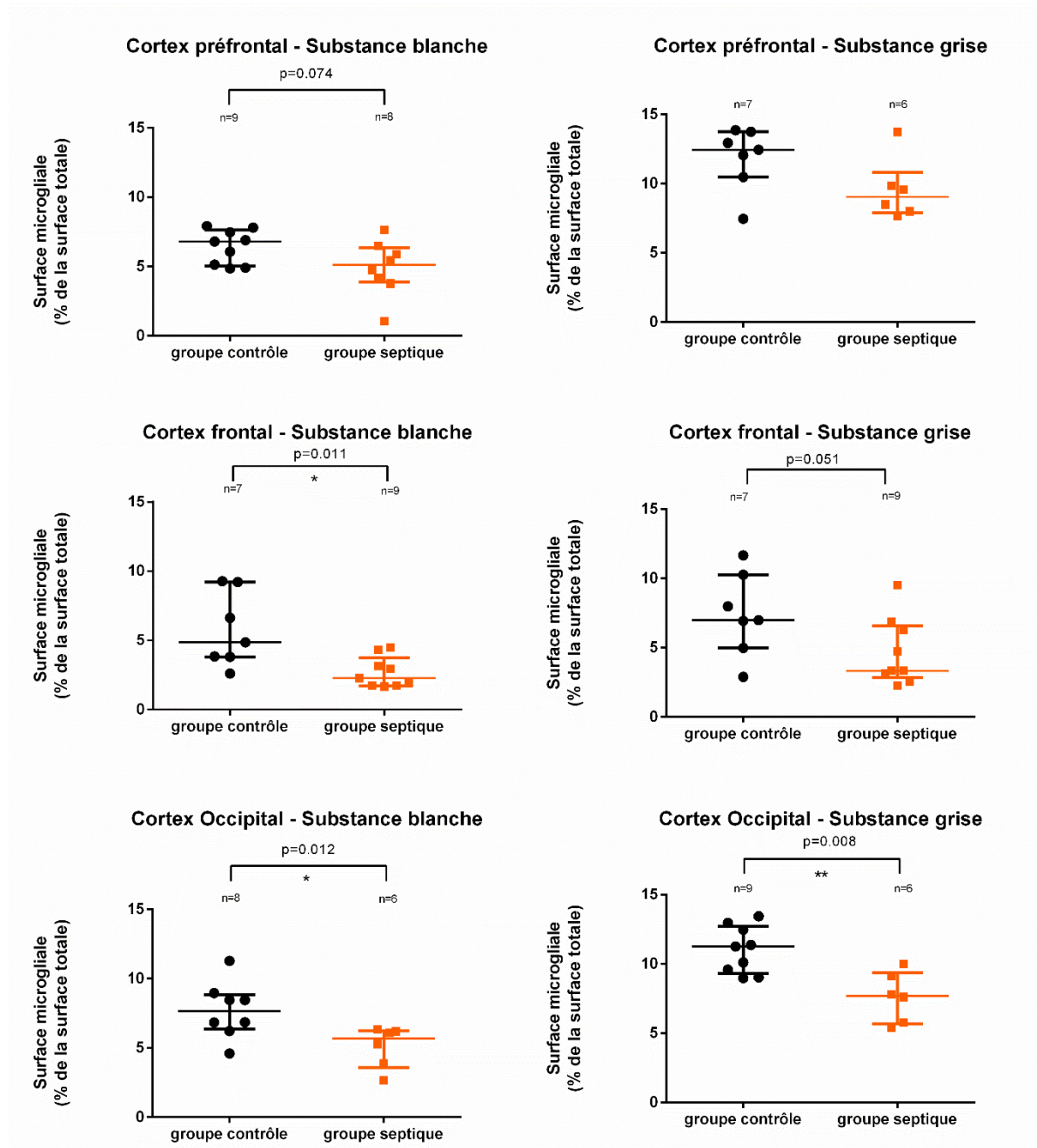


Figure 23 - Surface de Marquage Iba-1 dans les cortex préfrontal, frontal et occipital

Test des rangs de Mann-Whitney. Sont représentés la médiane et l'intervalle interquartile. La surface de marquage est significativement inférieure dans le groupe septique dans la substance blanche des cortex frontal et occipital ainsi que dans la substance grise du cortex occipital

Des différences significatives ont été observées dans 6 régions : la substance blanche des cortex frontal et occipital, la substance grise du cortex occipital, le noyau caudé du corps strié, le mésencéphale et la substance grise du cervelet. Toutes vont dans le sens d'une diminution de surface occupée par la microglie chez les chevaux septiques.

Tableau VI - Résultats de l'analyse de la surface microgliale

Zone	Médiane des pourcentages		Différence des médianes	Intervalle de confiance à 95% de la différence	P value	Variation	
	controles	septiques					
Cortex préfrontal	10,13	7,21	-2,92	[-3,462 ;0,4793]	0,092	Tendance↘	
	Substance blanche	6,795	5,111	-1,684	[-3,268 ;0,4033]	0,074	Tendance↘
	Substance grise	12,45	9,039	-3,41	[-5,248 ;1,043]	0,136	NS
<b>Cortex frontal</b>	<b>6,309</b>	<b>2,814</b>	<b>-3,495</b>	<b>[-6,302;-0,1510]</b>	<b>0,021</b>	<b>*↘</b>	
	<b>Substance blanche</b>	<b>4,856</b>	<b>2,271</b>	<b>-2,585</b>	<b>[-6,257;-0,6699]</b>	<b>0,011</b>	<b>*↘</b>
	Substance grise	6,981	3,335	-3,646	[-5,716;0,4480]	0,051	Tendance↘
<b>Cortex occipital</b>	<b>10,65</b>	<b>7,313</b>	<b>-3,332</b>	<b>[-5,364;-0,7884]</b>	<b>0,012</b>	<b>*↘</b>	
	<b>Substance blanche</b>	<b>7,653</b>	<b>5,689</b>	<b>-1,964</b>	<b>[-5,086;-0,5037]</b>	<b>0,013</b>	<b>*↘</b>
	<b>Substance grise</b>	<b>11,26</b>	<b>7,700</b>	<b>-3,560</b>	<b>[-5,640;-1,241]</b>	<b>0,008</b>	<b>**↘</b>
Hippocampe rostral	15	11,73	-3,27	[-5,218;1,761]	0,283	NS	
	Fimbria	11,14	9,499	-1,641	[-10,56;4,236]	0,25	NS
	Corne d'Amon	16,06	12,42	-3,641	[-8,350;2,401]	0,127	NS
Hippocampe caudal	18	17,92	-0,08	[-6,212;6,359]	0,917	NS	



	Fimbria	12,02	15	2,984	[1,691;4,126]	0,2	NS
	Gyrus Denté	20,99	18,39	-2,6	[-9,278;3,6]	0,292	NS
	<b>Corps striés</b>	<b>12,62</b>	<b>8,03</b>	<b>-4,59</b>	<b>[-6,775;-0,5489]</b>	<b>0,028</b>	<b>*↘</b>
	<b>Noyau Caudé</b>	<b>12,55</b>	<b>9,612</b>	<b>-2,943</b>	<b>[-5,787;-0,3212]</b>	<b>0,041</b>	<b>*↘</b>
	Capsule interne	10,32	6,147	-4,173	[-6,673;0,4566]	0,058	Tendance ↘
	Noyau lentiforme	12,84	9,925	-2,911	[-6,722;1,55]	0,156	NS
	Thalamus	6,929	4,382	-2,547	[-5,155;1,948]	0,248	NS
	<b>Mésencéphale</b>	<b>10,67</b>	<b>6,794</b>	<b>-3,881</b>	<b>[-6,724;-2,492]</b>	<b>0,004</b>	<b>**↘</b>
	Cervelet	5,052	4,530	-0,52	[-2,656 ;0,3596]	0,093	Tendance ↘
	Substance blanche	5,577	5,072	-0,505	[-2,9;0,40]	0,238	NS
	<b>Substance grise</b>	<b>4,874</b>	<b>3,483</b>	<b>-1,392</b>	<b>[-2,713 ;0,184]</b>	<b>0,041</b>	<b>*↘</b>

NS : non significatifs

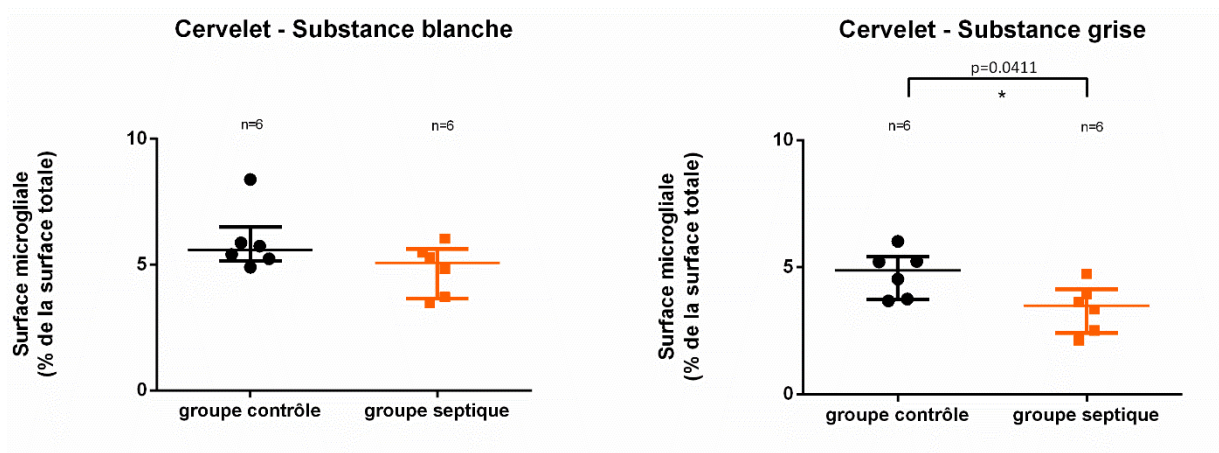


Figure 24 - Surface de marquage Iba-1 dans le cervelet

Test des rangs de Mann-Whitney. Sont représentés la médiane et l'intervalle interquartile. La surface de marquage est significativement inférieure dans le groupe septique dans la substance grise du cervelet.

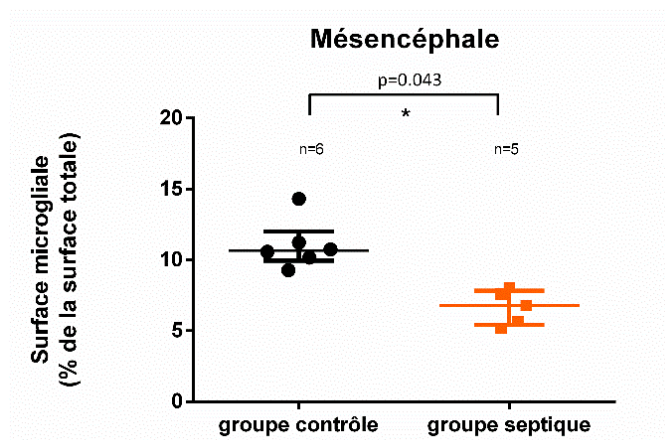


Figure 25 - Surface de marquage Iba-1 dans le mésencéphale

Test des rangs de Mann-Whitney. Sont représentés la médiane et l'intervalle interquartile. La surface de marquage est significativement inférieure dans le groupe septique dans le mésencéphale.

### II.3.3 Effet du sexe

L'effet du sexe sur la surface microgliale a été évaluée dans toutes les régions où cela était possible à l'aide d'un test de Krushkal-Wallis. Pour les régions du cervelet et de l'hippocampe rostral, un groupe était manquant ou insuffisamment représenté donc un test de Mann Whitney a été réalisé entre les deux groupes restants. Un effet du sexe a été mis en évidence dans le cortex préfrontal, la capsule interne des corps striés et le mésencéphale. Une tendance à la significativité ( $p < 0,1$ ) a été observé dans les régions du cortex frontal et occipital. Un test de comparaisons multiples de Dunn a été réalisé dans les régions ayant montré une différence

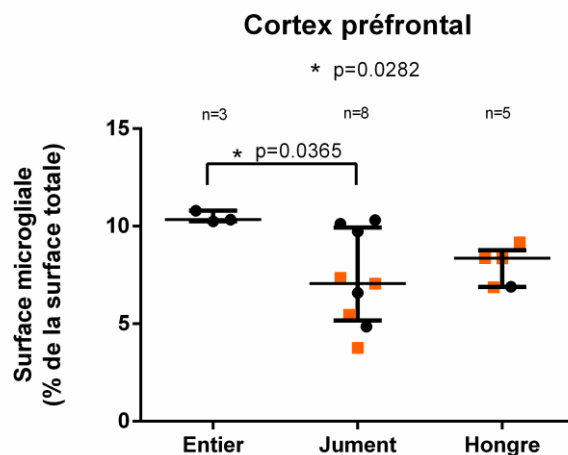


Figure 26 - Effet du sexe sur la surface de marquage Iba-1 dans le cortex préfrontal

Test des rangs de Krushkal-Wallis ( $p=0,0282$ ). Test de comparaisons multiples de Dunn ( $p=0,0365$  entre les groupes Jument et Entier). Sont représentés la médiane et l'intervalle interquartile. La surface de marquage dans le cortex préfrontal est significativement supérieure dans le groupe des entiers comparé à celui des juments.

significative. Le groupe Entier a obtenu une surface microgliale supérieure au groupe Jument dans le cortex préfrontal et au groupe Hongre dans la capsule interne. Aucune différence significative n'a été observée avec ce test dans le mésencéphale. Tous ces résultats sont présentés dans le tableau 7.

*Tableau VII - Effet du sexe sur la surface de marquage Iba-1*

Zone		Test de Krushkal Wallis		Test de comparaisons multiples de Dunn		
		P value	Résultats	Entier vs Jument	Jument vs Hongre	Entier vs Hongre
<b>Cortex préfrontal</b>		<b>0,0282</b>	<b>Différence significative entre les groupes</b>	<b>P value = 0,0365</b> <b>Entier &gt; Jument</b>	P value > 0,9999 NS	P value = 0,1289 NS
	Substance blanche	0,2604	NS			
	Substance grise	0,1210	NS			
Cortex frontal		0,0683	NS			
	Substance blanche	0,3139	NS			
	Substance grise	0,1279	NS			
Cortex occipital		0,0846	NS			
	Substance blanche	0,1243	NS			
	Substance grise	0,0706	NS			
Hippocampe rostral		Non réalisé car absence de chevaux entiers			P value = 0,7096 NS <sup>\$</sup>	
	Fimbria				P value = 0,1905 NS <sup>\$</sup>	
	Corne d'Amon				P value = 0,3308	

					NS <sup>\$</sup>	
	Hippocampe caudal	0,5827	NS			
	Fimbria					
	Gyrus Denté	0,4133	NS			
	Corps striés	0,1159	NS			
	Noyau Caudé	0,2969	NS			
	<b>Capsule interne</b>	<b>0,0277</b>	<b>Différence significative entre les groupes</b>	P value = 0,1664 NS	P value > 0,9999 NS	<b>P value = 0,0364 Entier &gt; Hongre</b>
	Noyau lentiforme	0,1119	NS			
	Thalamus	0,5159	NS			
	<b>Mésencéphale</b>	<b>0,0431</b>	<b>Différence significative entre les groupes</b>	P value > 0,9999 NS	P value = 0,0537 NS	P value = 0,3296 NS
	Cervelet			P value = 0,5476 NS <sup>\$</sup>		
	Substance blanche	Non réalisé car un seul cheval hongre		P value = 0,7143 NS <sup>\$</sup>	Non réalisé car un seul cheval hongre	
	Substance grise			P value = 0,7143 NS <sup>\$</sup>		

NS : non significatif, \$ Test de Mann-Whitney de comparaison des médianes

### II.3.4 Effet de l'âge

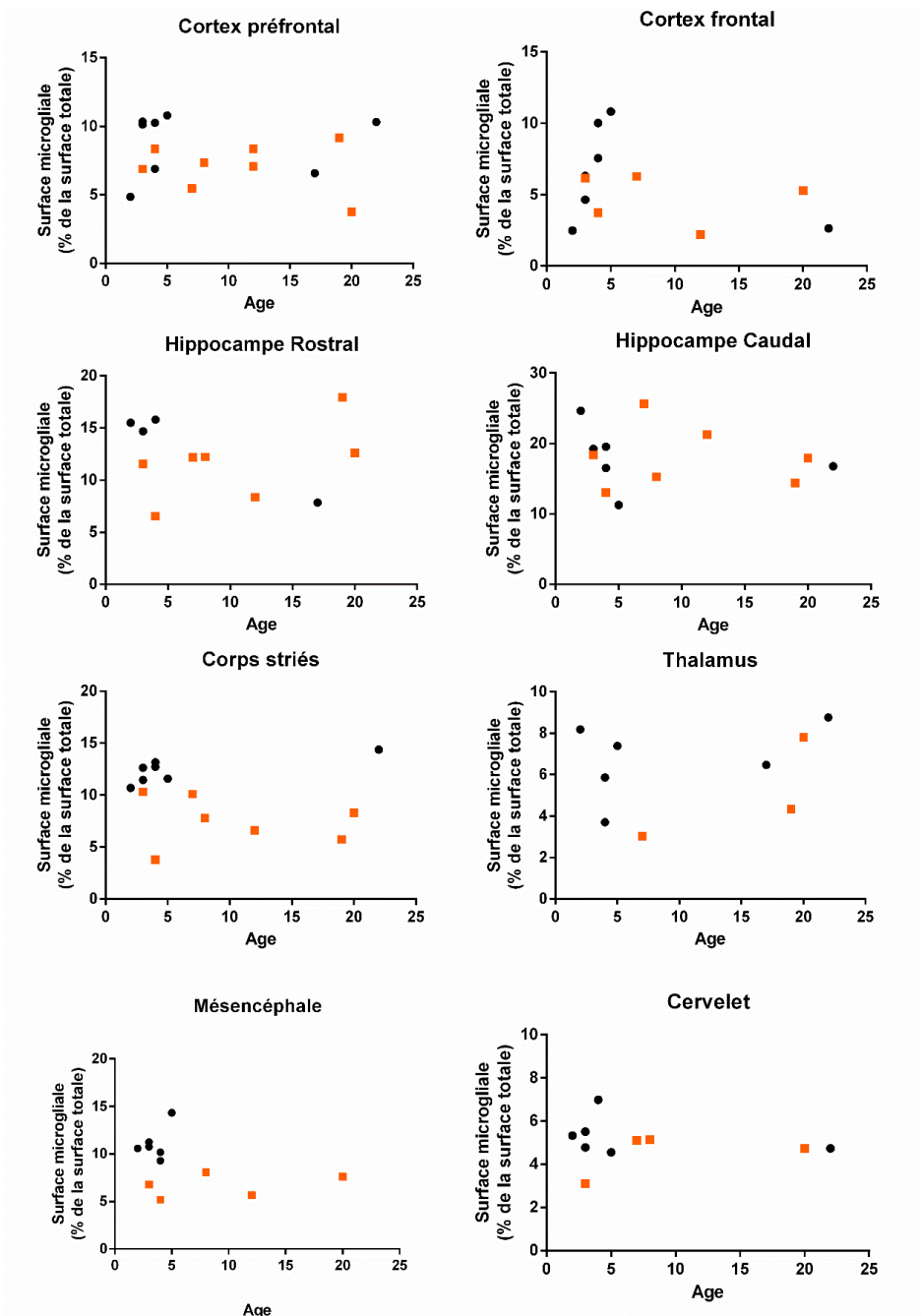


Figure 27 - Effet de l'âge sur la surface de marquage Iba-1

Aucune corrélation ne semble se dégager entre l'âge et la surface microgliale.

L'effet de l'âge a également été évalué en recherchant une corrélation linéaire à l'aide d'un test de Spearman. Aucune corrélation linéaire n'a pu être mise en évidence par ce test. L'observation de la forme du nuage de points ne permet pas de supposer l'existence d'une corrélation non-linéaire mais l'hétérogénéité des âges entre les deux groupes ne permet pas de conclure de façon certaine à une influence de l'âge sur la surface microgliale.

### II.3.5 Etude globale par analyse factorielle

Pour replacer ces résultats dans le contexte clinique général des chevaux de la cohorte, une AFM sur les données cliniques, cytokiniques et de surface microgliale a été réalisée. Nous avons regroupé nos variables en 11 groupes : Microglie, Cytokines, Biochimie, Hématocrite (HT), Leucocytes, Plaquettes, Gravité clinique, Durée, Age, Sexe et Race. L'appartenance au groupe septique ou contrôle a été introduite comme variable supplémentaire. Nous avons restreint l'étude aux 5 axes de plus forte inertie. Les valeurs propres et le pourcentage cumulé de variance expliquée en fonction de la dimension des axes sont présentés dans la figure 28. En prenant en compte 5 dimensions, on interprète 60% de la variance.

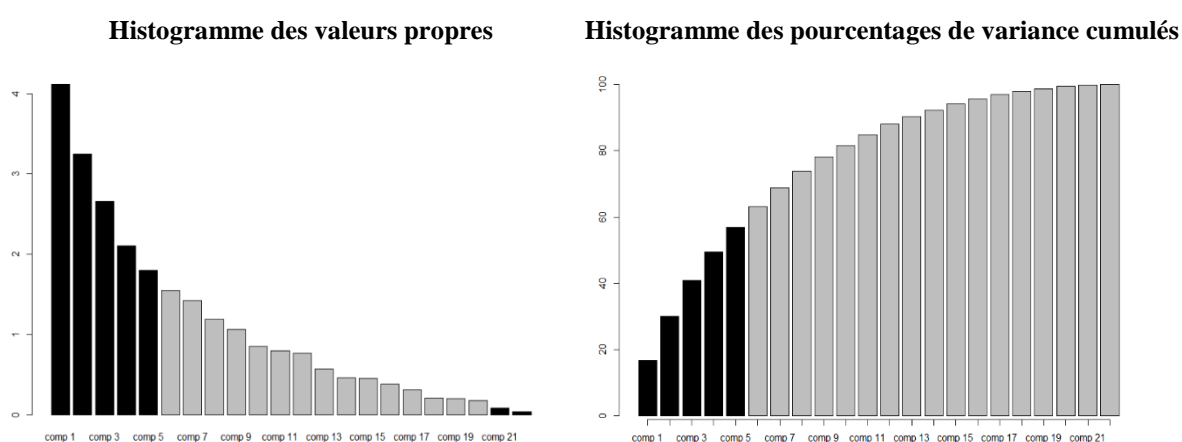


Figure 28 - Histogrammes des valeurs propres et des pourcentages de variance cumulés

En prenant en compte 5 dimensions, on interprète 60% de la variance.

Tableau VIII - Tableau des coefficients de corrélation canonique

Groupe	Dim.1	Dim.2	Dim.3	Dim.4	Dim.5
MICROGLIE	0.4054	0.7091	0.4327	0.7512	0.5728
Cytokines	0.5164	0.4494	0.5508	0.4405	0.6612
Biochimie	0.9263	0.4439	0.7428	0.6369	0.6285
HT	0.1472	0.5965	0.5023	0.2128	0.3692
Leucocytes	0.8635	0.4806	0.3027	0.5303	0.1804
Plaquettes	0.724	0.1338	0.6116	0.0685	0.0408
Gravité clinique	0.9058	0.7817	0.8783	0.6865	0.8326
Durée	0.9089	0.0673	0.2478	0.0059	0.1874
Age	0.3697	0.5613	0.3296	0.2308	0.1116
Sexe	0.4006	0.7343	0.5854	0.4269	0.2811
Race	0.6114	0.8957	0.5591	0.8052	0.7813

Si on analyse le tableau des coefficients de corrélation canonique (cf. Tab.8) on remarque que dans toutes les dimensions il y a un ou plusieurs coefficients supérieurs à 0,8. La dimension 1 représente donc un facteur commun aux groupes Biochimie, Leucocytes, Gravité clinique et Durée et est assez liée au groupe Plaquettes. La dimension 2 est un facteur spécifique de la Race mais est aussi liée à la Gravité clinique, au Sexe et à la Microglie. La dimension 3 est spécifique de la Gravité clinique bien que liée à la Biochimie. La dimension 4 est spécifique de la Race mais est aussi liée à la Microglie. Enfin la dimension 5 est un facteur spécifique à la Gravité clinique et liée à la Race.

*Tableau IX - Tableau des contributions des groupes de variables aux axes factoriels*

Groupe	Dim.1	Dim.2	Dim.3	Dim.4	Dim.5
MICROGLIE	1.1894	6.1414	3.3875	22.0947	4.6539
Cytokines	4.5614	5.3755	7.1767	7.583	13.355
Biochimie	17.5961	5.2809	19.719	9.1935	14.0212
HT	0.5269	10.9617	9.4969	2.153	7.5562
Leucocytes	18.1314	2.4902	2.5185	5.3515	1.5897
Plaquettes	12.7486	0.5514	14.0772	0.223	0.0924
Gravité clinique	8.8343	18.032	12.5639	11.3846	17.8728
Durée	20.0938	0.1397	2.3112	0.0017	1.948
Age	3.3251	9.7055	4.088	2.5323	0.6905
Sexe	3.9025	16.6098	12.8965	8.6627	4.38
Race	9.0906	24.712	11.7647	30.8201	33.8403

Ces remarques se confirment globalement après l'examen du tableau des contributions des groupes aux différents axes (cf. Tab.9). La surface microgliale impacte surtout la dimension 4 et la dimension 2. Les groupes de variables qualitatives impactent un plus grand nombre d'axes que les groupes de variables quantitatives car l'inertie de chaque variable est répartie sur un plus grand nombre de dimensions et leur influence est favorisée en AFM. C'est pourquoi on peut supposer que l'effet de la race et celui de la Gravité clinique sont un peu surestimés.

Au vu de la représentation du nuage des individus dans le premier plan factoriel et de la position de la variable condition dans le carré des liaisons, l'axe factoriel 2 sépare les individus septiques des contrôles. L'axe 1 sépare quant à lui le groupe septique en deux groupes (cf. Fig. 29). Sur cet axe, les groupes Biochimie Leucocytes et Durée montrent une certaine corrélation et sont à l'origine de la séparation du groupe septique en deux sous-groupes l'un à durée d'évolution courte l'autre à durée d'évolution longue (les chevaux 26, 19 et 20). Ceci montre l'effet

important de la durée sur la variabilité interne du groupe septique. Le groupe Microglie intervient surtout dans l'axe 2 mais sa contribution est modérée.

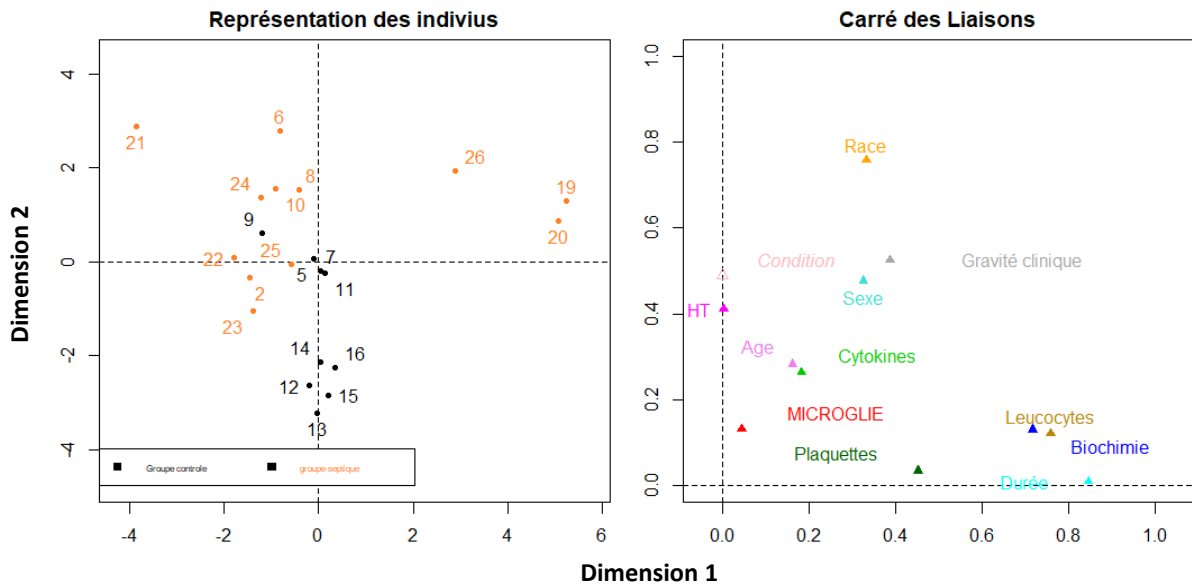


Figure 29 - Représentation du premier plan factoriel

A gauche : représentation des individus.

A droite : carrée des liaisons des groupes de variables

L'axe factoriel 2 sépare les individus septiques des contrôles. L'axe 1 sépare quant à lui le groupe septique en deux sous-groupes l'un à durée d'évolution courte l'autre à durée d'évolution longue.

Lorsqu'on représente les variables quantitatives qui contribuent le plus à ces deux axes, ce sont l'âge et l'hématocrite qui contribuent à l'axe 2 (cf. Fig. 30). Cette observation montre un biais lié à l'âge dans notre étude. Cependant on note aussi que plusieurs variables de la microglie

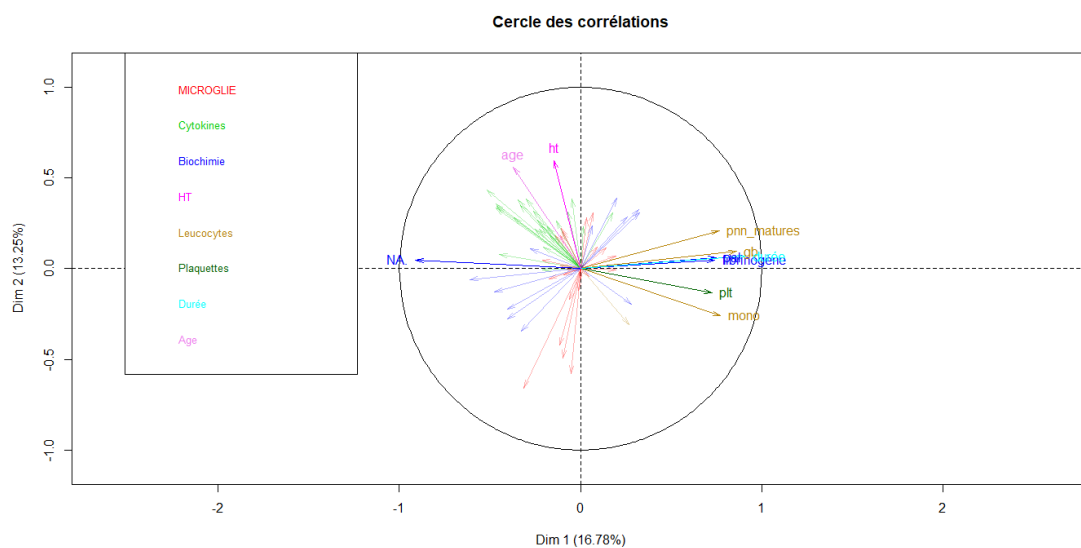


Figure 30 – Cercle des corrélations

Sont représentées les variables quantitatives contribuant le plus aux axes 1 et 2.

L'âge et l'hématocrite contribuent à l'axe 2. La durée, le sodium, les leucocytes le fibrinogène et les plaquettes contribuent à l'axe 1.



sont négativement corrélées à l'axe 2 ce qui va dans le sens d'une surface inférieure de microglie dans certaines régions spécifiques de l'encéphale des chevaux septiques.

Les dimensions suivantes isolent des individus septiques à l'extrémité des axes et rassemblent les contrôles au centre du graphique ce qui souligne la variabilité bien plus importante au sein du groupe septique et la tendance de ces chevaux à avoir des valeurs extrêmes pour les variables de plusieurs groupes : Race, Gravité clinique, Cytokines, Microglie, Biochimie.

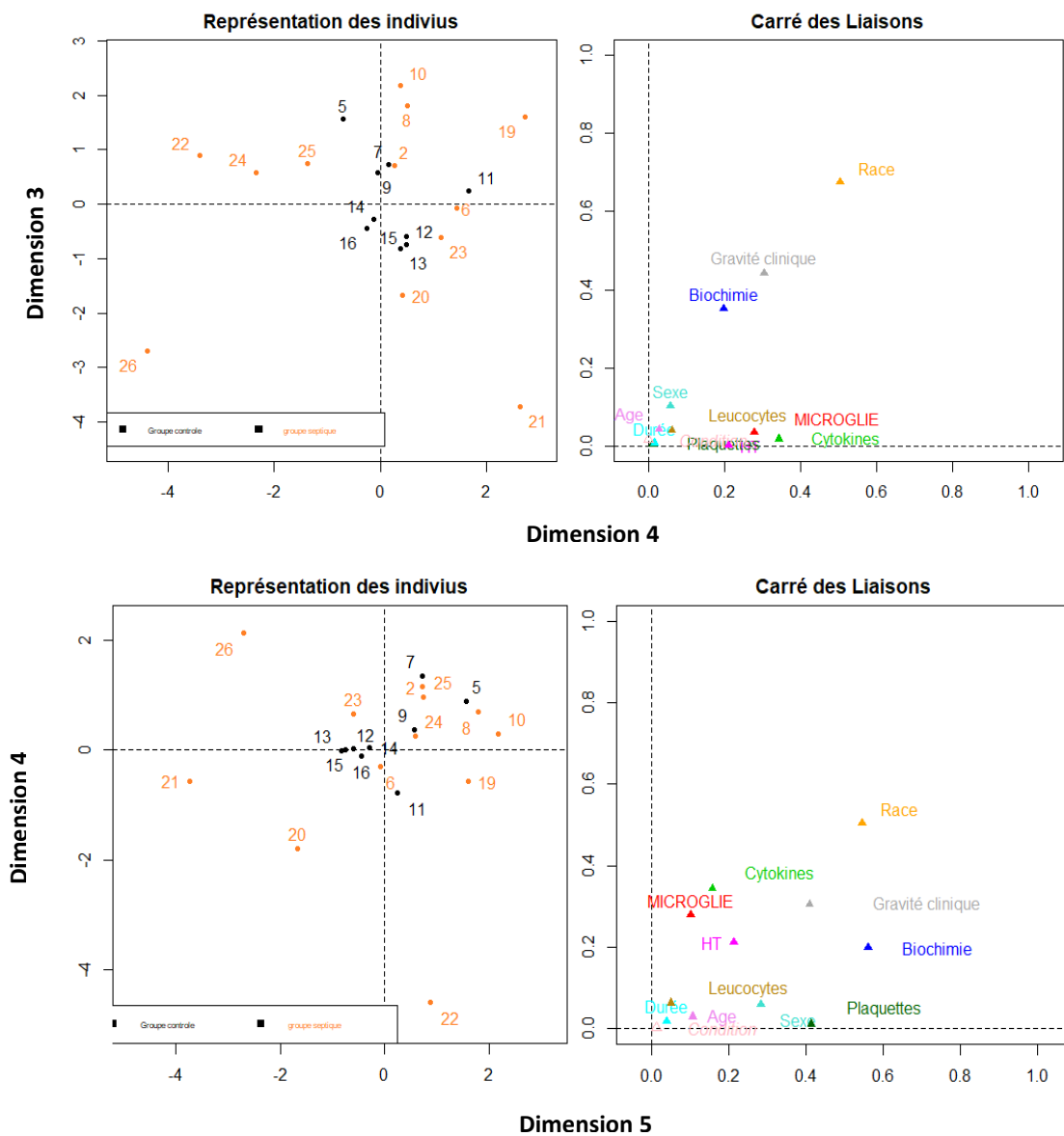


Figure 31 - Représentation des plans factoriels de dimension 3 et 4, et 4 et 5.

A gauche : représentation des individus.

A droite : carré des liaisons des groupes de variables

Les dimensions 3, 4 et 5 isolent des individus septiques à l'extrémité des axes et rassemblent les contrôles au centre du graphique. Les chevaux septiques ont des valeurs extrêmes pour les variables des groupes : Race, Gravité clinique, Cytokines, Microglie, Biochimie.

## II.4 Evaluation des conséquences musculaires du sepsis

### II.4.1 Morphométrie des fibres musculaires

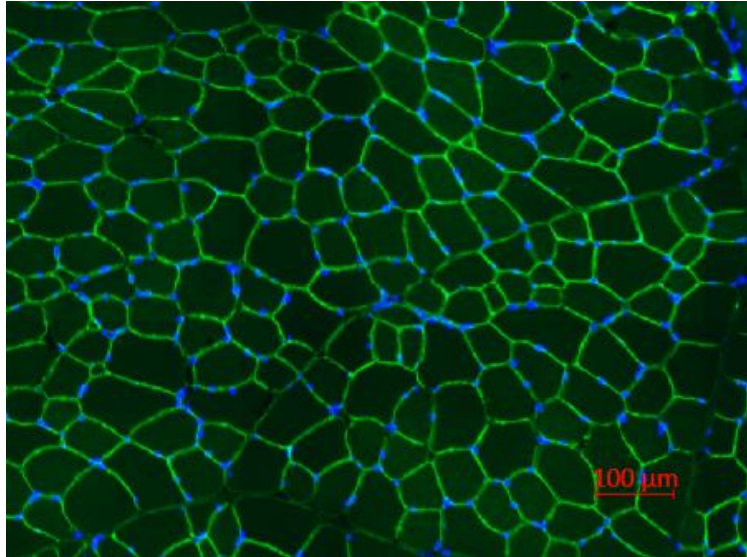


Figure 32 - Surface des fibres musculaires

Immunofluorescence anti-laminine (vert) et marquage des noyaux au Hoechst (bleu). Acquisition au Scanner de lame 20X.

La surface des fibres musculaires a été mesurée par analyse d'image. Dans une coupe donnée les surfaces des fibres suivent une loi normale, les surfaces moyennes de chaque coupe ont donc été comparées. A cause du faible nombre de chevaux dans le groupe contrôle (n=6) nous n'avons pas pu établir la normalité de la distribution des moyennes de surface des fibres et nous avons donc comparé les médianes des deux groupes à l'aide d'un test des rangs de Mann-Whitney (IC à 95% de la différence [-6.212 ; 6.359],  $p=0.92$ ) qui n'a pas mis en évidence de différence significative (cf. Fig. 33).

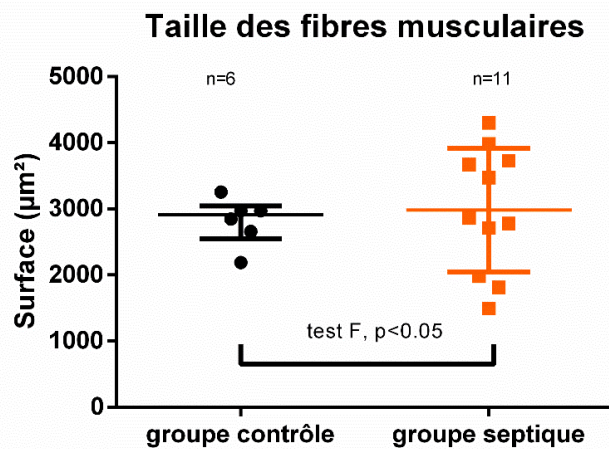


Figure 33 - Taille des fibres musculaires

Test des rangs de Mann-Whitney (IC à 95% de la différence [-6.212 ; 6.359],  $p=0.92$ ). Test F de comparaison des variances ( $p=0.0496$ ). Sont représentés la médiane et l'intervalle interquartile. Le groupe septique a une variance significativement supérieure pour la taille des fibres.

La réalisation d'un test F de comparaison des variances a en revanche révélé une différence significative avec une variance supérieure pour le groupe septique ( $p=0.0496$ ).

Lorsque l'on s'intéresse aux fibres de taille extrême, on remarque que la médiane des pourcentages de petites fibres ( $<500\mu\text{m}^2$  de section) du groupe septique est significativement supérieure à celle du groupe contrôle (IC à 95% de la différence  $[0,535; 14,35]$ ,  $p=0,027$ ). Cette comparaison a été effectuée à l'aide d'un test de Mann-Whitney (cf. Fig. 34). La même comparaison a été réalisée pour les fibres de grande section ( $>5000\mu\text{m}^2$ ) mais n'a pas montré de différence significative. En revanche ces résultats sont à interpréter avec beaucoup de prudence car les variances se sont montrées significativement différentes entre les deux groupes à chaque comparaison ( $p=0,006$  et  $p=0,011$  pour les tests F respectifs).

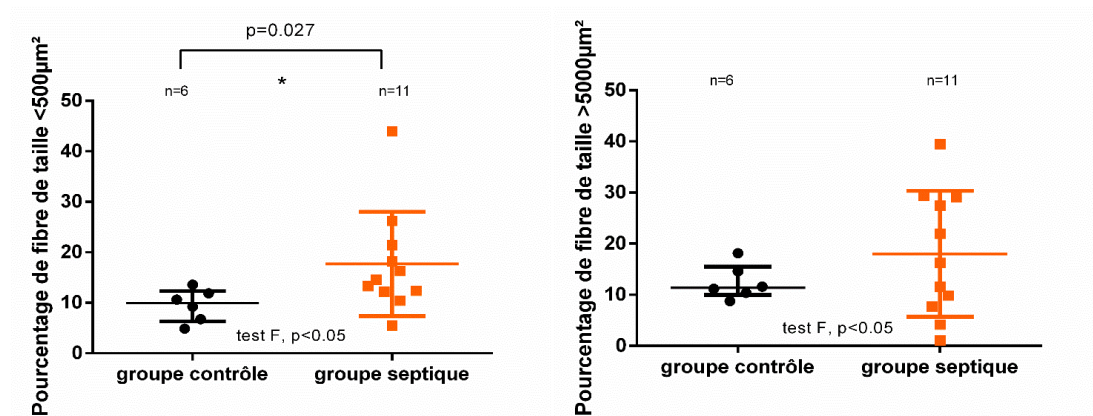


Figure 34 - Pourcentages de fibres de taille extrême

Test des rangs de Mann-Whitney. Test F de comparaison des variances. Sont représentés la médiane et l'intervalle interquartile. Les chevaux septiques ont un pourcentage significativement supérieur de petites fibres.

Nous avons cherché à visualiser l'effet de l'âge sur cette surface mais la répartition ne permet de dégager aucune tendance (cf. Fig. 35). Mais les fortes disparités d'âge entre les deux groupes compliquent l'interprétation.

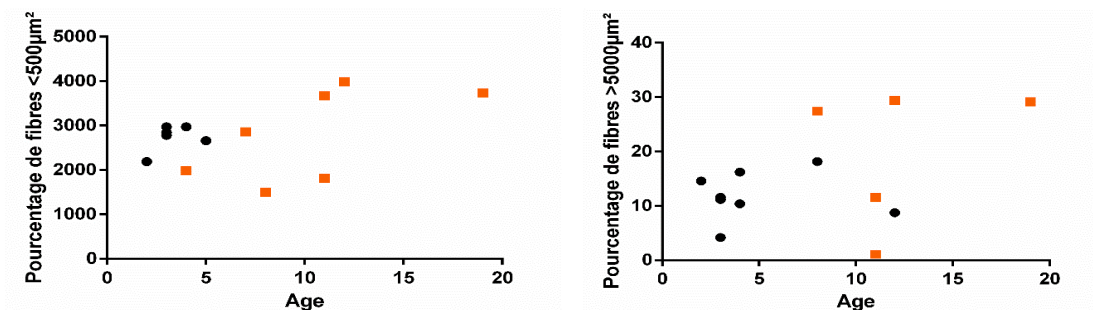


Figure 35 - Effet de l'âge sur les fibres de taille extrême

Aucune corrélation ne semble exister entre le pourcentage de fibres extrêmes et l'âge.

Les fibres centro-nucléées ont également été comptées et les densités ont été comparées mais aucune différence significative n'a pu être mise en évidence.

## II.4.2 Analyse de la vascularisation des muscles

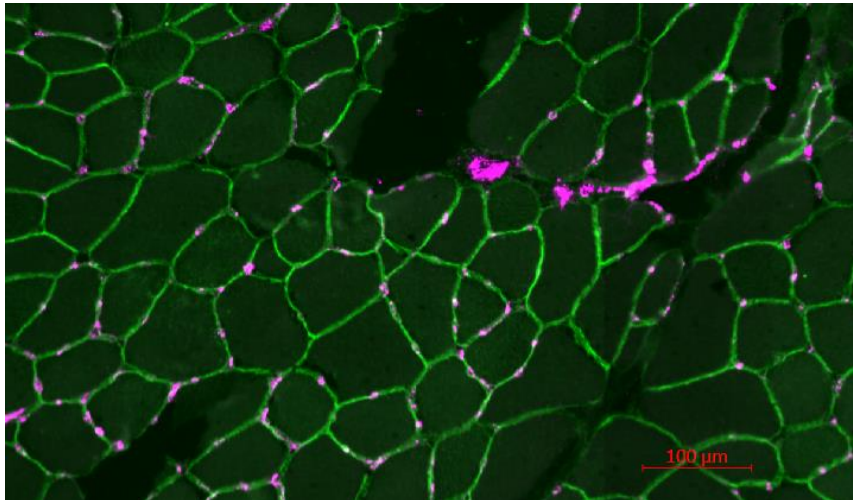


Figure 36 - Cryosection transversale de muscle immunomarquée

Immunofluorescence anti-laminine (vert) et anti-vaisseaux (rose). Acquisition au Scanner de lame 20X.

Un immunomarquage dirigé contre le facteur de Von Willebrand a été réalisé dans le but de repérer les vaisseaux. La vascularisation a été estimée en calculant le pourcentage de la surface marquée sur la surface totale de la coupe. La densité de vaisseaux par mm<sup>2</sup>, leur taille et leur nombre par fibre ont été calculés.

La comparaison des médianes de ces données par le test de Mann-Whitney n'a pas permis de mettre en évidence de différences significatives. De même que pour la surface des fibres, une différence significative entre les variances a pu être mise en évidence ( $p < 0.05$ ) sauf pour la

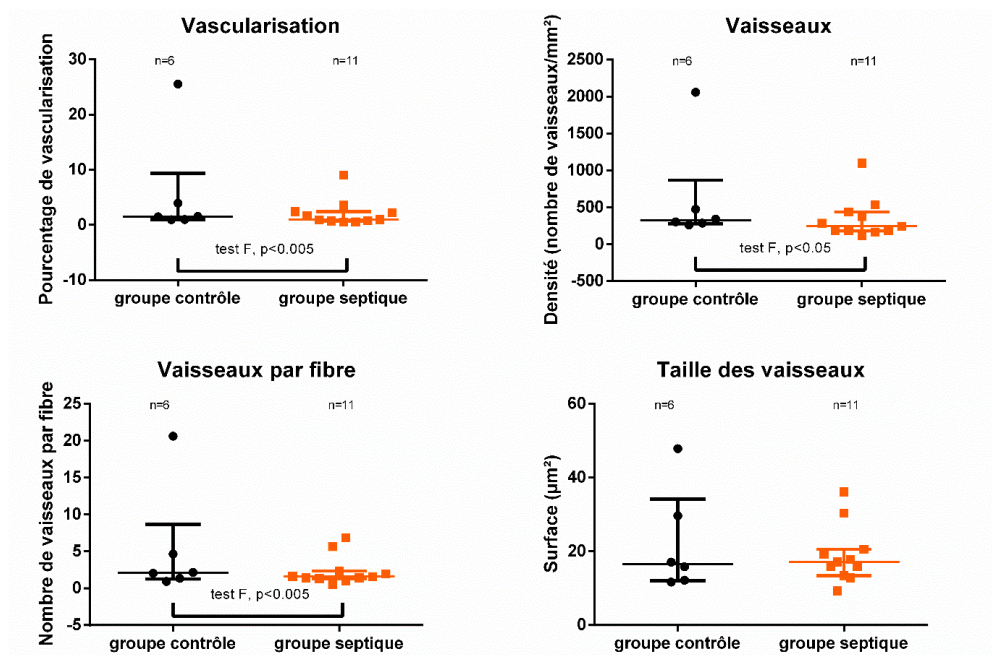


Figure 37 - Evaluation de la vascularisation musculaire

Test des rangs de Mann-Whitney (Vascularisation,  $p=0.35$ , Vaisseaux,  $p=0.18$ , vaisseaux par fibre,  $p=0.53$ , taille des vaisseaux,  $p=0.84$ ). Test F de comparaison des variances. Sont représentés la médiane et l'intervalle interquartile.



taille des vaisseaux ( $p=0.7594$ ) mais cette fois dans le sens inverse (cf. Fig. 37). Cette différence peut s'expliquer par l'existence d'un point extrême (cheval 12) dans le groupe contrôle.

Ce marquage cible un facteur pro-coagulant important qui subit chez l'homme une augmentation d'expression pendant le sepsis (390). C'est pourquoi nous avons aussi cherché à quantifier son intensité de marquage. La répartition de cette intensité dans le groupe septique a semblé former deux sous-groupes. Une analyse de clustering par la méthode des k-moyens au sein du groupe septique sur l'ensemble des données issues de l'analyse des muscles a mis en évidence deux groupes notés septique 1 et septique 2 (cf. Fig. 38). En les analysant séparément on a pu mettre en évidence par un test de Mann-Whitney une différence significative entre ces groupes (septique 1 > septique 2, IC à 95% [-17512 ; -5294],  $p=0.0159$ ) et entre le groupe 1 et le groupe contrôle (IC à 95% de la différence [-2352 ; 14132],  $p=0.040$ ). Certaines variables ont été comparées entre les deux groupes septiques par un test de comparaisons multiples de Dunn. Seule la densité de vaisseaux montre une différence significative avec une valeur plus faible dans le groupe 1 (cf. Tab. 10).

Tableau X - Comparaison des sous-populations du groupe septique

	Groupe septique 1			Groupe septique 2			p-value
	Moyenne	Erreur Standard	n	Moyenne	Erreur Standard	n	
Age	12.7	1.789165	10	8.75	1.973787	4	0.23025
FBXO	5993.143	942.1563	7	6844.5	1805.288	4	0.652132
TRIM.63	6941.833	681.679	6	8754.25	1965.833	4	0.33643
Durée	38.55556	19.1479	9	67.5	40.03644	4	0.470251
ASAT	310.625	63.00225	8	3566.333	3216.982	3	0.100883
CK	456.375	47.52929	8	3791.333	3111.914	3	0.0847672
IL 10	627.4667	570.5358	6	216.375	105.2201	4	0.58268
TNF $\alpha$	305.2167	295.9019	6	26.625	21.82446	4	0.473376
IL 1 $\beta$	270.05	271.1205	6	57.95	56.36956	4	0.552188
IL 6	617.6334	620.8123	6	21.475	26.78079	4	0.464582
Surface de vascularisation	1.248	0.4147768	7	3.65655	1.811383	4	0.12553
<b>Densité de vaisseaux</b>	<b>223.194</b>	<b>32.38536</b>	<b>7</b>	<b>562.559</b>	<b>193.1751</b>	<b>4</b>	<b>0.0457781</b>
Vaisseaux par fibre	2.065393	0.8116818	7	2.813622	0.9691584	4	0.580098
Taille vaisseaux	17.87371	3.321085	7	20.8465	3.221718	4	0.571705
Taille moyenne de fibre	3037.593	397.2316	7	2885.788	414.4449	4	0.810826
<500 $\mu\text{m}^2$	0.2168075	0.0413234	7	0.1073696	0.01929981	4	0.0902222
>5000 $\mu\text{m}^2$	0.1976225	0.05120005	7	0.1491392	0.05414333	4	0.557691

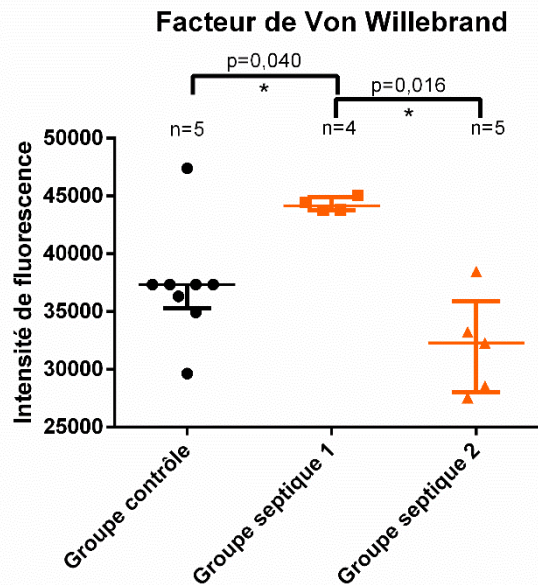


Figure 38 – Intensité de fluorescence du marquage Von Willebrand

La répartition en sous-groupe des médianes du groupe septique a été déterminé par la méthode des k-moyens. Test des rangs de Mann-Whitney (Contrôles/Groupe septique 1 IC à 95% de la différence [-2352 ; 14132],  $p=0.040$ , Contrôles/Groupe septique 2 : IC à 95% [-9798 ; 1134],  $p=0.1088$ , Groupe septique 1/Groupe septique 2 IC à 95% [-17512 ; -5294],  $p=0.0159$ ) Sont représentés la médiane et l'intervalle interquartile. Le sous-groupe septique 1 a une intensité de fluorescence pour le facteur de von Willebrand significativement supérieure aux groupes contrôle et septique 2.

### II.4.3 Analyse du métabolisme musculaire

Pour évaluer le métabolisme musculaire le typage des fibres a été effectué par immunofluorescence. Le pourcentage de chaque type de fibre a été calculé pour chaque cheval. Les médianes des pourcentages des groupes ont été comparées pour chaque type de fibre par un test de Mann-Whitney. Mais aucune différence significative n'a été mise en évidence (cf. Fig. 39).

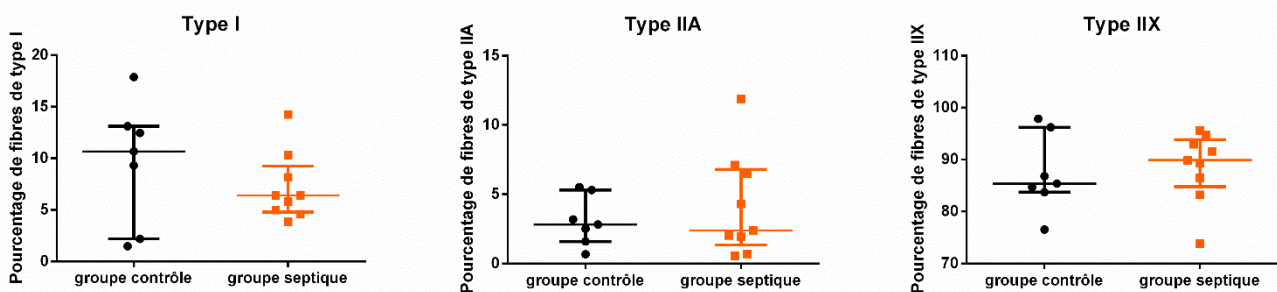


Figure 39 - Types de fibre

Test des rangs de Mann-Whitney. Sont représentés les médianes et intervalle interquartile. Aucune différence significative de répartition des types de fibre entre les groupes.

Aucune fibre IIB n'a été observée dans aucun muscle analysé.

La répartition des fibres a été représentée dans une cartographie des types de fibres de façon à confirmer la validité des données (cf. Fig. 40).

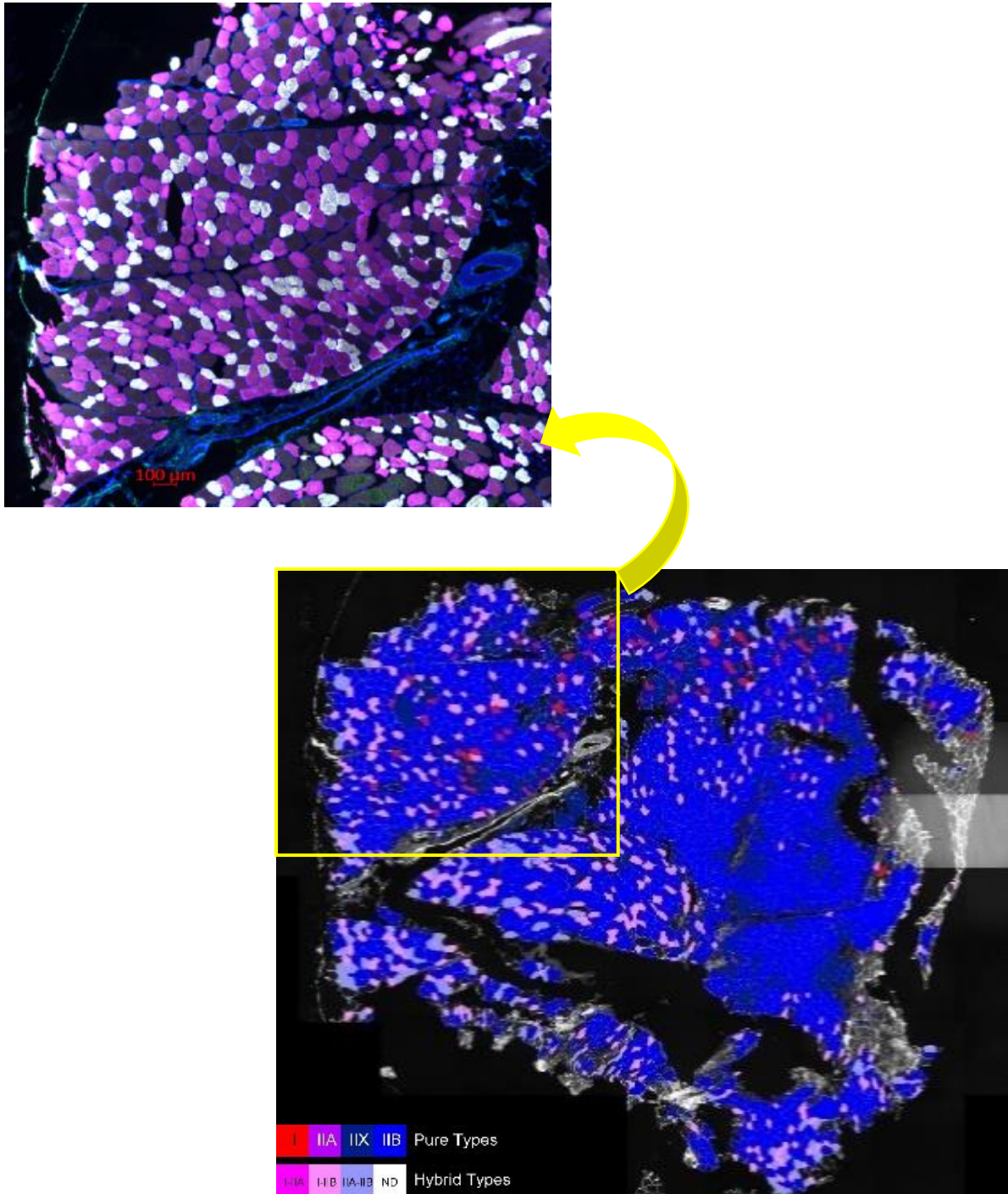


Figure 40 - Typage de fibres musculaires par immunofluorescence

En haut à gauche - Marquage par immunofluorescence anti-laminine (bleu), anti-type 1 (blanc), anti-type 2A (rose) et anti-type 2B (vert). Les fibres non-marquées sont les fibres 2X. Acquisition au scanner de lames.

En bas à droite - Cartographie construite dans Fiji à partir de l'image de la lame scannée

Le métabolisme protéique a été évalué par le marquage en immunofluorescence des ubiquitine-ligases TRIM 63 et FBXO. L'intensité de fluorescence a été quantifiée et comparée entre les deux groupes en prenant en compte l'ensemble des fibres ou les fibres de tailles extrêmes (<math>500\mu\text{m}^2</math> ou >math>5000\mu\text{m}^2</math> de section). Des tests de Mann-Whitney ont été réalisés mais n'ont pas montré de différence significative entre les deux groupes (cf. Fig. 41).

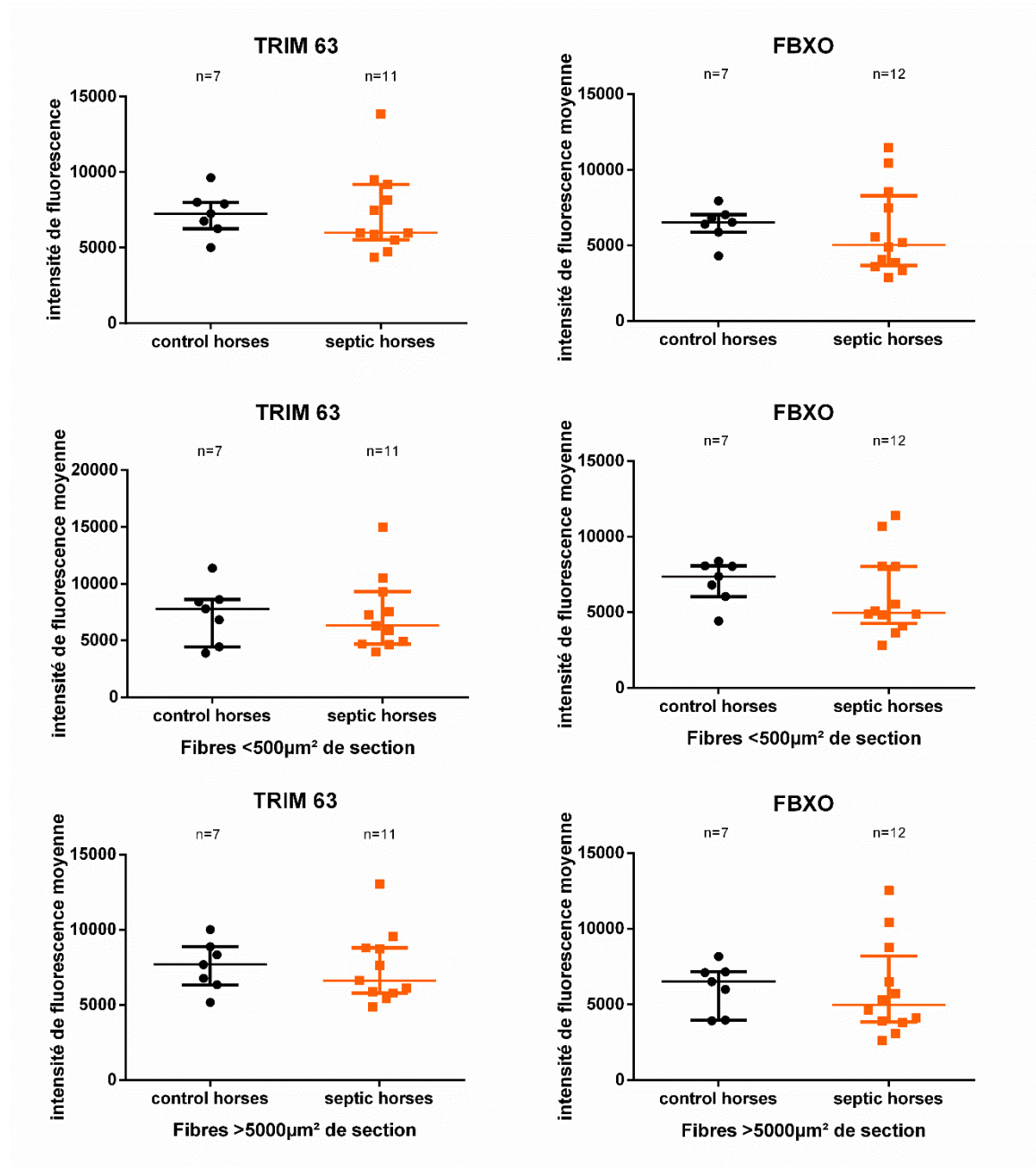


Figure 41 - Evaluation du Protéasome

Test des rangs de Mann-Whitney. Sont représentés les médianes et intervalle interquartile. Aucune différence significative d'expression d'ubiquitine ligases entre les groupes.



## II.4.5 Etude globale par analyse factorielle

Nous avons réalisé de la même manière que précédemment une analyse factorielle des données récoltées en ajoutant aux groupes précédant 4 groupes de variables : Taille des fibres, Type de fibre, Vascularisation, Facteur de Van Willebrand et Protéasome. En prenant en compte les 5 premiers axes on explique un peu plus de 50% de la variance (cf. Fig. 42).

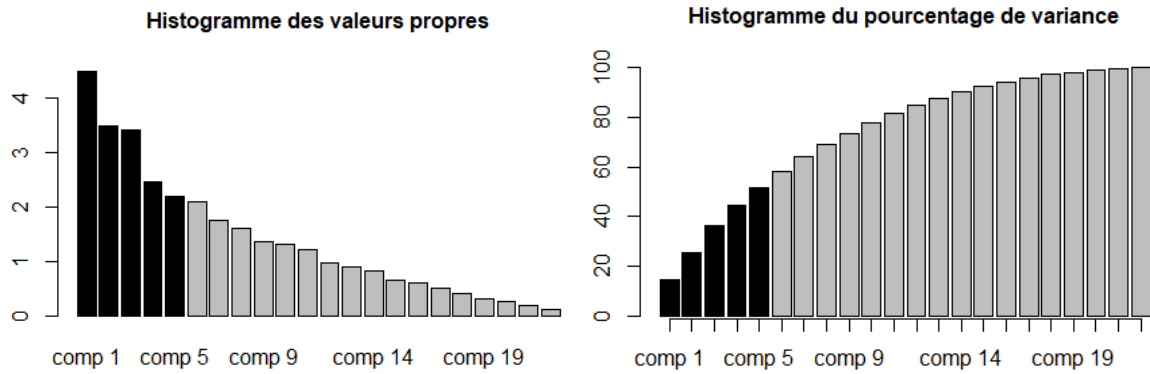


Figure 42 - Histogrammes des valeurs propres et des pourcentages de variance cumulés

En prenant en compte les 5 premiers axes on explique un peu plus de 50% de la variance

Si on analyse le tableau des coefficients de corrélation canonique (cf. Tab.11), la dimension 1 représente un facteur commun aux groupes Biochimie, Leucocytes, Gravité clinique et Durée et est assez liée au groupe Plaquettes. La dimension 2 est un facteur spécifique de la Race mais est aussi liée à la Gravité clinique et à la Microglie. La dimension 3 est spécifique de la Gravité clinique bien que liée à la Biochimie. Les dimensions 4 et 5 ne sont spécifiques à aucun groupe de variable mais sont toutes deux assez liées à la race. La dimension 4 présente une liaison modérée avec le groupe Protéasome et la dimension 5 est modérément liée à la Gravité clinique.

Tableau XI - Tableau des coefficients de corrélation canonique

Groupe	Dim.1	Dim.2	Dim.3	Dim.4	Dim.5
MICROGLIE	0.3714	0.7406	0.503	0.5344	0.6435
Taille de fibre	0.4719	0.5539	0.5219	0.5114	0.5701
Type de fibre	0.1123	0.3807	0.5267	0.3705	0.3461
Vascularisation	0.1745	0.1843	0.4038	0.2372	0.2361
VWF	0.3027	0.3351	0.0488	0.1822	0.6024
Protéasome	0.361	0.2177	0.0319	0.6403	0.1295
Cytokines	0.53	0.3653	0.6727	0.5615	0.6634
Biochimie	0.8985	0.6326	0.4491	0.4043	0.6591

HT	0.1989	0.2172	0.7251	0.3152	0.1823
Leucocytes	0.8403	0.4513	0.3185	0.2562	0.3389
Plaquettes	0.7262	0.2727	0.5111	0.052	0.06
Gravité clinique	0.9106	0.7334	0.8071	0.5068	0.7693
Durée	0.8999	0.0308	0.2868	0.0718	0.1899
Age	0.4424	0.6442	0.0025	0.1152	0.0617
Sexe	0.3633	0.642	0.6069	0.5101	0.106
Race	0.5832	0.9116	0.6093	0.6957	0.7389

Ces remarques se confirment globalement après l'examen du tableau des contributions des groupes aux différents axes (cf. Tab.12). La surface microgliale impacte moins les axes. Le Protéasome a un impact important sur la dimension 4 et le VWF sur la dimension 5 tout comme la taille des fibres. L'hématocrite est le premier contributeur de la dimension 3.

*Tableau XII - Tableau des contributions des groupes de variables aux axes factoriels*

Groupe	Dim.1	Dim.2	Dim.3	Dim.4	Dim.5
MICROGLIE	1.0821	5.441	3.299	6.9418	5.8461
Taille de fibre	4.1887	8.4294	7.4457	6.8137	11.3907
Type de fibre	0.2779	2.9624	8.1605	5.5772	5.4368
Vascularisation	0.4881	0.9039	4.6694	2.1979	1.0789
VWF	2.0458	3.2139	0.0702	1.3488	16.4889
Protéasome	2.8889	1.3486	0.0223	16.644	0.7452
Cytokines	4.691	1.004	9.6082	11.0001	10.1325
Biochimie	15.1439	10.4112	4.8884	4.4534	7.3016
HT	0.883	1.3498	15.4699	4.0346	1.5105
Leucocytes	15.7557	1.795	2.3727	2.6165	2.5181
Plaquettes	11.774	2.1276	7.6856	0.1098	0.1634
Gravité clinique	7.7879	13.5442	12.1289	7.281	10.2607
Durée	18.0819	0.0271	2.4198	0.2094	1.6393
Age	4.3699	11.873	2.00E-04	0.5393	0.1728
Sexe	2.9474	11.7929	10.8365	10.5715	0.5105
Race	7.5937	23.776	10.9227	19.6609	24.8042

La forme du nuage des individus dans les différents plans factoriels étudiés est semblable à celle décrite précédemment (cf. Fig. 43). La dimension 2 sépare les deux groupes le long de

l'axe tandis que les autres axes isolent des individus septiques à leurs extrémités. Cette plus forte variabilité des individus septique est bien visible sur la représentation des individus partiels où les nuages partiels des individus septiques sont beaucoup plus larges que ceux des contrôles (cf. Fig. 44).

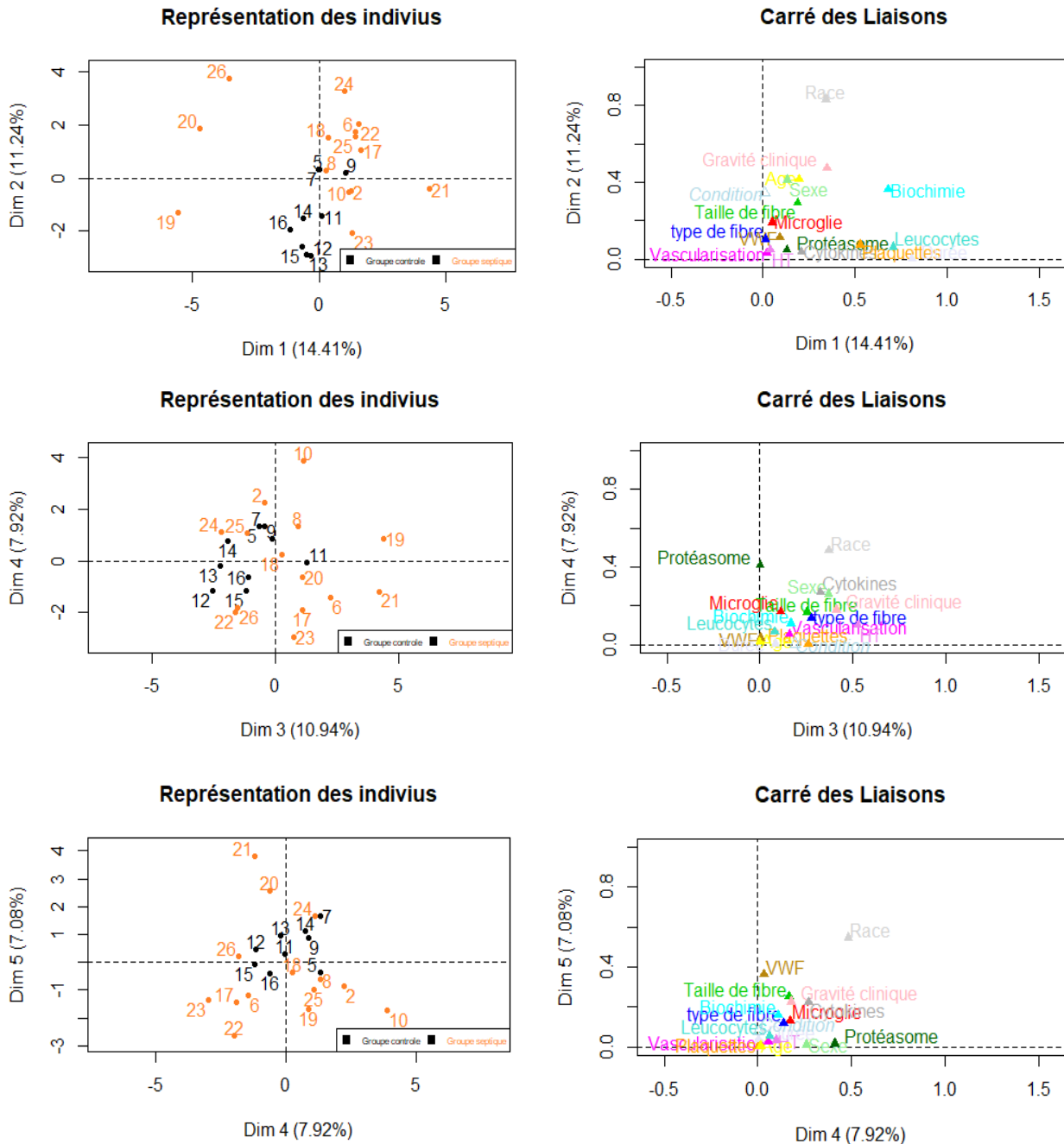


Figure 43 - Représentation des différents plans factoriels

A gauche : représentation des individus.

A droite : carré des liaisons des groupes de variables

La dimension 2 séparent les deux groupes le long de l'axe tandis que les autres axes isolent des individus septiques à leurs extrémités.

Les variables des groupes Protéasome et Taille de fibre sont particulièrement impliquées dans l'isolement des individus septiques sur les axes de dimension 4 et 5. La race reste sur chaque axe un groupe de très forte contribution.

### Représentation des individus partiels

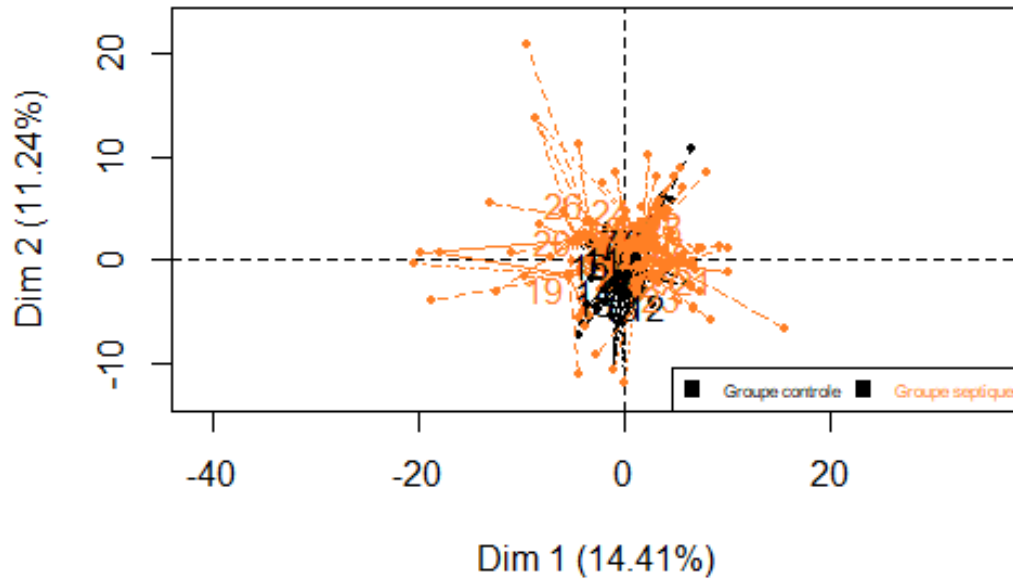


Figure 45 - Représentation des individus partiels dans le premier plan factoriel

Les nuages partiels des individus septiques sont beaucoup plus larges que ceux des contrôles

### Cercle des corrélations

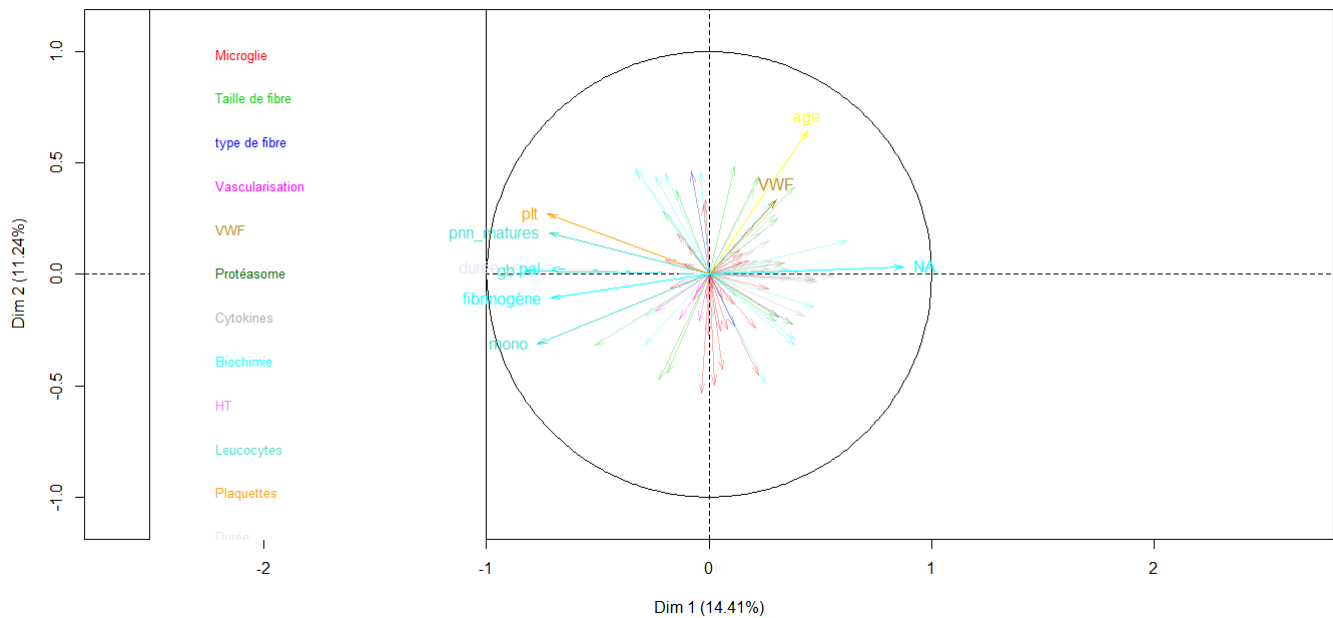


Figure 44 - Cercle des corrélations

Sont représentées les variables quantitatives contribuant le plus aux axes 1 et 2.

Les leucocytes, les plaquettes, le fibrinogène et le sodium contribuent à l'axe 1. Le VWF et l'âge contribuent à l'axe 2.

Dans le premier plan factoriel les variables quantitatives qui contribuent majoritairement aux axes 1 et 2 sont le nombre de PNN, de leucocytes, de monocytes et de plaquettes ainsi que la concentration en fibrinogène et en sodium pour l'axe 1 et le VWF et l'âge pour l'axe 2 (cf. Fig. 45). Certaines variables du groupe Microglie sont aussi bien corrélées négativement à l'axe 2.

Tableau XIII - Tableau des corrélations des groupes de variable

	Cytokines	Biochimie	HT	Leucocytes	Plaquettes	Gravité clinique	Durée	Age	Sexe	Race	Condition
Cytokines	1	0.0988	0.2155	0.1146	0.2503	0.3173	0.1017	0.0292	0.0493	0.1485	0.1774
Biochimie	0.0988	1	0.0156	0.4896	0.2841	0.4666	0.4674	0.0967	0.1643	0.2693	0.0946
HT	0.2155	0.0156	1	0.0283	0.3208	0.2827	0.0069	0.0277	0.1051	0.0494	0.2604
Leucocytes	0.1146	0.4896	0.0283	1	0.1881	0.3456	0.5075	0.1766	0.1416	0.1216	0.0789
Plaquettes	0.2503	0.2841	0.3208	0.1881	1	0.1604	0.2601	0.0252	0.0081	0.2238	0.0273
Gravité clinique	0.3173	0.4666	0.2827	0.3456	0.1604	1	0.2776	0.1202	0.1538	0.3298	0.4944
Durée	0.1017	0.4674	0.0069	0.5075	0.2601	0.2776	1	0.1359	0.1448	0.1108	0
Age	0.0292	0.0967	0.0277	0.1766	0.0252	0.1202	0.1359	1	0.1448	0.1497	0.0906
Sexe	0.0493	0.1643	0.1051	0.1416	0.0081	0.1538	0.1448	0.1448	1	0.2108	0.0922
Race	0.1485	0.2693	0.0494	0.1216	0.2238	0.3298	0.1108	0.1497	0.2108	1	0.2023
Condition	0.1774	0.0946	0.2604	0.0789	0.0273	0.4944	0	0.0906	0.0922	0.2023	1

Enfin il est possible de s'intéresser aux corrélations deux-à-deux des groupes de variables que le tableau 13 représente en partie. Les groupes issus des données sur le muscle et le groupe microglie montrent des coefficients de corrélation faibles avec tous les groupes et ne sont pas représentés ici. Pour les autres groupes on note un lien particulier entre la formule leucocytaire et la durée d'évolution. On remarque également une possible corrélation entre les analyses biochimiques, la gravité clinique et la durée d'évolution. Les coefficients restent néanmoins faibles mais l'aspect multi-dimensionnel de cette analyse diminue la probabilité d'apparition d'un fort coefficient.

**Notre étude a permis de mettre en évidence dans le groupe de chevaux septiques :**

- **Une défaillance organique mise en évidence par des altération cliniques et hématobiochimiques.**
- **Une tempête cytokinique ont les acteurs majeurs sont l'IL-10, le TNF $\alpha$  et l'IL-6**
- **Une altération de la microglie dans 6 régions cérébrales : la substance blanche des cortex frontal et occipital, la substance grise du cortex occipital, le noyau caudé du corps strié, le mésencéphale et la substance grise du cervelet**
- **Un nombre plus important de petites fibres musculaires**
- **Une surexpression chez certains septiques du VWF avec une diminution de la densité de vaisseaux dans ce sous-groupe.**

**L'âge et la race de chevaux inclus dans l'étude ne sont pas équitablement répartis entre les deux groupes et constituent un biais important à prendre en compte.**

## III. Discussion

### III.1 Evaluation des défaillances organiques

Le recrutement du groupe septique a rassemblé des individus exprimant une symptomatologie équivalente à celle retrouvée chez l'homme lors d'un SIRS. De plus, le calcul du score MODS SGI (391) dans la cohorte, a permis de valider un score minimal de 1/24 pour tous les chevaux du groupe septique, respectant ainsi la nouvelle définition du sepsis chez l'homme. En effet, le dernier consensus sepsis-3 préconise l'utilisation du score *Sequential [Sepsis-related] Organ Failure Assessment* (SOFA) ou du *quick SOFA* (qSOFA) pour le dépistage des patients septiques (382) et exige la présence obligatoire d'une preuve de dysfonction organique, objectivement évaluée par un SOFA supérieur ou égal à 2 (382). Seul un cheval contrôle présente un MODS SGI égal à 1, en raison d'une légère augmentation de l'activité plasmatique de la créatine kinase (CK). Il s'agissait d'un cheval d'expérimentation ayant subi un protocole d'électrostimulation du nerf radial à basse fréquence. Des travaux récents ont montré qu'une électrostimulation à haute fréquence couplée à des contractions excentriques du muscle stimulé pouvait entraîner d'importantes lésions des cellules musculaires, pouvant expliquer l'élévation de l'activité plasmatique de la CK chez ce cheval dans un contexte hors sepsis et SIRS (392). Cependant, le MODS SGI ne possède pas le même niveau de validation que le score SOFA chez l'homme. En effet, il n'est basé que sur une seule étude dans laquelle il a été déterminé au chevet des patients (383). Ici son utilisation est différente puisqu'il a été appliqué a posteriori sur l'ensemble des données cliniques disponibles pour chaque cheval. Il a également dû être adapté pour tenir compte des données manquantes. Tout ceci explique que les scores retrouvés ici soient inférieurs à ceux rencontrés lors de cette précédente étude qui avait déterminé une valeur seuil de 8 pour la prédiction de la survie à 6 mois (sensibilité 92%, spécificité 88%).

### **III.2 Evaluation de la réponse immunitaire**

Le dosage des cytokines et chémokines plasmatiques de la cohorte a permis de mettre en évidence une augmentation significative de 15 d'entre elles également présentes en quantité augmentée chez l'homme en sepsis sévère ou choc septique (49). Les augmentations les plus marquées concernent le TNF $\alpha$ , l'IL-6, l'IL-1 $\beta$ , la Fractalkine, l'IL-12, l'IL-17A et l'IL-10.

Les chevaux du groupe septique présentent donc un profil cytokinique mixte à la fois pro et anti-inflammatoire avec des concentrations très élevées de certaines cytokines comme l'IL-10. Ces modifications sont cohérentes avec un déséquilibre de la réponse immunitaire et valident donc l'état septique de notre groupe. L'ensemble de ces résultats est cohérent avec la circulation plasmatique de cytokines et chémokines observée chez l'homme lors d'un sepsis sévère ou choc septique (49).

Il a donc été mis en évidence dans la circulation générale une activation des voies pro-inflammatoires, mais également anti-inflammatoires ainsi que la présence de cytokines régulatrices telles que l'IL-17A. Cette multiplicité des voies de l'inflammation mises en jeu correspond également aux phénomènes d'activation et de régulation de la réaction immunitaire observée chez l'homme. En effet, dans les premières 48 heures suivant un sepsis, les pics de cytokines pro- et anti-inflammatoires sont quasiment simultanés soulignant l'importante inter-régulation de ces deux phénomènes dans la réponse de l'hôte face à l'agression systémique (9). Cependant les prises de sang des chevaux septiques sont réalisées dès leur admission au centre hospitalier vétérinaire. Dans la cohorte, la durée entre le début des symptômes et le prélèvement sanguin varie entre 2 heures et 7 jours. Malheureusement la cinétique des cytokines chez le cheval septique n'est pas totalement démontrée. Le tableau 14 présente un résumé des données de la littérature.

Ces différents résultats cliniques et biocliniques laissent à penser que la réaction de l'organisme du cheval face à un sepsis présente beaucoup de similitudes avec celle de l'homme. D'un point de vue immunitaire, cela a été confirmé dans la littérature portant sur le SIRS induit expérimentalement par injection intraveineuse de LPS. Les monocytes circulants du cheval sont très sensibles au LPS, la demi-concentration efficace pour entraîner la libération de TNF $\alpha$  est de 0,02ng/mL pour *Escherichia coli* ((393), alors qu'elle est de l'ordre du 0,01 $\mu$ g/mL chez l'homme et la souris (394)). Cette sensibilité est retrouvée *in vivo*, avec une induction de symptômes de type SIRS en 6 heures après injection avec une récupération complète en 24 heures avec une injection intraveineuse de 1  $\mu$ g/kg de LPS, contre 1 mg/kg habituellement utilisé chez la souris pour induire un léger SIRS (395).



Tableau XIV - Rôles et fonction des cytokines au cours du sepsis

Cytokines/ Chémokines plasmatic ues	Résultats		Cellules productrices	Fonction et cellules cibles	Concentration dans le sepsis humain	Implications connues en pathologie équine
	Concentration en pg/mL	Variance				
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	<b>5,55</b> (4,48- 1024) <i>n</i> =7	↗	Lymphocytes T (LT), Macrophages, Lymphocytes Natural Killers (NK) (396)	Inflammation locale Synthèse de prostaglandines Activation endothéliale, production de cytokines (396)	0-14 pg/mL (49)	Corrélée aux signes cliniques lors d'endotoxémie et de défaillance organique expérimentales (397– 400). Corrélée à l'IL-6 et à la mortalité lors d'affection abdominale aigue (371,401). Le blocage prévient les signes cliniques lors d'endotoxémie expérimentale (402). Augmentée (894.064 ( $\pm$ 179.221) pg/mL) 6h après injection de LPS (403)
<b>IL-6</b>	<b>23,62</b> (8,48- 5556) <i>n</i> =4	↗	LT, Mastocytes, Macrophages (396)	Hépatocytes : production des protéines de la phase aigüe de l'inflammation Fièvre (396) Muscle : myokine régulant la réponse du muscle à l'exercice (223)	1027- 5632 pg/mL (49)	Corrélée à l'IL-6 et à la mortalité lors d'affection abdominale aigue (371,401). Corrélée aux signes cliniques lors d'endotoxémie expérimentale (376,400) Augmentée (261.540 ( $\pm$ 42.707) pg/mL) 6h après injection de LPS (403)
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	<b>14,26</b> (7,41- 1549) <i>n</i> =6	↗	Macrophages (396)	Activation des macrophages Fièvre (396)	0,17-1,22 pg/mL (49)	Corrélée aux signes cliniques lors d'endotoxémie expérimentale (376,400) Augmenté (3,150.524 ( $\pm$ 1,520.336) pg/mL) 6h après injection de LPS (403)

<b>Fractalkine</b>	<b>1096</b> (718,1-4909) <i>n=3</i>	↗		Chimiokines pour LT et cellules microgliales (récepteur CX3CR1) (396)	Augmentée (404)	Augmentée lors d'uvéite récurrente (405). Augmentée (1,211.792 (±772.502) pg/mL) 6h après injection de LPS (403)
<b>IL-12</b>	<b>37,33</b> <i>n=1</i>	↗	Lymphocytes B (LB), Macrophages (396)	Différenciation des LT Helper 1 (L <sub>TH1</sub> ) Activation des NK	Augmentée (406)	Utilisation en thérapie génique dans un modèle équin de mélanome (407,408). Sécrété par les macrophages alvéolaires et les monocytes sanguins lors de rhodococcose (409).
<b>G-CSF</b>	<b>541,7</b> (159,7-815) <i>n=4</i>	↗	Monocytes, macrophages, fibroblastes (396)	Stimulation des PNN (396)	Augmentée (406)	Augmentation lors de fièvre des transport (410). Augmentée (334.736 (±100.147) pg/mL) 6h après injection de LPS (403)
<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	<b>25,63</b> (25,63-37,33) <i>n=3</i>	↗	Macrophages (396)	Activation des macrophages Fièvre (396)	Augmentée (411)	Expression lors d'endotoxémie expérimentale (412). Impliquée dans l'endométriose (413)
<b>IL-5</b>	<b>32,63</b> (30,9-34,35) <i>n=2</i>	↗	LT, Mastocytes (396)	Stimulation de polynucléaire éosinophiles (PNE) (396)	Augmentée (406)	Augmentation dans le liquide broncho-alvéolaires des chevaux atteints d'asthme (414) et dans la peau des chevaux atteints d'urticaire récurrent (415). Augmentée (56.785 (±14.970) pg/mL) 6h après injection de LPS (403)
<b>IL-2</b>	<b>9,15</b> (5,12-15,22) <i>n=3</i>	↗	LT, Cellules dendritiques (DC) (396)	Prolifération des LT (396)	Augmentée (406)	Impliquée dans les maladies inflammatoires du gros intestin (416) Augmentée (12.988 (±2.803) pg/mL) 6h après injection de LPS (403)

<b>IFN<math>\gamma</math></b>	<b>3529</b> (251,9-6807) <i>n=2</i>	↗	LT, NK (396)	Inhibition des LTH2 Activation des macrophages (396)	0-33,1 pg/mL (49)	Pas d'augmentation lors de sepsis néonatal (417) Augmentée (947.748 ( $\pm$ 286.373) pg/mL) 6h après injection de LPS (403)
<b>IL-8</b>	<b>66,52</b> <i>n=1</i>	↗		Chimiokines pour LT et PNN (récepteur CXCR1,2) (396)	52,63- 145,3 pg/mL (49)	Corrélée aux signes cliniques lors d'endotoxémie expérimentale (376,418) Augmentée (160.750 ( $\pm$ 33.802)pg/mL) 6h après injection de LPS (403)
<b>IP-10</b>	<b>57,98</b> (17,01- 98,94) <i>n=2</i>	↗		Chimiokines pour LT activés (récepteur CXCR3) (396)	Augment ée (406)	Impliquée dans l'anémie infectieuse équine (419) Augmentée (173.014 ( $\pm$ 51.100)pg/mL) 6h après injection de LPS (403)
<b>GRO</b>	<b>48,95</b> <i>n=1</i>	↗		Chimiokines pour PNN (récepteur CXCR2) (396)	Pas d'homolo gue humain (406)	Augmentée (206.730 ( $\pm$ 19.548) pg/mL) 6h après injection de LPS (403) Produit dans le podophyle lors de fourbure(420–422)
<b>GM-CSF</b>	2,42 (1,38- 10,03) <i>n=6</i>	Ten dan ce ↗	LT, Macrophages (396)	Production de cellules myéloïde surtout DC (396)	Augment ée (406)	Pas à notre connaissance
<b>RANTES</b>	3,89 <i>n=1</i>	NS		Chimiokines pour LT, macrophages, DC, NK et PNE (récepteur CCR1,3,5) (396)	Augment ée (406)	Impliqué dans l'attraction des monocytes infectés par l'herpesvirus équin lors de formes neurologiques (423)
<b>MCP-1</b>	435 (168,5- 1173) <i>n=4</i>	NS		Chimiokines pour LT et monocytes (récepteur CCR2) (396)	6,295- 753,9 pg/mL (49)	Augmentée (3,767.000 ( $\pm$ 1,012.198) pg/mL) 6h après injection de LPS (403)

<b>IL-18</b>	12,61 (12,49-79,64) <i>n=3</i>	NS	Macrophages activés, cellules de Kupffer (396)	Activation des LTH1 Production d'IFN $\gamma$ par les LT et NK (396)	Augmentée (406)	Augmentée (142.850 ( $\pm$ 43.023) pg/mL) 6h après injection de LPS (403)
<b>FGF-2</b>	55,27 (14,1-256) <i>n=7</i>	NS			Pas à notre connaissance	Pas à notre connaissance
<b>Eotaxine</b>	12,16 (9,825-91,86) <i>n=7</i>	NS		Chimiokines pour PNE (récepteur CCR3) (396)	Augmentée (406)	Stable (15.282 ( $\pm$ 6.499) pg/mL) 6h après injection de LPS (403)
<b>IL-13</b>	< LC	NA	LT (396)	Inhibe la sécrétion de cytokines inflammatoire par les macrophages (396)	0,27-7,21 pg/mL (49)	Augmentation dans le sérum des chevaux atteints d'asthme (424) et dans la peau des chevaux atteints d'urticaire récurrent (415).
<b>IL-17A</b>	<b>10,56</b> (5,62-18,65) <i>n=7</i>	↗			Augmentée (406)	Impliquée dans l'asthme chronique (425,426).
<b>IL-4</b>	436,9 (230,1-643,8) <i>n=2</i>	NS	LT, Mastocytes (396)	Suppression des LTH1 Activation des LB (396)	Augmentée (406)	Augmentée (1,486.826 ( $\pm$ 557.649) pg/mL) 6h après injection de LPS (403)
<b>IL-10</b>	<b>175</b> (27,76-970,2) <i>n=10</i>	↗	LT, Macrophages (396)	Inhibition des macrophages Immunotolérance, (396)	2,27-27,45 pg/mL (49)	Augmentée (284.534 ( $\pm$ 59.435) pg/mL) 6h après injection de LPS (403)

### **III.3 Réactivité microgliale des chevaux septiques**

Une réactivité microgliale a pu être mise en évidence dans la substance blanche des cortex frontal et occipital, la substance grise du cortex occipital, le noyau caudé du corps strié, le mésencéphale et la substance grise du cervelet des chevaux septiques, grâce à l'analyse morphologique systématisée montrant une diminution de la surface de la microglie, associée à une forme majoritairement améboïde des cellules microgliales. Il est possible de faire l'hypothèse d'une relation entre la modification morphologique observée et la diminution de la surface mesurée. En effet, plus une cellule est ramifiée plus ses branches cytoplasmiques se prolongent dans toutes les directions et donc plus la probabilité qu'une ou plusieurs parties de son cytoplasme passent par le plan de coupe est importante. Le marquage Iba1 étant membranaire, on peut supposer que la surface du marquage sur une coupe est plus importante lorsque la microglie est fortement ramifiée.

Cette réactivité est également retrouvée dans les études cliniques humaines (427) et les modèles expérimentaux murins (270,428). Parfois, il peut s'agir d'une réaction aigüe retrouvée dès 6h après l'induction du sepsis ou beaucoup plus persistante qui est mise en évidence plusieurs semaines après résolution de l'épisode septique (395). Les méthodes d'étude de la réactivité microgliale retrouvées dans la littérature sont résumées dans le tableau 15.

*Tableau XV - Réactivité microgliale au cours du sepsis selon les espèces*

<b>Espèce</b>	<b>Région</b>	<b>Méthode</b>	<b>Référence</b>
Homme	Cortex Frontal Cortex Pariétal	Score	(257)
Homme	Cortex	Observation	(429)
Homme	Thalamus	Observation	(267)
Homme	Hippocampe caudal	Quantification de la densité microgliale (augmentation non-significative)	(430)
Souris	Cortex	Microscopie bi-photonique	(258)
Rat	Hypothalamus Thalamus Tronc cérébral	8-24h après injection LPS Immunomarquage ED-1 Observation	(431)
Souris	Cortex	Marquage ED-1 quantifié	(270)

	Hippocampe		
Souris	Cervelet	Marquage ED-1 quantifié	(256)
Souris	Cortex frontal Hippocampe Corps striés Cervelet	Analyse morphométrique	(395)

Chez l'homme, les régions du cortex frontal et pariétal ont montré une réactivité microgliale lors de sepsis comme les chevaux de notre étude. Cependant, l'hippocampe et le thalamus ont également présenté des altérations dans certaines études, ce qui n'a pas pu être confirmé ici. Il convient de signaler que ces études sont toutes des cas cliniques isolés ou des petites séries de cas cliniques et que toutes les régions étudiées ici n'ont pas été étudiées dans ces études. Dans les modèles animaux disponibles jusqu'ici, le cortex, le cervelet et le corps strié ont présenté comme chez le cheval des signes de réactivité microgliale. En revanche, notre étude n'a pas pu démontrer d'altération de la microglie du thalamus, hypothalamus, hippocampe et tronc cérébral comme dans les autres modèles. Les méthodes d'étude diffèrent beaucoup entre les études et certaines se basent sur une simple observation qualitative. La nôtre a l'avantage de proposer une réelle quantification même si elle se limite à une analyse plus grossière que les études utilisant des modèles génétiques CX3CR1-GFP permettant d'étudier les paramètres morphométriques de chaque cellule microgliale. C'est à notre connaissance, la première étude qui s'intéresse à la morphologie microgliale du cheval et également la première à l'étudier dans un modèle animal de sepsis, sur autant de régions différentes.

A l'heure actuelle, il n'existe pas d'étude clinique s'intéressant aux conséquences neurologiques observées pendant ou après la survenue d'un épisode de sepsis chez le cheval et aucun signe clinique neurologique n'a été rapporté chez aucun des chevaux de notre cohorte. Il est donc impossible de rapprocher la neuroanatomie des lésions à des signes neurologiques comme chez l'homme ou la souris. Des études de cas rapportent des signes neurologiques chez des chevaux opérés de colique souvent interprétés comme liés à une hyperamoniémie sans preuve réelle (432). Ces signes sont principalement des convulsions, un coma ou la mort de l'animal. Ces modifications de l'état de conscience peuvent s'expliquer par des lésions corticales comme c'est le cas chez l'homme.

### **III.4 Des altérations fonctionnelles de la cellule musculaire dans le sepsis à explorer**

De façon peu surprenante notre étude n'a pas permis de souligner de différences de morphologie majeures au sein du tissu musculaire. Seules les fibres de petit diamètre semblent être plus nombreuses dans le groupe des chevaux septiques, ce qui pourrait indiquer un début d'atrophie musculaire. Les atteintes morphologiques sont des lésions tardives (433,434) qui sont difficiles à mettre en évidence au vu de nos conditions de recrutement. A ce stade, les modifications sont de faible amplitude et la variabilité de notre échantillon ainsi que la faible standardisation inhérente à toute étude clinique diminuent notre pouvoir de discrimination. L'échantillonnage pour l'étude du tissu musculaire a été également beaucoup plus hasardeux que celui de l'encéphale puisque le prélèvement s'est résumé à une biopsie d'une cinquantaine de grammes dans un très grand muscle. Ceci a fortement augmenté la variabilité de nos mesures.

L'étude de la vascularisation musculaire n'a montré aucune modification sur l'ensemble du groupe septique. Or les conséquences vasculaires du sepsis dans d'autres tissus chez le cheval a été bien démontré notamment dans le podophylle (435). Seule l'intensité du marquage du facteur de Von Willebrand semble discriminer notre groupe de chevaux septiques en deux sous-populations. Il reste cependant à investiguer cette donnée pour la confirmer sur un plus grand nombre d'individus et tenter de déterminer d'autres modifications associées pouvant confirmer cette séparation en deux groupes. De façon générale, la présence de sous populations dans le groupe septique est très probable vu l'hétérogénéité du groupe mais la taille de l'effectif est trop faible pour pouvoir séparer ces sous populations.

Dans notre étude, la composition en type de fibres s'est trouvée très variable d'un individu à l'autre dans les deux groupes. Beaucoup de paramètres innés ou acquis influencent cette composition (âge, race, entraînement, sexe, ...) tout comme certaines conditions expérimentales (muscle prélevé, profondeur de la biopsie). Aucune fibre de type IIb n'a été repérée. Cette absence de fibre IIb est déjà connue et constitue une particularité de l'espèce (436,437).

Ces données pourront servir de base à une étude plus poussée du métabolisme énergétique comme la quantification des mitochondries.

Pour réussir à caractériser une neuro-myopathie associée au sepsis chez le cheval à un temps précoce, il est nécessaire de rechercher des altérations de fonctionnement cellulaire. En effet, une activation des voies du catabolisme musculaire a été montrée chez l'homme et les modèles expérimentaux notamment via une activation du protéasome et précède la perte de masse musculaire (223). La recherche de l'expression des enzymes d'entrée dans cette voie telles que les ubiquitine-ligases Trim63 et FBXO32 permet d'évaluer cette voie et a montré dans les

modèles animaux une augmentation de l'expression des gènes homologues (281,387). Dans notre étude la quantification de ces marqueurs à l'échelle protéique par immunofluorescence n'a pas permis de montrer de modifications liées au sepsis. Il est possible que la durée d'évolution du sepsis ait été insuffisante pour pouvoir voir ces modifications à l'échelle protéique et qu'il aurait fallu évaluer l'expression de ces gènes. Ces deux marqueurs n'ont jamais été évalués chez le cheval ; il est possible que chez cette espèce la voie du protéasome soit activée par des enzymes différentes.

Il n'existe à l'heure actuelle pas d'étude clinique menée chez le cheval ayant mis en évidence des altérations musculaires secondaires au sepsis. Il semble cependant nécessaire de déterminer si un équivalent des neuro-myopathies acquises en réanimation existe chez le cheval et de quantifier l'amyotrophie souvent observée par les cliniciens chez les chevaux hospitalisés pour coliques. En effet, des études de cas vont dans ce sens avec des signes d'atteinte du tissu musculaire lors d'un syndrome de douleur abdominale aiguë, par exemple une mise en évidence de nécrose dans les muscles semi-membraneux de trois chevaux présentant un SIRS (438). Cette nécrose était caractérisée par une lyse et une fragmentation de fibres isolées parmi des myofibrilles saines, laissant supposer un mécanisme d'induction apoptotique par la circulation de médiateurs pro-inflammatoires (439).

### **III.5 Points forts et limites de l'étude**

Les contraintes imposées par la méthodologie de l'étude nous ont obligés à adapter nos méthodes expérimentales. En effet, le recrutement des chevaux a été basé sur un seul centre et a nécessité pour chaque animal un accord des propriétaires. Notre étude a donc été limitée dans son effectif et dans le but d'en maximiser la taille, les critères de recrutement choisis ont été larges. Ce choix a eu pour conséquence l'obtention d'une cohorte très hétérogène avec une forte variabilité interindividuelle pour l'ensemble des variables observées, limitant ainsi notre pouvoir de discrimination. En revanche, comme notre cohorte comporte une grande variété d'âge, de sexe, de race et de diagnostic étiologique, elle est représentative de l'ensemble de la population équine. Ceci représente un intérêt certain pour l'étude du sepsis puisque ce dernier touche toutes les tranches d'une population. Cependant, cette hétérogénéité n'est pas tout à fait identique entre les deux groupes que nous avons comparés du fait de la difficulté d'enroller des chevaux sains. Ceci peut conduire à la présence de biais d'échantillonnage et limite l'interprétation des résultats. Les analyses factorielles réalisées montrent bien un effet de l'âge et de la race qui perturbe l'interprétation des résultats. La cohorte nécessite donc d'être élargie pour permettre une répartition plus homogène de ces variables dans nos deux groupes.



Pour tenter de contrebalancer le manque de sensibilité de cette étude, lié à son faible effectif, nous avons mis au point des méthodes pour diminuer les fluctuations expérimentales. Nous avons en effet cherché à systématiser au maximum nos expérimentations et à utiliser les méthodes les plus sensibles et précises possibles. Pour cela, nous avons, par exemple, utilisé pour le dosage des cytokines une méthode très performante (la méthode multiplex) associée à une plaque Drop Array et ceci en dosant simultanément tous les prélèvements. Nous avons également eu recours à des systèmes de coloration immunohistochimiques automatiques pour l'analyse des lames d'encéphale. Enfin la numérisation et l'analyse d'images via un programme informatique a permis de mesurer les différents paramètres sur l'ensemble de chaque lame (plusieurs milliers de fibres musculaires par cheval et plusieurs centimètres-carrés de tissu cérébral par région) de façon précise et totalement reproductible.

Cette stratégie a, semble-t-il, été payante pour l'analyse du tissu cérébral puisqu'elle a permis de mettre en évidence plusieurs différences significatives.

Une des limites majeures pour l'interprétation de nombreux résultats est la forte variation de la durée d'évolution et donc de la durée du sepsis (beaucoup plus difficile à déterminer). Cette contrainte est présente dans la plupart des études cliniques mais dans le cas des études cliniques vétérinaires, elle est compliquée par l'euthanasie. En effet, dans notre étude la mort des chevaux a, presque exclusivement, été décidée par les propriétaires et ce pour des raisons multiples (pronostiques, financières, éthiques, ...). Ce point diffère totalement dans les études humaines dans lesquelles les patients meurent de mort naturelle. Ceci n'est pas non plus comparable aux études en laboratoire qui imposent que l'euthanasie des animaux soit décidée selon des critères physiologiques précis décidés au début de l'étude et nommés points de contrôle (température, fréquence cardiaque, score septique ou de douleur). Les données obtenues ici doivent donc être comparées avec celles des études chez l'homme ou la souris avec beaucoup de prudence. Cependant, l'euthanasie ne perturbe pas la comparaison entre nos deux groupes puisque ce procédé est aussi bien utilisé dans le groupe contrôle que dans le groupe septique.

Notre cohorte ne présente cependant que des sepsis à point de départ abdominal, tout comme le « gold-standard » des modèles expérimentaux que représente le modèle de ligature-ponction du cæcum chez la souris. Or, plus de la moitié des sepsis chez l'homme est causée par des infections pulmonaires avec un taux de mortalité d'environ 30%, les sepsis digestifs quant à eux représentent environ un tiers des sepsis pour une mortalité un peu moindre (440).

## IV. Perspectives

Les arguments cliniques et expérimentaux s'accumulent en faveur du développement de sepsis lors d'affections abdominales aiguës chez le cheval. Cependant beaucoup reste encore à comprendre. Les pathogènes impliqués dans ce cas de figure sont encore très méconnus. Nous n'avons malheureusement pas pu réaliser une étude bactériologique chez les chevaux de notre cohorte mais un dosage d'endotoxine et d'acide ribonucléique ribosomal bactérien 16S seront effectués et complétés par un profilage génétique des souches retrouvées. Une étude complète des portes d'entrée de sepsis chez le cheval ainsi que la détermination des souches bactériennes et leur profil de résistance permettrait une grande avancée pour la médecine équine tant ce domaine s'est prouvé essentiel en médecine humaine. Les données récoltées pourraient notamment être la base de recommandations en termes de thérapie antibiotique dans le but de lutter contre l'antibiorésistance et améliorer le pronostic des chevaux septiques.

Les scores de défaillance organique méritent d'être améliorés et validés sur des études multicentriques à grande échelle pour assurer de leur valeur diagnostique et pronostique.

La réponse immunitaire du cheval au cours du sepsis devrait être investiguée plus en profondeur. Nous allons compléter nos données par le dosage de marqueurs de l'inflammation comme la SAA, mais une étude des altérations des cellules de l'immunité et de la cinétique de la production de cytokines serait à envisager.

Les conséquences à long terme du sepsis chez le cheval sont totalement inconnues. Le suivi médical et sportif d'une cohorte de survivants pourrait répondre à la question de l'existence de séquelles chez ces animaux. Associer une telle étude à l'élaboration de tests comportementaux équivalents à ceux utilisés chez la souris permettrait d'améliorer notre compréhension du fonctionnement du système nerveux équin et de ses dysfonctionnements.

Les premiers résultats sur la réactivité microgliale incitent à explorer le niveau et la modulation de la neuro-inflammation au cours du sepsis chez le cheval. La variation marquée de TNF $\alpha$  obtenue dans la cohorte incite à explorer les voies de nécrose et d'apoptose neuronale dans les différentes régions de l'encéphale, en particulier dans les zones où la microglie a présenté une réactivité. L'analyse morphologique utilisée pour la cellule microgliale est en cours de transposition sur un autre effecteur cellulaire participant aux voies de la neuro-inflammation : l'astrocyte. Le multiplex équin pourrait également être utilisé pour doser les cytokines et chémokines dans certaines régions encéphaliques, et corrélérer des signes de morphologie de

neuro-inflammation à une production locale effectrice de médiateurs de l'inflammation. Les modifications morphologiques des cellules microgliales doivent également être précisées peut-être avec d'autres outils comme le logiciel Acapella® (Perkin Elmer) pour la quantification de paramètres comme la surface cytoplasmique, le nombre de branches et de nœuds ou la complexité des branches.

Il est malheureusement difficile de mettre en évidence une altération de la BHE dans notre groupe septique, en raison de l'utilisation d'embupramide pour l'euthanasie des animaux. L'embupramide est un produit soluble au fort pouvoir nécrosant, susceptible entraîner une altération de la BHE.

Les dysfonctionnements neuronaux et l'excitotoxicité sont plus difficiles à étudier sur des prélèvements post-mortem mais l'utilisation du marqueur c-FOS ou le dosage sanguin des acides aminés toxiques pourrait donner d'importantes informations.

Pour détecter les altérations du tissu musculaire, des investigations complémentaires sur le fonctionnement cellulaire et les voies de signalisation activées par le sepsis seront nécessaires. Les modifications du métabolisme protéique peuvent être investiguées en étudiant le protéome et le transcriptome des fibres musculaires.

Des modifications du métabolisme énergétique et des lésions mitochondriales sont également précurseurs de dysfonctionnement à l'échelle du tissu. L'évaluation de la masse mitochondriale peut se faire à l'aide de marqueur tels que TOM22 et permettrait de compléter l'analyse du métabolisme musculaire. D'autres techniques comme la microscopie optique non linéaire pour mettre en évidence l'auto-fluorescence du NADH, pourrait permettre l'évaluation du métabolisme oxydatif. De façon plus complète il est possible de s'intéresser spécifiquement au fonctionnement des différents complexes de la chaîne respiratoire en étudiant l'activité mitochondriale. Les altérations du métabolisme sont fortement liées au stress oxydatif qui peut être mesuré à travers l'activité de l'iNOS ou le dosage de la nitration des protéines.

Les capacités de régénération du muscle sont aussi susceptibles d'être impactées sans entraîner de modifications morphologiques visibles. L'évaluation des cellules satellites dont le fonctionnement est altéré par le sepsis dans les modèles murins et chez l'homme est aussi une piste qui mérite d'être investiguée. Les cellules satellites des chevaux de cette cohorte ont été isolées et congelées pour permettre cette évaluation.



# CONCLUSION

La recherche sur le sepsis souffre à l'heure actuelle d'un défaut de modélisation animale susceptible de recréer l'ensemble de la physiopathologie complexe de cette affection, et autorisant une transposition réussie des solutions thérapeutiques à l'homme.

Ce projet de recherche a permis de mettre en évidence une piste de modélisation intéressante, ne faisant pas appel à une induction expérimentale du sepsis mais à l'étude d'une évolution spontanée de celui-ci lors d'un syndrome de douleur abdominal équin, ayant un point de départ intestinal. Les investigations se sont concentrées sur les modifications neuromusculaires induites lors de sepsis susceptibles de mener à des séquelles.

Les modifications cliniques et cytokiniques ainsi que les signes d'activation microgliale montrent la cohérence de ce modèle avec les données de la littérature. Les altérations musculaires et neurologiques restent à préciser pour rechercher les altérations plus fines qui peuvent être observées dans d'autres modèles. Mais on peut supposer que la diversité de ce modèle comme tous les modèles spontanés le rend beaucoup plus transposable à l'homme. Ce travail, comme d'autres travaux récents, place l'animal domestique en position de modèle pour une maladie humaine. Cette vision moderne de la recherche donne un nouveau rôle à la médecine vétérinaire et offre de nombreux avantages pour le développement efficace d'une santé globale.



# Bibliographie

1. Journée mondiale de lutte contre le sepsis [Internet]. [cité 16 mai 2018]. Disponible sur: <http://journee-mondiale-sepsis.com>
2. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*. 2003;348(16):1546–1554.
3. Rodríguez F, Barrera L, De La Rosa G, Dennis R, Dueñas C, Granados M, et al. The epidemiology of sepsis in Colombia: a prospective multicenter cohort study in ten university hospitals. *Crit Care Med*. juill 2011;39(7):1675-82.
4. Kaukonen K-M, Bailey M, Suzuki S, Pilcher D, Bellomo R. Mortality Related to Severe Sepsis and Septic Shock Among Critically Ill Patients in Australia and New Zealand, 2000-2012. *JAMA*. 2 avr 2014;311(13):1308-16.
5. Kenney EM, Rozanski EA, Rush JE, deLaforcade-Buress AM, Berg JR, Silverstein DC, et al. Association between outcome and organ system dysfunction in dogs with sepsis: 114 cases (2003–2007). *J Am Vet Med Assoc*. 1 janv 2010;236(1):83-7.
6. Arroyo MG, Slovis NM, Moore GE, Taylor SD. Factors Associated with Survival in 97 Horses with Septic Pleuropneumonia. *J Vet Intern Med*. 2017;31(3):894-900.
7. Maley JH, Mikkelsen ME. Short-term Gains with Long-term Consequences: The Evolving Story of Sepsis Survivorship. *Clin Chest Med*. 1 juin 2016;37(2):367-80.
8. Rittirsch D, Hoesel LM, Ward PA. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J Leukoc Biol*. oct 2006;81(1):137–143.
9. Rasid O, Cavaillon J-M. Recent developments in severe sepsis research: from bench to bedside and back. *Future Microbiol*. 2016;11(2):293-314.
10. Fink MP. Animal models of sepsis. *Virulence*. 1 janv 2014;5(1):143-53.
11. Leppik IE, Patterson EN, Coles LD, Craft EM, Cloyd JC. Canine Status Epilepticus: A Translational Platform for Human Therapeutic Trials. *Epilepsia*. oct 2011;52(Suppl 8):31-4.
12. Khanna C, London C, Vail D, Mazcko C, Hirschfeld S. Guiding the Optimal Translation of New Cancer Treatments From Canine to Human Cancer Patients. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 sept 2009;15(18):5671-7.
13. Hall KE, Sharp CR, Adams CR, Beilman G. A novel trauma model: naturally occurring canine trauma. *Shock Augusta Ga*. janv 2014;41(1):25-32.
14. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 23 févr 2016;315(8):801-10.

15. Angus DC, van der Poll T. Severe Sepsis and Septic Shock. *N Engl J Med.* août 2013;369(9):840–851.
16. Deutschman CS, Tracey KJ. Sepsis: Current Dogma and New Perspectives. *Immunity.* avr 2014;40(4):463–475.
17. Singer M, Santis VD, Vitale D, Jeffcoate W. Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation. *The Lancet.* août 2004;364(9433):545–548.
18. Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H, Martin C, Goodman S, Artigas A, et al. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Med.* févr 2002;28(2):108-21.
19. Gray A, Ward K, Lees F, Dewar C, Dickie S, McGuffie C, et al. The epidemiology of adults with severe sepsis and septic shock in Scottish emergency departments. *Emerg Med J.* 1 mai 2013;30(5):397-401.
20. Levy MM, Rhodes A, Phillips GS, Townsend SR, Schorr CA, Beale R, et al. Surviving Sepsis Campaign: association between performance metrics and outcomes in a 7.5-year study. *Crit Care Med.* janv 2015;43(1):3-12.
21. Vincent J-L, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, et al. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med.* févr 2006;34(2):344-53.
22. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.* juill 2001;29(7):1303-10.
23. Shuster R, Traub-Dargatz J, Baxter G. Survey of diplomates of the American College of Veterinary Internal Medicine and the American College of Veterinary Surgeons regarding clinical aspects and treatment of endotoxemia in horses. *J Am Vet Med Assoc.* janv 1997;210(1):87–92.
24. Senior JM, Proudman CJ, Leuwer M, Carter SD. Plasma endotoxin in horses presented to an equine referral hospital: Correlation to selected clinical parameters and outcomes: Plasma endotoxin in horses: Correlation to clinical parameters and outcomes. *Equine Vet J.* sept 2011;43(5):585-91.
25. Martin GS. Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. *Expert Rev Anti Infect Ther.* juin 2012;10(6):701-6.
26. Berkley JA, Maitland K, Mwangi I, Ngetsa C, Mwarumba S, Lowe BS, et al. Use of clinical syndromes to target antibiotic prescribing in seriously ill children in malaria endemic area: observational study. *BMJ.* 30 avr 2005;330(7498):995.
27. Kumalo A, Kassa T, S/Mariam Z, Daka D, Tadesse A. Bacterial Profile of Adult Sepsis and their Antimicrobial Susceptibility Pattern at Jimma University Specialized Hospital, South West Ethiopia. *Health Sci J [Internet].* 10 mars 2016 [cité 26 juin 2018];10(2). Disponible sur : <http://www.hsj.gr/abstract/bacterial-profile-of-adult-sepsis-and-their-antimicrobial->



susceptibility-pattern-at-jimma-university-specialized-hospital-south-west-ethiopia-8707.html

28. Bataar O, Khuderchuluun C, Lundeg G, Chimeddorj S, Brunauer A, Gradwohl-Matis I, et al. Rate and pattern of antibiotic resistance in microbiological cultures of sepsis patients in a low-middle-income country's ICU. *Middle East J Anaesthesiol.* 2013;22(3):293–300.
29. Johns I, Tennent-Brown B, Schaer BD, Southwood L, Boston R, Wilkins P. Blood culture status in mature horses with diarrhoea: a possible association with survival. *Equine Vet J.* févr 2009;41(2):160-4.
30. MacFie J, Reddy BS, Gatt M, Jain PK, Sowdi R, Mitchell CJ. Bacterial translocation studied in 927 patients over 13 years. *Br J Surg.* janv 2006;93(1):87-93.
31. Hollis AR, Wilkins PA, Palmer JE, Boston RC. Bacteremia in Equine Neonatal Diarrhea: A Retrospective Study (1990–2007). *J Vet Intern Med.* 22(5):1203-9.
32. Constable PD. Antimicrobial Use in the Treatment of Calf Diarrhea. *J Vet Intern Med.* 18(1):8-17.
33. Turk J, Miller M, Brown T, Fales W, Fischer J, Gosser H, et al. Coliform septicemia and pulmonary disease associated with canine parvoviral enteritis: 88 cases (1987-1988). *J Am Vet Med Assoc.* 1 mars 1990;196(5):771-3.
34. Deutschman CS, Tracey KJ. Sepsis: Current Dogma and New Perspectives. *Immunity.* 17 avr 2014;40(4):463-75.
35. Owen JA, Punt J, Stranford S. Immunologie: Le cours de Janis Kuby avec questions de révision [Internet]. 2014 [cité 20 juill 2018]. Disponible sur: <http://sbiproxy.uqac.ca/login?url=http://international.scholarvox.com/book/88820754>
36. Cavaillon J-M. Exotoxins and endotoxins: Inducers of inflammatory cytokines. *Toxicon* [Internet]. 19 oct 2017; Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010117303136>
37. Horvath GL, Schrum JE, De Nardo CM, Latz E. Intracellular sensing of microbes and danger signals by the inflammasomes. *Immunol Rev.* sept 2011;243(1):119-35.
38. Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol* [Internet]. juin 2013 [cité 13 juill 2018];13(6). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3807999/>
39. Adib-Conquy M, Cavaillon J-M. Réponse inflammatoire et anti-inflammatoire de l'hôte au cours du sepsis. *Pathol Biol.* oct 2012;60(5):306–313.
40. Fong YM, Marano MA, Moldawer LL, Wei H, Calvano SE, Kenney JS, et al. The acute splanchnic and peripheral tissue metabolic response to endotoxin in humans. *J Clin Invest.* juin 1990;85(6):1896-904.
41. Taveira da Silva AM, Kaulbach HC, Chuidian FS, Lambert DR, Suffredini AF, Danner RL. Brief report: shock and multiple-organ dysfunction after self-administration of Salmonella endotoxin. *N Engl J Med.* 20 mai 1993;328(20):1457-60.

42. Cavaillon JM, Munoz C, Fitting C, Misset B, Carlet J. Circulating cytokines: the tip of the iceberg? *Circ Shock*. oct 1992;38(2):145-52.
43. Munoz C, Misset B, Fitting C, Blériot J-P, Jean-Carlet, Cavaillon J-M. Dissociation between plasma and monocyte-associated cytokines during sepsis. *Eur J Immunol*. 21(9):2177-84.
44. Marie C, Fitting C, Cheval C, Losser MR, Carlet J, Payen D, et al. Presence of high levels of leukocyte-associated interleukin-8 upon cell activation and in patients with sepsis syndrome. *Infect Immun*. mars 1997;65(3):865-71.
45. Cavaillon J, Adib-conquy M, Fitting C, Adrie C, Payen D. Cytokine Cascade in Sepsis. *Scand J Infect Dis*. 1 janv 2003;35(9):535-44.
46. Cavaillon JM, Adib-Conquy M, Cloëz-Tayarani I, Fitting C. Immunodepression in sepsis and SIRS assessed by ex vivo cytokine production is not a generalized phenomenon: a review. *J Endotoxin Res*. 2001;7(2):85-93.
47. Munford RS, Pugin J. Normal Responses to Injury Prevent Systemic Inflammation and Can Be Immunosuppressive. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 févr 2001;163(2):316-21.
48. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. déc 2013;13(12):862-74.
49. Bozza FA, Salluh JI, Japiassu AM, Soares M, Assis EF, Gomes RN, et al. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit Care*. 2007;11(2):R49.
50. Beeson PB. Development of tolerance to typhoid bacterial pyrogen and its abolition by reticulo-endothelial blockade. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N*. mars 1946;61:248-50.
51. Cavaillon J-M. The nonspecific nature of endotoxin tolerance. *Trends Microbiol*. 1 août 1995;3(8):320-4.
52. Mathison JC, Virca GD, Wolfson E, Tobias PS, Glaser K, Ulevitch RJ. Adaptation to bacterial lipopolysaccharide controls lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in rabbit macrophages. *J Clin Invest*. avr 1990;85(4):1108-18.
53. Rayhane N, Fitting C, Lortholary O, Dromer F, Cavaillon J-M. Administration of Endotoxin Associated with Lipopolysaccharide Tolerance Protects Mice against Fungal Infection. *Infect Immun*. juin 2000;68(6):3748-53.
54. Munoz C, Carlet J, Fitting C, Misset B, Blériot JP, Cavaillon JM. Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest*. nov 1991;88(5):1747-54.
55. Cavaillon J-M, Adib-Conquy M. Bench-to-bedside review: Endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit Care*. 2006;10(5):233.
56. Cavaillon J-M, Adrie C, Fitting C, Adib-Conquy M. Reprogramming of circulatory cells in sepsis and SIRS. *J Endotoxin Res*. 2005;11(5):311-20.

57. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med.* 1 juill 1999;27(7):1230-51.
58. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Schmiege RE, Hui JJ, Chang KC, et al. Sepsis-Induced Apoptosis Causes Progressive Profound Depletion of B and CD4+ T Lymphocytes in Humans. *J Immunol.* 1 juin 2001;166(11):6952-63.
59. Boomer JS, To K, Chang KC, Takasu O, Osborne DF, Walton AH, et al. Immunosuppression in Patients Who Die of Sepsis and Multiple Organ Failure. *Jama.* déc 2011;306(23):2594–2605.
60. Torgersen C, Moser P, Luckner G, Mayr V, Jochberger S, Hasibeder WR, et al. Macroscopic Postmortem Findings in 235 Surgical Intensive Care Patients with Sepsis. *Anesth Analg.* juin 2009;108(6):1841.
61. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis.* mars 2013;13(3):260-8.
62. Cavaillon J-M, Annane D. Compartmentalization of the inflammatory response in sepsis and SIRS. *J Endotoxin Res.* 1 juin 2006;12(3):151-70.
63. Hauser CJ, Lagoo S, Lagoo A, Hale E, Hardy KJ, Barber WH, et al. Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Gene Expression in Human Peritoneal Macrophages Is Suppressed by Extra-abdominal Trauma. *Arch Surg.* 1 nov 1995;130(11):1186-92.
64. Shenkar R, Coulson WF, Abraham E. Hemorrhage and resuscitation induce alterations in cytokine expression and the development of acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1 mars 1994;10(3):290-7.
65. Friedland JS, Suputtamongkol Y, Remick DG, Chaowagul W, Strieter RM, Kunkel SL, et al. Prolonged elevation of interleukin-8 and interleukin-6 concentrations in plasma and of leukocyte interleukin-8 mRNA levels during septicemic and localized *Pseudomonas pseudomallei* infection. *Infect Immun.* juin 1992;60(6):2402-8.
66. Byerley LO, Alcock NW, Starnes HF. Sepsis-induced cascade of cytokine mRNA expression: correlation with metabolic changes. *Am J Physiol-Endocrinol Metab.* 1 mai 1992;262(5):E728-35.
67. Tannahill CL, Fukuzuka K, Marum T, Abouhamze Z, MacKay SL, Copeland EM, et al. Discordant tumor necrosis factor- $\alpha$  superfamily gene expression in bacterial peritonitis and endotoxemic shock. *Surgery.* août 1999;126(2):349-57.
68. Yeh CL, Hsu C-S, Yeh S-L, Chen W-J. Dietary glutamine supplementation modulates Th1/Th2 cytokine and interleukin-6 expressions in septic mice. *Cytokine.* 7 sept 2005;31(5):329-34.
69. Sharshar T, Gray F, Grandmaison GL de la, Hopkinson NS, Ross E, Dorandeu A, et al. Apoptosis of neurons in cardiovascular autonomic centres triggered by inducible nitric oxide synthase after death from septic shock. *The Lancet.* 29 nov 2003;362(9398):1799-805.

70. Waage A, Halstensen A, Shalaby R, Brandtzaeg P, Kierulf P, Espevik T. Local production of tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and interleukin 6 in meningococcal meningitis. Relation to the inflammatory response. *J Exp Med*. 1 déc 1989;170(6):1859-67.
71. Olszyna DP, Opal SM, Prins JM, Horn DL, Speelman P, Deventer V, et al. Chemotactic Activity of CXC Chemokines Interleukin-8, Growth-Related Oncogene— $\alpha$ , and Epithelial Cell—Derived Neutrophil-Activating Protein—78 in Urine of Patients with Urosepsis. *J Infect Dis*. 1 déc 2000;182(6):1731-7.
72. Deitch EA, Xu D, Franko L, Ayala A, Chaudry IH. Evidence favoring the role of the gut as a cytokine-generating organ in rats subjected to hemorrhagic shock. *Shock* Augusta Ga. févr 1994;1(2):141-5.
73. Rivera-Chavez FA, Wheeler H, Lindberg G, Munford RS, O'Keefe GE. Regional and Systemic Cytokine Responses to Acute Inflammation of the Vermiform Appendix. *Ann Surg*. mars 2003;237(3):408-16.
74. Douzinas EE, Tsidemiadou PD, Pitaridis MT, Andrianakis I, Bobota-Chloraki A, Katsouyanni K, et al. The regional production of cytokines and lactate in sepsis-related multiple organ failure. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 janv 1997;155(1):53-9.
75. Frangogiannis NG, Lindsey ML, Michael LH, Youker KA, Bressler RB, Mendoza LH, et al. Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF-alpha, initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation*. 18 août 1998;98(7):699-710.
76. Kolaczowska E, Seljelid R, Plytycz B. Role of mast cells in zymosan-induced peritoneal inflammation in Balb/c and mast cell-deficient WBB6F1 mice. *J Leukoc Biol*. 1 janv 2001;69(1):33-42.
77. Kanwar S, Kubes P. Mast cells contribute to ischemia-reperfusion-induced granulocyte infiltration and intestinal dysfunction. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol*. 1 août 1994;267(2):G316-21.
78. Schmauder-Chock EA, Chock SP, Patchen ML. Ultrastructural localization of tumour necrosis factor-alpha. *Histochem J*. févr 1994;26(2):142-51.
79. Echtenacher B, Männel DN, Hültner L. Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature*. mai 1996;381(6577):75-7.
80. Malaviya R, Ikeda T, Ross E, Abraham SN. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF- $\alpha$ . *Nature*. mai 1996;381(6577):77-80.
81. Marie C, Lossier M-R, Fitting C, Kermarrec N, Payen D, Cavaillon J-M. Cytokines and Soluble Cytokine Receptors in Pleural Effusions from Septic and Nonseptic Patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 nov 1997;156(5):1515-22.
82. Akalin H, Akdiş AC, Mistik R, Helvacı S, Kiliçturgay K. Cerebrospinal fluid interleukin-1 beta/interleukin-1 receptor antagonist balance and tumor necrosis factor-alpha concentrations in tuberculous, viral and acute bacterial meningitis. *Scand J Infect Dis*. 1994;26(6):667-74.

83. Cominelli F, Bortolami M, Pizarro TT, Monsacchi L, Ferretti M, Brewer MT, et al. Rabbit interleukin-1 receptor antagonist. Cloning, expression, functional characterization, and regulation during intestinal inflammation. *J Biol Chem.* 3 avr 1994;269(9):6962-71.
84. Olszyna DP, Prins JM, Buis B, van Deventer SJH, Speelman P, van der Poll T. Levels of Inhibitors of Tumor Necrosis Factor Alpha and Interleukin 1 $\beta$  in Urine and Sera of Patients with Urosepsis. *Infect Immun.* août 1998;66(8):3527-34.
85. Suter PM, Suter S, Girardin E, Roux-Lombard P, Grau GE, Dayer J-M. High Bronchoalveolar Levels of Tumor Necrosis Factor and Its Inhibitors, Interleukin-1, Interferon, and Elastase, in Patients with Adult Respiratory Distress Syndrome after Trauma, Shock, or Sepsis. *Am Rev Respir Dis.* 1 mai 1992;145(5):1016-22.
86. Dugernier TL, Laterre P-F, Wittebole X, Roeseler J, Latinne D, Reynaert MS, et al. Compartmentalization of the Inflammatory Response during Acute Pancreatitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 juill 2003;168(2):148-57.
87. Cavaillon J-M. "Septic Plasma". *Am J Respir Crit Care Med.* 1 déc 2002;166(11):1417-8.
88. Chinnaiyan AM, Huber-Lang M, Kumar-Sinha C, Barrette TR, Shankar-Sinha S, Sarma VJ, et al. Molecular Signatures of Sepsis. *Am J Pathol.* oct 2001;159(4):1199-209.
89. Kadokami T, McTiernan CF, Kubota T, Frye CS, Bounoutas GS, Robbins PD, et al. Effects of soluble TNF receptor treatment on lipopolysaccharide-induced myocardial cytokine expression. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol.* 1 mai 2001;280(5):H2281-91.
90. Stanley E, Lieschke GJ, Grail D, Metcalf D, Hodgson G, Gall JA, et al. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-deficient mice show no major perturbation of hematopoiesis but develop a characteristic pulmonary pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 7 juin 1994;91(12):5592-6.
91. Bozinovski S, Jones J, Beavitt S-J, Cook AD, Hamilton JA, Anderson GP. Innate immune responses to LPS in mouse lung are suppressed and reversed by neutralization of GM-CSF via repression of TLR-4. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol.* 1 avr 2004;286(4):L877-85.
92. Hudson LD, Milberg JA, Anardi D, Maunder RJ. Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 févr 1995;151(2):293-301.
93. Bernard GR, Vincent J-L, Laterre P-F, LaRosa SP, Dhainaut J-F, Lopez-Rodriguez A, et al. Efficacy and Safety of Recombinant Human Activated Protein C for Severe Sepsis [Internet]. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM200103083441001>. 2009 [cité 13 août 2018]. Disponible sur: [https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJM200103083441001?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3Dwww.ncbi.nlm.nih.gov](https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJM200103083441001?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dwww.ncbi.nlm.nih.gov)
94. Group TES. EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. *Intensive Care Med.* 1 avr 2004;30(4):580-8.
95. Wada K, Montalto MC, Stahl GL. Inhibition of complement C5 reduces local and remote organ injury after intestinal ischemia/reperfusion in the rat. *Gastroenterology.* janv 2001;120(1):126-33.

96. Klausner JM, Paterson IS, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Leukotrienes but not complement mediate limb ischemia-induced lung injury. *Ann Surg.* avr 1989;209(4):462-70.
97. Sir O, Fazal N, Choudhry MA, Goris RJ, Gamelli RL, Sayeed MM. Role of neutrophils in burn-induced microvascular injury in the intestine. *Shock Augusta Ga.* août 2000;14(2):113-7.
98. Parsey MV, Tuder RM, Abraham E. Neutrophils Are Major Contributors to Intraparenchymal Lung IL-1 $\beta$  Expression After Hemorrhage and Endotoxemia. *J Immunol.* 15 janv 1998;160(2):1007-13.
99. Miyazaki Y, Inoue T, Kyi M, Sawada M, Miyake S, Yoshizawa Y. Effects of a Neutrophil Elastase Inhibitor (ONO-5046) on Acute Pulmonary Injury Induced by Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF  $\alpha$ ) and Activated Neutrophils in Isolated Perfused Rabbit Lungs. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 janv 1998;157(1):89-94.
100. Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature* [Internet]. 19 déc 2002 [cité 13 août 2018]; Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/nature01321>
101. Elenkov IJ, Papanicolaou DA, Wilder RL, Chrousos GP. Modulatory effects of glucocorticoids and catecholamines on human interleukin-12 and interleukin-10 production: clinical implications. *Proc Assoc Am Physicians.* sept 1996;108(5):374-81.
102. Christensen JD, Hansen EW, Frederiksen C, Møllris M, Moesby L. Adrenaline influences the release of interleukin-6 from murine pituicytes: role of  $\beta$ 2-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol.* 28 juill 1999;378(1):143-8.
103. Chrousos GP. The Hypothalamic–Pituitary–Adrenal Axis and Immune-Mediated Inflammation. *N Engl J Med.* 18 mai 1995;332(20):1351-63.
104. Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature.* mai 2000;405(6785):458-62.
105. Romanovsky AA. Thermoregulatory manifestations of systemic inflammation: lessons from vagotomy. *Auton Neurosci Basic Clin.* 20 déc 2000;85(1):39-48.
106. Hansen MK, O'Connor KA, Goehler LE, Watkins LR, Maier SF. The contribution of the vagus nerve in interleukin-1 $\beta$ -induced fever is dependent on dose. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol.* 1 avr 2001;280(4):R929-34.
107. Berthoud H-R, Neuhuber WL. Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. *Auton Neurosci Basic Clin.* 20 déc 2000;85(1):1-17.
108. Chrousos GP. The stress response and immune function: clinical implications. The 1999 Novera H. Spector Lecture. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;917:38-67.
109. Richter DC, Heininger A, Brenner T, Hochreiter M, Bernhard M, Briegel J, et al. Bacterial sepsis. *Anaesthesist* [Internet]. 30 janv 2018 [cité 21 août 2018]; Disponible sur: <https://doi.org/10.1007/s00101-017-0396-z>

110. Sterling SA, Miller WR, Pryor J, Puskarich MA, Jones AE. The Impact of Timing of Antibiotics on Outcomes in Severe Sepsis and Septic Shock: A Systematic Review and Meta-analysis. *Crit Care Med.* sept 2015;43(9):1907-15.
111. Bloos F, Thomas-Rüddel D, Rüddel H, Engel C, Schwarzkopf D, Marshall JC, et al. Impact of compliance with infection management guidelines on outcome in patients with severe sepsis: a prospective observational multi-center study. *Crit Care.* 2014;18(2):R42.
112. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Med.* 1 mars 2017;43(3):304-77.
113. Kollef MH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ. Inadequate Antimicrobial Treatment of Infections: A Risk Factor for Hospital Mortality Among Critically Ill Patients. *CHEST.* 1 févr 1999;115(2):462-74.
114. Bloos F, Rüddel H, Thomas-Rüddel D, Schwarzkopf D, Pausch C, Harbarth S, et al. Effect of a multifaceted educational intervention for anti-infectious measures on sepsis mortality: a cluster randomized trial. *Intensive Care Med.* 1 nov 2017;43(11):1602-12.
115. Vincent J-L, Bassetti M, François B, Karam G, Chastre J, Torres A, et al. Advances in antibiotic therapy in the critically ill. *Crit Care* [Internet]. 2016 [cité 3 sept 2018];20. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4869332/>
116. Kumar A, Kethireddy S. Emerging concepts in optimizing antimicrobial therapy of septic shock: speed is life but a hammer helps too. *Crit Care.* 2013;17(1):104.
117. Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med.* juin 2006;34(6):1589-96.
118. Iscimen R, Cartin-Ceba R, Yilmaz M, Khan H, Hubmayr RD, Afessa B, et al. Risk factors for the development of acute lung injury in patients with septic shock: An observational cohort study\*: *Crit Care Med.* mai 2008;36(5):1518-22.
119. Garnacho-Montero J, Aldabo-Pallas T, Garnacho-Montero C, Cayuela A, Jiménez R, Barroso S, et al. Timing of adequate antibiotic therapy is a greater determinant of outcome than are TNF and IL-10 polymorphisms in patients with sepsis. *Crit Care.* 2006;10(4):R111.
120. Bagshaw SM, Lapinsky S, Dial S, Arabi Y, Dodek P, Wood G, et al. Acute kidney injury in septic shock: clinical outcomes and impact of duration of hypotension prior to initiation of antimicrobial therapy. *Intensive Care Med.* 1 mai 2009;35(5):871-81.
121. Singer M. Antibiotics for Sepsis: Does Each Hour Really Count, or Is It Incestuous Amplification? *Am J Respir Crit Care Med.* 15 mai 2017;196(7):800-2.
122. Doron S, Davidson LE. Antimicrobial Stewardship. *Mayo Clin Proc.* nov 2011;86(11):1113-23.
123. Jong E de, Oers JA van, Beishuizen A, Vos P, Vermeijden WJ, Haas LE, et al. Efficacy and safety of procalcitonin guidance in reducing the duration of antibiotic treatment in

critically ill patients: a randomised, controlled, open-label trial. *Lancet Infect Dis.* 1 juill 2016;16(7):819-27.

124. Shafiq N, Gautam V, Pandey AK, Kaur N, Garg S, Negi H, et al. A meta-analysis to assess usefulness of procalcitonin-guided antibiotic usage for decision making. *Indian J Med Res.* nov 2017;146(5):576-84.
125. Ziegler EJ, Fisher CJJ, Sprung CL, Straube RC, Sadoff JC, Foulke GE, et al. Treatment of Gram-Negative Bacteremia and Septic Shock with HA-1A Human Monoclonal Antibody against Endotoxin. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199102143240701> [Internet]. 14 janv 2010 [cité 3 sept 2018]; Disponible sur: [https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJM199102143240701?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3Dwww.ncbi.nlm.nih.gov](https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJM199102143240701?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dwww.ncbi.nlm.nih.gov)
126. Cruz DN, Antonelli M, Fumagalli R, Foltran F, Brienza N, Donati A, et al. Early Use of Polymyxin B Hemoperfusion in Abdominal Septic Shock: The EUPHAS Randomized Controlled Trial. *JAMA.* 17 juin 2009;301(23):2445-52.
127. Payen DM, Guilhot J, Launey Y, Lukaszewicz AC, Kaaki M, Veber B, et al. Early use of polymyxin B hemoperfusion in patients with septic shock due to peritonitis: a multicenter randomized control trial. *Intensive Care Med.* 2015;41(6):975-84.
128. Iba T, Fowler L. Is polymyxin B-immobilized fiber column ineffective for septic shock? A discussion on the press release for EUPHRATES trial. *J Intensive Care* [Internet]. 3 juill 2017 [cité 3 sept 2018];5. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5496228/>
129. Sprung CL, Caralis PV, Marcial EH, Pierce M, Gelbard MA, Long WM, et al. The Effects of High-Dose Corticosteroids in Patients with Septic Shock. *N Engl J Med.* 1 nov 1984;311(18):1137-43.
130. Annane D, Bellissant E, Bollaert PE, Briegel J, Keh D, Kupfer Y. Corticosteroids for treating sepsis. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 2015 [cité 3 sept 2018];(12). Disponible sur: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD002243.pub3/abstract>
131. Bone RC, Fisher CJ, Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA, Balk RA. A Controlled Clinical Trial of High-Dose Methylprednisolone in the Treatment of Severe Sepsis and Septic Shock. *N Engl J Med.* 10 sept 1987;317(11):653-8.
132. Bernard GR, Wheeler AP, Russell JA, Schein R, Summer WR, Steinberg KP, et al. The effects of ibuprofen on the physiology and survival of patients with sepsis. The Ibuprofen in Sepsis Study Group. *N Engl J Med.* 27 mars 1997;336(13):912-8.
133. Fisher CJ, Dhainaut J-FA, Opal SM, Pribble JP, Balk RA, Slotman GJ, et al. Recombinant Human Interleukin 1 Receptor Antagonist in the Treatment of Patients With Sepsis Syndrome: Results From a Randomized, Double-blind, Placebo-Controlled Trial. *JAMA.* 15 juin 1994;271(23):1836-43.
134. Abraham E, Wunderink R, Silverman H, Perl TM, Nasraway S, Levy H, et al. Efficacy and Safety of Monoclonal Antibody to Human Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  in Patients With



- Sepsis Syndrome: A Randomized, Controlled, Double-blind, Multicenter Clinical Trial. *JAMA*. 22 mars 1995;273(12):934-41.
135. Abraham E, Laterre PF, Garbino J, Pingleton S, Butler T, Dugernier T, et al. Lenercept (p55 tumor necrosis factor receptor fusion protein) in severe sepsis and early septic shock: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter phase III trial with 1,342 patients. *Crit Care Med*. mars 2001;29(3):503-10.
  136. Heming N, Lamothe L, Ambrosi X, Annane D. Emerging drugs for the treatment of sepsis. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2 janv 2016;21(1):27-37.
  137. Venet F, Rimmelé T, Monneret G. Management of Sepsis-Induced Immunosuppression. *Crit Care Clin*. 1 janv 2018;34(1):97-106.
  138. Meisel C, Schefold JC, Pschowski R, Baumann T, Hetzger K, Gregor J, et al. Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor to Reverse Sepsis-associated Immunosuppression. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 oct 2009;180(7):640-8.
  139. Leentjens J, Kox M, Koch RM, Preijers F, Joosten LAB, van der Hoeven JG, et al. Reversal of Immunoparalysis in Humans In Vivo. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 nov 2012;186(9):838-45.
  140. Delano MJ, Ward PA. Sepsis-induced immune dysfunction: can immune therapies reduce mortality? *J Clin Invest*. janv 2016;126(1):23-31.
  141. Johnson RL, Wilson CG. A review of vagus nerve stimulation as a therapeutic intervention. *J Inflamm Res*. 16 mai 2018;11:203-13.
  142. Russell JA, Rush B, Boyd J. Pathophysiology of Septic Shock. *Crit Care Clin*. 1 janv 2018;34(1):43-61.
  143. Angus DC, van der Poll T. Severe Sepsis and Septic Shock. *N Engl J Med*. 29 août 2013;369(9):840-51.
  144. Cobb JP, Danner RL. Nitric Oxide and Septic Shock. *JAMA*. 17 avr 1996;275(15):1192-6.
  145. Zardi EM, Zardi DM, Dobrina A, Afeltra A. Prostacyclin in sepsis: A systematic review. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 1 févr 2007;83(1):1-24.
  146. Araújo AV, Ferezin CZ, C. Pereira A de, Rodrigues GJ, Grando MD, Bonaventura D, et al. Augmented nitric oxide production and up-regulation of endothelial nitric oxide synthase during cecal ligation and perforation. *Nitric Oxide*. 30 juin 2012;27(1):59-66.
  147. Levy B, Fritz C, Tahon E, Jacquot A, Auchet T, Kimmoun A. Vasoplegia treatments: the past, the present, and the future. *Crit Care*. 27 févr 2018;22(1):52.
  148. Caironi P, Latini R, Struck J, Hartmann O, Bergmann A, Maggio G, et al. Circulating Biologically Active Adrenomedullin (bio-ADM) Predicts Hemodynamic Support Requirement and Mortality During Sepsis. *CHEST*. 1 août 2017;152(2):312-20.

149. Wagner K, Wachter U, Vogt JA, Scheuerle A, McCook O, Weber S, et al. Adrenomedullin binding improves catecholamine responsiveness and kidney function in resuscitated murine septic shock. *Intensive Care Med Exp* [Internet]. 29 oct 2013 [cité 5 sept 2018];1. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4796991/>
150. Dalsgaard T, Sonkusare SK, Teuscher C, Poynter ME, Nelson MT. Pharmacological inhibitors of TRPV4 channels reduce cytokine production, restore endothelial function and increase survival in septic mice. *Sci Rep* [Internet]. 22 sept 2016 [cité 5 sept 2018];6. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5031985/>
151. Opal SM, Poll T van der. Endothelial barrier dysfunction in septic shock. *J Intern Med*. 1 mars 2015;277(3):277-93.
152. Lv X, Wang H. Pathophysiology of sepsis-induced myocardial dysfunction. *Mil Med Res* [Internet]. 27 sept 2016 [cité 29 juill 2018];3. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5037896/>
153. Antonucci E, Fiaccadori E, Donadello K, Taccone FS, Franchi F, Scolletta S. Myocardial depression in sepsis: From pathogenesis to clinical manifestations and treatment. *J Crit Care*. 1 août 2014;29(4):500-11.
154. Delabranche X, Helms J, Meziani F. Immunohaemostasis: a new view on haemostasis during sepsis. *Ann Intensive Care* [Internet]. 2 déc 2017 [cité 4 sept 2018];7. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5712298/>
155. King EG, Bauzá GJ, Mella JR, Remick DG. Pathophysiologic mechanisms in septic shock. *Lab Invest J Tech Methods Pathol*. janv 2014;94(1):4-12.
156. Petäjä J. Inflammation and coagulation. An overview. *Thromb Res*. 1 janv 2011;127:S34-7.
157. Venkata C, Kashyap R, Farmer JC, Afessa B. Thrombocytopenia in adult patients with sepsis: incidence, risk factors, and its association with clinical outcome. *J Intensive Care* [Internet]. 30 déc 2013 [cité 6 sept 2018];1(1). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4373028/>
158. Camerer E, Kolstø A-B, Prydz H. Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. *Thromb Res*. 1 janv 1996;81(1):1-41.
159. White GC. The partial thromboplastin time: defining an era in coagulation. *J Thromb Haemost*. 1 nov 2003;1(11):2267-70.
160. Smith SA, Choi SH, Davis-Harrison R, Huyck J, Boettcher J, Reinstra CM, et al. Polyphosphate exerts differential effects on blood clotting, depending on polymer size. *Blood*. 18 nov 2010;116(20):4353-9.
161. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*. 5 mars 2004;303(5663):1532-5.
162. Noubouossie DF, Whelihan MF, Yu Y-B, Sparkenbaugh E, Pawlinski R, Monroe DM, et al. In vitro activation of coagulation by human neutrophil DNA and histone proteins but not neutrophil extracellular traps. *Blood*. 23 févr 2017;129(8):1021-9.

163. Ott I, Miyagi Y, Miyazaki K, Heeb MJ, Mueller BM, Rao LV, et al. Reversible regulation of tissue factor-induced coagulation by glycosyl phosphatidylinositol-anchored tissue factor pathway inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* mars 2000;20(3):874-82.
164. Jonge E de, Dekkers PEP, Creasey AA, Hack CE, Paulson SK, Karim A, et al. Tissue factor pathway inhibitor dose-dependently inhibits coagulation activation without influencing the fibrinolytic and cytokine response during human endotoxemia. *Blood.* 15 févr 2000;95(4):1124-9.
165. Levi M. New insights into pathways that determine the link between infection and thrombosis. 2012;70(3):7.
166. Danese S, Vetrano S, Zhang L, Poplis VA, Castellino FJ. The protein C pathway in tissue inflammation and injury: pathogenic role and therapeutic implications. *Blood.* 11 févr 2010;115(6):1121-30.
167. Levi M, van der Poll T. Endothelial injury in sepsis. *Intensive Care Med.* 1 oct 2013;39(10):1839-42.
168. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med.* 8 mars 2001;344(10):699-709.
169. Abraham E, Laterre P-F, Garg R, Levy H, Talwar D, Trzaskoma BL, et al. Drotrecogin alfa (activated) for adults with severe sepsis and a low risk of death. *N Engl J Med.* 29 sept 2005;353(13):1332-41.
170. Ranieri VM, Thompson BT, Barie PS, Dhainaut J-F, Douglas IS, Finfer S, et al. Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock. *N Engl J Med.* 31 mai 2012;366(22):2055-64.
171. Zeerleder S, Hack CE, Willemin WA. Disseminated Intravascular Coagulation in Sepsis. *CHEST.* 1 oct 2005;128(4):2864-75.
172. Pool R, Gomez H, Kellum JA. Mechanisms of Organ Dysfunction in Sepsis. *Crit Care Clin.* 1 janv 2018;34(1):63-80.
173. Takasu O, Gaut JP, Watanabe E, To K, Fagley RE, Sato B, et al. Mechanisms of cardiac and renal dysfunction in patients dying of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 mars 2013;187(5):509-17.
174. Lerolle N, Nochy D, Guérot E, Bruneval P, Fagon J-Y, Diehl J-L, et al. Histopathology of septic shock induced acute kidney injury: apoptosis and leukocytic infiltration. *Intensive Care Med.* 1 mars 2010;36(3):471-8.
175. De Backer D, Creteur J, Preiser J-C, Dubois M-J, Vincent J-L. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 juill 2002;166(1):98-104.
176. Goldman D, Bateman RM, Ellis CG. Effect of decreased O<sub>2</sub> supply on skeletal muscle oxygenation and O<sub>2</sub> consumption during sepsis: role of heterogeneous capillary spacing and blood flow. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol.* juin 2006;290(6):H2277–H2285.

177. Rajendram R, Prowle JR. Venous congestion: are we adding insult to kidney injury in sepsis? *Crit Care*. 2014;18(1):104.
178. Goddard CM, Allard MF, Hogg JC, Herbertson MJ, Walley KR. Prolonged leukocyte transit time in coronary microcirculation of endotoxemic pigs. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 1 oct 1995;269(4):H1389-97.
179. Wang Z, Holthoff JH, Seely KA, Pathak E, Spencer HJ, Gokden N, et al. Development of Oxidative Stress in the Peritubular Capillary Microenvironment Mediates Sepsis-Induced Renal Microcirculatory Failure and Acute Kidney Injury. *Am J Pathol*. févr 2012;180(2):505-16.
180. Schumacker PT, Chandel N, Agusti AG. Oxygen conformance of cellular respiration in hepatocytes. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol*. 1 oct 1993;265(4):L395-402.
181. Levy RJ, Piel DA, Acton PD, Zhou R, Ferrari VA, Karp JS, et al. Evidence of myocardial hibernation in the septic heart. *Crit Care Med*. déc 2005;33(12):2752-6.
182. Waltz P, Carchman E, Gomez H, Zuckerbraun B. Sepsis results in an altered renal metabolic and osmolyte profile. *J Surg Res*. 1 mai 2016;202(1):8-12.
183. Brealey D, Brand M, Hargreaves I, Heales S, Land J, Smolenski R, et al. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *The Lancet*. 20 juill 2002;360(9328):219-23.
184. Carré JE, Orban J-C, Re L, Felsmann K, Iffert W, Bauer M, et al. Survival in Critical Illness Is Associated with Early Activation of Mitochondrial Biogenesis. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 sept 2010;182(6):745-51.
185. Hsiao H-W, Tsai K-L, Wang L-F, Chen Y-H, Chiang P-C, Chuang S-M, et al. The decline of autophagy contributes to proximal tubular dysfunction during sepsis. *Shock Augusta Ga*. mars 2012;37(3):289-96.
186. Watanabe E, Muenzer JT, Hawkins WG, Davis CG, Dixon DJ, McDunn JE, et al. Sepsis Induces Extensive Autophagic Vacuolization in Hepatocytes –a clinical and laboratory based study. *Lab Investig J Tech Methods Pathol*. mai 2009;89(5):549-61.
187. Vanhorebeek I, Gunst J, Derde S, Derese I, Boussemaere M, Güiza F, et al. Insufficient Activation of Autophagy Allows Cellular Damage to Accumulate in Critically Ill Patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 1 avr 2011;96(4):E633-45.
188. Yang Q, Liu D, Long Y, Liu H, Chai W, Wang X-T. Acute renal failure during sepsis: Potential role of cell cycle regulation. *J Infect*. 1 juin 2009;58(6):459-64.
189. Brealey D, Karyampudi S, Jacques TS, Novelli M, Stidwill R, Taylor V, et al. Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol*. 1 mars 2004;286(3):R491-7.
190. Singer M, Santis VD, Vitale D, Jeffcoate W. Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation. *The Lancet*. 7 août 2004;364(9433):545-8.

191. Boller EM, Otto CM. Chapter 91 - Sepsis and Septic Shock. In: Silverstein DC, Hopper K, éditeurs. *Small Animal Critical Care Medicine (Second Edition)* [Internet]. St. Louis: W.B. Saunders; 2015 [cité 11 sept 2018]. p. 472-80. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978145570306700091X>
192. Head LW, Coopersmith CM. Evolution of Sepsis Management: From Early Goal-Directed Therapy to Personalized Care. *Adv Surg.* sept 2016;50(1):221–234.
193. Barrier KM. Summary of the 2016 International Surviving Sepsis Campaign: A Clinician’s Guide. *Crit Care Nurs Clin North Am.* 1 sept 2018;30(3):311-21.
194. Gibbison B, López-López JA, Higgins JPT, Miller T, Angelini GD, Lightman SL, et al. Corticosteroids in septic shock: a systematic review and network meta-analysis. *Crit Care* [Internet]. 28 mars 2017 [cité 16 sept 2018];21. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5371269/>
195. Sprung CL, Annane D, Keh D, Moreno R, Singer M, Freivogel K, et al. Hydrocortisone Therapy for Patients with Septic Shock. *N Engl J Med.* 10 janv 2008;358(2):111-24.
196. Annane D, Sébille V, Charpentier C, Bollaert P-E, François B, Korach J-M, et al. Effect of Treatment With Low Doses of Hydrocortisone and Fludrocortisone on Mortality in Patients With Septic Shock. *JAMA.* 21 août 2002;288(7):862-71.
197. Russell JA. Management of Sepsis. *N Engl J Med.* 19 oct 2006;355(16):1699-713.
198. WHO | Sepsis [Internet]. WHO. [cité 17 sept 2018]. Disponible sur: <http://www.who.int/sepsis/en/>
199. Mayr FB, Yende S, Angus DC. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence.* 1 janv 2014;5(1):4-11.
200. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NKJ, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, et al. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am J Respir Crit Care Med.* 28 sept 2015;193(3):259-72.
201. Dagher GA, Chehade AEH, Chebl RB, Majzoub I. Assessment of Sepsis in a Developing Country: Where do We Stand? *Health Care Curr Rev.* 12 oct 2015;3(2):1-4.
202. Dagher GA, Saadeldine M, Bachir R, Zebian D, Chebl RB. Descriptive analysis of sepsis in a developing country. *Int J Emerg Med* [Internet]. 6 juin 2015;8. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4460115/>
203. Reinhart K, Daniels R, Kisson N, Machado FR, Schachter RD, Finfer S. Recognizing Sepsis as a Global Health Priority — A WHO Resolution. *N Engl J Med.* 3 août 2017;377(5):414-7.
204. Edbrooke DL, Hibbert CL, Kingsley JM, Smith S, Bright NM, Quinn JM. The patient-related costs of care for sepsis patients in a United Kingdom adult general intensive care unit. *Crit Care Med.* sept 1999;27(9):1760.

205. Schmid A, Schneider H, Adlof A, Smolle K-H, Edelmann G, Sporn P, et al. Economic burden of illness imposed by severe sepsis in Austria. *Wien Klin Wochenschr.* 30 août 2002;114(15-16):697-701.
206. Brun-Buisson C, Roudot-Thoraval F, Girou E, Grenier-Sennelier C, Durand-Zaleski I. The costs of septic syndromes in the intensive care unit and influence of hospital-acquired sepsis. *Intensive Care Med.* 1 sept 2003;29(9):1464-71.
207. Cecconi M, Evans L, Levy M, Rhodes A. Sepsis and septic shock. *The Lancet.* 7 juill 2018;392(10141):75-87.
208. Stevenson EK, Rubenstein AR, Radin GT, Wiener RS, Walkey AJ. Two Decades of Mortality Trends among Patients with Severe Sepsis: A Comparative Meta-analysis. *Crit Care Med.* mars 2014;42(3):625-31.
209. Rivers E, Muzzin A. Early Goal-Directed Therapy in the Treatment of Severe Sepsis and Septic Shock. *N Engl J Med.* 2001;10.
210. Iwashyna TJ, Cooke CR, Wunsch H, Kahn JM. The Population Burden of Long-Term Survivorship after Severe Sepsis Among Older Americans. *J Am Geriatr Soc.* juin 2012;60(6):1070-7.
211. Angus DC. The Lingering Consequences of Sepsis: A Hidden Public Health Disaster? *JAMA.* 27 oct 2010;304(16):1833-4.
212. Winters BD, Eberlein M, Leung J, Needham DM, Pronovost PJ, Sevransky JE. Long-term mortality and quality of life in sepsis: A systematic review\*: *Crit Care Med.* mai 2010;38(5):1276-83.
213. Wang HE, Szychowski JM, Griffin R, Safford MM, Shapiro NI, Howard G. Long-term mortality after community-acquired sepsis: a longitudinal population-based cohort study. *BMJ Open* [Internet]. 17 janv 2014 [cité 18 sept 2018];4(1). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3902401/>
214. Cuthbertson BH, Elders A, Hall S, Taylor J, MacLennan G, Mackirdy F, et al. Mortality and quality of life in the five years after severe sepsis. *Crit Care.* 2013;17(2):R70.
215. Prescott HC, Langa KM, Liu V, Escobar GJ, Iwashyna TJ. Increased 1-Year Healthcare Use in Survivors of Severe Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 juill 2014;190(1):62-9.
216. Jones TK, Fuchs BD, Small DS, Halpern SD, Hanish A, Umscheid CA, et al. Post-Acute Care Use and Hospital Readmission after Sepsis. *Ann Am Thorac Soc.* juin 2015;12(6):904-13.
217. Walton AH, Muenzer JT, Rasche D, Boomer JS, Sato B, Brownstein BH, et al. Reactivation of Multiple Viruses in Patients with Sepsis. *PLoS ONE* [Internet]. 11 juin 2014 [cité 18 sept 2018];9(6). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4053360/>
218. Iwashyna TJ, Ely EW, Smith DM, Langa KM. Long-term Cognitive Impairment and Functional Disability Among Survivors of Severe Sepsis. *Jama.* 27 oct 2010;304(16):1787-94.

219. Davydow DS, Hough CL, Langa KM, Iwashyna TJ. Symptoms of Depression in Survivors of Severe Sepsis: A Prospective Cohort Study of Older Americans. *Am J Geriatr Psychiatry Off J Am Assoc Geriatr Psychiatry* [Internet]. sept 2013 [cité 18 sept 2018];21(9). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3462893/>
220. Davydow DS, Gifford JM, Desai SV, Bienvenu OJ, Needham DM. Depression in general intensive care unit survivors: a systematic review. *Intensive Care Med.* 1 mai 2009;35(5):796-809.
221. Wintermann G-B, Brunkhorst FM, Petrowski K, Strauss B, Oehmichen F, Pohl M, et al. Stress disorders following prolonged critical illness in survivors of severe sepsis. *Crit Care Med.* juin 2015;43(6):1213-22.
222. Desai SV, Law TJ, Needham DM. Long-term complications of critical care. *Crit Care Med.* févr 2011;39(2):371-9.
223. Friedrich O, Reid MB, Van den Berghe G, Vanhorebeek I, Hermans G, Rich MM, et al. The Sick and the Weak: Neuropathies/Myopathies in the Critically Ill. *Physiol Rev.* juill 2015;95(3):1025-109.
224. Baldwin CE, Bersten AD. Alterations in Respiratory and Limb Muscle Strength and Size in Patients With Sepsis Who Are Mechanically Ventilated. *Phys Ther.* 1 janv 2014;94(1):68-82.
225. Farhan H, Moreno-Duarte I, Latronico N, Zafonte R, Eikermann M. Acquired Muscle Weakness in the Surgical Intensive Care Unit: Nosology, Epidemiology, Diagnosis, and Prevention. *Anesthesiol J Am Soc Anesthesiol.* 2016;124(1):207–234.
226. Hermans G, Van den Berghe G. Clinical review: intensive care unit acquired weakness. *Crit Care* [Internet]. déc 2015 [cité 11 déc 2017];19(1). Disponible sur: <http://ccforum.com/content/19/1/274>
227. Tauber SC, Eiffert H, Brück W, Nau R. Septic encephalopathy and septic encephalitis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* févr 2017;15(2):121-32.
228. Heming N, Mazeraud A, Verdonk F, Bozza FA, Chrétien F, Sharshar T. Neuroanatomy of sepsis-associated encephalopathy. *Crit Care.* 21 mars 2017;21(1):65.
229. Barr J, Fraser GL, Puntillo K, Ely EW, Gélinas C, Dasta JF, et al. Clinical practice guidelines for the management of pain, agitation, and delirium in adult patients in the intensive care unit. *Crit Care Med.* janv 2013;41(1):263-306.
230. Ely EW, Margolin R, Francis J, May L, Truman B, Dittus R, et al. Evaluation of delirium in critically ill patients: validation of the Confusion Assessment Method for the Intensive Care Unit (CAM-ICU). *Crit Care Med.* juill 2001;29(7):1370-9.
231. Polito A, Eischwald F, Maho A-LL, Polito A, Azabou E, Annane D, et al. Pattern of Brain Injury in the Acute Setting of Human Septic Shock. *Crit Care.* 2013;17(5):R204.
232. Hosokawa K, Gaspard N, Su F, Oddo M, Vincent J-L, Taccone FS. Clinical neurophysiological assessment of sepsis-associated brain dysfunction: a systematic review. *Crit Care.* 8 déc 2014;18(6):674.

233. Mazeraud A, Pascal Q, Verdonk F, Heming N, Chrétien F, Sharshar T. Neuroanatomy and Physiology of Brain Dysfunction in Sepsis. *Clin Chest Med.* juin 2016;37(2):333–345.
234. Nayak R. Practical approach to the patient with acute neuromuscular weakness. *World J Clin Cases.* 16 juill 2017;5(7):270-9.
235. Ely EW, Shintani A, Truman B, Speroff T, Gordon SM, Frank E, Harrell J, et al. Delirium as a Predictor of Mortality in Mechanically Ventilated Patients in the Intensive Care Unit. *JAMA.* 14 avr 2004;291(14):1753-62.
236. Ali NA, O'Brien JM, Hoffmann SP, Phillips G, Garland A, Finley JCW, et al. Acquired Weakness, Handgrip Strength, and Mortality in Critically Ill Patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 août 2008;178(3):261-8.
237. Sharshar T, Bastuji-Garin S, Stevens RD, Durand M-C, Malissin I, Rodriguez P, et al. Presence and severity of intensive care unit-acquired paresis at time of awakening are associated with increased intensive care unit and hospital mortality. *Crit Care Med.* déc 2009;37(12):3047-53.
238. Jonghe BD, Sharshar T, Lefaucheur J-P, Authier F-J, Durand-Zaleski I, Boussarsar M, et al. Paresis Acquired in the Intensive Care Unit: A Prospective Multicenter Study. *JAMA.* 11 déc 2002;288(22):2859-67.
239. De Jonghe B, Bastuji-Garin S, Durand M-C, Malissin I, Rodrigues P, Cerf C, et al. Respiratory weakness is associated with limb weakness and delayed weaning in critical illness. *Crit Care Med.* sept 2007;35(9):2007-15.
240. Mirzakhani H, Williams J-N, Mello J, Joseph S, Meyer MJ, Waak K, et al. Muscle Weakness Predicts Pharyngeal Dysfunction and Symptomatic Aspiration in Long-term Ventilated Patients. *Anesthesiol J Am Soc Anesthesiol.* 1 août 2013;119(2):389-97.
241. Sharshar T, Porcher R, Siami S, Rohaut B, Bailly-Salin J, Hopkinson N, et al. Brainstem responses can predict death and delirium in sedated patients in intensive care unit. *Crit Care Med.* 1 août 2011;39:1960-7.
242. Korach-André M, Sharshar T, Jarrin I, P Fouillot J, C Raphaël J, Gajdos P, et al. Cardiac variability in critically ill adults: Influence of sepsis. *Crit Care Med.* 1 août 2001;29:1380-5.
243. Annane D, Trabold F, Sharshar T, Jarrin I, Blanc AS, Raphael JC, et al. Inappropriate Sympathetic Activation at Onset of Septic Shock: A Spectral Analysis Approach. *Am J Respir Crit Care Med.* août 1999;160(2):458-65.
244. Sonnevile R, Guidoux C, Barrett L, Viltart O, Mattot V, Polito A, et al. Vasopressin Synthesis by the Magnocellular Neurons is Different in the Supraoptic Nucleus and in the Paraventricular Nucleus in Human and Experimental Septic Shock. *Brain Pathol Zurich Switz.* 1 nov 2009;20:613-22.
245. Carlson DE, Chiu WC, Fiedler SM, Hoffman GE. Central Neural Distribution of Immunoreactive Fos and CRH in relation to plasma ACTH and Corticosterone during Sepsis in the Rat. *Exp Neurol.* juin 2007;205(2):485-500.



246. Rothenhäusler H-B, Ehrentraut S, Stoll C, Schelling G, Kapfhammer H-P. The relationship between cognitive performance and employment and health status in long-term survivors of the acute respiratory distress syndrome: results of an exploratory study. *Gen Hosp Psychiatry*. 1 mars 2001;23(2):90-6.
247. Imamura Y, Wang H, Matsumoto N, Muroya T, Shimazaki J, Ogura H, et al. Interleukin-1 $\beta$  causes long-term potentiation deficiency in a mouse model of septic encephalopathy. *Neuroscience*. juill 2011;187:63-9.
248. Ari I, Kafa IM, Kurt MA. Perimicrovascular edema in the frontal cortex in a rat model of intraperitoneal sepsis. *Exp Neurol*. mars 2006;198(1):242-9.
249. Papadopoulos MC, Lamb FJ, Moss RF, Davies DC, Tighe D, Bennett ED. Faecal peritonitis causes oedema and neuronal injury in pig cerebral cortex. 1999;6.
250. Muscatell KA, Dedovic K, Slavich GM, Jarcho MR, Breen EC, Bower JE, et al. Greater amygdala activity and dorsomedial prefrontal–amygdala coupling are associated with enhanced inflammatory responses to stress. *Brain Behav Immun*. janv 2015;43:46-53.
251. Bolton CF, Breuer AC. Critical illness polyneuropathy. *Muscle Nerve*. mars 1999;22(3):419-24.
252. Latronico N, Shehu I, Seghelini E. Neuromuscular sequelae of critical illness. Vol. 11. 2005. 381 p.
253. Michels M, Sonai B, Dal-Pizzol F. Polarization of microglia and its role in bacterial sepsis. *J Neuroimmunol*. févr 2017;303:90–98.
254. Chhor V, Le Charpentier T, Lebon S, Oré M-V, Celador IL, Josserand J, et al. Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia in vitro. *Brain Behav Immun*. août 2013;32:70-85.
255. Orihuela R, McPherson CA, Harry GJ. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br J Pharmacol*. févr 2016;173(4):649-65.
256. Semmler A, Okulla T, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L, Heneka MT. Systemic inflammation induces apoptosis with variable vulnerability of different brain regions. *J Chem Neuroanat*. oct 2005;30(2):144–157.
257. Lemstra AW, Groen in't Woud JC, Hoozemans JJ, van Haastert ES, Rozemuller AJ, Eikelenboom P, et al. Microglia activation in sepsis: a case-control study. *J Neuroinflammation*. janv 2007;4:4.
258. Gyoneva S, Davalos D, Biswas D, Swanger SA, Garnier-Amblard E, Loth F, et al. Systemic inflammation regulates microglial responses to tissue damage in vivo. *Glia*. août 2014;62(8):1345–1360.
259. Hoogland ICM, Houbolt C, van Westerloo DJ, van Gool WA, van de Beek D. Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments. *J Neuroinflammation* [Internet]. juin 2015 [cité 31 janv 2018];12. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4470063/>

260. Akroun N, Sharshar T, Annane D. Mechanisms of Brain Signaling During Sepsis. *Curr Neuropharmacol.* déc 2009;7(4):296-301.
261. Varatharaj A, Galea I. The blood-brain barrier in systemic inflammation. *Brain Behav Immun.* févr 2017;60:1–12.
262. Davies D. Blood–brain barrier breakdown in septic encephalopathy and brain tumours. *J Anat.* juin 2002;200(6):639-46.
263. Piazza O, Cotena S, De Robertis E, Caranci F, Tufano R. Sepsis Associated Encephalopathy Studied by MRI and Cerebral Spinal Fluid S100B Measurement. *Neurochem Res.* 1 juill 2009;34(7):1289-92.
264. Michels M, Vieira AS, Vuolo F, Zapelini HG, Mendonça B, Mina F, et al. The role of microglia activation in the development of sepsis-induced long-term cognitive impairment. *Brain Behav Immun.* janv 2015;43:54–59.
265. Rao JS, Kellom M, Kim H-W, Rapoport SI. Neuroinflammation and synaptic loss. *Neurochem Res.* mai 2012;37(5):903–910.
266. Pfister D, Siegemund M, Dell-Kuster S, Smielewski P, Rüegg S, Strebel SP, et al. Cerebral perfusion in sepsis-associated delirium. *Crit Care.* 2008;12(3):R63.
267. Sharshar T, Annane D, de la Grandmaison GL, Brouland JP, Hopkinson NS, Françoise G. The neuropathology of septic shock. *Brain Pathol Zurich Switz.* janv 2004;14(1):21-33.
268. Schramm P, Klein KU, Falkenberg L, Berres M, Closhen D, Werhahn KJ, et al. Impaired cerebrovascular autoregulation in patients with severe sepsis and sepsis-associated delirium. *Crit Care.* 2012;16(5):R181.
269. Rosengarten B, Krekel D, Kuhnert S, Schulz R. Early neurovascular uncoupling in the brain during community acquired pneumonia. *Crit Care Lond Engl.* 20 avr 2012;16:R64.
270. Semmler A, Hermann S, Mormann F, Weberpals M, Paxian SA, Okulla T, et al. Sepsis causes neuroinflammation and concomitant decrease of cerebral metabolism. *J Neuroinflammation.* 15 sept 2008;5:38.
271. Kadoi Y, Saito S, Kunimoto F, Imai T, Fujita T. Impairment of the Brain  $\beta$ -Adrenergic System during Experimental Endotoxemia. *J Surg Res.* 1 mars 1996;61(2):496-502.
272. van Gool WA, van de Beek D, Eikelenboom P. Systemic infection and delirium: when cytokines and acetylcholine collide. *Lancet Lond Engl.* 27 févr 2010;375(9716):773-5.
273. Pandharipande PP, Pun BT, Herr DL, Maze M, Girard TD, Miller RR, et al. Effect of Sedation With Dexmedetomidine vs Lorazepam on Acute Brain Dysfunction in Mechanically Ventilated Patients: The MENDS Randomized Controlled Trial. *JAMA.* 12 déc 2007;298(22):2644-53.
274. Basler T, Meier-Hellmann A, Bredle D, Reinhart K. Amino acid imbalance early in septic encephalopathy. *Intensive Care Med.* mars 2002;28(3):293–298.

275. Z'Graggen WJ, Lin CSY, Howard RS, Beale RJ, Bostock H. Nerve excitability changes in critical illness polyneuropathy. *Brain J Neurol.* sept 2006;129(Pt 9):2461-70.
276. Díaz NL, Finol HJ, Torres SH, Zambrano CI, Adjounian H. Histochemical and ultrastructural study of skeletal muscle in patients with sepsis and multiple organ failure syndrome (MOFS). *Histol Histopathol.* janv 1998;13(1):121-8.
277. Tsukagoshi H, Morita T, Takahashi K, Kunimoto F, Goto F. Cecal Ligation and Puncture Peritonitis Model Shows Decreased Nicotinic Acetylcholine Receptor Numbers in Rat Muscle Immunopathologic Mechanisms? *Anesthesiol J Am Soc Anesthesiol.* 1 août 1999;91(2):448-60.
278. Xie F, Min S, Liu L, Peng L, Hao X, Zhu X. Advanced age enhances the sepsis-induced up-regulation of the  $\gamma$ - and  $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptors in different parts of the skeletal muscles. *Arch Gerontol Geriatr.* juill 2016;65:1-8.
279. Martyn JAJ, Richtsfeld M. Succinylcholine-induced hyperkalemia in acquired pathologic states: etiologic factors and molecular mechanisms. *Anesthesiology.* janv 2006;104(1):158-69.
280. Z'Graggen WJ, Brander L, Tuchscherer D, Scheidegger O, Takala J, Bostock H. Muscle membrane dysfunction in critical illness myopathy assessed by velocity recovery cycles. *Clin Neurophysiol.* 1 avr 2011;122(4):834-41.
281. Balboa E, Saavedra-Leiva F, Cea LA, Vargas AA, Ramírez V, Escamilla R, et al. Sepsis-Induced Channelopathy in Skeletal Muscles is Associated with Expression of Non-Selective Channels. *Shock.* févr 2018;49(2):221.
282. Jiao G-Y, Hao L-Y, Gao C-E, Chen L, Sun X-F, Yang H-L, et al. Reduced DHPR $\alpha 1S$  and RyR1 expression levels are associated with diaphragm contractile dysfunction during sepsis. *Muscle Nerve.* nov 2013;48(5):745-751.
283. Singer M, Brealey D. Mitochondrial dysfunction in sepsis. :18.
284. Schumer W, Erve PR, Obernolte RP. Endotoxemic effect on cardiac and skeletal muscle mitochondria. *Surg Gynecol Obstet.* sept 1971;133(3):433-6.
285. Maestraggi Q, Lebas B, Clere-Jehl R, Ludes P-O, Chamaroux-Tran T-N, Schneider F, et al. Skeletal Muscle and Lymphocyte Mitochondrial Dysfunctions in Septic Shock Trigger ICU-Acquired Weakness and Sepsis-Induced Immunoparalysis. *BioMed Res Int [Internet].* 2017;2017. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5447268/>
286. Jiao G, Hao L, Wang M, Zhong B, Yu M, Zhao S, et al. Upregulation of endoplasmic reticulum stress is associated with diaphragm contractile dysfunction in a rat model of sepsis. *Mol Med Rep.* janv 2017;15(1):366-374.
287. Hobler SC, Tiao G, Fischer JE, Monaco J, Hasselgren P-O. Sepsis-induced increase in muscle proteolysis is blocked by specific proteasome inhibitors. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol.* janv 1998;274(1):R30-7.

288. Constantin D, McCullough J, Mahajan RP, Greenhaff PL. Novel events in the molecular regulation of muscle mass in critically ill patients. *J Physiol.* 1 août 2011;589(Pt 15):3883-95.
289. Klaude M, Fredriksson K, Tjäder I, Hammarqvist F, Ahlman B, Rooyackers O, et al. Proteasome proteolytic activity in skeletal muscle is increased in patients with sepsis. *Clin Sci.* mai 2007;112(9):499–506.
290. Banduseela VC, Chen Y-W, Kultima HG, Norman HS, Aare S, Radell P, et al. Impaired autophagy, chaperone expression, and protein synthesis in response to critical illness interventions in porcine skeletal muscle. *Physiol Genomics.* 9 avr 2013;45(12):477-86.
291. Rocheteau P, Chatre L, Briand D, Mebarki M, Jouvion G, Bardon J, et al. Sepsis induces long-term metabolic and mitochondrial muscle stem cell dysfunction amenable by mesenchymal stem cell therapy. *Nat Commun [Internet].* 15 déc 2015;6. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4682118/>
292. Fink MP, Warren HS. Strategies to improve drug development for sepsis. *Nat Rev Drug Discov.* oct 2014;13(10):741-58.
293. Vincent J-L, Marshall JC, Dellinger RP, Simonson SG, Guntupalli K, Levy MM, et al. Talactoferrin in Severe Sepsis: Results From the Phase II/III Oral tAlactoferrin in Severe sepsIS Trial. *Crit Care Med.* sept 2015;43(9):1832-8.
294. Venkatesh B, Finfer S, Cohen J, Rajbhandari D, Arabi Y, Bellomo R, et al. Adjunctive Glucocorticoid Therapy in Patients with Septic Shock. *N Engl J Med.* 1 mars 2018;378(9):797-808.
295. Annane D, Renault A, Brun-Buisson C, Megarbane B, Quenot J-P, Siami S, et al. Hydrocortisone plus Fludrocortisone for Adults with Septic Shock. *N Engl J Med.* 1 mars 2018;378(9):809-18.
296. Ziegler EJ, McCutchan JA, Fierer J, Glauser MP, Sadoff JC, Douglas H, et al. Treatment of Gram-Negative Bacteremia and Shock with Human Antiserum to a Mutant *Escherichia coli*. *N Engl J Med.* 11 nov 1982;307(20):1225-30.
297. Marra MN, Thornton MB, Snable JL, Wilde CG, Scott RW. Endotoxin-binding and -neutralizing properties of recombinant bactericidal/permeability-increasing protein and monoclonal antibodies HA-1A and E5. *Crit Care Med.* avr 1994;22(4):559-65.
298. Angus DC, Birmingham MC, Balk RA, Scannon PJ, Collins D, Kruse JA, et al. E5 Murine Monoclonal Antiendotoxin Antibody in Gram-Negative Sepsis: A Randomized Controlled Trial. *JAMA.* 5 avr 2000;283(13):1723-30.
299. Tidswell M, Tillis W, Larosa SP, Lynn M, Wittek AE, Kao R, et al. Phase 2 trial of eritoran tetrasodium (E5564), a toll-like receptor 4 antagonist, in patients with severe sepsis. *Crit Care Med.* janv 2010;38(1):72-83.
300. Opal SM, Laterre P-F, Francois B, LaRosa SP, Angus DC, Mira J-P, et al. Effect of Eritoran, an Antagonist of MD2-TLR4, on Mortality in Patients With Severe Sepsis: The ACCESS Randomized Trial. *JAMA.* 20 mars 2013;309(11):1154-62.

301. Fisher CJ, Agosti JM, Opal SM, Lowry SF, Balk RA, Sadoff JC, et al. Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group. *N Engl J Med.* 27 juin 1996;334(26):1697-702.
302. Cohen J, Carlet J. INTERSEPT: an international, multicenter, placebo-controlled trial of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor-alpha in patients with sepsis. International Sepsis Trial Study Group. *Crit Care Med.* sept 1996;24(9):1431-40.
303. Abraham E, Anzueto A, Gutierrez G, Tessler S, San Pedro G, Wunderink R, et al. Double-blind randomised controlled trial of monoclonal antibody to human tumour necrosis factor in treatment of septic shock. NORASEPT II Study Group. *Lancet Lond Engl.* 28 mars 1998;351(9107):929-33.
304. Panacek EA, Marshall JC, Albertson TE, Johnson DH, Johnson S, MacArthur RD, et al. Efficacy and safety of the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody F(ab')<sub>2</sub> fragment afelimomab in patients with severe sepsis and elevated interleukin-6 levels. *Crit Care Med.* nov 2004;32(11):2173-82.
305. Opal SM, Fisher CJ, Dhainaut JF, Vincent JL, Brase R, Lowry SF, et al. Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. The Interleukin-1 Receptor Antagonist Sepsis Investigator Group. *Crit Care Med.* juill 1997;25(7):1115-24.
306. Shakoory B, Carcillo JA, Chatham WW, Amdur RL, Zhao H, Dinarello CA, et al. Interleukin-1 Receptor Blockade Is Associated With Reduced Mortality in Sepsis Patients With Features of Macrophage Activation Syndrome: Reanalysis of a Prior Phase III Trial. *Crit Care Med.* févr 2016;44(2):275-81.
307. Meyer NJ, Reilly JP, Anderson BJ, Palakshappa JA, Jones TK, Dunn TG, et al. Mortality Benefit of Recombinant Human Interleukin-1 Receptor Antagonist for Sepsis Varies by Initial Interleukin-1 Receptor Antagonist Plasma Concentration. *Crit Care Med.* 2018;46(1):21-8.
308. Nadel S, Goldstein B, Williams MD, Dalton H, Peters M, Macias WL, et al. Drotrecogin alfa (activated) in children with severe sepsis: a multicentre phase III randomised controlled trial. *Lancet Lond Engl.* 10 mars 2007;369(9564):836-43.
309. Vincent J-L, Ramesh MK, Ernest D, LaRosa SP, Pacht J, Aikawa N, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, Phase 2b study to evaluate the safety and efficacy of recombinant human soluble thrombomodulin, ART-123, in patients with sepsis and suspected disseminated intravascular coagulation. *Crit Care Med.* sept 2013;41(9):2069-79.
310. Root RK, Lodato RF, Patrick W, Cade JF, Fotheringham N, Milwee S, et al. Multicenter, double-blind, placebo-controlled study of the use of filgrastim in patients hospitalized with pneumonia and severe sepsis. *Crit Care Med.* févr 2003;31(2):367-73.
311. Guntupalli K, Dean N, Morris PE, Bandi V, Margolis B, Rivers E, et al. A phase 2 randomized, double-blind, placebo-controlled study of the safety and efficacy of talactoferrin in patients with severe sepsis. *Crit Care Med.* mars 2013;41(3):706-16.

312. National Heart, Lung, and Blood Institute ARDS Clinical Trials Network, Truwit JD, Bernard GR, Steingrub J, Matthay MA, Liu KD, et al. Rosuvastatin for sepsis-associated acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 5 juin 2014;370(23):2191-200.
313. Wang X, Li S. Effect of small-dose levosimendan on mortality rates and organ functions in Chinese elderly patients with sepsis. *Clin Interv Aging.* 2017;12:917-21.
314. Remick DG, Newcomb DE, Bolgos GL, Call DR. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. *Shock Augusta Ga.* févr 2000;13(2):110-6.
315. Poli-de-Figueiredo LF, Garrido AG, Nakagawa N, Sannomiya P. Experimental models of sepsis and their clinical relevance. *Shock.* oct 2008;30(7):53.
316. Deitch EA. Rodent Models Of Intra-abdominal Infection. *Shock.* 1 déc 2005;24:19-23.
317. Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, Kerby JD, Rue LW, Bland KI, et al. Cecal Ligation And Puncture. *Shock.* 1 déc 2005;24:52-7.
318. Gentile LF, Nacionales DC, Lopez MC, Vanzant E, Cuenca A, Szpila BE, et al. Host Responses to Sepsis Vary in Different Low-Lethality Murine Models. *PLoS ONE [Internet].* 1 mai 2014 [cité 20 août 2018];9(5). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4006924/>
319. Rittirsch D, Hoesel LM, Ward PA. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J Leukoc Biol.* 10 oct 2006;81(1):137-43.
320. Singleton KD, Wischmeyer PE. Distance of Cecum Ligated Influences Mortality, Tumor Necrosis Factor-Alpha and Interleukin-6 Expression following Cecal Ligation and Puncture in the Rat. *Eur Surg Res.* 2003;35(6):486-91.
321. Fox JG, Cohen BJ, Loew FM, éditeurs. *Laboratory animal medicine.* Orlando, Fla: Academic Press; 1984. 750 p. (American College of Laboratory Animal Medicine series).
322. De Maio A, Torres MB, Reeves RH. Genetic determinants influencing the response to injury, inflammation, and sepsis. *Shock.* janv 2005;23(1):11.
323. Wells CA, Ravasi T, Faulkner GJ, Carninci P, Okazaki Y, Hayashizaki Y, et al. Genetic control of the innate immune response. *BMC Immunol.* 26 juin 2003;4:5.
324. Berghe TV, Hulpiau P, Martens L, Vandenbroucke RE, Van Wonterghem E, Perry SW, et al. Passenger Mutations Confound Interpretation of All Genetically Modified Congenic Mice. *Immunity.* 21 juill 2015;43(1):200-9.
325. Seok J, Warren HS, Cuenca AG, Mindrinos MN, Baker HV, Xu W, et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 26 févr 2013;110(9):3507-12.
326. Osuchowski MF, Remick DG, Lederer JA, Lang CH, Aasen AO, Aibiki M, et al. Abandon the mouse research ship? Not just yet! *Shock Augusta Ga.* juin 2014;41(6):463-75.

327. Takao K, Miyakawa T. Genomic responses in mouse models greatly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 27 janv 2015;112(4):1167-72.
328. Rasid O, Cavaillon J-M. Recent developments in severe sepsis research: from bench to bedside and back. *Future Microbiol*. 1 févr 2016;11(2):293-314.
329. McCuskey RS, McCuskey PA, Urbaschek R, Urbaschek B. Species differences in Kupffer cells and endotoxin sensitivity. *Infect Immun*. juill 1984;45(1):278-80.
330. Glode LM, Mergenhagen SE, Rosenstreich DL. Significant contribution of spleen cells in mediating the lethal effects of endotoxin in vivo. *Infect Immun*. sept 1976;14(3):626-30.
331. Reynolds K, Novosad B, Hoffhines A, Gipson J, Johnson J, Peters J, et al. Pretreatment with troglitazone decreases lethality during endotoxemia in mice. *J Endotoxin Res*. 2002;8(4):307-14.
332. Gentile LF, Nacionales DC, Cuenca AG, Armbruster M, Ungaro RF, Abouhamze AS, et al. Identification and description of a novel murine model for polytrauma and shock. *Crit Care Med*. avr 2013;41(4):1075-85.
333. Mestas J, Hughes CCW. Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *J Immunol*. 1 mars 2004;172(5):2731-8.
334. Rehli M. Of mice and men: species variations of Toll-like receptor expression. *Trends Immunol*. 1 août 2002;23(8):375-8.
335. Doeing DC, Borowicz JL, Crockett ET. Gender dimorphism in differential peripheral blood leukocyte counts in mice using cardiac, tail, foot, and saphenous vein puncture methods. *BMC Clin Pathol*. 12 sept 2003;3:3.
336. Gordon CJ. Thermal physiology of laboratory mice: Defining thermoneutrality. *J Therm Biol*. 1 déc 2012;37(8):654-85.
337. Karp CL. Unstressing intemperate models: how cold stress undermines mouse modeling. *J Exp Med*. 4 juin 2012;209(6):1069-74.
338. Jiang Q, Cross AS, Singh IS, Chen TT, Viscardi RM, Hasday JD. Febrile Core Temperature Is Essential for Optimal Host Defense in Bacterial Peritonitis. *Infect Immun*. mars 2000;68(3):1265-70.
339. Moragues V, Pinkerton H. Variation in morbidity and mortality of murine typhus infection in mice with changes in the environmental temperature. *J Exp Med*. 1 janv 1944;79(1):41-3.
340. Martin B, Ji S, Maudsley S, Mattson MP. "Control" laboratory rodents are metabolically morbid: Why it matters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 6 avr 2010;107(14):6127-33.
341. Saito H, Sherwood ER, Varma TK, Evers BM. Effects of aging on mortality, hypothermia, and cytokine induction in mice with endotoxemia or sepsis. *Mech Ageing Dev*. 1 déc 2003;124(10):1047-58.

342. Veissier I. Expérimentation animale: biologie, éthique, réglementation. *Prod Anim* 5 12 365-375 1999. 1999;
343. Unsinger J, McDonough JS, Shultz LD, Ferguson TA, Hotchkiss RS. Sepsis-induced human lymphocyte apoptosis and cytokine production in “humanized” mice. *J Leukoc Biol.* août 2009;86(2):219-27.
344. Efron PA, Mohr AM, Moore FA, Moldawer LL. The future of murine sepsis and trauma research models. *J Leukoc Biol.* déc 2015;98(6):945-52.
345. Zeiss CJ, Johnson LK. Bridging the Gap between Reproducibility and Translation: Data Resources and Approaches. *ILAR J.* 1 juill 2017;58(1):1-3.
346. Osuchowski MF, Ayala A, Bahrami S, Bauer M, Boros M, Cavillon J-M, et al. Minimum Quality Threshold in Pre-Clinical Sepsis Studies (MQTiPSS): an international expert consensus initiative for improvement of animal modeling in sepsis. *Infection* [Internet]. 14 août 2018 [cité 21 août 2018]; Disponible sur: <https://doi.org/10.1007/s15010-018-1183-8>
347. Salgado-Pabón W, Breshears L, Spaulding AR, Merriman JA, Stach CS, Horswill AR, et al. Superantigens Are Critical for Staphylococcus aureus Infective Endocarditis, Sepsis, and Acute Kidney Injury. *mBio* [Internet]. 20 août 2013 [cité 26 sept 2018];4(4). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3747586/>
348. Camerota AJ, Creasey AA, Patla V, Larkin VA, Fink MP. Delayed treatment with recombinant human tissue factor pathway inhibitor improves survival in rabbits with gram-negative peritonitis. *J Infect Dis.* mars 1998;177(3):668-76.
349. Meurens F, Summerfield A, Nauwynck H, Saif L, Gerds V. The pig: a model for human infectious diseases. *Trends Microbiol.* 1 janv 2012;20(1):50-7.
350. Vassal O, Bonnet J-M, Barthelemy A, Allaouchiche B, Goy-Thollot I, Louzier V, et al. Renal haemodynamic response to amino acids infusion in an experimental porcine model of septic shock. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1 mai 2015;59(5):598-608.
351. Wang S, Wang J-Y, Wang T, Hang C-C, Shao R, Li C-S. A Novel Porcine Model of Septic Shock Induced by Acute Respiratory Distress Syndrome due to Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Chin Med J (Engl).* 2017;130(10):1226.
352. Murakami K, Bjertnaes LJ, Schmalstieg FC, McGuire R, Cox RA, Hawkins HK, et al. A novel animal model of sepsis after acute lung injury in sheep. *Crit Care Med.* sept 2002;30(9):2083-90.
353. Jonkam CC, Bansal K, Traber DL, Hamahata A, Maybauer MO, Maybauer DM, et al. Pulmonary vascular permeability changes in an ovine model of methicillin-resistant Staphylococcus aureus sepsis. *Crit Care.* 2009;13(1):R19.
354. Asmussen S, Ito H, Traber DL, Lee JW, Cox RA, Hawkins HK, et al. Human mesenchymal stem cells reduce the severity of acute lung injury in a sheep model of bacterial pneumonia. *Thorax.* sept 2014;69(9):819-25.



355. Lange M, Connelly R, Traber DL, Hamahata A, Nakano Y, Esechie A, et al. Time course of nitric oxide synthases, nitrosative stress, and poly(ADP ribosylation) in an ovine sepsis model. *Crit Care*. 2010;14(4):R129.
356. Taccone FS, Su F, De Deyne C, Abdellhai A, Pierrakos C, He X, et al. Sepsis is associated with altered cerebral microcirculation and tissue hypoxia in experimental peritonitis. *Crit Care Med*. févr 2014;42(2):e114-122.
357. Barreiro LB, Marioni JC, Blekhman R, Stephens M, Gilad Y. Functional Comparison of Innate Immune Signaling Pathways in Primates. *PLoS Genet* [Internet]. 16 déc 2010 [cité 20 août 2018];6(12). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3002988/>
358. Taylor FB, Kinasewitz GT, Lupu F. Pathophysiology, staging and therapy of severe sepsis in baboon models. *J Cell Mol Med*. avr 2012;16(4):672-82.
359. André C, Grall A, Guaguere É, Thomas A, Galibert F. [Spontaneous models of human diseases in dogs: ichthyoses as an example]. *Bull Acad Natl Med*. juin 2013;197(6):1225-30.
360. André DC. Intérêt du chien dans la pathologie et la génétique comparée: exemples de maladies et de gènes partagées entre l'Homme et le chien. 2012;13.
361. Abadie J, Nguyen F, Loussouarn D, Peña L, Gama A, Rieder N, et al. Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 2: immunophenotypes and prognostic significance. *Breast Cancer Res Treat*. 2018;167(2):459-68.
362. Truvé K, Dickinson P, Xiong A, York D, Jayashankar K, Pielberg G, et al. Utilizing the Dog Genome in the Search for Novel Candidate Genes Involved in Glioma Development—Genome Wide Association Mapping followed by Targeted Massive Parallel Sequencing Identifies a Strongly Associated Locus. *PLoS Genet* [Internet]. 12 mai 2016 [cité 26 sept 2018];12(5). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4865040/>
363. Lampropoulou-Adamidou K, Lelovas P, Karadimas EV, Liakou C, Triantafillopoulos IK, Dontas I, et al. Useful animal models for the research of osteoarthritis. *Eur J Orthop Surg Traumatol*. 1 avr 2014;24(3):263-71.
364. Minneci PC, Deans KJ, Hansen B, Parent C, Romines C, Gonzales DA, et al. A canine model of septic shock: balancing animal welfare and scientific relevance. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 1 oct 2007;293(4):H2487-500.
365. Hicks CW, Sweeney DA, Danner RL, Eichacker PQ, Suffredini AF, Feng J, et al. Efficacy of selective mineralocorticoid and glucocorticoid agonists in canine septic shock. *Crit Care Med* [Internet]. janv 2012 [cité 11 sept 2018];40(1). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3242885/>
366. Le cheval athlète, modèle animal de choix en médecine du sport : l'apport de l'échographie en pathologie articulaire [Internet]. Académie nationale de médecine | Une institution dans son temps. 2008 [cité 27 sept 2018]. Disponible sur: <http://www.academie-medecine.fr/le-cheval-athlete-modele-animal-de-choix-en-medecine-du-sport-lapport-de-lechographie-en-pathologie-articulaire/>

367. Wilkins PA. What's in a word? The need for SIRS and sepsis definitions in equine medicine and surgery. *Equine Vet J.* 1 janv 2018;50(1):7-9.
368. Barton MH, Peroni JF. Chapter 2 - The Systemic Inflammatory Response. In: Auer JA, Stick JA, éditeurs. *Equine Surgery (Fourth Edition)* [Internet]. Saint Louis: W.B. Saunders; 2012 [cité 14 mai 2017]. p. 13-24. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781437708677000028>
369. Morris DD. Endotoxemia in horses. A review of cellular and humoral mediators involved in its pathogenesis. *J Vet Intern Med.* juin 1991;5(3):167–181.
370. Hurcombe SD, Mudge MC, Daniels JB. Presumptive bacterial translocation in horses with strangulating small intestinal lesions requiring resection and anastomosis. *J Vet Emerg Crit Care.* déc 2012;22(6):653–660.
371. Barton MH, Collates C. Tumor Necrosis Factor and Interleukin-6 Activity and Endotoxin Concentration in Peritoneal Fluid and Blood of Horses with Acute Abdominal Disease. *J Vet Intern Med.* sept 1999;13(5):457–464.
372. Forbes G, Sorich E, Nath LC, Church S, Savage CJ, Bailey SR. Activin A as a novel biomarker of equine inflammatory abdominal disease: Preliminary findings. *Vet J.* nov 2011;190(2):e154–e156.
373. Burrows GE. Dose-response of ponies to parenteral *Escherichia coli* endotoxin. *Can J Comp Med.* avr 1981;45(2):207-10.
374. Vinther AML, Skovgaard K, Heegaard PM, Andersen PH. Dynamic expression of leukocyte innate immune genes in whole blood from horses with lipopolysaccharide-induced acute systemic inflammation. *BMC Vet Res* [Internet]. déc 2015 [cité 15 mai 2018];11(1). Disponible sur: <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/11/134>
375. Toribio RE, Kohn CW, Hardy J, Rosol TJ. Alterations in Serum Parathyroid Hormone and Electrolyte Concentrations and Urinary Excretion of Electrolytes in Horses with Induced Endotoxemia. *J Vet Intern Med.* mars 2005;19(2):223–231.
376. Tadros EM, Frank N, Donnell RL. Effects of equine metabolic syndrome on inflammatory responses of horses to intravenous lipopolysaccharide infusion. *Am J Vet Res.* juill 2013;74(7):1010–1019.
377. Bonelli F, Meucci V, Divers TJ, Wagner B, Intorre L, Sgorbini M. Kinetics of plasma procalcitonin, soluble CD14, CCL2 and IL-10 after a sublethal infusion of lipopolysaccharide in horses. *Vet Immunol Immunopathol.* févr 2017;184:29–35.
378. DeForge LE, Remick DG. Kinetics of TNF, IL-6, and IL-8 gene expression in LPS-stimulated human whole blood. *Biochem Biophys Res Commun.* 15 janv 1991;174(1):18-24.
379. Khan ASA, Gibson JM, Carlson GL, Rooyackers O, New JP, Soop M. Protein kinetics in human endotoxaemia and their temporal relation to metabolic, endocrine and proinflammatory cytokine responses. *BJS.* 1 juin 2015;102(7):767-75.

380. Frellstedt L, McKenzie HC, Barrett JG, Furr MO. Induction and characterization of endotoxin tolerance in equine peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Vet Immunol Immunopathol.* sept 2012;149(1-2):97–102.
381. Holcombe SJ, Jacobs CC, Cook VL, Gandy JC, Hauptman JG, Sordillo LM. Duration of in vivo endotoxin tolerance in horses. *Vet Immunol Immunopathol.* mai 2016;173:10–16.
382. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 23 févr 2016;315(8):801-10.
383. McConachie E, Giguère S, Barton MH. Scoring System for Multiple Organ Dysfunction in Adult Horses with Acute Surgical Gastrointestinal Disease. *J Vet Intern Med.* 2016;30(4):1276-83.
384. Karperien A, Ahammer H, Jelinek HF. Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 30 janv 2013;7. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3558688/>
385. Beynon SB, Walker FR. Microglial activation in the injured and healthy brain: What are we really talking about? Practical and theoretical issues associated with the measurement of changes in microglial morphology. *Neuroscience.* 6 déc 2012;225:162-71.
386. Oikawa M, Shiga J. Equine Endotoxemia: Pathomorphological Aspects of Endotoxin-induced Damage in Equine Mesenteric Arteries. *Transbound Emerg Dis.* 2002;49(4):173–176.
387. Steiner JL, Pruznak AM, Deiter G, Navaratnarajah M, Kutzler L, Kimball SR, et al. Disruption of Genes Encoding eIF4E Binding Proteins-1 And -2 Does Not Alter Basal or Sepsis-Induced Changes in Skeletal Muscle Protein Synthesis in Male or Female Mice. *PLoS ONE* [Internet]. juin 2014 [cité 28 févr 2018];9(6). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4063727/>
388. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji - an Open Source platform for biological image analysis. *Nat Methods* [Internet]. 28 juin 2012 [cité 17 mai 2018];9(7). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3855844/>
389. Breen EJ, Tan W, Khan A. The Statistical Value of Raw Fluorescence Signal in Luminex xMAP Based Multiplex Immunoassays. *Sci Rep* [Internet]. 31 mai 2016 [cité 16 nov 2018];6. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4886638/>
390. Gragnano F, Sperlongano S, Golia E, Natale F, Bianchi R, Crisci M, et al. The Role of von Willebrand Factor in Vascular Inflammation: From Pathogenesis to Targeted Therapy. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2017;2017. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5467347/>
391. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med.* juill 1996;22(7):707-10.

392. Cramer RM, Aagaard P, Qvortrup K, Langberg H, Olesen J, Kjær M. Myofibre damage in human skeletal muscle: effects of electrical stimulation versus voluntary contraction. *J Physiol*. 15 août 2007;583(Pt 1):365-80.
393. Moore JN, Vandenplas ML. Is it the systemic inflammatory response syndrome or endotoxemia in horses with colic? *Vet Clin North Am Equine Pract*. août 2014;30(2):337-51, vii-viii.
394. Sato W, Enzan K, Masaki Y, Kayaba M, Suzuki M. [The effect of isoflurane on the secretion of TNF-alpha and IL-1 beta from LPS-stimulated human peripheral blood monocytes]. *Masui*. juill 1995;44(7):971-5.
395. Verdonk F, Roux P, Flamant P, Fiette L, Bozza FA, Simard S, et al. Phenotypic clustering: a novel method for microglial morphology analysis. *J Neuroinflammation* [Internet]. 17 juin 2016;13. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4912769/>
396. Jr CAJ, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ, Jr CAJ, Travers P, et al. *Immunobiology*. 5th éd. Garland Science; 2001.
397. Morris DD, Crowe N, Moore JN. Correlation of clinical and laboratory data with serum tumor necrosis factor activity in horses with experimentally induced endotoxemia. *Am J Vet Res*. déc 1990;51(12):1935–1940.
398. Tadros EM, Frank N. Effects of continuous or intermittent lipopolysaccharide administration for 48 hours on the systemic inflammatory response in horses. *Am J Vet Res*. 2012;73(9):1394–1402.
399. Tadros EM, Frank N, Newkirk KM, Donnell RL, Horohov DW. Effects of a “two-hit” model of organ damage on the systemic inflammatory response and development of laminitis in horses. *Vet Immunol Immunopathol*. nov 2012;150(1-2):90–100.
400. Veenman JN, Dujardin CLL, Hoek A, Grootendorst A, Klein WR, Rutten V. High volume continuous venovenous haemofiltration (HV-CVVH) in an equine endotoxaemic shock model. *Equine Vet J*. 2002;34(5):516–522.
401. Steverink PJGM, Sturk A, Rutten VPMG, Wagenaar-Hilbers JPA, Klein WR, Velden MA van der, et al. Endotoxin, interleukin-6 and tumor necrosis factor concentrations in equine acute abdominal disease: relation to clinical outcome. *J Endotoxin Res*. août 1995;2(4):289–299.
402. Cargile JL, MacKay RJ, Dankert JR, Skelley L. Effect of treatment with a monoclonal antibody against equine tumor necrosis factor (TNF) on clinical, hematologic, and circulating TNF responses of miniature horses given endotoxin. *Am J Vet Res*. nov 1995;56(11):1451–1459.
403. Martin EM, Messenger KM, Sheats MK, Jones SL. Misoprostol Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Pro-inflammatory Cytokine Production by Equine Leukocytes. *Front Vet Sci* [Internet]. 28 sept 2017;4. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5624997/>

404. Hoogendijk AJ, Wiewel MA, van Vught LA, Scicluna BP, Belkasim-Bohoudi H, Horn J, et al. Plasma fractalkine is a sustained marker of disease severity and outcome in sepsis patients. *Crit Care*. 25 nov 2015;19:412.
405. Curto E, Messenger KM, Salmon JH, Gilger BC. Cytokine and chemokine profiles of aqueous humor and serum in horses with uveitis measured using multiplex bead immunoassay analysis. *Vet Immunol Immunopathol*. déc 2016;182:43-51.
406. Gentile LF, Cuenca AG, Vanzant EL, Efron PA, McKinley B, Moore F, et al. Is there value in plasma cytokine measurements in patients with severe trauma and sepsis? *Methods*. mai 2013;61(1):3-9.
407. Pavlin D, Cemazar M, Sersa G, Tozon N. IL-12 based gene therapy in veterinary medicine. *J Transl Med*. 21 nov 2012;10:234.
408. Müller J-MV, Feige K, Wunderlin P, Hödl A, Meli ML, Seltenhammer M, et al. Double-blind placebo-controlled study with interleukin-18 and interleukin-12-encoding plasmid DNA shows antitumor effect in metastatic melanoma in gray horses. *J Immunother Hagerstown Md* 1997. janv 2011;34(1):58-64.
409. Berghaus LJ, Giguère S, Sturgill TL. Effects of age and macrophage lineage on intracellular survival and cytokine induction after infection with *Rhodococcus equi*. *Vet Immunol Immunopathol*. 15 juill 2014;160(1-2):41-50.
410. Momoi Y, Kato H, Youn HY, Aida H, Takagi S, Watari T, et al. Elevation of serum G-CSF level in horses with transportation-induced fever. *J Vet Med Sci*. juin 1996;58(6):537-41.
411. Hillenbrand A, Knippschild U, Weiss M, Schrezenmeier H, Henne-Bruns D, Huber-Lang M, et al. Sepsis induced changes of adipokines and cytokines - septic patients compared to morbidly obese patients. *BMC Surg*. 9 sept 2010;10:26.
412. Nieto JE, Macdonald MH, Braim AEP, Aleman M. Effect of lipopolysaccharide infusion on gene expression of inflammatory cytokines in normal horses in vivo. *Equine Vet J*. sept 2009;41(7):717-719.
413. Rebordão MR, Galvão A, Szóstek A, Amaral A, Mateus L, Skarzynski DJ, et al. Physiopathologic mechanisms involved in mare endometrosis. *Reprod Domest Anim Zuchthyg*. oct 2014;49 Suppl 4:82-7.
414. Beekman L, Tohver T, Léguillette R. Comparison of cytokine mRNA expression in the bronchoalveolar lavage fluid of horses with inflammatory airway disease and bronchoalveolar lavage mastocytosis or neutrophilia using REST software analysis. *J Vet Intern Med*. févr 2012;26(1):153-61.
415. Hinden S, Klukowska-Rötzler J, Janda J, Marti EI, Gerber V, Roosje PJ. Characterization of the inflammatory infiltrate and cytokine expression in the skin of horses with recurrent urticaria. *Vet Dermatol*. déc 2012;23(6):503-e99.
416. Davidson AJ, Edwards GB, Proudman CJ, Cripps PJ, Matthews JB. Cytokine mRNA expression pattern in horses with large intestinal disease. *Res Vet Sci*. juin 2002;72(3):177-185.

417. Gold JR, Perkins GA, Erb HN, Ainsworth DM. Cytokine profiles of peripheral blood mononuclear cells isolated from septic and healthy neonatal foals. *J Vet Intern Med.* juin 2007;21(3):482–488.
418. Jacobs CC, Holcombe SJ, Cook VL, Gandy JC, Hauptman JG, Sordillo LM. Ethyl pyruvate diminishes the inflammatory response to lipopolysaccharide infusion in horses: Ethyl pyruvate and lipopolysaccharide in horses. *Equine Vet J.* mai 2013;45(3):333–339.
419. Covalada L, Fuller FJ, Payne SL. EIAV S2 enhances pro-inflammatory cytokine and chemokine response in infected macrophages. *Virology.* 5 févr 2010;397(1):217.
420. Faleiros RR, Leise BB, Westerman T, Yin C, Nuovo GJ, Belknap JK. In vivo and in vitro evidence of the involvement of CXCL1, a keratinocyte-derived chemokine, in equine laminitis. *J Vet Intern Med.* oct 2009;23(5):1086-96.
421. Leise BS, Faleiros RR, Watts M, Johnson PJ, Black SJ, Belknap JK. Lamellar inflammatory gene expression in the carbohydrate overload model of equine laminitis: Lamellar inflammation in CHO laminitis. *Equine Vet J.* janv 2011;43(1):54–61.
422. Faleiros RR, Leise BS, Watts M, Johnson PJ, Black SJ, Belknap JK. Lamellar chemokine mRNA concentrations in horses with carbohydrate overload-induced laminitis. *Vet Immunol Immunopathol.* 15 nov 2011;144(1-2):45-51.
423. Zhao J, Poelaert KCK, Van Cleemput J, Nauwynck HJ. CCL2 and CCL5 driven attraction of CD172a+ monocytic cells during an equine herpesvirus type 1 (EHV-1) infection in equine nasal mucosa and the impact of two migration inhibitors, rosiglitazone (RSG) and quinacrine (QC). *Vet Res.* 27 2017;48(1):14.
424. Niedźwiedz A, Borowicz H, Kubiak K, Nicpoń J, Skrzypczak P, Jaworski Z, et al. Evaluation of serum cytokine levels in recurrent airway obstruction. *Pol J Vet Sci.* 1 déc 2016;19(4):785-91.
425. Mensikova M, Stepanova H, Faldyna M. Interleukin-17 in veterinary animal species and its role in various diseases: A review. *Cytokine.* 1 oct 2013;64(1):11-7.
426. Debrue M, Hamilton E, Joubert P, Lajoie-Kadoch S, Lavoie J-P. Chronic exacerbation of equine heaves is associated with an increased expression of interleukin-17 mRNA in bronchoalveolar lavage cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 1 mai 2005;105(1-2):25-31.
427. Sharshar T, Carlier R, Bernard F, Guidoux C, Brouland J-P, Nardi O, et al. Brain lesions in septic shock: a magnetic resonance imaging study. *Intensive Care Med.* mai 2007;33(5):798-806.
428. Costa LHA da, Júnior NN dos S, Catalão CHR, Sharshar T, Chrétien F, Rocha MJA da. Vasopressin Impairment During Sepsis Is Associated with Hypothalamic Intrinsic Apoptotic Pathway and Microglial Activation. *Mol Neurobiol.* 1 sept 2017;54(7):5526-33.
429. Jackson AC, Gilbert JJ, Young GB, Bolton CF. The Encephalopathy of Sepsis. *Can J Neurol Sci J Can Sci Neurol.* nov 1985;12(04):303–307.
430. Tauber SC, Bunkowski S, Brück W, Nau R. Septic metastatic encephalitis: coexistence of brain damage and repair. *Neuropathol Appl Neurobiol.* déc 2011;37(7):768–776.

431. Buttini M, Limonta S, Boddeke HW. Peripheral administration of lipopolysaccharide induces activation of microglial cells in rat brain. *Neurochem Int.* juill 1996;29(1):25-35.
432. Sharkey LC, DeWitt S, Stockman C. Neurologic signs and hyperammonemia in a horse with colic. *Vet Clin Pathol.* 2006;35(2):254–258.
433. Bloise FF, van der Spek AH, Surovtseva OV, Ortiga-Carvalho TM, Fliers E, Boelen A. Differential Effects of Sepsis and Chronic Inflammation on Diaphragm Muscle Fiber Type, Thyroid Hormone Metabolism, and Mitochondrial Function. *Thyroid Off J Am Thyroid Assoc.* avr 2016;26(4):600-9.
434. Wang Y, Pessin JE. Mechanisms for fiber-type specificity of skeletal muscle atrophy. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* mai 2013;16(3):243-50.
435. Belknap JK, Moore JN, Crouser EC. Sepsis—From human organ failure to laminar failure. *Vet Immunol Immunopathol.* juin 2009;129(3-4):155–157.
436. Chikuni K, Muroya S, Nakajima I. Absence of the Functional Myosin Heavy Chain 2b Isoform in Equine Skeletal Muscles. *Zoolog Sci.* 1 mai 2004;21(5):589-96.
437. Rivero J-LL, Piercy RJ. Chapter 2.1 - Muscle physiology: responses to exercise and training A2 - Hinchcliff, Kenneth W. In: Geor RJ, Kaneps AJ, éditeurs. *Equine Exercise Physiology* [Internet]. Edinburgh: W.B. Saunders; 2008 [cité 2 janv 2017]. p. 30-80. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780702028571500056>
438. Valentine BA, Löhr CV. Myonecrosis in three horses with colic: evidence for endotoxic injury. *Vet Rec.* 8 déc 2007;161(23):786-9.
439. Valentine BA, Löhr CV. Myonecrosis in three horses with colic: evidence for endotoxic injury. *Vet Rec.* 8 déc 2007;161(23):786-9.
440. Fujishima S. Organ dysfunction as a new standard for defining sepsis. *Inflamm Regen.* 2016;36:24.





# Annexes

## Annexe 1 : Critères clinique du score SOFA

Système/ Organe		Paramètre	Score				
			0	1	2	3	4
Système respiratoire		PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub>	>400 mmHg	<400 mmHg	<300 mmHg	<200 mmHg	<100 mmHg
Coagulation		Plaquettes	>150 10 <sup>3</sup> /μL	<150 10 <sup>3</sup> /μL	<100 10 <sup>3</sup> /μL	<50 10 <sup>3</sup> /μL	<20 10 <sup>3</sup> /μL
Système cardiovascul aire		PAM (pression artérielle)	>70 mmHg	<70 mmHg	Dobutamine ou dopamine <5 μg/kg/min	Dopamine <15 μg/kg/min (au	Dopamine >15 μg/kg/min (au
Foie		Bilirubine	<1,2 μmol/L	>1,2 μmol/L	>2 μmol/L	>6 μmol/L	>12 μmol/L
Système nerveux central		Score de Glasgow	15<6	13–14	10–12	6–9	<6
Rein		Créatinine	<1,2 μmol/L	>1,2 μmol/L	>2 μmol/L	> 3,5 μmol/L	>5 μmol/L
	Productio n d'urine					<500 mL/jour	<200 mL/jour

## Annexe 2 : Critères cliniques du score qSOFA

Système/ Organe	Paramètre	Score	
		0	1
<b>Système Respiratoire</b>	Fréquence respiratoire	<22 mpm	>22mpm
<b>Système Nerveux</b>	Statut mental	Normal	Altéré
<b>Système Cardiovasculaire</b>	Pression Artérielle Systolique (PAS)	<100 mmHg	>100 mmHg

## Annexe 3 : Score MODS SGI

Système/ Organe	Paramètre	Score			
		0	1	2	3
<b>Système respiratoire</b>	PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> , FR	>400 mmHg, Normale	<400 mmHg, Anormale	<300 mmHg	<200 mmHg
<b>Coagulation</b>	Plaquettes, Temps de prothrombine	>104 10 <sup>3</sup> /μL, <11,6	<104 10 <sup>3</sup> /μL, >11,6	<88 10 <sup>3</sup> /μL, >13,6	<55 10 <sup>3</sup> /μL, >14,3
<b>Système cardiovasculaire</b>	cTnI,  SVI,  SDNN	≤0.03 ng/mL, ≥1.4 mL/kg/min, >56 ms	>0.03 ng/mL, <1,4 mL/kg/min, <56 ms	>0.15 ng/mL, <1.2 mL/kg/min, <40 ms	>0.25 ng/mL, ≤0.9 mL/kg/min, <26.7 ms
<b>Foie</b>	Acides biliaires	<15 μmol/L	>15 μmol/L	>30 μmol/L	>50 μmol/L
<b>Système nerveux central/Attitude</b>	Score de comportement	<12	>12	>18	>23
<b>Rein</b>	Créatinine	<1,9 μmol/L	>1,9 μmol/L	>2,2 μmol/L	>3 μmol/L
<b>Système musculo-squelettique</b>	CK, Fourbure	<343, Absence	>343, Présence Grade I	>643	>943, Présence Grade II ou >
<b>Système Gastro-intestinal</b>	Reflux, Distension abdominale	<10 L/24h, Absence	>10 L/24h, Présence	>36 L/24h	>50 L/24h

## Annexe 4 : Score de défaillance multi-organique utilisé dans notre étude

Système/ Organe	Paramètre	Score			
		0	1	2	3
Système respiratoire	FR	Normale	Anormale		
Coagulation	Plaquettes	>104 10 <sup>3</sup> /μL	<104 10 <sup>3</sup> /μL	<88 10 <sup>3</sup> /μL	<55 10 <sup>3</sup> /μL
Système cardiovasculaire	FC	Normale	Anormale		
Foie	GGT	Normale	Anormale		
Système nerveux central/Attitude	Modification du comportement	Absence	Présence		
Rein	Créatinine	<1,9 μmol/L	>1,9 μmol/L	>2,2 μmol/L	>3 μmol/L
Système musculo-squelettique	CK, Fourbure	<343, Absence	>343, Présence Grade I	>643	>943, Présence Grade II ou >
Système Gastro-intestinal	Reflux, Distension abdominale	<10 L/24h, Absence	>10 L/24h, Présence	>36 L/24h	>50 L/24h

## Annexe 5 : Anticorps utilisés pour les marquages histologiques

ANTIGENE CIBLE	REFERENCE	DILLUTION	TYPE	HOTE
<b>ANTICORPS PRIMAIRES</b>				
Von Willebrand Factor	DAKO A0082	1/300	anti-VWF humain	Lapin
Laminine	Sigma L8271 clone LAM 89	1/500	IgG1 anti – laminine humaine	Souris
Laminine	SIGMA L9393	1/100	Polyclonal anti-laminine humaine	Lapin
Type 1	BA-D5 DSHB	1/100	IgG2b	Souris
Type 2B	BF-F3 DSHB	1/10	IgM	Souris
Type 2A	SC-71 DSHB	1/100	IgG1	Souris
Iba 1	PA5-27436	1/1000	IgG	Lapin
<b>ANTICORPS SECONDAIRES</b>				
IgG1 souris	A21124	1/200	AF 568	Poulet
IgM souris	A21042	1/200	AF 488	Poulet
IgG2b souris	A21242	1/200	AF 647	Poulet
IgG lapin	ABCAM ab175651	1/200	AF 405	Poulet
IgG lapin	Invitrogen	1/200	AF 488	Poulet
IgG lapin	Invirogen A21428	1/200	AF 555	Âne
IgG souris	Pierce	1/200	DL 488	Âne
IgG souris	Pierce	1/200	DL 550	Âne
IgG1 souris	VECTOR BA-2000	1/200	Biotinylé	Âne



**PREMONT Antoine**

## **CONSEQUENCES NEURO-MUSCULAIRES DU SEPSIS DANS UN MODELE SPONTANE EQUIN**

**Thèse d'Etat de Doctorat Vétérinaire : Lyon, le 14 décembre 2018**

Le sepsis est toujours considéré comme une priorité de santé publique à cause de du fort taux de mortalité en phase aigüe et des séquelles au long terme. Bien que la prise en charge ait progressé la physiopathologie des troubles neurologiques et musculaires associés au sepsis reste mal comprise. C'est pourquoi les modèles murins sont remis en questions et trouver un modèle préclinique pertinent est un vrai défi. Dans cette étude nous nous intéressons aux conséquences cérébrales et musculaires d'un syndrome abdominal aigu (colique) chez le cheval comme model préclinique de sepsis.

Des échantillons de cerveaux, de muscle et de plasma ont été prélevés sur 15 chevaux euthanasiés des suites de coliques ayant présenté des signes de sepsis et sur 9 chevaux morts de cause non-infectieuse. L'inflammation systémique a été étudiée en dosant les cytokines dans le plasma. L'activation microgliale a été caractérisée dans différentes régions du cerveau. La structure et le métabolisme musculaire ont aussi été évalués.

Une défaillance multi-organique et de fortes concentrations plasmatiques de cytokines pro et anti-inflammatoires ont été mises en évidence chez les chevaux septiques. Une diminution de la surface microgliale rapportée à la surface totale du tissu a été identifiée chez les chevaux septique dans le cortex frontal (6,3 vs 2,8 p=0,021) et occipital (10,6 vs 7,3 p=0,012) ainsi que dans le noyau caudé (12,6 vs 8 p=0,028), le mésencéphale (10,7 vs 6,8 p=0,004) et le cervelet (4,8 vs 3,5 p=0,04). Seule une augmentation significative du pourcentage de fibres de petite taille a été observée chez les chevaux septiques (20 vs 10% p=0,027) sans altération de la vascularisation ou du métabolisme musculaire.

Cette étude est la première de ce type dans l'espèce équine. Le modèle équin pourrait apporter des informations pertinentes à appliquer à la médecine humaine.

### **MOTS CLES :**

- Sepsis
- Modèles animaux
- Maladies
- Cheval
- Système nerveux

### **JURY :**

Président :	Monsieur le Professeur Jean-Jacques LEHOT
1er Assesseur :	Madame la Maître de Conférences Sara BELLUCO
2ème Assesseur :	Madame la Maître de Conférences Agnès BENAMOU-SMITH
Membre invité :	Monsieur le Docteur Gregory JOUVION

**DATE DE SOUTENANCE : 14 décembre 2018**