

Médiateurs de l'inflammation : modèles expérimentaux

Inflammatory mediators: experimental models

© SRLF et Springer-Verlag France 2012

SP221

Le *cisatracurium* diminue la production in vitro des médiateurs de l'inflammation

J.-M. Forel¹, S. Hraiech¹, F. Xeridat¹, C. Farnarier², C. Guervilly³, M. Adda Roblot⁴, V. Marin², L. Papazian¹, A. Roch¹

³Service de réanimation des détresses respiratoires et infections sévères, Urmite Cnrs-UMR 6236, université de la Méditerranée Marseille,

Assistance publique-Hôpitaux de Marseille, France

²Laboratoire d'immunologie, UMR 600-CNRS FRE 2059, Assistance publique-Hôpitaux de Marseille et université de la Méditerranée, Marseille, France

³Service de réanimation des détresses respiratoires et infections sévères, Assistance publique-Hôpitaux de Marseille, Marseille, France

⁴Service de réanimation des détresses respiratoires et infections sévères, Assistance publique-Hôpitaux de Marseille, Marseille, France

Introduction : La curarisation précoce lors du syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) réduit la mortalité, la durée de ventilation mécanique (VM) et la durée des défaillances d'organe associées [1]. Le *cisatracurium* a montré in vivo une réduction de la réponse pro-inflammatoire associée au SDRA et à la VM [2]. Les mécanismes physiopathologiques participants à ces effets bénéfiques restent inconnus. Un effet anti-inflammatoire direct du *cisatracurium* ne peut être exclu. Le but de cette étude est de déterminer l'effet anti-inflammatoire direct du *cisatracurium* sur des cellules monocytaires adhérentes et endothéliales.

Matériels et méthodes : Les effets de 1 et 10 µmol/ml de *cisatracurium* sur la production in vitro d'interleukine-1β, 6, 8, MCP-1 et TNF-alpha par des *human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC) et des cellules monocytaires adhérentes (CMA) avec ou sans stimulation par LPS (2 ng/ml) ont été étudiés. Les cytokines étaient mesurées sur les surnageants cellulaires par techniques Elisa après 24 heures. Les manipulations expérimentales ont été réalisées six à neuf fois en duplicats (moyenne). L'analyse statistique a été réalisée par tests non paramétriques. La condition « Contrôle » (pas de *cisatracurium*/ pas de LPS) a été comparée à la condition « *cisatracurium* 1 et 10 µmol/ml ». La condition « Contrôle LPS » (pas de *cisatracurium* et LPS+) a été comparée à la condition « *cisatracurium* 1 µmol/ml + LPS » et « *cisatracurium* 10 µmol/ml + LPS ». Les résultats sont exprimés en médiane [IQR], *p* inférieur à 0,05 est significatif.

Résultats : Sans LPS, les concentrations d'IL-6 et MCP-1 sont diminuées après adjonction de 10 µmol/ml de *cisatracurium* sur les HUVEC. Aucun effet n'est observé sur CMA non stimulées par LPS (Tableau 1).

Conclusion : Le *cisatracurium* réduit la production in vitro des cytokines pro-inflammatoires par les HUVEC et les cellules monocytaires adhérentes (CMA), en particulier en cas de stimulation par LPS.

Tableau 1. Effets du *cisatracurium* sur HUVEC et CMA stimulées par LPS

	HUVEC				
	Contrôle LPS	Cisatra 1 µmol/ml	Cisatra 10 µmol/ml	<i>p</i>	<i>p</i> *
MCP-1	16 962 [12 812–19 121]	13 002 [10 996–15 459]	5 658 [5 264–9 023]	0,001	0,001
IL-6	102 [92–109]	80 [61–99]	62 [60–84]	0,066	0,015
IL-8	2 380 [1 389–4 310]	2 463 [1 063–4 059]	1 289 [657–2 062]	ns	0,002
Cellules adhérentes					
	Contrôle LPS	Cisatra 1 µmol/ml	Cisatra 10 µmol/ml	<i>p</i>	<i>p</i> *
MCP-1	2 635 [1 374–2 840]	2 242 (1 156–2 362)	866 [440–1 067]	0,066	0,066
IL-1 bêta	134 [49–325]	112 (28–284)	37 [19–108]	0,006	< 0,001
IL-6	1 024 [607–2 935]	833 [609–3 462]	581 [421–1 221]	ns	< 0,001
IL-8	12 298 [6 709–21 675]	8 688 [6 732–17 015]	7 458 [3 374–12 144]	ns	0,01
TNF-alpha	1 458 [568–2 329]	835 [523–2 443]	537 [137–1 682]	ns	0,003

n = 9 pour toutes les conditions, sauf pour MCP-1 CMA (*n* = 6).
Unités : pg/ml pour toutes les cytokines.
p : comparaison témoin LPS vs *cisatracurium* 1 µmol/ml.
*p** : comparaison témoin LPS vs *cisatracurium* 10 µmol/ml.

Références

1. Papazian L, Forel JM, Gacouin A, et al (2010) Neuromuscular blockers in early acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 363:1107–16
2. Forel JM, Roch A, Marin V, et al (2006) Neuromuscular blocking agents decrease inflammatory response in patients presenting with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 34:2749–57

SP222

Effets de la dexaméthasone et de la protéine C activée dans un modèle d'ischémie-reperfusion

K. Issa¹, J. Perrin¹, N. Kettany¹, C. Montemont¹, B. Levy²

¹Groupe Choc, Inserm U961, Vandœuvre-lès-Nancy, France

²Service de réanimation médicale, CHU de Nancy,

hôpital Brabois-Adultes, Vandœuvre-lès-Nancy, France

Introduction : L'ischémie/reperfusion (I/R) intestinale est un phénomène très fréquent en clinique humaine. Ce phénomène est observé lors de la désobstruction d'une artère digestive mais aussi du traitement

d'un état de choc. L'interruption de la perfusion tissulaire (ischémie) et le rétablissement de celle-ci (reperfusion) induisent des troubles hémodynamiques et métaboliques. L'I/R intestinale est souvent présentée comme étant la principale source de l'hyperlactatémie et le moteur de la réponse inflammatoire lors des états de choc (cardiogénique, hypovolémique, septique). Parallèlement, elle est responsable de l'induction de la production et de la libération des espèces réactives de l'oxygène, des cytokines et du monoxyde d'azote (NO). Dans un modèle de choc septique, l'administration de la protéine C activée (PCa) ou de la dexaméthasone (Dexa) améliorerait l'hémodynamique, la fonction myocardique, la réactivité vasculaire et le temps de survie [1]. Par analogie au choc septique, nous avons émis l'hypothèse que ces deux molécules pouvaient être utilisées dans le traitement d'une I/R expérimentale. L'objectif de cette étude est de déterminer l'impact d'un traitement par la PCa ou la Dexa, sur l'amélioration des paramètres hémodynamiques, métaboliques ainsi que sur la réactivité vasculaire dans l'I/R expérimentale.

Matériels et méthodes : Pour cela, nous avons mis au point un modèle expérimental (rat Wistar) d'I/R par choc hémorragique retransfusé dans lequel nous nous sommes intéressés à l'étude des effets de ces deux molécules sur les paramètres cités auparavant ainsi que leurs effets anti-inflammatoires et antiapoptotiques.

Résultats : Les résultats obtenus montrent que l'administration de la PCa ou Dexa : 1) améliore les paramètres hémodynamiques et en particulier la pression artérielle moyenne (PAM) ; 2) corrige l'hyperlactatémie et l'acidose métabolique ; 3) améliore la réponse vasculaire aux vasoconstricteurs ; 4) a un effet anti-inflammatoire, en diminuant le taux des cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et TNF α) et en augmentant le taux des cytokines anti-inflammatoires (IL-10) ; 5) a un effet antiapoptotique en diminuant le taux des caspases 3 et 8 et de la protéine p-53. Nous avons aussi observé une *down regulation* de iNOS, une restauration de la voie eNOS-Akt et une *up regulation* des adrénerécepteurs α -1 vasculaires.

Conclusion : Nous avons montré dans ce travail : 1) que l'ischémie reperfusion induite par le clampage de l'aorte abdominale reproduit les manifestations du choc septique ; 2) que deux traitements efficaces dans le sepsis le sont aussi dans l'I/R, et ce, par les mêmes mécanismes. Ce travail suggère donc fortement une communauté physiopathologique et thérapeutique dans la grande famille des états de choc. Enfin, les glucocorticoïdes, molécules peu onéreuses, pourraient constituer une thérapeutique d'appoint dans cette pathologie. Une étude humaine semble maintenant nécessaire.

Référence

1. Bouazza Y, Sennoun N, Strub C, et al (2011) Comparative effects of recombinant human activated protein C and dexamethasone in experimental septic shock. *Intensive Care Med* 37:1857–64

SP223

Le plasma de patient septique induit une altération du métabolisme oxydatif de cellules endothéliales

L. Dupic¹, O. Huet², A. Harrois³, S. Lecart⁴, E. Vicaut⁵, J. Duranteau⁶

¹Service de réanimation pédiatrique, CHU Necker-Enfants-Malades, Paris, France

²Laboratoire de biologie, Bakerid Heart and Diabetes Institute, Melbourne, Australia

³DAR, CHU de Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France

⁴Clups, centre laser de l'université Paris-Sud ; centre de photonique biomédicale, Orsay, France

⁵CIC, hôpital Fernand-Widal, Paris, France

⁶Département d'anesthésie et réanimation, CHU de Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France

Introduction : Le choc septique est pourvoyeur d'une mortalité importante dans nos unités par le biais d'une défaillance multiviscérale (DMV). Les mécanismes cellulaires de cette défaillance sont complexes et mal connus. La dysfonction endothéliale (DE) pourrait constituer un des éléments à l'origine de cette DMV. En particulier, le sepsis pourrait induire une altération du métabolisme endothélial. Le rôle des espèces radicalaires liées à l'oxygène (ERO) dans cette altération métabolique pourrait être central. Le but de notre travail a été d'analyser la production d'ERO et l'auto fluorescence du NAD (P) H dans un modèle de cellules microcirculatoires humaines d'artère pulmonaire (HPMEC) exposé à du sérum de patient en choc septique.

Patients et méthodes : Les cellules ont été perfusées soit par du sérum de patients en choc septique, soit par du sérum de témoins sains. Un microscope confocal nous a permis une analyse de la fluorescence au sein de la cellule. Le métabolisme oxydatif des HPMEC a été analysé par l'auto fluorescence du NAD (P) H. L'étude des ERO a été effectuée par un marqueur fluorescent MitoSOX. Une analyse de la colocalisation au microscope confocale est effectuée afin de déterminer le lieu de production des espèces radicalaires endothéliales. L'analyse statistique a été réalisée par Anova comparant les mesures entre les patients en choc septique et les volontaires sains. Une valeur de *p* inférieure à 0,05 a été considérée comme significative.

Population : Ont été inclus 12 patients en choc septique selon les critères de Bone d'un âge médian de 65 ans (± 21) et d'un SOFA médian de 9 (3–13). Les sera ont été prélevés sur des tubes à EDTA et conservés à -80°C . Ces sera sont comparés à des sera de volontaires sains non appariés en âge.

Résultats : La production d'ERO était significativement plus élevée avec le sérum des patients en choc septique ($197 \text{ UI} \pm 244$ vs $139 \text{ UI} \pm 75$; [*p* < 0,05]). Le sérum des patients en choc septique a induit une augmentation de l'auto fluorescence du NAD (P) H significativement supérieure à celle induite par le sérum des témoins ($311 \text{ UI} \pm 211$ vs $184 \text{ UI} \pm 49$; *p* < 0,05). L'analyse en colocalisation de la production d'ERO montre que la production d'espèces radicalaires est localisée au niveau mitochondrial. Cela nous permet de mettre en évidence ainsi une concomitance de la modification du métabolisme oxydatif et de la production d'ERO.

Conclusion : Notre étude confirme que le plasma de patient septique induit une production d'espèces radicalaires. Cette production apparaît être au niveau mitochondrial. Elle s'accompagne d'une altération du métabolisme oxydatif traduite par l'augmentation de la fluorescence du NAD (P) H. L'existence d'une causalité entre la production d'espèces radicalaires et l'éventuelle altération du métabolisme oxydatif reste à démontrer.

Bibliographie

1. Huet O, Dupic L, Harrois A, Duranteau J (2011) Oxidative stress and endothelial dysfunction during sepsis. *Front Biosci* 16:1986–95
2. Harrois A, Huet O, Duranteau J (2009) Alterations of mitochondrial function in sepsis and critical illness. *Curr Opin Anaesthesiol* 22:143–9

SP224

Rôle de l'IL-10 dans l'augmentation de l'expression des ARNm de S100A8 et S100A9

au cours du phénomène de tolérance à l'endotoxine

M. Fontaine¹, S. Planel², E. Peronnet², V. Barbalat³, E. Cerrato², C. Arnaud², F. Wallet¹, C. Tassin¹, V. Piriou¹, J. Bohe¹, A. Pachot², G. Monneret³, A. Lepape¹, F. Venet³

¹Pam urgence, soins critiques, anesthésie, CHU de Lyon, centre hospitalier Lyon-Sud, Pierre-Bénite, France

²Laboratoire commun de recherche « Sepsis » HCL-Biomérieux, CHU de Lyon, hôpital Édouard-Herriot, Lyon, France
³Laboratoire d'immunologie, CHU de Lyon, hôpital Édouard-Herriot, Lyon, France

Introduction : Le choc septique est caractérisé par le développement d'une réponse inflammatoire précoce suivie d'une phase d'immunosuppression. Cette dysfonction immunitaire, associée à une augmentation de la mortalité et des infections nosocomiales, est caractérisée par l'apparition d'un phénomène de tolérance à l'endotoxine (ET ; moindre capacité des leucocytes à produire des cytokines pro-inflammatoires en réponse au LPS). Les alarmines sont des signaux de danger endogènes produits en réponse à un stress cellulaire ou un dommage tissulaire. S100A8 et S100A9 sont deux alarmines produites par les monocytes et les neutrophiles. Nous avons récemment montré que les ARNm des alarmines S100A8 et S100A9 étaient augmentés chez des patients en choc septique, et qu'une augmentation différée de l'ARNm de S100A9 prédisait la survenue d'infections nosocomiales [1]. Notre objectif est d'étudier la régulation de l'expression des ARNm de S100A8 et S100A9 dans un modèle *ex vivo* de tolérance à l'endotoxine.

Matériels et méthodes : Le phénomène de tolérance à l'endotoxine est reproduit *ex vivo* en exposant des cellules à de faibles doses d'endotoxine induisant un état réfractaire à une nouvelle exposition. Des cellules mononucléées du sang périphérique sont ainsi isolées à partir de volontaires sains et stimulées consécutivement par 2 et 100 ng/ml de LPS, en l'absence ou présence d'un anticorps bloquant l'IL-10 extracellulaire. L'expression des ARNm du TNF α , de l'IL-10, de S100A8 et S100A9 est mesurée par RT-qPCR.

Résultats : Le phénomène de tolérance à l'endotoxine est associé à une diminution de l'ARNm du TNF α , une augmentation de l'IL-10 et une augmentation des ARNm de S100A8 et S100A9. Les niveaux d'expression de ces alarmines sont corrélés à celui de l'IL-10. La littérature suggérant un rôle de l'IL-10 dans la régulation de leur expression, le blocage de l'IL-10 dans notre modèle a montré que l'augmentation de S100A8 et S100A9 était partiellement inhibée par le blocage de l'IL-10 après une ou deux stimulations par du LPS.

Conclusion : L'expression des ARNm de S100A8 et S100A9 est significativement augmentée dans notre modèle *ex vivo* de tolérance à l'endotoxine mimant les dysfonctions monocytaires habituellement observées dans ce type de modèle. Nous reproduisons ainsi *ex vivo* les observations réalisées chez des patients en choc septique. Le blocage de l'IL-10 abolit partiellement l'augmentation des ARNm de S100A8 et S100A9, suggérant un rôle de cette cytokine dans la régulation de leur expression dans notre modèle et plus généralement chez les patients en choc septique.

Référence

- Fontaine M, Pachot A, Larue A, et al (2011) Delayed increase of S100A9 messenger RNA predicts hospital-acquired infection after septic shock. *Crit. Care Med* 39:2684–90

SP225

QSOX1, un nouveau facteur de protection cardiaque lors du sepsis chez la souris

A. Blet, R. Bern, M. Sadoune, N. Bihry, J.L. Samuel, A. Mebazaa
Inserm U942, hôpital Lariboisière, université Paris-VII, Paris, France

Introduction : Le sepsis constitue une des causes majeures de décès en réanimation. La dysfonction myocardique est fréquente au cours du sepsis. QSOX1 (Q6 ou quiescin sulphydryl oxidase 1) [1], un des

nouveaux biomarqueurs d'intérêt dans le diagnostic d'une défaillance cardiaque aiguë, est induit dans le cœur lors du choc septique chez le rat et la souris. L'objectif du travail a été de déterminer le rôle de QSOX1 dans ce contexte.

Matériels et méthodes : Le sepsis (S) chez la souris (Balb/c, mâles) était induit par une ligature et perforation cœcale (CLP). Les animaux ($n = 8-10$ /groupes) recevaient en intrapéritonéal de la trichostatine A (TSA) [0,8 mM/kg], un inhibiteur de HDAC, ou des oligonucléotides antisens (0,5 μ g/kg) ciblant QSOX1 (AOs) [2]. La survie était analysée par courbe de Kaplan-Meier et Log Rank test. Les animaux étaient sacrifiés à la 18^e heure pour analyse du phénotype cardiaque par analyse de transcripts (QSOX1, ANP, BNP, TNF- α , IL1 β , IL10, IL1 α).

Résultats : Le sepsis entraîne une mortalité rapide des souris (100 % à 36 heures), le traitement par TSA améliore la survie ($p < 0,01$). En revanche, les AOs aggravent la dysfonction cardiaque et accélèrent la mortalité ($p < 0,05$). Le sepsis s'accompagne de l'induction des ARNm codant pour QSOX1, BNP, ANP, TNF- α , IL10, IL1 β , IL1 α , ($p < 0,05$ versus Sham). La TSA augmente l'expression de QSOX1 mais prévient significativement l'augmentation des autres transcripts. En revanche, les AOs spécifiques de QSOX1 aggravent l'expression d'ANP, de BNP, de TNF α et bloquent celle des IL1 β , IL1 α , et IL10 dans le cœur.

Conclusion : QSOX1 émerge non seulement comme un biomarqueur de l'insuffisance cardiaque aiguë, mais aussi comme un nouvel acteur des réponses cardiaques au stress associé à la dysfonction aiguë.

Références

- Mebazaa A, Vanpoucke G, Thomas G, et al (2012) Unbiased plasma proteomics for novel diagnostic biomarkers in cardiovascular disease: identification of quiescin Q6 as a candidate biomarker of acutely decompensated heart failure. *Eur Heart J* 33:2317–24
- Merki E, Graham MJ, Mullick AE, et al (2008) Antisense oligonucleotide directed to human apolipoprotein B-100 reduces lipoprotein(a) levels and oxidized phospholipids on human apolipoprotein B-100 particles in lipoprotein(a) transgenic mice. *Circulation* 118:743–53

SP226

Hmgb1 promotes neutrophil extracellular trap formation through interactions with toll-like receptor 4

J.M. Tadié¹, H.B. Bae², C. Bell², H. Yang³, K. Tracey³, V. Thannickal², E. Abraham⁴, J. Zmijewski²

¹Service des maladies infectieuses et réanimation médicale, CHU de Rennes–hôpital Pontchaillou, Rennes, France

²Department of Medicine, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, United States

³Feinstein Institute for Medical Research,

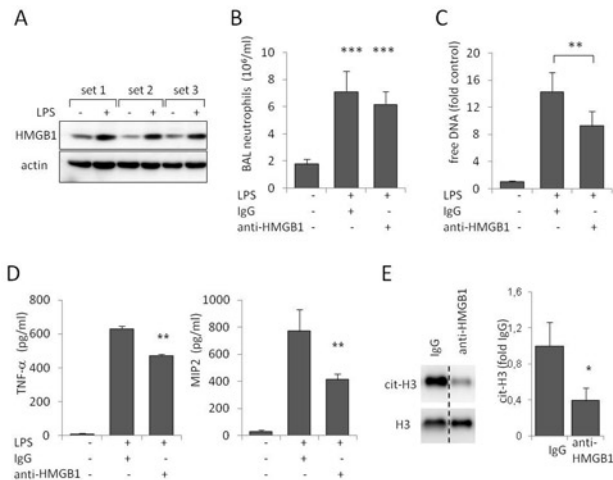
Feinstein Institute for Medical Research, Manhasset, United States

⁴Wake Forest School of Medicine, Wake Forest School of Medicine, Winston-Salem, United States

Introduction: Although neutrophil extracellular traps (NETs) form to prevent dissemination of pathogenic microorganisms, excessive release of DNA and DNA associated proteins can also perpetuate sterile inflammation. In this study, we found that the danger associated molecular pattern protein High Mobility Group Box 1 (HMGB1) can induce NET formation.

Results: NET formation was found after exposure of wild type and RAGE deficient neutrophil to HMGB1 whereas deficiency of TLR4 diminished the ability of neutrophils to produce NETs. Incubation of neutrophils with HMGB1 significantly increased the amount of DNA

released as well as histone 3 citrullination, a signaling event that precedes chromatin de-condensation. In vivo, neutrophils isolated from bronchoalveolar lavages of mice exposed to LPS and HMGB1 showed consistently greater ability to produce NETs as compared to pulmonary neutrophils from mice that received LPS alone. In contrast, mice treated with LPS and neutralizing antibody to HMGB1 had decreased amounts of the inflammatory cytokines TNF- α and MIP2, as well as of free DNA in bronchoalveolar lavage fluids. Airway neutrophils from LPS exposed mice that had been treated with anti-HMGB1 antibodies showed decreased citrullination of histone 3. These results demonstrate that interactions between HMGB1 and TLR4 enhance the formation of NETs, and provide a novel mechanism through which HMGB1 may contribute to the severity of neutrophil associated inflammatory conditions.



Effects of HMGB1 neutralizing antibody on NETs formation. (A) Amount of HMGB1 and actin determined in whole lung from mice subjected to LPS induced ALI. (B) shows number of neutrophil obtained from BALs whereas (C) demonstrates free DNA that was measured in BALs. (D) Amount of TNF and MIP2 cytokines were measured in BALs of control mice (saline) or mice that received LPS and IgG or LPS and HMGB1 neutralizing antibody. (E) Western blot and quantitative analysis show amount of citrullinated histone 3 (cit-H3) and total histone (H3). Cell extract was prepared from BAL neutrophils isolated from mice subjected to LPS (i.t.) and anti-HMGB1 antibody (i.p.) or LPS (i.t.) and IgG (i.p.) administration.

Conclusion: These results demonstrate that interactions between HMGB1 and TLR4 enhance the formation of NETs, and provide a novel mechanism through which HMGB1 may contribute to the severity of neutrophil associated inflammatory conditions.

SP227

Impact de la ventilation mécanique sur la réponse inflammatoire pulmonaire et systémique de l'hôte médiée par TLR2 dans un modèle animal de PAVM à SARM

R. Bruyère¹, L.A. Pauchard², S.D. Barbar¹, F. Dalle³, P.E. Charles¹
¹Service de réanimation médicale, CHU de Dijon, complexe du Bocage, Dijon, France

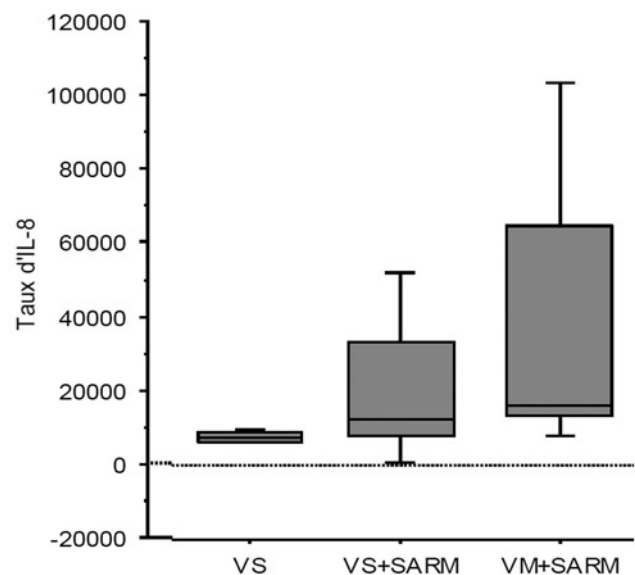
²Inra, UMR agroécologie, pôle microbiologie environnementale et risque sanitaire Ea 562, Dijon, France

³Laboratoire de mycologie, plateau technique de biologie, CHU de Dijon, France

Introduction : Le poumon est une cible privilégiée des bactéries chez les patients de réanimation soumis à la ventilation mécanique, aboutissant ainsi aux pneumopathies acquises sous ventilation mécanique (PAVM). *Staphylococcus aureus* est un des principaux germes retrouvés lors des PAVM. Comme nous l'avons montré précédemment, la ventilation mécanique induit la surexpression de *toll-like receptor 2* (TLR2), aboutissant à l'activation de voies de signalisation intracellulaires déterminant les caractéristiques de la réponse inflammatoire. Notre travail étudie l'impact de la ventilation mécanique sur la réponse immunitaire de l'hôte médiée par TLR2, au cours d'une pneumopathie à *S. aureus* méticilline-résistant (SARM).

Matériels et méthodes : Nous avons pu inoculer 20 lapins par SARM : dix dans un groupe « ventilation spontanée » (VS + SARM) et dix dans un groupe « ventilation mécanique » (VM + SARM). Après une période préalable de ventilation de 24 heures, un inoculum de 10 log UFC/ml de SARM était administré dans les voies aériennes. La ventilation était poursuivie durant 24 heures supplémentaires dans ce groupe, les autres laissés en ventilation spontanée avant d'être autopsiés. Un groupe « ventilation spontanée » (VS) servait de contrôle. Les analyses effectuées portaient sur : 1) la mesure de la charge bactérienne pulmonaire par culture de broyats de poumon ; 2) l'évaluation de la réponse inflammatoire pulmonaire et systémique, par quantification de l'expression du gène de l'IL-8 et du TNF- α par RT-qPCR dans les broyats de poumon et dosage de l'IL-8 et du TNF- α en Elisa dans les broyats de poumon et le sérum ; 3) l'analyse des dommages tissulaires par analyse microscopique.

Résultats : La charge bactérienne du poumon était significativement inférieure chez les animaux du groupe VM + SARM par rapport au groupe VS + SARM. L'inflammation pulmonaire est augmentée chez les animaux ventilés. Pour l'IL-8, l'expression du gène est augmentée dans le groupe VM + SARM par rapport au groupe VS + SARM. Nous observons des concentrations supérieures en IL-8 respectivement dans le groupe VS + SARM et VM + SARM par rapport au groupe VS. Pour le TNF- α , on observe une augmentation de l'expression génique et du taux de cytokine elle-même. L'inflammation systémique est également augmentée. On observe une augmentation croissante de l'IL-8 dans le sérum jusqu'à h6 puis une diminution jusqu'à h24 dans les deux groupes. Pour le TNF- α , on observe une augmentation progressive dans le groupe VM + SARM mais une stabilité du TNF- α au cours du temps. L'atteinte histologique quantifiée par analyse microscopique montre des dommages tissulaires plus importants dans les groupes inoculés.



Conclusion : Pour conclure, nous avons montré, dans ce modèle de PAVM à SARM, que la ventilation mécanique réduit la clairance bactérienne pulmonaire et augmente l'inflammation pulmonaire et systémique. Ce modèle pourrait être utilisé afin de tester la réponse aux thérapeutiques antibiotiques ou immunomodulatrices.

Bibliographie

1. Charles PE, Tissières P, Barbar SD, et al (2011) Mild-stretch mechanical ventilation upregulates toll-like receptors 2 and sensitizes the lung to bacterial lipopeptide. *Crit Care* 15:R181
2. Dhanireddy S, Altemeier WA, Matute-Bello G, et al (2006) Mechanical ventilation induces inflammation, lung injury, and extrapulmonary organ dysfunction in experimental pneumonia. *Lab Invest* 86:790–9

SP228

Assurer la protection animale tout en conservant les exigences scientifiques lors de l'utilisation de modèles de choc septique chez la souris

O. Huet¹, D. Ramsey², S. Miljavec², A. Jenney³, C. Aubron⁴, A. Aprico¹, N. Stefanovic⁵, B. Baklaou⁶, G. Head⁷, J. de Haan⁵, J. Chin-Dusting¹

¹*Vascular Pharmacology, Bakeridi Heart and Diabetes Institute, Melbourne, Australia*

²*Animal Precinct, Bakeridi Heart and Diabetes Institute, Melbourne, Australia*

³*Infectious Disease Department, Alfred Hospital, Melbourne, Australia*

⁴*Anzic Rc, Monash University, Melbourne, Australia*

⁵*Oxidative Stress Laboratory, Bakeridi Heart and Diabetes Institute, Melbourne, Australia*

⁶*U1018, Inserm, Paris, France*

⁷*Neuropharmacology Laboratory, Bakeridi Heart and Diabetes Institute, Melbourne, Australia*

Introduction : Depuis 1959, les 3Rs (remplacement, raffinement, réduction) sont la pierre angulaire de la protection animale pour la recherche biomédicale. Au cours d'expérimentations impliquant des modèles animaux, la mort comme objectif principal est éthiquement et donc légalement, dans certains pays, inacceptable. Cependant, lors d'études expérimentales sur le choc septique la mort reste le seul

objectif principal considéré comme pertinent. L'objectif de cette étude est de développer un score d'évaluation clinique standardisé lors d'expérimentations utilisant un modèle de choc septique chez la souris.

Matériels et méthodes : Cette étude expérimentale ouverte non randomisée a reçu l'autorisation du comité d'éthique animal de l'AMREP (Melbourne, Australie). Chez des souris C57Bl6, le sepsis a été induit par injection intratrachéale de *Klebsiella pneumoniae*. Huit critères d'évaluation sans cruauté (aspect de la fourrure, comportement, posture, bruits respiratoires, fréquence respiratoire, yeux, perte de poids) ont été déclinés en quatre degrés de sévérité (de sain à moribond) et ont été utilisés pour mettre au point un outil pertinent de notation appelé « Mouse-Clinical Assessment Score for Sepsis (M-CASS) ». Le but de ce score est de permettre une approche cohérente pour évaluer la sévérité du sepsis chez la souris. Il permettrait une appréciation éthique et objective de la sévérité de la maladie. Les animaux seront ainsi euthanasiés plutôt que d'attendre leur décès. Pour valider le M-CASS, sept scientifiques ont testé la cohérence du score. La mesure de cytokines (TNF- α , IL-6, IL-1 α , IL-1 β , IL-10) et celle de marqueurs de stress oxydant ont été faites pour chaque score.

Résultats : Cent huit souris furent utilisées pour cette étude. Le M-CASS présente une cohérence interne élevée (coefficient alpha de Cronbach = 0,97) et un degré d'interrelation inter-observateurs élevé (ICC = 0,91). Les dosages plasmatiques d'IL-1 α (score 4 : 569,8 \pm 184,5 pmol/ml ; score 3 : 120,1 \pm 44,11 ; score 2 : 42,7 \pm 13,91 pmol/ml), d'IL-1 β (score 4 : 79,32 \pm 32,48 pmol/ml ; score 3 : 6,9 \pm 1,531 pmol/ml ; score 2 : 6,95 \pm 1,53), de TNF- α (score 4 : 75,31 \pm 26,07 pmol/ml ; score 3 : 13,27 \pm 5,17 pmol/ml ; score 2 : 1,51 \pm 0,27 pmol/ml), d'IL-6 (score 4 : 3 018 \pm 755,9 pmol/ml, score 3 : 401 \pm 121,3 score 2 : 175,4 \pm 91,93 pmol/ml), d'IL-10 et des marqueurs de stress oxydant étaient caractéristiques de chaque score (Kruskal-Wallis test, $p < 0,05$).

Discussion : L'utilisation du M-CASS permet de ne pas avoir recourt à la mort comme objectif principal. De plus, il reflète l'évolution de la réponse inflammatoire au cours du sepsis permettant une meilleure appréciation du stade de la maladie. L'évolution du syndrome septique dépend des individus, ce score devrait assurer une meilleure standardisation du modèle en permettant de choisir un stade d'évolution plutôt qu'un temps fixé arbitrairement.

Conclusion : Le M-CASS permet de suivre l'évolution de la réponse inflammatoire et permet d'adhérer aux bonnes pratiques éthiques lors de l'emploi de modèles de choc septique chez la souris.