



**HAL**  
open science

# Implication des pièges extracellulaires dans la neuro-inflammation induite par infection ou par traumatisme médullaire

Camille Bourcier

► **To cite this version:**

Camille Bourcier. Implication des pièges extracellulaires dans la neuro-inflammation induite par infection ou par traumatisme médullaire. Immunologie. Université Paris-Saclay, 2024. Français. NNT : 2024UPASQ005 . tel-04620909

**HAL Id: tel-04620909**

**<https://theses.hal.science/tel-04620909v1>**

Submitted on 22 Jun 2024

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Implication des pièges extracellulaires dans la neuro-inflammation induite par infection ou par traumatisme médullaire

*Involvement of extracellular traps in neuroinflammation induced by  
infection or spinal cord injury*

## Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 569, Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué  
(ITFA)

Spécialité de doctorat : Physiologie et physiopathologie  
Graduate School : Santé et médicaments

Référent : Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines

Thèse préparée dans les unités de recherche **END-ICAP** (Université Paris-Saclay, UVSQ, Inserm) et **Infection et inflammation** (Université Paris-Saclay, UVSQ, Inserm), sous la direction de **Stéphane VINIT**, Maître de Conférences, HDR, et la co-direction d'**Arnaud MANSART**, Maître de Conférences, HDR

Thèse soutenue à Montigny le Bretonneux, le 21 mai 2024, par

**Camille BOURCIER**

## Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

<b>François VIALARD</b> Professeur des Universités – Praticien hospitalier, Université Paris-Saclay	Président
<b>Antoine KIMMOUN</b> Professeur des Universités – Praticien hospitalier, CHRU Nancy	Rapporteur et examinateur
<b>Caroline SEVOZ-COUCHE</b> Chargée de recherche, HDR, Sorbonne, UPMC	Rapporteur et examinateur
<b>Fabienne TAMION</b> Professeure des Universités – Praticienne hospitalière, CHU Rouen	Examinateur

**Titre : Implication des pièges extracellulaires dans la neuro-inflammation induite par infection ou par traumatisme médullaire**

**Mots clés :** sepsis, lésion moelle épinière, inflammation, pièges extracellulaires,  $\beta$ 1-bloquants, système nerveux.

**Résumé :** Qu'il soit déclenché par une infection ou par un traumatisme, un dérèglement de la réponse immunitaire peut avoir de graves conséquences. Généralement étudiés indépendamment, ces origines différentes peuvent toutefois mettre en jeu des mécanismes communs. Au cours de ma thèse, j'ai donc cherché à étudier plusieurs de ces mécanismes. L'un d'entre eux a plus particulièrement retenu mon attention : la production de pièges extracellulaires (ETs). Pour évaluer ces possibles interactions, j'ai travaillé sur deux pathologies : le sepsis, en tant que facteur infectieux, et la lésion de la moelle épinière, en tant que facteur d'origine traumatique. Les études menées après lésion de la moelle épinière ont permis de caractériser les types cellulaires produisant les ETs dans ce modèle. Celles menées sur deux modèles précliniques de sepsis ont permis de caractériser et explorer les effets des ETs sur les troubles neuromusculaires au cours de cette pathologie. Ces troubles peuvent être atténués par l'administration d'un inhibiteur spécifique de la production de ETs ou par une modulation spécifique du système adrénergique, ce qui a également permis de réduire les dysfonctions d'organes et d'améliorer la survie. Cette piste thérapeutique semble prometteuse et pourrait être envisagée afin d'améliorer la prise en charge des patients atteints d'une neuro-inflammation excessive.

**Title : Involvement of extracellular traps in neuroinflammation induced by infection or spinal cord injury**

**Keywords :** sepsis, spinal cord injury, inflammation, extracellular traps,  $\beta$ 1-blockers, nervous system.

**Abstract :** Whether triggered by infection or trauma, immune dysfunction can have serious consequences. Usually studied independently, these different origins may nevertheless involve common mechanisms. In the course of my thesis, I set out to study several of these mechanisms. One in particular caught my attention: the production of extracellular traps (ETs). To assess these possible interactions, I worked on two pathologies: sepsis, as an infectious factor, and spinal cord injury, as a factor of traumatic origin. Studies carried out after spinal cord injury enabled us to characterize the cell types producing ETs in this model. Studies carried out on two preclinical models of sepsis have enabled us to characterize and explore the effects of ETs on neuromuscular disorders in this pathology. These disorders can be alleviated by the administration of a specific inhibitor of ETs production, or by specific modulation of the adrenergic system, which has also been shown to reduce organ dysfunction and improve survival. This appears to be a promising therapeutic avenue which could be considered to improve the management of patients with excessive neuroinflammation.

# REMERCIEMENTS

---



Je remercie tout d'abord mes rapporteurs, le Pr Antoine Kimmoun et le Dr Caroline Sévoz-Couche, et mes examinateurs de thèse, le Pr François Vialard et le Pr Fabienne Tamion, pour avoir accepté de consacrer leur temps à la lecture et l'évaluation de mon travail de thèse. Je tiens également à remercier le Dr Aurore Rincheval pour son expertise lors de mon comité de suivi de thèse.

J'exprime toute ma gratitude au Dr Luis Garcia et au Pr Jean-Louis Herrmann pour m'avoir accueilli dans les unités INSERM-UVSQ qu'ils dirigent, respectivement « le laboratoire Handicap neuromusculaire : physiopathologie, biothérapie et pharmacologie appliquées (END-ICAP, U1179) », et « l'UMR 2I (Infection et Inflammation, U1173) ».

Je remercie également le Pr Djillali Annane et le Pr Marcel Bonay, pour leur accueil au sein des équipes « Laboratoire d'étude de la réponse neuroendocrine au sepsis » et « Handicap et inflammation ».

Je remercie sincèrement le Dr Stéphane Vinit et le Dr Arnaud Mansart pour m'avoir encadré et conseillé, ainsi que pour les nombreuses connaissances qu'ils m'ont permis d'acquérir durant mes années de masters et de thèse. Merci de m'avoir appris tout ce que vous pouviez, de m'avoir emmené en congrès et de m'avoir fait découvrir Hooters. Grace à vous, j'ai appris la patience, la rigueur, la persévérance, et l'alignement des images au pixel près.

Je remercie également les ingénieurs et les étudiants de mes équipes d'accueil : le Dr Lucille Adam, Laila Emam, le Dr Adeline Gasser, le Dr Pauline Michel-Flutot, Elodie Lamy, le Dr Thérèse Deramaudt, le Dr Isley De Jesus et Valentin Vanhée, pour leur soutien technique et leur aide durant ces années. Lucile, je te suis reconnaissant de m'avoir appris énormément de choses en cytométrie, et Laila, grâce à toi, je sais maintenant que n'importe quel mot peut devenir un verbe. Merci aussi pour la nourriture toujours disponible (un peu trop !) dans le bureau.

J'exprime également ma gratitude envers les membres des plateformes de l'UFR Simone Veil, en particulier le Dr Simon Glatiny, Olivier Le Coz, Aude Malfait-Jobart et Anne-Laure Raveu. Merci aux chercheurs qui m'ont aidé à effectuer mes enseignements le Dr Hadia Moindjie, le Dr Jean-Marc Corsi, le Dr Fabienne Misguich et le Dr Tom Hutteau. Sans oublier tous les membres des différentes équipes du labo qui m'ont aidé de près ou de loin, que ce soit pour les manip ou simplement par leur présence et leur soutien.

## REMERCIEMENTS

Je remercie également les membres de SQY Therapeutics en particulier le Dr Fédor Svirnatchouk et Graziella Griffith pour leurs conseils scientifiques et leur aide technique, Pierre-Olivier Buclez pour ses conseils éclairés sur la vie et le Dr Christophe Blaszykowski pour l'engraissement de mes poules au pain sec.

Je remercie particulièrement le Dr Laurie Efthimiadi pour ses conseils et son aide précieuse tout au long de ma thèse, et pour sa patience pour me supporter pendant toutes ces années.

Enfin, je remercie sincèrement ma mère pour m'avoir toujours soutenu et pour ses relectures de ma thèse pour « l'hortohgraphe ».

## **ABRÉVIATIONS**

---

ADN : acide désoxyribonucléique  
 AMPc : adénosine monophosphate cyclique  
 ATP : adénosine triphosphate  
 BBB score : test de Basso, Beattie et Bresnahan  
 BDNF : facteur neurotrophique issu du cerveau  
 BETs : basophil extracellular traps  
 BHE : barrière hémato-encéphalique  
 BPI : protéine augmentant la perméabilité bactérienne  
 C2 : deuxième vertèbre cervicale  
 C5a : composants du complément 5a  
 Ca<sup>2+</sup> : ion calcium  
 CASP : péritonite sur stent du colon ascendant  
 CLP : modèle de ligature et ponction cœcale  
 CMH : complexe majeur d'histocompatibilité  
 CRP : protéine C réactive  
 CSPG : protéoglycanes de chondroïtine sulfate  
 CXCR : récepteur des chimiokines  
 DAMPs : modèles moléculaires associés aux dommages  
 ECFA : facteur chimiotactique de l'anaphylaxie des éosinophiles  
 EETs : eosinophil extracellular traps  
 ETs : pièges extracellulaires  
 FasL : ligand de Fas  
 FiO<sub>2</sub> : fraction d'oxygène inspiré  
 fMLP : formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine  
 G-CSF : facteur de stimulation des colonies de granulocytes  
 GDNF : facteur neurotrophique dérivé des cellules gliales  
 GM-CSF : facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages  
 GSDMD : gasdermine D  
 H3 : histone-3  
 H3 citr : histone-3 citrullinée  
 HOCl : acide hypochloreux  
 Iba1 : ionized calcium-binding adapter molecule 1

ICAM-1 : molécule d'adhésion intercellulaire-1  
ICUAW : faiblesse acquise en unité de soins intensifs  
IFN : interféron  
IL : interleukine  
iNOS : oxyde nitrique synthase inductible  
IRA : insuffisance rénale aiguë  
LBP : protéine de liaison au LPS  
LPS : lipopolysaccharides  
MBP : mannose binding protein  
MCETs : mast cell extracellular traps  
Mcl-1 : leucémie à cellules myéloïdes  
METs : monocyte extracellular traps  
MFI : intensité de fluorescence moyenne  
MiETs : microglia extracellular traps  
MMP : métalloprotéinase matricielle  
MPO : myéloperoxydase  
mTOR: mammalian target of rapamycin  
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate  
NE : élastase neutrophile  
NETs : pièges extracellulaires des neutrophiles  
NK : natural killer  
NO : oxyde nitrique  
NOX : NADPH oxydase  
OMS : Organisation mondiale de la santé  
PAD4 : peptidylarginine déiminase 4  
PAM : pression artérielle moyenne  
PAMPs : motifs moléculaires associés aux pathogènes  
paO<sub>2</sub> : pressions partielles en O<sub>2</sub>  
PEM : potentiel évoqué moteur  
PEMdia : potentiel évoqué moteur diaphragmatique  
pETs : plasmacytoid dendritic cell extracellular traps  
PG : peptidoglycane

PGE2 : prostaglandine E2  
PGI2 : prostacycline  
PICS : syndrome d'immunosuppression, de catabolisme et d'inflammation persistante  
PIP2 : phosphatidylinositol (4,5) trisphosphate  
PKA : protéine kinase A  
PKC : protéine kinase C  
PMA : Phorbol 12-myristate 13-acetate  
PMN : leucocytes polymorphonucléaires  
PPA : protéines de phase aiguë  
PPC : phénomène phrénique croisé  
rMS : stimulation magnétique répétitive  
rTMS : stimulation magnétique transcrânienne répétée  
ROS : espèces réactives de l'oxygène  
SAE : encéphalopathie associée au sepsis  
SDRA : syndrome de détresse respiratoire aiguë  
SIRS : syndrome de réponse inflammatoire systémique  
SK3 : canal potassique-3  
SNA : système nerveux autonome  
SNC : système nerveux central  
SNP : système nerveux périphérique  
SNPa : système nerveux parasympathique  
SNS : système nerveux sympathique  
SOFA : sequential sepsis-related organ failure assessment  
sTNFR : récepteur soluble du TNF- $\alpha$   
TF : facteur tissulaire  
TGF : facteur de croissance transformant  
TLR : récepteur de type Toll  
TMS : stimulation magnétique transcrânienne  
TNF : facteur de nécrose tumorale  
VCAM-1 : molécule d'adhésion cellulaire vasculaire-1  
VEGF : facteur de croissance endothélial vasculaire  
WFA : agglutinine de glycine floribunda

# TABLE DES MATIÈRES

---

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>3</b>
<b>ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>6</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>10</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS ET DES TABLEAUX</b> .....	<b>15</b>
ILLUSTRATIONS .....	16
TABLEAUX.....	17
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>18</b>
<b>LA RÉPONSE INFLAMMATOIRE</b> .....	<b>21</b>
1. DÉFINITION.....	22
2. MÉCANISMES MIS EN JEU DANS LA RÉACTION INFLAMMATOIRE .....	23
3. LES CYTOKINES .....	25
3.1. Généralités .....	25
3.2. Les principales cytokines pro-inflammatoires .....	26
3.3. Les principales cytokines anti-inflammatoires .....	28
4. LES CELLULES MYÉLOÏDES DE LA RÉPONSE INNÉE .....	31
4.1. La mobilisation leucocytaire.....	31
4.2. Les éosinophiles.....	33
4.3. Les mastocytes .....	34
4.4. Les basophiles.....	34
4.5. Les neutrophiles.....	35
4.5.1. Généralités .....	35
4.5.2. Rôles .....	35
A. La phagocytose .....	35
B. La dégranulation .....	36
C. Production de pièges extracellulaires .....	38
o Structure et composition .....	38
o Mécanismes .....	39
o Dommages causés par les NETs .....	44
4.6. Les monocytes .....	46
4.7. Les cellules dendritiques.....	47
4.8. Les macrophages.....	47
4.9. La microglie .....	50
<b>LE SEPSIS</b> .....	<b>54</b>



1. LE SEPSIS.....	55
1.1. Définition.....	55
1.2. Épidémiologie.....	57
1.2.1. Incidence et mortalité.....	57
1.2.2. Facteurs de risques.....	58
1.2.3. Étiologie.....	59
1.2.4. Coût et prise en charge.....	60
1.3. Les modèles de sepsis.....	60
1.3.1. Modèles animaux.....	60
1.3.2. Modèle de sepsis par infection bactérienne.....	62
1.3.3. Le modèle endotoxinique par injection de LPS.....	62
A. Description du modèle.....	62
B. Mode d'action du LPS.....	63
1.3.4. Induction du sepsis par perturbation de la barrière de l'hôte.....	66
A. Le modèle de péritonite sur stent du colon ascendant.....	66
B. Le modèle de ligature et ponction cœcale.....	67
2. LA RÉPONSE IMMUNITAIRE ET INFLAMMATOIRE AU COURS DU SEPSIS.....	71
2.1. Définition.....	71
2.2. Les cytokines au cours du sepsis.....	72
2.2.1. Les principales cytokines pro-inflammatoires au cours du sepsis.....	72
2.2.2. Les principales cytokines anti-inflammatoires au cours du sepsis.....	74
2.3. Les cellules myéloïdes de la réponse innée impliquées dans le sepsis.....	74
2.3.1. Les neutrophiles au cours du sepsis.....	74
A. Altération de la demi-vie des neutrophiles.....	75
B. Altération des fonctions migratoires.....	76
C. Altération des fonctions antimicrobiennes des neutrophiles.....	77
D. Les NETs au cours du sepsis.....	77
2.3.2. Les monocytes.....	79
2.3.3. Les cellules dendritiques.....	79
2.3.4. Les macrophages.....	80
2.3.5. La microglie.....	80
2.3.6. Implication du système immunitaire adaptatif.....	81
3. DYSFONCTIONS D'ORGANES.....	83
3.1. Dysfonctions cardiovasculaires.....	83
3.1.1. Dysfonctions vasculaires et de la coagulation.....	83
3.1.2. Dysfonctions cardiaques.....	85
3.2. Dysfonctions du système nerveux central et neuro-inflammation.....	86
3.2.1. Le système nerveux central.....	86

3.2.3. Dysfonctions du système nerveux central .....	88
3.3. <i>Autres principaux systèmes présentant des dysfonctions au cours du sepsis</i> .....	89
3.3.1. Dysfonctions pulmonaires .....	89
3.3.2. Dysfonctions rénales .....	90
3.3.3. Dysfonctions hépatiques .....	91
3.3.4. Dysfonctions métaboliques .....	92
4. PISTES THÉRAPEUTIQUES DU SEPSIS .....	94
4.1. <i>Prise en charge du sepsis</i> .....	94
4.2. <i>Le système adrénergique</i> .....	95
4.2.1. Le système nerveux autonome.....	95
A. Le système nerveux parasympathique .....	96
B. Le système nerveux sympathique.....	97
4.2.2. Les récepteurs adrénergiques .....	99
A. Les récepteurs $\alpha$ -adrénergiques .....	99
B. Les récepteurs $\beta$ -adrénergiques .....	100
o Les récepteurs $\beta$ 3-adrénergiques .....	100
o Les récepteurs $\beta$ 2-adrénergiques .....	100
o Les récepteurs $\beta$ 1-adrénergiques.....	101
4.3. <i>La modulation du système nerveux autonome comme piste thérapeutique</i> .....	102
4.3.1. Pistes thérapeutiques .....	102
4.3.2. Dérégulation de la signalisation $\beta$ -adrénergique au cours du sepsis.....	103
4.3.3. Intérêt clinique des $\beta$ -bloquants.....	104
4.3.4. Effets de la modulation adrénergique sur la fonction cardiovasculaire au cours du sepsis ...	105
4.3.5. Effets de la modulation adrénergique sur la réponse immunitaire.....	106
4.3.6. Effets de la modulation adrénergique sur la fonction métabolique.....	107
<b>NEURO-INFLAMMATION INDUITE PAR UNE LÉSION HAUTE DE LA MOELLE ÉPINIÈRE.....</b>	<b>108</b>
1. NEURO-INFLAMMATION TRAUMATIQUE.....	109
2. LES LÉSIONS DE LA MOELLE ÉPINIÈRE .....	112
2.1. <i>Définition</i> .....	112
2.2. <i>Épidémiologie</i> .....	112
3. MODÈLES DE NEURO-INFLAMMATION SPINALE : CAS DE LA LÉSION DE LA MOELLE ÉPINIÈRE	
.....	114
4. LA NEURO-INFLAMMATION CONSÉCUTIVE À UNE LÉSION SPINALE.....	117
4.1. <i>Les cytokines</i> .....	119
4.2. <i>Les cellules immunitaires</i> .....	119
4.2.1. La microglie .....	120

4.2.2. Les lymphocytes .....	121
4.2.3. Les neutrophiles .....	121
4.3. Les astrocytes et la cicatrice gliale .....	122
5. MODULATION NON-INVASIVE DE LA NEURO-INFLAMMATION : CAS DE LA STIMULATION MAGNÉTIQUE TRANSCRÂNIENNE .....	125
<b>OBJECTIFS DE RECHERCHE .....</b>	<b>128</b>
<b>RÉSULTATS .....</b>	<b>132</b>
LISTE DES PUBLICATIONS PRÉSENTÉES DANS LES RÉSULTATS .....	133
1. MÉCANISMES D'ACTION DES $\beta$ 1-BLOQUANTS AU COURS DU SEPSIS .....	134
2. EFFET DE L'ADMINISTRATION D'UN $\beta$ 1-BLOQUANT SUR LA NEURO-INFLAMMATION ET LA FONCTION NEUROMUSCULAIRE DANS UN MODÈLE DE SEPSIS PAR INJECTION DE LPS.....	180
<i>Résultat complémentaire : vérification de l'infiltration tissulaire des neutrophiles.....</i>	<i>202</i>
3. CONSÉQUENCES DE LA PRODUCTION DE PIÈGES EXTRACELLULAIRES SUR LA FONCTION NEUROMUSCULAIRE AU COURS DU SEPSIS .....	203
<i>Résultat complémentaire : le modèle LPS induit une augmentation de l'expression des CSPGs</i> .....	<i>221</i>
4. FORMATION DE PIÈGES EXTRACELLULAIRES SUITE À UNE LÉSION DE LA MOELLE ÉPINIÈRE .	223
5. EFFETS D'UN PROTOCOLE CHRONIQUE DE rTMS SUITE À UNE LÉSION DE LA MOELLE ÉPINIÈRE .....	238
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>266</b>
1. IMPLICATION DE LA MODULATION ADRÉNERGIQUE AU COURS DU SEPSIS (ARTICLE 1) .....	268
2. IMPLICATION DES ETs DANS LES DYSFONCTIONS DU SYSTÈME NEUROMUSCULAIRE AU COURS DU SEPSIS (ARTICLES 2 ET 3).....	272
3. PRODUCTION DE ETs DANS UN MODÈLE D'INFLAMMATION D'ORIGINE TRAUMATIQUE (ARTICLE 4).....	277
4. EFFET DE L'APPLICATION D'UN PROTOCOLE DE rTMS SUR LA RÉCUPÉRATION NEURORESPIRATOIRE (ARTICLE 5) .....	280
5. CONCLUSION .....	282
<b>RÉFÉRENCES .....</b>	<b>283</b>

# **TABLE DES ILLUSTRATIONS ET DES TABLEAUX**

---

## ILLUSTRATIONS

---

Figure 1 : Représentation simplifiée des évènements impliqués dans une réponse inflammatoire.....	24
Figure 2 : Migration des leucocytes.....	33
Figure 3 : Les différents types de granules libérés par les neutrophiles.....	37
Figure 4 : Production de pièges extracellulaires par des neutrophiles stimulés in vitro et observés au microscope électronique à balayage.....	38
Figure 5 : Implication de la voie Raf-MEC-ERK dans la production des NETs.....	40
Figure 6 : Processus de formation des NETs par NETose suicidaire ou NETose vitale.....	42
Figure 7 : Mécanisme de formation des pièges extracellulaires dépendant de la caspase-11.....	43
Figure 8 : Activation des macrophages.....	50
Figure 9 : Formes et fonctions de la microglie dans les états homéostatique et activé.....	52
Figure 10 : Score SOFA.....	57
Figure 11 : Nombre de cas de sepsis aux États-Unis (entre 1979 et 2001).....	59
Figure 12 : Voie de signalisation du TLR4.....	65
Figure 13 : Le modèle CASP.....	66
Figure 14 : Le modèle de CLP.....	68
Figure 15 : Réponses immunitaires médiées par les TLR.....	69
Figure 16 : Les différents profils de réponses inflammatoires rencontrés au cours du sepsis.....	72
Figure 17 : Cinétique des cytokines au cours du sepsis.....	73
Figure 18 : Voies de l'apoptose des neutrophiles au cours du sepsis.....	75
Figure 19 : Formation de thrombus de plaquettes associées aux NETs (exemple dans le poumon).....	85
Figure 20 : Anatomie de la barrière hémato-encéphalique.....	87
Figure 21 : Illustration des mécanismes de régulation à court terme du système cardiovasculaire par le SNA.....	98
Figure 22 : Mécanisme du processus de désensibilisation des récepteurs $\beta$ -adrénergiques.....	104
Figure 23 : Modèle d'hémisection spinale en C2.....	116
Figure 24 : Les 4 phases post-traumatiques suite à une lésion de la moelle épinière.....	117
Figure 25 : Profil de la réponse inflammatoire à la suite d'une lésion de la moelle épinière.....	120
Figure 26 : La cicatrice gliale.....	124
Figure 27 : Confirmation de l'infiltration des neutrophiles.....	202
Figure 28 : Expression des CSPGs induite par le LPS sur la moelle épinière.....	222

**TABLEAUX**

---

Tableau 1 : Origine et rôles des principales cytokines impliquées dans la réponse inflammatoire. ....	29
Tableau 2 : Comparaison des principaux modèles murins de sepsis. ....	70

# INTRODUCTION

---

La réponse immunitaire est un processus de défense mis en place pour protéger un organisme afin de répondre à une agression par un facteur d'origine infectieux ou stérile. Elle comprend la réponse inflammatoire.

L'inflammation d'origine infectieuse est déclenchée par la présence d'agents pathogènes tels que des bactéries, des virus ou des champignons. Cependant, celle-ci est parfois dérégulée et aboutit alors à une réponse disproportionnée de l'organisme. Dans les cas les plus graves, cela peut engendrer un sepsis, défini comme une dysfonction d'organes potentiellement mortelle causée par une réponse dérégulée de l'hôte à une infection (M. Singer et al. 2016).

Dans cette pathologie, l'infection d'abord localisée, se propage et affecte plusieurs organes, dont le système nerveux central. L'inflammation cérébrale qui en résulte peut alors entraîner divers symptômes neurologiques qui pourront perdurer et laisser des séquelles chez les patients survivants, notamment au niveau neuromusculaire.

Ces symptômes neuro-inflammatoires peuvent aussi se retrouver dans l'inflammation de type stérile. Il s'agit d'une réponse immunitaire déclenchée sans origine infectieuse, qui fait suite à des dommages tissulaires comme lors de traumatismes, ou à une ischémie-reperfusion ou des réactions auto-immunes comme lors de l'encéphalomyélite auto-immune (qui provoque une réaction auto-immune dirigée contre la myéline pour provoquer une démyélinisation et des dommages axonaux) par exemple.

Dans ce contexte, la compréhension des acteurs impliqués dans la neuro-inflammation, définie comme une réponse inflammatoire mise en place dans le système nerveux central, est importante pour développer des traitements efficaces. Au cours de ma thèse, j'ai donc cherché à comprendre le rôle de certaines cellules immunitaires impliquées dans la réponse innée et la protection du système nerveux central dont la microglie (population de cellules immunitaires la plus abondante dans le SNC, elle correspond aux macrophages résidents), les neutrophiles et les monocytes infiltrants. Plus particulièrement, je me suis intéressé aux pièges extracellulaires pouvant être produits par ces trois types cellulaires en réponse à une inflammation.

En parallèle, j'ai étudié les effets d'un traitement sur le système nerveux central à l'aide de deux modèles de sepsis : les  $\beta$ 1-bloquants adrénergiques, ayant déjà montré un intérêt dans d'autres tissus comme le cœur, le foie ou le rein. Enfin, j'ai évalué l'efficacité de la stimulation



magnétique transcrânienne répétée, un traitement non invasif utilisé en clinique pour traiter des maladies liées à la neuro-inflammation, sur l'inflammation suite à une lésion de la moelle épinière.

# LA RÉPONSE INFLAMMATOIRE

---

## 1. DÉFINITION

---

L'inflammation, ou réaction inflammatoire, est un mécanisme naturel qui se met en place lorsque l'organisme subit une agression de type chimique, toxique, microbienne ou traumatique (Medzhitov 2008), ou lors de maladies auto-immunes. Elle peut concerner tous les organes sans distinction, et agit en éliminant les stimuli nuisibles et en initiant le processus de guérison (Ferrero-Miliani et al. 2007). Pour cela, l'inflammation déclenche une cascade de signalisation qui active les cellules immunitaires résidentes et, *via* le chimiotaxisme leucocytaire, attire les cellules immunitaires sanguines au site subissant l'agression. Ces cellules activées produisent des cytokines qui modulent cette réponse inflammatoire (Jabbour et al. 2009). L'inflammation est donc un mécanisme de défense indispensable pour maintenir l'homéostasie du corps (Nathan et al. 2010), mais qui doit être régulé afin d'éviter des dommages à l'organisme (Headland et al. 2015).

La réponse inflammatoire peut être qualifiée d'aiguë ou de chronique. L'inflammation aiguë est non spécifique et se met en place très rapidement en faisant intervenir les cellules immunitaires capables de détruire l'élément déclencheur. Elle dure peu de temps : une fois l'agression contrôlée, le tissu est réparé et l'inflammation prend fin. Néanmoins, même aiguë, l'inflammation peut parfois prendre des proportions démesurées et conduire à de graves complications, comme lors d'un sepsis. Si l'inflammation n'est pas contrôlée et perdure dans le temps, elle devient alors délétère : il s'agit de l'inflammation chronique, avec l'intervention de mécanismes immunitaires plus spécifiques qui se produisent lorsque le pathogène n'a pu être éliminé ou bien encore lorsqu'une pathologie auto-immune est apparue (Gusev et al. 2019, 2022).

## 2. MÉCANISMES MIS EN JEU DANS LA RÉACTION INFLAMMATOIRE

---

La réaction inflammatoire peut être subdivisée en trois étapes. Dès le stimulus déclencheur, la phase d'initiation, ou phase vasculaire, se met en place pour permettre le recrutement des cellules immunitaires. Là, des molécules vasodilatatrices vont être libérées : elles permettront l'afflux de cellules immunitaires lors de la phase d'amplification (Kolaczowska et al. 2013). Durant cette deuxième phase, les cellules immunitaires telles que les neutrophiles et les monocytes sanguins vont venir en renfort des macrophages résidents sur le site de l'inflammation. Enfin, la phase de résolution et de réparation permet de restaurer l'intégrité des tissus et de revenir à l'homéostasie. Cette dernière étape dépend de la sévérité de la lésion et peut prendre entre 10 et 15 jours (figure 1). Lorsque l'inflammation persiste ou n'est plus contrôlée, la réponse immunitaire et inflammatoire peut devenir disproportionnée, comme lors d'un sepsis (Beutler et al. 2001), dont les mécanismes mis en jeu seront développés ultérieurement.

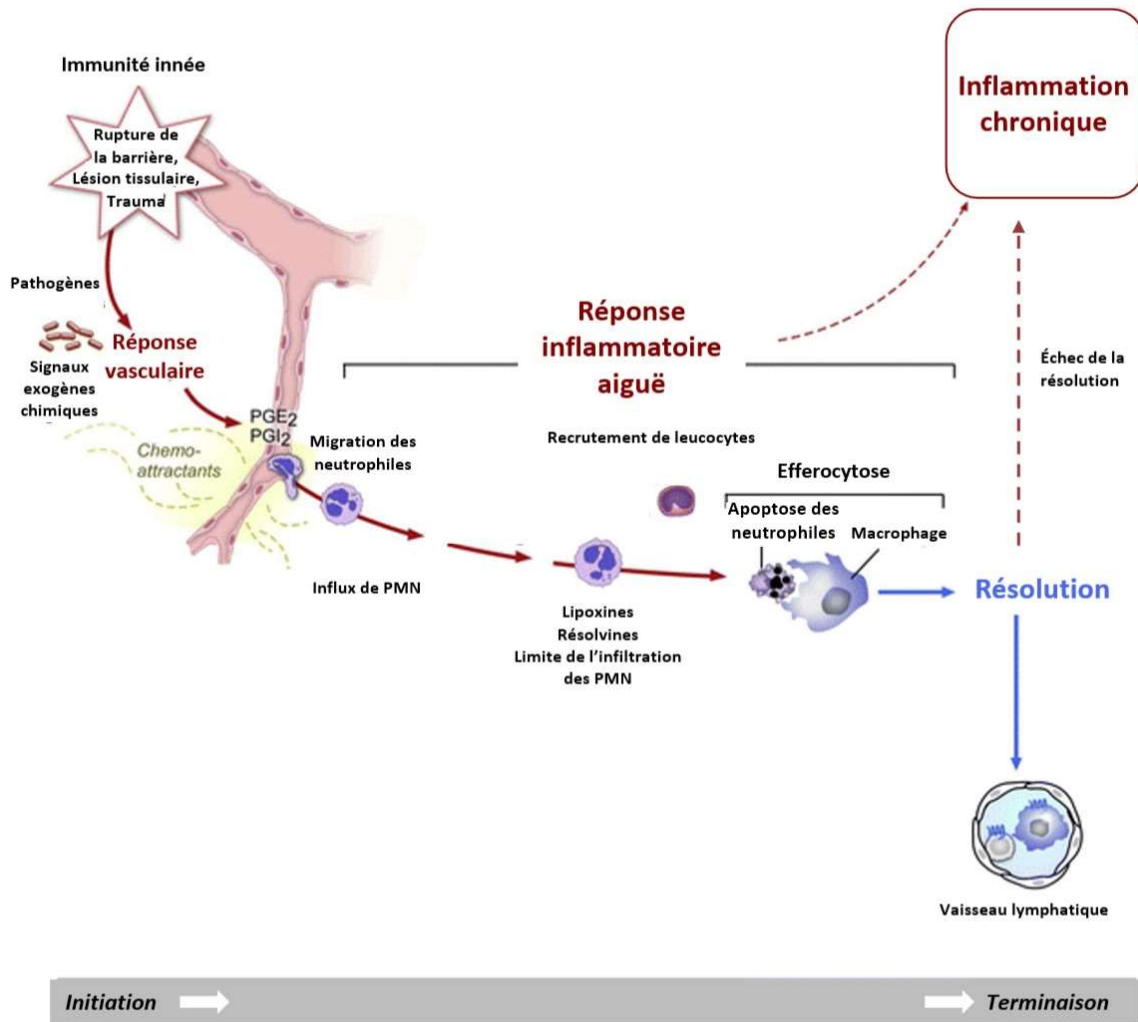


Figure 1 : Représentation simplifiée des événements impliqués dans une réponse inflammatoire. La stimulation de la réponse inflammatoire commence par provoquer la réponse vasculaire, qui est suivie d'un afflux de leucocytes polymorphonucléaires (PMN) vers la zone inflammée. Après avoir atteint les tissus, les monocytes se transforment en macrophages et phagocytent activement les débris. Les lymphocytes, qui sont des cellules du système immunitaire adaptatif, modulent ensuite cette réponse initiale. Une fois l'élément déclencheur de l'inflammation éliminé, il se met en place une phase de résolution de l'inflammation afin de revenir à l'homéostasie. L'échec de cette résolution conduit à la persistance de l'inflammation, entraînant un état inflammatoire chronique responsable des lésions tissulaires durables. (PGE2 : prostaglandine E2; PGI2 : prostacycline) (Suthahar et al. 2017).

### 3. LES CYTOKINES

---

La réponse inflammatoire est en partie régulée par les cytokines qui peuvent l'amplifier, ou au contraire la diminuer.

#### 3.1. Généralités

Les cytokines sont des protéines solubles qui régulent la réponse immunitaire. Elles sont synthétisées en réponse à un signal activateur et jouent un rôle clé dans la régulation de l'inflammation. Il existe deux types de cytokines : les cytokines pro-inflammatoires qui stimulent l'inflammation, et les cytokines anti-inflammatoires qui l'inhibent et favorisent le retour à l'homéostasie.

Les principales cytokines pro-inflammatoires précoces sont l'interleukine-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et le facteur de nécrose tumorale- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Il en existe d'autres, plus tardives, telles que l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), le facteur de croissance transformant- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), le facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF), et les interleukines IL-8, IL-11, IL-12, IL-17, IL-18 et IL-33. Les cytokines pro-inflammatoires précoces (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) agissent comme des pyrogènes endogènes en induisant de la fièvre, et régulent à la hausse la synthèse de médiateurs secondaires et d'autres cytokines pro-inflammatoires. Elles stimulent la production des protéines de phase aiguë (comme la protéine C réactive) ou attirent les cellules immunitaires (Holdsworth et al. 2015). Pour ce faire, des chimiokines, qui sont des cytokines chimiotactiques, sont sécrétées dans l'espace extracellulaire. Là, elles restent solubles ou se lient à la matrice extracellulaire, formant ainsi des gradients de concentration transitoires (si elles sont solubles) ou stables (si elles sont liées). Les cellules immunitaires détectent ensuite ces chimiokines et leurs gradients par liaison à des récepteurs spécifiques, ce qui permet leur recrutement (Sokol et al. 2015).

Quant aux cytokines anti-inflammatoires, il s'agit d'un groupe de molécules immunorégulatrices impliquées dans la prévention des effets potentiellement nocifs des réactions inflammatoires persistantes ou excessives. Les principales cytokines anti-inflammatoires comprennent l'IL-10, l'IL-11, l'IL-13, l'antagoniste des récepteurs de l'IL-1 (IL-1Ra), l'IL-4, l'IL-6

(Opal et al. 2000) et le sTNFR qui est un récepteur soluble du TNF- $\alpha$  (Waetzig et al. 2005).

Il existe de très nombreuses cytokines : j'ai donc pris le parti de mettre l'accent sur certaines d'entre elles, celles majoritairement impliquées dans la mise en place de la réponse immunitaire dans les modèles que j'ai étudiés au cours de ma thèse.

### 3.2. Les principales cytokines pro-inflammatoires

Les cytokines pro-inflammatoires permettent d'initier et de diriger la réponse immunitaire en favorisant l'inflammation (tableau 1). Certaines sont exprimées précocement, comme le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  qui sont les premières à intervenir, alors que d'autres le sont plus tardivement, comme l'IFN- $\gamma$ .

Le TNF- $\alpha$  est produit essentiellement par les macrophages activés, mais il peut également l'être par de nombreux autres types de cellules, comme les lymphocytes T auxiliaires, les lymphocytes NK, les neutrophiles, les éosinophiles, les mastocytes et les neurones. Il est exprimé dès le début de la réponse inflammatoire parce qu'il déclenche la fièvre et stimule la phase de réponse aiguë de l'inflammation en permettant le recrutement des neutrophiles et des lymphocytes (Locksley et al. 2001).

L'IL-1 $\beta$ , aussi connue sous le nom de cataboline (March et al. 1985), est produite par les macrophages activés sous forme d'une pro-protéine qui subira une modification protéolytique en sa forme active par la caspase-1. Elle est également exprimée précocement parce que son implication dans diverses activités cellulaires, notamment la prolifération, la différenciation et l'apoptose, en font un médiateur important de la réponse inflammatoire (Dinarello 2009).

L'IL-6, aussi appelée interféron- $\beta$ 2 ou facteur de stimulation des lymphocytes B2, est une cytokine pro-inflammatoire majeure (Hirano et al. 1986) sécrétée par les lymphocytes T et les macrophages pour stimuler la réponse immunitaire à la suite d'un traumatisme. Les macrophages peuvent également la produire suite à la reconnaissance de PAMPs (motifs moléculaires associés aux pathogènes) bactériens par les TLR (récepteurs de type Toll) (Larsson et al. 1999). Cette cytokine a plusieurs rôles : elle aide à réguler la réponse immunitaire en favorisant non seulement l'activation et la différenciation des lymphocytes T et B, mais aussi la libération de granulocytes et

de monocytes (Galanaud et al. 1989).

D'autres cytokines sont sécrétées plus tardivement. C'est le cas de l'IL-8 qui est une chimiokine produite par les macrophages et par d'autres types cellulaires comme les cellules épithéliales et endothéliales (Strieter et al. 1989). Il s'agit de l'un des médiateurs majeurs de la réponse inflammatoire. En effet, sa fonction principale est l'induction de la chimiotaxie de cellules cibles telles que les neutrophiles *via* la liaison sur son récepteur CXCR2 : elle les attire vers le site de l'inflammation, ce qui lui confère aussi le nom de facteur chimiotactique des neutrophiles (Colditz et al. 1989).

L'IL-18 est une cytokine pro-inflammatoire produite entre autres par les macrophages (Boraschi et al. 2006). Elle peut induire une immunité à médiation cellulaire en réponse à une infection par des produits microbiens tels que le LPS (Biet et al. 2002). En effet, l'IL-18 peut stimuler les lymphocytes NK et certains lymphocytes T pour libérer l'IFN- $\gamma$  ou l'interféron de type II, qui jouent un rôle important dans l'activation des macrophages notamment (Tschoeke et al. 2006).

L'IFN- $\gamma$  est une cytokine essentielle pour le contrôle des tumeurs, et pour l'immunité innée et adaptative contre les infections bactériennes, virales et intracellulaires. En effet, c'est un activateur important des macrophages et il induit l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (Schoenborn et al. 2007). L'IFN- $\gamma$  est produite par les lymphocytes T CD4 et CD8 lors de la stimulation antigénique, et par les lymphocytes NK dans la réponse immunitaire innée (Schoenborn et al. 2007).

Quant à GM-CSF, elle est sécrétée par les macrophages, les lymphocytes T, les mastocytes, les cellules endothéliales et les fibroblastes (Ushach et al. 2016). Elle induit la différenciation des cellules souches en neutrophiles, éosinophiles, basophiles et monocytes (Hamilton 2002), en plus de sa fonction pro-inflammatoire (Hamilton et al. 2004).

En ce qui concerne l'IL-17, elle est produite par les lymphocytes T auxiliaires et est induite par l'IL-23 (Costa et al. 2010). Elle intervient dans la régulation de l'hématopoïèse et de l'inflammation en augmentant la production de chimiokines dans divers tissus pour recruter des monocytes (Shahreyar et al. 2018) et des neutrophiles (Witowski et al. 2000) sur le site de l'inflammation. Elle stimule également la production de nombreuses autres cytokines.



### 3.3. Les principales cytokines anti-inflammatoires

Les cytokines anti-inflammatoires sont des molécules immunorégulatrices (tableau 1) impliquées dans la prévention des réactions inflammatoires persistantes ou excessives, sécrétées de manière précoce ou plus tardive selon le type. Deux d'entre elles jouent un rôle majeur.

L'IL-10 est la cytokine clé des réponses anti-inflammatoires. Elle est principalement produite par les monocytes, et dans une moindre mesure par les lymphocytes. L'IL-10 inhibe l'expression des cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, et GM-CSF dans les monocytes, les macrophages, les neutrophiles et les lymphocytes NK (Opal et al. 2000).

L'IL-1Ra est sécrétée lors de la phase aiguë de l'inflammation : elle joue donc un rôle modulateur de la réponse inflammatoire. Elle entre en compétition avec les cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$  dans la liaison au récepteur de l'IL-1 et bloque leur fonction, régulant ainsi la réponse immunitaire (Schreuder et al. 1997). Certaines cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et l'IL-13, augmentent la synthèse d'IL-1Ra mais inhibent également la synthèse d'IL-1 $\beta$  (Dinarello 1997).

<b>Cytokine</b>	<b>Famille</b>	<b>Source principale</b>	<b>Rôles</b>
IL-1 $\beta$	IL-1	Monocytes, macrophages	Pro-inflammatoire, prolifération, apoptose et différenciation
IL-6	IL-6	Macrophages, lymphocytes T, adipocytes	Pro-inflammatoire, différenciation, induction d'autres cytokines
IL-8	CXC	Macrophages, cellules endothéliales et épithéliales	Pro-inflammatoire, chimiotaxisme, angiogenèse
IL-10	IL-10	Monocytes, lymphocytes B et T	Anti-inflammatoire, inhibition des cytokines pro-inflammatoires
IL-12	IL-12	Macrophages, neutrophiles, cellules dendritiques	Pro-inflammatoire, différenciation, activation des cellules NK
TNF- $\alpha$	TNF	Macrophages, cellules NK, lymphocytes et adipocytes	Pro-inflammatoire, production de cytokines, prolifération, apoptose et rôle anti infectieux
IFN- $\gamma$	IFN	Lymphocytes T, cellules NK	Pro-inflammatoire, réponse immunitaire innée et adaptative
GM-CSF	IL-4	Macrophages, fibroblastes, lymphocytes T	Pro-inflammatoire, activation des macrophages, augmentation de la production des neutrophiles et des monocytes
IL-1ra	IL-1	Cellules immunitaires, épithéliales et adipocytes	Anti-inflammatoire, inhibition des effets de l'IL-1 $\beta$

Tableau 1 : Origine et rôles des principales cytokines impliquées dans la réponse inflammatoire (Chen et al. 2017).

En plus des cytokines, la réponse inflammatoire implique un réseau hautement coordonné de nombreux types cellulaires qui peuvent être résidents ou recrutés. Dans le prochain paragraphe, je vais décrire plus particulièrement les cellules myéloïdes et leurs rôles dans la réponse inflammatoire innée.

## 4. LES CELLULES MYÉLOÏDES DE LA RÉPONSE INNÉE

---

L'ensemble des travaux présentés dans ma thèse sont relatifs à la réponse immunitaire innée, c'est pourquoi par la suite, uniquement celle-ci sera décrite.

Le système immunitaire inné constitue la première ligne de défense de l'organisme. Il réagit de la même manière à tous les germes et substances étrangères, c'est pourquoi on l'appelle parfois le système immunitaire « non spécifique ». Il agit également très rapidement, au contraire du système adaptatif qui est spécifique et intervient plus tardivement (8 à 15 jours), avec la mise en place de cellules spécifiques telles que les lymphocytes T et B.

Les cellules impliquées dans cette réponse immunitaire innée dérivent de la lignée hématopoïétique. Ces cellules, appelées cellules myéloïdes, sont les granulocytes (neutrophiles, éosinophiles et basophiles) et les monocytes, qui sont des descendants différenciés de progéniteurs communs dérivés de cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse. Leur différenciation vers l'un ou l'autre type cellulaire est sous le contrôle de facteurs de transcriptions distincts et de facteurs de stimulation des colonies comme le GM-CSF. Lorsque l'organisme est en présence d'un agent pathogène, ces cellules myéloïdes sont rapidement libérées de la moelle osseuse vers le sang. Elles doivent ensuite être mobilisées vers les tissus nécessitant leurs actions (Kawamoto et al. 2004).

### 4.1. La mobilisation leucocytaire

La migration des leucocytes du sang vers les tissus comprend quatre phases successives : tout d'abord les leucocytes sont mobilisés et libérés depuis la moelle osseuse (phase de mobilisation et de libération), puis ils scrutent l'endothélium pour détecter des signaux de migration (phase de capture). Ensuite intervient la phase de diapédèse leucocytaire qui est elle-même divisée en plusieurs étapes : la margination et le roulement, suivie par l'adhérence et enfin, la transmigration (figure 2).

Dans la moelle osseuse, le facteur de stimulation des colonies de granulocytes (G-CSF) et

le facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF) régulent la granulopoïèse, qui est le processus de fabrication des granulocytes tels que les neutrophiles (Kovach et al. 2012). Les chimiokines et les molécules d'adhésion exprimées sur les cellules endothéliales de la moelle osseuse et les neutrophiles régulent la libération de ces derniers dans la circulation sanguine. Dans des conditions normales, le récepteur de chimiokine CXCR4 interagit avec son ligand (ligand du récepteur de chimiokine CXCL12) pour médier leur rétention, et CXCR2 interagit avec CXCL1 ou CXCL2 pour déclencher leur libération. Dans ce cas, l'équilibre des chimiokines et de leurs récepteurs aide à maintenir les leucocytes dans la moelle osseuse, avec seulement une petite fraction de neutrophiles matures libérés dans la circulation pour permettre une veille immunitaire et une mobilisation rapide en cas d'infection (Capucetti et al. 2020).

La phase de migration et de roulement des leucocytes implique l'expression des E et P-sélectines endothéliales, qui présentent des interactions de faible affinité avec la L-sélectine exprimée à la surface des leucocytes (figure 2). Ceci permet la liaison initiale des leucocytes et leur interaction avec les cellules endothéliales avant la phase d'adhésion. Cette étape implique l'interaction des  $\beta$ -intégrines exprimées à la surface des leucocytes, et leurs ligands exprimés à la surface de l'endothélium : ICAM-1 (molécule d'adhésion intercellulaire-1) et VCAM-1 (molécule d'adhésion cellulaire vasculaire-1) (Tedder et al. 1995).

La phase de transmigration des leucocytes correspond à leur passage à travers les jonctions serrées de l'endothélium vasculaire. Cette étape nécessite des chimio-attractants leucocytaires, tels que la formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (fMLP), le facteur d'activation plaquettaire, le composant du complément 5a (C5a), le leucotriène B4 et l'IL-8, qui se lient aux récepteurs de chimiokines CXCR2 exprimés sur les leucocytes comme les neutrophiles (Cacalano et al. 1994).

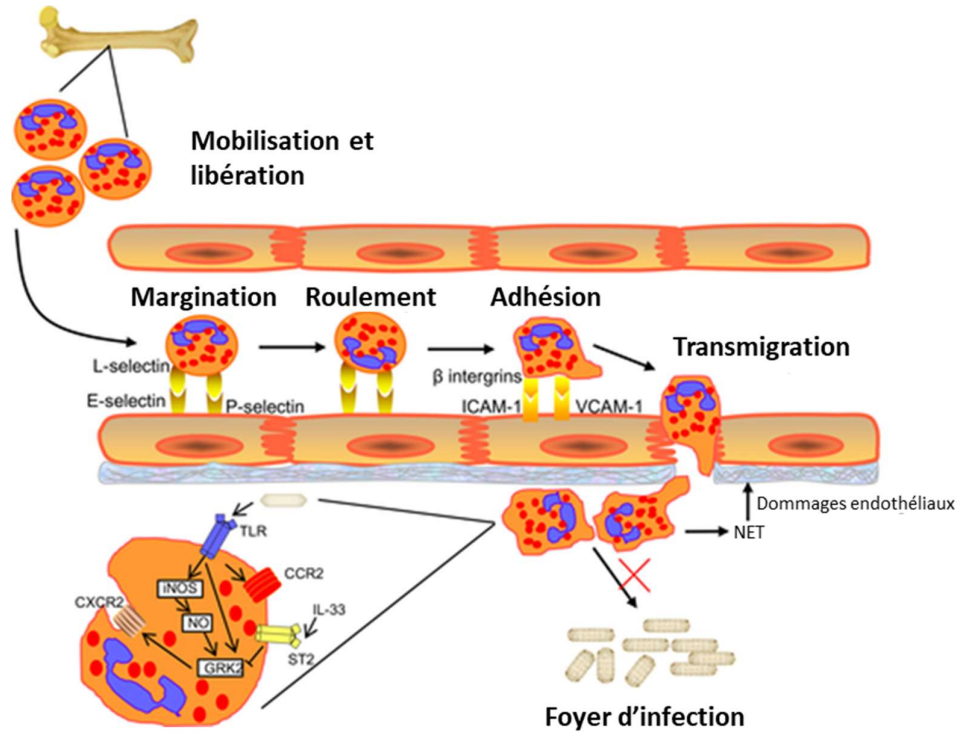


Figure 2 : Migration des leucocytes.

La migration des leucocytes se déroule en plusieurs étapes : les phases de ralentissement, d'arrêt, puis d'adhésion à l'endothélium, qui font intervenir les sélectines et les  $\beta$ -intégrines. Ensuite, il y a la phase de transmigration, qui correspond au passage du leucocyte entre les jonctions serrées de l'endothélium vasculaire pour atteindre le foyer d'infection (Shen et al. 2017).

Une fois les cellules myéloïdes mobilisées, elles vont pouvoir agir en fonction de leurs spécificités.

## 4.2. Les éosinophiles

Ils ont pour fonction principale la libération de médiateurs cytotoxiques par un mécanisme de dégranulation lors de réactions allergiques par exemple. Si l'organisme réagit de manière excessive à la présence d'un allergène, il va y avoir une augmentation importante du nombre d'éosinophiles, ce qui peut avoir pour effet des troubles inflammatoires, des rhinites allergiques ou des eczémas, ainsi que des dommages tissulaires causés par la libération excessive de molécules inflammatoires.

Les éosinophiles peuvent aussi être impliqués dans la réponse immunitaire innée précoce *via* leur capacité à exprimer des  $\alpha$ -défensines et des récepteurs de l'immunité innée comme le Toll-like 2. Cette activation du récepteur TLR-2 entraîne notamment une production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de peroxydase (Driss et al. 2010).

### 4.3. Les mastocytes

Les mastocytes sont produits dans la moelle osseuse puis ils passent dans le sang et colonisent les tissus où ils terminent leur différenciation. Les mastocytes ont un rôle dans la protection contre les infections : ils sont situés dans les tissus conjonctifs, la peau et les muqueuses, ce qui les place en première ligne de défense contre les pathogènes (Piliponsky et al. 2019). Ils peuvent libérer des médiateurs inflammatoires pour recruter d'autres cellules immunitaires comme les neutrophiles ou les monocytes vers le site de l'infection et renforcer la réponse immunitaire (Mukai et al. 2018). Ils sont aussi impliqués dans la cicatrisation en favorisant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogenèse) et en régulant la matrice extracellulaire. Enfin, ils permettent une modulation de la réponse immunitaire adaptative en interagissant avec les cellules du système immunitaire adaptatif, telles que les lymphocytes T et B (Elieh Ali Komi et al. 2020).

Cependant, lorsqu'un individu allergique est exposé à un allergène comme du pollen ou une piqûre d'insecte, les mastocytes dégranulent : ils libèrent les granules présents dans leur cytoplasme et déversent les médiateurs qu'ils contiennent, tels que l'histamine, l'héparine, la sérotonine et diverses chimiokines, provoquant ainsi des symptômes allergiques comme des démangeaisons, de l'urticaire, un gonflement et une constriction des voies respiratoires (Hallgren et al. 2014; Shea-Donohue et al. 2010).

### 4.4. Les basophiles

Comme les éosinophiles, les basophiles sont des cellules circulantes de la réponse immunitaire innée, mais moins courantes. Ils ont un rôle important dans la lutte contre les parasites et dans la réaction allergique, notamment *via* la libération par dégranulation

d'histamines ou d'ECFA (facteur chimiotactique de l'anaphylaxie des éosinophiles) qui attirent les éosinophiles (Mukai et al. 2013).

Leurs granules contiennent aussi de l'héparine, un puissant vasodilatateur qui favorise la perméabilité vasculaire et donc facilite la mobilisation leucocytaire pour permettre l'afflux de cellules immunitaires sur le lieu de l'inflammation.

## **4.5. Les neutrophiles**

Du fait de l'importance des neutrophiles dans la réponse immunitaire initiale et des résultats significatifs obtenus lors des premiers mois de ma thèse, ces cellules immunitaires seront davantage détaillées.

### **4.5.1. Généralités**

Les neutrophiles sont les leucocytes les plus abondants dans la circulation sanguine chez l'Homme. Ils sont considérés comme la première ligne de défense du système immunitaire inné : ils capturent et détruisent les micro-organismes par phagocytose, libèrent des granules contenant des protéines antimicrobiennes et forment les pièges extracellulaires (ETs) après détection des agents pathogènes (Brinkmann et al. 2004). Les neutrophiles jouent aussi un rôle de médiateurs de l'inflammation. Ils sont produits dans la moelle osseuse, libérés dans la circulation sanguine et migrent vers les tissus où ils exercent leurs fonctions (Bratton et al. 2011).

### **4.5.2. Rôles**

#### **A. La phagocytose**

La phagocytose est l'un des principaux mécanismes de la défense immunitaire innée et l'un des premiers processus mis en place lors d'une infection. Il s'agit d'une fonction clé des neutrophiles.

Lors de la phagocytose, la cellule va internaliser un pathogène, ce qui donne naissance à



un phagosome. Ensuite ce phagosome va fusionner avec les lysosomes présents dans la cellule pour former un phagolysosome, ce qui va conduire à une dégradation de son contenu. Pour cela, il s'acidifie progressivement, ce qui a pour conséquence d'activer les enzymes de dégradation (Lee et al. 2003). La dégradation provoquée par ces enzymes peut être dépendante ou indépendante de l'oxygène, les deux mécanismes agissant de manière complémentaire l'un de l'autre. La dégradation dépendante de l'oxygène fait intervenir le NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) et la production de ROS, dont le peroxyde d'hydrogène. Celui-ci et la myéloperoxydase (MPO) activent un système halogénant, ce qui conduit à la création d'hypochlorite. Quant à la dégradation indépendante de l'oxygène, elle implique la destruction de l'agent pathogène *via* des enzymes lysosomales telles que les protéases, les phospholipases, les nucléases et les lysozymes qui aident à tuer les agents pathogènes (Raichvarg et al. 1981).

### **B. La dégranulation**

La dégranulation physiologique des neutrophiles est un processus cellulaire visant à détruire des agents pathogènes *via* la libération de molécules cytotoxiques antimicrobiennes contenues dans des granules. Différents types de granules sont libérés de manière séquentielle pour optimiser l'efficacité de la réponse immunitaire (figure 3) (Gierlikowska et al. 2021). Dans un premier temps, les granules tertiaires sont libérés. Ils sont riches en enzymes lysosomales et en protéines antimicrobiennes peu spécifiques. Ils contiennent par exemple la cathepsine ou la gélatinase, aussi connue sous le nom de métalloprotéase-9, qui permet la dégradation de la matrice extracellulaire, favorisant ainsi la migration des cellules immunitaires. Ils sont suivis par la libération des granules secondaires, qui contiennent des molécules qui ont un pouvoir antimicrobien plus puissant, dont la lactoferrine (qui permet de priver les agents pathogènes du fer nécessaire à leur développement), la phosphatase alcaline, le lysozyme (une enzyme capable de lyser des bactéries), la cathélicidine (un peptide antimicrobien), la NADPH oxydase (NOX, qui permet de former des ROS) et la collagénase. Puis pour terminer, ce sont les granules primaires, dits azurophiles, qui sont libérés : ceux-ci contiennent les protéines les plus pro-inflammatoires et antimicrobiennes, et donc les plus toxiques, comme l'élastase, la myéloperoxydase (MPO), la cathepsine G, les défensines (peptides HNP-1, HNP-2 et HNP-3) et la protéine augmentant la perméabilité bactérienne (BPI) (Faurischou et al. 2003).

Ce processus en trois étapes permet de coordonner la réponse immunitaire pour qu'elle soit la plus ciblée et efficace possible, en libérant les substances appropriées au moment le plus opportun. Elle peut-être dérégulée par certaines bactéries qui vont être capables de la limiter comme par exemple *Chlamydia trachomatis* (Rajeeve et al. 2018), *Mycobacterium smegmatis* (Cougoule et al. 2002) ou encore *Yersinia pseudotuberculosis* (Taheri et al. 2016), ce qui aura pour effet une perturbation de la réponse immunitaire. Au contraire, certaines peuvent induire une dégranulation excessive des neutrophiles, comme *Staphylococcus aureus* qui va aggraver sa pathogénicité en entraînant une augmentation des fuites vasculaires.

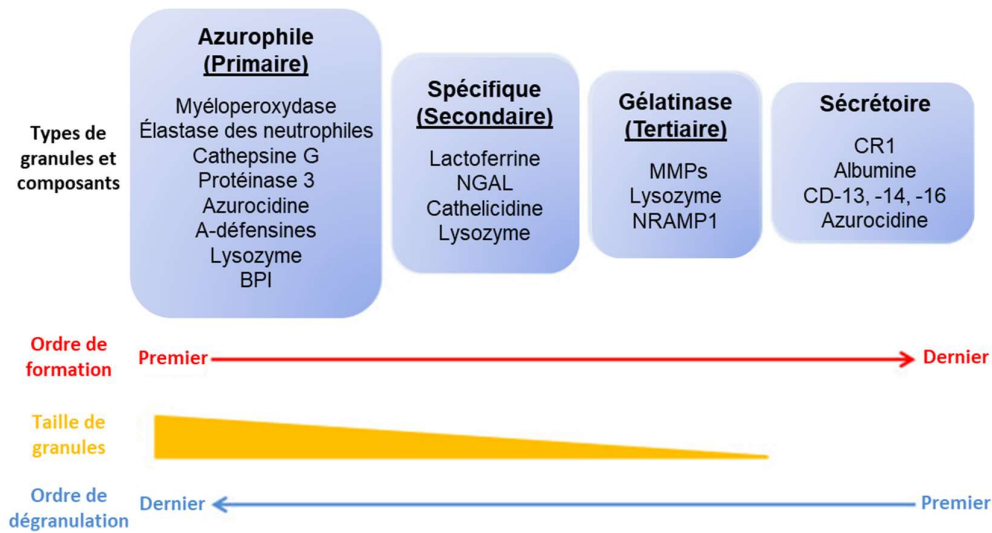


Figure 3 : Les différents types de granules libérés par les neutrophiles. Les granules tertiaires, contenant des enzymes peu spécifiques, sont les premiers à être libérés, puis ce sont les secondaires qui ciblent plus spécifiquement le type de pathogène, et dans un dernier temps les granules primaires (Ma et al. 2013).

### C. Production de pièges extracellulaires

Si la capacité des neutrophiles à faire de la phagocytose et de la dégranulation est connue depuis plusieurs dizaines d'années, celle de produire des pièges extracellulaires (NETs) n'a été caractérisée pour la première fois qu'en 2004. Il s'agit de structures composées de chromatine et de protéines cellulaires qui permettent de « piéger » et dégrader les agents pathogènes (figure 4). C'est l'une des stratégies importantes des neutrophiles pour limiter la propagation de l'infection et la combattre (Brinkmann et al. 2004).

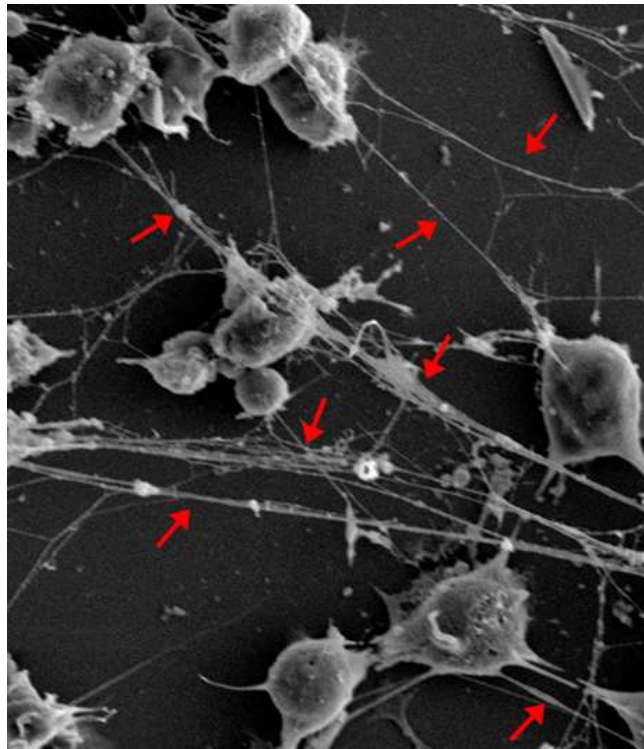


Figure 4 : Production de pièges extracellulaires par des neutrophiles stimulés in vitro et observés au microscope électronique à balayage.

Les flèches rouges indiquent les NETs (Zhao et al. 2017).

#### ○ Structure et composition

Les pièges extracellulaires sont principalement composés de fibres de chromatine décondensée, d'histones H1, H2A, H2B, H3 et H4, et d'enzymes associées à ces structures. Ces enzymes proviennent de granules primaires (comme l'élastase neutrophile (NE), la cathepsine G et la MPO), de granules secondaires (comme la lactoferrine), et de granules tertiaires (comme la

gélatinase) (Brinkmann et al. 2004). La MPO active l'oxydation des halogénures par le peroxyde d'hydrogène pour former de l'acide hypochloreux, qui est hautement réactif et antimicrobien (Nauseef 2007). La NE est une sérine protéase qui a aussi une activité antibactérienne (Weinrauch et al. 2002). Elle joue également un rôle essentiel dans la formation des NETs et interagit avec la MPO pour initier la décondensation de la chromatine (Papayannopoulos et al. 2010). Cette activité antimicrobienne est également observée chez les histones qui sont les constituants les plus abondants des NETs, et plus particulièrement chez les histones H2A et H2B (Li et al. 2007).

- Mécanismes

Il existe deux grands mécanismes de formation des NETs : la NETose suicidaire et la NETose vitale. La NETose suicidaire est dépendante de l'activité de la NOX et implique la lyse de la cellule et donc sa mort, tandis que la NETose vitale se produit sans activité de la NOX et maintient la cellule en vie (Huang et al. 2022).

La formation des pièges extracellulaires par le processus de NETose suicidaire implique le déclenchement de la voie Raf-MEK-ERK (Desai et al. 2016), puis des voies dépendantes de la NOX, et de la génération de ROS (figure 5). La voie RIPK1-RIPK3-MLKL activant également la NOX est aussi impliquée (Hakkim et al. 2011). Différents récepteurs, tels que les récepteurs TLR, les récepteurs Fc ou les récepteurs du complément, peuvent induire l'initiation de la NETose (Brinkmann et al. 2004). Leur activation entraîne une libération de calcium du réticulum endoplasmique et une augmentation du calcium cytoplasmique. Ces ions calcium ( $Ca^{2+}$ ) vont stimuler l'activité de la protéine kinase C (PKC) (figure 5), la phosphorylation de la gp91phox et l'assemblage fonctionnel des sous-unités cytosoliques et membranaires de la NOX, ce qui entraîne la formation de ROS. Sous l'activation des ROS, les granules et l'enveloppe nucléaire se rompent. Dans cette voie, la citrullination des histones dépendante de la peptidylarginine déiminase 4 (PAD4) favorise la décondensation de l'ADN en neutralisant la charge positive des histones, ce qui diminue les interactions électrostatiques entre les histones et l'ADN. Ce processus génère un mélange d'ADN et de protéines bactéricides, comprenant la MPO et la NE qui se trouvaient initialement dans les granules intracytoplasmiques (Li et al. 2010). Par la suite, les substances nucléaires, granulaires et cytoplasmiques sécrétées se combinent pour former le NET (Y. Chen et al. 2022).

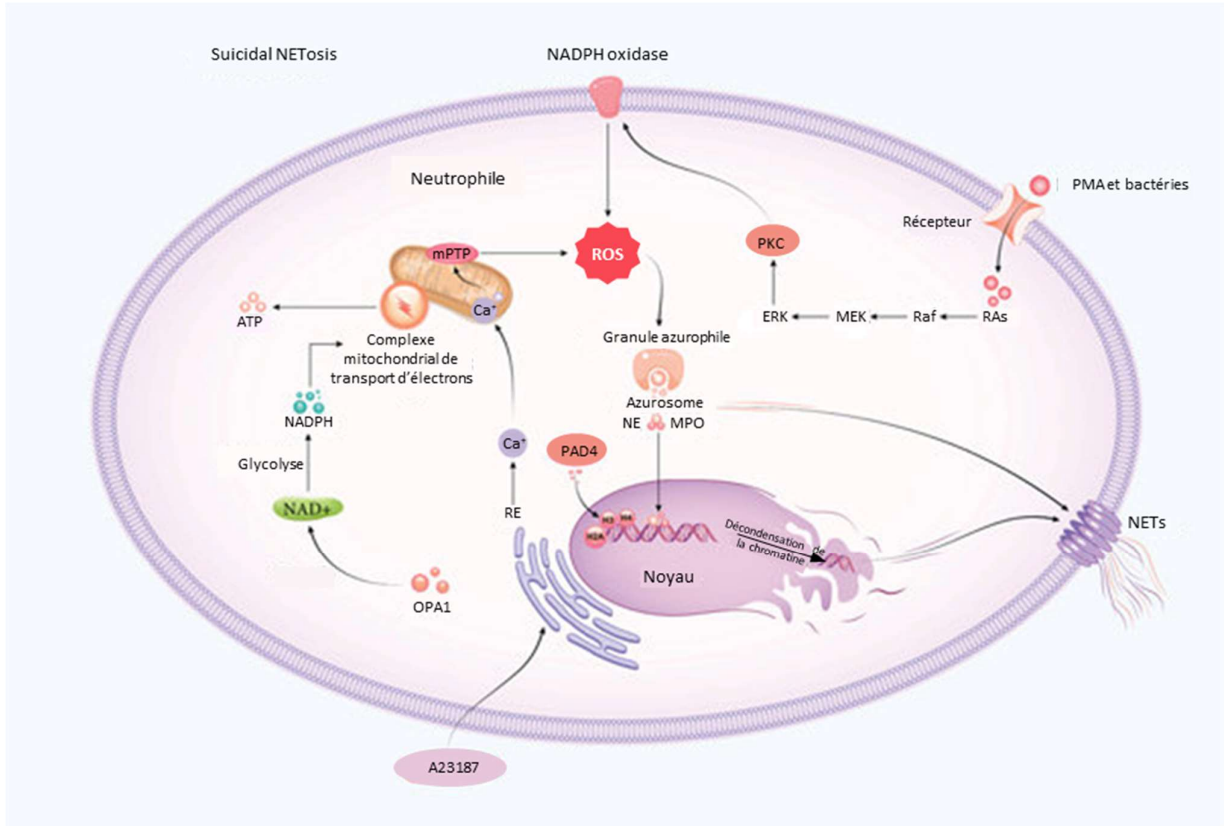


Figure 5 : Implication de la voie Raf-MEK-ERK dans la production des NETs.

La production des NETs par le processus de NETose suicidaire implique l'activation de la voie Raf-MEK-ERK suite à la reconnaissance de signaux comme la PMA ou des composants bactériens. Cette voie est dépendante des ROS qui vont favoriser la destruction de l'enveloppe nucléaire et des granules qui contiennent la MPO et la NE. Ces deux enzymes vont finalement permettre de décompacter l'ADN et s'associer à la chromatine pour former le NET par le processus de NETose suicidaire (Y. Chen et al. 2022).

La majorité des connaissances mécanistiques sur la NETose suicidaire proviennent d'études *in vitro* consistant à traiter des neutrophiles isolés avec par exemple de la PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate), un puissant activateur synthétique de plusieurs types de cellules immunitaires dont les neutrophiles via l'activation de la PKC (Silvestre-Roig et al. 2019; Weckbach et al. 2019).

La production de NETs par la mort du neutrophile est un processus lent (de 2 à 4 heures), ce qui a pour conséquence de laisser le temps aux pathogènes de se propager. En revanche, l'autre processus de formation de NETs, la NETose vitale, est plus rapide (entre 5 minutes et 1 heure) et indépendant des ROS et de la voie Raf-MERK-ERK (Pilszczek et al. 2010; Rochael et al.

2015). Ce type de NETose passe par l'activation des TLR et de récepteurs du complément (figure 6) (Byrd et al. 2013; Clark et al. 2007). De plus, la NETose vitale entraîne un mouvement vésiculaire de l'ADN de l'intérieur du noyau vers l'espace extracellulaire (Pilszczek et al. 2010). Les NETs sont expulsés par exocytose. Par conséquent, cette voie préserve l'intégrité des membranes plasmiques et n'entraîne pas la mort lytique des neutrophiles (Clark et al. 2007). Après le relargage d'ADN, ces neutrophiles restent fonctionnels : ils conservent leur capacité à faire de la phagocytose, et leur durée de vie n'est pas affectée (Yipp et al. 2013). Enfin, il a été montré que l'ADN composant ces pièges extracellulaires n'était pas uniquement d'origine nucléaire, mais pouvait également provenir de la mitochondrie, et que les neutrophiles relarguant de l'ADN mitochondrial restaient eux aussi viables (Yousefi et al. 2009).

La NETose vitale, indépendante de la NOX, peut être stimulée par des plaquettes activées, des micro-organismes et des protéines du complément (Douda et al. 2015). Après cette activation qui est régulée par le canal potassique 3 à faible conductance médiée par le calcium (SK3), les ions calcium pénètrent dans les neutrophiles (Douda et al. 2015). L'influx de  $Ca^{2+}$  active la PAD4 qui va aider à la citrullination de H3 (figure 6). Ainsi, la liaison électrostatique entre l'histone et l'ADN s'affaiblit, ce qui provoque la décondensation de la chromatine qui sera transportée par des vésicules hors du neutrophile, avec les histones et les protéines granulaires (Leshner et al. 2012).

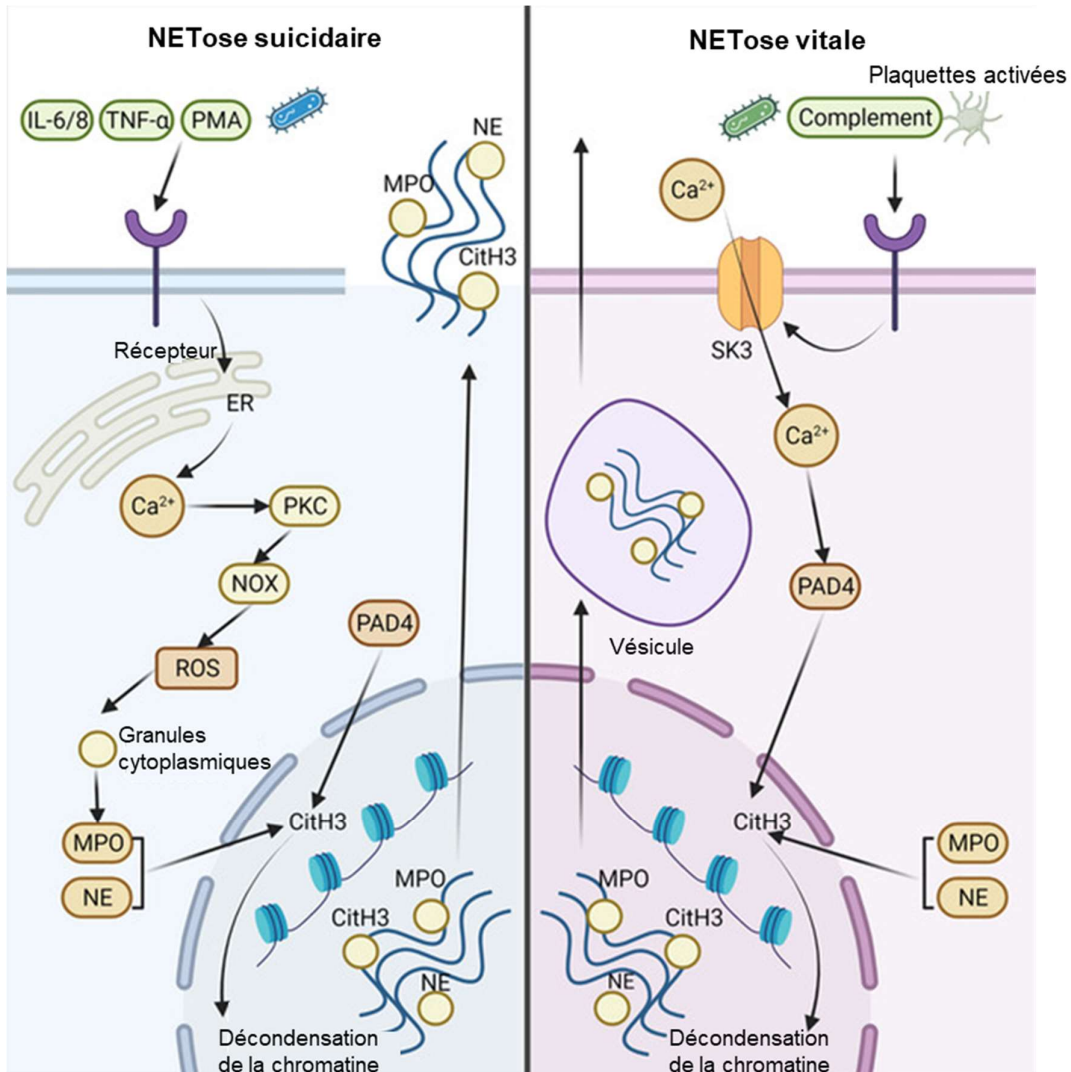


Figure 6 : Processus de formation des NETs par NETose suicidaire ou NETose vitale.

Lors de la NETose vitale, des ions calcium peuvent être libérés, entraînant l'activation de la protéine kinase C (PKC). Par la suite, la PAD4 induit la citrullination de l'histone H3 (CitH3), entraînant en outre une décondensation de la chromatine. Enfin, le NET est envoyé hors du neutrophile par des vésicules. Un autre type de NETose, appelée NETose suicidaire, implique les ROS via le complexe NOX activé. Le NET est formé et libéré dans l'espace extracellulaire (Huang et al. 2022).

Des études montrent que le clivage des histones H2, H3 et H4 en N-terminal peut être utilisé pour déterminer le type de NETose : la neutrophile élastase clive les queues N-terminales des histones lors de la NETose suicidaire mais pas durant la NETose vitale (Pieterse et al. 2018).

Outre la NETose vitale et la suicidaire, quelques études récentes indiquent qu'il pourrait

exister un troisième type de production de pièges extracellulaires. Il a été constaté que le LPS cytosolique ou les bactéries à Gram négatif induisent une forme de NETose dépendante des caspases *via* l'activation de la caspase-11.

Cette caspase clive la gasdermine D (GSDMD), conduisant à la formation de pores dans la membrane nucléaire (figure 7) (Chen et al. 2018). Ce pore nucléaire permet l'entrée de la caspase-11 et le clivage des histones, ce qui induit la décondensation de la chromatine. Par la suite, la GSDMD crée un pore dans la membrane plasmique pour permettre l'extrusion de l'ADN (Chen et al. 2018; Sollberger et al. 2018). Dans cette voie de formation des pièges extracellulaires, la NE, la MPO et la PAD4 ne semblent pas nécessaires : la caspase-11 et la GSDMD sont les inducteurs directs (Chen et al. 2018).

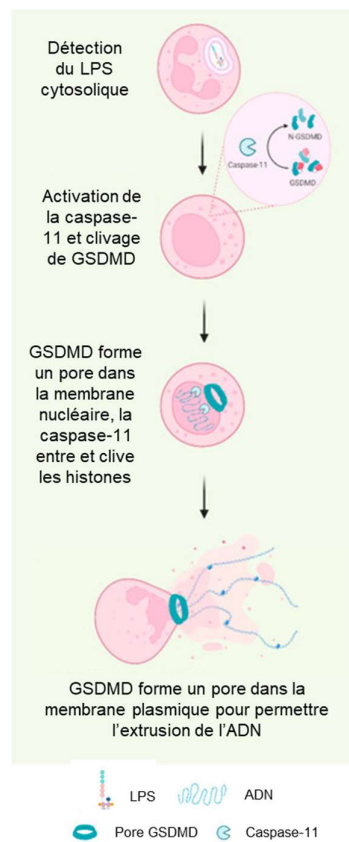


Figure 7 : Mécanisme de formation des pièges extracellulaires dépendant de la caspase-11.

Dans cette voie, il y a une activation de la caspase-11, qui clive la GSDMD, conduisant à la formation de pores dans la membrane nucléaire : cela va permettre la translocation de la caspase-11 dans le noyau pour le clivage des histones. La GSDMD forme ensuite des pores dans la membrane plasmique pour l'expulsion du piège extracellulaire.



- Dommmages causés par les NETs

La capacité des NETs à limiter la dispersion des pathogènes et à favoriser leur destruction est bien connue. Néanmoins, les NETs peuvent également endommager les tissus en cas d'excès, notamment lors d'infections et de maladies auto-immunes.

Par exemple, dans le lupus érythémateux disséminé, une maladie auto-immune dans laquelle les patients développent des auto-anticorps contre l'ADN et les histones, la formation de ces pièges extracellulaires ainsi que les difficultés à les éliminer, entraîne une atteinte rénale (Hakkim et al. 2010). Dans la polyarthrite rhumatoïde, caractérisée par une inflammation synoviale persistante qui provoque des lésions du cartilage et des os dans les articulations, une production de NETs associée à une augmentation de l'inflammation dans les articulations, peut contribuer à la pathogénèse de cette maladie (Khandpur et al. 2013). Les NETs sont également impliqués dans d'autres pathologies auto-immunes comme la rectocolite hémorragique (Bennike et al. 2015) ou la vascularite des petits vaisseaux dans laquelle ils endommagent les cellules endothéliales et induisent une inflammation locale dans les vaisseaux (Villanueva et al. 2011). Ils peuvent également tuer directement les cellules épithéliales et endothéliales (Saffarzadeh et al. 2012; Villanueva et al. 2011) ou participer à l'évolution de maladies métaboliques comme le diabète de type 2, l'hyperglycémie augmentant la production des NETs (Menegazzo et al. 2015).

Une autre fonction néfaste des NETs est l'occlusion du système vasculaire. La présence de protéines pro-coagulantes dans la structure des NETs peut activer le processus de coagulation sanguine à travers la formation de fibrine, une protéine qui forme le réseau de base des caillots sanguins. Les NETs induisent aussi le piégeage des plaquettes et des cellules sanguines qui dans ce cas, peuvent s'agréger et contribuer là encore à la formation de caillots sanguins. Cela conduit à une occlusion rapide des vaisseaux affectés, à une microcirculation perturbée et à des lésions organiques (Leppkes et al. 2020).

Dans le système nerveux central (SNC), les NETs sont également retrouvés dans les infections de type méningite ou encéphalopathie, où grâce à leur rôle antimicrobien, ils permettent de lutter contre l'infection (Appelgren et al. 2019; Schönrich et al. 2016). Cependant, ils sont également connus pour être présents dans de nombreuses pathologies neurologiques. Par exemple, ils sont impliqués dans les déficits neurologiques suite à un traumatisme crânien : une étude dans un modèle d'impact cortical chez la souris a montré une augmentation de la

production de NETs, ainsi qu'une réduction de l'œdème cérébral et une amélioration des déficits neurologiques suite à l'inhibition de leur production (Vaibhav et al. 2020).

Suite à l'inhibition de la production de NETs dans un modèle de souris athérosclérotiques, la thrombose de l'artère carotide et la taille des lésions athérosclérotiques étaient réduites (Fuchs et al. 2010; Knight et al. 2014). Les NETs sont également retrouvés lors des ischémies cérébrales et provoquent aussi des effets négatifs en cas d'excès de production. Dans cette pathologie, les NETs accélèrent le processus de coagulation et de formation de caillots sanguins (S.-W. Kim et al. 2020).

Ils sont également associés à la maladie d'Alzheimer et à la neuro-inflammation chronique qui est une caractéristique de cette maladie (Wyss-Coray et al. 2012). La présence de ces NETs a été montrée dans un modèle murin et chez les patients atteints (Wyss-Coray et al. 2012; Zenaro et al. 2015) : ils aggravent l'inflammation et peuvent causer des dommages (Manda-Handzlik et al. 2019). Enfin, une étude dans un modèle de lésion de la moelle épinière chez le rat a montré que l'inhibition de la production de NETs atténuait les dommages secondaires, limitait la formation de la cicatrice gliale et favorisait la récupération fonctionnelle (Feng et al. 2021).

Depuis la découverte de ces pièges extracellulaires produits par les neutrophiles, appelés NETs, ce type de structures a été caractérisé dans de nombreux autres types cellulaires : les METs (macrophage extracellular traps) formés par les macrophages (Mohan et al. 2013; Sharma et al. 2017), les EETs (eosinophil extracellular traps) par les éosinophiles (Ueki et al. 2013, 2016), les BETs (basophil extracellular traps) par les basophiles (Morshed et al. 2014; Schorn et al. 2012), les MCETs (mast cell extracellular traps) par les mastocytes (von Köckritz-Blickwede et al. 2008), les pETs (plasmacytoid dendritic cell extracellular traps) par les cellules dendritiques (Loures et al. 2015), les METs par les monocytes (Granger et al. 2017; Muñoz-Caro et al. 2014), et les MiETs par la microglie (Wang et al. 2019). Bien qu'il existe des similitudes dans la formation de tous ces types de pièges extracellulaires, les déclencheurs de leur formation peuvent varier selon les types de cellules en fonction des agents pathogènes ou des stimuli immunitaires rencontrés, mais beaucoup sont encore peu étudiés.

#### 4.6. Les monocytes

Les monocytes sont des phagocytes mononucléés issus de la lignée myéloïde. Ils sont produits dans la moelle osseuse puis passent dans la circulation sanguine, où ils peuvent rester durant 1 à 3 jours avant d'être recrutés par tous les types de tissus par le processus de diapédèse leucocytaire, ou dégradés au niveau de la rate ou du foie (Hu et al. 2009).

Au cours de l'homéostasie, ils contribuent à l'élimination des cellules sénescents et apoptotiques. Les monocytes sont aussi les principaux effecteurs de l'immunité innée : leur recrutement est essentiel pour le contrôle des infections (bactériennes, virales ou fongiques), grâce à leur capacité à phagocyter les pathogènes, à leur activité antimicrobienne et à leur rôle de principale source de médiateurs inflammatoires (Cavaillon et al. 2005).

La différenciation des monocytes est sous le contrôle de facteurs hématopoïétiques, comme le facteur des cellules souches et l'IL-3. Au cours d'une infection, d'autres facteurs comme le GM-CSF sont produits et stimulent l'hématopoïèse, incluant la production de monocytes.

Il existe deux principales sous-populations de monocytes circulants et inflammatoires, caractérisées selon l'expression à leur surface cellulaire de certains récepteurs de chimiokines (CCR2+ et CCR2-) et de la L-sélectine (Geissmann et al. 2003). Que le contexte soit inflammatoire ou non, les monocytes doivent infiltrer les tissus avant de se différencier. La première étape du processus de migration vers le site d'infection est leur adhésion à la surface de la paroi vasculaire *via* des molécules d'adhésion. En condition physiologique, les monocytes circulants infiltrer les tissus sains grâce à l'intégrine B2. Là, ils vont renouveler certaines populations de cellules dendritiques ou de macrophages tissulaires pouvant survivre des mois voire des années et acquérir une spécificité tissulaire, comme les macrophages péritonéaux par exemple. Si le contexte est inflammatoire, les monocytes inflammatoires adhèrent à l'endothélium grâce aux molécules d'adhésion ICAM-1 et 2, VCAM-1, à l'antigène très tardif 4, aux L-sélectine (CD62L) ou CD43, et à l'intégrine B2, puis ils migrent vers les tissus inflammés pour se différencier en cellules dendritiques ou en macrophages inflammatoires (Imhof et al. 2004).

#### 4.7. Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont présentes dans les tissus en contact avec l'environnement extérieur comme les muqueuses, le système digestif et la peau, où il existe un type de cellules dendritiques spécialisées appelées cellules de Langerhans. Elles peuvent également être trouvées à l'état immature dans le sang (Reizis 2012).

Les cellules dendritiques sont les cellules de présentation antigénique les plus puissantes. Elles jouent un rôle essentiel dans la reconnaissance des agents pathogènes, la régulation de la réponse immunitaire et l'inflammation : elles initient la réponse immunitaire innée en capturant les agents pathogènes, puis elles contribuent à la réponse adaptative grâce à leur capacité à présenter l'antigène. En effet, une fois activées, elles migrent vers les ganglions lymphatiques où elles vont permettre l'activation des lymphocytes T et B en présentant l'antigène, ce qui va initier et réguler la réponse immunitaire adaptative et favoriser la communication et la coordination du système immunitaire (Niessen et al. 2008; Poehlmann et al. 2009).

Enfin, les cellules dendritiques permettent de contribuer au maintien de l'homéostasie en empêchant les réactions immunitaires excessives en présence d'antigène du soi (Lukacs-Kornek et al. 2011).

#### 4.8. Les macrophages

Les macrophages peuvent avoir deux origines : ils peuvent soit provenir de la différenciation des monocytes, soit avoir une origine embryonnaire et résider en permanence dans les tissus durant toute la vie de l'individu (Gentek et al. 2014).

Ils remplissent plusieurs fonctions : comme les neutrophiles, ils réalisent de la phagocytose, puis ils dégradent les pathogènes internalisés par le processus d'explosion oxydative qui consiste à libérer rapidement des ROS telles que l'ion superoxyde ou le peroxyde d'hydrogène. Après avoir détruit un agent pathogène, les macrophages peuvent présenter des antigènes associés aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II, et donc stimuler des lymphocytes CD4+. Ils sont également capables de produire et sécréter des cytokines comme l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  afin d'activer le recrutement d'autres cellules de l'immunité telles que les

neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes T (Shapouri-Moghaddam et al. 2018).

Les macrophages adoptent différents phénotypes fonctionnels en réponse aux signaux qu'ils reçoivent de leur environnement. Ce processus, appelé polarisation, est un processus dynamique qui se produit lorsque les macrophages sont stimulés par des changements dans le microenvironnement d'un tissu spécifique, entraînant différents phénotypes fonctionnels (Sica et al. 2015). Les deux principaux phénotypes actuellement connus sont les macrophages inflammatoires ou activés de manière classique dits de type M1, et les macrophages cicatrisants ou activés de manière alternative dits de type M2 (Patel et al. 2017) : ces deux phénotypes représentent donc des pôles opposés du spectre de polarisation des macrophages (Labonte et al. 2014).

Cette caractérisation M1/M2 a principalement été définie *in vitro* à l'aide de stimulations ne reflétant pas la complexité du micro-environnement *in vivo* (Mills et al. 2000). En réalité, cette classification est bien plus complexe et il est maintenant largement admis que le profil M1/M2 a peu de pertinence *in vivo* : il existe plus vraisemblablement un continuum de polarisation entre les stades M1 et M2 (Specht et al. 2021). De plus, les macrophages présentent une plasticité très importante et peuvent passer d'un état d'activation à l'autre en fonction du micro-environnement (Porcheray et al. 2005).

La polarisation de l'équilibre des macrophages présentant un phénotype plutôt M1 ou M2 est nécessaire pour éviter des lésions. En effet, lors d'une infection, les macrophages présentent d'abord le phénotype orienté vers le type M1 pour libérer de nombreuses molécules pro-inflammatoires dirigées contre le pathogène. Cependant, un processus continu de polarisation des macrophages vers ce type M1 peut entraîner des dommages aux tissus, aux organes et aux cellules immunitaires. Par conséquent, les macrophages de phénotype orienté vers le type M2 sécrètent de grandes quantités de molécules anti-inflammatoires pour supprimer l'inflammation et revenir dans des conditions inflammatoires physiologiques (Shapouri-Moghaddam et al. 2018).

Les macrophages activés par des cytokines comme le TNF- $\alpha$  ou l'IFN- $\gamma$ , mais également par les PAMPs tels que le LPS se polariseront vers le phénotype M1 (Arora et al. 2018). Chez l'homme, ces macrophages expriment fortement les marqueurs CD68, CD80, CD86, le CMH de classe II, l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) et le TLR4 (Atri et al. 2018). Des niveaux élevés d'iNOS dans ces macrophages contribuent à la synthèse d'oxyde nitrique (NO) qui permet de lutter contre

les agents pathogènes (Vogel et al. 2014). En général, ils présentent une forte activité cytotoxique, afin de tuer les agents pathogènes et éliminer les cellules endogènes anormales car il provoque des dommages oxydatifs et nitrosatifs en modifiant l'ADN, en inhibant la fonction enzymatique et en induisant une peroxydation lipidique, qui explique la majorité des propriétés antimicrobiennes du NO (Wink et al. 1998). Ils favorisent également la dégradation de la matrice extracellulaire et l'activité antitumorale (Vogel et al. 2014). En outre, ils sécrètent de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-12, IL-23 et IL-1 $\beta$ ) pour attirer les lymphocytes NK (natural killer), les neutrophiles et les lymphocytes T activés (figure 8) (Atri et al. 2018).

Les macrophages plutôt polarisés M2 peuvent être induits par certaines cytokines comme l'IL-4, IL-13, l'IL-10 et le TGF- $\beta$ , par les glucocorticoïdes et par le complexe immunitaire (Sica et al. 2015). Ils expriment des niveaux élevés de lectines de type C (CD206) et de récepteurs endocytaires (CD163). Ils favorisent la sécrétion de chimiokines comme CCL17 et CCL18 pour recruter des basophiles, des éosinophiles et des lymphocytes T régulateurs sur le site inflammé comme lors d'allergies (Kang et al. 2013). Ils produisent également des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10, l'IL-1ra et le TGF- $\beta$  (figure 8) (Porta et al. 2015). Ces macrophages de type M2 sont impliqués dans le maintien de l'homéostasie et dans la régulation de la réponse immunitaire, grâce à la promotion de l'angiogenèse, le remodelage tissulaire et l'inhibition de l'inflammation.

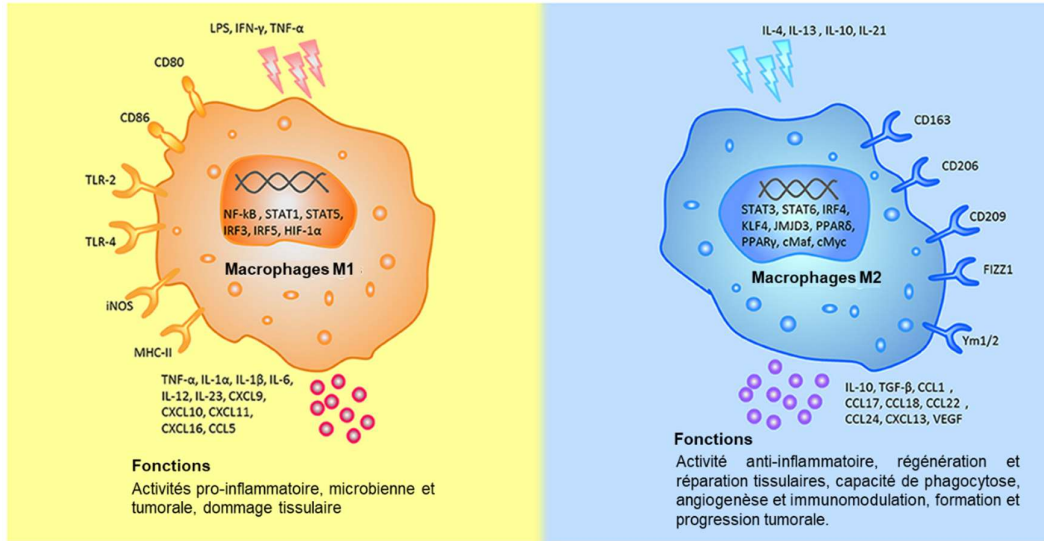


Figure 8 : Activation des macrophages.

Résumé des différents stimuli, marqueurs de surface, cytokines sécrétées et fonctions biologiques des macrophages de types M1 et M2. CCL, ligand de chimiokine (motif C-C); cMaf, fibrosarcome c-musculo-aponévrotique; CXCL, ligand de chimiokine (C-X-C); FIZZ1,  $\alpha$  de type résistine; HIF, facteur inductible par l'hypoxie; iNOS, oxyde nitrique synthase inductible; IFN- $\gamma$ , interféron-gamma; IL, interleukine; IRF, facteur de régulation de l'interféron; JMJD, protéine contenant le domaine Jumonji; KLF, facteur de type Kruppel; NF- $\kappa$ B, facteur nucléaire  $\kappa$ B; KLF, facteur de type Kruppel; LPS, lipopolysaccharides; CMH, complexe majeur d'histocompatibilité; PPAR, récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes; STAT, transducteur de signal et activateur de transcription; TLR, récepteur de type Toll; TNF- $\alpha$ , facteur de nécrose tumorale alpha; TGF- $\beta$ , facteur de croissance transformant bêta; VEGF, facteur de croissance endothélial vasculaire; Ym1, chitinase 3-like 3 (Denning et al. 2019).

La majorité des macrophages résident dans les tissus en condition non inflammatoires. Ils peuvent avoir des fonctions et des noms spécifiques comme les macrophages alvéolaires dans les poumons, les cellules de Kupffer dans le foie, ou la microglie dans le SNC. Ma thèse portant en grande partie sur la neuro-inflammation au niveau spinal, la microglie sera le seul de ces types cellulaires que je développerai dans la suite de ce manuscrit.

#### 4.9. La microglie

La microglie est un type de cellules gliales située dans le cerveau et la moelle épinière (Lawson et al. 1990). Elle provient des cellules du sac vitellin qui peuplent le SNC lors de la phase embryonnaire (Ginhoux et al. 2010). Il s'agit d'une population de macrophages résidents, qui

représente environ 10 à 15 % des cellules présentes dans le SNC (Baik et al. 2014) dont elle constitue la première forme de défense immunitaire (Kreutzberg 1995). La microglie permet de réguler la réponse neuro-inflammatoire en phagocytant et en éliminant les débris et les cellules mortes dans le SNC (Li et al. 2005; Zhao et al. 2019). Elle participe également à l'immunité innée et adaptative en régulant la tolérance immunitaire grâce à leur fonction de veille : leurs récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR) peuvent détecter les PAMPs et les modèles moléculaires associés aux dommages (DAMPs), permettant ainsi leur activation en présence d'un pathogène (Saijo et al. 2011).

Il existe différents sous-types de microglie, qui sont fonctionnellement et morphologiquement différents en fonction de leur degré de réactivité et de leur rôle dans la réponse immunitaire (figure 9). La morphologie ramifiée, qui est la forme au repos, présente un petit corps cellulaire, de longues branches et une faible activité immunitaire. Cette forme de microglie n'a pas de capacité fonctionnelle de phagocytose et de présentation antigénique mais maintient un environnement immunologiquement stable (Kierdorf et Prinz, 2017). Sous cette forme, grâce à ses prolongements cytoplasmiques, la microglie réalise une surveillance constante du microenvironnement notamment contre les agents pathogènes, les signaux associés et les dommages cellulaires (Nimmerjahn et al. 2005), afin de rechercher et d'identifier les menaces immunitaires tout en maintenant l'homéostasie dans le SNC. Bien que cela soit considéré comme l'état de repos, la microglie sous cette forme est encore extrêmement active dans l'analyse de l'environnement puisqu'elle permet de réagir rapidement aux perturbations du microenvironnement (Aloisi 2001). En effet, en cas de perturbation, la microglie est le premier type cellulaire à s'activer, et ce en quelques minutes (Davalos et al. 2005).

Lors de son activation, la microglie subit un changement de morphologie : la forme activée représente un continuum qui va de la forme ramifiée vers un corps cellulaire amiboïde arrondi avec des prolongements courts et épais. La microglie activée possède la capacité de présenter l'antigène et de phagocyter mais ne se déplace pas (Cai et al. 2014), tandis que lorsqu'elle atteint la forme amiboïde, elle a la capacité de se déplacer librement dans le tissu et de phagocyter mais elle n'est plus capable de réaliser la présentation d'antigène (Savage et al. 2019).

En plus de son activité de phagocytose pour éliminer les agents pathogènes, la microglie peut sécréter des substances cytotoxiques, comme des protéinases, des cytokines, des espèces



réactives de l'oxygène ou de l'azote (Banati et al. 1993). En cas de dérèglement, ces substances peuvent endommager directement les cellules et entraîner la mort des neurones. En effet, les protéases sécrétées dégradent des protéines spécifiques à l'origine de dommages cellulaires directs, tandis que des cytokines comme l'IL-1 favorisent la démyélinisation des axones neuronaux (Lin et al. 2017). Enfin, la microglie peut aussi endommager les neurones *via* le récepteur NMDA qui est activé par le glutamate ou l'aspartate qu'elle sécrète (Domercq et al. 2013).

Ainsi, la sécrétion cytotoxique qui vise à détruire les virus et les bactéries, peut également causer de grandes quantités de lésions neurales collatérales. De ce fait, une activation excessive ou à long terme de la microglie est délétère, puisqu'elle induit une mort neuronale mais aussi une augmentation des cytokines pro-inflammatoires (Lull et al. 2010) (figure 9).

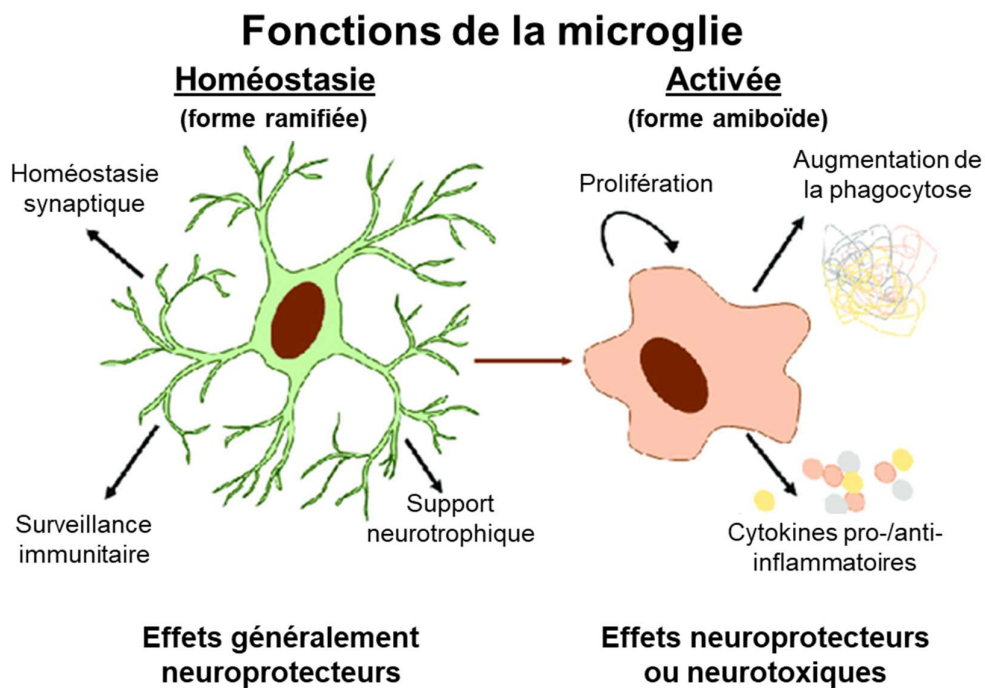


Figure 9 : Formes et fonctions de la microglie dans les états homéostatique et activé. En l'absence d'inflammation, la microglie a un rôle de soutien des neurones et de surveillance des agents pathogènes ou d'autres débris dans le SNC. Une fois activée, elle augmente sa capacité phagocytaire et tente de combattre l'infection ou les dommages en libérant des cytokines pro- et/ou anti-inflammatoires. Ces fonctions activées peuvent entraîner la résolution de l'infection ou des dommages et donc une neuroprotection ou, par exemple, dans les maladies neurodégénératives, entraîner une inflammation continue et des effets neurotoxiques ultérieurs (Bruno et al. 2021).

En plus des fonctions précédemment citées, des travaux, majoritairement *in vitro*, ont récemment montré que la microglie est également capable de former des pièges extracellulaires (Agrawal et al. 2021; Eto et al. 2021). Une seule étude *in vivo* (Wang et al. 2019) l'a aussi mis en évidence.

L'inflammation et la réponse immunitaire sont des processus vitaux qui visent à protéger l'organisme contre les infections et les lésions tissulaires. Cependant, lorsque cette réaction immunitaire devient dérégulée ou se propage de manière incontrôlée, elle peut conduire à des complications graves comme le sepsis qui illustre comment l'inflammation, normalement bénéfique, peut entraîner des conséquences graves, voire létales lorsque les mécanismes de régulation du système immunitaire sont dépassés.

## **LE SEPSIS**

---

## 1. LE SEPSIS

---

### 1.1. Définition

Le sepsis est une pathologie encore peu connue du grand public, alors que selon l'organisation mondiale de la santé, il représente un décès sur cinq, soit environ 48 millions cas et 11 millions de décès annuels dans le monde.

L'histoire des définitions du sepsis est marquée par une évolution progressive de la compréhension de cette pathologie complexe. Les premières références à des symptômes similaires au sepsis sont attribuées à Hippocrate, qui a décrit des cas de fièvre, de frissons et d'infections potentiellement mortelles. Puis au cours du 19<sup>ème</sup> siècle, la médecine moderne a commencé à mieux comprendre les infections et leurs conséquences. Cependant, le terme sepsis n'était pas encore largement utilisé à cette époque. Dans les années 1970, le terme « syndrome de réponse inflammatoire systémique » (SIRS) a été introduit pour décrire la réaction du corps à une infection. Cette définition incluait des critères tels que la fièvre, les fréquences cardiaque et respiratoire accrues et une numération des globules blancs anormale. Cependant, le SIRS n'était toujours pas spécifique au sepsis (Gyawali et al. 2019). La première utilisation moderne du terme sepsis est attribuée à Roger Bone dans les années 80. À cette époque, cette pathologie était définie comme une infection accompagnée d'une réaction inflammatoire systémique. Cependant, cette définition était encore assez vague (Bone et al. 1992).

En 1991, une conférence de consensus organisée par la Society of Critical Care Medicine et l'American College of Chest Physicians a abouti à la définition du sepsis comme étant une infection associée à au moins deux critères de SIRS (Bone et al. 1992). Une révision majeure de cette définition, appelée Sepsis-2, est intervenue en 2001 avec l'introduction des prémices du score de gravité du sepsis (SOFA, pour Sequential sepsis-related Organ Failure Assessment) qui a pris en compte des paramètres plus spécifiques, tels que la fonction des organes. Cette seconde définition a également introduit le terme « syndrome de réponse inflammatoire systémique lié à l'infection » (Levy et al. 2003).

À cette époque, le sepsis pouvait être découpé en deux grandes phases par lesquelles

passent les patients. La phase hyperdynamique est généralement la première phase de cette pathologie. Elle est marquée par une réponse physiologique durant laquelle le corps tente de juguler l'infection induisant une augmentation du métabolisme. Cette augmentation du métabolisme entraîne une élévation des débits cardiaque et sanguin pour maintenir un apport en oxygène et en nutriments adéquat aux organes et aux tissus, mais également pour éliminer les déchets du métabolisme. Les signes cliniques de cette phase peuvent inclure une fréquence cardiaque élevée (tachycardie), une augmentation du débit cardiaque et une vasodilatation périphérique. Cependant, dans la phase hypodynamique, plus tardive, le corps ne parvient plus à maintenir un débit sanguin adéquat pour fournir de l'oxygène et des nutriments aux organes et aux tissus. Les symptômes de cette phase peuvent inclure une fréquence cardiaque plus faible (bradycardie), une baisse significative du débit cardiaque, une pression artérielle systémique basse, une confusion mentale, une hypoxie (niveaux d'oxygène bas dans le sang) ainsi qu'une acidose lactique sévère (Clowes et al. 1966; Gahhos et al. 1981).

Enfin en 2016, la troisième Conférence Internationale sur le Sepsis et les Définitions de Choc Septique a proposé une nouvelle définition, appelée Sepsis-3, basée sur le concept des dysfonctions d'organes. Cette fois, le sepsis est défini par une dysfonction d'organes potentiellement mortelle causée par une réponse dérégulée de l'hôte à une infection. En clinique, ces dysfonctions d'organes sont caractérisées à l'aide du score SOFA (figure 10). Ce score, redéfini en 2016, est calculé à partir d'un barème qui attribue un nombre de points en fonction de l'état des principaux systèmes (respiratoire, neurologique, cardiovasculaire, etc.). S'il est supérieur ou égal à deux, ce score suggère un sepsis et est associé à un risque de mortalité accru de 10 % (M. Singer et al. 2016).

Système	Score				
	0	1	2	3	4
Respiration					
PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> , mm Hg (kPa)	≥400 (53.3)	<400 (53.3)	<300 (40)	<200 (26.7) avec assistance respiratoire	<100 (13.3) avec assistance respiratoire
Coagulation					
Plaquettes x10 <sup>3</sup> /μL	≥150	<150	<100	<50	<20
Foie					
Bilirubine, mg/dL (μmol/L)	<1.2 (20)	1.2-1.9 (20-32)	2.0-5.9 (33-101)	6.0-11.9 (102-204)	>12.0 (204)
Cardiovasculaire					
	MAP ≥70 mm Hg	MAP <70 mm Hg	Dopamine <5 ou dobutamine (toutes doses) <sup>b</sup>	Dopamine 5.1-15 ou epinephrine ≤0.1 ou norepinephrine ≤0.1 <sup>b</sup>	Dopamine >15 ou epinephrine >0.1 ou norepinephrine >0.1 <sup>b</sup>
Système nerveux central					
Score de l'échelle de coma de Glasgow <sup>c</sup>	15	13-14	10-12	6-9	<6
Rénal					
Créatinine, mg/dL (μmol/L)	<1.2 (110)	1.2-1.9 (110-170)	2.0-3.4 (171-299)	3.5-4.9 (300-440)	>5.0 (440)
Débit urinaire, mL/d				<500	<200

Abréviations : FiO<sub>2</sub>, fraction d'oxygène inspiré ; MAP, pression artérielle moyenne ; PaO<sub>2</sub>, pression partielle d'oxygène.  
<sup>a</sup> Adapté de Vincent et al.<sup>27</sup>

<sup>b</sup> Les doses de catécholamine sont données en μg/kg/min pendant au moins 1 heure.  
<sup>c</sup> Les scores de l'échelle de coma de Glasgow vont de 3 à 15 ; le score le plus haut indique les meilleures fonctions neurologiques.

Figure 10 : Score SOFA

Score utilisé pour évaluer les fonctions d'organes des patients au niveau respiratoire (avec la mesure du ratio de la pression partielle d'oxygène sanguin et de la fraction d'oxygène présent dans le mélange gazeux (PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>), hépatique (avec le dosage de la bilirubine), rénal (avec le dosage sanguin de la créatinine et la mesure du débit urinaire), cardiovasculaire (avec la mesure de la pression artérielle) et nerveux (grâce à l'échelle de Glasgow qui permet d'évaluer l'état de conscience du patient). La coagulation est également évaluée grâce au dosage des plaquettes sanguines (M. Singer et al. 2016).

Le sepsis peut également évoluer vers une forme plus grave de la maladie : le choc septique. Il s'agit d'un sous-ensemble du sepsis qui présente un risque de mortalité beaucoup plus important (40 %) (Bauer et al. 2020). Il est caractérisé par des anomalies circulatoires, cellulaires et métaboliques graves. Résistants au remplissage vasculaire, ces patients sont identifiés cliniquement par un besoin en vasopresseur pour maintenir une pression artérielle moyenne de 65 mmHg ou plus. De plus, leur taux de lactate sérique est supérieur à 2 mmol/L, ce qui reflète un apport en oxygène insuffisant (M. Singer et al. 2016).

## 1.2. Épidémiologie

### 1.2.1. Incidence et mortalité

Avec 11 millions de morts par an dans le monde, soit 1 décès sur 5 selon l'OMS (OMS,

données de 2020), le sepsis est considéré comme la seconde cause de mortalité au niveau mondial après les maladies cardiovasculaires, et la première cause de décès liée à l'hospitalisation aux États-Unis avec environ 250 000 décès par an (Angus et al. 2013).

Son incidence augmente au fil des ans, principalement pour deux raisons : une meilleure connaissance de la pathologie induisant de ce fait un meilleur diagnostic et un meilleur recensement des cas, et un vieillissement de la population, ce qui augmente le risque de développer cette pathologie, notamment à cause de comorbidités liées à l'âge. De même, la fonction immunitaire diminuant avec l'âge, les personnes âgées sont aussi plus susceptibles de développer une infection (60 % des patients atteints de sepsis ont plus de 65 ans) (Girard et al. 2005).

### **1.2.2. Facteurs de risques**

Les facteurs à l'origine de l'augmentation du risque de développer un sepsis sont multiples. Parmi ces facteurs aggravants, le genre semble jouer un rôle : les hommes sont plus fréquemment atteints par cette maladie, mais paradoxalement, le risque de décès est plus élevé chez les femmes (Nachtigall et al. 2011). L'origine ethnique semble également avoir une incidence : les individus de type caucasien ont un risque plus faible de développer un sepsis par rapport à toutes les autres ethnies, mais le facteur responsable de cette disparité est encore inconnu (Dombrovskiy et al. 2007; Mayr et al. 2010). Les personnes ayant un système immunitaire affaibli sont également plus susceptibles de développer une infection, qui peut dans certains cas entraîner un sepsis. Cela peut être dû à des maladies chroniques, ou à la prise de certains médicaments tels que les corticostéroïdes ou les immunosuppresseurs par exemple (G. S. Martin, Mannino, et Moss 2006). De plus, de nombreuses maladies associées aux personnes âgées sont connues pour augmenter le risque d'infection et donc de développer cette pathologie, comme par exemple la bronchopneumopathie chronique obstructive qui provoque l'altération de la clairance mucociliaire, le dysfonctionnement des macrophages alvéolaires et la suppression du mécanisme de la toux, ce qui augmente considérablement le risque d'infection des voies respiratoires inférieures chez cette catégorie de patients (Rowe et al. 2017). Enfin, l'hospitalisation et les interventions chirurgicales augmentent également la probabilité de développer un sepsis. En effet, les personnes hospitalisées sont souvent exposées à des bactéries et à d'autres germes au sein

de l'hôpital, ce qui peut conduire au développement d'une infection nosocomiale en cas d'immunodépression par exemple (données de l'OMS de 2020).

### 1.2.3. Étiologie

La majorité des cas de sepsis est causée par une infection d'origine bactérienne, mais cette pathologie peut aussi être due à une infection virale ou fongique (CDC 2022; Martin et al. 2003).

Il y a environ autant de cas d'infection à bactéries à Gram négatif qu'à Gram positif, malgré une légère prédominance de ces dernières. Quant aux infections d'origine fongique, elles ne représentent qu'une petite proportion des cas et restent rares, mais leur incidence tend à augmenter au fil des années grâce à une meilleure identification de celles-ci (figure 11) (Martin et al. 2003).

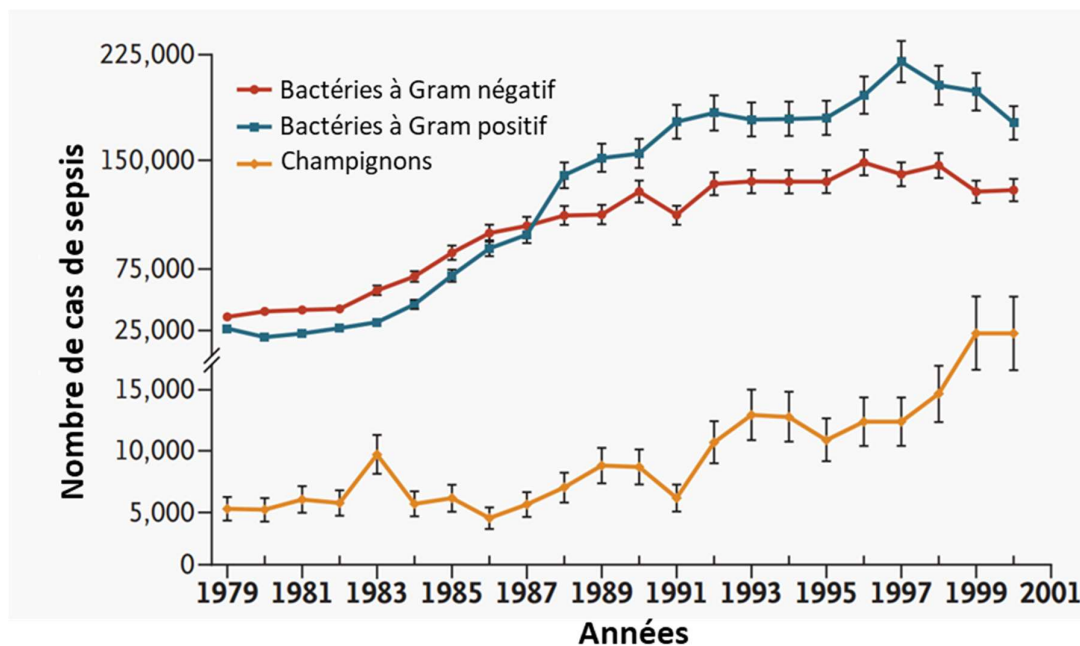


Figure 11 : Nombre de cas de sepsis aux États-Unis (entre 1979 et 2001). L'incidence du sepsis a augmenté entre 1979 et 2001, qu'il soit d'origine bactérienne ou fongique. Dans la majorité des cas, cette infection est d'origine bactérienne (Martin et al. 2003).



### 1.2.4. Coût et prise en charge

Le coût de la gestion du sepsis dans les hôpitaux est très élevé. En 2013, le sepsis représentait plus de 24 milliards de dollars de dépenses hospitalières, soit 13 % du total des coûts hospitaliers aux États-Unis, mais paradoxalement, il ne représentait que 3,6 % des séjours (Torio Celeste M et al. 2016).

En outre, les patients qui survivent à un sepsis gardent souvent des séquelles de la pathologie. Ces patients peuvent développer des complications cardiovasculaires, telles qu'un infarctus du myocarde, une insuffisance cardiaque aiguë ou un accident vasculaire cérébral (Merdji et al. 2021). Une forte proportion des patients (25 à 50 %) devra vivre avec des troubles cognitifs qui affectent leur vie quotidienne, avec des problèmes de mémoire, d'apprentissage, de concentration et de prise de décision. Ils sont également affectés par des handicaps physiques persistants, associés à une perte de force musculaire, une diminution de la masse musculaire et une réduction de la taille des fibres musculaires (Callahan et al. 2009; Mostel et al. 2019). Toutes ces complications engendrent des implications financières, sanitaires et sociales importantes (Yende et al. 2007).

## 1.3. Les modèles de sepsis

### 1.3.1. Modèles animaux

La physiopathologie du sepsis implique des interactions complexes entre le système immunitaire, le SNC et divers organes. C'est pourquoi les modèles animaux jouent un rôle central dans l'étude des mécanismes complexes sous-jacents de cette pathologie, mécanismes difficiles à reproduire sur des modèles *in vitro*. Il est cependant important de noter que ces modèles ne sont pas une réplique exacte de la pathologie humaine : ils permettent donc de travailler sur certains aspects du sepsis mais ne peuvent pas prédire avec précision les résultats chez l'Homme. Ainsi, avant la mise en œuvre d'essais thérapeutiques, l'utilisation de modèles complémentaires est recommandée pour la compréhension des mécanismes mis en jeu. Cette combinaison de plusieurs modèles a l'avantage de pouvoir fournir des informations précieuses sur la pathogenèse du sepsis et sur l'efficacité des traitements potentiels.

Différents types d'animaux sont utilisés pour étudier le sepsis. Les grands animaux (chiens,

moutons et porcs) sont ou ont été utilisés pour étudier les mécanismes fondamentaux du sepsis et pour tester des agents thérapeutiques. Ils ont l'avantage d'avoir des paramètres physiologiques proches de ceux des humains. De plus, du fait de leur grande taille, ils permettent de prélever en série des échantillons de sang ou d'autres fluides. Des évaluations détaillées des fonctions hémodynamiques, cardiodynamiques et d'autres organes peuvent aussi être effectuées en série. Il est donc possible d'obtenir de grandes quantités de données en fonction du temps et pour une multitude de paramètres (Zanotti-Cavazzoni et al. 2009). Cependant, les animaleries en capacité de recevoir ces types d'animaux sont peu nombreuses.

De ce fait, les petits modèles animaux de sepsis, en particulier les rongeurs de type rats et souris, sont largement utilisés dans la recherche. Bien qu'ils présentent des différences distinctes par rapport aux humains en ce qui concerne les réactions inflammatoires et immunitaires, ils conservent de nombreuses caractéristiques biologiques communes aux mammifères. En outre, leur petite taille est un atout concernant le coût des traitements : à concentration identique, le rongeur recevra une quantité de molécule plus faible. Ils présentent aussi l'avantage d'avoir un faible coût d'achat, ainsi qu'une certaine facilité d'élevage et d'hébergement. Il est donc possible de travailler avec de nombreux animaux sur une période réduite, pour limiter les biais et donc obtenir des données en grands nombres et plus reproductibles (Fink et al. 1990). De plus, un autre avantage de l'utilisation de rongeurs comme la souris est l'existence d'une grande variété de souches knock-out (KO). Ces souris génétiquement modifiées permettent, par exemple, d'étudier le rôle d'une protéine sur un processus biologique précis grâce à l'inactivation spécifique d'un ou plusieurs gènes (Ju et al. 2022).

Il existe de nombreux modèles précliniques utilisés pour étudier le sepsis et évaluer les traitements potentiels. Il est possible d'en distinguer 3 grands types chez le rongeur (Buras et al. 2005) :

- les modèles d'infection bactérienne, par exemple par injection d'une bactérie comme *Escherichia Coli* par voie intraveineuse ou intrapéritonéale ;
- les modèles de toxémie, par exemple par injection de lipopolysaccharides (LPS) ;
- les modèles de perturbation de la barrière de la muqueuse intestinale de l'hôte tels que le modèle de ligature et ponction cæcale (CLP), ou celui de péritonite sur stent du colon ascendant

(CASP).

### **1.3.2. Modèle de sepsis par infection bactérienne**

Les modèles d'infection bactérienne sont peu utilisés, parce qu'ils ne réussissent pas à reproduire de nombreuses caractéristiques du sepsis humain, comme certaines dysfonctions d'organes par exemple. Cependant, ils peuvent fournir des informations sur les mécanismes de réponse de l'hôte aux agents pathogènes. En effet, malgré des doses élevées fréquemment administrées, les bactéries injectées ne parviennent à se répliquer et à coloniser l'hôte, souvent en raison d'une lyse rapide par le complément. Cela conduit donc à un modèle de choc endotoxinique plutôt qu'à un véritable modèle d'infection (Buras et al. 2005). De plus, la manipulation de bactéries vivantes implique des règles de confinement particulier pour les animaux infectés, ce qui n'est pas envisageable dans tous les laboratoires de recherche et animaleries agréées.

### **1.3.3. Le modèle endotoxinique par injection de LPS**

#### **A. Description du modèle**

Ce modèle consiste à injecter à l'animal des lipopolysaccharides (LPS), un composant de la paroi des bactéries à Gram négatif, généralement par voie intra-péritonéale. Il présente plusieurs avantages : son induction est simple, et il est possible de contrôler étroitement ses paramètres tels que le moment d'induction, les doses et la sévérité du modèle, ce qui lui confère une assez bonne reproductibilité. Il s'agit du modèle animal qui a été le plus utilisé pour les études de sepsis depuis près de cent ans (Deitch 2005). Pour ces raisons, il s'agit du principal modèle utilisé au cours de ma thèse : de nombreuses études ayant été menées grâce à celui-ci, il existe, dans la littérature, un volume important de données permettant de comparer nos résultats expérimentaux.

L'utilisation du LPS induit des changements physiologiques similaires à ceux du sepsis, avec une activation des cellules immunitaires innées et la production des principaux médiateurs pro-inflammatoires comme TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  (Beutler et al. 2001; Luo et al. 2015). De plus, la réponse

murine au LPS présente un spectre dose-dépendant : des doses faibles produisent un état hyperdynamique tandis que des doses plus élevées provoquent une hypotension caractéristique du choc septique (Fink et al. 1990).

Cependant, ce modèle a plusieurs inconvénients : le LPS induit une réponse immunitaire trop importante et rapide par rapport à ce qui est observé chez l'Homme. Le LPS est l'unique PAMP (motifs moléculaires associés aux pathogènes) alors qu'au cours d'une infection, même mono-bactérienne, plusieurs PAMPs vont être reconnus par le système immunitaire. Cela ne permet pas de reproduire la physiologie complexe retrouvée lors de la progression du sepsis chez l'Homme. Ce modèle n'induit pas non plus tous les changements hémodynamiques observés dans le sepsis humain et dans certains modèles d'infection (Fink et al. 1990).

Le LPS va induire une réponse immunitaire alors qu'il n'y a pas d'agents pathogènes à éliminer. Cette réponse immunitaire n'a donc que des effets délétères sur l'organisme alors que lors d'un sepsis chez l'Homme, la réponse immunitaire a un effet négatif sur l'organisme, mais bénéfique pour combattre l'infection (Buras et al. 2005).

## **B. Mode d'action du LPS**

Les PAMPs sont exprimés par les bactéries, les virus et les champignons. Ils sont capables de stimuler les TLR (récepteurs de type Toll), exprimés par les cellules du système immunitaire inné. Chaque TLR a une spécificité pour reconnaître des types distincts de PAMPs : parmi les TLR, le TLR4 est celui qui interagit avec le LPS (Akira et al. 2006).

L'action du LPS se fait par une série d'interactions avec plusieurs protéines (figure 12), dont la protéine de liaison au LPS (LBP), la CD14 et la MD-2 (Gioannini et al. 2007). La LBP est une protéine soluble qui se lie directement au LPS et qui facilite son association avec la CD14 (Peter S. Tobias et al. 1986). La CD14 module la reconnaissance du LPS et facilite son transfert vers le complexe récepteur TLR4/MD-2 (Wright et al. 1990). Quant à la MD-2, il s'agit d'une protéine soluble qui s'associe de manière non covalente avec le TLR4, mais qui peut aussi former directement un complexe avec le LPS en l'absence du TLR4 (Shimazu et al. 1999).

Lors de la reconnaissance du LPS, le TLR4 subit une oligomérisation et recrute ses

adaptateurs par des interactions avec les domaines TIR (récepteur Toll-interleukine-1), qui médient les interactions protéine-protéine entre les TLR et les protéines adaptatrices de transduction du signal. Ce mécanisme fait intervenir 4 protéines adaptatrices contenant le domaine TIR : MyD88 (gène de réponse primaire de différenciation myéloïde 88), TIRAP (protéine également appelée Mal pour MyD88-adaptor-like), TRIF (protéine induisant l'IFN- $\beta$ ), et TRAM (molécule adaptatrice liée à TRIF) (O'Neill et al. 2007).

La signalisation du TLR4 est divisée en deux voies : dépendante ou indépendante du MyD88. La voie dépendante du MyD88 est responsable de l'expression des cytokines pro-inflammatoires (Kawai et al. 1999), tandis que la voie indépendante de cette protéine médie l'induction d'interférons de type I et de gènes inductibles par l'interféron (Kawai et al. 2001). Cette signalisation aboutit également à la translocation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, qui contrôle l'expression des cytokines pro-inflammatoires et joue un rôle essentiel dans la régulation de la survie, de l'activation et de la différenciation des cellules immunitaires innées et des lymphocytes T inflammatoires (T. Liu et al. 2017).

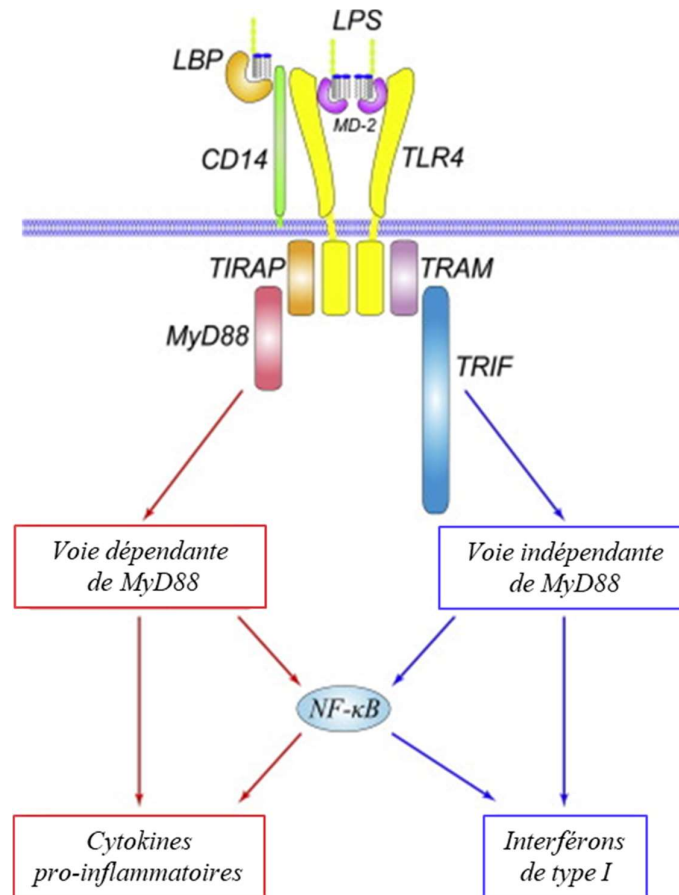


Figure 12 : Voie de signalisation du TLR4.

La LBP se lie au LPS et facilite son association avec la CD14. La CD14 module la reconnaissance du LPS et facilite son transfert vers le complexe récepteur TLR4/MD-2. Lors de la reconnaissance du LPS, le TLR4 subit une oligomérisation et recrute ses adaptateurs : MyD88, TIRAP, TRIF et TRAM. La signalisation du TLR4 est divisée en deux voies : dépendante ou indépendante de MyD88 (Lu et al. 2008).

### 1.3.4. Induction du sepsis par perturbation de la barrière de l'hôte

Les deux principaux modèles de perturbation de la barrière de l'hôte sont le modèle de péritonite sur stent du colon ascendant (CASP), et celui de ligature et ponction caecale (CLP).

#### A. Le modèle de péritonite sur stent du colon ascendant

Le modèle CASP est un modèle de péritonite septique aiguë d'origine polybactérienne. La procédure pour l'induire comprend une laparotomie, puis le placement et la fixation d'un stent de diamètre défini dans le côlon ascendant de l'animal (figure 13). Cela entraîne une fuite persistante de contenu fécal dans la cavité péritonéale et de ce fait, une infection par des bactéries intestinales (Zantl et al. 1998). Ce modèle présente plusieurs avantages : la sévérité de la maladie peut être modulée de manière reproductible en utilisant des stents de différents diamètres (Maier et al. 2004), et le stent peut être retiré après une période de temps définie dans le but d'éliminer la source d'infection, ce modèle imitant ainsi une intervention chirurgicale chez un patient atteint de péritonite (Zantl et al. 1998).

La mortalité dans le modèle du CASP, qui survient souvent 1 à 2 jours après la pose du stent, est associée à une défaillance de plusieurs organes, notamment les poumons, le foie et les reins, comme lors du sepsis chez l'Homme (Feterowski et al. 2004).

#### Péritonite sur stent du colon ascendant (CASP)

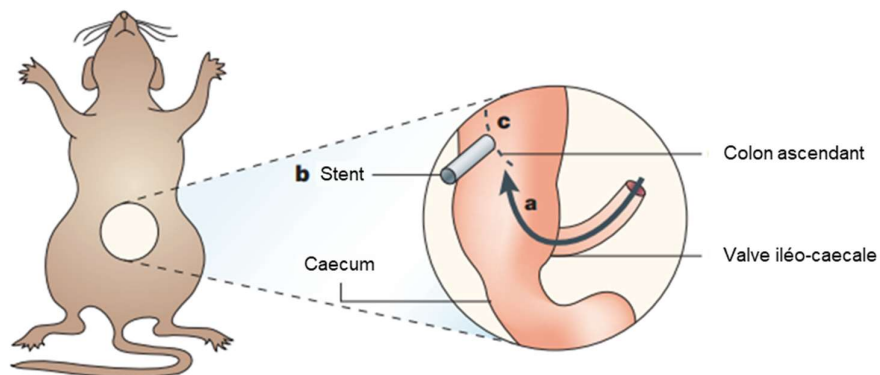


Figure 13 : Le modèle CASP.

Ce modèle consiste à placer et fixer un stent de diamètre défini dans le côlon ascendant de l'animal (Buras, Holzmann, et Sitkovsky 2005).

Le modèle de CASP est un modèle relativement nouveau et son utilisation est encore peu répandue, notamment en raison d'une procédure chirurgicale complexe. De ce fait, il y a peu de données dans la littérature, donc la totalité de ses avantages ainsi que ses éventuels inconvénients ne sont probablement pas encore tous identifiés. Son utilisation élargie pourrait permettre de mieux apprécier ses limites et de déterminer la meilleure façon de l'utiliser dans l'étude des mécanismes du sepsis afin de le comparer aux modèles plus répandus.

### **B. Le modèle de ligature et ponction cœcale**

Le modèle de CLP est induit par une laparotomie suivie d'une ligature du cæcum en aval de la valve iléo-cæcale, puis de la ponction du cæcum ligaturé (figure 14). Cela conduit à une perforation intestinale avec fuite de contenu fécal dans le péritoine, à l'origine d'une infection avec une source inflammatoire de flore mixte et de tissus nécrotiques dus à la ligature. Ce modèle reproduit le cas clinique d'un abcès intrapéritonéal et d'une péritonite polymicrobienne (Wang et al. 2022).

La gravité du modèle de CLP peut être contrôlée et ajustée en augmentant le diamètre de l'aiguille et le nombre de perforation. Cette gravité est mesurable à l'aide d'une courbe de survie, la mortalité pouvant être rapide, dès quelques heures, ou s'étaler sur plusieurs jours (Remick et al. 2005).

Le modèle de CLP s'est imposé comme le « gold standard » des modèles de sepsis en raison de son assez bonne reproductibilité et de sa similitude avec la progression du sepsis humain. En effet, les réponses sont similaires pour l'activation des réponses immunitaires pro-inflammatoires et anti-inflammatoires, pour les phases hyperdynamique précoce et hypodynamique tardive, ainsi que pour le dysfonctionnement de plusieurs organes, l'hypothermie, les altérations métaboliques, la production de DAMPs (modèles moléculaires associés aux dommages), et la cinétique de la réponse des cytokines. Cependant, ce modèle est complexe à induire du fait de la chirurgie à réaliser, et il est responsable d'une hypovolémie qui nécessite un remplissage vasculaire conséquent. De plus, il implique une plus grande variabilité comparée à d'autres modèles, tels que celui par injection de LPS : cette variabilité est en lien avec la dextérité et la reproductibilité de l'expérimentateur, mais également avec la composition de la flore microbienne du cæcum (Tao



et al. 2004; Wichterman et al. 1980; Xiao et al. 2006).

### Ponction et ligature caecale (CLP)

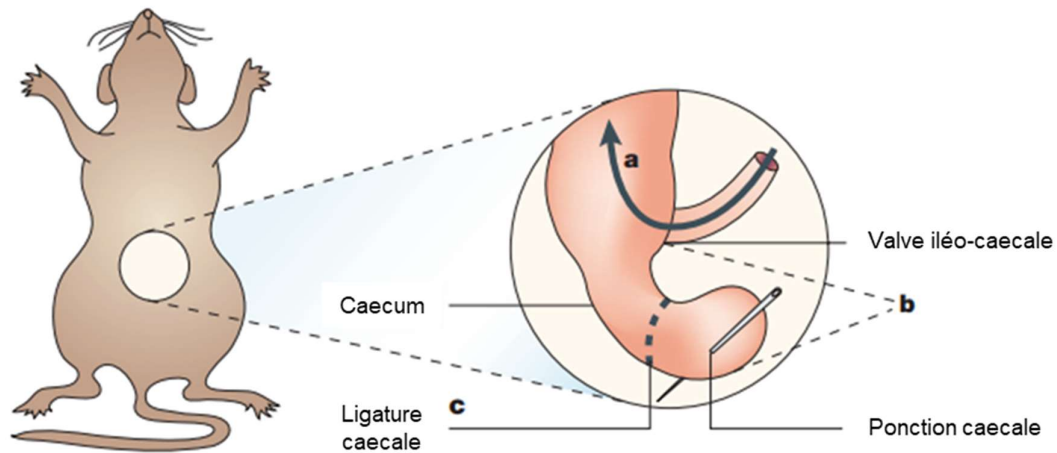


Figure 14 : Le modèle de CLP

Ce modèle consiste en une ligature du caecum en aval de la valve iléo-caecale, associée à la ponction du caecum ligaturé (Buras et al. 2005).

Le modèle de CLP présente un autre avantage : contrairement au modèle LPS (tableau 2) qui implique la stimulation d'un seul type de récepteur (TLR4), l'infection par des bactéries vivantes (à la fois de type Gram positif et Gram négatif) induite par CLP va stimuler plusieurs types de PRR (récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires) qui initient ensuite des cascades de signalisations cellulaires aboutissant à la synthèse de cytokines, chimiokines, molécules inflammatoires et antimicrobiennes. Ces PRR sont impliqués dans la détection des agents pathogènes (figure 15). Par exemple, les PRR de type TLR reconnaissent la flagelline bactérienne avec le TLR5, l'ADN CpG non méthylé bactérien ou viral avec le TLR9, l'acide lipotéchoïque avec le TLR2, ou encore les lipopolysaccharides bactériens avec le TLR4 (Li et al. 2021). De plus, des études ont montré l'importance de la synergie obtenue lors de la stimulation de plusieurs TLR dans l'intensité, la qualité et la persistance de la réponse immunitaire (Mäkelä et al. 2011).

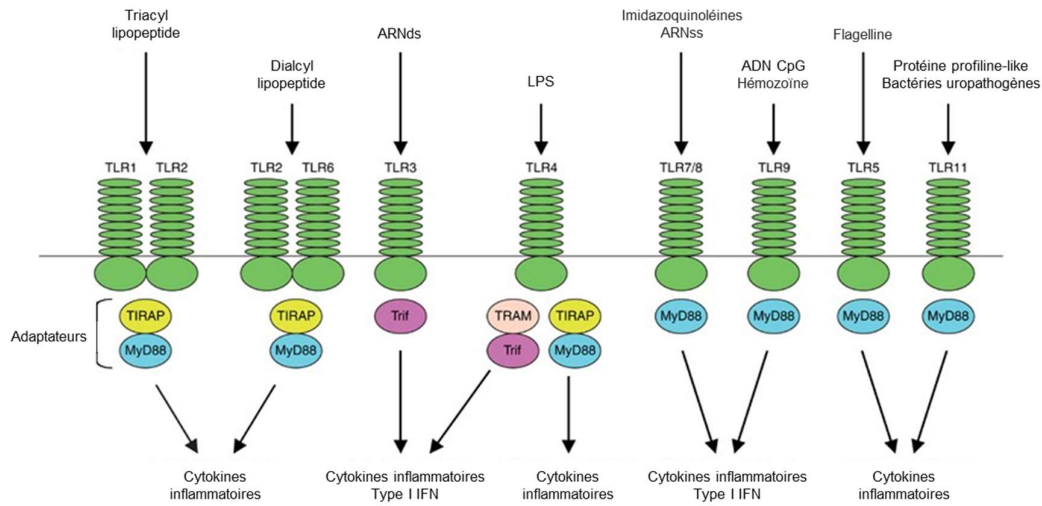


Figure 15 : Réponses immunitaires médiées par les TLR.

Le TLR2, de concert avec le TLR1 ou le TLR6, permet respectivement la distinction entre les modèles moléculaires du triacyl (bactériens) et du dialcyl lipopeptide. Le TLR3 reconnaît l'ARNdb (viral). Le TLR4 reconnaît le LPS (bactériens). Le TLR7/8 assure la reconnaissance des imidazoquinoléines et de l'ARNsb (viral). Le TLR9 reconnaît l'ADN CpG (bactérien ou viral). Le TLR5 reconnaît la flagelline bactérienne et le TLR11 de souris reconnaît les composants des bactéries uropathogènes. Le TLR1/2 et le TLR2/6 utilisent MyD88 et TIRAP/MAL comme adaptateurs. Le TLR3 utilise Trif. Le TLR4 utilise quatre adaptateurs, dont MyD88, TIRAP/MAL, Trif et TRAM. Le TLR7/8, le TLR9, le TLR5 et le TLR11 utilisent uniquement MyD88. La voie dépendante de MyD88 contrôle les réponses inflammatoires, tandis que Trif médie principalement les réponses d'IFN de type I. De plus, le TLR7/8 et le TLR9 induisent l'IFN de type I de manière dépendante de MyD88 (Kawai et al. 2006).

Modèle	Type	Facteurs de variabilité	Avantages	Inconvénients
Endotoxinique	Injection	- Type et dose de LPS administré - Voie d'administration	- Simple et reproductible - Induit une réponse aiguë - Modèle très standardisé et contrôlé	- Implique seulement la stimulation des TLR4 - Ne reproduit pas le profil inflammatoire retrouvé chez l'homme
Injection de bactéries	Injection	- Charge bactérienne - Voie et temps d'administration - Souche de bactéries	- La présence de bactéries permet d'étudier les mécanismes de la réponse de l'hôte aux pathogènes	- Mise en culture et quantification de bactéries nécessaire - Une seule bactérie ne reproduit pas la réalité du sepsis humain - La lyse d'une forte dose de bactéries provoque un choc endotoxique plutôt qu'un choc septique
CASP	Chirurgie	- Diamètre du stent - Quantité de selles transférées dans le péritoine	- Polymicrobien - Présence d'un foyer d'infection	- Chirurgie relativement complexe - Phases hémodynamiques peu caractérisées
CLP	Chirurgie	- Taille de l'aiguille et nombre de perforations - Volume de caecum ligaturé	- Procédure relativement simple - Polymicrobien - Présence d'un foyer d'infection - Modèle le plus proche du sepsis humain	- Variabilité de la sévérité due aux différences de procédures expérimentales - Nature des fèces pouvant varier d'un individu à l'autre

Tableau 2 : Comparaison des principaux modèles murins de sepsis.

Avantages, inconvénients et facteurs de variabilité des principaux modèles de sepsis : par injection d'endotoxines (modèle LPS) ou de bactéries, ou par chirurgie pour les modèles CLP et CASP.

## 2. LA RÉPONSE IMMUNITAIRE ET INFLAMMATOIRE AU COURS DU SEPSIS

---

### 2.1. Définition

La réponse immunitaire au cours du sepsis est déterminée par de nombreux facteurs tels que la virulence du pathogène ou les comorbidités (maladies cardiaques, diabète...) qui peuvent entraîner une altération de la fonction des cellules immunitaires et donc une clairance bactérienne réduite (Schuetz et al. 2011). Bien que les processus pro- et anti-inflammatoires soient activés simultanément lors de l'apparition du sepsis, c'est bien souvent une réponse hyper-inflammatoire qui domine durant la phase précoce. Qualifiée de « tempête de cytokines », cette réponse exagérée est caractérisée par une production massive de cytokines (Boomer et al. 2014) qui peut entraîner des problèmes hémodynamiques et des anomalies de la coagulation. Cela va engendrer une hypoperfusion des organes et participer à l'installation de leur défaillance, puis à la mort (Hotchkiss et al. 2016). Les patients qui survivent à cette première phase peuvent subir soit une réponse anti-inflammatoire contrôlée leur permettant de retrouver l'homéostasie immunitaire, soit une réponse anti-inflammatoire incontrôlée qui les fait entrer dans une phase hypo-inflammatoire (figure 16) (Hotchkiss et al. 2013). Dans cette phase, les patients ne parviennent pas à développer une réponse appropriée, ce qui conduit à une réactivation possible de l'infection et/ou à des infections secondaires. Cela entraîne un cercle vicieux de phases hyper-inflammatoires et hypo-inflammatoires sur le long terme (Hotchkiss et al. 2016).

Au cours du sepsis, les phases d'inflammation et d'immunosuppression peuvent se chevaucher (Adib-Conquy et al. 2009; Gomez et al. 2014), ce qui complique davantage la compréhension de la réponse immunitaire au cours de cette pathologie.

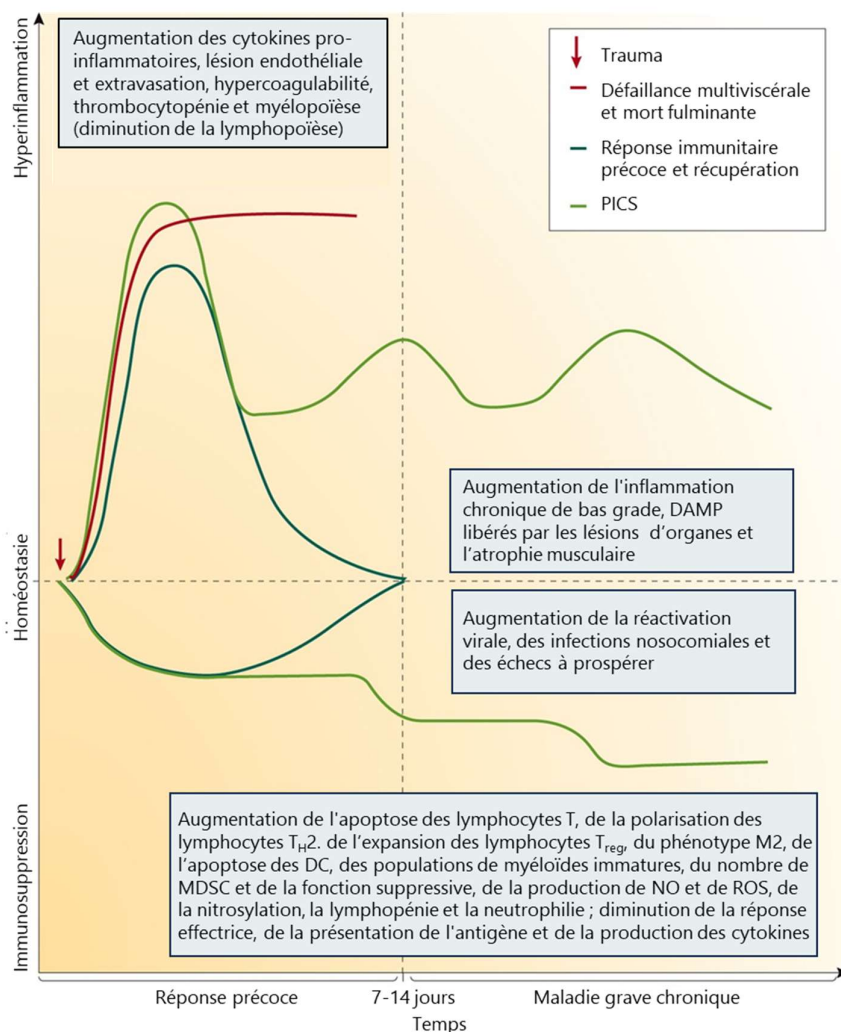


Figure 16 : Les différents profils de réponses inflammatoires rencontrés au cours du sepsis. Certains patients rétablissent une réponse inflammatoire physiologique (courbes bleues), cependant d'autres présentent une réponse précoce disproportionnée (courbe rouge) entraînant des dysfonctions d'organes pouvant aller jusqu'à la mort. D'autres encore peuvent survivre à la phase précoce mais rester dans un état hyper-inflammatoire persistant, ou faire face à une immunosuppression (courbes vertes) (Hotchkiss et al. 2016).

## 2.2. Les cytokines au cours du sepsis

### 2.2.1. Les principales cytokines pro-inflammatoires au cours du sepsis

Dans le sepsis, la tempête de cytokines pro-inflammatoires joue un rôle important chez les patients présentant un profil de réponse hyper-inflammatoire persistante. Parmi ces cytokines, il a été démontré qu'un niveau accru d'IL-6 plasmatique présente la plus forte corrélation avec le

taux de mortalité, associant ainsi cette interleukine au risque de décès le plus élevé chez les patients atteints (Kellum et al. 2007; Kumar et al. 2009; Mera et al. 2011). Le TNF- $\alpha$  est également l'une des cytokines pro-inflammatoires les plus étudiées dans cette pathologie. Son taux augmente de manière significative chez les patients et dans les modèles animaux correspondants (Mera et al. 2011), et ce dès les premières heures du sepsis (figure 17). Son rôle délétère au cours de cette pathologie a été confirmé par une étude qui a montré que l'administration d'anticorps anti-TNF- $\alpha$  améliore la survie dans un modèle murin (Beutler et al. 2001). D'autres cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$ , l'IL-12 (Mera et al. 2011), l'IFN- $\gamma$  et l'IL-8 voient également leurs taux augmenter de manière persistante chez les patients, avec une valeur prédictive de décès probable pour la dernière citée (Mera et al. 2011). Quant à l'IL-18, l'évolution de son taux permettrait de discriminer les sepsis induits par des bactéries à Gram positif ou à Gram négatif (Tschoeke et al. 2006).

Pour d'autres cytokines pro-inflammatoires, leur implication dans le sepsis est moins claire : c'est le cas du GM-CSF. Une analyse multiplex chez 60 patients atteints de sepsis a montré qu'il n'était pas détectable (Bozza et al. 2007) alors qu'au contraire, une autre étude a montré que son taux augmentait de manière persistante chez les patients décédés (Mera et al. 2011).

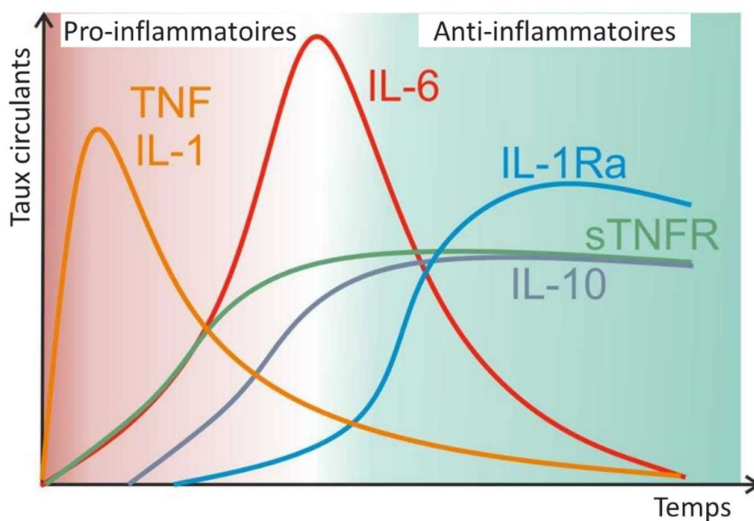


Figure 17 : Cinétique des cytokines au cours du sepsis.

Le facteur de nécrose tumorale (TNF) et l'interleukine 1 (IL-1) sont les premières cytokines à être libérées au cours du sepsis : elles favorisent la sécrétion d'IL-6. Ensemble, ces cytokines orchestrent la phase pro-inflammatoire. Après un certain temps, des mécanismes de compensation apparaissent pour atténuer la réponse pro-inflammatoire, dont l'IL-10, l'antagoniste des récepteurs de l'IL-1 (IL-1Ra) et le récepteur soluble du TNF (sTNFR) (Steeland et al. 2018).

### **2.2.2. Les principales cytokines anti-inflammatoires au cours du sepsis**

Étant impliquées dans la prévention des réactions inflammatoires persistantes ou excessives, ces cytokines jouent donc un rôle dans le développement du sepsis.

L'IL-10 est la cytokine clé des réponses anti-inflammatoires (Wu et al. 2009). La mesure des cytokines sériques chez les patients atteints de sepsis a indiqué que le niveau d'IL-10 était significativement augmenté (Rau et al. 2010; Surbatovic et al. 2007) : sa surproduction persistante serait le principal facteur de risque de sévérité du sepsis d'issue fatale et un rapport élevé IL-10/TNF- $\alpha$  serait corrélé au risque de décès (Gogos et al. 2000). D'autres cytokines sont également impliquées, dont l'IL-1Ra : sécrétée lors de la phase aiguë de l'inflammation, elle joue un rôle de modulatrice de la réponse inflammatoire. Dans un modèle de rats atteints de sepsis induit par CLP, le traitement à l'IL-1Ra limite l'hypothermie et l'hypovolémie, et permet d'améliorer la survie (Alexander et al. 1992).

En plus des cytokines, la réponse inflammatoire au cours du sepsis implique un réseau hautement coordonné de nombreux types cellulaires qui peuvent être résidents ou recrutés.

### **2.3. Les cellules myéloïdes de la réponse innée impliquées dans le sepsis**

Mon laboratoire étant lié à un service de réanimation, je me suis plus particulièrement intéressé à la réponse innée du sepsis. Les macrophages résidents ainsi que deux types cellulaires dérivés de la lignée myélocytaire sont particulièrement impliqués dans le développement de la maladie : les neutrophiles qui constituent la première ligne de défense à une infection, et les monocytes qui vont se différencier en macrophages ou en cellules dendritiques.

#### **2.3.1. Les neutrophiles au cours du sepsis**

Les neutrophiles jouent un rôle essentiel dans la défense de l'hôte au cours du sepsis. Cependant, si leurs fonctions sont dérégulées, ils peuvent contribuer au dysfonctionnement des organes et à la mortalité dans cette pathologie (Murao et al. 2022).

### A. Altération de la demi-vie des neutrophiles

En conditions physiologiques, les neutrophiles ont une durée de vie courte (7 à 12 heures), mais elle augmente en cas d'infection et en particulier lors du sepsis, ce qui entraîne une accumulation souvent délétère de ces cellules dans les organes vitaux (Kovach et al. 2012).

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer cet accroissement de la durée de vie, notamment la balance de l'équilibre des protéines pro- et anti-apoptotiques. L'expression des protéines anti-apoptotiques Mcl-1 (protéine de différenciation cellulaire de la leucémie myéloïde induite) (Luan et al. 2015) et Bcl-xL augmente. À l'inverse, le taux de la protéine pro-apoptotique Bim diminue, via l'activation des protéines kinases ERK-1, ERK-2 et PI-3K (figure 18), elles-mêmes activées par les médiateurs pro-inflammatoires comme le LPS ou le C5a (Guo et al. 2006; Perianayagam et al. 2004).

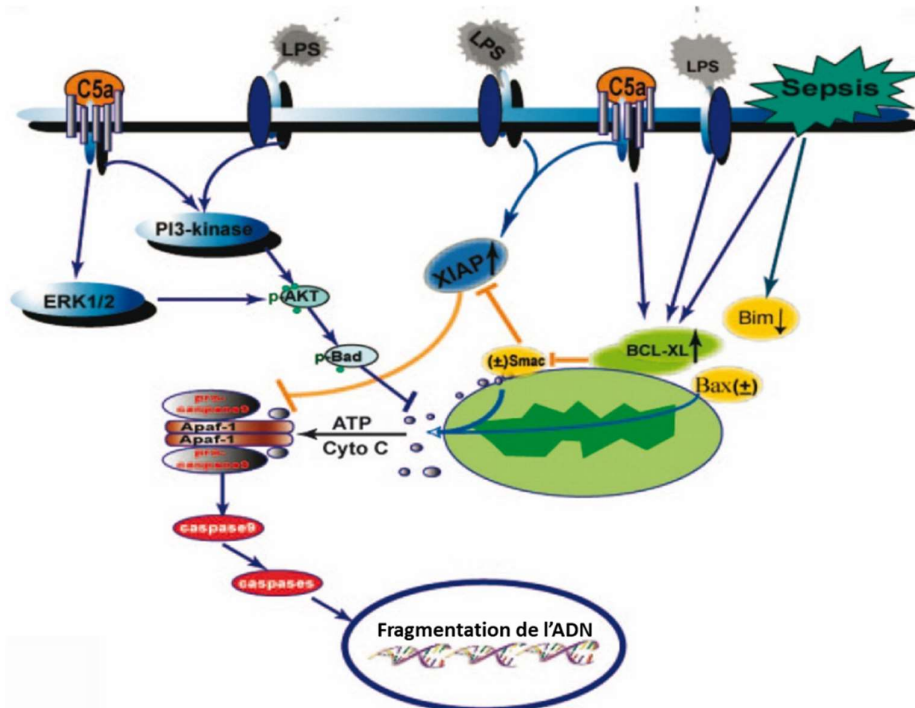


Figure 18 : Voies de l'apoptose des neutrophiles au cours du sepsis.

Au cours du sepsis, le C5a active les voies ERK-1 et 2 et PI-3K, entraînant la phosphorylation de la protéine AKT et la phosphorylation de Bad. Bad phosphorylée inhibe la libération du cytochrome C par les mitochondries pour empêcher la formation de l'apoptosome, inhibant ainsi l'apoptose. Il y a également une production de XIAP, qui peut inhiber la formation de l'apoptosome ou l'augmentation de l'expression de Bcl-xL et la réduction de l'expression de Bim (Guo et al. 2006).



En outre, d'autres voies de l'apoptose, comme la voie extrinsèque, *via* la liaison du TNF- $\alpha$  ou du ligand de Fas (FasL) à des récepteurs spécifiques sur les neutrophiles, contribueraient également à retarder l'apoptose de ces cellules dans le cadre du sepsis (Iba et al. 2013; Schulze-Osthoff et al. 1998).

### **B. Altération des fonctions migratoires**

Au cours du sepsis, les phases de migration des neutrophiles de la moelle osseuse vers les tissus sont bien souvent altérées (Roger et al. 2010).

En effet, les composants bactériens et les cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et l'IL-17 pourraient réguler à la hausse le niveau de G-CSF circulant qui active la granulopoïèse, conduisant à une augmentation de la génération des neutrophiles dans la moelle osseuse. De plus, l'expression du CXCL12 est diminuée et celle de CXCL1 est augmentée, ce qui favorise la libération des neutrophiles matures mais aussi immatures dans le sang (Delano, Kelly-Scumpia, et al. 2011; Eash et al. 2010).

Les produits bactériens et les cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  favorisent la perte de L-sélectine (Ahmed et al. 1999), ce qui provoque une altération de l'étape de roulement des neutrophiles qui se retrouvent donc bloqués dans le compartiment vasculaire. Cette retenue a lieu malgré une augmentation de l'expression des  $\beta$ -intégrines à la surface des neutrophiles, les  $\beta$ -intégrines interagissant avec les molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 sur l'endothélium vasculaire, ce qui favorise une adhésion de haute affinité avec celui-ci (Lerman et al. 2015) et donc augmente l'arrêt des neutrophiles mais pas leur migration. Cette séquestration dans le compartiment vasculaire peut aboutir à une occlusion vasculaire et augmenter l'ischémie tissulaire et le dysfonctionnement des organes, en particulier dans les poumons et le foie qui sont riches en vaisseaux sanguins.

La phase de transmigration des neutrophiles peut aussi être altérée. Au cours du sepsis, on observe une diminution de l'expression des récepteurs de chimiokines CXCR2 exprimés sur les neutrophiles, en particulier sur les immatures, ce qui diminue leur réponse chimiotaxique et de ce fait, leur infiltration (Chishti et al. 2004; Rios-Santos et al. 2007).

### C. Altération des fonctions antimicrobiennes des neutrophiles

Au cours du sepsis, l'action oxydante et la phagocytose des neutrophiles sont affectées (Delano, Thayer, et al. 2011; Mishra et al. 2012), notamment *via* une augmentation de la production et de la libération incontrôlée de ROS dans le milieu extracellulaire (Santos et al. 2012). Cela peut contribuer à la perte de l'intégrité de la barrière endothéliale et aux fuites vasculaires, et entraîner des lésions d'organes, notamment au niveau pulmonaire (Fox et al. 2013; S. Zhao et al. 2020). Une dégranulation excessive et la libération de protéases ont aussi été observées, ce qui participe également aux lésions tissulaires (Martin-Fernandez et al. 2020). En ce qui concerne la phagocytose, les études sur le sepsis sont contradictoires : certaines concluent à un excès de cette activité (Martins et al. 2003) alors que d'autres montrent plutôt sa diminution (Taneja et al. 2008).

Il a aussi été montré que la voie mTOR était impliquée dans la modulation des fonctions des neutrophiles au cours du sepsis. L'expression de rictor, un composant du complexe mTOR2, est régulée à la baisse dans les neutrophiles isolés de patients septiques par rapport aux individus sains (Breda et al. 2021). Cette diminution peut entraîner une altération de la fusion des granules des neutrophiles et donc limiter leur action antimicrobienne (Breda et al. 2021).

### D. Les NETs au cours du sepsis

Les NEToses suicidaire et vitale sont associées à la pathogenèse du sepsis (Huang et al. 2022). En effet, la production excessive de NETs est couramment retrouvée au cours de cette pathologie : ils peuvent l'aggraver en activant le mécanisme de coagulation (Jiménez-Alcázar et al. 2017). Les histones associées aux NETs provoquent la formation de thrombus en activant les plaquettes, ce qui favorise l'activité pro-thrombotique et pro-coagulante conduisant à l'aggravation des lésions et à la mortalité en cas de sepsis (Delabranche et al. 2017; S. Yang et al. 2017). Une étude a confirmé l'implication des NETs dans la gravité du sepsis, suggérant ainsi leur contribution dans le dysfonctionnement de plusieurs organes chez les patients atteints (Kumar et al. 2019). De plus, les enzymes libérées par la NETose ont également une conséquence néfaste sur les tissus environnants : la neutrophile élastase (NE) augmente la perméabilité des cellules épithéliales pulmonaires en modulant le cytosquelette d'actine (Peterson et al. 1995), et son inhibition améliore les lésions pulmonaires aiguës associées au sepsis (Ishii et al. 2010; Tsai et al. 2015). Il a également été montré que des NETs sont formés dans le liquide de lavage broncho-

alvéolaire de patients atteints (Mikacenic et al. 2018).

De ce fait, la modulation de la formation des NETs au cours du sepsis fait l'objet de recherches afin de développer de nouvelles thérapies ciblées contre cette pathologie. Deux axes principaux sont envisagés : agir sur le produit final (ADN extracellulaire et histones) ou sur sa production en interagissant avec les enzymes à l'origine de sa formation (PAD4, NOX, élastase).

Par exemple, l'administration de faibles niveaux d'ascorbate, aussi connu sous le nom de vitamine C, réduit de manière significative le taux de NETose spontanée et l'expression de l'ARNm PAD4 chez les patients. De plus, ce traitement semble diminuer la détectabilité de la NETose non seulement chez les patients atteints de sepsis mais aussi chez les témoins sains (Sae-Khow et al. 2020).

Le ciblage des histones ou de l'ADN extracellulaire composant les NETs pourrait également être une stratégie intéressante pour prévenir la thrombose et les lésions tissulaires liées à l'excès de NETs au cours du sepsis. En effet, les histones sont impliquées dans les lésions endothéliales, les défaillances d'organes et le décès au cours du sepsis (Xu et al. 2009). Une étude a montré que l'administration d'anticorps dirigés contre les histones réduit la mortalité dans des modèles murins de sepsis (Xu et al. 2011). En ce qui concerne l'ADN extracellulaire, l'administration de Dnase I prévient la formation de thrombose veineuse profonde dans un modèle murin (Brill et al. 2012). D'autres cibles sont également étudiées comme l'inhibition de la PAD4 ou de la NOX, deux enzymes essentielles à la formation des NETs (Li et al. 2010; Parker et al. 2012; Remijsen et al. 2011). Un inhibiteur de la NOX a amélioré l'état inflammatoire pulmonaire induit par le virus de la grippe A impliquant des NETs (Vlahos et al. 2011). Quant à l'administration de Cl-amidine (un inhibiteur de l'enzyme PAD4) ou l'utilisation de souris KO pour la PAD4, elles ont permis de limiter la production de NETs, d'améliorer la survie et de réduire la gravité de la maladie (Biron et al. 2017; Martinod et al. 2016). Enfin, l'utilisation du sivelestat, un inhibiteur de l'élastase, a permis de diminuer les lésions pulmonaires, de réduire le taux de certaines cytokines pro-inflammatoires et d'améliorer la survie dans un modèle murin de sepsis par injection de LPS (Okeke et al. 2020).

En ce qui concerne les patients atteints de sepsis, certains traitements ciblant ces molécules sont prometteurs. En effet, une étude a montré que le sivelestat avait des effets bénéfiques similaires à ceux obtenus sur la souris (Hayakawa et al. 2010). Enfin, concernant le ciblage de l'ADN extracellulaire, un essai clinique débuté en octobre 2022 appelé IDEALSepsis (Intravenous Dnase

I for the Treatment of Sepsis) teste la pertinence de l'administration de Dnase I chez les malades afin de dégrader les NETs (McMaster University 2022).

### **2.3.2. Les monocytes**

Malgré leur rôle dans la lutte contre les pathogènes, les monocytes contribuent également à la physiopathologie des maladies inflammatoires comme le sepsis (Serbina et al. 2008).

Une diminution importante de la quantité de monocytes présents dans le sang a été observée chez les patients atteints de sepsis. Celle-ci peut résulter de la migration des monocytes du sang vers les tissus, où ils se transforment en macrophages ou en cellules dendritiques. Cette baisse peut également refléter une augmentation des monocytes présents dans le pool marginal ou en transit le long des parois des vaisseaux sanguins (Tak et al. 2017). Cette accumulation peut participer aux thromboses associées au sepsis (Bajaj et al. 2007).

Quant à leur activité inflammatoire, elle se révèle contradictoire. Certaines publications ont observé une augmentation des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) produites par les monocytes au cours du sepsis. Le facteur NF-kB, un régulateur transcriptionnel central de la réponse inflammatoire, et la cytokine anti-inflammatoire IL-10 sont également surexprimées (Lekkou et al. 2004; Lorente-Sorolla et al. 2019). À l'inverse, d'autres études ont montré une production de cytokines pro-inflammatoires réduite chez des monocytes provenant de patients atteints comparés à des volontaires sains. Cette étude a également montré une capacité à faire de la phagocytose préservée et une génération accrue de ROS et de NO (Santos et al. 2012). Les raisons de ces divergences sont sans doute multiples et font encore aujourd'hui l'objet de recherche.

### **2.3.3. Les cellules dendritiques**

Comme expliqué précédemment, les cellules dendritiques peuvent provenir de la différenciation des monocytes. Les anomalies des cellules dendritiques contribuent à l'inflammation persistante, à l'immunosuppression, à la susceptibilité aux infections et à la mort chez les patients atteints de sepsis (Hotchkiss et al. 2016). En effet, les malades avec un faible

nombre de cellules dendritiques sont plus sensibles aux infections nosocomiales (Grimaldi et al. 2011). De plus, une analyse post-mortem a montré que les patients adultes atteints de sepsis avaient moins de cellules dendritiques dans le sang et la rate que les patients sains, et que cette diminution était corrélée avec la gravité de la maladie (Guisset et al. 2007; Tinsley et al. 2003). Une autre étude a montré qu'une déplétion de ce type cellulaire dans un modèle murin augmentait la mortalité en lien avec le sepsis (Scumpia et al. 2005).

#### **2.3.4. Les macrophages**

Dans la première phase du sepsis, les macrophages, qu'ils soient résidents ou dérivés de monocytes, subissent plutôt une différenciation vers le profil M1. Ainsi, ils favorisent la défense de l'hôte en éliminant les agents pathogènes ou les tissus endommagés et en libérant d'importantes quantités de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-1, l'IL-6 et l'IL-8 (Murray et al. 2000). Cependant, ils sont souvent activés de manière excessive et vont produire des cytokines pro-inflammatoires en excès (Wang et al. 2008), ce qui aura pour conséquence d'accroître la mortalité associée au sepsis (Angus et al. 2013). De plus, en raison de la tempête de cytokines, un grand nombre de facteurs induisant l'apoptose est libéré, comme le TNF- $\alpha$  (Zhu et al. 2009). Ces facteurs induisent et favorisent l'apoptose des macrophages (Luan et al. 2015) : des études ont montré cela chez des patients décédés et dans des modèles animaux de sepsis. Ce mécanisme peut conduire à une immunosuppression et contribuer au risque de survenue d'une infection secondaire opportuniste chez ces patients (Luan et al. 2014; Rimmelé et al. 2016). De même, il arrive que les macrophages pro-inflammatoires activés finissent par se polariser vers le phénotype M2 qui atténue la réponse pro-inflammatoire. Ils peuvent alors contribuer à une amplification de l'immunosuppression (W. Zhao et al. 2020).

#### **2.3.5. La microglie**

Les effets décrits précédemment sur les macrophages sont également retrouvés pour la microglie. Son activation est systématiquement observée dans le sepsis, à la fois dans les modèles expérimentaux et chez les patients (van Munster et al. 2011; Yan et al. 2022). Cette activation aboutit très régulièrement à un profil pro-inflammatoire (Zrzavy et al. 2019).

Chez l'Homme, une étude portant sur 13 patients décédés d'un sepsis a montré une augmentation de l'expression de CD68 (un marqueur de la microglie et des macrophages) dans le cortex, et davantage de microglie sous forme amiboïde a été observée (Lemstra et al. 2007). Dans une autre étude post-mortem de patients atteints de délire lié au sepsis, une augmentation des marqueurs microgliaux CD68 et HLA-DR (un récepteur de surface cellulaire du CMH de classe II) a été observée par rapport aux témoins du même âge, suggérant que l'activation de la microglie pourrait être liée au délire causé par le sepsis (van Munster et al. 2011). Dans une étude prospective portant sur 17 autres patients décédés des suites d'un sepsis, l'étude du tissu hippocampique a également mis en évidence une augmentation de l'activation de la microglie et de l'apoptose (Polito et al. 2011).

Dans les modèles précliniques, le LPS stimule fortement l'activation de la microglie (Lee et al. 2020; Song et al. 2022) et peut entraîner une détérioration supplémentaire du tissu cérébral déjà endommagé. Dans le modèle CLP, une modification de la morphologie de la microglie a été observée par immunofluorescence (Singer et al. 2018). D'autres travaux sur le même modèle ont montré une suractivation microgliale et une pyroptose neuronale, aggravant la destruction des tissus cérébraux et le dysfonctionnement cognitif (Yang et al. 2022).

### **2.3.6. Implication du système immunitaire adaptatif**

Le sepsis est une maladie inflammatoire médiée par l'activation du système immunitaire inné, dont certaines cellules ont la capacité de faire de la présentation d'antigènes et d'activer les cellules de la réponse immunitaire adaptative (Hotchkiss et al. 2016). Parmi les patients qui survivent à la phase hyper-inflammatoire aiguë du sepsis, certains progressent vers une phase ultérieure d'immunodépression, durant laquelle 30 % des patients meurent des suites d'une infection secondaire (Brady et al. 2020).

Les déficits de la réponse immunitaire adaptative peuvent jouer un rôle majeur dans la mortalité chez ces patients : cette réponse implique un certain nombre de types de cellules, notamment les lymphocytes T, les lymphocytes B et les cellules dendritiques, toutes jouant un rôle immunorégulateur visant à limiter les dommages et à rétablir l'homéostasie immunitaire après une infection ou une agression. Cependant, en cas de sepsis, les cellules immunitaires

adaptatives subissent la mort ou l'épuisement cellulaire, ce qui signifie qu'elles ont des réponses effectrices défectueuses, aboutissant finalement à une défense immunitaire inefficace ou supprimée (Brady et al. 2020).

Au cours du sepsis, les lymphocytes T sont recrutés sur le site de l'infection suite à la libération de cytokines pro-inflammatoires. Ils peuvent produire à leur tour des cytokines et sont également impliqués dans la régulation de la réponse immunitaire en interagissant avec d'autres cellules immunitaires comme les macrophages et les neutrophiles (Gao et al. 2022).

### 3. DYSFONCTIONS D'ORGANES

---

La réponse immunitaire disproportionnée rencontrée au cours du sepsis entraîne des dommages tissulaires au moins en partie responsables des dysfonctions d'organes associées à cette pathologie (Delano et al. 2016). Les patients atteints de sepsis peuvent présenter un dysfonctionnement de pratiquement n'importe quel système, quel que soit le site d'infection. Mais les organes les plus fréquemment touchés sont les reins, le foie, les poumons, le cœur, le système vasculaire et le système nerveux central. Cette défaillance multiviscérale est la marque caractéristique du sepsis : elle détermine l'évolution des patients de l'infection jusqu'à la guérison ou la mort.

#### 3.1. Dysfonctions cardiovasculaires

Le système cardiovasculaire, regroupant le cœur et les vaisseaux, constitue un système circulatoire fermé qui assure le transport du sang du cœur vers les tissus et inversement. Il permet l'échange de diverses substances biochimiques au sein de l'organisme et aide à fournir des nutriments, de l'oxygène et des hormones aux cellules. Le cœur et le système vasculaire présentent tous les deux de graves dysfonctionnements au cours du sepsis (Greer 2015). Ces dysfonctions entraînent des problèmes circulatoires et de perfusion tissulaire (Hariri et al. 2019), ce qui a pour conséquence d'aggraver les dysfonctions des autres organes.

##### 3.1.1. Dysfonctions vasculaires et de la coagulation

Plusieurs changements se produisent simultanément au niveau vasculaire chez les patients atteints de sepsis. La perméabilité capillaire est augmentée, ce qui entraîne une fuite de liquide à l'origine de la diminution du volume vasculaire effectif et donc de la perfusion systémique : les malades se retrouvent en hypotension. Cette fuite paracellulaire semble être causée par une lésion de l'endothélium médiée par des molécules pro-inflammatoires (Fiedler et al. 2006).

Des travaux récents ont montré un rôle important de l'angiopoïétine dans la dysfonction



vasculaire. En condition physiologique, l'activation du récepteur aux angiopoïétines (Tie2) par l'angiopoïétine-1 est nécessaire pour maintenir l'endothélium à l'état de repos. Chez les patients atteints de sepsis, on remarque une augmentation de l'expression de l'angiopoïétine-1 qui bloque le récepteur Tie2, ce qui a pour conséquence de déstabiliser l'endothélium quiescent, et donc d'augmenter la perméabilité vasculaire, provoquant ainsi un œdème tissulaire (Fiedler et al. 2006). Des études cliniques ont d'ailleurs montré qu'un rapport sérique élevé angiopoïétine-1/angiopoïétine-2 était associé à une sévérité accrue du dysfonctionnement des organes et à une mortalité plus élevée (Fang et al. 2015; Ricciuto et al. 2011).

Dans le cas du choc septique, les muscles lisses vasculaires ne parviennent pas à se contracter correctement, même après une stimulation adrénergique, ce qui entraîne une profonde vasodilatation artérielle et veineuse systémique (Burgdorff et al. 2018). Ce dysfonctionnement endothélial induit par l'inflammation semble au moins en partie être associé à une surexpression de iNOS (Morelli et al. 2016). La production excessive de NO qui en résulte induit directement la relaxation et l'hyperpolarisation des cellules musculaires lisses vasculaires (Rabuel et al. 2006), empêchant leur réponse aux vasoconstricteurs et perpétuant ainsi l'hypotension (Barrett et al. 2007; Burgdorff et al. 2018).

En plus de ces dysfonctions de l'endothélium et des cellules musculaires lisses, le système de coagulation est également affecté. La réponse inflammatoire augmente l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 à la surface de l'endothélium, ce qui favorise l'adhésion plaquettaire et l'activation de la cascade de coagulation (Bombeli et al. 1998). De plus, les mécanismes anticoagulants sont régulés à la baisse par les cytokines pro-inflammatoires. En parallèle, la production endothéliale de thrombomoduline, une protéine qui inhibe la conversion du fibrinogène en fibrine en se liant à la thrombine, est diminuée, ce qui réduit l'activation de la protéine C, une protéine anticoagulante aux propriétés fibrinolytiques (Levi et al. 2013; Simmons et al. 2015). Ceci a pour conséquence la formation de microthrombus dans les capillaires, avec pour effet une altération de la perfusion et de l'apport en oxygène, provoquant des lésions et un dysfonctionnement des organes (Fang et al. 2015).

Les NETs aggravent ce processus, car ils induisent l'agrégation plaquettaire (figure 19), la production de thrombine et la formation de caillots de fibrine (McDonald et al. 2017).

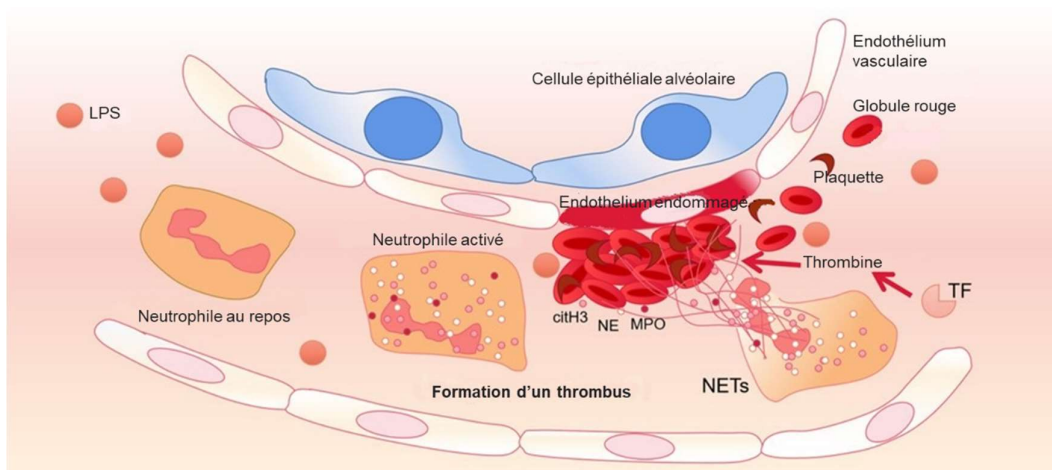


Figure 19 : Formation de thrombus de plaquettes associées aux NETs (exemple dans le poumon). Au cours du sepsis, le LPS libéré par les bactéries à Gram négatif peut activer les plaquettes. Dans un même temps, les neutrophiles migrent dans les capillaires et interagissent avec les plaquettes circulantes pour former des agrégats. Les neutrophiles libèrent alors des NETs associant l'H3 citrullinée, la NE et la MPO. Enfin, sous l'action du facteur tissulaire (TF), les NETs forment un thrombus avec les globules rouges et les plaquettes, détruisant par la même occasion les cellules endothéliales vasculaires (Chen et al. 2021).

Chez les patients atteints de sepsis, cette régulation à la hausse des facteurs pro-coagulants entraîne une consommation plaquettaire et une déplétion des facteurs de coagulation, conduisant à une thrombocytopénie associée au sepsis et/ou à une coagulation intravasculaire disséminée pour 55 % à 61 % des malades (Saito et al. 2019; Sharma et al. 2017), ces atteintes provoquant un risque plus élevé d'hémorragies et de décès (Seki et al. 2013; Sharma et al. 2017).

### 3.1.2. Dysfonctions cardiaques

La dysfonction contractile est la principale caractéristique de la dysfonction cardiaque au cours du sepsis. Elle se manifeste par une dilatation des ventricules et une diminution de la fraction d'éjection, ce qui a pour conséquence une diminution de la pression artérielle. Celle-ci peut être résistante à la réanimation liquidienne intraveineuse, ce qui nécessite alors l'ajout de vasopresseurs (Habimana et al. 2020).

Ces réponses sont accompagnées d'une fonction myocardique altérée. En effet, plusieurs acteurs, dont le NO, exacerbent le dysfonctionnement mitochondrial en diminuant l'utilisation de

l'oxygène par le myocarde, amplifient la libération de cytokines pro-inflammatoires et régulent à la baisse les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques (Dal-Secco et al. 2017). Les cytokines pro-inflammatoires ainsi libérées, telles que l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6, dépriment la contractilité des cardiomyocytes et induisent l'expression de la molécule d'adhésion VCAM-1 dans l'endothélium coronaire, dont le rôle est de médier l'infiltration de neutrophiles vers le myocarde (Y.-C. Liu et al. 2017; Sergi et al. 2017).

Au cours du sepsis, près d'un tiers des patients atteints présente une insuffisance systolique ventriculaire gauche réversible, entraînée par une hypokinésie et une fraction d'éjection ventriculaire réduite (Sevilla Berrios et al. 2014). Cette dysfonction a pour conséquence d'augmenter le risque de décès de 60 % (Vallabhajosyula et al. 2017). D'autre part, un dysfonctionnement diastolique gauche est présent chez un patient sur deux, et est également associé à un risque accru de décès de 80 % (Sanfilippo et al. 2015).

En outre, la modulation de la fréquence cardiaque, appelée réponse chronotrope, est également altérée au cours du sepsis (de Castilho et al. 2018). Des études ont montré que les personnes ayant une faible variabilité de la fréquence cardiaque présentaient un risque de décès près de six fois plus élevé (de Castilho et al. 2017; Korach et al. 2001). Les patients atteints de sepsis peuvent également être touchés, entre autres, par une insuffisance cardiaque aiguë, des arythmies cardiaques, un infarctus du myocarde ou des lésions myocardiques non ischémiques (Frencken et al. 2018; Shahreyar et al. 2018; Wang et al. 2017).

## **3.2. Dysfonctions du système nerveux central et neuro-inflammation**

Le cerveau est un organe responsable des réponses, des sensations, des mouvements, des émotions, de la communication, du traitement de la pensée et de la mémoire. Le tissu nerveux est extrêmement délicat et peut être rapidement endommagé. La protection du cerveau humain provient du crâne, des méninges et du liquide céphalo-rachidien. De plus, le cerveau possède une barrière hémato-encéphalique (BHE) qui permet de séparer le système nerveux central du sang.

### **3.2.1. Le système nerveux central**

Le système nerveux se subdivise en système nerveux central (SNC) et système nerveux

périphérique (SNP). Le SNC est principalement constitué de deux structures, le cerveau et la moelle épinière, tandis que le SNP englobe le reste du tissu nerveux. Les rôles du SNC comprennent la réception, le traitement et la réponse aux informations sensorielles. Quant à la moelle épinière, située dans la colonne vertébrale, son rôle est d'envoyer des commandes du cerveau vers le corps périphérique et de relayer les informations sensorielles des organes sensoriels vers le cerveau. Elle renferme des réseaux de neurones agissant tels des centres de contrôle pour la marche, la miction, la défécation ou l'éjaculation.

Le SNC est protégé du reste de l'organisme par la BHE qui est une barrière semi-perméable et hautement sélective. Elle empêche les solutés circulant dans le sang de traverser de manière non contrôlée (Daneman et al. 2015). Elle est formée par les cellules endothéliales des capillaires, les pieds terminaux des astrocytes enveloppant à la fois le capillaire sanguin et les péricytes intégrés dans sa membrane basale (Ballabh et al. 2004) (figure 20).

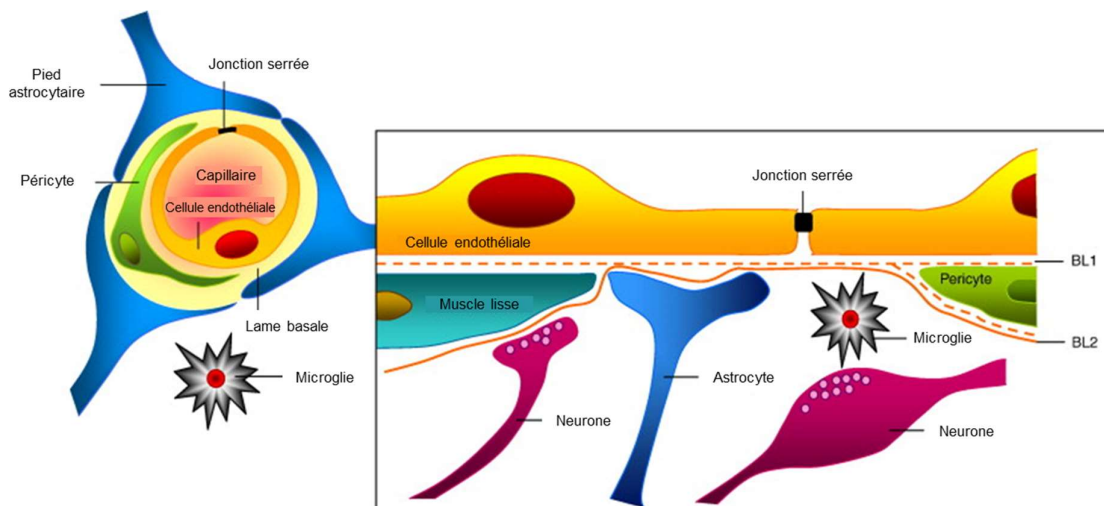


Figure 20 : Anatomie de la barrière hémato-encéphalique.

Les cellules endothéliales cérébrales forment des jonctions serrées qui scellent la voie de diffusion paracellulaire entre les cellules. Les péricytes sont distribués de manière discontinue le long des capillaires cérébraux et entourent partiellement l'endothélium. Les cellules endothéliales cérébrales et les péricytes contribuent à la formation de la membrane basale locale qui forme une matrice extracellulaire périvasculaire distincte (lame basale 1, BL1), de composition différente de la matrice extracellulaire des pieds gliaux délimitant le parenchyme cérébral (BL2). Les pieds astrocytaires forment un réseau complexe entourant les capillaires et cette association cellulaire étroite est importante dans l'induction et le maintien des propriétés de la barrière (Abbott et al. 2010).

La BHE résulte de la sélectivité des jonctions serrées entre les cellules endothéliales des capillaires cérébraux, ce qui limite le passage des solutés. Ces jonctions sont composées de protéines transmembranaires, telles que l'occludine, les claudines (comme la claudine-5) et la molécule d'adhésion jonctionnelle (comme JAM-A) (Stamatovic et al. 2008). Chacune de ces protéines est stabilisée à la membrane cellulaire endothéliale par un autre complexe protéique qui comprend des protéines d'échafaudage telles que la protéine de jonction serrée 1 (ZO1) (Stamatovic et al. 2008).

La perturbation de la BHE peut être expliquée par plusieurs mécanismes : une perturbation des jonctions serrées, des dommages aux cellules endothéliales, une activation des astrocytes et de la microglie, et la pénétration de cellules immunitaires périphériques (Huang et al. 2021). D'autres études ont montré que l'injection périphérique de LPS augmente la perméabilité de la BHE, ce qui permet l'infiltration de facteurs pro-inflammatoires périphériques tels que l'IL-6 et le TNF- $\alpha$ , et favorise l'inflammation neurologique (Jaeger et al. 2009; Peng et al. 2021).

Des études précliniques et cliniques ont montré que l'inflammation périphérique d'origine infectieuse est un facteur contribuant à la détérioration de la BHE et que dans certaines maladies du SNC, telles que les maladies neurodégénératives, les accidents vasculaires cérébraux ou le sepsis, la perméabilité de la BHE participe au développement de la maladie (Sweeney et al. 2019).

### **3.2.3. Dysfonctions du système nerveux central**

Jusqu'à 70 % des patients gravement atteints présentent un degré varié d'encéphalopathie associée à leur sepsis. Il s'agit d'un dysfonctionnement cérébral diffus qui survient à la suite d'une infection systémique, sans infection manifeste du système nerveux central (SNC) (Gofton et al. 2012).

Le sepsis endommage le SNC par plusieurs mécanismes, le premier étant l'inadéquation entre la perfusion systémique et les besoins métaboliques du patient (Sharshar et al. 2014). De plus, le sepsis est à l'origine d'arythmies cardiaques et de coagulopathie qui peuvent expliquer le risque accru d'accident vasculaire cérébral ischémique et hémorragique chez les patients atteints (Polito et al. 2013; Walkey et al. 2014). En outre, la réponse inflammatoire contribue à l'insuffisance microcirculatoire et à la perturbation de la barrière hémato-encéphalique, permettant aux

médiateurs inflammatoires et aux neurotoxines de pénétrer dans le SNC (Sweis et al. 2016). C'est par exemple le cas du monoxyde d'azote majoritairement libéré par l'endothélium, qui diffuse même à travers la barrière hémato-encéphalique intacte, et provoque un stress oxydatif qui peut entraîner un dysfonctionnement neuronal voire l'apoptose de cellules (Siami et al. 2008). La perturbation de la neurotransmission cholinergique et dopaminergique retrouvée au cours du sepsis joue également un rôle clé dans ce dysfonctionnement cérébral aigu (Annane et al. 2015; Wa et al. 2010), qui peut aller du délire aux convulsions et au coma. Toutes ces dysfonctions peuvent conduire à l'encéphalopathie associée au sepsis (SAE) qui est une complication neurologique courante mais mal comprise de cette pathologie. Elle se caractérise par un dysfonctionnement cérébral diffus sans infection manifeste du SNC (Chaudhry et al. 2013).

Le sepsis est également associé à des troubles moteurs (Xie et al. 2017), tels que la faiblesse acquise en unité de soins intensifs (ICUAW). Il s'agit d'une complication fréquente développée par une grande partie des patients admis pour sepsis dans une unité de soins intensifs. Elle se caractérise par un trouble des organes neuromusculaires (Scheffold et al. 2010) qui pourrait retarder le sevrage de la ventilation mécanique en raison d'une atrophie du diaphragme. Une étude dans un modèle de CLP de rats a montré une faiblesse musculaire, associée à une diminution persistante de l'excitabilité neuronale (Nardelli et al. 2016), raison qui pourrait donc expliquer cette ICUAW.

Les origines de ces complications peuvent être multiples et sont souvent liées à différents acteurs du système immunitaire comme la microglie résidente (Xie et al. 2017) ou les neutrophiles qui s'infiltrent dans le SNC (B. H. Singer et al. 2016). En effet, l'utilisation de l'Ulinastatine, une molécule aux propriétés anti-inflammatoires connue pour agir sur les neutrophiles *via* l'inhibition de l'élastase (Karnad et al. 2014), a diminué la neuro-inflammation et a montré une amélioration de la fonction neuromusculaire (Xie et al. 2017).

### **3.3. Autres principaux systèmes présentant des dysfonctions au cours du sepsis**

#### **3.3.1. Dysfonctions pulmonaires**

Le poumon est un organe intrathoracique de l'appareil respiratoire, permettant l'échange

des gaz, principalement l'oxygène nécessaire au métabolisme, et le dioxyde de carbone qui en résulte et qu'il faut évacuer. Le sepsis est la cause la plus fréquente du syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) (Rubenfeld et al. 2005) : 40 % des patients le développent (Fujishima et al. 2016). Le SDRA est caractérisé par une insuffisance respiratoire aiguë causée par des lésions alvéolaires et une perméabilité vasculaire pulmonaire accrue à l'origine d'œdèmes. Cette lésion de la barrière alvéolaire est médiée par le dysfonctionnement généralisé de la barrière endothéliale, l'activation plaquettaire, la formation de NETs, et la libération de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  ou l'IL-1 $\beta$  (Evans et al. 2017; Matthay et al. 2012; Park et al. 2019). Cet œdème et ces lésions alvéolaires augmentent « l'espace mort » physiologique, ce qui altère les échanges gazeux et provoque une hypoxémie et une hypercapnie (surcharge du sang artériel en CO<sub>2</sub>) (Ranieri et al. 2012). Ces dysfonctions sont prises en charge grâce à la ventilation mécanique des poumons pour aider les muscles respiratoires et maintenir un échange gazeux adéquat (Zampieri et al. 2017). Malgré cela, la mortalité parmi les personnes atteintes de SDRA au cours du sepsis est plus élevée de 35 à 46 % que chez celles sans ce syndrome (Bellani et al. 2016).

### 3.3.2. Dysfonctions rénales

Le rein est un organe de l'appareil urinaire qui a plusieurs fonctions : il produit des hormones, régule la pression artérielle et permet l'élimination des toxines. Il assure, par la filtration et l'excrétion d'urine, l'équilibre hydroélectrolytique du sang et de l'organisme. Ce système est également touché par des dysfonctionnements au cours du sepsis : la moitié des patients atteints développe une insuffisance rénale aiguë (IRA) (Poukkanen et al. 2013). L'IRA est caractérisée par une augmentation de la créatinine sérique supérieure ou égale à 0,3mg/dL en 48 heures, et un débit urinaire inférieur à 0,5mL/kg/h pendant plus de 6 heures (Khwaja 2012). Malgré sa fréquence élevée, les mécanismes sous-jacents de l'IRA associée au sepsis ne sont pas complètement compris même si un certain nombre de facteurs sont connus. Elle est entre autre causée par l'hypoperfusion rénale qui conduit à une nécrose tubulaire aiguë, mais aussi par la microcirculation défectueuse, des lésions d'ischémie-reperfusion, le stress oxydatif et des signaux inflammatoires (Lerolle et al. 2010; S. Ma et al. 2019).

De plus, les traitements administrés au cours du sepsis peuvent contribuer à l'IRA, par l'utilisation de médicaments néphrotoxiques et une réanimation liquidienne excessive. En effet, la

surcharge volémique augmente la pression veineuse centrale, ce qui augmente la pression vasculaire rénale, provoquant un œdème, une augmentation de la pression intracapsulaire et une diminution du taux de filtration glomérulaire (Bellomo et al. 2017; Poston et al. 2019).

Les patients atteints d'IRA au cours du sepsis ont un risque de mortalité hospitalière beaucoup plus élevé que ceux non atteints d'IRA (Bagshaw et al. 2009). Néanmoins, il a été montré que la sélection des fluides administrés en réanimation peut jouer un rôle important dans la survie du patient en IRA : par rapport à une solution saline normale (0,9 % de chlorure de sodium), les solutions de cristalloïdes équilibrées comme la solution de Ringer-lactate permettent une mortalité hospitalière plus faible (Rochweg et al. 2014; Shaw et al. 2014).

### 3.3.3. Dysfonctions hépatiques

Le foie est un organe du système digestif qui assure de nombreuses fonctions vitales. Il agit au niveau nutritionnel avec le métabolisme des glucides et des lipides et permet la synthèse de protéines et d'acides biliaires. Il a aussi une fonction sanguine avec la production des facteurs de coagulation, la destruction des hématies et des leucocytes, et une fonction endocrine et antitoxique (Grant 1991). Au cours du sepsis, cet organe intervient dans la régulation du processus inflammatoire et est une cible de la réponse de l'hôte. En effet, lorsqu'elles sont exposées à des LPS dans un modèle préclinique, les cellules de Kupffer, qui sont les macrophages résidents du foie, augmentent la libération d'IL-1 $\beta$ , d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  (Yan et al. 2014). En réponse à ces cytokines pro-inflammatoires, les hépatocytes libèrent des protéines de phase aiguë (PPA) dans la circulation systémique. Il s'agit d'une classe de protéines qui comprend le mannose binding protein (MBP), la protéine C réactive (CRP), les facteurs du complément, les protéines de liaison au LPS, les inhibiteurs de réactifs oxygénés, le sérum amyloïde A, le sérum amyloïde P et l'haptoglobine. Ces protéines ont différentes fonctions, notamment dans la protéolyse, la coagulation, le système du complément, ou encore le recrutement des cellules immunitaires. Cette réponse est appelée réaction de phase aiguë (Strnad et al. 2017).

Les hépatocytes, *via* les PPA, pourraient donc avoir un rôle dans l'équilibrage de la réponse immunitaire dans le sepsis, empêchant un état inflammatoire ou immunodéprimé excessif (Yan et al. 2014).



Jusqu'à 46 % des patients atteints de sepsis présentent un dysfonctionnement hépatique, qui a été associé à une mortalité à 28 jours plus élevée (Brun-Buisson et al. 2004). Deux mécanismes peuvent expliquer cette atteinte hépatique : l'hépatite hypoxique et la cholestase induite par le sepsis. L'hépatite hypoxique est généralement définie comme un contexte clinique entraînant une diminution de l'apport ou de l'utilisation de l'oxygène par le foie (Nessler et al. 2012; Waseem et al. 2016) principalement causée par les problèmes hémodynamiques (Strnad et al. 2017). Quant à la cholestase induite par le sepsis, il s'agit d'une altération de la formation de la bile et d'un débit déficient causés par une atteinte intrahépatique non obstructive (Chand et al. 2007).

### **3.3.4. Dysfonctions métaboliques**

Le sepsis induit une réponse catabolique qui se caractérise par une augmentation de la dépense énergétique au repos, un catabolisme important des protéines et des graisses, un bilan azoté négatif, une hyperglycémie et une perte progressive de la masse maigre (Träger et al. 2003).

La lutte contre l'hyperglycémie peut avoir un impact favorable sur la mortalité (van den Berghe et al. 2001; Van den Berghe et al. 2003). En effet, l'augmentation du glucose circulant altère la réponse de l'hôte à l'infection, accroît le stress oxydatif, et favorise les facteurs pro-coagulants, l'hyperactivité sympathique et la réponse pro-inflammatoire (Brierre et al. 2004). Cette hyperglycémie peut avoir plusieurs origines : l'augmentation des hormones de contre-régulation du glucagon, du cortisol et des catécholamines qui favorisent la glycogénolyse et la gluconéogenèse hépatiques, ainsi que la résistance périphérique à l'insuline (Chambrier et al. 2000).

Le catabolisme des protéines musculaires squelettiques induit par le sepsis est majoritairement provoqué par un déséquilibre entre l'augmentation de la dégradation des protéines musculaires et une synthèse accrue de protéines telles que les cytokines (Lang et al. 2007).

Au niveau de la cellule, le sepsis est caractérisé par une altération de la respiration cellulaire. Alors que la pression partielle d'oxygène dans les tissus est normale ou élevée lors de cette pathologie, les cellules sont incapables d'utiliser cet oxygène. Cela est une conséquence directe

du dysfonctionnement mitochondrial (Fink 2001), qui est au moins en partie lié à une libération excessive de NO suite à une surexpression de l'iNOS (Fink 2002).

## 4. PISTES THÉRAPEUTIQUES DU SEPSIS

---

### 4.1. Prise en charge du sepsis

La gravité du sepsis est mesurée à l'aide du score SOFA. Or, les informations nécessaires pour le calculer peuvent ne pas être disponibles lorsque le patient est gravement malade. En conséquence, le score qSOFA (quick SOFA) a été développé pour identifier rapidement les patients adultes atteints de sepsis lors de leur prise en charge. Il est considéré comme positif si le patient présente au moins deux des critères cliniques suivants : une fréquence respiratoire de 22 ou plus par minute, une altération mentale (échelle de Glasgow < 15), ou une pression artérielle systolique de 100 mmHg ou moins (M. Singer et al. 2016).

Les objectifs thérapeutiques dans la prise en charge du sepsis sont de fournir une thérapie antimicrobienne appropriée contre l'organisme pathogène responsable de l'infection et d'améliorer l'oxygénation et la perfusion des tissus.

Dans un premier temps, dès le diagnostic, des antibiotiques à larges spectres sont administrés par voie intraveineuse. Ensuite, les patients vont faire l'objet d'un remplissage vasculaire à l'aide de cristaalloïdes. Chez les malades souffrant d'hypoperfusion, un minimum de 30 mL/kg de liquide cristaalloïde intraveineux doit être administré (Dellinger et al. 2013). Ils peuvent aussi être placés sous oxygène si leur saturation est inférieure à 94 %.

Chez les patients qui restent hypotendus malgré une réanimation liquidienne adéquate, ou chez ceux qui développent un œdème pulmonaire cardiogénique, un vasopresseur doit être utilisé pour remonter la pression artérielle en augmentant les résistances vasculaires périphériques. La noradrénaline est le premier choix pour le traitement de ces malades, avec parfois l'ajout de vasopressine ou d'épinéphrine. Pour les patients qui restent instables, la dobutamine est recommandée car elle induit un effet inotrope positif et donc une augmentation du débit cardiaque et de la pression artérielle (Rhodes et al. 2017).

Quant aux patients présentant des saignements actifs, une ischémie myocardique, une hypoxie sévère ou lorsque le taux d'hémoglobine tombe en dessous de 7 g/dL, ils doivent recevoir une transfusion sanguine (Keeley et al. 2017).

Chez les patients en choc septique qui ne parviennent pas à conserver une pression artérielle moyenne (PAM) adéquate malgré un remplissage et l'utilisation de vasopresseurs adaptés (Scheeren et al. 2019), l'administration de corticostéroïdes comme l'hydrocortisone en tant que traitement adjuvant peut avoir un effet positif (Annane et al. 2019; Evans et al. 2021). Mais d'autres traitements adjuvants sont également testés, dont un semble prometteur et a fait l'objet de recherches précliniques et d'essais cliniques au cours des dix dernières années : il s'agit de l'administration de  $\beta$ 1-bloquants, qui sont des antagonistes des récepteurs  $\beta$ 1-adrénergiques.

## 4.2. Le système adrénurgique

Il existe deux grands types de récepteurs adrénurgiques : les récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$ -adrénurgiques. Ce système est sous contrôle du système nerveux sympathique, l'un des sous-types du système nerveux autonome (SNA).

### 4.2.1. Le système nerveux autonome

Le système nerveux autonome, aussi appelé système végétatif, est un composant du système nerveux périphérique qui régule les processus physiologiques involontaires, notamment la fréquence cardiaque, la tension artérielle, la respiration, la digestion et l'excitation sexuelle.

Il est divisé en deux sous-systèmes : le système nerveux sympathique (SNS) et le système nerveux parasympathique (SNPa). Le SNS est souvent considéré comme le système de « combat ou fuite », tandis que le SNPa est plutôt celui de « repos et digestion ». Dans de nombreux cas, ces deux systèmes ont des actions antagonistes pour maintenir un équilibre : l'un active une réponse physiologique et l'autre l'inhibe (McCorry 2007).

Le SNA joue un rôle essentiel dans la régulation de diverses fonctions corporelles, notamment la gestion des muscles lisses impliqués dans la digestion et la régulation de la vascularisation, des muscles cardiaques, de la plupart des glandes exocrines responsables de la digestion et de la sudation, ainsi que de certaines glandes endocrines. Ce système complexe comprend à la fois des neurones périphériques et centraux (Karemaker 2017).

Il se compose de voies afférentes qui incluent les ganglions sensoriels crâniens, responsables du relais des informations sensorielles telles que la pression artérielle ou la saturation en oxygène du sang. Ces informations convergent vers un centre intégrateur appelé le noyau du tractus solitaire, situé dans le SNC. Ce centre intégrateur prend en compte ces données et envoie des signaux dans les voies efférentes pour, par exemple, réguler la dilatation des bronches ou la libération de sucs digestifs.

Généralement, les voies motrices SNS et SNPa consistent en une série de deux neurones : un neurone préganglionnaire avec un corps cellulaire dans le SNC, et un neurone postganglionnaire avec un corps cellulaire en périphérie qui innerve les tissus cibles (Sternini 1997).

### **A. Le système nerveux parasympathique**

Les fibres nerveuses du SNPa proviennent du SNC *via* les nerfs crâniens III, VII, IX et X, ainsi que par les racines nerveuses S2 à S4. Toutes les autres fibres parasympathiques présynaptiques font synapse dans un ganglion proche ou sur la paroi du tissu cible, ce qui explique que les fibres présynaptiques sont nettement plus longues que les fibres post-synaptiques (Waxenbaum et al. 2023). Le nerf vague fournit l'innervation parasympathique à la plupart des organes thoraciques et viscéraux (Berthoud et al. 2000). Il favorise en particulier la relaxation cardiaque. En effet, le nerf vague innerve principalement les oreillettes du cœur, avec une innervation ventriculaire clairsemée (Kent et al. 1974). À ce niveau, le SNPa libère de l'acétylcholine qui va se fixer sur les récepteurs de type muscarinique, ce qui va induire principalement une diminution de la fréquence cardiaque (Levy 1997).

L'autre fonction clé du SNPa est centrée sur la digestion et le cycle respiratoire. Dans un état non pathologique, les nerfs parasympathiques se déclenchent, par exemple, pendant l'expiration, contractant et raidissant les voies respiratoires pour les dilater et permettre un afflux d'air approprié (Karemaker 2017).

## B. Le système nerveux sympathique

Au niveau anatomique, les neurones sympathiques ont des corps cellulaires situés dans les cornes latérales de la moelle épinière. Les fibres présynaptiques sortent de la moelle épinière par les racines antérieures et pénètrent dans les branches antérieures des nerfs spinaux T1-L2 et sur les troncs sympathiques *via* les branches communicantes blanches. À partir de là, les fibres peuvent monter ou descendre le tronc sympathique jusqu'à un ganglion paravertébral supérieur ou inférieur. Ce ganglion innerve lui-même le tissu cible. Ces neurones post-ganglionnaires libèrent entre autres de la noradrénaline qui active les récepteurs adrénergiques présents sur les tissus cibles.

Le SNS est responsable de la réponse de l'organisme au stress, principalement en régulant le système cardiovasculaire. En fonction du signal reçu, une augmentation des signaux sympathiques conduit généralement à une vasoconstriction des vaisseaux, mais également à quelques vasodilatations, en particulier pour les vaisseaux coronaires et ceux qui alimentent les muscles squelettiques afin d'assurer un apport suffisant en oxygène et en énergie (Waxenbaum et al. 2023). Ces effets opposés sont médiés par le type de récepteurs auquel est associé le vaisseau. Quant au cœur, également innervé par le SNS, sa stimulation va entraîner une augmentation de la vitesse et de la force de contraction (Carrara et al. 2020) (figure 21).

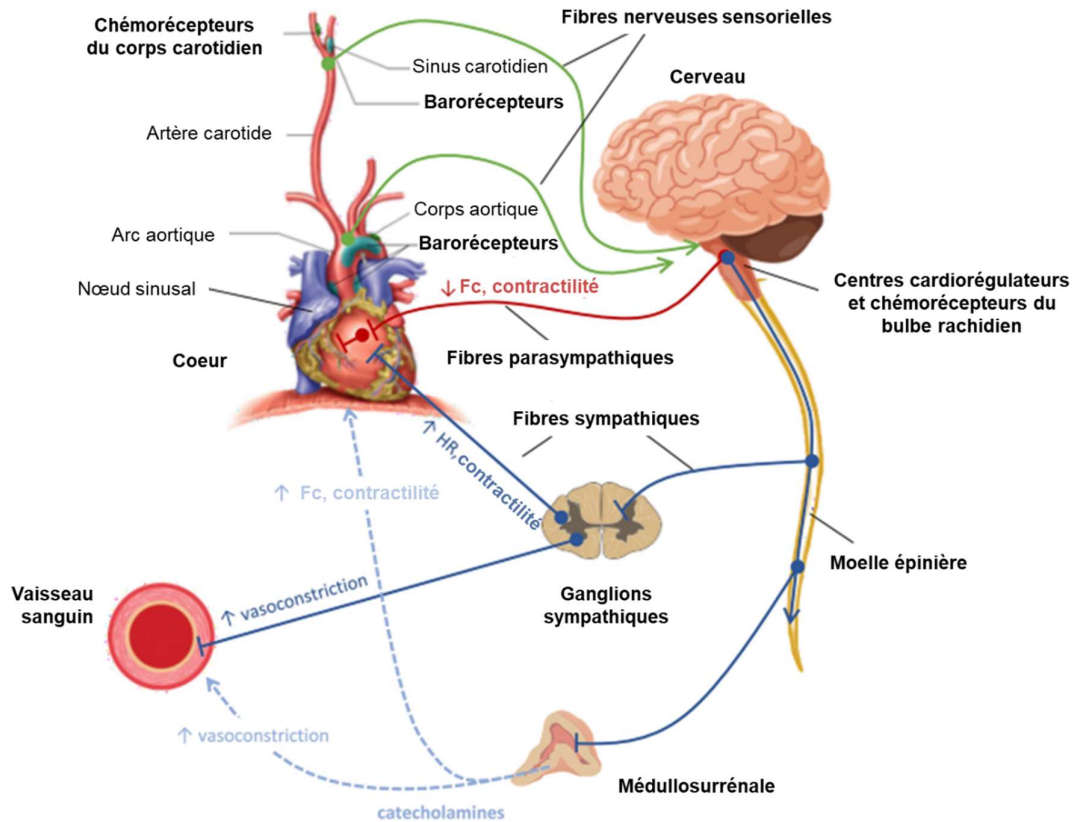


Figure 21 : Illustration des mécanismes de régulation à court terme du système cardiovasculaire par le SNA. Les barorécepteurs artériels sont principalement situés dans la crosse aortique et les sinus carotidiens. Les barorécepteurs cardio-pulmonaires sont situés dans les oreillettes, les ventricules, la veine cave et les vaisseaux pulmonaires. Le centre vasomoteur héberge la régulation circulatoire et fait partie du bulbe rachidien situé dans le tronc cérébral, à côté du noyau du tractus solitaire qui reçoit les signaux des nerfs sensoriels à travers les nerfs glossopharyngien et vague (lignes vertes). Les fibres du SNS (lignes bleues) proviennent du bulbe rachidien et émergent des segments thoraciques supérieurs de la moelle épinière en tant que neurones pré-ganglionnaires, se terminant à l'intérieur des ganglions de la chaîne sympathique situés à côté de la colonne vertébrale. Les neurones post-ganglionnaires du SNS quittent les ganglions de la chaîne sympathique vers leurs organes cibles (le cœur, les vaisseaux et les glandes surrénales). L'activation sympathique de la médullosurrénale induit également la libération d'épinéphrine et de norépinéphrine (lignes bleu clair en pointillés) dans la circulation sanguine. Les fibres du SNPa (lignes rouges) proviennent également du tronc cérébral et sont incorporées en tant que neurones pré-ganglionnaires dans le nerf vague, se terminant sur les ganglions cardiaques parasympathiques. Des neurones post-ganglionnaires très courts naissent de ces ganglions cardiaques parasympathiques vers l'oreillette droite et gauche, le nœud auriculo-ventriculaire, le septum interauriculaire, l'aorte ascendante et le tronc pulmonaire. Lors d'un choc septique, l'hypotension et la réaction inflammatoire inhibent les centres vagues, induisant une réduction de la stimulation vagale, tandis que la voie sympathique est stimulée. Le sepsis provoque donc un déséquilibre frappant de l'activité SNA avec une suractivation du SNS (Carrara et al. 2020).

Le SNS est constamment actif, même dans des situations « non stressantes ». En plus de la stimulation tonique des vaisseaux sanguins, le SNS est actif pendant le cycle respiratoire normal :

l'activation sympathique complète le SNPa en agissant pendant l'inspiration pour dilater les voies respiratoires et permettre un afflux d'air approprié (I.-C. Chen et al. 2016; Karemaker 2017).

#### **4.2.2. Les récepteurs adrénergiques**

Les neurones post-ganglionnaires du SNS libèrent entre autres de la noradrénaline qui active les récepteurs adrénergiques présents sur les tissus cibles. Il existe deux types de récepteurs adrénergiques : les récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$ -adrénergiques, qui sont tous les deux liés aux protéines G (Bylund et al. 1994). Ils permettent la transduction cellulaire et tissulaire de l'activation du SNS grâce à leur activation par les catécholamines.

##### **A. Les récepteurs $\alpha$ -adrénergiques**

Les récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques sont de type  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$ -adrénergiques (Hoffman et al. 1980). Les récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques sont impliqués dans la vasoconstriction : ils sont liés à la protéine  $G_q$ , qui induit une activation de la phospholipase C. La phospholipase C transforme le PIP2 en DAG et en IP3. Le DAG stimule la protéine kinase C (PKC) tandis que l'IP3 agit au niveau des compartiments de stockage intracellulaire de calcium pour le libérer, ce qui induit une contraction du muscle lisse associé. Les récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques sont également impliqués dans d'autres processus comme le tractus gastro-intestinal et la dilatation des pupilles

Quant aux récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques, ils sont couplés à une protéine  $G_i$  qui inhibe l'adénylate cyclase, ce qui permet la diminution de la concentration intracellulaire d'AMP cyclique (AMPC) et conduit à une diminution de l'activité de la protéine kinase A (PKA) AMPC-dépendante. Ces récepteurs se trouvent principalement dans le SNC, sur les neurones présynaptiques, où leur activation entraîne une diminution de l'activité sympathique et donc une diminution de la pression artérielle. Ils ont également un effet au niveau de la pupille de l'œil, du pancréas en diminuant la sécrétion d'insuline, ou encore par exemple au niveau de la thyroïde où ils inhibent la production d'hormones thyroïdiennes (Muraki et al. 1984).



## B. Les récepteurs $\beta$ -adrénergiques

Il en existe 3 types : les récepteurs  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  et  $\beta_3$ -adrénergiques (Bylund et al. 1994).

### ○ Les récepteurs $\beta_3$ -adrénergiques

Les récepteurs  $\beta_3$ -adrénergiques sont abondamment exprimés dans les tissus adipeux blancs et bruns. Leur stimulation entraîne une augmentation de l'oxydation des graisses, une augmentation de la dépense énergétique et une amélioration de l'absorption du glucose médiée par l'insuline.

### ○ Les récepteurs $\beta_2$ -adrénergiques

Les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques sont distribués dans de nombreux organes du corps, mais ils sont exprimés principalement dans les cellules musculaires lisses bronchiques. Ils sont également largement exprimés par les cellules épithéliales et endothéliales du poumon, par les hépatocytes et par les cellules musculaires lisses uro-génitales. Les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques sont couplés à la protéine  $G_s$ , qui active l'adénylyl-cyclase, provoquant la production d'AMPc à partir d'ATP. L'AMPc catalyse alors l'activation de la PKA, qui à son tour phosphoryle les protéines impliquées dans le contrôle du tonus musculaire. L'AMPc inhibe également la libération d'ions calcium à partir des réserves intracellulaires, ce qui facilite la relaxation des cellules musculaires lisses. L'activation des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques permet une dilatation des bronchioles et des vaisseaux sanguins exprimant ce récepteur, et permet également de détendre les muscles de l'utérus, de la vessie et du conduit gastro-intestinal. Il existe d'autres effets de leur activation tels qu'une diminution de l'agrégation plaquettaire et de la glycogénolyse dans le foie et dans les muscles squelettiques. Au niveau du cœur, ces récepteurs représentent environ 20 % de tous les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques présents (Barki-Harrington et al. 2004; Wachter et al. 2012). Leur activation permet aussi d'augmenter la force de contraction et la fréquence cardiaque à un degré moindre par rapport aux récepteurs  $\beta_1$ -adrénergiques (Bernstein et al. 2011). De plus, ils jouent un rôle majeur dans la dilatation des artères coronaires en réponse au stress. Ces récepteurs sont également exprimés sur les principales cellules immunitaires telles que les neutrophiles (Gurguis et al. 1999), les monocytes (Kavelaars et al. 1997), et les macrophages (Grailer et al. 2014), et ils

permettent de réguler le système immunitaire (Sharma et al. 2020).

- Les récepteurs  $\beta$ 1-adrénergiques

Les récepteurs  $\beta$ 1-adrénergiques sont prédominants dans le cœur : ils représentent environ 80 % des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques cardiaques. Ils sont couplés à la protéine  $G_s$ , ce qui entraîne l'activation de la cascade de signalisation  $G_s$ -adénylyl cyclase-AMPC-protéine kinase A (PKA). Dans les myocytes ventriculaires, la phosphorylation des substrats de la PKA, notamment le canal calcique de type L, la troponine I cardiaque et la protéine C de liaison à la myosine cardiaque, entraîne une augmentation transitoire du calcium et de la contractilité. Dans les cellules dites pacemaker, ou cellules du nœud sinusal, la phosphorylation des canaux ioniques membranaires et des protéines de gestion du calcium, médiée par la PKA, augmente l'afflux de calcium cellulaire, ce qui permet d'élever la fréquence cardiaque. L'activation  $\beta$ 1-adrénergique facilite également la conduction à travers le nœud auriculo-ventriculaire. Par conséquent, les récepteurs  $\beta$ 1-adrénergiques sont principalement responsables de la contractilité ventriculaire et de la fréquence cardiaque (effets inotropes et chronotropes positifs) (Jahns et al. 2006).

Les récepteurs  $\beta$ 1-adrénergiques sont également présents sur le rein. Lorsqu'ils sont activés dans cet organe, les cellules musculaires lisses de l'appareil juxtaglomérulaire se contractent et libèrent de la rénine. Cet effet en cascade finit par augmenter le volume sanguin grâce aux actions de l'angiotensine II et de l'aldostérone (Panico et al. 2019).

Des récepteurs  $\beta$ 1-adrénergiques sont aussi présents à la surface de cellules immunitaires comme les neutrophiles qui expriment également des récepteurs  $\beta$ 2-adrénergiques. Si cette affirmation a été discutée pendant de nombreuses années, des études récentes ont confirmé leur présence et leur rôle dans la régulation de la réponse immunitaire (Clemente-Moragón et al. 2020; Yousefi et al. 2009).

### **4.3. La modulation du système nerveux autonome comme piste thérapeutique**

#### **4.3.1. Pistes thérapeutiques**

Il existe plusieurs stratégies thérapeutiques visant à moduler les effets du système nerveux autonome au cours du sepsis. Je choisis de vous présenter ici une liste non exhaustive des principales pistes thérapeutiques.

L'une des stratégies les plus connues consiste à stimuler les récepteurs  $\alpha$ 1-adrénergiques à l'aide de catécholamines possédant une activité  $\alpha$ -agoniste. Ce traitement est administré en cas d'hypotension résistante au remplissage vasculaire, et permet d'augmenter la vasoconstriction (Keeley et al. 2017). Ce traitement est couramment utilisé lors de la prise en charge des patients en choc septique, mais ne présente ni un effet curatif, ni un effet préventif.

La stimulation du nerf vague est une autre approche envisagée (Wang et al. 2016), déjà utilisée avec de bons résultats pour traiter certaines pathologies telles que l'épilepsie, la dépression ou l'inflammation. Dans le cas de cette pathologie, le nerf vague est stimulé grâce à la stimulation transcutanée auriculaire qui permet la libération d'acétylcholine qui va pouvoir se lier, entre autres, aux récepteurs nicotiniques présents sur certaines cellules immunitaires (Di Lazzaro et al. 2004; González et al. 2019). Cette approche a des effets positifs chez les patients atteints de sepsis (Imamura et al. 2023), et permet une diminution du score SOFA par rapport à la valeur initiale. Elle permet aussi une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$ ) et une augmentation de la production de cytokines anti-inflammatoires (IL-4 et IL-10) (Bonaz et al. 2016; Wu et al. 2023). Dans des modèles animaux, des études ont également montré des effets positifs avec une amélioration des dysfonctionnements microcirculatoires et une diminution de la réponse inflammatoire (Borovikova et al. 2000; Mihaylova et al. 2012).

Une autre approche consiste à stimuler la voie  $\beta$ 2-adrénergique. Celle-ci a fait l'objet de recherches et a montré des effets positifs au cours du sepsis, notamment suite à l'administration d'agonistes, avec une diminution des lésions hépatiques associées au sepsis (Izeboud et al. 2004). Ce type de traitement a également permis de réduire l'inflammation, avec une diminution des taux plasmatiques de TNF- $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$  et d'IL-6 (Izeboud et al. 2004), et de la production des

cytokines IL-12 et IL-18 par les monocytes (Mizuno et al. 2005).

Enfin, l'administration de  $\beta$ -bloquants est une piste thérapeutique qui a fait l'objet de très nombreuses recherches et dont les effets sont maintenant assez bien connus en clinique, ou sur des modèles précliniques, notamment aux niveaux cardiovasculaire, immunitaire, métabolique, de la coagulation ou sur la mortalité (Hasegawa et al. 2021).

#### **4.3.2. Dérégulation de la signalisation $\beta$ -adrénergique au cours du sepsis**

Au cours du sepsis, il a été démontré que des concentrations plasmatiques constamment élevées de catécholamines sont associées à une morbidité et une mortalité accrues (Brown et al. 2013; Ostrowski et al. 2015). Bien que la stimulation adrénergique puisse être bénéfique à court terme en aidant le corps à faire face au sepsis, une stimulation excessive ou prolongée peut avoir des effets néfastes, notamment une défaillance de plusieurs organes. Chez les patients atteints de sepsis, une dérégulation de la signalisation adrénergique est associée à un dysfonctionnement cardiaque induit par le sepsis (Dünser et al. 2009; Pancoto et al. 2008; Schmittinger et al. 2012). Malgré l'augmentation des taux de catécholamines circulantes, la réponse contractile des cardiomyocytes à la stimulation des catécholamines est altérée chez les patients atteints de sepsis (Ferreira et al. 2018; Pancoto et al. 2008). Comme le sepsis est caractérisé par une activation excessive du SNS et une augmentation des taux de catécholamines endogènes circulantes, la stimulation accrue des récepteurs adrénergiques active des mécanismes de désensibilisation. Ce processus de désensibilisation se produit au moyen de trois mécanismes qui commencent peu de temps après la stimulation : la phosphorylation en quelques secondes, l'endocytose en quelques minutes et enfin, la régulation négative de l'expression du récepteur à la surface cellulaire en quelques heures (Rockman et al. 2002; Vasudevan et al. 2011) (figure 22). Cette désensibilisation contribue à la réduction de la réactivité cardiovasculaire aux stimuli adrénergiques qui est fréquemment observée en cas de choc septique (Rudiger 2010). La régulation négative de l'expression du gène du récepteur  $\alpha$ 1-adrénergique au cours du sepsis a été démontrée *in vivo* et *in vitro* en raison de la libération de cytokines pro-inflammatoires et a été associée à une insuffisance circulatoire (Schmidt et al. 2009).

D'autres organes sont également affectés par le stress adrénergique, avec des

conséquences telles qu'un œdème pulmonaire, des thromboses, une hypoperfusion gastro-intestinale, une dérégulation de la réponse immunitaire, une augmentation de la dépense énergétique cellulaire et un dysfonctionnement microvasculaire (Dünser et al. 2009; Ferreira et al. 2018; Rudiger et al. 2016).

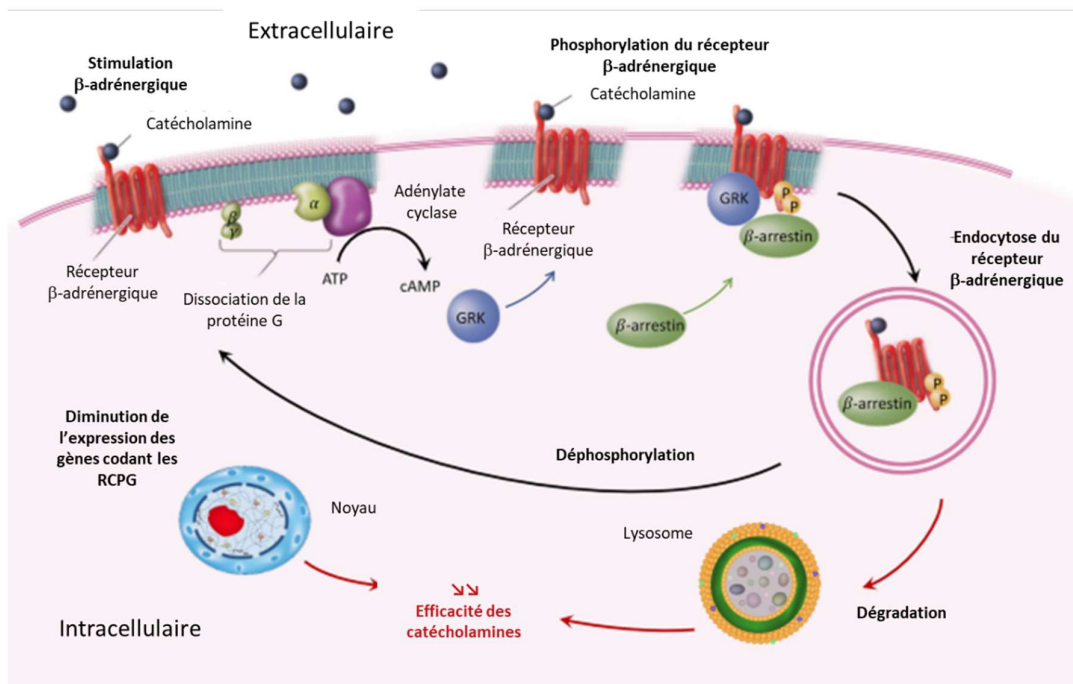


Figure 22 : Mécanisme du processus de désensibilisation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques.

Les kinases (GRK) phosphorylent le récepteur adrénérgique uniquement s'il est lié à un agoniste. Cette phosphorylation favorise l'interaction du récepteur avec des protéines cytosoliques appelées  $\beta$ -arrestines qui empêchent sa signalisation intracellulaire. L'activité accrue de GRK force donc l'équilibre des récepteurs  $\beta$  vers un état inactif. De plus, les  $\beta$ -arrestines favorisent leur internalisation et leur dégradation ultérieure dans les lysosomes. La resensibilisation est le processus qui rétablit la réactivité des récepteurs désensibilisés, par déphosphorylation par des phosphatases spécifiques et par recyclage des récepteurs vers la membrane cellulaire. La régulation négative des gènes codant pour les récepteurs adrénérgiques conduit également à une efficacité réduite des catécholamines (Carrara et al. 2021).

#### 4.3.3. Intérêt clinique des $\beta$ -bloquants

Les  $\beta$ -bloquants sont des antagonistes compétitifs. Certains peuvent bloquer l'activation de tous les types de récepteurs  $\beta$ -adrénergiques alors que d'autres sont plus ou moins sélectifs. Les  $\beta$ 1-bloquants sont utilisés en particulier pour traiter les troubles cardiaques comme la tachycardie, grâce à leurs effets chronotropes négatifs et inotropes. Dans le sepsis, les premières études sur l'effet des  $\beta$ -bloquants datent de la fin des années 60. Elles ont mis en évidence que le choc

septique induisait une stimulation  $\beta$ -adrénergique excessive et que la perfusion de propranolol, un  $\beta$ -bloquant non sélectif, permettait d'améliorer la pression artérielle et le pH, et finalement d'améliorer la survie chez l'Homme (Berk et al. 1969, 1972).

Des études plus récentes ont également montré des effets positifs des  $\beta$ -bloquant sur la survie au cours du sepsis (Chacko et al. 2015; Gadallah et al. 2020). Cependant, il reste de nombreuses incertitudes avant d'envisager l'utilisation généralisée de ce traitement, notamment le choix du  $\beta$ -bloquant, la posologie optimale, le moment et la durée d'administration, ainsi que le moment d'arrêt du traitement (Chacko et al. 2015).

#### **4.3.4. Effets de la modulation adrénérergique sur la fonction cardiovasculaire au cours du sepsis**

Une étude a montré que des animaux KO pour le récepteur  $\beta$ 2-adrénergique et traités à l'isoprotérénol, un  $\beta$ -stimulant non-sélectif, présentaient des taux de mortalité plus élevés, alors que chez des souris KO pour les récepteurs  $\beta$ 1-adrénergiques, l'administration de ce même  $\beta$ -stimulant empêchait l'apoptose dans le myocarde. Les résultats de cette étude suggèrent donc que l'activation *in vivo* des récepteurs  $\beta$ 2-adrénergiques est anti-apoptotique et contribue à la protection du myocarde (Patterson et al. 2004).

Dans un modèle de CLP chez le rat, l'administration d'esmolol, un  $\beta$ 1-bloquant sélectif à durée de demi-vie courte, a permis d'améliorer le débit et l'efficacité cardiaques comparés aux animaux non traités (Suzuki et al. 2005). Elle a également eu des effets bénéfiques sur la contractilité cardiaque intrinsèque et la réactivité vasculaire aux catécholamines, grâce à une régulation à la hausse de l'expression vasculaire  $\alpha$ 1-adrénergique (Kimmoun et al. 2015). Chez les patients atteints de sepsis, l'esmolol a diminué la fréquence et le débit cardiaques sans modifier la consommation d'oxygène du corps entier, suggérant une augmentation de l'extraction d'oxygène tissulaire (Gore et al. 2006). Il a également permis d'améliorer la survie (Morelli et al. 2013). Une autre étude a confirmé ces résultats et montré que l'esmolol améliorait la fonction vasculaire *via* une résistance vasculaire périphérique accrue (Carrara et al. 2020).

L'administration d'aténolol, un  $\beta$ 1-bloquant sélectif à durée de demi-vie longue, a permis de montrer des effets positifs sur la fonction cardiaque (fraction d'éjection du ventricule gauche

et débit cardiaque) et vasculaire (pression artérielle) dans un modèle de souris CLP (Bedet et al. 2020).

L'utilisation conjointe de métoprolol, un  $\beta$ 1-bloquant sélectif, et d'aténolol a permis de restaurer la variabilité de la fréquence cardiaque dans la maladie coronarienne (Niemelä et al. 1994) ou l'insuffisance cardiaque chronique (Aronson et al. 2001). L'administration d'un  $\beta$ 1-bloquant pourrait également avoir des effets positifs sur la variabilité de la fréquence cardiaque au cours du sepsis (Aronson et al. 2001).

Le blocage des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques semble donc bénéfique pour la fonction cardiovasculaire au cours du sepsis, comme montré dans une méta-analyse qui a mis en évidence que l'utilisation de ce type de traitement chez les patients atteints de sepsis et de choc septique était associé à une mortalité à 28 jours significativement plus faible (Hasegawa et al. 2021). Ces effets passent notamment par l'amélioration de la fonction diastolique, de l'extraction et de la consommation d'oxygène, ou de l'augmentation des résistances vasculaires. En outre, la stimulation  $\beta$ 2-adrénergique doit être conservée car des études montrent une action protectrice au niveau du cœur.

#### **4.3.5. Effets de la modulation adrénérergique sur la réponse immunitaire**

Le système  $\beta$ -adrénergique est connu pour ses propriétés modulatrices sur le système immunitaire depuis de nombreuses années (Elenkov et al. 2000). Les catécholamines, *via* les récepteurs  $\beta$ 2-adrénergiques (Sekut et al. 1995), régulent à la baisse la synthèse de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 et l'IL-1 (Deng et al. 2004; Muthu et al. 2005), et augmentent la synthèse de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 (Deng et al. 2004; Muthu et al. 2005).

Cependant, la stimulation des récepteurs  $\beta$ 1-adrénergiques semble plutôt pro-inflammatoire. En effet, dans un modèle de sepsis chez le rat, le blocage des récepteurs  $\beta$ 1-adrénergiques par l'esmolol a permis de diminuer les concentrations circulantes de TNF- $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$ , et de diminuer l'inflammation (Guo et al. 2006; Suzuki et al. 2005). De même, le landiolol, un autre  $\beta$ 1-bloquant sélectif, a diminué les taux circulants de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 (Hagiwara et al. 2008). Il a également été montré que l'administration d'esmolol pouvait réduire le taux de NF- $\kappa$ B

(Kimmoun et al. 2015).

Des travaux plus récents ont montré des effets de l'administration de  $\beta$ 1-bloquants sur les neutrophiles : l'administration de métoprolol, un  $\beta$ 1-bloquant sélectif, a permis de limiter les dommages cérébraux en ciblant les neutrophiles dans un modèle d'accident vasculaire cérébral chez le rat (Clemente-Moragón et al. 2017). Une autre étude s'est intéressée à ces effets dans plusieurs modèles en utilisant également le métoprolol : dans un modèle d'infarctus du myocarde, elle a montré une diminution de la zone cardiaque lésée, de l'infiltration des neutrophiles, et de l'interaction des neutrophiles avec les plaquettes. Elle a également mis en évidence une réduction de la migration des neutrophiles dans un modèle de péritonite et d'inflammation pulmonaire (Clemente-Moragón et al. 2020). Une étude clinique réalisée par cette même équipe a montré des effets positifs de l'administration de métoprolol chez des patients atteints de COVID-19, avec une diminution de l'infiltration des cellules immunitaires dans les poumons, une meilleure oxygénation et une baisse du nombre de jours de ventilation mécanique. Au niveau des neutrophiles, une diminution de leur activation, et particulièrement une limitation de la production de NETs, a été observée (Clemente-Moragón et al. 2021).

#### **4.3.6. Effets de la modulation adrénérgique sur la fonction métabolique**

L'hyperglycémie et l'augmentation du catabolisme des protéines et des lipides sont toutes deux en partie médiées par la signalisation  $\beta$ 2-adrénérgique (Haffner et al. 1992; John et al. 1990).

Des études expérimentales dans des modèles animaux de sepsis ont montré que l'administration de propranolol, un  $\beta$ -bloquant non spécifique, a permis de réduire la concentration plasmatique de glucose *via* une diminution de sa production endogène (Hargrove et al. 1988; Norbury et al. 2007). Le propranolol a également permis d'améliorer le bilan azoté, suggérant une protéolyse musculaire réduite (Dickerson et al. 1990). Cependant, ces effets n'ont pas été observés suite à l'administration de  $\beta$ 1-bloquants sélectifs (Gore et al. 2006).

Ainsi, dans les troubles métaboliques induits par le sepsis, l'antagonisme des récepteurs  $\beta$ 2-adrénérgiques semble bénéfique en diminuant la gluconéogenèse, l'hyperglycémie et la protéolyse, tandis que les  $\beta$ 1-bloquants semblent dépourvus d'activité sur la modulation du métabolisme.



**NEURO-INFLAMMATION INDUITE PAR  
UNE LÉSION HAUTE DE LA MOELLE  
ÉPINIÈRE**

---

## 1. NEURO-INFLAMMATION TRAUMATIQUE

---

Outre l'inflammation infectieuse, comme le sepsis, il existe l'inflammation traumatique. Il s'agit d'une réponse inflammatoire induite en l'absence de micro-organismes. Elle est généralement associée à la reconnaissance par les récepteurs de la signalisation inflammatoires, du contenu intracellulaire libéré par les cellules endommagées et nécrotiques. Ce contenu intracellulaire reconnu comme un DAMP est libéré à la suite d'un traumatisme, d'une lésion d'ischémie-reperfusion ou d'une lésion induite chimiquement (Medzhitov 2008). Elle peut aussi résulter d'un changement des récepteurs de la reconnaissance du soi, et donc de ce fait induire des maladies auto-immunes.

Semblable à la réponse mise en place lors de la lutte contre des agents pathogènes, la réponse inflammatoire stérile est marquée par le recrutement de cellules immunitaires comme les neutrophiles et les macrophages, ainsi que par la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires. Elle est également cruciale pour la réparation des tissus et des plaies (Yong et al. 2019). Cependant, une inflammation disproportionnée ou chronique peut être impliquée dans de nombreuses pathologies comme la goutte (Nuki et al. 2006), l'asbestose qui est une fibrose pulmonaire induite par l'amiante (Mossman et al. 1998), l'athérosclérose (Galkina et al. 2009) et certaines maladies du SNC.

En effet, la neuro-inflammation stérile survient dans de nombreuses pathologies, comme les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson...), les maladies auto-immunes du système nerveux (sclérose en plaques...), les accidents vasculaires cérébraux, les hémorragies, l'épilepsie ou les lésions traumatiques du SNC telles que les lésions de la moelle épinière. Elle peut créer un cercle vicieux d'inflammation incontrôlée, entraînant une neurodégénérescence progressive (W.-W. Chen et al. 2016). Dans ces pathologies, la persistance du phénotype pro-inflammatoire de la microglie se traduit par une augmentation des facteurs pro-inflammatoires et une diminution de leur fonction phagocytaire. Les astrocytes de phénotype pro-inflammatoire libèrent des facteurs pro-inflammatoires, qui peuvent déréguler la fonction synaptique, la barrière hémato-encéphalique, la fonction métabolique, le glutamate, les ions extracellulaires et le flux sanguin. Cela peut conduire à une progression de la neurodégénération (Kwon et al. 2020).

L'un des cas les mieux connus d'inflammation stérile est celui des maladies auto-immunes du système nerveux central. Il s'agit d'affections dans lesquelles le système immunitaire attaque à tort les composants du système nerveux central, comme lors de l'encéphalite auto-immune ou de la sclérose en plaque par exemple. Dans la sclérose en plaque, les cellules du système immunitaire sont dérégulées et attaquent la myéline qui recouvre les axones du système nerveux central, provoquant une démyélinisation et un dysfonctionnement neurologique (Dobson et al. 2019). Cela induit une inflammation stérile, le système immunitaire cherchant entre autres à éliminer les débris de myéline. En effet, dans cette pathologie, les lymphocytes T sont activés de manière inappropriée puis ils migrent dans le système nerveux central en passant la BHE. Là, ils contribuent aux lésions du SNC *via* la production de granzymes et de perforines. De plus, ils sécrètent des cytokines pro-inflammatoires et des chimio-attractants tels que l'IL-17 et l'IL-16 qui vont permettre d'activer entre autres, les lymphocytes B et les monocytes. Les lymphocytes B vont sécréter des auto-anticorps dirigés contre la myéline, ce qui participe à la cytotoxicité dépendante des anticorps et aux lésions du complément. Quant aux monocytes, ils sont impliqués dans la phagocytose des débris cellulaires et de la myéline endommagée. En parallèle, la microglie et les macrophages produisent des molécules neurotoxiques telles que le TNF- $\alpha$ , des ROS et des espèces réactives de l'azote comme le NO, qui accentuent l'inflammation. Enfin, les astrocytes peuvent favoriser l'inflammation innée et la neurodégénérescence dans cette pathologie par l'expression de cytokines (IL-6, TNF- $\beta$ ) et de chimiokines (CCL2). Cette accumulation de cellules immunitaires, de cytokines inflammatoires et de débris cellulaires dans le SNC conduit à la formation de lésions ou de plaques de démyélinisation qui perturbent la transmission des signaux nerveux, ce qui entraîne les symptômes de la sclérose en plaque (Rodríguez Murúa et al. 2022).

Pour étudier les mécanismes des réactions auto-immunes et tester des thérapies potentielles contre la sclérose en plaque, un modèle d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) a été développé. L'EAE est induite chez les animaux, généralement des souris ou des rats, en leur injectant des protéines ou des peptides de myéline ainsi qu'un adjuvant pour stimuler la réponse immunitaire. Cela provoque une réaction auto-immune chez les animaux, conduisant au développement de symptômes similaires à ceux observés dans la sclérose en plaque, notamment une paralysie, une altération de la fonction motrice et des troubles sensoriels (Constantinescu et al. 2011).

Cette réponse inflammatoire stérile est également un mécanisme clé mis en place suite à

une lésion de la moelle épinière. Dans cette pathologie, ce type d'inflammation contribue à la progression ou au développement de blessures secondaires (Chen et al. 2010). La blessure secondaire est indirecte : elle résulte de processus initiés par le traumatisme. Elle survient dans les heures et les jours suivant la blessure primaire et joue un rôle important dans les lésions cérébrales et la mort résultant du traumatisme. Cette blessure secondaire peut endommager les neurones qui n'ont pas été lésés lors de la blessure primaire (Kaur et al. 2018). Je reviendrai plus en détail sur ce mécanisme dans les paragraphes suivants.

## 2. LES LÉSIONS DE LA MOELLE ÉPINIÈRE

---

### 2.1. Définition

Le terme « lésion de la moelle épinière » fait référence à une lésion résultant ou non d'un traumatisme, bien que dans 90 % des cas, l'origine soit traumatique (OMS, 2013). La lésion traumatique de la moelle épinière est définie comme une lésion médullaire aiguë qui entraîne un degré variable de paralysie et/ou de troubles sensoriels en fonction du niveau médullaire et de l'étendue de l'atteinte (Kraus et al. 1975). Elle survient lorsqu'un impact physique externe tel qu'une blessure liée à un accident de la route, une chute, une blessure ou un coup provoque des dommages structurels à la moelle épinière, tandis qu'une lésion médullaire non traumatique résulte d'un processus pathologique aigu ou chronique, tel qu'une tumeur, un œdème (OMS 2013) ou la syringomyélie qui est caractérisée par la présence de cavités, appelées syrinx, remplies de liquide céphalo-rachidien dans la moelle épinière (Brodgelt et al. 2003).

### 2.2. Épidémiologie

Au niveau mondial, l'incidence des lésions de la moelle épinière est de 26,5 cas pour un million de personnes. La majorité est due à des causes évitables telles que les accidents de la route, les chutes ou la violence. Ces lésions touchent plus fréquemment les hommes (68,3 %) que les femmes. La majorité des cas sont des lésions cervicales (52,1%). Les accidents de la route sont la principale cause de toutes les lésions traumatiques et représentent 29,9 % des lésions, suivies par celles résultant des accidents du travail (29,8%). Les autres principales causes sont les chutes, et les blessures liées au sport (DeVivo 2012; Lenehan et al. 2012). Les impacts à haute énergie, tels que ceux liés aux accidents de la route et au sport, sont plus fréquents chez les personnes plus jeunes, tandis que les impacts à faible énergie, comme les chutes, se produisent beaucoup plus fréquemment chez les personnes de plus de 60 ans (Lenehan et al. 2012).

Bien que la survie des patients atteints de lésion traumatique se soit améliorée au fil du temps, le taux de mortalité reste élevé. Selon les estimations, la mortalité hospitalière aiguë varie de 4 % à 17 %, puis après la sortie de l'hôpital, le risque de décès reste plus important. Ce risque

de mortalité augmente avec l'âge du patient, la gravité des blessures et son niveau vertébral, les lésions médullaires cervicales étant associées à une mortalité plus élevée que les lombaires (National Spinal Cord Injury Statistical Center 2013). Cette gravité des blessures peut être évaluée à l'aide du score ASIA (association américaine des lésions de la moelle épinière).

Le score ASIA est un système utilisé pour évaluer les déficits neurologiques résultant de blessures à la moelle épinière, qu'elles soient traumatiques ou non. Il est basé sur un examen neurologique qui permet d'attribuer des notes aux fonctions motrices et sensorielles dans différentes parties du corps. Cela permet ensuite de classer la gravité de la lésion médullaire en six catégories, allant de la lésion complète (aucune fonction motrice ni sensorielle préservée en dessous du niveau de la lésion) jusqu'à la fonction normale (aucune perte de fonction motrice ou sensorielle), avec une échelle variable de lésions incomplètes entre les deux, en fonction du degré de préservation de certaines fonctions motrices ou sensorielles en dessous du niveau de la lésion (Schuld et al. 2016).

Ce score ASIA permet d'adapter la prise en charge des patients, mais bien que de nombreux traitements soient actuellement à l'essai, certains mécanismes impliqués dans l'inflammation induite par la lésion restent encore mal compris. Afin de pouvoir étudier cela, des modèles animaux de lésions de la moelle épinière ont été développés, parmi lesquels le modèle d'hémisection haute de la moelle épinière utilisé dans mon équipe.

### 3. MODÈLES DE NEURO-INFLAMMATION SPINALE : CAS DE LA LÉSION DE LA MOELLE ÉPINIÈRE

---

Il existe 3 grands types modèles de lésions cervicales chez le rongeur : des modèles de contusion, de compression ou de lésion (Gruner 1992; Pan et al. 2002; Scheff et al. 2003). Le modèle de contusion est induit soit par le lâché d'une tige d'un poids spécifique sur la surface de la moelle épinière pour induire une lésion de gravité définie, soit par un impacteur à pistolet à air comprimé (Marcol et al. 2012). Le modèle de compression se distingue du modèle de contusion car il implique une compression prolongée de la moelle épinière qui peut être réalisée à l'aide d'un clip d'anévrisme, d'une pince de forceps, ou par le gonflement d'un ballonnet inséré dans l'espace péri-dural (Joshi et al. 2002; Marques et al. 2009; Skinner et al. 2009). Les modèles de contusion et/ou de compression sont préférés, car la plupart des lésions médullaires humaines surviennent à la suite d'un traumatisme contondant de ce type, comme lors d'un accident de voiture. Le dernier type de modèle est celui de section de la moelle épinière, qui peut être réalisé à différents niveaux spinaux avec une étendue plus ou moins importante (Michel-Flutot, Bourcier, et al. 2022; Sharif-Alhoseini et al. 2017; Vinit et al. 2006).

Le modèle de neuro-inflammation que nous avons utilisé est un modèle de lésion de la moelle épinière par hémisection spinale haute au niveau de la deuxième vertèbre cervicale (C2) car il est très reproductible (Cheriyana et al. 2014), déjà développé dans mon laboratoire d'accueil (Keomani et al. 2014) et maîtrisé par l'étudiante en thèse avec qui j'ai collaboré pour les études portant sur cette partie : je centrerais donc mon introduction autour de ce modèle-ci.

Une hémisection de la moelle épinière correspond à la section partielle de celle-ci de manière sélective. Si l'hémisection cervicale est unilatérale sur la partie dorsale, elle permet la destruction précise du tractus corticospinal, ce qui entraîne une altération de la fonction motrice des membres (Zörner et al. 2010). L'hémisection cervicale peut également être faite de manière latérale (côté droit ou gauche) de la moelle épinière : dans ce cas, elle induit entre autres, des altérations des fonctions locomotrice, respiratoire (Keomani et al. 2014; Vinit et al. 2006, 2009) et cardiovasculaire, notamment à cause de la perte de la moitié des afférences sympathiques. Ce modèle permet d'étudier la récupération due à la compensation des afférences du côté

controlatéral à la lésion (Keomani et al. 2014). Les voies respiratoires descendantes proviennent du groupe respiratoire rostro-ventral situé au niveau du bulbe rachidien (Feldman et al. 2013). Il se connecte de manière bilatérale et monosynaptique au pool de motoneurones phréniques, au niveau des segments cervicaux C3 à C6 de la moelle épinière, qui innervent bilatéralement le diaphragme *via* le nerf phrénique (Feldman et al. 2013; Lipski et al. 1986; Vandeweerd et al. 2018). L'hémisection latérale au niveau du segment cervical C2 de la moelle épinière induit une déafférentation du pool de motoneurones phréniques correspondant, ce qui entraîne entre autre une paralysie immédiate de l'hémi-diaphragme du côté ipsilatéral à la lésion qui ne reçoit plus de signaux nerveux des motoneurones phréniques déafférentés (figure 23) (Vinit et al. 2006). Avec ce type de blessure, la présence d'une moelle épinière intacte controlatérale permet la survie des animaux (Keomani et al. 2014; Rana et al. 2021). Dans ce modèle, une récupération spontanée limitée de l'hémi-diaphragme du côté lésé peut être observée. Celle-ci est principalement due aux voies silencieuses connectées aux motoneurones phréniques déafférentés qui traversent la ligne médiane de la moelle épinière au niveau C3-C6 (Fuller et al. 2008; Goshgarian 2003; Porter 1895; Vinit et al. 2009), appelée phénomène phrénique croisé (PPC) (Fuller et al. 2006; Ghali 2017; Goshgarian 2003). Cependant, cette plasticité spontanée est trop faible pour contribuer à une récupération de la fonction ventilatoire significative après hémisection en C2 (Dougherty et al. 2012).

Une hémisection au niveau C2 n'induit pas d'effet sur la régulation par le système parasympathique car celle-ci provient du tronc cérébral et envoie des informations *via* les nerfs vagues et glossopharyngés (Hou et al. 2014). Dans les lésions de la moelle épinière supérieure, les activités parasympathiques restent intactes et vont dominer l'influence sympathique, dérégulant l'homéostasie entre les systèmes sympathique et parasympathique. Cette dérégulation entraîne une diminution de pression artérielle moyenne après l'hémisection en C2, avec une compensation complète 7 jours après la lésion. Néanmoins, après ce délai, la diminution d'éjection du ventricule gauche observée n'est pas compensée (Michel-Flutot, Mansart, et al. 2022).



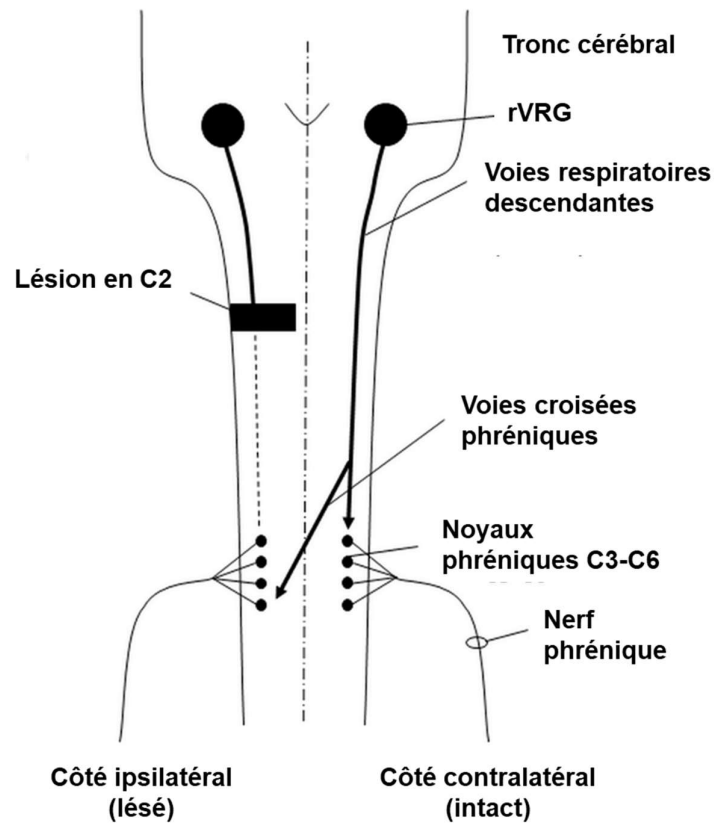


Figure 23 : Modèle d'hémisection spinale en C2.

L'hémisection latérale au niveau C2 interrompt les connexions nerveuses d'un côté (côté ipsilatéral) et permet d'étudier la récupération due à la compensation des afférences du côté contralatéral à la lésion. Une récupération spontanée limitée de l'hémiaphragme du côté lésé peut être observée : elle est principalement due au phénomène phrénique croisé (voies silencieuses connectées aux motoneurones phréniques déafférentés qui traversent la ligne médiane de la moelle épinière au niveau C3-C6).

L'hémisection spinale provoque des lésions tissulaires, des saignements, une axotomie, et de ce fait une neuro-inflammation de type stérile, car la chirurgie qui permet d'induire le modèle est réalisée dans des conditions stériles, et des antibiotiques sont administrés en post-opératoire. Cette neuro-inflammation va avoir de nombreux effets sur la cicatrisation et la récupération fonctionnelle éventuelle suite à la lésion.

## 4. LA NEURO-INFLAMMATION CONSÉCUTIVE À UNE LÉSION SPINALE

Un traumatisme spinal entraîne une série d'évènements organisés en deux phases successives : une blessure primaire consécutive à la lésion, puis des lésions secondaires caractérisées en 4 phases post-traumatiques qui se succèdent (aiguë, subaiguë, intermédiaire et chronique) (figure 24). L'inflammation après une lésion médullaire est complexe et orchestrée par de nombreux types de cellules et de cytokines inflammatoires.

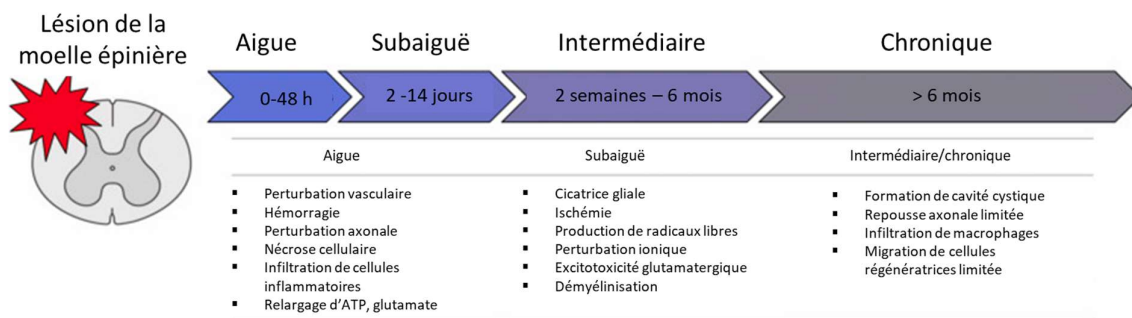


Figure 24 : Les 4 phases post-traumatiques suite à une lésion de la moelle épinière.

Suite à une lésion de la moelle épinière, il y a 4 phases qui se succèdent : aiguë, subaiguë, intermédiaire et chronique, avec des durées variables (Jeong et al. 2021).

La blessure primaire résulte de la lésion elle-même. Elle est la conséquence directe de la lésion, qui induit une atteinte à l'intégrité de la moelle épinière. Elle compromet les vaisseaux sanguins locaux, avec pour conséquence un œdème et une hémorragie qui vont endommager les tissus environnants (les cellules gliales, les neurones et leurs axones), et donc activer la microglie et provoquer une infiltration de neutrophiles. Cela induit une mortalité cellulaire, conduisant à la libération de molécules (cytokines pro-inflammatoires, DAMPs...) à l'origine de dommages secondaires (Gadani et al. 2015; Popovich et al. 1997). L'atteinte axonale (étirement, rupture, démyélinisation...) au niveau de la lésion entraîne une certaine paralysie de la musculature dénervée, ainsi qu'une perte de sensation et de contrôle moteur. Les projections axonales descendantes lésées ne peuvent plus innervier les pools de motoneurones sous le niveau de la lésion, tandis que les projections axonales ascendantes lésées ne peuvent plus fournir une

transmission adéquate des informations sensorielles (Ahuja et al. 2017). En parallèle, l'axotomie va être responsable d'une libération massive de neurotransmetteurs au niveau de la synapse, dont le glutamate qui, en excès, va induire une excitotoxicité du neurone post-synaptique *via* une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire. Ces ions calcium vont entraîner une augmentation des ROS produits par les mitochondries, ce qui contribue au maintien de l'inflammation (Görlach et al. 2015; Jia et al. 2015). Les DAMPs et les cytokines libérées activent la microglie locale et des cellules immunitaires circulantes systémiques qui pénètrent dans le tissu. La persistance de ce mécanisme déclenche ensuite une cascade de blessures secondaires qui entraînent une mort cellulaire et des dommages supplémentaires au cours des semaines suivantes (Gadani et al. 2015; Popovich et al. 1997). Bien que nécessaire dans un premier temps pour éliminer les débris cellulaires, cette réponse inflammatoire massive dans la phase précoce de la blessure, combinée à la rupture de la BHE, s'ajoute progressivement à l'œdème et aux dommages de la moelle épinière durant la phase subaiguë, qui s'étend de plusieurs jours à plusieurs semaines. Durant cette période, on observe la formation de thromboses et d'ischémies en lien avec les dommages vasculaires, ainsi qu'une astroglie (augmentation anormale du nombre d'astrocytes suite à la perte des neurones à proximité).

Le résultat final, correspondant à la phase chronique, est une cicatrice gliale produite notamment par les astrocytes. Ils sécrètent des protéoglycanes de chondroïtine sulfate (CSPG), qui sont initialement protecteurs en bloquant la propagation des DAMPs, mais qui finissent par interférer avec la régénération et l'extension du réseau neuronal, et causer une dégénérescence wallérienne (Donnelly et al. 2008). Cette perte d'intégrité des axones, leur rétractation et la démyélinisation liée à ce phénomène peuvent entraîner une perte de fonction dans les voies nerveuses situées en aval de la lésion. De plus, l'axotomie en lien avec le stress oxydatif, ainsi que la microglie et les astrocytes activés qui entretiennent l'inflammation dans un périmètre étendu autour de la lésion (Michel-Flutot, Efthimiadi, et al. 2022; Windelborn et al. 2012), limitent les possibilités de récupération cellulaire et fonctionnelle.

Les mécanismes présentés dans la première partie portant sur la réponse immunitaire et inflammatoire, qui ont été étudiés dans un contexte d'inflammation provoquée par injection de LPS, sont également valables pour cette neuro-inflammation d'origine stérile traumatique, avec également une implication des cytokines et des cellules immunitaires précédemment présentées comme les neutrophiles ou la microglie.

#### 4.1. Les cytokines

Les cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  sont libérées immédiatement après la blessure et induisent une augmentation de la perméabilité vasculaire qui contribue à la formation de l'œdème (Schnell et al. 1999). Un certain nombre d'autres substances vasoactives libérées par les cellules gliales et les leucocytes peuvent également jouer un rôle dans la formation de cet œdème. C'est notamment le cas des ROS (Z. Li et al. 2023; Unterberg et al. 1988), des protéases (Armao et al. 1997; Beladi et al. 2021), des histamines (Sarker et al. 1998), du NO (Brown et al. 2016; Nag et al. 2000) et de l'élastase (Kumar et al. 2018).

La libération de ces différents facteurs par les neutrophiles et la microglie activée peut provoquer une toxicité neuronale et gliale. De plus, des taux importants de TNF- $\alpha$  (Hermann et al. 2001; Lee et al. 2000) et d'IL-1 $\beta$  (Lu et al. 2005) provoquent une inflammation et dérèglent la libération de cytokines responsables de la mort des neurones et des oligodendrocytes. Des études ont d'ailleurs montré que le blocage du TNF- $\alpha$  ou de l'IL-1 $\beta$  confère une neuroprotection dans les modèles de traumatisme médullaire (Boato et al. 2013; Nestic et al. 2001; Sharma et al. 2003) ou cérébral (Akuzawa et al. 2008; Sanderson et al. 1999).

#### 4.2. Les cellules immunitaires

Suite à la libération des cytokines après un traumatisme spinal, il y a activation de la microglie résidente dans les minutes suivant cette lésion. Puis en quelques heures, les neutrophiles arrivent sur le site de la lésion et s'accumulent avant d'être rapidement éliminés au cours de la semaine suivante (figure 25). Les monocytes et les lymphocytes interviennent beaucoup plus tardivement, au bout de plusieurs jours post lésionnels (Donnelly et al. 2008).

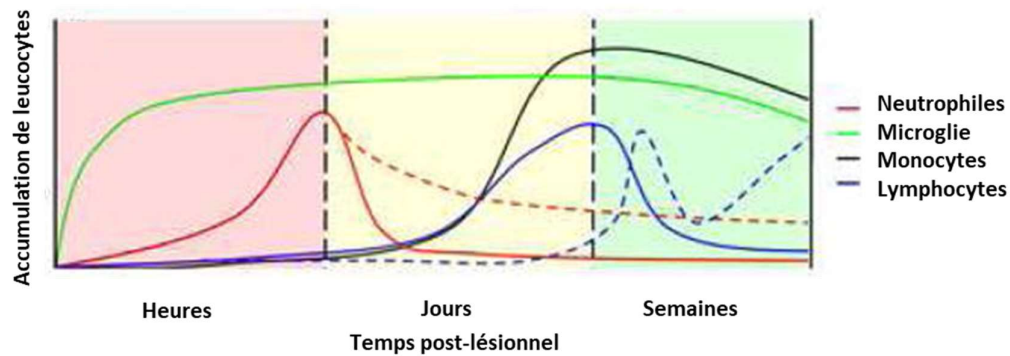


Figure 25 : Profil de la réponse inflammatoire à la suite d'une lésion de la moelle épinière. Activation de la microglie résidente (ligne verte) et accumulation intraspinale de leucocytes circulants. Les lignes en pointillés s'écartant des courbes pleines représentent les données des souris lésées tandis que les courbes pleines continues indiquent les données des rats lésés. Les courbes pleines avant ces points de rupture proviennent des deux espèces. Les valeurs à la verticale représentent les changements relatifs et ne sont pas à l'échelle. Adapté de (Donnelly et al. 2008).

#### 4.2.1. La microglie

Comme tous les macrophages, la microglie peut être classifiée selon les polarisations plutôt M1 ou M2. La microglie plutôt polarisée vers le phénotype M2 peut être qualifiée de neuroprotectrice, grâce à son rôle de surveillance régulière du SNC et en fournissant un soutien trophique aux neurones et aux autres cellules gliales (Colonna et al. 2017; Kreutzberg 1996; Nimmerjahn et al. 2005). En outre, la microglie et les macrophages dérivés des monocytes infiltrants produisent des cytokines neuroprotectrices (Colonna et al. 2017) telles que l'IL-10 ou le TGF- $\beta$ , et des facteurs de croissance. C'est par exemple le cas de TGF- $\beta$  produit par les macrophages après une blessure (Lagord et al. 2002; McTigue et al. 2000) qui a des effets bénéfiques sur les neurones. Des facteurs neurotrophiques comme la neurotrophine, le BDNF (facteur neurotrophique dérivé du cerveau) et le GDNF (facteur neurotrophique dérivé des cellules gliales), sont également synthétisés et libérés par les macrophages activés du SNC (Colucci-D'Amato et al. 2020; Hashimoto et al. 2005; Kerschensteiner et al. 1999; Nakajima et al. 2001, 2004). Ces facteurs neurotrophiques sont impliqués dans la survie des neurones existants. Ils favorisent aussi la croissance et la différenciation de nouveaux neurones et la mise en place des synapses.

La microglie plutôt polarisée vers le phénotype M1 produit des cytokines et des chimiokines

pro-inflammatoires, comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-6, l'IL-1 $\beta$  et l'IL-12. Elle exprime la NOX qui produit des ROS, et l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) qui produit du NO (Colonna et al. 2017; Nguyen et al. 2017).

La production des pièges extracellulaires dans le SNC est connue et a été montrée dans diverses pathologies comme dans le cas de tumeurs (Cools-Lartigue et al. 2013) ou lors des maladies neurodégénératives comme les maladies d'Alzheimer (Pietronigro et al. 2017) ou de Parkinson (Azevedo et al. 2012). Des études ont montré que ces pièges extracellulaires exacerbent les déficits neurologiques dans un modèle préclinique de traumatisme crânien. Récemment, la présence de ETs a été observée dans la moelle épinière de rat suite à une compression thoracique (Feng et al. 2021) mais sans identification claire des cellules produisant ces pièges. Il a été montré *in vitro* et *in vivo* que la microglie était capable de former des pièges extracellulaires qui pourraient être capables de capturer et détruire des bactéries : les MiETs (Agrawal et al. 2021; Eto et al. 2021; Wang et al. 2019). Cependant, la production de MiETs dans la moelle épinière n'a jamais été mise en évidence.

#### 4.2.2. Les lymphocytes

En ce qui concerne les lymphocytes, certains peuvent être réactifs aux constituants du SNC, principalement ceux qui reconnaissent et déclenchent des réactions contre les protéines de la myéline (von Büdingen et al. 2001; Constantinescu et al. 2011; Stinissen et al. 1997). Ces réponses auto-immunes amplifient l'activité des macrophages du SNC, entraînant des lésions de la BHE et une toxicité pour les oligodendrocytes et les neurones (Benveniste 1997; Schroeter et al. 2005). Cela provoque un œdème généralisé de la moelle épinière, une lésion axonale et par conséquent une perte de fonction. Cependant, les lymphocytes peuvent aussi être une composante importante de la réparation du SNC. En effet, les lymphocytes B et T peuvent sécréter le BDNF bénéfique pour les neurones (Kerschensteiner et al. 1999; Ziemssen et al. 2005).

#### 4.2.3. Les neutrophiles

Les neutrophiles sont les premières cellules immunitaires recrutées après une lésion de la

moelle épinière. Ils sont mobilisés au niveau du site lésé en quelques heures grâce aux chimiokines et cytokines pro-inflammatoires produites par les cellules résidentes et nouvellement recrutées par les DAMPS après le traumatisme initial (Zivkovic et al. 2021), et ils y culminent environ 24 heures après la lésion (Donnelly et al. 2008). Le rôle des neutrophiles recrutés est principalement la dégranulation et la phagocytose au niveau du site de la lésion (Zivkovic et al. 2021). Ces neutrophiles sécrètent également des cytokines pour recruter d'autres cellules immunitaires, et libèrent des protéases et des enzymes oxydatives impliquées dans les lésions tissulaires, notamment les ROS et la MPO (Nguyen et al. 2007).

Lors d'une étude dans un modèle de lésion de la moelle épinière chez le rat, une neuro-inflammation associée à une infiltration des neutrophiles produisant des NETs a été mise en évidence, ce qui aggrave l'œdème de la moelle épinière et l'apoptose neuronale. L'inhibition de la formation des NETs par l'inhibiteur de la PAD4, ou leur dégradation par la DNase-1, atténue la neuro-inflammation par une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires, réduit l'œdème et les dommages secondaires. Cela permet de limiter la formation de la cicatrice gliale et de favoriser la récupération fonctionnelle après une lésion médullaire (Feng et al. 2021), ce qui suggère l'implication de ces pièges extracellulaires dans les dommages secondaires suite à ce type de traumatisme.

### 4.3. Les astrocytes et la cicatrice gliale

Les astrocytes sont un autre type de cellules avec de nombreux rôles dans le SNC, dont la protection de celui-ci. Il s'agit de cellules gliales caractérisées par une forme en étoile, type cellulaire majoritaire du SNC. Les astrocytes fournissent une isolation physiologique essentielle et un soutien aux neurones *via* leur implication dans le métabolisme énergétique du système nerveux et un apport de nutriments. Ils participent également à la neurotransmission et à la détoxification du milieu extracellulaire. Leur importance physiologique a d'abord été sous-estimée. Cependant, au cours des dernières décennies, on a découvert que les astrocytes participaient non seulement largement aux activités biologiques du SNC en régulant notamment la BHE, la fonction synaptique et l'absorption du glutamate ( Füchtbauer et al., 2011 ; Haj-Yasein et al ., 2011 ; Murai et Pasquale, 2011 ; Min et Nevean, 2012 ; Murphy-Royal et al., 2015 ), mais jouaient également un rôle dans le développement de certaines pathologies, comme les maladies

neurodégénératives ou par exemple dans la sclérose en plaque durant laquelle les astrocytes affectent négativement la viabilité des motoneurons (Di Giorgio et al. 2007), les accidents vasculaires cérébraux et les lésions du SNC (Bradford et coll., 2009 ; Kuchibhotla et al., 2009 ; Wanner et al., 2013 ; Khakh et Sofroniew, 2015 ; Malik et al., 2020 ). Après un traumatisme de la moelle épinière, les astrocytes sont activés et certains d'entre eux prolifèrent rapidement pour former une bordure cicatricielle astrocytaire, appelée cicatrice gliale.

Cette cicatrice gliale se compose de matrices extracellulaires et de cellules, majoritairement des fibroblastes, des astrocytes et de cellules immunitaires telles que la microglie (Dias et al. 2018). Dans la phase précoce (figure 26), la formation de cette cicatrice gliale a une fonction protectrice. Elle permet d'isoler les molécules potentiellement nocives du reste des tissus sains, et de contrôler la propagation des dommages. Sa formation lors de la phase aiguë limite donc l'inflammation et préserve le tissu neuronal (Faulkner et al. 2004; Wanner et al. 2013).

Néanmoins, la cicatrice gliale est un phénomène complexe, considéré comme l'une des principales limites à la capacité de récupération. En effet, durant la phase chronique (au-delà de 14 jours après la blessure chez la souris), elle constitue le principal obstacle à la régénération axonale et à la récupération fonctionnelle (Ahuja et al. 2017; Karimi-Abdolrezaee et al. 2012; Silver et al. 2004), en créant à la fois une barrière physique pour la réparation neuronale et une inhibition chimique par la sécrétion de molécules inhibitrices de la matrice extracellulaire (Gu et al. 2019). Elle est composée de deux parties : la partie fibreuse et la partie gliale. La cicatrice fibreuse, qui occupe le centre de la lésion avec des dépôts de matrice de collagène, est principalement composée de fibroblastes dérivés de cellules méningées et périvasculaires (Göritz et al. 2011; Yuan et al. 2013). Les fibroblastes et les astrocytes sécrètent des composants de la matrice extracellulaire qui comprennent la fibronectine, le collagène et la laminine, ainsi que la famille des CSPG. Ils participent à la formation de la barrière physique de la cicatrice gliale (Cregg et al. 2014; Tang et al. 2003). Ces derniers peuvent aussi être produits par les cellules mononucléées du sang périphérique. Lors de la formation aiguë de la cicatrice gliale, l'expression des CSPG participe à la réduction de l'étendue des dommages, mais leur exposition prolongée est préjudiciable à la récupération fonctionnelle car ils sont connus pour être les principaux inhibiteurs de la régénération axonale et de la remyélinisation au cours de la phase chronique suite à une lésion de la moelle épinière (Alizadeh et al. 2019; Pendleton et al. 2013). En effet, ces CSPG forment une barrière physique qui rend difficile la croissance des axones en régénération dans la zone lésée



(Siebert et al. 2014). Ils induisent un effondrement des cônes de croissance (Jin et al. 2018), ou encore peuvent activer des voies de signalisation telles que celle de RhoA/ROCK (Monnier et al. 2003). L'activation de ces voies peut entraîner des modifications cytosquelettiques des neurones qui inhibent la croissance axonale. En plus des fibroblastes, de la microglie et des astrocytes, la cicatrice gliale est également formée de précurseurs d'oligodendrocytes NG2+, de péricytes et de cellules épendymaires (Adams et al. 2018).

Ensemble, ces types cellulaires et les molécules qu'ils produisent contribuent à la formation de la cicatrice gliale. Ils participent à la création d'une barrière physique et à l'expression de molécules qui entravent la repousse des axones et la récupération fonctionnelle après la lésion (Adams et al. 2018; DiProspero et al. 1997).

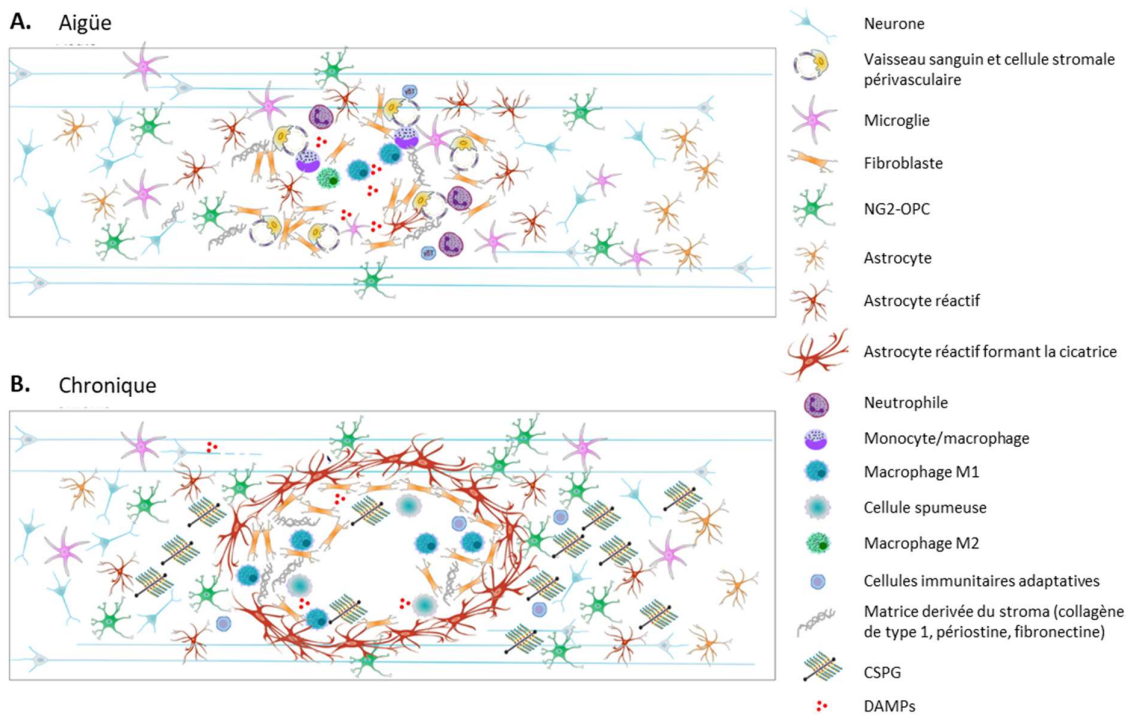


Figure 26 : La cicatrice gliale.

La formation de la cicatrice gliale est divisée en deux phases : la phase aiguë, au cours de laquelle il y a libération d'une importante quantité de DAMPs qui entraînent une activation des cellules immunitaires (microglie, astrocytes...); puis la phase chronique au cours de laquelle les macrophages et la microglie sont plutôt orientés vers un phénotype pro-inflammatoire, aboutissant à une inflammation persistante. Cette inflammation à long terme ainsi que les CSPG inhibent les processus de régénération et de neuroplasticité à long terme. Adapté de (Bradbury et al. 2019).

## 5. MODULATION NON-INVASIVE DE LA NEURO-INFLAMMATION : CAS DE LA STIMULATION MAGNÉTIQUE TRANSCRÂNIENNE

---

Il existe différentes approches de pistes de thérapies qui sont en cours d'exploration afin d'améliorer la prise en charge des patients atteints d'une lésion de la moelle épinière, notamment dans le but de moduler cette neuro-inflammation. Plusieurs sont à l'étude sur des modèles précliniques. Une de ces approches consiste en la digestion des CSPG par la chondroïtinase ABC qui induit une modulation de l'inflammation dans la moelle épinière lésée de rat. Elle est accompagnée d'une altération du phénotype des macrophages présents en favorisant leur polarisation en macrophages M2 réparateurs au détriment des macrophages M1 pro-inflammatoires dans un modèle de contusion (Bartus et al., 2014). Elle est associée à une réponse anti-inflammatoire médiée par l'IL-10 et est donc plutôt pro-réparatrice (Didangelos et al., 2014).

Une autre thérapie qui permet de moduler la neuro-inflammation est la greffe de cellules souches (C. Yang et al. 2017), qui a montré des effets bénéfiques dans des modèles précliniques de lésions de la moelle épinière chez le rat. Cela a pour conséquence une diminution de la production de ROS (López-Vales et al. 2004) et de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$  (C. Yang et al. 2017), le TNF- $\alpha$  (Nicola et al. 2016) et l'iNOS, ainsi qu'une augmentation de la production d'IL-10 (Zhang et al. 2017). La stimulation vagale est également une option de traitement à l'étude. Dans un modèle de compression de la moelle épinière, elle est associée à une réduction de la formation de la cicatrice gliale, à une diminution de la production de facteurs pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-6) et à une augmentation de l'expression des facteurs anti-inflammatoires (IL-10). De plus, il a également été montré que cette stimulation vagale permettait d'induire un phénotype plutôt M2 chez la microglie (H. Chen et al. 2022).

Enfin, une technique a quant à elle déjà été testée sur l'Homme après traumatisme spinal (Wincek et al. 2021) : il s'agit de la stimulation magnétique transcrânienne (TMS) qui est une technique prometteuse car non invasive et largement utilisée en clinique pour traiter d'autres pathologies du SNC lorsqu'elle est appliquée de manière répétée (rTMS), mais qui semble avoir un intérêt thérapeutique dans la cadre d'une lésion de moelle épinière. La TMS est une forme non invasive de stimulation cérébrale dans laquelle un champ magnétique est utilisé pour provoquer

un déplacement de charges ioniques et finalement induire un courant électrique dans une zone spécifique du SNC. Un générateur d'impulsions électriques (stimulateur) est relié à une bobine en cuivre qui produit un champ magnétique de haute intensité à partir d'un courant qui la traverse. Si la stimulation induite atteint le seuil de dépolarisation, elle provoque une dépolarisation de ces neurones qui va à son tour dépolariser les neurones connectés et induire une contraction musculaire (Grunhaus et al. 2002). Cette contraction, appelée potentiel évoqué moteur (PEM), est enregistrable et reflète la capacité du signal nerveux à être transmis à partir du premier neurone dépolarisé jusqu'au muscle enregistré.

Lorsque cette stimulation est appliquée de façon répétée (rTMS), elle est utilisée dans le cadre de la neuromodulation des réseaux neuronaux. Il s'agit d'une méthode non invasive et indolore, déjà utilisée en clinique pour traiter de nombreux troubles comme la dépression (Jaššová et al. 2019; Martin et al. 2017), le stress post traumatique (Yan et al. 2017), l'anxiété et les troubles bipolaires (Kozel 2018). C'est aussi un outil thérapeutique potentiel dans les modèles précliniques de troubles cognitifs (Q. Ma et al. 2019; Wang et al. 2013). Cette technique a des effets neuromodulateurs sur les circuits neuronaux : plusieurs études ont montré une diminution de l'inflammation suite à la rTMS (Kobayashi et al. 2003; Ziemann et al. 2008), notamment avec une modulation de la production de cytokines ou un changement de polarisation de la microglie M1 vers le phénotype M2 lors de douleurs neuropathiques (Toledo et al. 2021), de dépression chronique (Zuo et al. 2022) ou d'ischémie. En ce qui concerne les lésions de la moelle épinière, la rTMS semble aussi moduler la neuro-inflammation : dans un modèle préclinique de lésion spinale, un tel traitement a permis une diminution de l'expression des marqueurs de l'apoptose et de la mort neuronale, tandis que ceux de la croissance axonale et de la prolifération neuronale augmentaient (Chalfouh et al. 2020). Dans un modèle de compression de la moelle épinière, c'est une diminution de la densité des astrocytes et de la microglie qui a été observée (Aftanas et al. 2018). D'un point de vue fonctionnel, la rTMS a également permis d'améliorer la récupération locomotrice dans des modèles de compression (Marufa et al. 2021; Poirrier et al. 2004) ou de contusion de la moelle épinière (Krishnan et al. 2019). Elle a aussi permis une restauration sensorimotrice dans des modèles de contusion (Ellaway et al. 2014; Petrosyan et al. 2017).

Une compréhension plus approfondie des voies de signalisation moléculaire régulées par la rTMS après une lésion de la moelle épinière pourrait donc aider à exploiter ses effets bénéfiques potentiels en tant qu'intervention thérapeutique, afin de moduler l'inflammation résultant d'une

lésion de la moelle épinière.

## **OBJECTIFS DE RECHERCHE**

---

Mon travail doctoral porte principalement sur l'implication des pièges extracellulaires (ETs) dans la neuro-inflammation induite par infection ou par traumatisme médullaire.

Bien que l'inflammation puisse avoir des origines différentes, certains mécanismes de la réponse immunitaire mis en jeu sont communs, comme la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires, l'implication des neutrophiles et des macrophages, et la production de pièges extracellulaires par ces cellules immunitaires. Ces structures sont composées de chromatine et de protéines cellulaires qui permettent de capturer et dégrader les agents pathogènes afin de limiter la propagation de l'infection. D'abord décrits chez les neutrophiles, l'existence de ces pièges extracellulaires a récemment été démontrée chez de nombreux autres types de cellules immunitaires tels que les macrophages, la microglie et les monocytes par exemple.

Cet intérêt pour ces structures antimicrobiennes fait suite aux recherches que j'ai entreprises au début de ma thèse sur l'intérêt thérapeutique d'une modulation de la réponse du SNA au cours du sepsis à travers l'utilisation de  $\beta$ 1-bloquants adrénergiques. Responsable de millions de morts par an, cette pathologie voit émerger régulièrement de nouvelles thérapeutiques faisant suite à des découvertes intéressantes dans d'autres maladies. Les premières recherches prometteuses sur ce traitement potentiel ont été réalisées voici environ 20 ans, mais elles n'ont jamais expliqué clairement les mécanismes mis en jeu.

Dès les premiers mois de ma thèse, j'ai donc participé à une étude qui visait à les expliquer en se basant sur des modèles précliniques reproduisant au mieux les caractéristiques connues du sepsis humain, mais aussi les effets protecteurs des  $\beta$ 1-bloquants sélectifs sur la fonction des organes et la survie. L'analyse microarray qui a été réalisée nous a permis d'émettre l'hypothèse qu'une modulation des réponses immunitaires et inflammatoires pouvait expliquer cet effet positif des  $\beta$ 1-bloquants. Suite à ces résultats, nous avons étudié plus particulièrement les activités des neutrophiles, car ce sont les premières cellules recrutées, et présentes en nombre important. Si le traitement permettait de moduler plusieurs activités des neutrophiles, son effet sur la production de pièges extracellulaires nous a paru majeur au vu de la grande reproductibilité des résultats obtenus sur ce paramètre.

Les effets des  $\beta$ 1-bloquants sur la production de ETs que nous avons observés ne se limitaient pas à la circulation sanguine, mais étaient également retrouvés dans des tissus comme le tissu cardiaque. Nous avons donc émis l'hypothèse que ce processus pouvait également se

dérouler au sein du système nerveux, qui présente d'importantes dysfonctions au cours du sepsis, avec notamment des troubles neuromusculaires. Nos résultats ont mis en évidence que ces pièges étaient bien formés au sein du SNC et qu'un traitement par  $\beta$ 1-bloquants améliorait la fonction neuromusculaire grâce à une diminution de la production d'ETs.

Cette étude a été menée dans un modèle endotoxinique hyper-inflammatoire, avant d'être reproduit sur le modèle CLP (ponction et ligation caecale), reconnu comme présentant une inflammation plus progressive et représentative du sepsis humain. Nos résultats ont permis de mettre en évidence que les troubles neuromusculaires semblent majoritairement induits par les MiETs indépendamment de l'inflammation, comme nous avons pu le montrer avec l'emploi d'un inhibiteur sélectif des ETs : le sivelestat. Ces MiETs sont eux-mêmes induits par l'activation de la microglie suite à l'infiltration de neutrophiles, indiquant l'existence d'un lien indirect entre les MiETs et les troubles neuromusculaires.

L'inflammation et la réponse immunitaire ne sont pas forcément associées à une infection et à la présence d'agents pathogènes : elles sont également retrouvées dans des modèles stériles comme lors de pathologies auto-immunes, ou de traumatismes comme lors d'une lésion de la moelle épinière. Dans la suite de mon projet de thèse, nous avons donc centré nos recherches sur un modèle d'inflammation stérile après lésion de la moelle épinière afin de déterminer si les mêmes mécanismes sont mis en jeu lors d'une inflammation d'origine infectieuse ou d'origine plutôt stérile, en particulier la production de ETs. Nous avons mis en évidence que les neutrophiles et la microglie étaient capables de former des ETs dans ce modèle d'hémisection cervicale haute de la moelle épinière chez la souris, ce qui n'avait jamais été montré avant la publication de notre travail. Mais à l'inverse d'une infection systémique, cette production est limitée au site de la lésion.

Au cours de ces différentes études, nous avons montré non seulement un effet positif des  $\beta$ 1-bloquants adrénergiques sur différentes fonctions d'organes et le système neuromusculaire à travers une modulation des ETs dans un modèle infectieux. Nous avons également montré des similitudes entre les modèles infectieux et stérile concernant la réponse immunitaire et notamment la production de ETs. Dans le modèle d'inflammation stérile de la moelle épinière, nous aurions donc pu moduler les réponses inflammatoires et immunitaires à l'aide  $\beta$ 1-bloquants pour étudier leurs effets sur la récupération fonctionnelle, mais nous avons choisi une autre approche qui est déjà utilisée en clinique en tant que traitement thérapeutique non invasif de

plusieurs pathologies comme lors de douleurs neuropathiques chroniques qui sont liées à une neuro-inflammation : il s'agit de la stimulation magnétique transcrânienne (TMS). Appliquée de façon répétée et localisée, à l'inverse d'un traitement par  $\beta$ 1-bloquants, elle pourrait être une piste de traitement pour moduler la neuro-inflammation afin d'améliorer la récupération suite à une lésion. Dans un modèle de lésion spinale, nous avons donc appliqué un protocole de traitement chronique (rTMS) qui nous a permis d'observer une réduction de l'inflammation : la rTMS aurait donc un effet anti-inflammatoire et pourrait contribuer à la neuroplasticité. Cependant, cette modulation de l'inflammation n'a pas apporté de réels bénéfices sur la récupération fonctionnelle, mais elle a tout de même permis une accélération de la récupération spontanée.



# RÉSULTATS

---

## LISTE DES PUBLICATIONS PRÉSENTÉES DANS LES RÉSULTATS

---

Par ordre de présentation :

1. Gasser A, Glatiny S, De Montmollin E, Fayssoil, Pawlik A, **Bourcier CH**, Aboab J, Annane D, Mansart A.

*$\beta$ 1-adrenergic blockers provide organ protection in sepsis through neutrophil modulation.*

En préparation : une analyse des voies de signalisation impactées par l'administration de  $\beta$ 1-bloquant au niveau des neutrophiles reste à effectuer avant soumission de l'article.

2. **Bourcier CH**, Michel-Flutot P, Emam L, Adam L, Gasser A, Vinit S, Mansart A (2023)

*$\beta$ 1-adrenergic blockers preserve neuromuscular function by inhibiting the production of extracellular traps during systemic inflammation in mice.*

Frontiers in immunology. 2023 Sep 22. doi.org/10.3389/fimmu.2023.1228374

3. **Bourcier CH**, Adam L, Emam L, Vinit S, Mansart A.

*Microglia extracellular traps produce neuromuscular dysfunction during sepsis in mice*

En cours de rédaction.

4. Michel-Flutot P, **Bourcier CH**, Emam L, Gasser A, Glatigny S, Vinit S, Mansart A (2022).

*Extracellular traps formation following cervical spinal cord injury.*

Eur J Neurosci. 2022 Dec 19. doi: 10.1111/ejn.15902.

5. Michel-Flutot P, Jesus I, Vanhee V, **Bourcier CH**, Emam L, Ouguerroudj A, Lee KZ, Zholudeva LV, Lane MA, Mansart A, Bonay M, Vinit S (2022).

*Effects of Chronic High-Frequency rTMS Protocol on Respiratory Neuroplasticity Following C2 Spinal Cord Hemisection in Rats.*

Biology (Basel). 2022 Mar 19;11(3):473. doi: 10.3390/biology11030473.

## 1. MÉCANISMES D'ACTION DES $\beta$ 1-BLOQUANTS AU COURS DU SEPSIS

---

Publication :

Gasser A, Glatiny S, De Montmollin E, Fayssoil, Pawlik A, **Bourcier CH**, Aboab J, Annane D, Mansart A.

*$\beta$ 1-adrenergic blockers provide organ protection in sepsis through neutrophil modulation.*

En préparation : une analyse des voies de signalisation impactées par l'administration de  $\beta$ 1-bloquant au niveau des neutrophiles reste à effectuer avant soumission de l'article.

Le système nerveux autonome est passé en quelques années d'une structure neurologique à un système de régulation cellulaire étendu à la plupart des cellules de l'organisme. Il est aujourd'hui admis que son influence ne se cantonne pas au seul contrôle de la fonction cardiovasculaire, mais qu'il est également capable de moduler le fonctionnement de la plupart des cellules, notamment des cellules immunitaires. Des études ont montré que cette activité était notamment régulée par la voie  $\beta$ -adrénergique.

La stimulation  $\beta$ -adrénergique chronique entraîne la production de cytokines telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 et l'IL-1 $\beta$ , tandis que le blocage sélectif des récepteurs  $\beta$ 1 exerce une action anti-inflammatoire systémique, réduisant les niveaux de ces cytokines dans le sang et les tissus. En parallèle, les effets cardioprotecteurs des  $\beta$ 1-bloquants dans le sepsis ont été démontrés dans des études expérimentales, conduisant à l'amélioration de l'efficacité cardiaque et à la restauration de la contractilité du ventricule gauche. Cependant, les mécanismes par lesquels les  $\beta$ 1-bloquants exercent leurs effets protecteurs ne sont pas clairs.

Dans cet article, nous avons, dans un premier temps, évalué les effets de  $\beta$ 1-bloquants sélectifs sur la fonction des organes et la survie en utilisant un modèle endotoxinique et un modèle de ligature et ponction caecale, puis nous avons cherché à caractériser les mécanismes expliquant les bénéfices observés de ce traitement. Concernant la réponse immunitaire innée, nous nous sommes concentrés sur les neutrophiles, qui constituent la première ligne de défense contre l'infection et jouent un rôle essentiel dans le déclenchement de la réponse inflammatoire, ainsi

que sur la production de pièges extracellulaires des neutrophiles (NETs) impliqués dans la pathogenèse de lésions d'organes aigus telles que celles observées dans le choc septique.

Nos résultats ont démontré un effet bénéfique du traitement sur la survie. À une concentration réduisant la fréquence cardiaque d'environ 10 %, cet effet était corrélé à la préservation des fonctions d'organes étudiées. Nous avons mis en évidence une modulation spécifique de la transmigration endothéliale, associée à une modération de l'inflammation des neutrophiles. Nous avons également montré une réponse plus appropriée de ces cellules, avec notamment une diminution de la production des NETs suite à l'administration de  $\beta$ 1-bloquants, suggérant un effet direct de ce traitement sur cette production. En conclusion, notre étude suppose que les effets positifs des  $\beta$ 1-bloquants sur la survie et les fonctions d'organes pourraient s'expliquer par une modulation de l'activité des neutrophiles, et en particulier de la production de NETs.

**B1-ADRENERGIC BLOCKERS PROVIDE ORGAN PROTECTION IN SEPSIS THROUGH NEUTROPHIL MODULATION**

Adeline GASSER,<sup>1</sup> Simon GLATIGNY,<sup>1</sup> Etienne DE MONTMOLLIN,<sup>1</sup> Abdallah FAYSSOIL,<sup>2</sup> Alexandre PAWLIK,<sup>1</sup> Camille H. BOURCIER,<sup>1</sup> Jérôme ABOAB,<sup>1,3</sup> Djillali ANNANE,<sup>1,3,4\*</sup> Arnaud MANSART<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup>University of Paris-Saclay, UVSQ, INSERM U1173, 2I, Montigny-le-Bretonneux, France. <sup>2</sup>University of Paris-Saclay, UVSQ, INSERM U1179, END-ICAP, Montigny-le-Bretonneux, France. <sup>3</sup>Department of Intensive Care, Hôpital Raymond Poincaré (APHP), <sup>4</sup>FHU SEPSIS (Saclay and Paris Seine Nord Endeavour to Personalize Interventions for Sepsis), RHU RECORDS (Rapid rEcognition of CORTicosteroid resistant or sensitive Sepsis), Garches, France

**Corresponding author:** Arnaud MANSART

INSERM U1173 (équipe LARENES)

Université de Versailles Saint Quentin en Yvelines/ Paris-Saclay

2 Avenue de la source de la Bièvre

78180 Montigny-le-Bretonneux, France

Telephone : +33 170 42 94 14

Email address : [arnaud.mansart@uvsq.fr](mailto:arnaud.mansart@uvsq.fr)

**Authorship note:** DA and AM are co-senior authors.

**Conflict of interest:** The authors have declared that no conflict of interest exists.

**ABSTRACT**

Sepsis is one of the leading causes of death worldwide, and no therapy is available other than intensive care treatments. Drug development attempts have mainly focused on controlling inflammation or treating dysfunction, without significant improvement in the last decades. Recently, interest has emerged in  $\beta$ 1-adrenergic blockade, which has proved beneficial to both parameters. Unfortunately, the specific underlying mechanisms have not been addressed yet. This study aimed to investigate on rodent septic models the effects of  $\beta$ 1-adrenergic blockers currently used in intensive care units. The results demonstrated a beneficial effect of treatment on survival. This beneficial effect was correlated with preservation of organ functions at a concentration reducing heart rate by approximately 10%. A specific modulation of endothelial transmigration, associated with more appropriate neutrophil response and tempering of inflammation, explains these effects. An effect on neutrophil extracellular traps, a physical barrier that prevents the spread of microbes and involved in acute organ injuries, was particularly observed.

Keywords: sepsis,  $\beta$ 1-adrenergic blockers, inflammation, immune cells, organ function, diapedesis, extracellular traps

**MAIN TEXT**

## INTRODUCTION

Sepsis, one of the leading causes of patient admission to intensive care units, is characterized by the association of infection and systemic inflammatory response syndrome (1). While our understanding of this pathology is increasing, controversies in cardiovascular management are non-negligible (2). Sepsis guidelines recommend catecholamine administration, but their negative effects at high concentrations are known (3). Interestingly, the administration of  $\beta$ 1-adrenergic blockers has emerged as a possible treatment to limit the negative effects of excessive stimulation, and beneficial effects on patient survival (4, 5) have been observed.

The  $\beta$ -adrenergic system is a powerful modulator of cardiovascular function (6) but also acts as an immune function regulator. Chronic  $\beta$ -adrenergic stimulation leads to the production of cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$ , whereas selective  $\beta$ 1 blockade exerts a systemic anti-inflammatory action, reducing the levels of these cytokines in both blood and tissue (7). The cardioprotective effects of  $\beta$ 1-blockers in sepsis have been demonstrated in experimental studies, leading to the improvement of cardiac efficiency and the restoration of left ventricular contractility (7). However, contradictory results have been published (8), and the mechanisms by which  $\beta$ 1-blockers exert their protective effect are unclear.

Rather than activating new signaling pathways, we hypothesized that selective  $\beta$ 1-blockers further modulate the response to infection. This modulation would prevent complete dysregulation of systems and at the same time erratic response. To test this hypothesis, we (1) evaluated the protective effects of selective  $\beta$ 1-blockers on organ function and survival using endotoxemic and cecal ligation and puncture models and (2) characterized the reasons for these protective effects on the heart. Our focus was on neutrophils, which are the first line of defense against infection and critical in initiation of the inflammatory response, and on the production of neutrophil extracellular traps (NETs), involved in the pathogenesis of acute organ injuries such as observed in septic shock.

## RESULTS

 **$\beta$ 1-adrenergic blockers improve survival**

Using a lethal dose of LPS (75 mg/kg, IP), a single administration of atenolol (0.1 mg/kg, IP) 6 hours post endotoxin injection significantly increased the survival time from  $29.2 \pm 1.4$  to  $35.9 \pm 2.3$  hours ( $p < 0.05$ , by log-rank test). Despite this improved survival time, no significant difference was found in the overall mortality. A similar profile was observed using esmolol administered 6 hours post LPS injection at a concentration of 10 mg/kg/h ( $29.2 \pm 1.4$  to  $34.9 \pm 1.6$  hours;  $p < 0.05$ , by log-rank test). At these concentrations, atenolol reduced heart rate by  $10.1 \pm 3\%$  and esmolol by  $9.7 \pm 2.8\%$  in control mice.

Using a sublethal dose of LPS (22 mg/kg, IP), 90% of animals died with a survival time of  $37.9 \pm 2.9$  hours. A significant increase in the overall survival was observed in the LPS+atenolol and LPS+esmolol groups compared to the LPS group (20% and 30% respectively *versus* 90% of mortality,  $p < 0.01$ ) at 5 days (Figure 1). These concentrations of  $\beta$ 1-blockers did not induce a significant effect on arterial pressure or heart rate until 6 hours post LPS administration (Supplemental Table 1). At this time, arterial pressure was decreased by  $11.6 \pm 3.4\%$  in the LPS group compared to the control group ( $p < 0.01$ ).

Importantly, in an independent model of sepsis, a CLP model, these beneficial effects of atenolol or esmolol on survival were confirmed ( $28.9 \pm 2.2$  hours *versus*  $47.7 \pm 2.5$  hours or  $45.8 \pm 1.6$  hours, respectively;  $p < 0.0001$ , by log-rank test for both comparisons).

 **$\beta$ 1-adrenergic blockers preserve cardiovascular performance**

Organ dysfunction leads to animal death in sepsis. Thus, increasing survival should be associated with improved organ function. Transthoracic ultrasound measurements demonstrated no significant effect of a sublethal dose of LPS on anatomic heart parameters 22 hours post injection in mice (Table 1). LPS-induced endotoxemia had no significant effect on left ventricular ejection fraction within 6 hours post injection but significantly decreased left ventricular ejection fraction from  $64.7 \pm 1.9\%$  to  $33 \pm 2.8\%$  ( $p < 0.001$ ) at 22 hours (Figure 2). This reduction was not observed in the LPS+atenolol group. Similarly, cardiac output, mean arterial pressure, and heart rate were impaired in the LPS group and preserved in the LPS-treated group 22 hours post LPS injection. A single



administration of atenolol had no significant effect on cardiovascular parameters 16 hours post administration compared to the control group.

Simultaneously, a part of kidney and liver functions were studied. In the kidney, the glomerular filtration rate of LPS-induced endotoxemia animals were significantly decreased 22 hours post injection ( $1,17 \pm 0,09$  mL/min *versus*  $0,41 \pm 0,06$  mL/min respectively,  $p < 0,01$ ). The administration of atenolol partially preserved this parameter in LPS-treated animals ( $0,41 \pm 0,06$  mL/min *versus*  $0,67 \pm 0,07$  mL/min respectively,  $p < 0,05$ ). In the liver, LPS induced a marked decrease of indocyanine green clearance, whereas the clearance was partially preserved in the LPS+atenolol group. 100 % of the injected indocyanine green solution was eliminated of the blood within 5 minutes against  $68,93 \pm 2,89$  % for LPS group and  $82,95 \pm 2,99$ % for LPS+atenolol group ( $p < 0,05$  LPS vs LPS+atenolol groups). These improvements in tissue clearances and cardiac performance were correlated with a decrease of lactate concentration in the LPS+atenolol group compared to the LPS group (Table 1).

#### **$\beta$ 1-adrenergic blockers modulate gene expression**

To determine the mechanisms behind the beneficial effect of  $\beta$ 1-blocker treatment during sepsis, a microarray experiment was performed on mice. Four experimental groups were studied in this analysis: lethal LPS/saline *versus* lethal LPS/esmolol and saline/saline *versus* saline/esmolol. Each microarray chip contained 45,220 spots, of which 1,649 were used as controls; 202 (4.5%) presented hybridization problems and 245 were replicated 10 times as a reproducibility test. In the saline group, 48 genes were down-regulated by esmolol (of which 36 had a known function in the HGNC system), and 29 genes were up-regulated (19 in HGNC). In the LPS group, 1,843 genes were down-regulated (1,242 in HGNC), whereas 2,114 genes were up-regulated (1,365 in HGNC). Gene set enrichment analysis was performed on the different sets of up- and down-regulated genes for each experimental condition. In the saline group, despite the lack of a septic insult, esmolol administration resulted in a significant ( $p < 0,05$ ) enrichment of down-regulated genes in the functional gene groups "immune response" (Gene Ontology GO: 0006955), "chemotaxis" (GO: 0006935), "chemokine activity" (GO: 0008009), and "cytokine activity" (GO: 0005125). No significant enrichment of up-regulated genes was found for the control group. In the

LPS group, esmolol significantly down-regulated numerous genes involved in inflammatory responses, cytokine production, and the regulation of the activation of several immune cell types (Table 2).

To confirm the results obtained in the LPS group and potentially extrapolate to humans, a similar analysis was performed on a CLP model. In this second sepsis model, 428 genes were down-regulated (321 in HGNC) and 141 genes were up-regulated (87 in HGNC). Esmolol administration significantly down-regulated genes involved in local inflammatory responses and immune cell activation and several groups of genes involved in chemotaxis, leukocyte migration, and endothelial transmigration.

Based on our GSEA data, we specifically analyzed, gene-by-gene, the esmolol-induced modulation of the expression levels of the cytokines, chemokines, and proteins involved in leukocyte adhesion and endothelial transmigration. Numerous chemokine genes were significantly regulated by esmolol in the LPS and CLP models, including CCL-2 (MCP-1), CCL-5, CCL-11, CCL-19, CXCL-2 (MIP-2), CXCL-5, CXCL-9, CXCL-10, and CXCL-11. On analysis of the "adhesion and endothelial transmigration" functional group, we found that esmolol significantly down-regulated the expression of adhesion molecules involved in the different steps of endothelial transmigration, including P-selectin and E-selectin (Supplemental Table 2).

#### **Esmolol reduces inflammatory response**

Using microarray, the administration of esmolol demonstrated a beneficial effect on inflammatory response using LPS (lethal model) or CLP models. However, the effects of treatment on RNA expression observed previously had to be confirmed on protein expression. In the heart, levels of the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  increased significantly in the LPS group compared to the control group, whereas the administration of esmolol significantly reduced IL-6 concentration in the LPS+esmolol group, as expected Supplemental Table 2. In the CLP model, all cytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, and TNF- $\alpha$ ) concentrations were increased compared to the sham group or CLP+esmolol group. This beneficial effect of treatment was not limited to the heart. Serum levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , and IL-10 increased significantly in the LPS group compared to the control group. All cytokine concentrations were significantly lower in the LPS+esmolol group compared to the LPS group. Importantly, similar results were obtained after esmolol treatment in the CLP model (Figure 3).

In the heart, as expected Table 3, the chemokine (MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , and MCP-2) concentrations were significantly increased in the LPS group compared to the LPS+esmolol group, but no significant variation was observed using the CLP model (Supplemental Figure 2).

#### **Esmolol preserves heart architecture**

Excessive inflammation leads to disruption of the normal tissue architecture. Therefore, a significant effect of esmolol on tissue under the lethal LPS model should be observed. Indeed, heart sections from control mice showed normal architecture of cardiac myocytes with centrally placed nuclei. LPS showed disorganization of the myofibrils, with loss of striation, focal degenerating myocytes, moderate infiltration of leukocytes, and vascular dilatation and congestion 22 hours post LPS administration. The LPS+esmolol group showed moderate disorganization of the myofibrils with mild to moderate infiltration of leucocytes (Figure 4).

#### **$\beta$ 1-adrenergic blockers modulate immune response**

Besides inflammatory response, analysis of the different leucocytes presents in the heart demonstrated a significant increase of neutrophil concentration in the sublethal LPS group compared to the control group (Figure 5A), as suggested by hematoxylin and eosin staining analysis. This result implies a more important migration of these immune cells through the endothelium. However, a similar increase in neutrophil concentration was observed in the blood, associated with an increase of GM-CSF and G-CSF concentrations (Figures 5B and 5C). Following atenolol administration, the concentration of neutrophils was slightly lower in the blood and higher in the heart of LPS-treated animals, suggesting a better migration again following atenolol treatment (Figure 5A). Importantly, a single injection of atenolol did not affect neutrophil concentration, or GM-CSF and G-CSF concentrations, suggesting a specific effect of sepsis setting on these parameters.

The hypothesis of better diapedesis in the LPS+atenolol group compared to the LPS group was confirmed by analysis of molecules involved in the migration. Sublethal LPS injection had a negative effect on E-selectin and

P-selectin concentrations and a positive effect on ICAM-1 and VCAM-1 concentrations (Figure 6) in the heart compared to the control group, whereas atenolol treatment preserved the production of E-selectin and P-selectin after LPS administration. Atenolol alone did not affect E-selectin, P-selectin, ICAM-1, and VCAM-1 concentrations in the heart.

The administration of LPS also increased ICAM-1 soluble in the blood compared to the control group with or without atenolol (control:  $164.9 \pm 26.77$ ; LPS:  $902.8 \pm 126.6$ ; LPS+atenolol:  $839.1 \pm 140.4$  ng/mL).

In addition to endothelial parameters, diapedesis is modulated by leucocytes themselves. MMP-9 implicated in the vascular basement membrane was further cytosolically distributed in control and atenolol animals. An increase in MMP-9 immunofluorescence in cytosolic and membrane compartments was observed in the LPS group, whereas this metalloprotease was more membrane-associated in the LPS+atenolol groups, suggesting an increase in neutrophil diapedesis (Figure 6E and 6F).

An increase in neutrophil diapedesis suggests higher activity of neutrophils. This activity can be measured through various mechanisms: degranulation, phagocytosis, or generation of NETs. If the results obtained for degranulation did not indicate a specific effect of atenolol on this parameter (Supplemental Figure 3), NET formation is significantly modulated by the treatment. These NETs are involved in the pathogenesis of acute organ injuries such as observed in septic shock. In the heart, NET formation was strongly enhanced in the LPS group ( $p < 0.001$  versus control) and significantly reduced on treatment with atenolol (Figure 7B). As a control, a single administration of atenolol to naïve animals did not induce massive NET production, as evaluated by both production of MPO and expression of citrullinated H3. Similar results were obtained in the blood ( $p < 0.05$ ; Figure 7C) or using the CLP model (CLP:  $23.5 \pm 0.08$  % versus CLP+atenolol:  $12.5 \pm 0.08$  %,  $p < 0.05$ ). Furthermore, PMA stimulation demonstrated a decrease in neutrophil response in the LPS group compared to the control group, whereas the response was significantly higher in the LPS+atenolol group (Figure 7D), suggesting that neutrophils were more activated or more immature in the LPS group compared to the LPS+atenolol group.

## DISCUSSION



The main findings of the present study are that, in different experimental models of septic shock, selective  $\beta$ 1-adrenergic blockers such as atenolol and esmolol, at a dose that does not decrease significantly heart rate, improved survival and preserved organ function. These benefits effects were associated with a specific modulation of endothelial transmigration, associated with more appropriate neutrophil response and tempering of inflammation.

Administration of a short-acting  $\beta$ 1-blocker in clinical trials has shown a reduction in 28-day sepsis mortality (4, 9). Similar results have been obtained in experimental models. However, others have demonstrated negative effects of  $\beta$ 1-blockers on survival (8). Our study shed light on this variability by investigating the concentration and timing of the injection. We showed that the injection early on (up to 8 hours) and at a low dose (with approximately 10% reduction of heart rate) was associated with beneficial effects by improving organ function. In contrast, high doses or late injection of  $\beta$ 1-blockers were associated with poor prognosis, leading to an increase in death in the animals. Our findings also demonstrated that  $\beta$ 1-blockers at a low concentration preserved cardiovascular function. These results, not involving a massive reduction of heart rate despite  $\beta$ 1-blocker administration, have already been observed. One explanation could be better regulation of energy expenditure. The adrenergic response to sepsis induces a hypermetabolic state characterized by increased hyperglycemia, lipolysis, and proteolysis (10). Others have demonstrated an improvement in oxygen utilization by the myocardium or enhancement of intrinsic cardiac contractility and vascular responsiveness to catecholamines (11). However, the dysfunction is not limited to the heart. Although the cardiovascular system is the most commonly affected, the severity of organ dysfunction is an important determinant of prognosis in sepsis (12). A majority of patients have lung and liver dysfunction and deteriorating renal function (13). Our endotoxemic model reproduced these dysfunctions, and a beneficial effect of atenolol not limited to the heart was observed. These effects, particularly on renal function, raise questions about the negative effects of  $\beta$ -blockers on insulin resistance. This treatment with  $\beta$ -blockers has been involved in diabetes onset or worsening diabetes control, despite the fact that  $\beta$ 1-receptors are predominantly expressed in the heart. This suggests that  $\beta$ 1-selective drugs are less likely to interfere with the secretion and regulation of insulin. Moreover, some studies have shown that such specific treatments could increase insulin sensitivity instead of reducing insulin resistance (14). The

positive effect on the clearance of insulin might be explained by an improvement in cardiac output, which directly influences the glomerular filtration rate, and modulation of the immune response, as explained later. Similar explanations could be proposed for indocyanin green clearance.

Patients with sepsis have an exaggerated pro-inflammatory and anti-inflammatory response, the severity of which is related to outcome (15). In our study, the addition of atenolol or esmolol at a low dose was associated with modulation of inflammation at the systemic and cardiac levels, as already observed (7, 8, 16). Consequently,  $\beta$ 1-blockers may act at two levels: at the tissue level without interference with heart rate and more systemically on the regulation of the immune response through their direct anti-inflammatory properties. In addition to these anti-inflammatory properties, our results obtained on immune cells showed a positive effect on neutrophils. Neutrophils are the first line of defense against pathogens and one of the main cell types involved in the initiation of the inflammatory response. These cells are involved in cell debris clearance and essential for protection against infection. During sepsis, inadequate recruitment of neutrophils to the site of infection has been largely reported (17). Delayed apoptosis associated with a dysregulation of neutrophil activity (18) has also been observed. This impairment in neutrophil function has been proposed to underlie the increased incidence of sepsis, but few studies have extensively investigated this relationship.

Increased circulating neutrophil concentration is associated with immature neutrophil release in infectious diseases (19). Only mature neutrophils are normally released from the bone marrow. However, during stress conditions such as sepsis, the release of circulating catecholamines, GM-CSF, and G-CSF significantly increase the number of circulating neutrophils (20), as observed. This immature neutrophil release might result in less-efficient bacterial clearance and eventually lead to more inadvertent tissue destruction (21). Immature neutrophils are less effective than mature ones at promoting innate immune defenses (22). Besides maturation status, circulating neutrophils have a short half-life but can survive up to several days in tissue. This extended half-life can be allowed by the presence of inflammatory mediators such as GM-CSF and participate in this uncontrolled inflammation. These characteristics were reproduced in our endotoxemic sepsis model, and atenolol administration has demonstrated beneficial effects both on GM-CS and G-CSF parameters and therefore by deduction on the release of neutrophils from the bone marrow. This beneficial effect of  $\beta$ 1-adrenergic blockade on the amount of exogenous catecholamines release has also been observed by others (11, 23).

Four distinct phases of neutrophil diapedesis have been described: mobilization, margination and rolling, adherence, and transmigration through the vessel. At least part of these phases are altered during sepsis (24), and neutrophils isolated from septic patients show reduced migration (25). Severe infection modulates margination and rolling with reduced deformability and sequestering in the vessels during sepsis. Capillary bed sequestration further leads to vascular occlusion and promotes tissue ischemia and organ dysfunction (26). If pro-inflammatory cytokines enhance neutrophil migration (27) through increased expression of endothelial adhesion molecules or activation of endothelial cells (28, 29), this effect is reduced in case of simultaneous increase of the GM-CSF concentration in the blood. Similarly, GM-CSF enhances neutrophil migration across unstimulated endothelium, but it inhibits neutrophil migration across IL-1-activated endothelium (30), probably by reducing neutrophil rolling. This hypothesis was confirmed in our endotoxemic model, with a significant reduction of E-selectin and P-selectin concentrations in the heart blood vessels. All these negative effects were reduced in the LPS-treated mice, with decreased concentrations of GM-CSF, G-CSF, pro-inflammatory cytokines, and preservation of E-selectin and P-selectin compared to the LPS group. Besides the selectin-dependent transient rolling, firm adhesion is mediated by the binding of leukocyte integrins to their endothelial ligands through integrins such as ICAM-1 and VCAM-1. In contrast to selectins, integrin expression levels were increased in the LPS group. These results suggest a potential concentration-dependent effect of LPS on selectins and integrins, as observed by Yan J *et al.* (31). Moreover, the increase of heart ICAM-1 concentrations in the LPS and LPS-treated groups was also correlated with an increase in soluble ICAM-1. This last result suggests a side effect of this soluble integrin on leukocyte transmigration in our model. LFA-1 interacts with ICAM-1 or ICAM-1 soluble levels. Thus, even activated neutrophils could stay in the blood, linked to soluble ICAM, instead of going through the endothelial cells, but this hypothesis is challenged. Animals that were LPS-treated by atenolol presented a high level of soluble ICAM-1, like the LPS group, but better neutrophil transmigration.

Other groups have reported possible negative effects of  $\beta$ 1-blocking agents on leukocyte transmigration, but atenolol or esmolol seem to present particular effects. Weisdorf has already demonstrated that atenolol increased neutrophil migration (32). This result and ours could be explained by the absence of negative effects of atenolol or esmolol on chemotaxis, as suggested by Dunzendorfer and Wiedermann and our results, the

opposite to metoprolol or propranolol (33). Better selectivity compared to other adrenergic antagonists ( $\beta_1/\beta_2$ -selectivity ratio: atenolol: 35/1; esmolol: 33/1; metoprolol: 20/1; propranolol: 1/2) (34) could explain these results. Moreover, a supplementary specific effect of atenolol was observed on MMP-9. This metalloprotease is believed to be centrally important for the degradation of vascular basement membranes during neutrophil extravasation and migration, and gelatinase inhibitors decreased neutrophil migration by 50% (35). If LPS increased MMP-9 concentration without selectivity in neutrophil localization, LPS+atenolol results demonstrated a specific distribution to the membrane without increased production.

In recent years, accumulating evidence has shown that neutrophils possess great functional diversity. Direct antimicrobial activity by neutrophils occurs within phagosomes, but the involvement of neutrophils in the innate immune response to infection extends to extracellular responses. NETs are considerably important when studying diseases such as sepsis. This extracellular response has been shown to entrap bacteria, fungi, and viruses (21) and reduce bacterial spread (36). Antimicrobial structures consisting of extracellular chromatin enhanced with granular and cytoplasmic proteins, such as myeloperoxidase (MPO) and citrullinated histones (H3), are also present. In addition to their antimicrobial function, NETs act as a physical barrier that prevents the spread of microbes, allowing the maintenance of a high concentration of antimicrobial agents in a restricted area (37).

The beneficial role of NETs during infection has been clearly shown because deficiency in NET production (38) or the destruction of NETs by DNases leads to increased susceptibility to infection (39). Nevertheless, studies have demonstrated that high NET formation in intravascular beds causes endothelial damage, leads to patterns of organ dysfunction that are the hallmark of septic shock (40), and decreases survival in CLP models, even using only H3-like markers of NET formation (41). H3, the most abundant proteins in NETs, could generate thrombin during sepsis through inhibiting anticoagulants and trigger platelet activation, leading to thrombosis and pro-coagulant responses (42). H3 are also cytotoxic to endothelial cells (43). Thus, the destruction of endothelial cells activates the intrinsic clotting system through exposure of subendothelial collagen and activates the extrinsic coagulation system. NET formation was well increased in our endotoxemic model of sepsis, and the results demonstrate that the frequency of MPO<sup>+</sup>/H3<sup>+</sup> was decreased in LPS mice treated by atenolol compared to other LPS mice, suggesting a direct effect of treatment on NET formation. This significant decrease suggests



a reduction in negative effects of antimicrobial proteins and beneficial effects on intravascular coagulation or microvascular perfusion, as described by McDonald (44). In addition, we observed an increase in neutrophil response to PMA in the LPS-treated group compared to the LPS group, showing better reactivity of neutrophils following atenolol administration or a decrease in immature neutrophil concentration in the blood.

In tissue, excessive stimulation of neutrophils is believed to be responsible for the development of multiple organ failures during sepsis (45). Xu *et al.* showed that the concentration of H3 histones was increased in an experimental monkey model of sepsis. This increase was accompanied by the onset of acute renal failure. A high level of H3 has also recently been shown to be associated with sepsis severity and mortality in a mouse model of LPS-induced sepsis shock (46). Although weak pre-existing evidence exists linking the action of  $\beta$ 1-adrenergic blockers to neutrophils in tissue, the association between neutrophil and microvascular obstruction is negated in metoprolol-treated acute myocardial infarction patients. Metoprolol inhibits neutrophil–platelet interactions by targeting neutrophils (47). Consequently, the tissue vascularity is not impaired. Thus, the decrease in MPO<sup>+</sup>/H3<sup>+</sup> in LPS treated by atenolol could reduce organ injury and improve survival, as suggested in a model of pneumonia (48).

#### *Limits of the study and interest for humans*

Animals receiving LPS or CLP are models that have displayed the typical patterns of septic shock. All animals were resuscitated after creation of the models to mimic the setting usually observed at the bedside. Catecholamines were not administered to avoid any interference with the adrenergic system. Low concentrations of anesthetic were deliberately used to minimize the impact of anesthesia on organ function. The concentration of  $\beta$ 1-blockers was determined to limit significant effects on cardiovascular parameters such as heart rate and arterial pressure. These choices avoided subsequent interpretation of the results.

$\beta$ 2-adrenergic receptors are usually the most expressed on immune cells and are regarded as the main receptors mediating the immune effects of catecholamines, although other subtypes, such as  $\beta$ 1-adrenergic receptors, have also been described (49). Human neutrophils were reported in the 2000s to be devoid of  $\beta$ 1-adrenergic receptors, but this suggestion has been challenged directly by our results (Supplemental Figure 4) and others in

the 2010s (47,49,50). Moreover, authors have reported that  $\beta$ 1-blockade could modulate neutrophil migration even in the presence of  $\beta$ -adrenergic receptor agonists (33).

During experimental septic shock, a low dose of short-acting or long-lasting  $\beta$ 1-blockers such as esmolol or atenolol, which do not induce a significant reduction in heart rate, was associated with beneficial organ effects. These improvements appear to be related to inflammatory, immune, and endothelial modulations. Neutrophils are particularly involved in this process. To date, no therapeutic strategy has aimed to reduce neutrophil count in sepsis, presumably because the presence of too many circulating neutrophils during infection is assumed to be better than too few. Our results suggest a beneficial modulation of these immune cells in low-dose administration. On top of safety and efficacy concerns, the dosage at which  $\beta$ 1-blockade should be performed is crucial. Consequently, these findings offer new significant insights into the approach to prescribing  $\beta$ 1-blockers during septic shock and in the design of future clinical trials.

## METHODS

### Animals

Adult male Swiss and C57BL/6 mice (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France; 24–36 g body weight) and adult male Wistar rats (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France; 200–310 g body weight) were acclimated on arrival at a constant temperature (22 °C) and exposed to a 12–12-hour light–dark cycle for a minimum of 7 days before any experimentation was performed. They were maintained in a pathogen-free environment with access to food and water *ad libitum* during the experimental procedure.

### Sepsis models and treatments

The experimental endotoxemic model was induced by intraperitoneal (IP) injection of a sublethal dose of LPS (22 mg/kg, *Escherichia coli* O55:B5, Sigma-Aldrich). For survival, cytokine production, microarray, and histology study, an additional lethal dose at 48 hours (75mg/kg, IP) was included. All the animals were resuscitated with

30 mL/kg body weight of saline administered subcutaneously. For survival, cytokine production, microarray, and NET formation, a second sepsis model was induced by cecal ligation and puncture (CLP). After abdominal incision, the cecum was ligated and punctured with a 21-gauge needle, and a small amount of fecal matter was released. After the cecum was returned to the abdomen, the mice were resuscitated with 30 mL/kg body weight of saline administered subcutaneously. The control for the LPS group consisted of animals receiving an equivalent IP injection of saline. The control for the CLP group (sham animals) consisted of a group of animals that underwent a simple extraction and manipulation of the cecum without ligation or puncture before returning it to the abdomen. The mortality of CLP animals was 100% at 2 days.

Atenolol (Mylan, France) was administered 6 hours post LPS injection. At this time, arterial pressure was decreased by  $11.6 \pm 3.4$  % in the LPS group compared to the control group ( $p < 0.01$ ). Except for the survival study (reinjection every 24 hours of the same concentration), a single injection of this long-acting selective  $\beta_1$  blocker was investigated. Esmolol (Baxter, France), a short-acting selective  $\beta_1$ -blocker, was administered via continuous infusion (10 mg/kg/h) through a right jugular central venous catheter. The esmolol dose was chosen based on reports showing the maximum cardioprotective effect at a dose reducing cardiac frequency by less than 20% (7,51). Continuous infusion was provided by an osmotic pump (ALZET®, Durect Corporation, Cupertino, CA, USA) inserted under the skin on the back of the animal.

The CLP and osmotic pump were performed under gaseous anesthesia using isoflurane (Forene®; Abbott) at a concentration of 5% for induction in a chamber at 500 cc/min in 100% oxygen. The isoflurane concentration was subsequently reduced to 1.5–2% (balanced with 100% O<sub>2</sub>) for maintenance during surgery. Mice were maintained at  $37.5 \pm 0.5$  °C using a heating pad. The osmotic pump and venous catheter were inserted at the time of sepsis onset. Due to a delay in reaching the optimal osmotic pump flow, effective esmolol administration was achieved  $5.9 \pm 1.3$  hours ( $n=10$  animals) after sepsis onset.

#### **Experimental protocol**

First, based on the efficient concentrations for atenolol (Supplemental Table 1) and esmolol, we compared the effects of these  $\beta_1$ -blockers on survival using CLP, sublethal (22 mg/kg, IP) and lethal (75 mg/kg, IP) LPS models. Second, we analyzed the effect of atenolol on cardiovascular parameters. These analyses were

performed on mice using the sublethal LPS model. Third, we evaluated by a microarray technique the effects of esmolol on the myocardium of mice using both lethal LPS and CLP models. Based on microarray results and after analysis of inflammation, we developed a flow cytometry–based protocol that allowed direct quantification and analysis of immune cells using sublethal LPS and CLP models and atenolol. Simultaneously, we evaluated endothelial and blood parameters in connection with diapedesis. All these measurements were taken from distinct samples.

#### **Determination of effective concentration**

Swiss mice were treated with 1 µg/kg, 10 µg/kg, 0.1 mg/kg, or 1 mg/kg of atenolol 0, 1, 6, 8, or 22 hours post LPS injection to evaluate the effects of these doses on heart rate and mean arterial pressure in control and endotoxemic animals (Supplemental Table 1).

Mice were anesthetized with isoflurane (1.5–2%, balanced with 100% O<sub>2</sub>; Forene®, Abbott). They were maintained at 37 °C using a heating pad. The left carotid artery was cannulated, and mean arterial pressure and heart rate were continuously monitored using a disposable pressure transducer (AD Instruments, France). Atenolol was administrated IP, and values were recorded for 30 minutes post injection.

#### **Survival study**

Swiss mice were randomized into 12 groups of 10–12 animals: saline/saline, saline/atenolol (0.1 mg/kg, IP), LPS (22 mg/kg, IP)/atenolol (0.1 mg/kg, IP), LPS (22 mg/kg, IP)/saline, LPS (75 mg/kg, IP)/atenolol (0.1 mg/kg, IP), LPS (75 mg/kg, IP)/saline, saline/esmolol (10 mg/kg/h, IV), LPS (75 mg/kg, IP)/esmolol (10 mg/kg/h, IV), sham/saline, sham/esmolol (10 mg/kg/h, IV), CLP/esmolol (10 mg/kg/h, IV), and CLP/saline. Mice were housed in groups of 5–6 per cage and given access to food and water *ad libitum*. Survival was assessed at least every 4 hours for 120 hours.

#### **Cardiovascular parameters**

Heart parameters were evaluated using a high-resolution ultrasound system (LOGIQ E9; GE, France) and a linear L8-18i probe (GE, France) at high frequency (18 MHz). All Swiss mice were anesthetized with isoflurane (Forene®; Abbott, France) at a concentration of 5% for induction in a chamber at 500 cc/min in 100% O<sub>2</sub>. The isoflurane concentration was subsequently reduced to 1.5–2% for maintenance during handling and ultrasound. Each animal's anterior thorax and upper abdomen was shaved with depilatory cream before exploration. Then, the animal was placed in the supine position on the imaging platform, and body temperature was continuously monitored using a rectal probe and maintained at  $37.5 \pm 0.5$  °C. Ultrasound gel was applied to the chest of the mouse before measurements.

The LV end-diastolic diameter, end-diastolic posterior wall thickness, and end-diastolic interventricular septal wall thickness were measured using the leading-edge convention of the American Society of Echocardiography from M mode. The left ventricular end-diastolic diameter was measured from an M-mode short-axis view of the left ventricle at the papillary muscle level. Left ventricular shortening fraction and left ventricular ejection fraction (LVEF) were calculated from M mode. Aortic velocity integral (VTI) was recorded during the procedure from Doppler echocardiography. Mitral inflow Doppler pattern was recorded (peak E, peak A, mitral deceleration time) from a four-chamber apical view. Cardiac output was defined as stroke volume x heart rate. All these analyses were performed on each animal at 0, 1, 6, 16, and 22 hours post model creation. For arterial pressure and heart rate measurements, a catheter was then inserted in the right carotid artery. Arterial pressure was monitored continuously using a disposable pressure transducer (AD Instruments, France). The depth of anesthesia was confirmed by the absence of any response to toe pinch.

#### **Kidney and liver functions**

To evaluate these functions, the experiments were performed on rats using the LPS model (5 mg/kg, IP). Due to the requirement of large blood and urine volumes, the use of mice was impossible.

#### *Kidneys*



To evaluate renal filtration, we determined glomerular filtration rate (GFR) through inulin clearance. Before the analyses, each animal was anesthetized with an IP injection of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). The animal was placed in the supine position, and body temperature was continuously monitored using a rectal probe and maintained at  $37.5 \pm 0.5$  °C. After a laparotomy through a small midline incision, a urinary bladder catheter was positioned. Two others were inserted into the right jugular vein for IV injection of inulin solution (inulin 10 mg/kg + mannitol 1 g/kg body weight) and the left carotid artery for blood samplings. After a 10-minute acclimation period, inulin solution was injected (0.1 mL/min) for 20 minutes, and urine output was collected for the last 10 minutes. 250  $\mu$ L of blood was then sampled from the arterial catheter. Inulin concentration was determined in the plasma and urine using the anthrone method (52).

#### *Liver*

These analyses were performed on rats depending on technical constraints using the LPS model (5 mg/kg, IP). Before the analyses, each animal was anesthetized with an IP injection of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). Under monitoring for body temperature (holding at  $37.5 \pm 0.5$  °C), two catheters were inserted into the right jugular vein for IV injection of indocyanin green (ICG) solution (1 mg in 500  $\mu$ L of 0.1M phosphate-buffered saline, pH 7.4) and the left carotid artery for blood sampling. After a 10-minute acclimation period, fresh ICG solution was injected as a bolus into the jugular vein. Repeated blood samples (0.1 mL each) were then taken from the carotid artery for 10 minutes. Serum was separated, and the optical density was measured by spectrophotometer (Tecan, France) at 815 nm. The amount of ICG in the test samples was calculated from a standard curve (54).

#### **Hematoxylin and eosin stain**

Histological heart injury of C57BL/6 mice was analyzed in the control, LPS (75 mg/kg, IP) and LPS (75 mg/kg, IP) + esmolol (10 mg/kg/h, IV) groups. The sublethal LPS model (22 mg/kg, IP) did not show significant disorganization of the myofibrils or congestion 22 hours post LPS administration. The heart from each mouse was rapidly removed and fixed in freshly prepared 10% neutral buffered formalin, processed routinely, and

embedded in paraffin. Sections were cut 5  $\mu\text{m}$  in thickness. The sections were stained with hematoxylin and eosin for histopathological examination. All sections were investigated using a light microscope (Aperio® AT2, Leica, France).

#### Microarray analysis

Total RNA was isolated and purified from a 30-mg sample of the heart (RNeasy Kit, Qiagen, France) from six groups of eight C57/BL6 mice, depending on the sepsis model and the treatment. The groups studied were LPS/saline (75 mg/kg, IP), CLP/saline, LPS (75 mg/kg, IP)/esmolol (10 mg/kg/h, IV) and CLP/esmolol (10 mg/kg/h, IV). Complementary DNA (cDNA) was obtained from the original messenger RNA (mRNA) by reverse transcription and then hybridized onto a microarray chip according to the manufacturer's specifications (Whole Mouse Genome Microarray, Agilent, USA). One microarray chip was used for each model (LPS, CLP, LPS/esmolol, and CLP/esmolol), and the difference was determined in the expression levels of genes between LPS *versus* LPS-esmolol and CLP *versus* CLP-esmolol. Each microarray chip evaluated 41,000 different genes. We used the gene nomenclature established by the Human Genome Organization. If known, the gene function was retrieved from the HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) system. The complete array dataset and the experimental protocol were deposited in the NCBI's Gene Expression Omnibus and are accessible through the 

GEO	Series	accession	number	GSE31175

 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE31175>). Gene set enrichment analysis (GSEA) was performed on the microarray data to search for sets of related genes following the same trends in the dataset and discover biologically relevant themes in the lists of genes identified as significantly differentially expressed. GSEA was performed with ToppGene Suite online software (55) ([toppgene.cchmc.com](http://toppgene.cchmc.com)). The data were analyzed for biological themes using the gene ontology cellular compartment, molecular function, and biological process provided by the NCBI (56).

#### Bioplex assay for cytokines

For serum protein assays from C57BL/6 mice, the levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-10 were measured using the Bio-Plex Protein Array system according to the manufacturer's instructions (BioRad, France) in the

19

saline/saline, LPS (75 mg/kg, IP)/saline, saline/esmolol (10 mg/kg/h, IV), and LPS (75 mg/kg, IP)/esmolol (10 mg/kg/h, IV) groups. In brief, this is a multiplexed, particle-based, flow cytometric assay that enables the quantification of several cytokines and chemokines in a sample volume as small as 15  $\mu$ L and is equivalent in principle to performing multiple enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) simultaneously.

For myocardial protein analysis, a 40-mg sample of myocardium was mechanically removed, and proteins were extracted (Qproteome Mammalian Protein Preparation Kit, Qiagen, Les Ulis, France). The protein concentration was then assessed by multiplex bead-based assay.

#### **Flow cytometry**

After euthanasia of Swiss mice, cardiac blood was collected in EDTA-coated tubes, and the organs were perfused with PBS/EDTA (2mM, pH 7.4). Then, 100  $\mu$ L of whole blood was centrifuged at 1,500 rpm for 5 minutes. The pellet was washed, lysed twice in ACK buffer (150mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10mM  $\text{KHCO}_3$ , 0.1mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ), and resuspended in RPMI medium containing 10% fetal calf serum. The heart was cut into small pieces in 2.5 mg/mL collagenase solution, digested for 20 minutes at 37 °C, filtered, washed in PBS1X, and resuspended in RPMI medium. Blood and heart cell suspensions were then washed in 96-well plates at 2,000 rpm for 2 minutes, and pellets were suspended in complete RPMI. All samples were activated or not for 3 hours in phorbol myristate acetate (PMA, 50 ng/mL) before surface staining with Fixable Viability Dye eFluor 780 (Thermofisher) followed by fluorochrome-conjugated antibodies (30 minutes at 4 °C). Anti-rabbit allophycocyanin (APC; Abcam), Pacific Blue anti-mouse CD11b (BioLegend), AF700 anti-mouse I-A/I-E (BioLegend), PE/Cy7 anti-mouse Ly6G (BioLegend), BV510 anti-mouse CD45 (BioLegend), PerCP/Cy5.5 anti-mouse Ly6C (BioLegend), PE anti-mouse MPO (CliniScience), and PE-Texas Red rabbit anti-citrullinated Histone H3 (Abcam) were used to identify neutrophils and NETs. After washing in PBS, data were acquired using an LSR Fortessa flow cytometer (BD Biosciences, France) and analyzed with FlowJo.10 software. The exemplifying of neutrophils gating strategy is provided Supplemental Figure 1.

#### **Immunofluorescence: confocal microscopy**



After euthanasia of Swiss mice, blood was collected in EDTA-coated tubes and centrifuged before lysing by ACK lysis buffer (150mM NH<sub>4</sub>Cl, 10mM KHCO<sub>3</sub>, 0.1mM Na<sub>2</sub>EDTA). Cells were stained with PB anti-mouse CD11b antibody (BioLegend) and AF647 anti-mouse Ly6G antibody (BioLegend) for 15 minutes, filtered, isolated by double positive CD11b<sup>+</sup>/Ly6G<sup>+</sup> stain with FACS Aria III Cell Sorter (BD, France), and fixated in 4% paraformaldehyde (PFA) for 20 minutes at room temperature. Neutrophils were labeled with the cell surface membrane of live cells CellBrite Fix-640 Membrane Stains (Biotium, 30089), then MMP-9/Gelatinase primary antibody (abcam, ab38898) and AF488 secondary antibody in 0.1% BSA/0.1% Triton/PBS. Immuno-stained cells were mounted on a glass slide using ProLong Diamond Mounting Medium with DAPI (Sigma), and the images were captured using a White Light Laser Confocal Microscope SP8-X (Leica, France) at 63x magnification under oil immersion.

#### **Biochemical analyses by western blot**

Swiss mice were sacrificed and perfused with PBS/EDTA (2mM, pH 7.4) before tissue collection. Organs were harvested and immediately frozen in liquid nitrogen; 15–20 mg of tissue samples were homogenized in Precellys® Evolution in a lysis RIPA buffer consisting of 50mM Tris/HCl, pH 7.2, 150mM NaCl, 1% (v/v) Triton X-100, 0.5% (w/v) CHONa, 0.1% (w/v) SDS, 2mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 25mM β-glycerophosphate, and 10mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (Invitrogen), containing a phosphatase and protease inhibitor cocktail. Homogenized samples were centrifuged for 10 minutes at 13,200 rpm and 10 °C to obtain protein extracts. Protein concentration was determined with BCA protein assay (Biorad) according to the manufacturer's instructions. Total lysate protein was subjected to SDS-PAGE in a 4–12% acrylamide gel, then transferred to a nitrocellulose membrane in the iBlot 2 dry blotting system (Invitrogen, France), which was incubated using the iBind FD Flex system (Invitrogen, France) with antibody targeted for E-selectin (ab1981, 1:500), P-selectin (PA579973, 1:500), ICAM-1 (CD54, PA579430, 1:500), VCAM-1 (BS-0920R, 1:400), and GAPDH (MAB374, 1:4000). Membranes were washed in PBS and scanned with the LI-COR® Odyssey CLs imager using the appropriate channel. The intensity of the resulting bands was determined with image studio software.

#### **Quantification by ELISA**

ICAM-s levels were assayed using commercially available ELISA kits (MIC100, Bio-Techne) according to the manufacturer's instructions. Plasma was collected from both sepsis Swiss mice models at the final point, *i.e.*, 22 hours after LPS, and organs were washed by PBS/EDTA 2mM (pH 7.4) perfusions before tissue harvest. Part of organs weighing 30–70 mg was homogenized in Precellys® with 1 mL RIPA buffer containing a phosphatase and protease inhibitor cocktail.

### Statistics

The statistical analyses were performed using GraphPad v8.0 (GraphPad Software, USA) and XLSTAT 2016.1.1 software (Addinsof, France). Data are presented as the mean  $\pm$  SEM unless otherwise specified. Data considered statistically significant are shown as \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$ . For serum and tissue assays, statistically significant variations were assessed with unpaired t-test, one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's *post hoc* test for multiple comparisons, or two-way ANOVA and correction for multiple comparisons using Tukey's test depending on experiences. For microarray analysis, background reduction and quantile data normalization were performed with Bioconductor in the R environment (<http://www.bioconductor.org>). Variance was assessed by the VarMixt method. All p-values were adjusted with the Benjamini–Yekutieli method. For GSEA, a one-class analysis was performed, with significance achieved at  $p < 0.05$  after the Bonferroni correction for multiple hypothesis testing. Survival was assessed by the Kaplan–Meier method and the log-rank test.

### Study approval

All experiments were performed in accordance with French laws concerning animal experimentation (13161-2017112410451264v2 and 9486-201609161303285v3) and approved by our Institutional Animal Care and Use Committee (C2EA-47).

**Author contributions**

A.M. and D.A. designed the study and supervised the work. A.M., A.G. and D.A. wrote the manuscript, with input from all other authors. A.M., A.G., C.H.B. and S.G. designed and developed a flow cytometry-based protocol that allowed direct quantification and analyze of immunity, and analyzed all the data. E.D.M. and A.P. realized and analyzed microarray experiments. A.G., A.M., E.D.M, A.F. and J.A. contributed to the organ function experiments and analyses.

**Acknowledgements**

We thank R. Carlier and the radiology department of Raymond Poincaré hospital (AP-HP) for their help in ultrasound experiments; V. Assoun for discussions and technical assistance.

This research is funded by the French government through the Programme d'Investissements d'Avenir, project number ANR-18-RHUS60004.

**Data availability**

The complete array dataset and the experimental protocol have been deposited in the NCBI's Gene Expression Omnibus and are accessible through the GEO Series accession number GSE31175 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE31175>).

## REFERENCES

1. Singer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016; 315: (8) 801–810.
2. Shankar-Hari M, et al. Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016; 315: (8) 775–787.
3. Suzuki T, et al. Sepsis-induced cardiac dysfunction and  $\beta$ -adrenergic blockade therapy for sepsis. *J Intensive Care*. 2017; 5: (22) 1–10.
4. Morelli A, et al. Effect of heart rate control with esmolol on hemodynamic and clinical outcomes in patients with septic shock: A randomized clinical trial. *JAMA*. 2013; 310: (16) 1683–1691.
5. Fuchs C, et al. Continuing chronic beta-blockade in the acute phase of severe sepsis and septic shock is associated with decreased mortality rates up to 90 days. *Br J Anaesth*. 2017; 119: (4) 616–625.
6. De Montmollin E, et al. Bench-to-bedside review:  $\beta$ -Adrenergic modulation in sepsis. *Crit. Care*. 2009; 13: (5) 1–8.
7. Suzuki T, et al. Infusion of the  $\beta$ -adrenergic blocker esmolol attenuates myocardial dysfunction in septic rat. *Crit. Care Med*. 2005; 33: 2294–2301.
8. Ackland GL, et al. Cardioprotection, attenuated systemic inflammation, and survival benefit of  $\beta$ 1-adrenoceptor blockade in severe sepsis in rats. *Crit. Care Med*. 2010; 38: (2) 388–394.
9. Liu P, et al. The influence of esmolol on septic shock and sepsis: A meta-analysis of randomized controlled studies. *Am. J. Emerg. Med*. 2018; 36: 470–474.
10. Chioléro R, et al. Energy metabolism in sepsis and injury. *Nutrition*. 1997; 13: (9) 45.
11. Kimmoun A, et al.  $\beta$ 1-Adrenergic Inhibition Improves Cardiac and Vascular Function in Experimental Septic Shock. *Crit. Care Med*. 2015; 43: (9) 332–340.
12. Angus DC, Poll T van der. Severe sepsis and septic shock. *N Engl Med*. 2013; 369: 840–851.

13. Steinberg BE, Grinstein S. Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death. *Sci STKE*. 2007; 379: pe11.
14. Sirenko Y, et al. Effect of Beta - Blockers on Insulin Resistance in Patients with Hypertension and Metabolic Syndrome after 6 Months of Treatment. *J. Endocrinol. Diabetes*. 2017; 4: (2) 1–11.
15. Richard S. Hotchkiss. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2013; 13: (12) 862–874.
16. Mori K, et al. Beta-1 blocker improves survival of septic rats through preservation of gut barrier function. *Intensive Care Med*. 2011; 37: 1849–1856.
17. Hampson P, et al. Neutrophil dysfunction, immature granulocytes, and cell-free DNA are early biomarkers of sepsis in burn-injured patients: A prospective observational cohort study. *Ann. Surg*. 2017; 265: 1241–1249.
18. Sõnego F, et al. Paradoxical roles of the neutrophil in sepsis: Protective and deleterious. *Front. Immunol*. 2016; 7: 1–7.
19. O'Connell KE, et al. Practical murine hematopathology: A comparative review and implications for research. *Comp. Med*. 2015; 65: (2) 96–113.
20. Dale DC, et al. Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) on neutrophil kinetics and function in normal human volunteers. *Am. J. Hematol*. 1998; 57: 7–15.
21. Nauseef WM, Borregaard N. Neutrophils at work. *Nat. Immunol*. 2014; 15: (7) 602–611.
22. Drifte G, et al. Innate Immune Functions of Immature Neutrophils in Patients With Sepsis and Severe Systemic Inflammatory Response Syndrome\*. *Crit. Care Med*. 2013; 41: (3) 820–832.
23. Van Loon LM, et al. Hemodynamic response to  $\beta$ -blockers in severe sepsis and septic shock: A review of current literature. *J. Crit. Care*. 2019; 50: 138–143.
24. Pinheiro da Silva F, Soriano F. Neutrophils recruitment during sepsis: Critical points and crossroads. *Front. Biosci*. 2009; Volume: (14) 4464.

25. Tavares-Murta BM, et al. Failure of neutrophil chemotactic function in septic patients. *Crit. Care Med.* 2002; 30: (5) 1056–1061.
26. Shen X-F, et al. Neutrophil dysregulation during sepsis : an overview and update Recent advances in the pathophysiology process of sepsis Effects of sepsis on neutrophils Increased lifespan of neutrophils during sepsis. *J Cell Mol Med.* 2017; 21: (9) 1687–1697.
27. Hind LE, et al. Interaction with an endothelial lumen increases neutrophil lifetime and motility in response to *P aeruginosa*. *Blood.* 2018; 132: (17) 1818–1828.
28. Schramm R, Thorlacius H. Neutrophil recruitment in mast cell-dependent inflammation: inhibitory mechanisms of glucocorticoids. *Inflamm. Res.* 2004; 53: (12) 644–652.
29. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 2013; 13: 159–175.
30. Yong KL, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces neutrophil adhesion to pulmonary vascular endothelium in vivo: Role of  $\beta 2$  integrins. *Blood.* 1992; 80: (6) 1565–1575.
31. Yan J, et al. Selective induction of cell adhesion molecules by proinflammatory mediators in human cardiac microvascular endothelial cells in culture. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2010; 3: (4) 315–331.
32. Weisdorf DJ, Jacob HS. Beta-adrenergic blockade: augmentation of neutrophil-mediated inflammation. *J. Lab. Clin. Med.* 1987; 109: (2) 120–126.
33. Dunzendorfer S, Wiedermann CJ. Modulation of Neutrophil Migration and Superoxide Anion Release by Metoprolol. *J Mol Cell Cardiol.* 2000; 32: 915–924.
34. Wellstein A, et al. Affinity and selectivity of beta-adrenoceptor antagonists in vitro. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1986; 8: (Suppl 11) S36-40.
35. Delclaux C, et al. Role of Gelatinase B and Elastase in Human Polymorphonuclear Neutrophil Migration across Basement Membrane. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1996; 14: 288–295.
36. McDonald B, et al. Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream

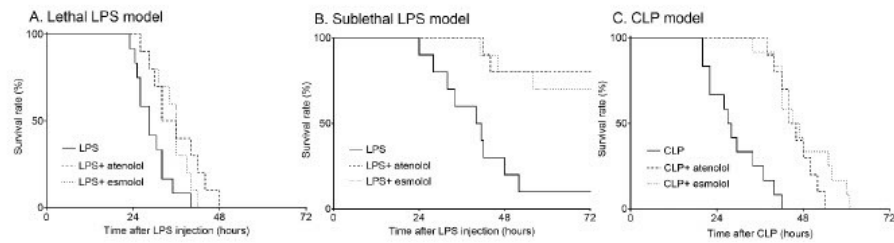


- during sepsis. *Cell Host Microbe*. 2012; 12: 324–333.
37. Nauseef WM. How human neutrophils kill and degrade microbes: An integrated view. *Immunol. Rev.* 2007; 219: 88–102.
  38. Bianchi M, et al. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood*. 2009; 114: (13) 2619–2622.
  39. Meng W, et al. Depletion of neutrophil extracellular traps in vivo results in hypersusceptibility to polymicrobial sepsis in mice. *Crit. Care*. 2012; 16: R137.
  40. Gardiner EE, Andrews RK. Neutrophil extracellular traps (NETs) and infection-related vascular dysfunction. *Blood Rev.* 2012; 26: 255–259.
  41. Li Y, et al. Citrullinated Histone H3 – A Novel Target for Treatment of Sepsis. *Surgery*. 2014; 156: (2) 229–234.
  42. Liaw PC, et al. DAMP and DIC: The role of extracellular DNA and DNA-binding proteins in the pathogenesis of DIC. *Blood Rev.* 2016; 30: 257–261.
  43. Xu J, et al. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat. Med.* 2009; 15: (11) 1319–1321.
  44. McDonald B, et al. Platelets and neutrophil extracellular traps collaborate to promote intravascular coagulation during sepsis in mice. *Blood*. 2017; 129: (10) 1357–1367.
  45. Brown K, et al. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet*. 2006; 368: 157–169.
  46. Li Y, et al. Identification of Cit H3 as a Potential Serum Protein Biomarker in a Lethal Model of LPS-induced Shock. *Surgery*. 2011; 150: (3) 442–451.
  47. Garcia-Prieto J, et al. Neutrophil stunning by metoprolol reduces infarct size. *Nat. Commun.* 2016;
  48. Lefrançois E, et al. Maladaptive role of neutrophil extracellular traps in pathogen-induced lung injury. *JCI Insight*. 2018; 3: (3) 1–15.

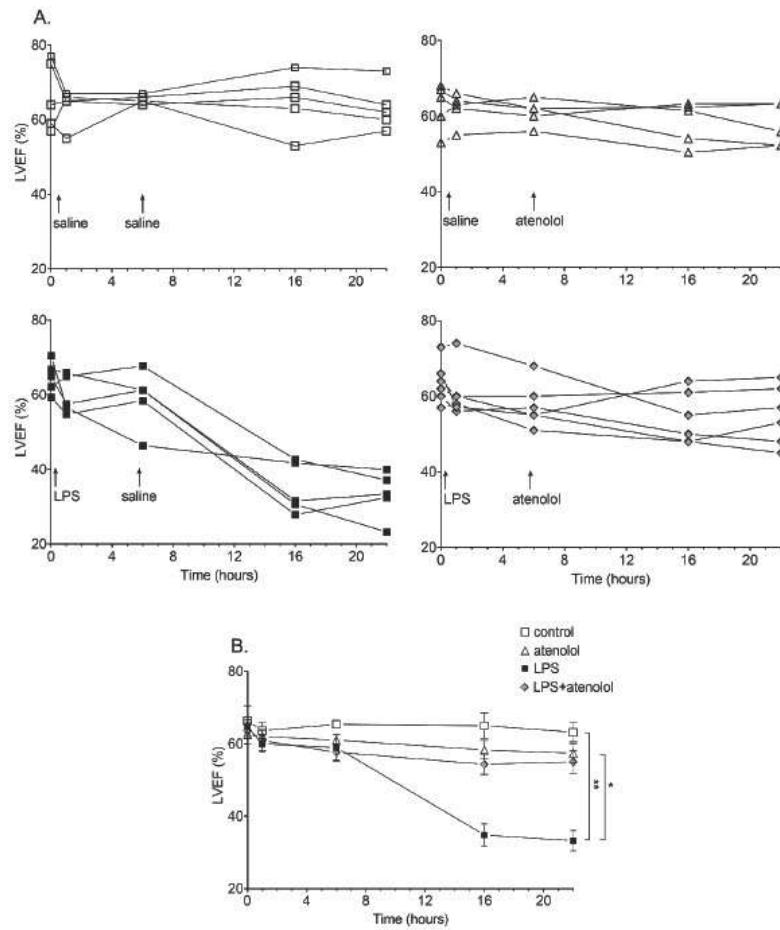


49. Scanzano A, et al. Adrenergic modulation of migration, CD11b and CD18 expression, ROS and interleukin-8 production by human polymorphonuclear leukocytes. *Inflamm. Res.* 2015; 64: 127–135.
50. Zieziulewicz TJ, et al. Stress-induced effects , which inhibit host defenses , alter leukocyte trafficking. *Cell Stress Chaperones.* 2013; 18: 279–291.
51. Wei C, et al. Effects of low doses of esmolol on cardiac and vascular function in experimental septic shock. *Crit. Care.* 2016; 20: (407) 1–10.
52. Moreira RS, et al. Apolipoprotein A-I mimetic peptide 4F attenuates kidney injury, heart injury, and endothelial dysfunction in sepsis. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2014; 307: 514–524.
53. Liang Y, et al. Effect of canagliflozin on renal threshold for glucose, glycemia, and body weight in normal and diabetic animal models. *PLoS One.* 2012; 7: (2) 2–8.
54. Dutta HK, et al. Indocyanine green clearance test to evaluate liver function in rat model of extrahepatic biliary atresia. *Afr. J. Paediatr. Surg.* 2018; 15: 5–9.
55. Chen J, et al. ToppGene Suite for gene list enrichment analysis and candidate gene prioritization. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37: 305–311.
56. Ashburner M, et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat Genet.* 2000; 25: (1) 29–29.

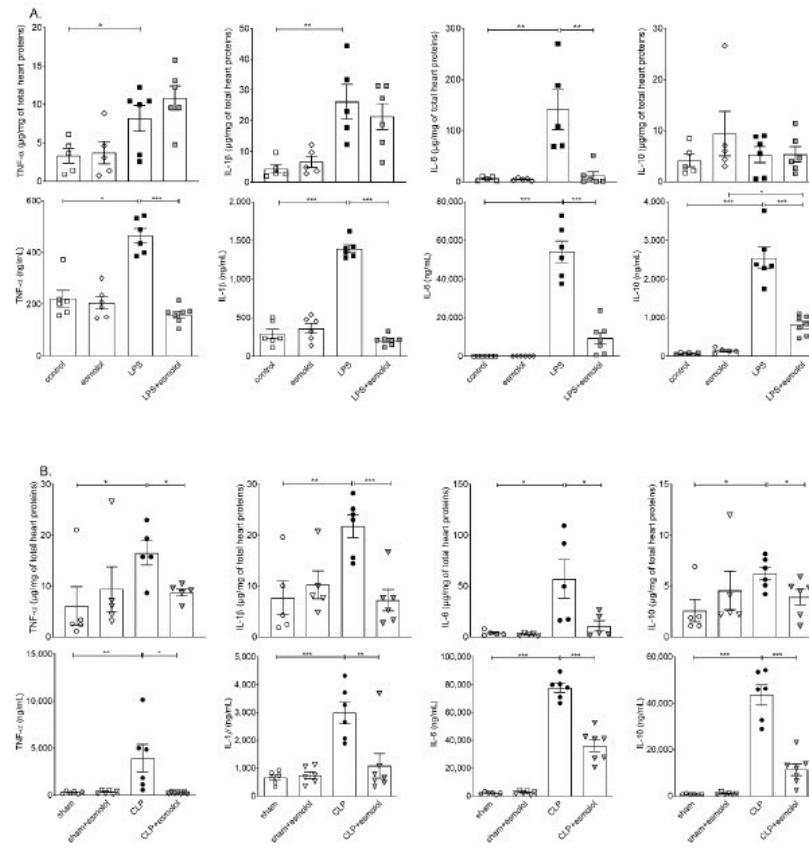
## FIGURES



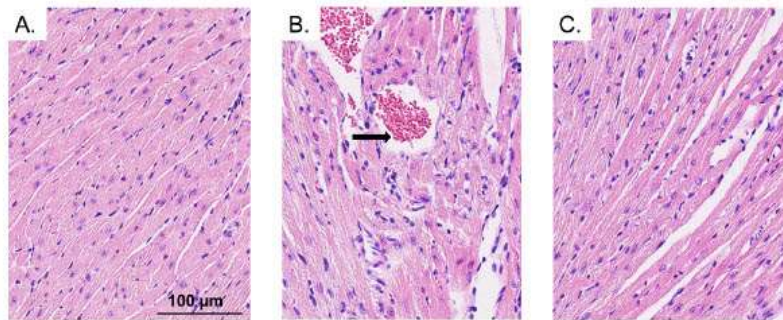
**Figure 1.  $\beta_1$ -adrenergic blockers improve survival using LPS (sublethal and lethal) or CLP models.** Mice were given (A) 22 mg/kg (sublethal dose) or (B) 75 mg/kg (lethal dose) of LPS by IP injection with atenolol (0.1 mg/kg, IP) or esmolol (10 mg/kg/h, IV) treatments 6 hours later. The survival was assessed at least every 4 hours for 5 days ( $n=10$ /group). Simultaneously, an identical study was performed using the (C) CLP model. LPS: lipopolysaccharide, CLP: cecal ligation and puncture, IP: intraperitoneal, IV: intravenous.



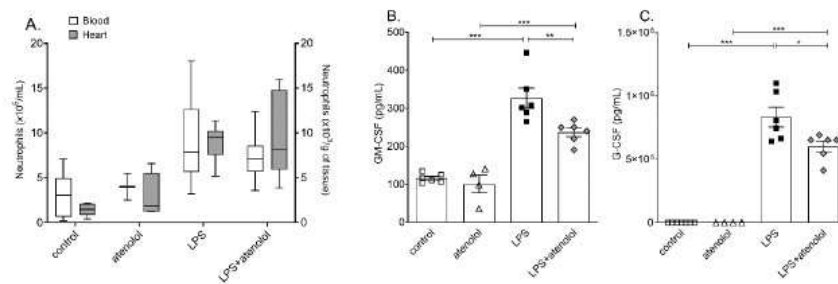
**Figure 2.  $\beta$ 1-adrenergic blockers preserve left ventricular ejection fraction post LPS injection (sublethal model).** Atenolol was administered 6 hours post LPS injection. (A) Individual values of LVEF for control (saline/saline), atenolol (saline/atenolol), LPS (LPS/saline), and LPS+atenolol (LPS/atenolol) animals were recorded on the same animal at 0, 1, 6, 16, and 22 hours post LPS injection. (B) Average values of LVEF for all groups are represented. All data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*p<0.05 LPS group versus LPS+atenolol group, \*\*p<0.01 control group versus LPS group. LPS: lipopolysaccharide, LVEF: left ventricular ejection fraction.



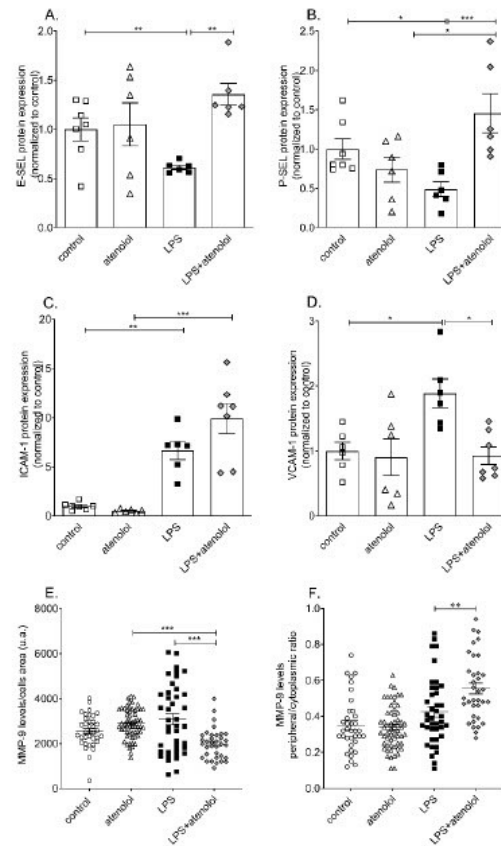
**Figure 3. Esmolol reduces inflammatory response in septic models.** Heart and serum levels of cytokines were measured 22 hours post LPS injection (A) or CLP creation (B). Protein production was assessed by ELISA. All data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . IL, interleukin; TNF, tumor necrosis factor.



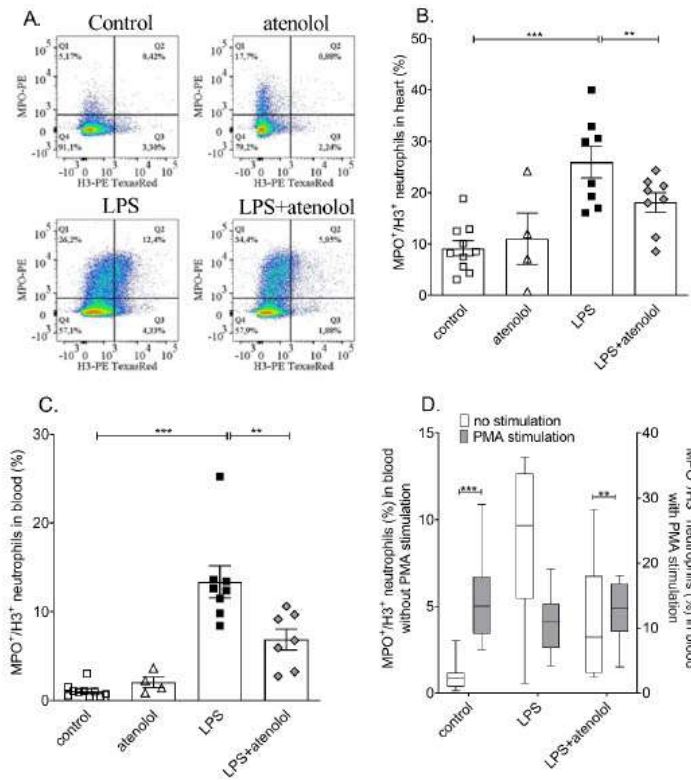
**Figure 4. Esmolol preserves heart architecture after LPS challenge using hematoxylin and eosin-staining.** (A) Control mice, showing normal architecture of cardiac myocytes with centrally placed nuclei. (B) Lethal LPS (75 mg/kg, IP), staining showing disorganization of the myofibrils with loss of striation, focal degenerating myocytes, and moderate infiltration of leucocytes and vascular dilatation and congestion (arrow). (C) LPS treated by esmolol group, showing moderate disorganization of the myofibrils with mild to moderate infiltration of leucocytes.



**Figure 5. Effect of atenolol and sublethal LPS model on plasmatic and heart parameters.** Neutrophil concentration in heart and blood (A), GM-CSF (B), and G-CSF (C) concentrations in blood. In A, the box and whisker plots show the median (line within the box), the IQR (box), and the minimum-to-maximum values (whiskers). In B and C, values are expressed as means  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, G-CSF: granulocyte-colony stimulating factor.



**Figure 6. Atenolol modulates the heart tissue concentrations of cell adhesion molecules in the sublethal LPS model and the localization of MMP-9 in freshly isolated neutrophils from blood.** E-selectin (A), P-selectin (B), ICAM-1 (C), and VCAM-1 (D). Values are expressed as means  $\pm$  SEM. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001. E-SEL: E-selectin, P-SEL: P-selectin, ICAM-1: intercellular adhesion molecule-1, VCAM-1: vascular cell adhesion molecule-1. Cells were double labeled for MMP-9 and plasmic membrane, followed by DAPI nuclear counterstain. Quantitative analysis of the relative fluorescence intensity in total cell area (A) and peripheral/cytoplasmic ratio (B). Values are expressed as means  $\pm$  SEM. \*\* $p$ <0.01\*\*\* $p$ <0.001.



**Figure 7. Neutrophil extracellular trap formation in response to sublethal LPS injection is modulated by  $\beta$ 1-adrenergic blockers.** Representative FACS plots for neutrophils in blood (A). Percentage of neutrophil-producing NETs in blood (B) and heart (C). NET measurement by flow cytometry with H3<sup>+</sup>/MPO<sup>+</sup> markers. Neutrophil activity (MPO<sup>+</sup>/H3<sup>+</sup>) in response to PMA (50 ng/mL) (D). Neutrophils isolated from mice were treated with PMA (50 ng/mL) 3 hours before analysis of the activity. In B and C, values are expressed as means  $\pm$  SEM. In D, the box and whisker plots show the median (line within the box), the IQR (box), and the minimum-to-maximum values (whiskers). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$



## TABLES

Parameters (n=6/group)	Control	LPS	LPS+BB
End-diastolic interventricular septal wall thickness (mm)	0.61 ±0.06	0.51 ±0.07	0.63 ±0.04
End-diastolic posterior wall thickness (mm)	0.9 ±0.05	0.88 ±0.88	0.97 ±0.09
LV end-diastolic diameter (mm)	4.46 ±0.03	4.58 ±0.11	4.2 ±0.3
Ejection Fraction (%)	64.7 ±1.9	33 ±2.8**	55 ±5.0#
E/A ratio	2.07 ±0.51	1.08 ±0.26 <sup>ˆ</sup>	1.76 ±0.13
Cardiac output (mL/min)	21.65 ±0.83	6.15 ±1.12**	17.04 ±0.94#
Mean Arterial pressure (mmHg)	74.2 ±1.4	59.4 ±2.5**	78.5 ±6.6##
Heart Rate (bpm)	531.5±7.7	480±13**	568.75±33.4#

**Table 1. Ultrasound and hemodynamic assessments of cardiovascular parameters 22 hours post LPS injection (sublethal model).** All data are presented as mean ± SEM. \* p<0.05 control versus LPS; \*\* p<0.01 control versus LPS; # p<0.05 LPS versus LPS+atenolol; ## p<0.01 LPS versus LPS+atenolol. LPS: lipopolysaccharide, CLP: cecal ligation and puncture.

Functional gene sets (number of genes in the sets)	Number of down-regulated genes	Expected number of down-regulated genes
CLP sepsis model		
Acute local inflammatory response (17)	7	0.7
Adhesion and endothelial transmigration of granulocytes (15)	6	0.7
Monocyte activation (11)	5	0.5
Neutrophil activation (8)	4	0.3
Chemotaxis (185)	25	3.2
Leukocyte migration (83)	17	1.4
Leucocytes adhesion (6)	4	0.1
IL-6 production (45)	7	0.8
LPS sepsis model		
Inflammatory response (398)	62	26.6
Regulation of leukocytes activation (191)	32	12.8
Regulation of T lymphocyte activation (85)	19	5.7
Regulation of monocyte proliferation (94)	19	6.3
Regulation of cytokine production (201)	34	13.4

**Table 2. Gene set enrichment analysis of the genes modulated by esmolol in the LPS (lethal model) and CLP models.** Only significantly enriched functional genes involving inflammation and immune responses are represented ( $p < 0.05$  after Bonferroni correction for multiple comparisons for each row). LPS: lipopolysaccharide, CLP: cecal ligation and puncture.

## SUPPLEMENTAL MATERIAL

<b>Atenolol (0.1 mg/kg, IP) (n=6/group)</b>					
Delay (post LPS injection)	0 hour	1 hour	6 hours	8 hours	22 hours
HR (% of baseline value)	-10.1 ± 3	-8.1 ± 2.2	-8.7 ± 1.4	-10.9 ± 1.8*	/
MAP (% of baseline value)	-1.5 ± 2.9	-8 ± 4.1	-12.5 ± 4.8	-46.9 ± 8*	/
Mortality within 1 hour (%)	0	0	0	34	100

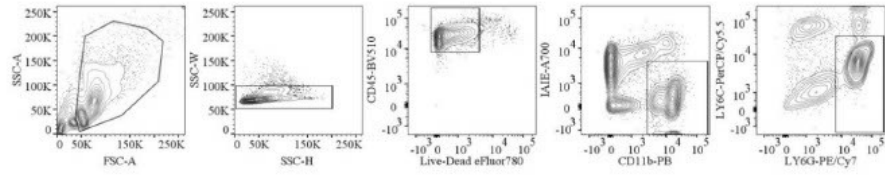
  

<b>Atenolol (1 mg/kg, IP) (n=6/group)</b>					
Delay (post LPS injection)	0 hour	1 hour	6 hours	8 hours	22 hours
HR (% of baseline value)	-18,2 ± 2,3**	-14,6 ± 1*	-13,5 ± 4,3	/	/
MAP (% of baseline value)	-1,9 ± 4	-21,1 ± 4,2**	-63,5 ± 9,7**	/	/
Mortality within 1 hour (%)	0	0	50	100	100

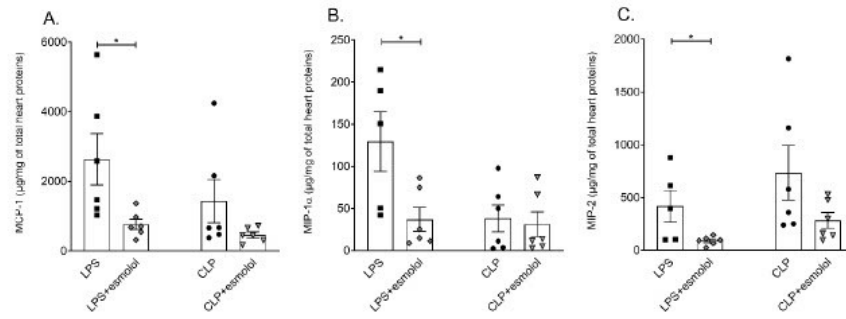
**Supplemental Table 1. Effects of atenolol (0.1 mg/kg, IP and 1 mg/kg, IP) on hemodynamic parameters and mortality.** 0, 1, 6, 8, and 22 hours post LPS (22 mg/kg, IP) administration. All data are expressed as mean ± SEM. \* p<0.05, \*\*p<0.01 versus baseline. HR: heart rate, MAP: mean arterial pressure.

Gene (protein)	CLP	LPS
<b>Cytokines</b>		
TNF (tumor necrosis factor $\alpha$ )	-4.40*	1.29
IL1B (interleukin-1 $\beta$ )	-7.51*	0.98
IL6 (interleukin-6)	-10.89*	-12.55*
<b>Chemokines</b>		
CCL2 (monocyte chemoattractant protein 1)	-5.21*	-4.64*
CCL3 (macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$ )	-8.49*	-0.06
CCL4 (macrophage inflammatory protein 1 $\beta$ )	-8.54*	-3.18
CCL5 (RANTES)	-4.48*	-4.43*
CCL7 (monocyte chemoattractant protein 3)	-9.88*	-3.36
CCL11 (eotaxin 1)	-5.26*	7.60*
CCL12 (monocyte chemoattractant protein 5)	-11.17*	5.29*
CCL19 (macrophage inflammatory protein 3 $\beta$ )	-7.60*	-8.27*
CXCL2 (macrophage inflammatory protein 2)	-9.20*	-8.60*
CXCL3 (GRO- $\gamma$ )	-9.49*	-2.825
CXCL5 (ENA 78)	-19.37*	-4.70*
CXCL9 (gamma-interferon-induced monokine)	-4.46*	-17.17*
CXCL10 (IP-10)	-14.13*	-20.65*
CXCL11 (interferon-inducible T-cell $\alpha$ chemoattractant)	-5.26*	-8.84*
<b>Proteins involved in endothelial transmigration</b>		
SELE (E-selectin)	-22.62*	-7.13*
SELP (P-selectin)	-16.75*	-7.65*
ICAM1 (intracellular cell adhesion molecule 1)	-8.35*	-8.64*
VCAM1 (vascular cell adhesion molecule 1)	-8.19*	-5.58*

**Supplemental Table 2. Esmolol-induced modulation of the gene expression of cytokines, chemokines, and proteins involved in leukocyte–endothelium adhesion and endothelial transmigration.** Values are given as the fold modulation (positive or negative) in LPS+esmolol mice compared with LPS mice. \*  $p < 0.05$  after the Benjamini-Yekutieli adjustment. LPS: lipopolysaccharide, CLP: cecal ligation and puncture.

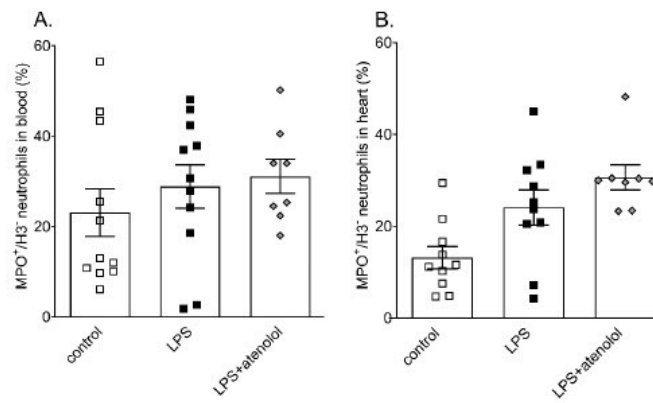


**Supplemental Figure 1.** An example of a gating strategy used to identify live neutrophils in mouse peripheral blood.

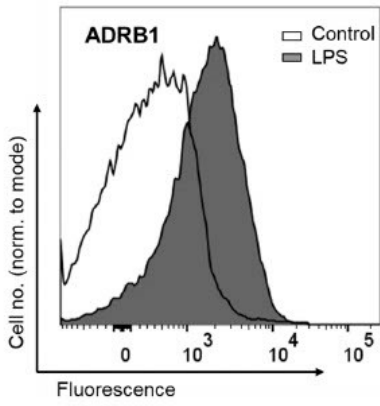


**Supplemental Figure 2. Effect of esmolol infusion on the heart tissue concentrations of chemokines.**

Esmolol significantly reduced heart (A) MCP-1, (B) MIP-1 $\alpha$ , and (C) MIP-2 levels in the LPS sepsis model. \*  $p < 0.05$ .



**Supplemental Figure 3. Neutrophil degranulation in response to sublethal LPS injection.** Percentage of neutrophil-producing MPO in (A) blood and (B) heart. Degranulation measurement by flow cytometry with MPO<sup>+</sup> / H3<sup>+</sup> markers.



**Supplemental Figure 4. Flow cytometry of  $\beta$ 1-adrenergic receptor (ADRB1) of neutrophils in LPS and control groups. Data representative of n=8 animals/group.**



## 2. EFFET DE L'ADMINISTRATION D'UN $\beta$ 1-BLOQUANT SUR LA NEURO-INFLAMMATION ET LA FONCTION NEUROMUSCULAIRE DANS UN MODÈLE DE SEPSIS PAR INJECTION DE LPS

---

Publication :

**Bourcier CH**, Michel-Flutot P, Emam L, Adam L, Gasser A, Vinit S, Mansart A (2023)

*$\beta$ 1-adrenergic blockers preserve neuromuscular function by inhibiting the production of extracellular traps during systemic inflammation in mice.*

Frontiers in immunology. 2023 Sep 22. doi.org/10.3389/fimmu.2023.1228374

Décrit pendant des décennies comme protégé du reste de l'organisme par la BHE, nous savons aujourd'hui que le SNC est particulièrement affecté au cours du sepsis, avec des dysfonctionnements neurologiques tels que la « faiblesse acquise en unité de soins intensifs », caractérisée par des troubles du système neuromusculaire et un impact négatif sur la fonction physique. Dans notre première étude, nous avons montré que l'administration d'un  $\beta$ 1-bloquant avait des effets positifs sur la survie et les fonctions d'organes, dont la fonction cardiovasculaire, et qu'ils pouvaient être dus à une modulation de la production de ETs. Dans ce second projet, nous avons donc étudié l'effet de ce même traitement dans le système nerveux central.

Les dysfonctionnements neurologiques résultent bien souvent des conséquences d'une neuro-inflammation excessive. L'inflammation généralisée induit la production systémique de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires et déclenchent l'activation des cellules gliales, du stress oxydatif et la perméabilisation de la BHE, ce qui entraîne l'infiltration de cellules immunitaires périphériques comme les neutrophiles. Cette cascade de processus neuro-inflammatoires modulent ensuite l'activité neuronale, ce qui contribue, du moins en partie, aux symptômes observés tels que la réduction de l'excitabilité motoneuronale. Cependant, les acteurs et les voies médiatrices de cette modulation de l'excitabilité neuronale restent à explorer.

Récemment, il a été démontré que la production des pièges extracellulaires par les

neutrophiles infiltrants (les NETs) était impliquée dans les processus neuro-inflammatoires associés aux lésions traumatiques du SNC, en particulier dans la perturbation de la BHE. La microglie, qui constitue le premier niveau de défense contre les infections grâce à sa capacité à réaliser la phagocytose et la présentation des antigènes dans le SNC, s'est révélée également capable de produire des pièges extracellulaires (les MiETs) *in vivo* dans un modèle d'infection. Cependant, il existe très peu de données sur cette production de ETs dans le SNC, et son implication potentielle dans le dysfonctionnement neuronal reste à explorer.

Dans cette étude, les objectifs étaient multiples. Nous avons voulu déterminer si les cellules immunitaires forment des pièges extracellulaires dans le SNC dans un modèle de choc endotoxinique par injection de LPS et si ces pièges étaient à l'origine de troubles neuromusculaires. Enfin, nous souhaitons déterminer si l'administration de  $\beta$ 1-bloquants limite ces effets.

Nous avons observé une infiltration de neutrophiles dans le SNC, une activation de la microglie et une production de ETs suite à l'administration de LPS. Cette production de ETs induit des troubles de la fonction neuromusculaire qui peuvent être réduits suite à l'administration d'aténolol. En effet, ce  $\beta$ 1-bloquant adrénergique a significativement diminué la production de ETs par la microglie et les neutrophiles, mais a également limité la chute du PEM. Ce lien entre ETs et troubles de la fonction neuromusculaire a ensuite été confirmé en utilisant un inhibiteur spécifique de la production des ETs, le sivelestat, qui a montré de effets similaires à l'aténolol sur la fonction neuromusculaire. Ce traitement par  $\beta$ 1-bloquant pourrait donc être une bonne piste thérapeutique pour réduire les effets indésirables dans les inflammations sévères telles que le sepsis, mais aussi dans d'autres pathologies faisant intervenir les pièges extracellulaires.



## OPEN ACCESS

EDITED BY  
Julien Pottecher,  
Hôpitaux Universitaires de Strasbourg,  
France

REVIEWED BY  
Cassiano Felipe Gonçalves-de-  
Albuquerque,  
Rio de Janeiro State Federal University,  
Brazil  
Maria Nikodemova,  
University of Florida, United States

\*CORRESPONDENCE  
Arnaud Mansart  
✉ [arnaud.mansart@univ-sq.fr](mailto:arnaud.mansart@univ-sq.fr)

<sup>†</sup>These authors have contributed equally to  
this work

RECEIVED 24 May 2023

ACCEPTED 31 August 2023

PUBLISHED 22 September 2023

## CITATION

Bourcier CH, Michel-Flutot P, Emam L,  
Adam L, Gasser A, Vinit S and Mansart A  
(2023)  $\beta$ 1-adrenergic blockers preserve  
neuromuscular function by inhibiting the  
production of extracellular traps during  
systemic inflammation in mice.  
*Front. Immunol.* 14:1228374.  
doi: 10.3389/fimmu.2023.1228374

## COPYRIGHT

© 2023 Bourcier, Michel-Flutot, Emam,  
Adam, Gasser, Vinit and Mansart. This is an  
open-access article distributed under the  
terms of the [Creative Commons Attribution  
License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or  
reproduction in other forums is permitted,  
provided the original author(s) and the  
copyright owner(s) are credited and that  
the original publication in this journal is  
cited, in accordance with accepted  
academic practice. No use, distribution or  
reproduction is permitted which does not  
comply with these terms.

## $\beta$ 1-adrenergic blockers preserve neuromuscular function by inhibiting the production of extracellular traps during systemic inflammation in mice

Camille H. Bourcier<sup>1,2</sup>, Pauline Michel-Flutot<sup>1</sup>, Laila Emam<sup>2</sup>,  
Lucille Adam<sup>2</sup>, Adeline Gasser<sup>2</sup>, Stéphane Vinit<sup>1†</sup>  
and Arnaud Mansart<sup>2\*†</sup>

<sup>1</sup>END-ICAP, INSERM U1179, UVSQ-Université Paris-Saclay, Versailles, France, <sup>2</sup>Infection et  
Inflammation (2), INSERM U1173, UVSQ-Université Paris-Saclay, Versailles, France

Severe inflammation via innate immune system activation causes organ dysfunction. Among these, the central nervous system (CNS) is particularly affected by encephalopathies. These symptoms are associated with the activation of microglia and a potential infiltration of leukocytes. These immune cells have recently been discovered to have the ability to produce extracellular traps (ETs). While these components capture and destroy pathogens, deleterious effects occur such as reduced neuronal excitability correlated with excessive ETs production. In this study, the objectives were to determine (1) whether immune cells form ETs in the CNS during acute inflammation (2) whether ETs produce neuromuscular disorders and (3) whether an immunomodulatory treatment such as  $\beta$ 1-adrenergic blockers limits these effects. We observed an infiltration of neutrophils in the CNS, an activation of microglia and a production of ETs following lipopolysaccharide (LPS) administration. Atenolol, a  $\beta$ 1-adrenergic blocker, significantly decreased the production of ETs in both microglia and neutrophils. This treatment also preserved the gastrocnemius motoneuron excitability. Similar results were observed when the production of ETs was prevented by sivelestat, an inhibitor of ET formation. In conclusion, our results demonstrate that LPS administration increases neutrophils infiltration into the CNS, activates immune cells and produces ETs that directly impair neuromuscular function. Prevention of ETs formation by  $\beta$ 1-adrenergic blockers partly restores this function and could be a good target in order to reduce adverse effects in severe inflammation such as sepsis but also in other motor related pathologies linked to ETs production.

## KEYWORDS

Inflammation, immune response, beta1-adrenergic blockers, extracellular traps, motor evoked potential, mouse model

## 1 Introduction

Inflammation is part of the innate defense mechanism of the body against infection. A dysregulated inflammation can become harmful and lead to multiple organ dysfunction. Among these, the central nervous system (CNS) is one of the first to be affected (1, 2). It displays neurotoxic processes characterized by electroencephalogram abnormalities, altered neurotransmission balance, increased excitotoxicity, impaired long-term potentiation, and neuronal apoptosis (3). Ultimately, severe inflammation leads to neurological dysfunctions (4) such as "intensive care unit-acquired weakness" (ICUAW), characterized by disorder of the neuromuscular system and a negative impact on physical function (5, 6). Many patients also develop a common complication characterized by an acutely altered mental state (from delirium to coma), a high mortality rate, and long-term cognitive impairments in surviving patients (7, 8).

These neurological dysfunctions result from CNS neuroinflammation. The generalized inflammation leads to the systemic production of pro-inflammatory cytokines that enter to the CNS and trigger glial cell activation, oxidative stress, and blood-brain barrier (BBB) permeabilization (9), resulting in peripheral immune cell infiltration (10, 11). The diverse neuroinflammatory processes then modulate neuronal activity, which contributes, at least in part, to the observed syndromes, such as reduced motoneuronal excitability in the case of ICUAW (12) and impaired somatosensory evoked potentials (2). However, the actors and pathways mediating this modulation of neuronal excitability remain to be explored.

Neuroinflammation involves diverse immune cells. The earliest recruited are microglia – resident macrophages (4, 13) and infiltrating neutrophils (14). Neutrophils are usually the first immune cells recruited following infection, and are the body's first line of defense against bacterial infections. In CNS inflammation, they are recruited by activated astrocytes due to pro-inflammatory cytokines production (15). Neutrophils are mainly known for their innate immunity functions consisting of phagocytosis and the release of granules that contain toxic substances allowing the elimination of extracellular microorganisms (16). However, in 2004, Brinkman et al. uncovered a new antimicrobial function of these neutrophils: extracellular trap (ET) formation (17). These neutrophil ETs (NETs) are mainly composed of chromatin, histones, and various proteins such as myeloperoxidase (MPO) and elastase. They help the organism eliminate pathogens such as bacteria (17). Dysregulation of NET formation can lead to deleterious outcomes such as vascular occlusions (18) and tissue damage (19, 20). Recently, this production of ETs by infiltrating neutrophils was shown to be involved in neuroinflammatory processes associated with CNS diseases and CNS traumatic injuries (21–23), especially in BBB disruption, spinal cord edema aggravation, and neuronal apoptosis (24). Interestingly microglia, which are the first level of defense against pathogens infection by making phagocytosis and antigen presentation in the CNS (25) have been shown to also produce extracellular traps (MiETs) *in vitro* (26–28) and *in vivo* (21, 28). However, data about this ET production in the CNS are lacking, and its potential involvement in neural dysfunction is yet to be explored.

In severe inflammation such as sepsis, drug development attempts have mainly focused on controlling inflammation or treating organ dysfunction, without significant benefit. Recently, interest has emerged in  $\beta$ 1-adrenergic blockade due to the efficiency of  $\beta$ 1-blockers in reducing inflammation and organ dysfunction. Clinical studies showed a reduction in patient mortality with  $\beta$ 1-adrenergic blocker administration (29) by improving cardiovascular parameters such as heart rate (29, 30) or attenuating acute lung injury (31), probably through modulation of the immune response. Interestingly,  $\beta$ 1-adrenergic blocker administration leads to a decrease in the production of pro-inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$  and IL-6 (31, 32).  $\beta$ 1-adrenergic blocker also reduce the number of macrophages (33) and neutrophils (34, 35) involved in inflammatory and neuroinflammatory pathologies.

In this study, we hypothesized that (1) infiltrating neutrophils and activated microglia produce ETs in the CNS during severe inflammation, (2) these ETs are involved in the modulation of neuronal excitability and (3) based on their immunomodulatory properties,  $\beta$ 1-blockers should reverse the adverse effect of ET formation on neuronal excitability. To address these important questions, we used a preclinical model of endotoxemic shock in mice. We evaluated motoneuronal excitability by recording gastrocnemius motor-evoked potentials, as well as ET production by neutrophils and microglia in the lumbar spinal cord where these gastrocnemius motoneurons are located.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Ethics statement

These experiments were approved by the ethics committee of the University of Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines (CEEA-47; APAHS #38573-2022082610387745 v4) and complied with French and European laws regarding animal experimentation. The animals were housed in ventilated cages in a state-of-the-art animal care facility (2CARE animal facility, accreditation A78-322-3, France), with access to food and water *ad libitum* on a 12-hour light/dark cycle.

### 2.2 Experimental protocol

A total of 180 male Swiss mice (Janvier Labs, France, 25–37 g, 5–7 weeks old) were used in this study. A single intraperitoneal (i.p.) injection of LPS (22 mg/kg, from *Escherichia coli* O55:B5, L2880, Merck, Darmstadt, Germany) was used to create our preclinical endotoxemic shock model. Mice were divided into different groups: the LPS group (n = 49); the LPS + atenolol group: a selective  $\beta$ 1-adrenergic blocker (atenolol, 0.1 mg/kg i.p., AstraZeneca, Courbevoie, France) was injected 6 hours post LPS injection (n = 33); and the LPS + sivelestat group: a selective ET inhibitor (sivelestat, ab14618, Abcam, Cambridge, UK) was injected 4 hours (10 mg/kg, i.p.), 8 hours (20 mg/kg, i.p.), and 12 hours (20 mg/kg, i.p.) post LPS injection (n = 16). Control groups were also



used for each condition: the saline group (NaCl 0.9%, i.p.; n = 56), the atenolol group (atenolol, 0.1 mg/kg i.p., 6 hours post saline injection; n = 14), and the sivelestat group (NaCl 0.9%, i.p. + 3 sivelestat injections at 4, 8, and 12 hours post saline injection; n = 12) (Supplemental Figure 1).

Twenty-two hours post LPS injection, the mice were used for gastrocnemius MEP recordings or harvested for tissue analysis. This delay is sufficient to induce a severe inflammatory response but does not cause the death of the animals which occurs from the twenty-fourth hour.

### 2.3 Cell processing for flow cytometry analyses

The mice (n = 91) were first anesthetized with 5% isoflurane in 100% O<sub>2</sub> and then maintained at 2.5% through a nose cone. The left carotid artery was cannulated. After euthanasia, the animals were perfused with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, BP2482-1, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in phosphate-buffered saline IX (PBS, BP399-1, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at 1 mL/g of body weight to remove blood from organs. The lumbar (L1–L6) spinal cord segment was then dissected out, cut into small pieces, and incubated in 2.5 mg/mL collagenase (11088858001, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) and RPMI solution (Roswell Park Memorial Institute, 1640 Gibco, 11875093, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at 37°C for 20 minutes in 5% CO<sub>2</sub>. The tissue suspension was then passed through a 100-µm cell strainer (22-363-549, Fisher Scientific, Illkirch, France), resuspended in RPMI, and distributed in a 96-well plate (650 185, Greiner bio-one, Les Ulis, France) for staining.

To identify microglia, neutrophils, and ETs (saline: n = 16; LPS: n = 13; atenolol: n = 6; LPS + atenolol: n = 10; sivelestat: n = 6; LPS + sivelestat: n = 8), the cells were resuspended in a mix composed of cell viability marker (eBioscience™ Fixable Viability Dye eFluor™ 780, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and SYTOX™ Green (Invitrogen- Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for 1 minute in PBS IX. Cells were then incubated with anti-TFAM antibody (20 minutes in RPMI at 4°C), followed by secondary antibody (20 minutes in RPMI at 4°C, see Table 1 for antibody

details) and an antibody mix (30 minutes at 4°C, Table 1). H3 antibody was conjugated with an antibody conjugation kit (DyLight 594, Abcam, ab201801, Paris, France) according to the manufacturer's instructions.

For the evaluation of β1-adrenergic receptor quantity (saline: n = 11 mice; LPS: n = 12; LPS + atenolol: n = 9), cells were incubated with the antibody mix shown in Table 2 for 30 minutes at 4°C in PBS IX.

The data was collected with a flow cytometer BD LSRFortessa™ III (BD Life Sciences, Franklin Lakes, NJ, USA) and analyzed using FlowJo™ v10.8.1 Software (RRID : SCR\_008520, BD Life Sciences, Franklin Lakes, NJ, USA).

### 2.4 Immunohistochemistry and tissue processing

The animals used for immunofluorescence analysis (saline: n = 6 mice; LPS: n = 6; LPS + atenolol: n = 6) were anesthetized using 5% isoflurane in 100% O<sub>2</sub> for induction and maintained at 2.5% through a nose cone. The mice were then euthanized by intracardiac perfusion of heparinized 0.1% (Panpharma, Luitré-Dompierre, France) saline solution (NaCl 0.9%). The lumbar segments (L1–L6) of the spinal cord were collected, fixed for 24 hours at 4°C (formalin 10%, HT501128 Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany), and cryoprotected for 48 hours in 30% sucrose in PBS IX (Pharmagrade, 141621, AppliChem, Darmstadt, Germany), then frozen and stored at -80°C. Transversal sections of 30 µm were obtained with a cryostat (NX70, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and stored at -20°C in cryoprotectant (300 g sucrose, 300 mL ethylene glycol [BP230-4, Fisher Scientific, Illkirch, France], and 10 g polyvinylpyrrolidone 40 [PVP40-100G, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany]), adjusted at 1 L with PBS IX. After washing with PBS IX, antigen retrieval (2.94 g/L tris-sodium citrate solution at pH 6) was realized for 20 minutes at 96°C. The sections were then permeabilized (0.5% triton X-100 [X100-100ML, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany]) in TBS IX, blocked (30 minutes at room temperature) in a saturation solution (4% BSA [Bovine Serum Albumin, A0336-50ML, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany], 4% NDS [Normal Donkey Serum, 566460,

TABLE 1 Antibodies used for cell processing before flow cytometry analyses.

Target	Reference	Fluorochrome
CD45	BioLegend Cat# 103137, RRID : AB_2561392	BV510
Ly6C	BioLegend Cat# 128012, RRID : AB_1659241	PerCP/Cy5.5
Ly6G	BioLegend Cat# 127618, RRID : AB_1877261	PE-Cy7
IA/IE	BioLegend Cat# 107622, RRID : AB_495727	AlexaFluor700
CD11b	BioLegend Cat# 101224, RRID : AB_755986	Pacific blue
TFAM Secondary antibody goat anti rabbit	Booster (PB9447) (Abcam Cat# ab130805, RRID : AB_11156672)	Unconjugated APC
MPO	Hycult Biotech Cat# HM1051, RRID : AB_533151	PE
H3 (citruiline R2 + R8 + R17)	Abcam Cat# ab5103, RRID : AB_304752	DyLight 594

TABLE 2 Antibodies used for  $\beta_1$ -adrenergic receptors study before flow cytometry analysis.

Target	Reference	Fluorochrome
CD45	BioLegend Cat# 103137, RRID : AB_2561392	BV510
Ly6C	BioLegend Cat# 128012, RRID : AB_1659241	PerCP/Cy5.5
Ly6G	BioLegend Cat# 127618, RRID : AB_1877261	PE-Cy7
IA/IE	BioLegend Cat# 107622, RRID : AB_493727	AlexaFluor700
CD11b	BioLegend Cat# 101224, RRID : AB_755986	Pacific blue
ADRB1	Bioss Cat# bs-0498R-PE, RRID : AB_11110613	PE

Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany], 0.05% triton X-100, 0.05% Tween 20 [BP337-100, Fisher Scientific, Illkirch, France] in TBS IX, and incubated overnight at room temperature with primary antibodies (Table 3). After washing, secondary antibodies (Table 3) were incubated for 2 hours at room temperature in saturation solution. Nuclei were labeled with DAPI (D1306, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for 10 minutes at room temperature (0.0025 mg/mL in saturation solution) and then washed again. The sections were mounted on slides, dried, and cover-slipped with fluorescent mounting medium (fluoromount G, Invitrogen-Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Images of the different sections were captured with a Hamamatsu ORCA-R2 camera mounted on an Olympus IX83 P2ZF microscope (Tokyo, Japan) or with a confocal microscope (Leica TCS SP8 microscope, Wetzlar, Germany) for higher magnification. Pictures were analyzed using ImageJ 1.53n software (ImageJ, RRID : SCR\_003070, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

## 2.5 Electrophysiological recordings of gastrocnemius motor evoked potentials

The excitability of motoneurons associated with the gastrocnemius muscle was evaluated (saline: n = 15 mice; LPS: n = 10; atenolol: n = 8; LPS + atenolol: n = 8; sivelestat: n = 6; LPS + sivelestat: n = 8) by electrophysiological recordings of the gastrocnemius (MEP). Briefly, anesthesia was induced using isoflurane (5% in 100% O<sub>2</sub>) and maintained (1%) through a nose cone. Two microneedle electrodes were inserted in the left and right gastrocnemius. A third electrode was placed subcutaneously as a

ground electrode. The electrodes were left in place for the entire duration of the experiment.

Trans-spinal magnetic stimulation, applied above CNS structures (spinal cord), is known to induce recordable MEP (36). This stimulation was performed using a magnetic stimulator MAGPRO R30 (Magventure, Farum, Denmark). The device is connected to a figure-of-eight coil (Cool-B65, Magventure, Farum, Denmark) that delivers a unique biphasic pulse with a stimulus intensity expressed as a percentage of the maximum output of the machine (%MO). Each animal was placed on a non-magnetic 3D-printed custom-made stereotaxic apparatus on the figure-of-eight coil, orientated at 90° to obtain the maximum amplitude (37), with the center of the coil under the cervical level of the animal. Each animal received five magnetic stimulation (MS) pulses, from 40% to 100% MO, with 10% increases (35 pulses in total), with an interpulse duration above 15 seconds to avoid repetitive, low-frequency MS-like effects. Gastrocnemius MEPs were amplified (gain, 1 k; A-M Systems, Everett, WA, USA) and band pass-filtered (100 Hz to 10 kHz). The signals were then digitized with an eight-channel Powerlab data acquisition device (acquisition rate: 100 k/s; AD Instruments, Dunedin, New Zealand) connected to a computer and analyzed using LabChart 8 Pro software (RRID : SCR\_017551, AD Instruments, Dunedin, New Zealand).

## 2.6 Blood-spinal cord barrier permeability

BSCB permeability was determined using Evans blue (EB) (E2129, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) extravasation. The

TABLE 3 Antibodies used for immunofluorescence analyses.

Target	Reference	Dilution
Ly6G (Rat)	BioLegend Cat# 127601, RRID : AB_1089179	1/100
H3 (citrulline R2 + R8 + R17) (Rabbit)	Abcam Cat# ab5103, RRID : AB_304752	1/100
MPO (Rabbit)	Thermo Fisher Scientific Cat# PA5-16672, RRID : AB_11006367	1/100
Iba1 (goat)	Abcam Cat# ab5076, RRID : AB_2224402	1/400
Donkey anti-Rat, Alexa Fluor™ 488	Thermo Fisher Scientific Cat# A-21208, RRID : AB_2535794	1/2000
Donkey anti-Rabbit, Alexa Fluor™ 594	Thermo Fisher Scientific Cat# A-21207, RRID : AB_141637	1/2000
Donkey anti-Goat, Alexa Fluor™ 647	Thermo Fisher Scientific Cat# A-21447, RRID : AB_2535864	1/2000

mice (saline:  $n = 8$ ; LPS:  $n = 8$ ) were anesthetized using 5% isoflurane in 100% O<sub>2</sub> for induction and maintained at 2.5% through a nose cone. A solution of 50 mg/mL of EB in saline solution was administered intravenously by a retro-orbital route (0.1 mL/10 g body weight). After 2.5 hours, the mice were anesthetized as described previously and transcardially perfused with heparinized 0.9% NaCl after euthanasia. The spinal cord was then collected. Each spinal cord was lysed in 200  $\mu$ L of a 7% perchloric acid solution (311421-50ML, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) with five Zirconium-Silicate spheres (6913500, MP Biomedicals, Illkirch, France) using a Precellys Evolution homogenizer (P000062-PEVO0-A, Bertin Technologies) and then centrifuged at 10,000 G for 30 minutes. The samples were diluted three times in ethanol, and the fluorescence intensity was measured with an Odyssey CLx Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences). The concentration of dye/g of tissue was determined using a standard curve of EB in ethanol 100%.

To measure section fluorescence, fluorescein isothiocyanate (FITC)-albumin (A9771, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany, dissolved at 20mg/mL in saline solution) was intravenously administered by a retro-orbital route (0.1 mL). The circulation period of FITC-albumin was ensured for 30 min prior to euthanasia. The mice were then anesthetized as described previously and euthanized. The spinal cord was then collected and Snap-freeze immediately in liquid nitrogen cooled isopentane. Sections of 30  $\mu$ m were sliced, then mounted on slides, dried, cover-slipped with fluorescent mounting medium (fluoromount G, Invitrogen-Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Images were captured with a Hamamatsu ORCA-R2 camera mounted on an Olympus IX83 P2ZF microscope (Tokyo, Japan).

## 2.7 Data processing and statistical analysis

For gastrocnemius MEP analysis, five MEPs for each side of every animal were superimposed and averaged, and the amplitude and latency were quantified with LabChart 8 Pro software (RRID : SCR\_017551, AD Instruments, Dunedin, New Zealand). Two-way ANOVA was used to compare each condition obtained with the same MO (percentage of stimulation for MEP measure from 40% to 100% MO) and animal groups.

For flow cytometry analysis, FlowJo v10.8.1 Software (RRID : SCR\_008520, BD Life Sciences, Franklin Lakes, NJ, USA) was used to study cell populations and quantification of mean fluorescence intensity (MFI) for ET markers and  $\beta$ 1-adrenergic receptor expression.

For immunohistochemistry analysis, ImageJ 1.53n software (ImageJ, RRID : SCR\_003070, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) was used to evaluate Iba1 labeling on the entire spinal cord section. A minimum of 5 spinal sections per animal were used to evaluate the MFI and the percentage of surface occupied by Iba1 labeling per slide for each group.

All data are presented as mean  $\pm$  SD. Statistics were considered significant when  $p < 0.05$  (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ). Normality was tested with the Shapiro-Wilk test. The difference between two

groups was assessed with the two-tailed unpaired Student's *t*-test or the non-parametric Mann-Whitney test. Between at least three groups, the difference was assessed by one-way ANOVA, followed by Fisher's LSD *post hoc* or the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test if normality failed. SigmaPlot 12.5 software (RRID : SCR\_003210 Systat Software, San Jose, CA, USA) was used for all analyses.

## 3 Results

### 3.1 LPS injection induced microglia activation and an increase in neutrophil infiltration in the spinal cord.

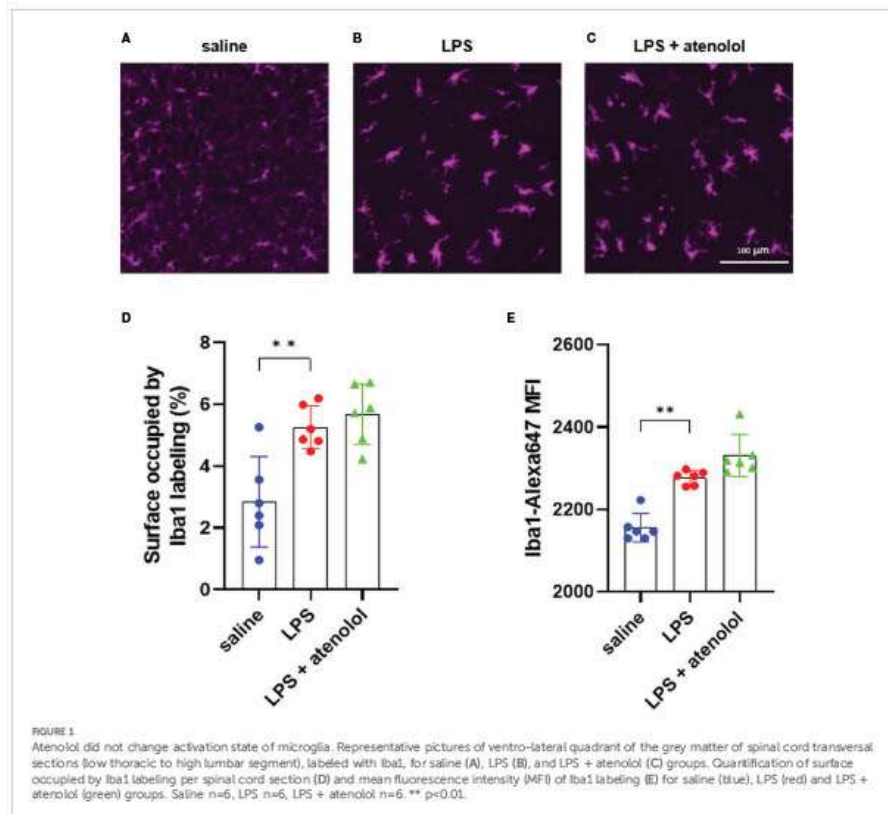
We first evaluated microglia activation and the presence of neutrophils in the spinal cord 22-hours after lipopolysaccharide (LPS) injection, using immunohistochemistry and flow cytometry. Microglia were identified as CD11b<sup>+</sup> <sup>and</sup> CD45<sup>int</sup> cells (Supplemental Figure 2). No significant change was observed between all groups in the frequency of microglia among living cells in the spinal cord (Supplemental Figure 3). Activation of these microglia was then identified by change morphology characterized by swelling of the microglial cell body, thickening of the proximal processes, and reduction of the distal branching (38), identifiable by immunolabeling microglia with Iba1 on spinal cord section. LPS injection induced morphological changes of microglia showing microglia activation (Figure 1B) compared to the saline group (Figure 1A), with a significant increase in surface occupied by Iba1 staining (Figure 1D) and in mean fluorescence intensity of Iba1 staining (Figure 1E) for the LPS group compared to the saline group. The administration of atenolol in animals injected with LPS (LPS + atenolol group) did not affect the morphology of activated microglia (Figures 1C-E).

Neutrophils were identified as CD11b<sup>+</sup>, CD45<sup>hi</sup>, and Ly6G<sup>+</sup> cells (Supplemental Figure 2). The frequency of neutrophils in the CNS among live cells was increased in the spinal cord 22 hours after LPS injection compared to the saline group (1.19  $\pm$  0.72% vs. 0.25  $\pm$  0.17%, respectively,  $p < 0.001$ ), whereas the frequency of neutrophils was similar between the LPS group and LPS + atenolol group (Supplemental Figure 3). We confirmed the presence of infiltrated neutrophils in the spinal cords of LPS-treated animals by immunostaining of Ly6G on spinal cord sections (Supplemental Figure 3). This effect of LPS on neutrophils was correlated with an increase of Evans blue (EB) leakage into the spinal cord tissue (saline group: 27.31  $\pm$  7.05 vs. LPS group: 81.34  $\pm$  27.08  $\mu$ g/g of spinal cord,  $p < 0.001$ ), (Supplemental Figure 4).

### 3.2 LPS increased the number of $\beta$ 1-adrenergic receptors on neutrophils and microglia

We observed the presence of  $\beta$ 1-adrenergic receptors on the surfaces of neutrophils (Supplemental Figures 5D, E) and microglia (Supplemental Figure 5F). The administration of LPS induced an





increase in the expression of these receptors in blood neutrophils ( $1,521 \pm 1,201$  vs.  $499 \pm 604.5$  [mean fluorescence intensity, MFI] respectively,  $p < 0.001$ ) (Supplemental Figures 5A, D) and microglia ( $14,764 \pm 2,135$  vs.  $1,370 \pm 767.9$  (MFI) respectively,  $p < 0.001$ ) (Supplemental Figure 5C and 4F) compared to the saline group. The administration of atenolol did not alter the expression of  $\beta$ 1-adrenergic receptors in neutrophils (Supplemental Figures 5D, E) and microglia (Supplemental Figure 4F) in the LPS + atenolol group or atenolol group.

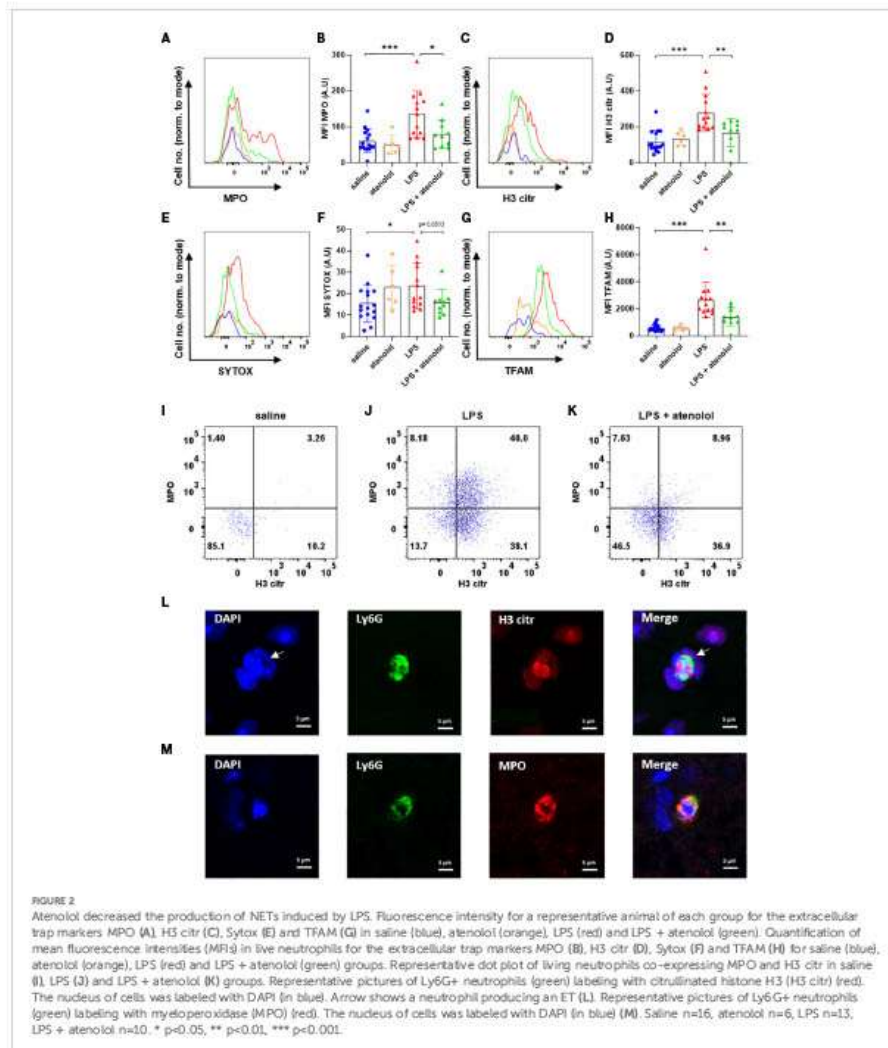
### 3.3 Atenolol decreased spinal ET production in endotoxemic mice

To determine whether these infiltrating neutrophils and resident microglia could form ETs in the spinal cord following LPS injection, we studied the expression of four individual markers of ETs: citrullinated histone H3 (H3 citr) involved in chromatin

decondensation, myeloperoxidase (MPO, a granular enzyme), SYTOX (a DNA intercalant agent), and TFAM (a protein linked to mitochondrial DNA) (39, 40). Studying ETs with a combination of these markers allows for being more specific and avoiding false positives.

Expressions of MPO in neutrophils (Figures 2A, B) and microglia (Figures 3A, B), H3 citr in neutrophils (Figures 2C, D) and microglia (Figures 3C, D), SYTOX in neutrophils (Figures 2E, F) and microglia (Figures 3E, F), and TFAM in neutrophils (Figures 2G, H) and microglia (Figures 3G, H) were significantly increased 22 hours following the injection of LPS compared to saline group. The administration of atenolol in animals injected with LPS (LPS + atenolol group) led to a reduction in MPO (Figures 2A, B), H3 citr (Figures 2C, D), and TFAM (Figures 2G, H) expression in neutrophils compared to the LPS group, whereas only a tendency towards decrease could be observed for SYTOX expression (Figures 2E, F). In microglia, atenolol administration in animals treated with LPS (LPS + atenolol group) led to a reduction of the expression in SYTOX (Figures 3E, F)

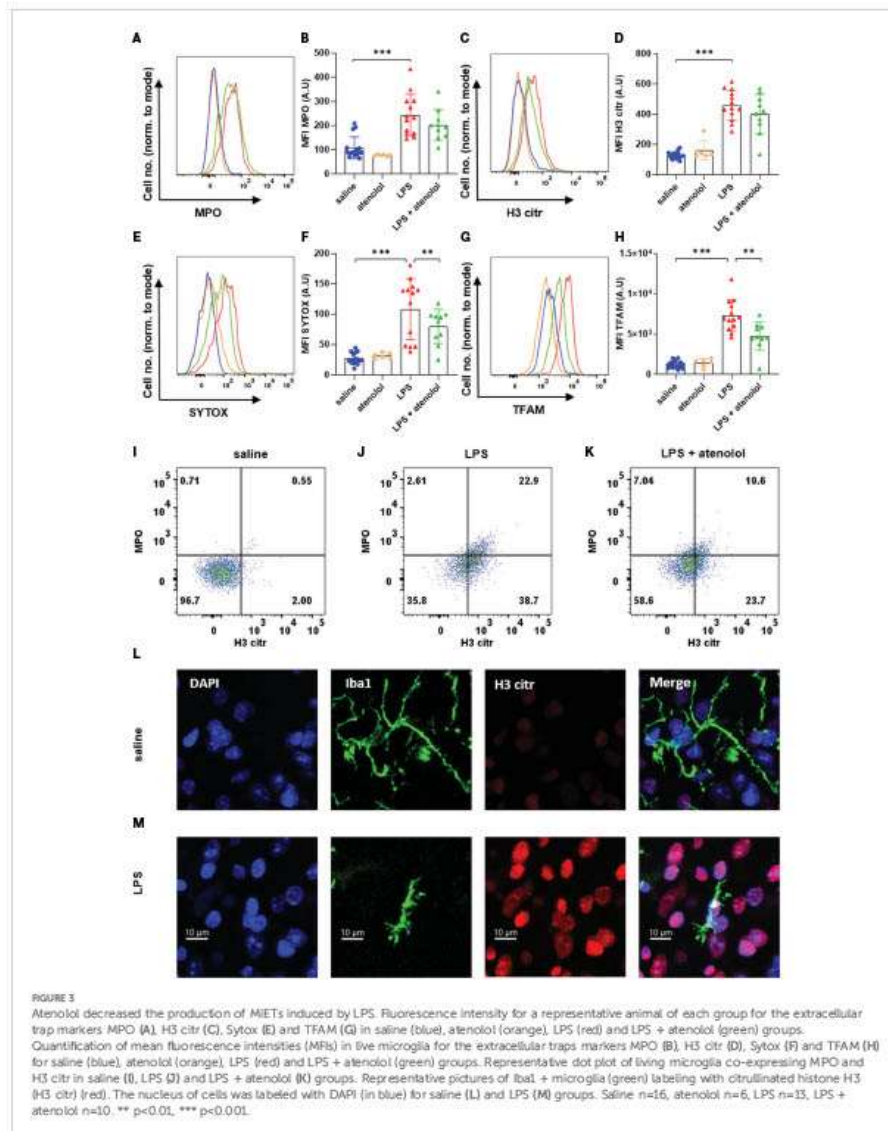




and TFAM (Figures 3G, H) and tended to reduce the expression of MPO (Figures 3A, B) and H3 citr (Figures 3C, D) compared to the LPS group. As expected, the administration of atenolol alone (atenolol group) had no significant effect on the expression of MPO in neutrophils (Figure 2B) and microglia (Figure 3B), H3 citr in neutrophils (Figure 2D) and microglia (Figure 3D), SYTOX in neutrophils (Figure 2F) and microglia (Figure 3F), and TFAM in

neutrophils (Figure 2H) and microglia (Figure 3H) compared to the saline group.

We also evaluated the frequency of neutrophils and microglia co-expressing H3 citr and MPO, which is a better proxy for ET formation. An increased expression of MPO alone, for instance, could reflect cell degranulation. We found an increase in the co-expression of H3 citr and MPO following LPS injection in both



neutrophils and microglia (Figures 2J and 3) respectively) compared to the saline group (respectively Figures 2I and 3I). The administration of atenolol in LPS-treated animals (LPS + atenolol group) reduced the proportion of neutrophils (Figure 2K) or

microglia (Figure 3K) positive for MPO and H3 citr co-labeling compared to the LPS group (respectively Figures 2J and 3J).

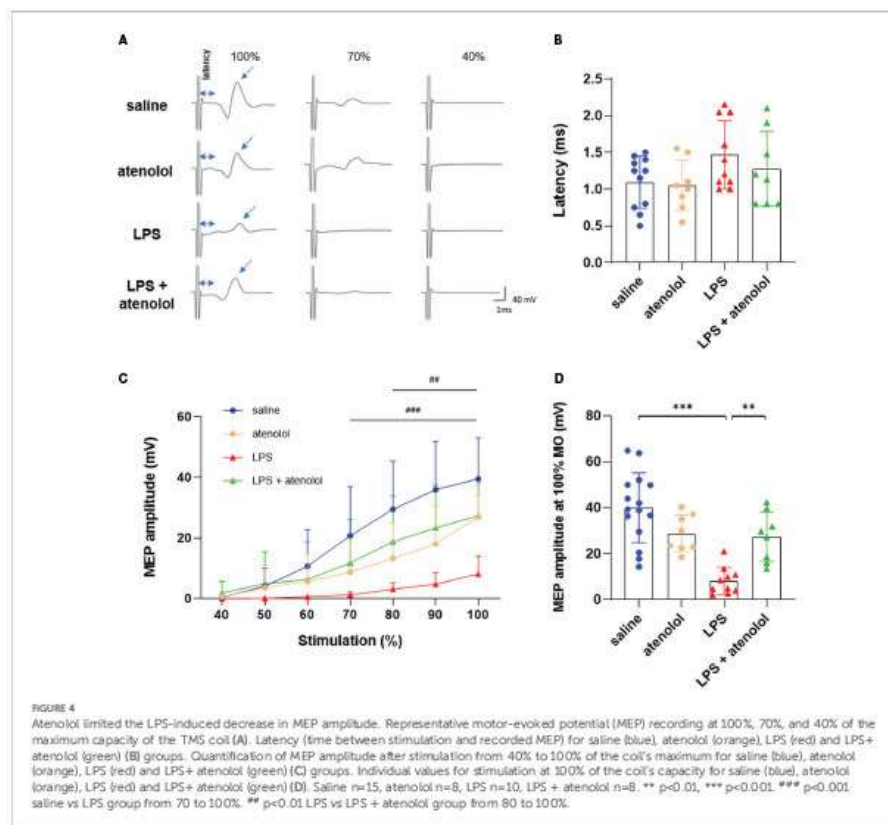
To deepen our analysis, we also identified ET formation in neutrophils and microglia on fixed spinal cord tissue. We visualized

the intraspinal NET production using a neutrophil-specific marker (Ly6G) combined with a marker of ETs (H3 citr) in LPS-treated animals. Among the neutrophils (Ly6G<sup>+</sup> cells), a H3 citr labeling was observed outside the cell contour (white arrow) (Figure 2L) as well as a MPO labeling (Figure 2M). A similar observation was performed for microglia (identified as Iba1<sup>+</sup> cells) for H3 citr expression in the LPS and saline group (Figures 3L, M).

### 3.4 Atenolol preserved motoneuronal excitability in endotoxemic mice

$\beta$ 1-adrenergic blockers have a negative effect on the production of ETs. We wondered whether this antagonist could also have an impact on the motoneuronal excitability during severe

inflammation. To address this question, gastrocnemius motor-evoked potentials were assessed in all groups (Figure 4). No significant difference was found in terms of latency (i.e., the delay between the stimulation artifact and the beginning of the motor-evoked potential, MEP), which represents the conduction velocity (Figure 4B). However, the administration of LPS reduced the gastrocnemius MEP amplitude 22 hours after the injection. This reduction was significant from 70% to 100% maximum output (MO) for the LPS group compared to saline-injected animals ( $8.15 \pm 5.89$  vs.  $39.93 \pm 15.16$  mV, respectively,  $p < 0.001$ ). Interestingly, atenolol injection in LPS animals preserved gastrocnemius MEP amplitude (ranging from 80% to 100% MO) compared to LPS alone (Figures 4A, C, D). The administration of atenolol alone (atenolol group) had no significant effect on gastrocnemius MEP amplitude compared to the saline group (Figures 4C, D).





### 3.5 Sivelestat decreased spinal ET production in endotoxemic mice

$\beta$ 1-adrenergic blockers have overall anti-inflammatory effects. We wondered whether the decrease in gastrocnemius MEP amplitude we observed could be related to the increase in ET production by neutrophils and microglia after atenolol administration. To test this hypothesis, we used sivelestat, an inhibitor of the neutrophil elastase involved in the formation of ETs (41, 42).

We first verified the effect of sivelestat on NET and MET production in our preclinical model of severe inflammation. As expected, the injection of sivelestat in LPS animals (LPS + sivelestat group) significantly reduced MPO (Figure 5A), H3 citr (Figure 5B), SYTOX (Figure 5C) and TFAM (Figure 5D) expression in neutrophils compared to the saline-injected LPS group. Similar results were observed in microglia with sivelestat injection in LPS animals, i.e., a significant reduction in MPO (Figure 5E), H3 citr (Figure 5F), SYTOX (Figure 5G) and TFAM (Figure 5H) expression compared to the saline-injected LPS group. In the same way, the injection of sivelestat in LPS-treated animals (LPS + sivelestat group) reduced the proportion of neutrophils (Figure 5K) and microglia (Figure 5N) positive cells for the combined MPO and H3 citr markers compared to the LPS group (respectively Figures 5J, M).

The administration of sivelestat alone (sivelestat group) had no significant effects on the expression of all the ET markers in neutrophils (respectively Figures 5A–D) and microglia (respectively Figures 5E–H) compared to the saline group.

### 3.6 ET formation was directly involved in motoneuronal excitability

Gastrocnemius MEPs were then recorded in animals injected with sivelestat. The sivelestat administration in the LPS and saline groups had no effect on nerve conduction evaluated by latency analysis (Figures 6A, B). Interestingly, the reduction in ET formation following the sivelestat injection in LPS-treated animals (LPS + sivelestat group) preserved the gastrocnemius MEP amplitude (significant from 80% to 100% MO) compared to the LPS group ( $26.13 \pm 5.78$  vs.  $8.15 \pm 5.89$  mV, respectively,  $p < 0.01$ ), (Figures 6C, D).

## 4 Discussion

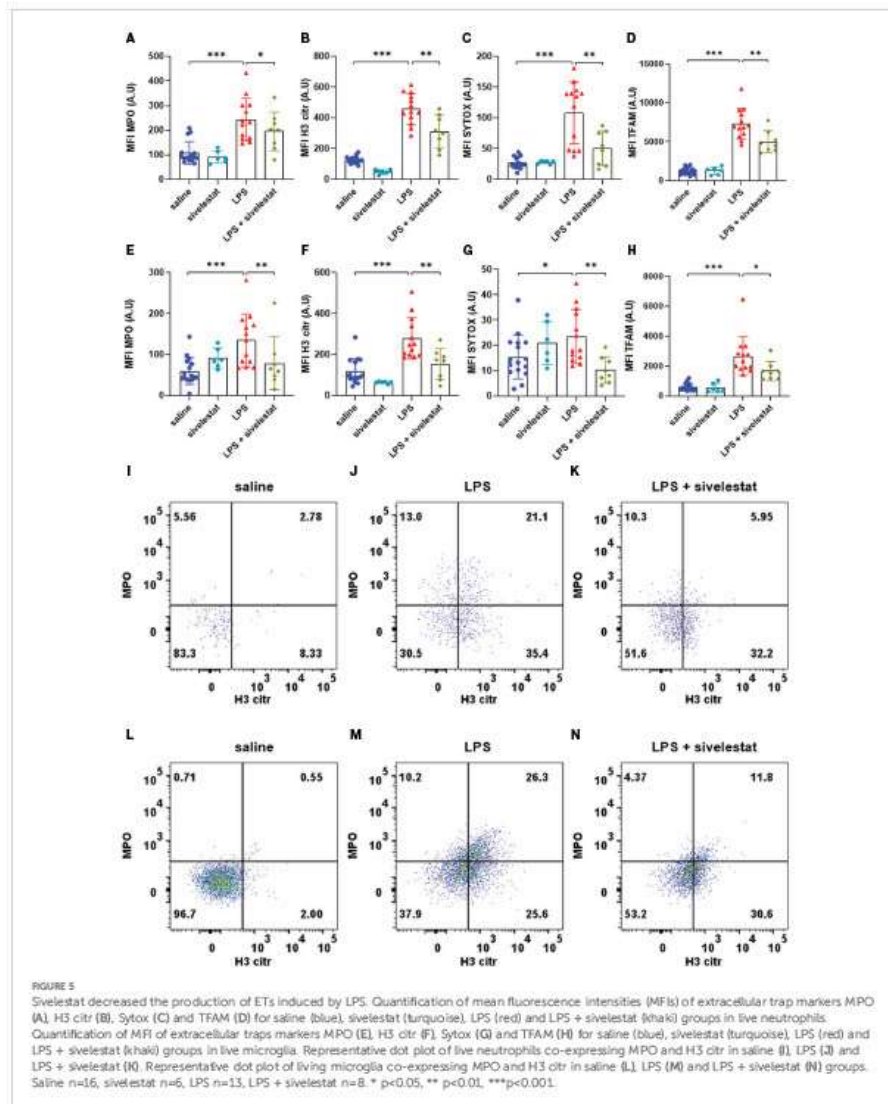
In this study, we showed for the first time that infiltrating neutrophils and microglia formed ETs in the spinal cord during endotoxemic shock. This production was associated with a reduction in motoneuronal excitability. Interestingly, the inhibition of ET production by  $\beta$ 1-adrenergic blockers or a specific ET inhibitor (sivelestat) partially preserved motoneuronal function.

Neutrophils are peripheral immune cells known to display upregulation of their activities during severe inflammation, associated with infiltration of the CNS (14, 43) as shown in

Supplemental Figure 3. This infiltration is due to an increase in leukocyte diapedeses or permeabilization of the blood–spinal cord barrier (BSCB), as shown in Supplemental Figure 4, facilitating the passage of these cells into the CNS (11). Neutrophils are also known for producing ETs (17) in various infectious or autoimmune pathologies and in different organs such as spinal cord tissue (21, 24, 44). However, the formation of ETs in the CNS during severe inflammation has never been described before and is not limited to neutrophils. As observed in this study, microglia can also produce ETs, as already observed *in vitro* (28) and *in vivo* (26, 27) in other pathologies impacting CNS homeostasis.

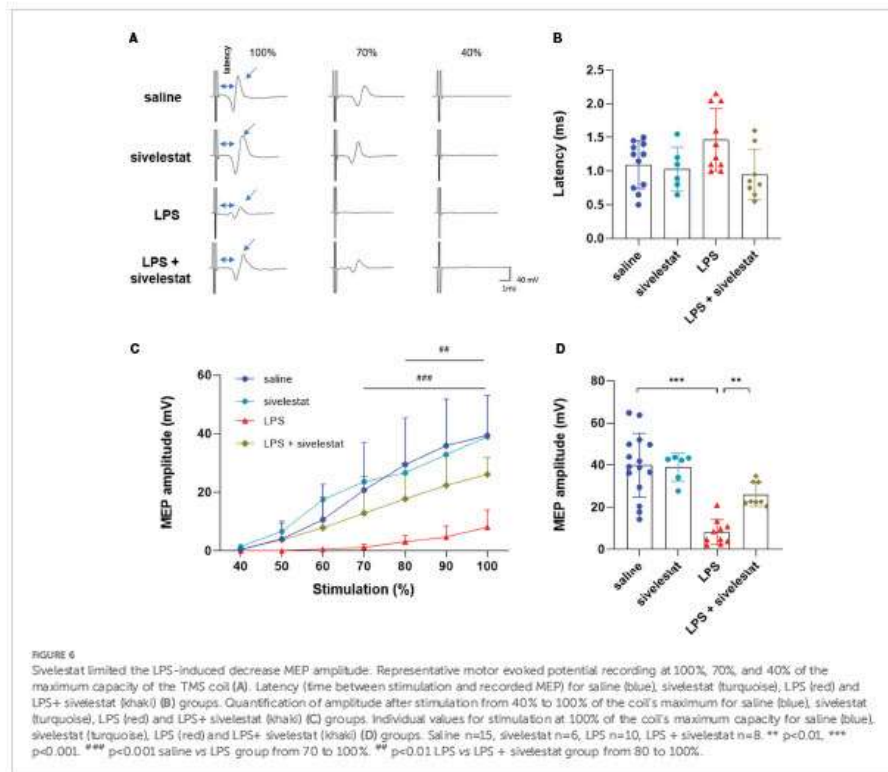
With dysregulation of ET production, adverse effects have been observed, such as vascular occlusion (18) and organ dysfunction (19, 20). These may be due to the intrinsic properties of ETs and the future of the cells that release them. Two types of ET have been observed: vital and suicidal. The fundamental differences are the nature of the inciting stimuli and the timing of the ET release. The formation of suicidal ETs has been primarily demonstrated in the context of chemical stimulation such as PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) and requires hours (45). In contrast, the formation of vital ETs has been demonstrated with microbial molecular models, particularly after LPS administration, and is achieved much faster (45). Thus, the analysis of ET formation in this present study was restricted, to the vital form with the expression of specific ET cell markers on alive cells with intact membranes. We also analyzed the combination of markers such as H3 citr and MPO, considered representative of specific vital ETs formation (46). H3 citr is involved in chromatin decondensation, and MPO, a granular enzyme, is involved in nuclear decondensation. In addition to H3 citr and MPO for ET labeling, SYTOX, a DNA intercalant agent, and TFAM, a protein associated with mitochondrial DNA (40, 47), were used. While the four markers confirmed the production of ETs during severe inflammation for neutrophils and microglia, TFAM also suggested an initial production only a few hours post infection. Vital ETs are probably formed by nuclear DNA at the initial stage, and later by mitochondrial DNA (48).

Recently, it has been demonstrated that  $\beta$ 1-adrenergic receptors could modulate NET production (34, 49). In addition, a reduction in the production of ETs in the lung has been reported in COVID-19 patients following  $\beta$ 1-adrenergic blocker administration (34). However,  $\beta$ 1-adrenergic blocker administration after a massive inflammation induced by an exogenous component, such as LPS, has never been evaluated in the CNS before. This ET modulation by  $\beta$ 1-adrenergic blockers (Figures 2, 3) could be achieved either by a modulation of the number of immune cells infiltrated or by a modulation of the number of  $\beta$ 1-adrenergic receptors expressed by these immune cells. The first hypothesis is not confirmed because the percentage of neutrophils or microglia among CD45 positive cells was similar between the LPS and LPS + atenolol groups (Supplemental Figure 3). Regarding the number of  $\beta$ 1-adrenergic receptors present on immune cells, their expression at their surface has been debated. Neutrophils have long been shown to express  $\beta$ 2-adrenergic receptors on their surface but no  $\beta$ 1-adrenergic receptors (50), whereas recent studies have shown both receptors present on neutrophils (51). In this study, we confirmed that (1)



neutrophils and microglia express  $\beta$ 1-adrenergic receptors on their membrane surfaces, and (2) after systemic LPS administration, the number of membrane receptors is increased. Interestingly, the administration of  $\beta$ 1-adrenergic blockers did not significantly change the number of infiltrating neutrophils and microglia in

the spinal cord (Supplemental Figure 5), whereas a reduction in ETs production was observed in the spinal cord tissue, (Figures 2, 3) as well as a beneficial effect on neuromuscular function by preserving MEP amplitude (Figure 4). This last effect suggests a modulation of reactive oxygen species production in motoneurons. This oxidative



stress is a common denominator in the pathology of neurodegenerative disorders.

To determine whether a direct link exists between the decrease in ET production after  $\beta$ 1-blocker administration and the preservation of neuromuscular excitability, we injected a specific inhibitor of ET production. Sivelestat specifically inhibits elastase, which is required during the initial step of ET formation. Following the sivelestat injection, ET production was reduced (Figure 5), and MEP amplitude preservation was observed (Figure 6). This result suggests a deleterious role of ETs on neuromuscular function in our endotoxemic mice model, similar to what has been demonstrated in other pathologies, such as spinal cord injury, when inhibitors of ETs were administered. An improvement in motor function was observed following the administration of ET inhibitors such as Cl-amidine, which inhibits the enzyme peptidylarginine deiminase 4 (PAD4), involved in histone citrullination (24), based on the Basso, Beattie, and Bresnahan test score (BBB Score), or sivelestat, based on PEM amplitude and the BBB score (52). In sepsis, a study showed positive effects on neuromuscular function following the administration of ulinastatin, an inhibitor of serine proteases

including elastase, which potentially allowed inhibiting the production of ETs, without having mentioned it (13).

#### 4.1 Limits of the study and interest for humans

The concentration of  $\beta$ 1-blockers was determined to limit significant effects on cardiovascular parameters such as heart rate and arterial pressure in our model (heart rate:  $-8.7 \pm 1.8\%$  of baseline value and mean arterial pressure:  $-12.5 \pm 4.8\%$  of baseline value at 6 hours post LPS injection and 10 minutes post atenolol administration). Moreover, atenolol has a good  $\beta$ 1-adrenergic receptor specificity and a sufficient half-life for our protocol (53).

Interestingly, gastrocnemius MEPs (latency and amplitude) can at least partly reflect the state of the motor neurons, the nerve conduction, the neuromuscular junction, and the state of muscular contractility. LPS model being characterized by a systemic inflammation, we cannot rule out that the observed functional effect (MEP amplitude reduction) was not also partly due to muscle inflammation through, for example,



ET production by neutrophils and monocytes or monocyte-derived macrophages that infiltrate the muscles.

## 4.2 Conclusion

In conclusion, our results show that LPS increased neutrophil infiltration in the spinal cord, activated microglia cells, led to ET formation, and decreased neuromuscular function. Moreover, the results showed a beneficial effect of  $\beta$ 1-adrenergic blocker administration on ET formation and neuromuscular function evaluated by MEP amplitude. The link between ETs and neuromuscular function was confirmed following the administration of a specific inhibitor of ETs. Thus, the modulation of ET formation during inflammatory-related diseases could have beneficial effects on patients to limit neuromuscular function disagreements. It could also be beneficial for other neuroinflammatory pathologies associated with motor function disorders, such as spinal cord injuries.

## Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

## Ethics statement

The animal studies were approved by Ethics committee of the University of Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines (CEEA-47; APAFIS #38573-2022082610387745 v4). The studies were conducted in accordance with the local legislation and institutional requirements. Written informed consent was not required from the owners for the participation of their animals in the study in accordance with local legislation and institutional requirements.

## Author contributions

CB: conceptualization, investigation, formal analysis, visualization, project administration, writing—original draft and review and editing. PM-F: conceptualization, methodology, investigation and writing—review and editing. LE: investigation, formal analysis, review and editing. LA: investigation, formal analysis, review and editing. AG: investigation, review and editing. SV: conceptualization, methodology, supervision, project administration, funding acquisition and writing—review and editing. AM: conceptualization, methodology, supervision, project administration, funding acquisition and writing—review and editing. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## Funding

This work was supported by funding from the Chancellerie des Universités de Paris (Legs Poix) (SV), INSERM (SV, AM),

Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines (SV, AM) and Fondation pour la recherche médicale (LE, ECO202106013756). The supporters had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

## Acknowledgments

Image acquisition and analysis/cytometry experiments and analysis were performed on CYMAGES facility, part of UVSQ-Paris Saclay University, (78180 Montigny-le-Bretonneux, France).

## Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

## Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1228374/full#supplementary-material>

### SUPPLEMENTARY FIGURE 1

Experimental protocol. A single injection of lipopolysaccharides (LPS) was used to create our preclinical endotoxemic shock model. Mice were divided in different groups: LPS group (A), LPS + atenolol (atenolol was injected 6 hours after LPS injection) (A), LPS + sivelestat group (sivelestat injected at 4 hours (0.0 mg/kg), 8 hours (20 mg/kg), and 12 hours (20 mg/kg) after LPS injection) (B). Controls groups were also used for each condition: saline group (NaCl 0.9%) (A), atenolol group (atenolol was injected 6 hours after the injection saline) (A), and sivelestat group (3 of sivelestat injections 4, 8, and 12 hours after saline injection) (B).

### SUPPLEMENTARY FIGURE 2

Gating strategy for neutrophils and microglia. Gating strategy used to differentiate CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>hi</sup> microglia and CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>lo</sup> Ly6G<sup>+</sup> neutrophils for a representative animal of saline, LPS, and LPS + atenolol groups.

### SUPPLEMENTARY FIGURE 3

Frequency of neutrophils and microglia among living cells in spinal cord. Flow cytometry analysis of the frequency of neutrophils among living cells, in the saline, atenolol, LPS, and LPS + atenolol (A) groups. Flow cytometry analysis of the frequency of microglia among living cells, in saline, atenolol, LPS and LPS + atenolol groups (B) groups. Representative picture of entire spinal cord transversal section (low thoracic to high lumbar segment), labeled with Ly6G (neutrophil marker, green), for saline and LPS groups (C), counterstained with DAPI (blue). The grey matter is delimited with white dashed line. \*\*\* p<0.001.

## SUPPLEMENTARY FIGURE 4

LPS administration promoted blood–spinal cord barrier disruption. Quantification of Evans blue (EB) leakage in cervical spinal cord (A). Representative fluorescence image of FITC (green) in blood vessels in cervical ventral spinal cord for saline and LPS groups (B). White arrow show an increase in FITC leakage from blood vessel in the LPS group. \*\*\*  $p < 0.001$ .

## SUPPLEMENTARY FIGURE 5

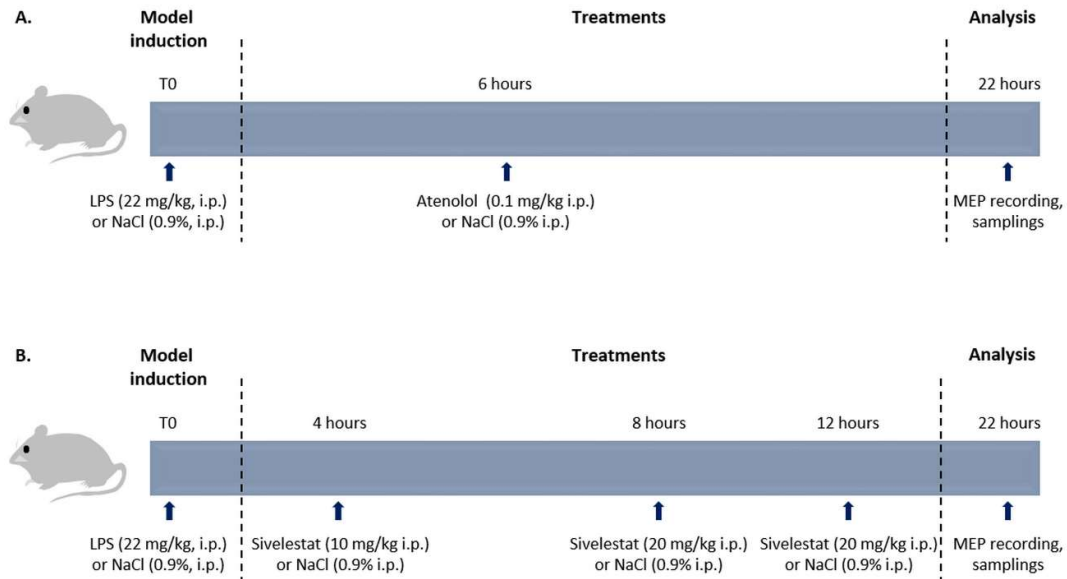
LPS increased the expression of  $\beta_1$ -adrenergic receptors in neutrophils and microglia. Fluorescence intensity for a representative animal of each group for blood neutrophils (A), neutrophils in spinal cord (B), and microglia (C). Quantification of mean fluorescence intensity (MFI) of  $\beta_1$ -adrenergic receptors (ADRB1) on blood neutrophils (D), spinal cord neutrophils (E) and microglia (F). \*\*\*  $p < 0.001$ .

## References

- Di Filippo M, Sarchielli P, Picconi B, Calabresi P. Neuroinflammation and synaptic plasticity: theoretical basis for a novel, immune-centred, therapeutic approach to neurological disorders. *Trends Pharmacol Sci* (2008) 29:402–12. doi: 10.1016/j.tips.2008.06.005
- Mazeraud A, Pascal Q, Verdonk F, Heming N, Chrétien F, Sharshar T. Neuroanatomy and physiology of brain dysfunction in sepsis. *Clinics Chest Med* (2016) 37:333–45. doi: 10.1016/j.ccm.2016.01.013
- Sharshar T, Bozza F, Chrétien F. Neuropathological processes in sepsis. *Lancet Neurol* (2014) 13:534–6. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70064-X
- Li Y, Yin L, Fan Z, Su B, Chen Y, Ma Y, et al. Microglia: a potential therapeutic target for sepsis-associated encephalopathy and sepsis-associated chronic pain. *Front Pharmacol* (2020) 11:600421. doi: 10.3389/fphar.2020.600421
- Scheff JC, Bierbrauer J, Weber-Carstens S. Intensive care unit-acquired weakness (ICUAW) and muscle wasting in critically ill patients with severe sepsis and septic shock. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* (2010) 1:147–57. doi: 10.1007/s13539-010-0010-6
- Jolley SE, Bunnell AE, Hough CL. ICU-acquired weakness. *CHEST* (2016) 150:1129–40. doi: 10.1016/j.chest.2016.03.045
- Ren C, Yao R, Zhang H, Peng Y, Yao Y. Sepsis-associated encephalopathy: a vicious cycle of immunosuppression. *J Neuroinflamm* (2020) 17:14. doi: 10.1186/s12974-020-1701-3
- Tauber SC, Djukić M, Gossner J, Effert H, Brück W, Nau R. Sepsis-associated encephalopathy and septic encephalitis: an update. *Expert Rev Anti Infect Ther* (2021) 19:215–31. doi: 10.1080/14787210.2020.1812384
- Meneses G, Gádenas G, Espinosa A, Rassy D, Pérez-Osorio IN, Bárcena B, et al. Sepsis: developing new alternatives to reduce neuroinflammation and attenuate brain injury. *Ann New York Acad Sci* (2019) 1437:43–56. doi: 10.1111/nyas.13985
- Widmann CN, Heneka MT. Long-term cerebral consequences of sepsis. *Lancet Neurol* (2014) 13:630–6. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70017-1
- Peng X, Luo Z, He S, Zhang L, Li Y. Blood-brain barrier disruption by lipopolysaccharide and sepsis-associated encephalopathy. *Front Cell Infect Microbiol* (2021) 11:768108. doi: 10.3389/fcimb.2021.768108
- Nardelli P, Khan J, Powers R, Cope TC, Rich MM. Reduced motoneuron excitability in a rat model of sepsis. *J Neurophysiol* (2013) 109:1775–81. doi: 10.1152/jn.00936.2012
- Xie F, Min S, Chen J, Yang J, Wang X. Ulinastatin inhibited sepsis-induced spinal inflammation to alleviate peripheral neuromuscular dysfunction in an experimental rat model of neuromyopathy. *J Neurochemistry* (2017) 143:225–35. doi: 10.1111/jnc.14145
- Singer BH, Newstead MW, Zeng X, Cooke CL, Thompson RC, Singer K, et al. Cecal ligation and puncture results in long-term central nervous system myeloid inflammation. *PLoS One* (2016) 11:e0149136. doi: 10.1371/journal.pone.0149136
- Liu P, Wang X, Yang Q, Yan X, Fan Y, Zhang S, et al. Collaborative action of microglia and astrocytes mediates neutrophil recruitment to the CNS to defend against *Escherichia coli* K1 infection. *Int J Mol Sci* (2022) 23:6540. doi: 10.3390/ijms23126540
- Rosales C. Neutrophil: a cell with many roles in inflammation or several cell types? (2018). (Accessed October 28, 2022).
- Brinkmann V, Reichard U, Gossmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* (2004) 303:1532–5. doi: 10.1126/science.1092385
- Tanaka K, Koike Y, Shimura T, Ohtgami M, Ide S, Toyama Y, et al. In vivo characterization of neutrophil extracellular traps in various organs of a murine sepsis model. *PLoS One* (2014) 9:e111888. doi: 10.1371/journal.pone.0111888
- Czaikowski PG, Mota JM, Nascimento DC, Sonego F, Castanheira FV e S, Melo PH, et al. Neutrophil extracellular traps induce organ damage during experimental and clinical sepsis. *PLoS One* (2016) 11:e0148142. doi: 10.1371/journal.pone.0148142
- Shen X, Cao K, Jiang J, Guan W, Du J. Neutrophil dysregulation during sepsis: an overview and update. *J Cell Mol Med* (2017) 21:1687–97. doi: 10.1111/jcmm.13112
- Michel-Hautot P, Bourcier CH, Emann L, Gasser A, Glatigny S, Vinit S, et al. Extracellular traps formation following cervical spinal cord injury. *Eur J Neurosci* (2023) 57:692–704. doi: 10.1111/ejn.15902
- Guo Y, Zeng H, Gao C. The role of neutrophil extracellular traps in central nervous system diseases and prospects for clinical application. *Oxid Med Cell Longev* (2021) 2021:9931742. doi: 10.1155/2021/9931742
- Chen Y, Zhang H, Hu X, Cai W, Ni W, Zhou K. Role of NETosis in central nervous system injury. *Oxid Med Cell Longev* (2022) 2022:235524. doi: 10.1155/2022/235524
- Feng Z, Min L, Liang L, Chen B, Chen H, Zhou Y, et al. Neutrophil extracellular traps exacerbate secondary injury via promoting neuroinflammation and blood–spinal cord barrier disruption in spinal cord injury. *Front Immunol* (2021) 12:698249. doi: 10.3389/fimmu.2021.698249
- Prinz M, Jung S, Priller J. Microglia biology: one century of evolving concepts. *Cell* (2019) 179:292–311. doi: 10.1016/j.cell.2019.08.053
- Agrawal I, Sharma N, Saxena S, Arvind S, Chakraborty D, Chakraborty D, et al. Dopamine induces functional extracellular traps in microglia. *iScience* (2021) 24:101968. doi: 10.1016/j.isci.2020.101968
- Eto SF, Fernandes DC, Funnick MJ, Alccim JVC, Sousa PG, Carvalho FCA, et al. Microglia extracellular traps in *Oreochromis niloticus* infected with *Weiella ciliaris*. *Fish Shellfish Immunol* (2021) 113:148–53. doi: 10.1016/j.fsi.2021.03.020
- Wang C, Wang Y, Shi X, Tang X, Cheng W, Wang X, et al. The TRAPs from microglial vesicles protect against *Listeria* infection in the CNS. *Front Cell Neurosci* (2019) 0:199. doi: 10.3389/fncel.2019.00199
- Morelli A, Ermer C, Westphal M, Rehberg S, Kampmeier T, Ligges S, et al. Effect of heart rate control with esmolol on hemodynamic and clinical outcomes in patients with septic shock: a randomized clinical trial. *JAMA* (2013) 304:1683–90. doi: 10.1001/jama.2013.278677
- Yang S, Liu Z, Yang W, Zhang G, Hou B, Liu J, et al. [Effects of the  $\beta$ -blockers on cardiac protection and hemodynamics in patients with septic shock: a prospective study]. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* (2014) 26:714–7. doi: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.10.007
- Hagiwara S, Iwasaki H, Maeda H, Takayuki N, Landiolol, an ultrashort-acting beta<sub>1</sub>-adrenoceptor antagonist, has protective effects in an LPS-induced systemic inflammation model. *Shock (Augusta Ga)* (2008) 31:515–20. doi: 10.1097/SHK.0b013e3181863689
- Sundt T, Moriuchi H, Serita R, Yamamoto M, Kotake Y, Ishiura A, et al. Infusion of the beta-adrenergic blocker esmolol attenuates myocardial dysfunction in septic rats. *Crit Care Med* (2005) 33:294–301. doi: 10.1097/CCM.0000000000000182
- Johansson M, Bernberg E, Ulleryd M, Bergström G. Metoprolol reduces proinflammatory cytokines and atherosclerosis in ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Atheroscler Suppl - ATHEROSCLER Suppl* (2011) 12:71–1. doi: 10.1016/S1567-5688(11)70329-4
- Clemente-Moragón A, Ince MJ M, Oliver E, Santos A, Flandes J, Fernández I, et al. Metoprolol in critically ill patients with COVID-19. *J Am Coll Cardiol* (2021) 78:1001–11. doi: 10.1016/j.jacc.2021.07.003
- García-Prieto I, Villena-Gutiérrez R, Gómez M, Bernardo E, Pun-García A, García-Lunar I, et al. Neutrophil stunning by metoprolol reduces infarct size. *Nat Commun* (2017) 8:4780. doi: 10.1038/ncomms4780
- Kumar H, Choi H, Jo M, Joo H, Mutig M, Bonanni D, et al. Neutrophil elastase inhibition effectively rescued angiotensin I decrease and inhibits glial scar after spinal cord injury. *Acta Neuropathologica Commun* (2018) 6:73. doi: 10.1186/s40478-018-0056-3
- Gorre F, Vandekekerckhove H. Beta-blockers: focus on mechanism of action. Which beta-blocker, when and why? *Acta Cardiologica* (2010) 65:565–70. doi: 10.1080/AC.65.5.2096244
- Michel-Hautot P, Jessu I, Mansart A, Bonay M, Lee K-Z, Auré K, et al. Evaluation of gastrocnemius motor evoked potentials induced by trans-spinal magnetic stimulation following tibial nerve crush in rats. *Biol (Basel)* (2022) 11:1834. doi: 10.3390/biology11121834
- Vinit S, Keomani E, Deramaudt TR, Spruance VM, Besudhaya T, Lane MA, et al. Interdisciplinary approaches of transcranial magnetic stimulation applied to a respiratory neuronal circuitry model. *PLoS One* (2014) 9:e113251. doi: 10.1371/journal.pone.0113251
- Kloss CUA, Bohatschek M, Kreutzberg GW, Raivich G. Effect of lipopolysaccharide on the morphology and integrin immunoreactivity of ramified microglia in the mouse brain and in cell culture. *Exp Neurol* (2001) 168:32–46. doi: 10.1006/exnr.2000.7575
- Farge G, Laurent N, Brodmanns OD, van den Wildenberg SMJJ, Dekker LCM, Gaspari M, et al. Protein sliding and DNA denaturation are essential for DNA organization by human mitochondrial transcription factor A. *Nat Commun* (2012) 3:1013. doi: 10.1038/ncomms1001

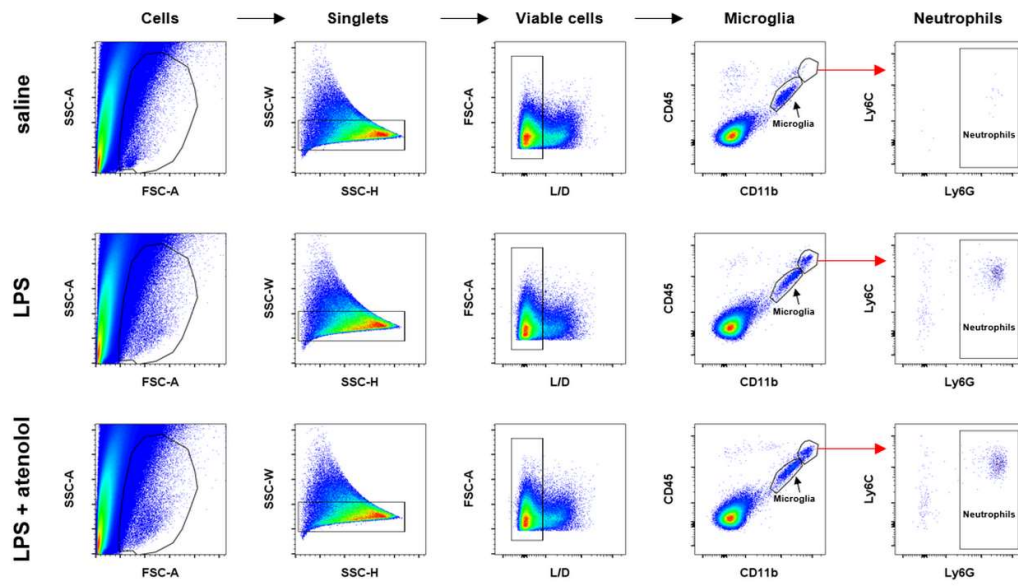


42. Kang D, Kim SH, Hamaaki N. Mitochondrial transcription factor A (TFAM) roles in maintenance of mtDNA and cellular functions. *Mitochondrion* (2007) 7:39–44. doi: 10.1016/j.mito.2006.11.017
43. Martinod K, Witsch T, Farley K, Gallant M, Remold-O'Donnell E, Wagner DD. Neutrophil elastase-deficient mice form neutrophil extracellular traps in an experimental model of deep vein thrombosis. *J Thromb Haemostas* (2016) 14:551–8. doi: 10.1111/jth.13239
44. Okéke EB, Louth C, Fry C, Najafabadi AH, Han K, Nemzek J, et al. Inhibition of neutrophil elastase prevents neutrophil extracellular trap formation and rescues mice from endotoxic shock. *Biomaterials* (2020) 238:119836. doi: 10.1016/j.biomaterials.2020.119836
45. Comin CM, Vilela MC, Constantino IS, Petroullo F, Vuolo F, Lacerda-Queiroz N, et al. Traffic of leukocytes and cytokine up-regulation in the central nervous system in sepsis. *Intensive Care Med* (2011) 37:711–8. doi: 10.1007/s00134-011-2151-2
46. Jin Z, Sun J, Song Z, Chen K, Nicolas YSM, Ke R, et al. Neutrophil extracellular traps promote scar formation in post-epidural fibrosis. *NPJ Regen Med* (2020) 5:1–9. doi: 10.1038/s41536-020-00103-1
47. Yipp BG, Kubes P. NETosis: how vital is it? *Blood* (2013) 122:2784–94. doi: 10.1182/blood-2013-04-457671
48. Chami B, Ahmad G, Schroder A, Gabriel PS, Witting P. The role of myeloperoxidase and neutrophil extracellular traps in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* (2021) 160:55–6. doi: 10.1053/j.gastro.2021.01.044
49. Keshari RS, Jyoti A, Kumar S, Dubey M, Verma A, Srinag BS, et al. Neutrophil extracellular traps contain mitochondrial as well as nuclear DNA and exhibit inflammatory potential. *Cytometry A* (2012) 81:238–47. doi: 10.1002/cyto.a.21178
50. Yousefi S, Stojkovic D, Germic N, Simon D, Wang X, Benarafa C, et al. Unraveling “NETosis” from NETs. *Eur J Immunol* (2019) 49:221–7. doi: 10.1002/eji.201747053
51. Clemente-Moragón A, Gómez M, Villena-Gutiérrez R, Lalama DV, García-Prieto J, Martínez F, et al. Metoprolol exerts a non-class effect against ischaemia-reperfusion injury by abrogating exacerbated inflammation. *Eur Heart J* (2020) 41:4425–40. doi: 10.1093/eurheartj/ehaa733
52. de Coupade C, Gear RW, Dazin PF, Sroussi HY, Green PG, Levine JD.  $\beta$ 2-Adrenergic receptor regulation of human neutrophil function is sexually dimorphic. *Br J Pharmacol* (2004) 143:1033–41. doi: 10.1038/sj.bjp.0705972
53. Scanzano A, Schembri L, Rasini E, Iaini A, Dallatorre J, Legnaro M, et al. Adrenergic modulation of migration, CD11b and CD18 expression, ROS and interleukin-8 production by human polymorphonuclear leukocytes. *Inflammation Res* (2015) 64:127–35. doi: 10.1007/s00011-014-0791-8



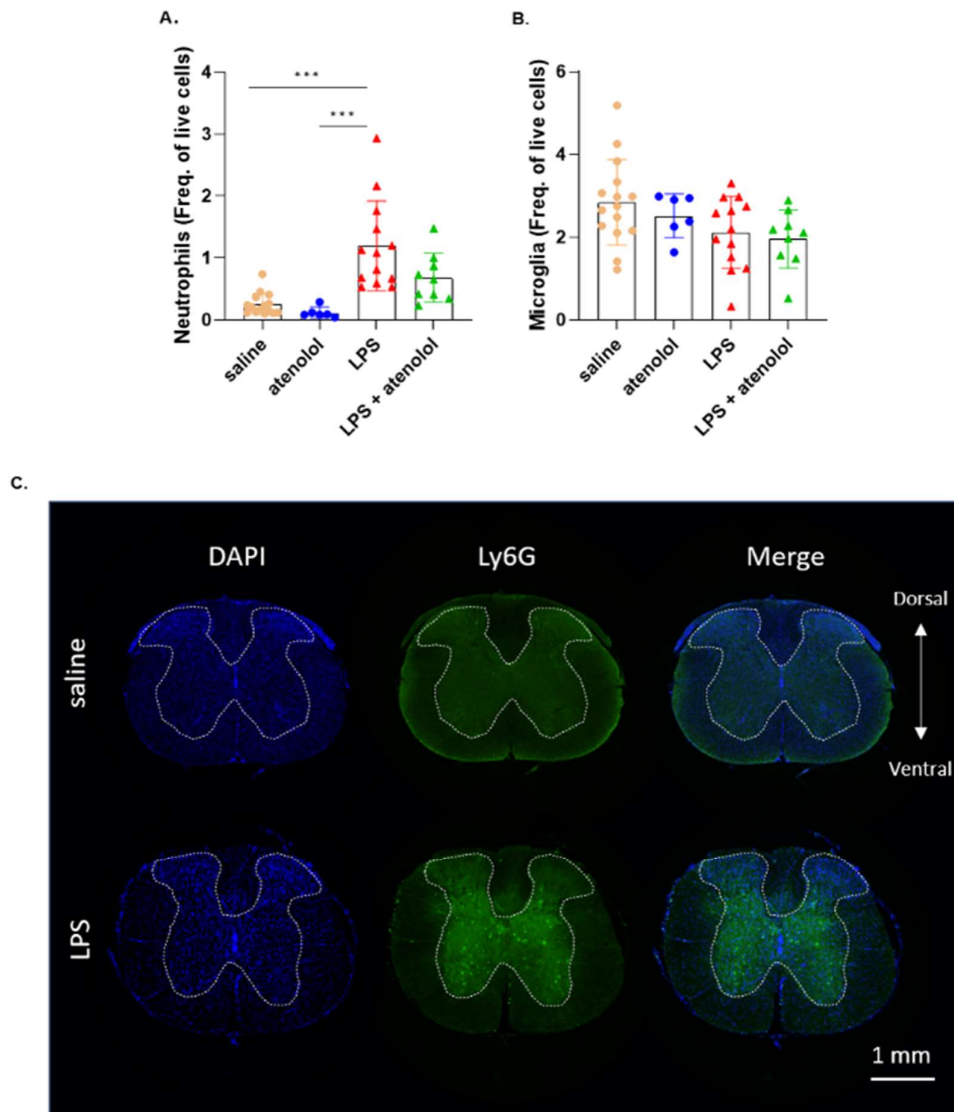
*Supplementary figure 1*

*Experimental protocol. A single injection of lipopolysaccharides (LPS) was used to create our preclinical endotoxemic shock model. Mice were divided in different groups: LPS group (A), LPS + atenolol (atenolol was injected 6 hours after LPS injection) (A), LPS + sivelestat group (sivelestat injected at 4 hours (10 mg/kg), 8 hours (20 mg/kg), and 12 hours (20 mg/kg) after LPS injection) (B). Controls groups were also used for each condition: saline group (NaCl 0.9%) (A), atenolol group (atenolol was injected 6 hours after the injection saline) (A), and sivelestat group (3 of sivelestat injections 4, 8, and 12 hours after saline injection) (B).*



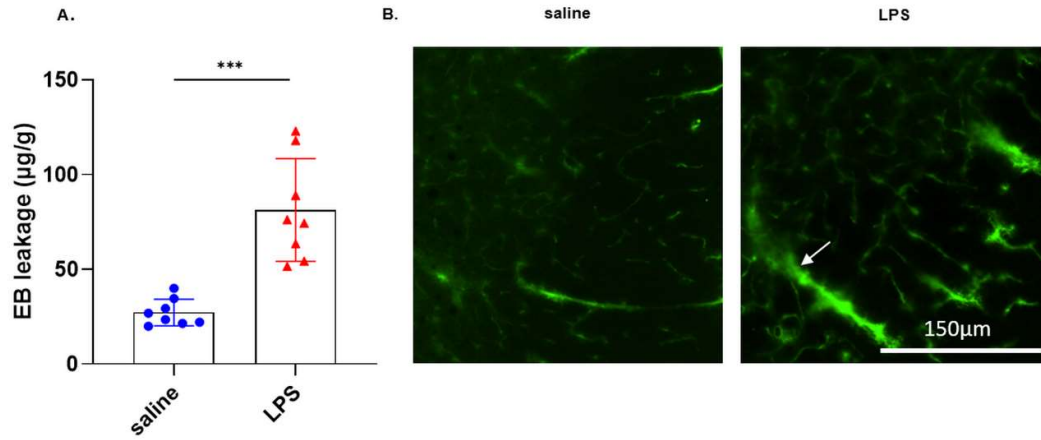
Supplementary figure 2

Gating strategy for neutrophils and microglia. Gating strategy used to differentiate CD11b<sup>+</sup> and CD45<sup>int</sup> microglia and CD11b<sup>+</sup>, CD45<sup>high</sup> and Ly6G<sup>+</sup> neutrophils for a representative animal of saline, LPS, and LPS + atenolol groups.



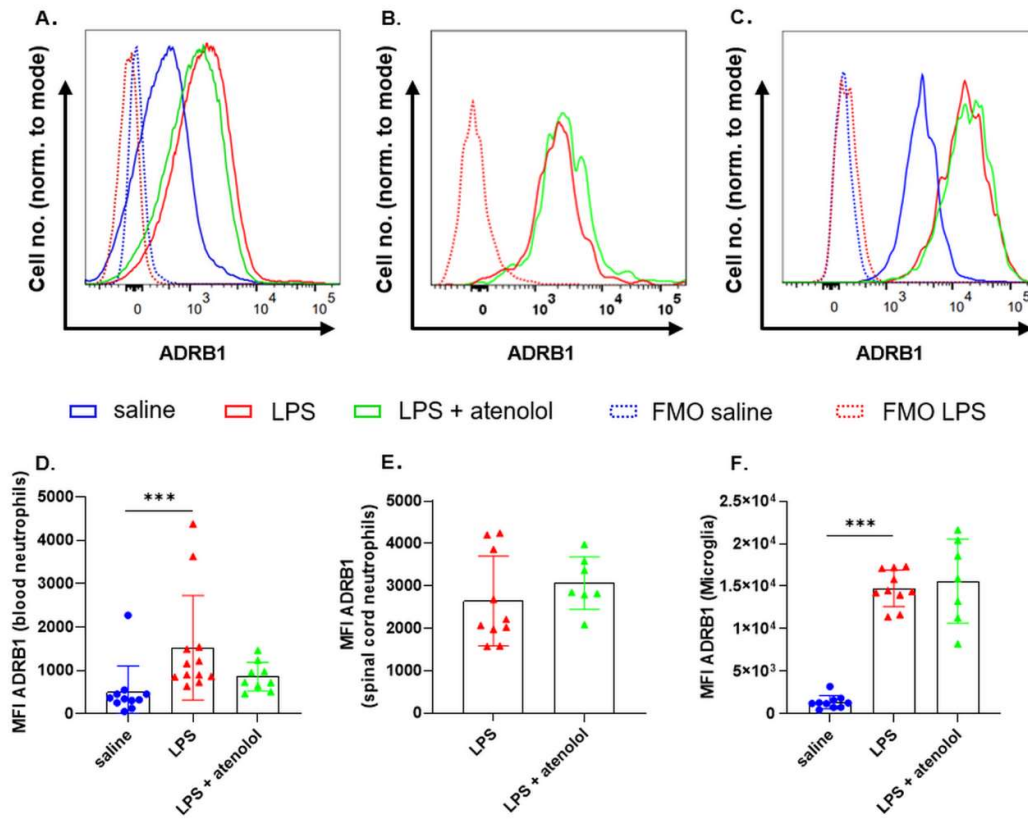
Supplementary figure 3

Frequency of neutrophils and microglia among living cells in spinal cord. Flow cytometry analysis of the frequency of neutrophils among living cells, in the saline, atenolol, LPS, and LPS + atenolol (A) groups. Flow cytometry analysis of the frequency of microglia among living cells, in saline, atenolol, LPS and LPS + atenolol groups (B) groups. Representative picture of entire spinal cord transversal section (low thoracic to high lumbar segment), labeled with Ly6G (neutrophil marker, green), for saline and LPS groups (C), counterstained with DAPI (blue). The grey matter is delimited with white dashed line. \*\*\*  $p < 0.001$ .



*Supplementary figure 4*

*LPS administration promoted blood–spinal cord barrier disruption. Quantification of Evans blue (EB) leakage in cervical spinal cord (A). Representative fluorescence image of FITC (green) in blood vessels in cervical ventral spinal cord for saline and LPS groups (B). White arrows show an increase in FITC leakage from blood vessel in the LPS group. \*\*\*  $p < 0.001$ .*



Supplementary figure 5

LPS increased the expression of  $\beta_1$ -adrenergic receptors in neutrophils and microglia. Fluorescence intensity for a representative animal of each group for blood neutrophils (A), neutrophils in spinal cord (B), and microglia (C). Quantification of mean fluorescence intensity (MFI) of  $\beta_1$ -adrenergic receptors (ADRB1) on blood neutrophils (D), spinal cord neutrophils, (E) and microglia (F). \*\*\*  $p < 0.001$ .

## Résultat complémentaire : vérification de l'infiltration tissulaire des neutrophiles

Les neutrophiles peuvent rester accrochés à l'endothélium lors de la diapédèse, ou bloqués dans des vaisseaux sanguins. Afin de vérifier que les neutrophiles que nous avons étudiés dans cet article étaient réellement infiltrés dans la moelle épinière, nous avons injecté *in vivo* chez la souris des anticorps anti-CD45, un antigène exprimé sur toutes les cellules hématopoïétiques du système immunitaire. L'anti-CD45 couplé au fluorochrome FITC a été injecté par voie intraveineuse avant le sacrifice de l'animal, marquant ainsi toutes les cellules immunitaires circulantes. Dans un second temps, les cellules ont également été marquées *in vitro* avec un anti-CD45 couplé au fluorochrome BV510. Les neutrophiles infiltrés dans les tissus seront donc BV510 positifs mais FITC négatifs. 95 à 99 % des cellules immunitaires présentes dans le sang ont été marquées en 2 minutes, alors que seulement 20 % des neutrophiles (figure 27) étaient positifs pour cet antigène dans notre section de moelle épinière (segment thoracique bas à lombaire haut) des animaux traités au LPS après lavage : cela indique que seuls 20 % des neutrophiles étudiés n'étaient pas infiltrés dans le tissu. Ce résultat nous permet de confirmer que la majorité (80 %) des cellules que nous avons étudiées sont réellement infiltrées dans la moelle épinière et ne se trouvaient dans la circulation sanguine.

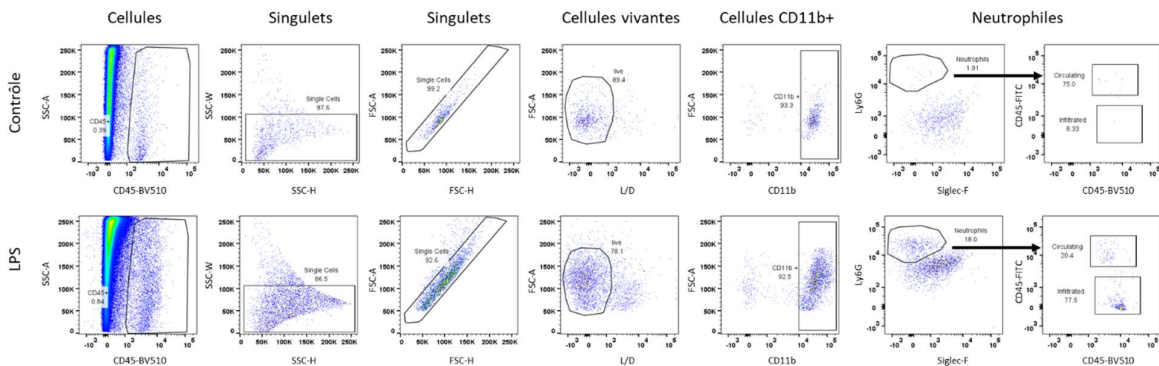


Figure 27 : Confirmation de l'infiltration des neutrophiles.

Marquages des neutrophiles présents dans les échantillons de moelle épinière à l'aide d'un anticorps CD45 conjugué au FITC injecté *in vivo*, et d'un anticorps CD45 conjugué BV510 *in vitro* afin de confirmer que les neutrophiles étudiés sont réellement infiltrés dans le tissu chez les animaux contrôles (A) ou traités au LPS (B).

### 3. CONSÉQUENCES DE LA PRODUCTION DE PIÈGES EXTRACELLULAIRES SUR LA FONCTION NEUROMUSCULAIRE AU COURS DU SEPSIS

---

Publication : **Bourcier CH**, Adam L, Emam L, Vinit S, Mansart A.

*Microglia extracellular traps produce neuromuscular dysfunction during sepsis in mice*

Cet article est en cours de rédaction : j'ai intégré dans ma thèse l'introduction, les résultats principaux ainsi que la discussion.

Au cours du projet précédent, nous avons étudié le rôle des ETs dans le SNC dans un modèle de choc endotoxinique répandu pour l'étude du sepsis mais plus inflammatoire et plus « rapide » que ce qu'il peut se passer chez l'Homme. Il était alors intéressant d'évaluer si le même processus était retrouvé dans le modèle CLP, reconnu comme moins inflammatoire et plus représentatif de ce qui est observé dans la pathologie humaine, et ce afin de confirmer le lien entre la réponse neuromusculaire et la production de ETs au cours du sepsis.

Au cours de cette étude, nous avons confirmé le caractère moins inflammatoire du modèle CLP, avec une production de cytokines plus faible que dans le modèle LPS, et avec une infiltration de neutrophiles au sein du SNC moindre dans ce modèle. Cependant, les neutrophiles infiltrés produisent des ETs, tout comme les monocytes et la microglie. Nous avons donc cherché à déterminer si la quantité produite était corrélée à l'état de la fonction neuromusculaire. Cette étude a permis de mettre en évidence que les troubles neuromusculaires semblent majoritairement induits par les MiETs indépendamment de l'inflammation, comme nous avons pu le montrer avec le sivelestat. Ces MiETs sont eux-mêmes induits par l'activation de la microglie suite à l'infiltration de neutrophiles, indiquant l'existence d'un lien indirect entre les neutrophiles et les troubles neuromusculaires, mais plus encore un lien direct entre les MiETs et les troubles neuromusculaires.



**Title****Microglia extracellular traps produce neuromuscular dysfunction during sepsis in mice****Abstract**

Sepsis via innate immune system activation causes organ dysfunction. Among these, the central nervous system (CNS) is particularly affected by sepsis-associated encephalopathies. These symptoms are linked with the activation of microglia and a potential leukocyte infiltration. These immune cells have recently been discovered to have the ability to produce extracellular traps (ETs). While these components capture and destroy pathogens, deleterious effects occur such as reduced neuronal excitability with excessive production. In this study, the objectives were to determine (1) whether immune cells form ETs in the CNS by using two current models of sepsis: lipopolysaccharide injection (LPS) and cecal ligation and puncture (CLP); (2) whether ETs produce neuromuscular disorders in these models, and (3) whether a threshold is necessary to produce these disorders. Our results demonstrate a significant systemic inflammation for both models. As expected, the LPS administration increases leukocyte infiltration into the CNS, activates immune cells and produces ETs, which interestingly directly impair the gastrocnemius motoneuron excitability. Sivelestat, an inhibitor of ET formation significantly decreases the production of ETs in both microglia and leukocytes and induces a preservation of the neuromuscular function without decrease of the inflammatory response. This infiltration of leukocytes and production of ETs is also observed using the CLP model, at a lower stage, without neuromuscular dysfunctions, suggesting that the CNS has an ET threshold to display these deleterious effects.

## Introduction

Sepsis is defined as life-threatening organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection (Singer et al. 2016). This pathology is often associated with an exacerbated production of inflammatory mediators that are mainly produced within tissues (Cavaillon et al. 2006). Although a systemic process, the pathophysiological events differ from organ to organ leading to the concept of compartmentalization. The nature of the insult, the cellular composition of each compartment and its micro-environment have a great influence on local inflammation and on tissue injury.

Brain dysfunction is a poorly explored complication of sepsis, but it contributes to the pathogenesis of sepsis, and reciprocal interactions between the immune and central nervous systems are now considered to be major components of the host response in sepsis (Sharshar et al. 2006). These interactions contribute to severe inflammation and neurological dysfunctions such as “intensive care unit-acquired weakness” (ICUAW), characterized by disorder of the neuromuscular system and a negative impact on physical function (Jolley et al. 2016; Schefold et al. 2010). Patients may also develop a complication characterized by an acutely altered mental state, a high mortality rate, and long-term cognitive impairments in surviving patients (Ren et al. 2020; Tauber et al. 2021). These consequences are due to the absence of an effective therapeutic strategy, explained by the lack of precise knowledge of pathophysiological mechanisms.

Triggering the cellular pathway of the immune system causes an excessive release of cytokines, chemokines, and other inflammatory mediators. This inflammatory response activates several immune cells and systems such as extracellular traps (ETs) formation. Described in 2004 (Brinkmann et al. 2004) and identified in most of immune cells involved in both innate and adaptive immune responses (Conceição-Silva et al. 2021), this process had been defined as a mechanism different from apoptosis and necrosis. In terms of location, ETs can be virtually seen in all tissues, and prevent the dissemination of pathogens. The presence of enzymes on their surface can degrade inflammatory mediators, which could lead to a decrease in the inflammatory process, promoting the resolution of lesions. Unfortunately, excessive production of ETs may be involved in the formation of tissue injury (Vaibhav et al. 2020) such as neurons dysfunctions and blood-brain barrier disruptions.

In this study, we hypothesized that (1) immune cells produce ETs in the CNS during sepsis, (2) these ETs are involved in the modulation of neuronal excitability, (3) based on their specific properties, ETs inhibitors should reverse the adverse effect of ET formation on neuronal excitability and (4) an ET threshold is necessary to trigger these effects. To address these questions, we used two preclinical models of sepsis in mice: endotoxemic shock by intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS) and cecal ligation and puncture (CLP). We assessed the motoneuronal excitability by recording

gastrocnemius motor-evoked potentials (MEP), as well as ETs production by immune cells located into the lumbar spinal cord, where these gastrocnemius motoneurons are located.

## Discussion

The CNS is defined as an “immune privileged site,” most likely due to the presence of the highly impenetrable blood brain barrier (BBB). However, studies have demonstrated flexibility in the BBB in response to neuroinflammation (Kanashiro et al. 2020; Patabendige et al. 2023). This process, generally defined as the response of brain cells to infection, is emerging as a central mechanism of brain dysfunction, and involves infiltration of circulating immune cells to the brain following resident immune cell activation (Mammana et al. 2018; Shastri et al. 2013). During sepsis, a systemic inflammatory disease defined as life-threatening organ dysfunction (Singer et al. 2016), the neuroinflammation contributes to neurological dysfunctions resulting in disorder of the neuromuscular system and a negative impact on physical function (Jolley et al. 2016; Schefold et al. 2010). Multiples mechanisms contribute to this damage but no specific pathway that directly addresses the underlying mechanisms of neuromuscular impairments in sepsis has currently emerged.

Whereas phagocytosis, degranulation, and oxidative killing mechanisms have been studied for decades and are now considered classical features of an important part of immune cells, the consequences of the production of ETs remains partial. Described for the first time in 2004, this process involves the extrusion of chromatin fibers outside the cell adorned with antimicrobial peptides and enzymes (Brinkmann et al. 2004). A variety of immune cells can realize this process (Gurski et al. 2022; Michel-Flutot et al. 2022) which is the result of immune cell pyroptosis, and involved two key pathways: suicidal and vital ETosis pathways (Tan et al. 2021; Yang et al. 2016). Suicidal ETosis is associated with reactive oxygen species (ROS) (Delgado-Rizo et al. 2017). The release of chromatin structures into the extracellular space is caused by osmotic pressure imbalance inside and outside the cell membrane, leading to cell death (Evavold et al. 2018). Vital ETs activated by platelets produce a large influx of calcium ions, an activation of peptidylarginase deaminase 4 (PAD4), and release of ETs (Li et al. 2020). A third pathways, defined as noncanonical, is also described. In this process, the accumulation of atypical inflammasomes and the activation of caspases lead to the relaxation of chromatin, and the extrusion of DNA (Zou et al. 2023). Despite differences, all these pathways have the same objective: the destruction of the pathogens. However, dysregulation of ET production may produce vascular occlusion, cellular dysfunction (Czaikoski et al. 2016; Shen et al. 2017), and possibly neuromuscular dysfunction (Vaibhav et al. 2020).

In the present study, we confirmed the production of these ETs in the spinal cord using a LPS model. This analyze was limited to vital ETs as they are produced much faster than suicidal, they were already observed using microbial molecular models (Comim et al. 2011), and the serotype 055:B5 employed is specific of this type of ETs (Pieterse et al. 2016). Thus, the analysis of ET formation was

restricted to specific ET cell markers on alive cells with intact membranes: H3 citr (involved in chromatin decondensation), MPO (granular enzyme), SYTOX (DNA intercalant agent), and TFAM (protein associated with mitochondrial DNA) (Kloss et al. 2001; Yipp et al. 2013). We also analyzed the combination of markers such as MPO and H3 citr, considered representative of specific vital ETs formation (Jin et al. 2020). These four markers and the combination confirmed the production of ETs (22 hours post LPS administration) in the spinal cord for circulating immune cells and microglia. This production is responsible to neuromuscular disorder as suggested by the reduction of MEP amplitude, and their negative effect was reduced following sivelestat administration. Specific inhibitor of ET production, sivelestat inhibits elastase, which is required during the initial step of ET formation.

This positive effect has already been observed following the administration of ulinastatin, an inhibitor of proteases including elastase, which allowed inhibiting the production of ETs (Xie et al. 2017) during sepsis, and in other pathologies, such as spinal cord injury. Both inhibition of ETs formation by peptidylarginine deiminase 4 (PAD4) inhibitor and disruption of ETs by DNase 1 alleviate secondary damage, thus promoting functional recovery and restraining scar formation. An improvement in motor function was also observed following the administration of ET inhibitors such as Cl-amidine, which inhibits PAD4, involved in histone citrullination (Feng et al. 2021), or sivelestat, based on PEM amplitude (de Coupade et al. 2004).

This production of ET is probably linked to the inflammatory cytokines produced within the first hours following LPS administration. The presence of inflammatory cytokines in the spinal cord is a hallmark of systemic inflammation, and treatment of immune cells from healthy subjects with TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , or IL-8 enhanced ETs formation. At the opposite, pre-incubation of plasma from SIRS with TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , or IL-8 antibodies reduced the ETs release (Keshari et al. 2012). Thus, the production of ETs probably depends of cytokines, but the negative effect on PEM is due to ET and not cytokines as sivelestat reduced ET production but not cytokines production in our LPS model. This lack of effect of a specific inhibitor of ET on cytokines production is controversial. A down-regulation of cytokines through degradation by ET products has been reported (Benabid et al. 2012) whereas others indicated an upregulation of pro-inflammatory cytokines in similar conditions (Domon et al. 2018). This difference may be due to doses of ET inhibitors, but does not call into questions the effects of sivelestat on ET and the absence of effect on cytokines in our experiments.

The LPS animal model has several essential advantages, including high reproducibility, particularly in the inflammatory response elicited. Few hours after LPS administration, high levels of pro-inflammatory cytokines are released (Remick et al. 2000). This leads to rapid development of systemic inflammatory response syndrome (Recknagel et al. 2013; Stortz et al. 2017). However, this model does not exactly reproduce the characteristic features of human sepsis (Buras et al. 2005; Deitch 1998). Thus,



we decided to reproduce our result on a cecal ligation and puncture model with a view to extrapolate the results to human in the future. This model is recognized to have significant compatibility to human sepsis (Dejager et al. 2011; Hubbard et al. 2005) with a mixed microbial flora. After CLP induction, immune, hemodynamic, and biochemical responses similar to human sepsis are produced. In line with septic patients (Chen et al. 2021), CLP mice model exhibited ET formation (Luo et al. 2014) as observed in circulating immune cells. Although this effect is observed at lower stage in spinal cord associated to a lower infiltration. These low effects cannot shift microglia toward a more proinflammatory phenotype and contribute to neuroinflammation as suggested by Hanzai Z et coll. (Hanzai Z, Aging 2021). When ramified microglia are stimulated by LPS, activation pathways cause them to transform into activated microglia which produce ET (Cai et al. 2014). In addition, excessive activation of microglia induces an increase in pro-inflammatory cytokines which maintain the loop: infection, activation of resident cells, production of cytokines and chemokines, infiltration and activation of circulating immune cells, production of ET, production of cytokines, etc. At the opposite, a too low stimulation of the microglia keeps them in a ramified morphology which maintains a more immunologically stable environment.

In conclusion, a significant systemic inflammation was observed for LPS and CLP models. As expected, the LPS administration increases leukocyte infiltration into the CNS, activates immune cells and produces ETs, which interestingly directly impair the gastrocnemius motoneuron excitability. Sivelastat, an inhibitor of ET formation significantly decreases the production of ETs in both microglia and leukocytes and induces a preservation of the neuromuscular function without decrease of the inflammatory response. This infiltration of leukocytes and production of ETs is also observed using the CLP model, at a lower stage, without neuromuscular dysfunctions, suggesting that the CNS has an ET threshold to display these deleterious effects.

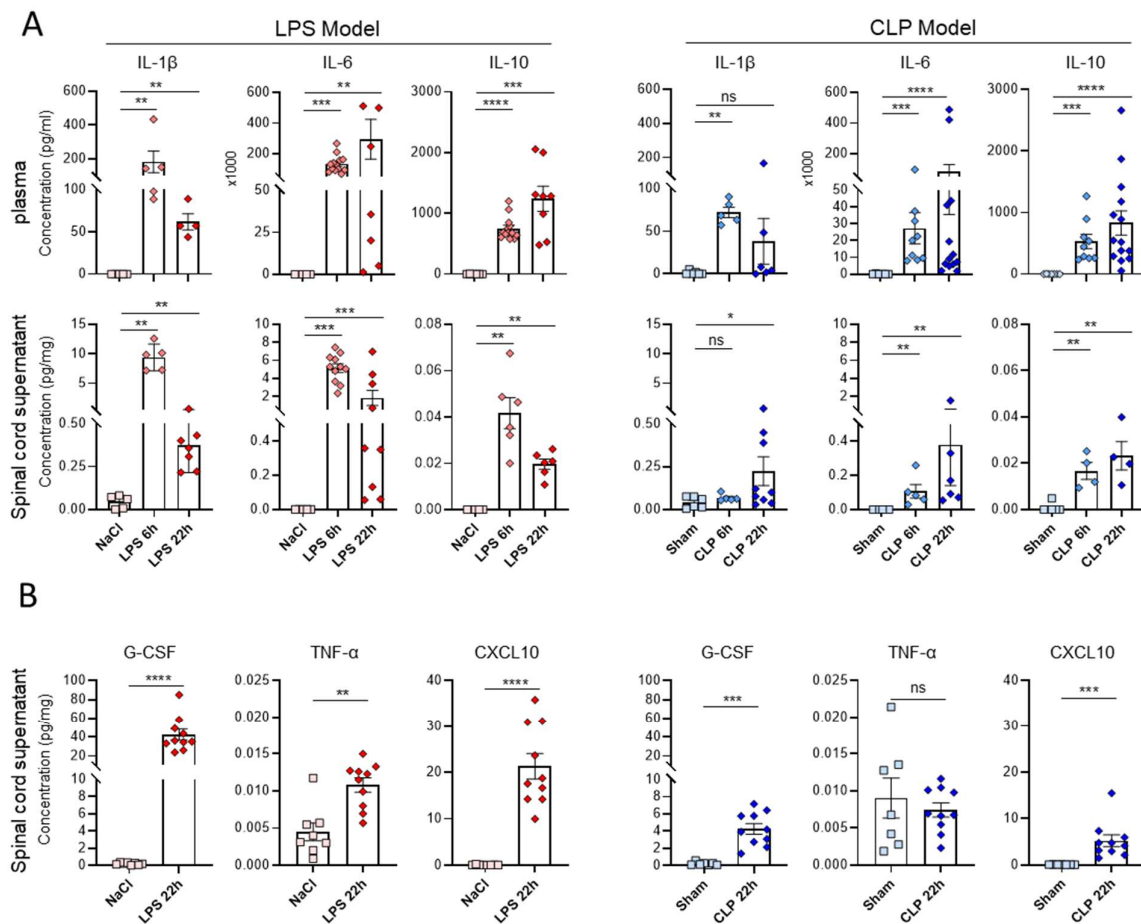
- Benabid, Rym, Julien Wartelle, Laurette Malleret, Nicolas Guyot, Sophie Gangloff, François Lebargy, et Azzag Belaouaj. 2012. « Neutrophil Elastase Modulates Cytokine Expression: Contribution to Host Defense against *Pseudomonas Aeruginosa*-Induced Pneumonia ». *The Journal of Biological Chemistry* 287(42):34883-94. doi: 10.1074/jbc.M112.361352.
- Brinkmann, Volker, Ulrike Reichard, Christian Goosmann, Beatrix Fauler, Yvonne Uhlemann, David S. Weiss, Yvette Weinrauch, et Arturo Zychlinsky. 2004. « Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria ». *Science* 303(5663):1532-35. doi: 10.1126/science.1092385.
- Buras, Jon A., Bernhard Holzmann, et Michail Sitkovsky. 2005. « Animal Models of Sepsis: Setting the Stage ». *Nature Reviews Drug Discovery* 4(10):854-65. doi: 10.1038/nrd1854.
- Cai, Zhiyou, M. Delwar Hussain, et Liang-Jun Yan. 2014. « Microglia, Neuroinflammation, and Beta-Amyloid Protein in Alzheimer's Disease ». *The International Journal of Neuroscience* 124(5):307-21. doi: 10.3109/00207454.2013.833510.
- Cavaillon, Jean-Marc, et Djillali Annane. 2006. « Compartmentalization of the Inflammatory Response in Sepsis and SIRS ». *Journal of Endotoxin Research* 12(3):151-70. doi: 10.1179/096805106X102246.
- Chen, Zhaoyuan, Hao Zhang, Mengdi Qu, Ke Nan, Hanzhong Cao, Juan P. Cata, Wankun Chen, et Changhong Miao. 2021. « Review: The Emerging Role of Neutrophil Extracellular Traps in Sepsis and Sepsis-Associated Thrombosis ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 11.
- Comim, Clarissa M., Márcia C. Vilela, Larissa S. Constantino, Fabrícia Petronilho, Franciele Vuolo, Norinne Lacerda-Queiroz, David H. Rodrigues, João Luiz da Rocha, Antônio L. Teixeira, João Quevedo, et Felipe Dal-Pizzol. 2011. « Traffic of Leukocytes and Cytokine Up-Regulation in the Central Nervous System in Sepsis ». *Intensive Care Medicine* 37(4):711-18. doi: 10.1007/s00134-011-2151-2.
- Conceição-Silva, Fátima, Clarissa S. M. Reis, Paula Mello De Luca, Jessica Leite-Silva, Marta A. Santiago, Alexandre Morrot, et Fernanda N. Morgado. 2021. « The Immune System Throws Its Traps: Cells and Their Extracellular Traps in Disease and Protection ». *Cells* 10(8):1891. doi: 10.3390/cells10081891.
- de Coupade, Catherine, Robert W. Gear, Paul F. Dazin, Herve Y. Sroussi, Paul G. Green, et Jon D. Levine. 2004. «  $\beta$ 2-Adrenergic receptor regulation of human neutrophil function is sexually dimorphic ». *British Journal of Pharmacology* 143(8):1033-41. doi: 10.1038/sj.bjp.0705972.
- Czaikoski, Paula Giselle, José Maurício Segundo Correia Mota, Daniele Carvalho Nascimento, Fabiane Sônego, Fernanda Vargas e Silva Castanheira, Paulo Henrique Melo, Gabriela Trentin Scortegagna, Rangel Leal Silva, Romualdo Barroso-Sousa, Fabrício Oliveira Souto, Antonio Pazin-Filho, Florencio Figueiredo, José Carlos Alves-Filho, et Fernando Queiróz Cunha. 2016. « Neutrophil Extracellular Traps Induce Organ Damage during Experimental and Clinical Sepsis ». *PLOS ONE* 11(2):e0148142. doi: 10.1371/journal.pone.0148142.
- Deitch, E. A. 1998. « Animal Models of Sepsis and Shock: A Review and Lessons Learned ». *Shock (Augusta, Ga.)* 9(1):1-11. doi: 10.1097/00024382-199801000-00001.
- Dejager, Lien, Iris Pinheiro, Eline Dejonckheere, et Claude Libert. 2011. « Cecal Ligation and Puncture: The Gold Standard Model for Polymicrobial Sepsis? ». *Trends in Microbiology* 19(4):198-208. doi: 10.1016/j.tim.2011.01.001.

- Delgado-Rizo, Vidal, Marco Martínez-Guzmán, Liliana Iñiguez-Gutierrez, Alejandra García-Orozco, Anabell Alvarado-Navarro, et Mary Fafutis-Morris. 2017. « Neutrophil extracellular traps and its implications in inflammation: an overview ». *Frontiers in Immunology* 8.
- Domon, Hisanori, Kosuke Nagai, Tomoki Maekawa, Masataka Oda, Daisuke Yonezawa, Wataru Takeda, Takumi Hiyoshi, Hikaru Tamura, Masaya Yamaguchi, Shigetada Kawabata, et Yutaka Terao. 2018. « Neutrophil Elastase Subverts the Immune Response by Cleaving Toll-Like Receptors and Cytokines in Pneumococcal Pneumonia ». *Frontiers in Immunology* 9.
- Evavold, Charles L., Jianbin Ruan, Yunhao Tan, Shiyu Xia, Hao Wu, et Jonathan C. Kagan. 2018. « The Pore-Forming Protein Gasdermin D Regulates Interleukin-1 Secretion from Living Macrophages ». *Immunity* 48(1):35-44.e6. doi: 10.1016/j.immuni.2017.11.013.
- Feng, Zhou, Lingxia Min, Liang Liang, Beike Chen, Hui Chen, Yi Zhou, Weiwei Deng, Hongliang Liu, et Jingming Hou. 2021. « Neutrophil Extracellular Traps Exacerbate Secondary Injury via Promoting Neuroinflammation and Blood–Spinal Cord Barrier Disruption in Spinal Cord Injury ». *Frontiers in Immunology* 12:698249. doi: 10.3389/fimmu.2021.698249.
- Gurski, Cody J., et Bonnie N. Dittel. 2022. « Myeloperoxidase as a Marker to Differentiate Mouse Monocyte/Macrophage Subsets ». *International Journal of Molecular Sciences* 23(15):8246. doi: 10.3390/ijms23158246.
- Hubbard, William J., Mashkoor Choudhry, Martin G. Schwacha, Jeffrey D. Kerby, Loring W. Rue, Kirby I. Bland, et Irshad H. Chaudry. 2005. « Cecal Ligation and Puncture ». *Shock (Augusta, Ga.)* 24 Suppl 1:52-57. doi: 10.1097/01.shk.0000191414.94461.7e.
- Jin, Zhen, Jinpeng Sun, Zeyuan Song, Kun Chen, Yap San Min Nicolas, Rupesh Kc, Qiyun Ma, Jun Liu, et Mingshun Zhang. 2020. « Neutrophil Extracellular Traps Promote Scar Formation in Post-Epidural Fibrosis ». *Npj Regenerative Medicine* 5(1):1-9. doi: 10.1038/s41536-020-00103-1.
- Jolley, Sarah E., Aaron E. Bunnell, et Catherine L. Hough. 2016. « ICU-Acquired Weakness ». *CHEST* 150(5):1129-40. doi: 10.1016/j.chest.2016.03.045.
- Kanashiro, Alexandre, Carlos Hiroji Hiroki, Denise Morais da Fonseca, Alexander Birbrair, Raphael Gomes Ferreira, Gabriel Shimizu Bassi, Mirian D. Fonseca, Ricardo Kusuda, Guilherme Cesar Martelossi Cebinelli, Katiussia Pinho da Silva, Carlos Wagner Wanderley, Gustavo Batista Menezes, José Carlos Alves-Fiho, André Gustavo Oliveira, Thiago M. Cunha, André Sampaio Pupo, Luis Ulloa, et Fernando Queiroz Cunha. 2020. « The Role of Neutrophils in Neuro-Immune Modulation ». *Pharmacological Research* 151:104580. doi: 10.1016/j.phrs.2019.104580.
- Keshari, Ravi S., Anupam Jyoti, Sachin Kumar, Megha Dubey, Anupam Verma, Bangalore S. Srinag, Hanumanthappa Krishnamurthy, Manoj K. Barthwal, et Madhu Dikshit. 2012. « Neutrophil Extracellular Traps Contain Mitochondrial as Well as Nuclear DNA and Exhibit Inflammatory Potential ». *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology* 81(3):238-47. doi: 10.1002/cyto.a.21178.
- Kloss, Christian U. A., Marion Bohatschek, Georg W. Kreutzberg, et Gennadij Raivich. 2001. « Effect of Lipopolysaccharide on the Morphology and Integrin Immunoreactivity of Ramified Microglia in the Mouse Brain and in Cell Culture ». *Experimental Neurology* 168(1):32-46. doi: 10.1006/exnr.2000.7575.



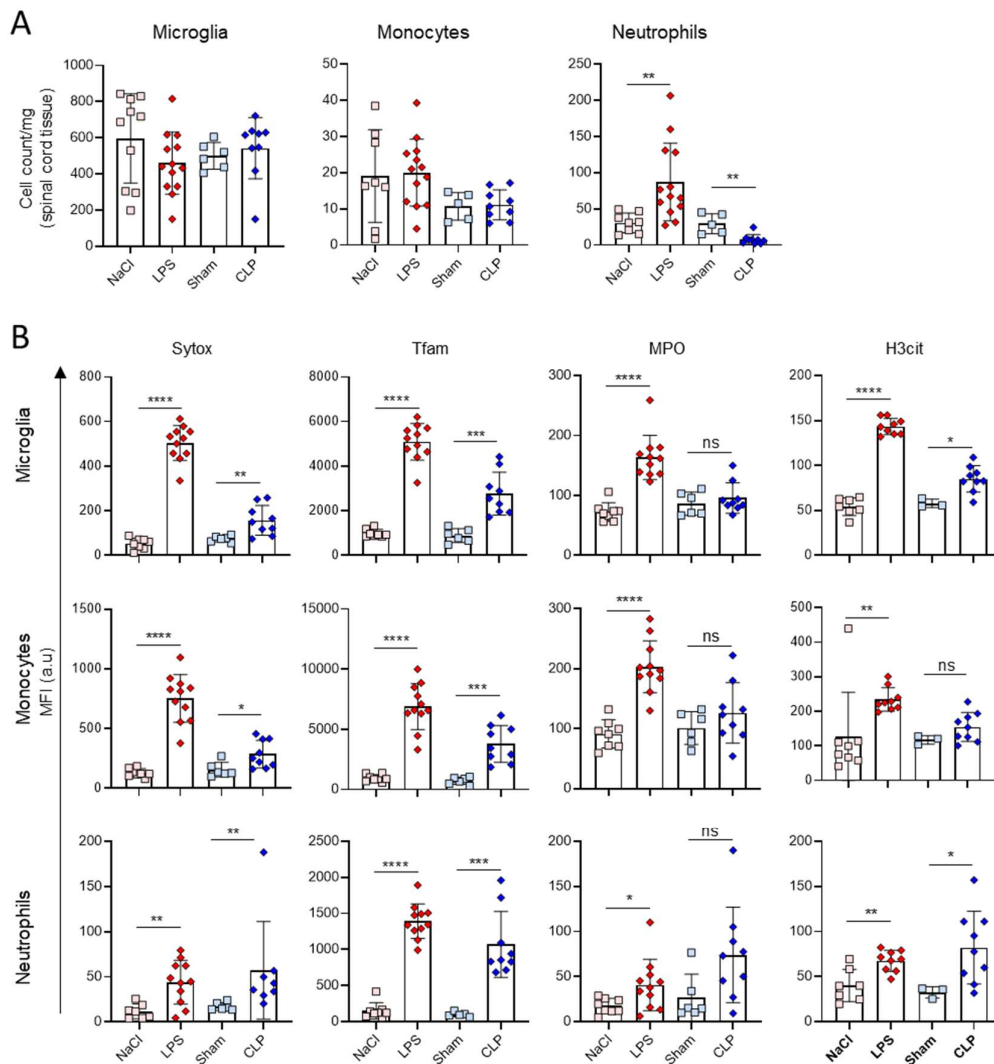
- Li, Tiewei, Xiaojuan Li, Yichuan Feng, Geng Dong, Yuewu Wang, et Junmei Yang. 2020. « The Role of Matrix Metalloproteinase-9 in Atherosclerotic Plaque Instability ». *Mediators of Inflammation* 2020:3872367. doi: 10.1155/2020/3872367.
- Luo, Lingtao, Su Zhang, Yongzhi Wang, Milladur Rahman, Ingvar Syk, Enming Zhang, et Henrik Thorlacius. 2014. « Proinflammatory Role of Neutrophil Extracellular Traps in Abdominal Sepsis ». *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 307(7):L586-596. doi: 10.1152/ajplung.00365.2013.
- Mammana, Santa, Paolo Fagone, Eugenio Cavalli, Maria Sofia Basile, Maria Cristina Petralia, Ferdinando Nicoletti, Placido Bramanti, et Emanuela Mazzon. 2018. « The Role of Macrophages in Neuroinflammatory and Neurodegenerative Pathways of Alzheimer's Disease, Amyotrophic Lateral Sclerosis, and Multiple Sclerosis: Pathogenetic Cellular Effectors and Potential Therapeutic Targets ». *International Journal of Molecular Sciences* 19(3):831. doi: 10.3390/ijms19030831.
- Michel-Flutot, Pauline, Camille H. Bourcier, Laila Emam, Adeline Gasser, Simon Glatigny, Stéphane Vinit, et Arnaud Mansart. 2022. « Extracellular Traps Formation Following Cervical Spinal Cord Injury ». *The European Journal of Neuroscience*.
- Patabendige, Adjanie, et Damir Janigro. 2023. « The Role of the Blood-Brain Barrier during Neurological Disease and Infection ». *Biochemical Society Transactions* 51(2):613-26. doi: 10.1042/BST20220830.
- Pieterse, Elmar, Nils Rother, Cansu Yanginlar, Luuk B. Hilbrands, et Johan van der Vlag. 2016. « Neutrophils Discriminate between Lipopolysaccharides of Different Bacterial Sources and Selectively Release Neutrophil Extracellular Traps ». *Frontiers in Immunology* 7:484. doi: 10.3389/fimmu.2016.00484.
- Recknagel, Peter, Falk A. Gonnert, Emina Halilbasic, Mieczyslaw Gajda, Nayla Jbeily, Amelie Lupp, Ignacio Rubio, Ralf A. Claus, Andreas Kortgen, Michael Trauner, Mervyn Singer, et Michael Bauer. 2013. « Mechanisms and Functional Consequences of Liver Failure Substantially Differ between Endotoxaemia and Faecal Peritonitis in Rats ». *Liver International* 33(2):283-93. doi: 10.1111/liv.12012.
- Remick, D. G., D. E. Newcomb, G. L. Bolgos, et D. R. Call. 2000. « Comparison of the Mortality and Inflammatory Response of Two Models of Sepsis: Lipopolysaccharide vs. Cecal Ligation and Puncture ». *Shock (Augusta, Ga.)* 13(2):110-16. doi: 10.1097/00024382-200013020-00004.
- Ren, Chao, Ren-qi Yao, Hui Zhang, Yong-wen Feng, et Yong-ming Yao. 2020. « Sepsis-associated encephalopathy: a vicious cycle of immunosuppression ». *Journal of Neuroinflammation* 17(1):14. doi: 10.1186/s12974-020-1701-3.
- Schefold, Joerg C., Jeffrey Bierbrauer, et Steffen Weber-Carstens. 2010. « Intensive care unit—acquired weakness (ICUAW) and muscle wasting in critically ill patients with severe sepsis and septic shock ». *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 1(2):147-57. doi: 10.1007/s13539-010-0010-6.
- Sharshar, Tarek, Djillali Annane, Geoffroy Lorin de la Gradmaison, Jean Philippe Brouland, Nicholas S. Hopkinson, et Françoise Gray. 2006. « The Neuropathology of Septic Shock ». *Brain Pathology* 14(1):21-33. doi: 10.1111/j.1750-3639.2004.tb00494.x.

- Shastri, Abhishek, Domenico Marco Bonifati, et Uday Kishore. 2013. « Innate Immunity and Neuroinflammation ». *Mediators of Inflammation* 2013:e342931. doi: 10.1155/2013/342931.
- Shen, Xiao-Fei, Ke Cao, Jin-peng Jiang, Wen-Xian Guan, et Jun-Feng Du. 2017. « Neutrophil dysregulation during sepsis: an overview and update ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 21(9):1687-97. doi: 10.1111/jcmm.13112.
- Singer, Mervyn, Clifford S. Deutschman, Christopher Warren Seymour, Manu Shankar-Hari, Djillali Annane, Michael Bauer, Rinaldo Bellomo, Gordon R. Bernard, Jean-Daniel Chiche, Craig M. Coopersmith, Richard S. Hotchkiss, Mitchell M. Levy, John C. Marshall, Greg S. Martin, Steven M. Opal, Gordon D. Rubenfeld, Tom van der Poll, Jean-Louis Vincent, et Derek C. Angus. 2016. « The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3) ». *JAMA* 315(8):801-10. doi: 10.1001/jama.2016.0287.
- Stortz, Julie A., Steven L. Raymond, Juan C. Mira, Lyle L. Moldawer, Alicia M. Mohr, et Philip A. Efron. 2017. « Murine Models of Sepsis and Trauma: Can We Bridge the Gap? » *ILAR Journal* 58(1):90-105. doi: 10.1093/ilar/ilx007.
- Tan, Chuyi, Monowar Aziz, et Ping Wang. 2021. « The Vitals of NETs ». *Journal of Leukocyte Biology* 110(4):797-808. doi: 10.1002/JLB.3RU0620-375R.
- Tauber, Simone C., Marija Djukic, Johannes Gossner, Helmut Eiffert, Wolfgang Brück, et Roland Nau. 2021. « Sepsis-Associated Encephalopathy and Septic Encephalitis: An Update ». *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 19(2):215-31. doi: 10.1080/14787210.2020.1812384.
- Vaibhav, Kumar, Molly Braun, Katelyn Alverson, Hesam Khodadadi, Ammar Kutiyawalla, Ayobami Ward, Christopher Banerjee, Tyler Sparks, Aneeq Malik, Mohammad H. Rashid, Mohammad Badruzzaman Khan, Michael F. Waters, David C. Hess, Ali S. Arbab, John R. Vender, Nasrul Hoda, Babak Baban, et Krishnan M. Dhandapani. 2020. « Neutrophil Extracellular Traps Exacerbate Neurological Deficits after Traumatic Brain Injury ». *Science Advances* 6(22):eaax8847. doi: 10.1126/sciadv.aax8847.
- Xie, Fei, Su Min, Jingyuan Chen, Jun Yang, et Xin Wang. 2017. « Ulinastatin Inhibited Sepsis-Induced Spinal Inflammation to Alleviate Peripheral Neuromuscular Dysfunction in an Experimental Rat Model of Neuromyopathy ». *Journal of Neurochemistry* 143(2):225-35. doi: 10.1111/jnc.14145.
- Yang, Hang, Mona Helena Biermann, Jan Markus Brauner, Yi Liu, Yi Zhao, et Martin Herrmann. 2016. « New Insights into Neutrophil Extracellular Traps: Mechanisms of Formation and Role in Inflammation ». *Frontiers in Immunology* 7:302. doi: 10.3389/fimmu.2016.00302.
- Yipp, Bryan G., et Paul Kubes. 2013. « NETosis: how vital is it? » *Blood* 122(16):2784-94. doi: 10.1182/blood-2013-04-457671.
- Zou, Shujing, Hongyu Jie, Xinai Han, et Jinghong Wang. 2023. « The Role of Neutrophil Extracellular Traps in Sepsis and Sepsis-Related Acute Lung Injury ». *International Immunopharmacology* 124(Pt A):110436. doi: 10.1016/j.intimp.2023.110436.



**Figure 1: Both LPS and CLP septic model induced dramatical cytokine increase in blood and spinal cord tissue.**

IL1 $\beta$ , IL6 and IL10 were measured in plasma and in the spinal cord supernatant at 6h and 22h post LPS or CLP model induction by ELISA. Spinal cord soluble factors were measured in tissue digestion media supernatant after spinal cord dissociation without cellular lysis. Results are expressed as pg/ml of cytokines in plasma or pg/mg of cytokines in spinal cord tissue (A). Spinal cord supernatant was also measured for additional soluble factors using Microglia/macrophages Legendplex panel (B). NaCl ip injected animals and Sham animals were used as control for LPS and CLP model respectively. Mann-Whitney t-test was used to analyze cytokine induction at 6h and 22h compared to control group, \* $<0,05$ , \*\* $<0,001$ , \*\*\* $<0,0001$ , \*\*\*\* $<0,00001$ .



**Figure 2: Infiltrating and resident immune cells in the spinal cord produced extracellular traps in both LPS and CLP model at 22h.**

Flow cytometry analysis of cell count in spinal cord. Count of microglia, monocytes and neutrophils was calculated per mg of spinal cord tissue. Individual value for each animal was shown in histogram with mean + SEM for NaCl, LPS, sham and CLP groups (A). Flow cytometry analysis of the relative expression of Ets markers expressed at microglia, monocytes and neutrophils cell surface among cells displaying an intact plasma cell membrane. Expression of Sytox, Tfam, MPO and H3Cit was expressed as mean fluorescence intensity (MFI), arbitrary unit (a.u). Individual values were shown in histogram for each animal with mean + SEM for each group. Mann-Whitney t-test was used to compare ETs expression level for each marker in each population between LPS and NaCl group and between CLP and sham group, ns,  $p > 0,05$ ; \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*,  $p < 0,0001$

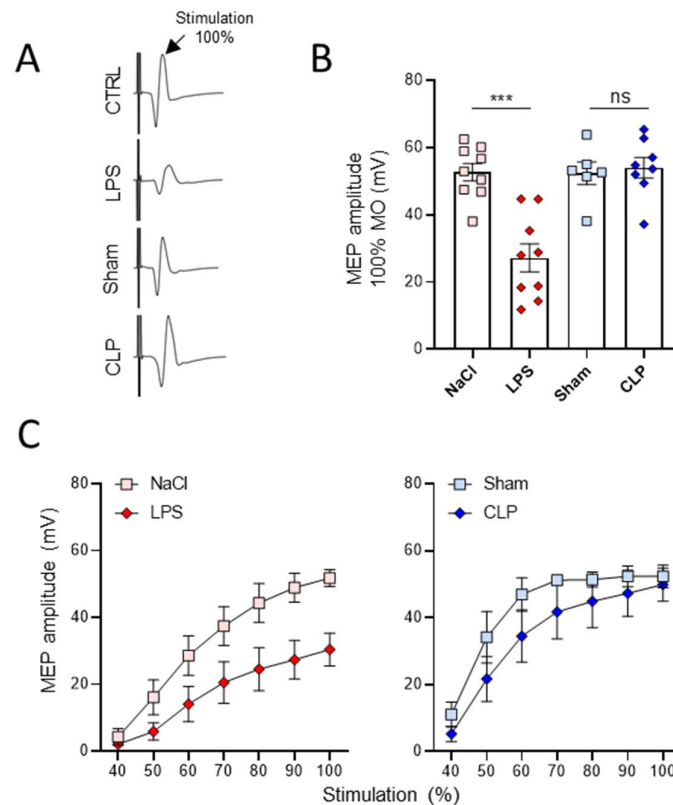


Figure 3: LPS but not CLP model promoted motor-evoked potential amplitude decrease at 22h

Representative motor-evoked potential (MEP) amplitude recorded at 100% of the maximum capacity of the TMS coil measured in mice 22h post LPS or CLP model induction. NaCl i.p or Sham animals were used as control for LPS and CLP group respectively (A). MEP amplitude histogram representation of individual value for each animal in NaCl, LPS, Sham and CLP group measured at 100% of the coil's capacity (B). Quantification of MEP amplitude after stimulation from 40% to 100% of the coil's maximum for LPS (left panel) or CLP (right panel) group compared to their respective control (C). Mann-Whitney t-test was used to analyze PEM amplitude variation between NaCl and LPS group or between Sham and CLP group, ns = no significant, \*\*\*<0,0001.

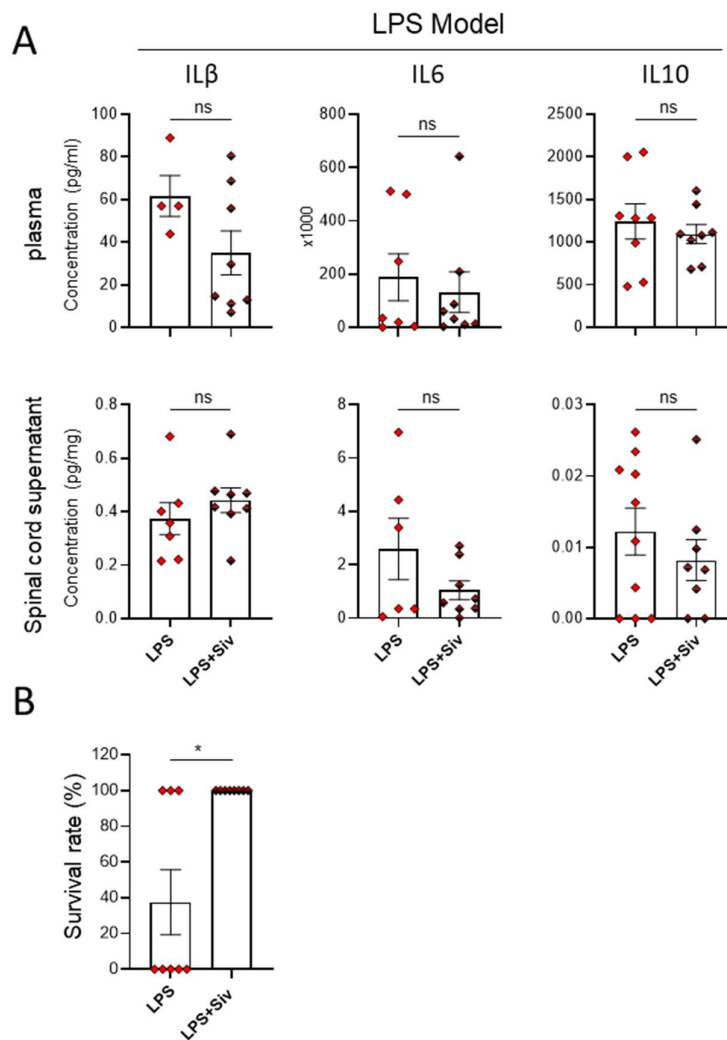
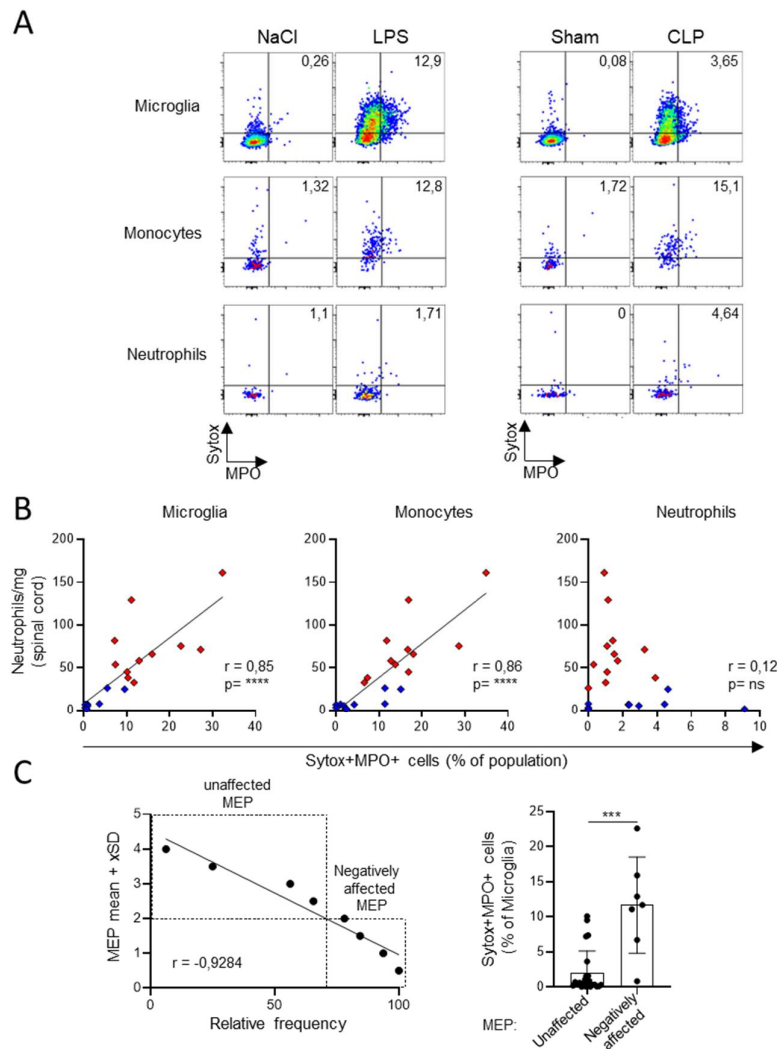


Figure 4: Extracellular traps inhibitor drug (sivelestat) does not impact global inflammation at 22h post LPS injection

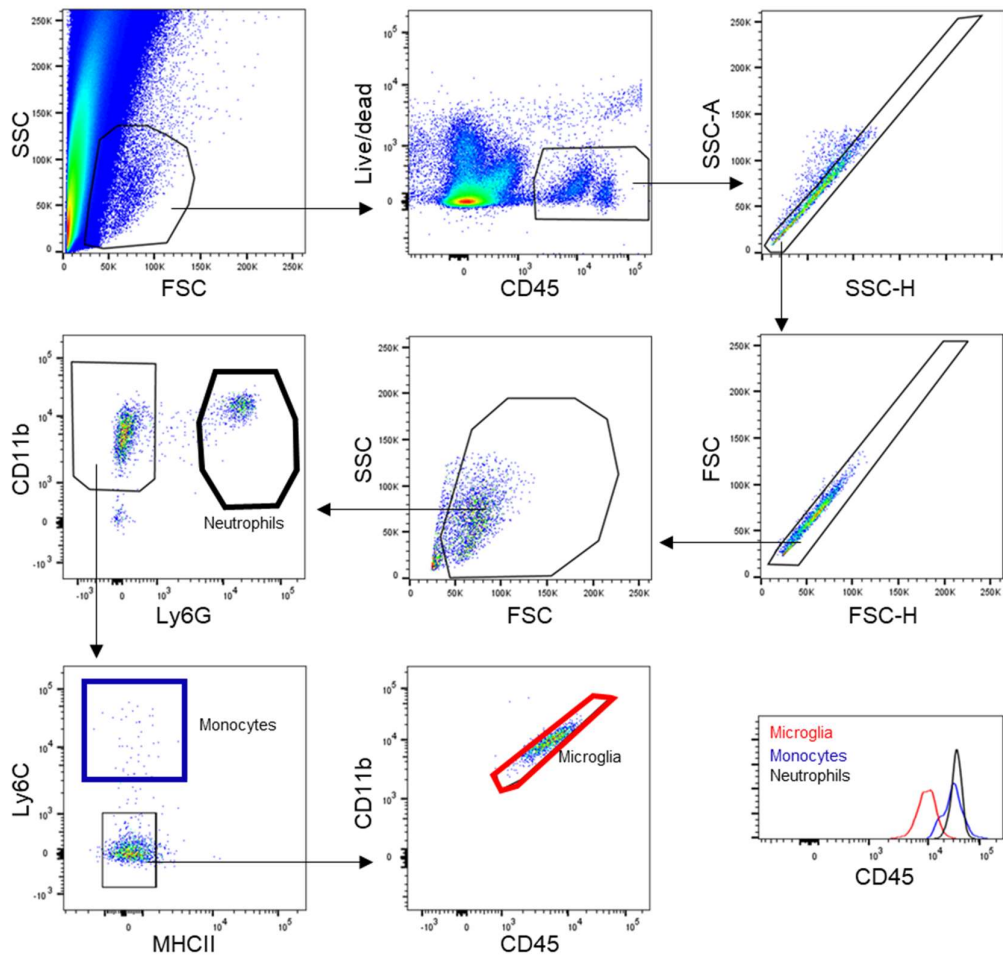
Sivelestat (Siv) was used as a drug to reduce ETs in LPS injected animals, through neutrophil elastase specific inhibition. IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-10 were measured in plasma and in the spinal cord supernatant at 22h in LPS and in LPS + Siv group by ELISA. Spinal cord soluble factors were measured in tissue digestion media supernatant after spinal cord dissociation without cellular lysis. Results are expressed as pg/ml of cytokines in plasma or as pg/mg of cytokines in spinal cord tissue and shown through histogram representation with mean + SEM for each group (A). Survival rate at 22h was measured in LPS and LPS+Siv groups. Results were expressed in percentage. 100% was attributed to alive animal and 0% was attributed to deceased animal 22h post LPS injection. Individual value for each animal and Mean + SEM were shown for each group (B). Mann-Whitney t-test was used to compare cytokines concentration and survival rate difference between LPS and LPS + Siv groups (ns,  $p > 0,05$ ; \*  $p < 0,05$ )





**Figure 5: Extracellular traps produced by microglia significantly affected MEP amplitude.**

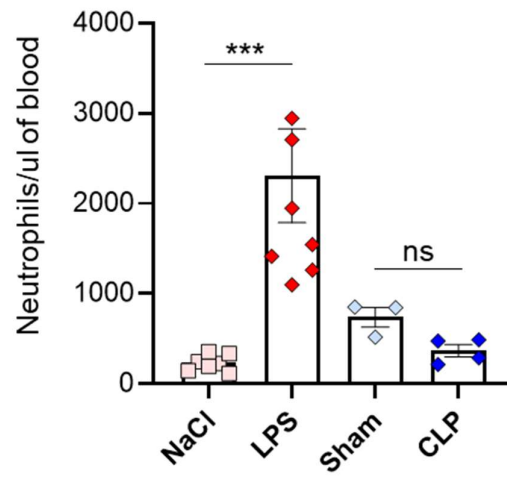
Flow cytometry analysis of immune cells producing ETs defined as Sytox<sup>+</sup>MPO<sup>+</sup> cells. Representative flow cytometry pseudocolor plot image of Sytox and MPO expression in Microglia, monocytes and neutrophils in NaCl, LPS, Sham and CLP groups (A). XY graphs showing the number of neutrophils per mg of spinal cord tissue (Y) versus frequency of Sytox<sup>+</sup>MPO<sup>+</sup> cells (X). Spearman correlation test was used to determine r and p value for each graph. \*\* p<0,001, \*\*\*p>0,0001 and linear regression was shown when significant correlation occurred (B). A linear regression was used on the MEP data from all animals in each group (NaCl, Sham, LPS and CLP) to evaluate the percent of animals in which MEP values were considered unaffected or negatively affected. These two groups have been designed by calculating the relative frequency of animals in each group using the Chebyshev's theorem (MEP mean + (0,5 to 5) standard deviation (SD)). Regression coefficient R<sup>2</sup> was calculated. According to this theorem, 23% of our animals displayed a negatively affected MEP, while 77% display a MEP value considered unaffected. In these two groups, the frequency of microglia producing Ets defined as Sytox<sup>+</sup>MPO<sup>+</sup>cells was reported. Mann-Whitney t-test was used, \*\*\*p<0,0001 (C).



Supplementary figure 1:

Gating strategy of immune cells in Spinal cord





Supplementary figure 2:

LPS model but not CLP model induced blood neutrophilia

**Résultat complémentaire : le modèle LPS induit une augmentation de l'expression des CSPGs**

En complément et afin d'explorer les processus inflammatoires dans les deux modèles, nous avons marqué les CSPGs, qui reflètent l'inflammation dans le tissu, sur des coupes transversales de moelle épinière. La famille des protéoglycans est connue pour se lier et réguler la fonction d'un certain nombre de protéines, par exemple les chimiokines. Ils sont également impliqués dans le recrutement et l'activation de cellules immunitaires (Stephenson et al. 2018). Nous avons observé une augmentation de l'intensité du marquage après l'administration de LPS par rapport aux animaux du groupe contrôle, alors qu'il n'y avait aucune différence significative entre les animaux des groupes CLP et sham (figure 28). Ce résultat confirme que le niveau d'inflammation n'est pas identique entre les deux modèles, comme les données obtenues sur les taux de cytokines le laissaient penser. Ce résultat est également en adéquation avec nos données sur le recrutement de cellules immunitaires : dans le groupe CLP, nous avons observé une moindre infiltration de ces cellules dans la moelle épinière, à l'inverse des animaux du groupe LPS.

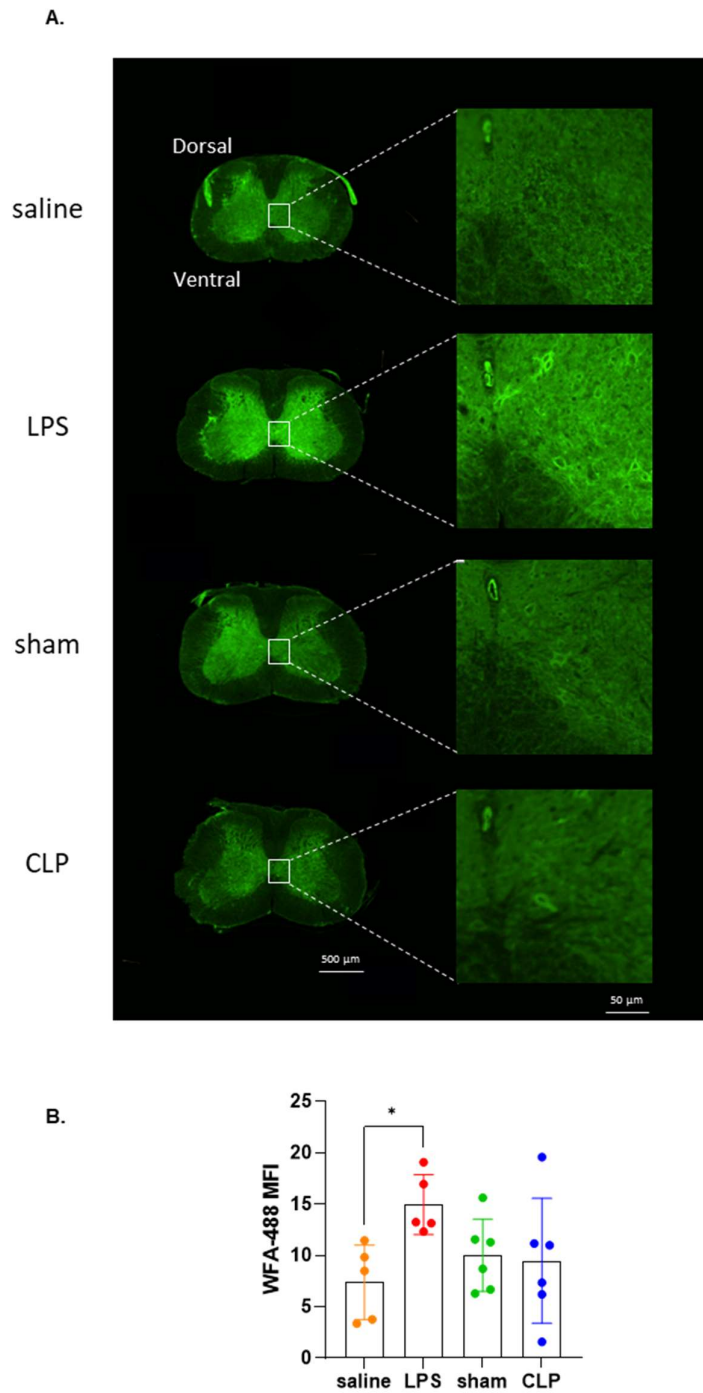


Figure 28 : Expression des CSPGs induite par le LPS sur la moelle épinière. Image représentative de l'ensemble de la section transversale de la moelle épinière (segment thoracique bas à lombaire haut) marquée avec WFA pour les groupes solution saline, LPS, sham et CLP (A). Quantification de l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) (B) pour les groupes solution saline (orange), LPS (rouge), sham (vert) et CLP (bleu). Solution saline n=5, LPS n=5, sham n=6, CLP n=6. \*  $p < 0,05$

## 4. FORMATION DE PIÈGES EXTRACELLULAIRES SUITE À UNE LÉSION DE LA MOELLE ÉPINIÈRE

---

### Publication :

Michel-Flutot P, **Bourcier CH**, Emam L, Gasser A, Glatigny S, Vinit S, Mansart A (2022).

Extracellular traps formation following cervical spinal cord injury.

*Eur J Neurosci.* 2022 Dec 19. doi: 10.1111/ejn.15902.

L'inflammation peut avoir différentes origines et ne pas être systématiquement associée à une infection et à la présence d'agents pathogènes : on la retrouve également dans des modèles considérés comme stériles tels que des pathologies auto-immunes, ou des traumatismes comme lors d'une lésion de la moelle épinière. Néanmoins, malgré des origines différentes, certains mécanismes de la réponse immunitaire mis en jeu sont communs, comme la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires, et l'implication des neutrophiles et des macrophages.

À la suite d'une lésion, il y a déclenchement d'une cascade de processus inflammatoires conduisant à l'activation et au recrutement de cellules immunitaires au niveau et autour du site lésé. Ce processus implique l'activation de la microglie et le recrutement des neutrophiles circulants. Or, ces cellules immunitaires ont la capacité de produire des pièges extracellulaires (ETs), connus pour induire des lésions tissulaires lorsqu'ils sont produits en excès. Notre hypothèse est que ces ETs pourraient être produits après une lésion de la moelle épinière et qu'ils pourraient être impliqués dans la persistance de l'inflammation associée à la mise en place de la lésion secondaire.

Cette hypothèse n'a jamais été démontrée jusqu'à présent à l'exception d'une étude ayant mis en évidence que les NETs exacerbent les déficits neurologiques dans un modèle préclinique de lésion cérébrale traumatique (Vaibhav et al. 2020). Récemment, la présence de ETs a également été observée dans la moelle épinière de rat suite à une compression thoracique mais sans identification claire des types cellulaires produisant ces pièges (Feng et al. 2021). En effet, les

cellules positives à la MPO peuvent être exprimées non seulement par les neutrophiles comme cela a été suggéré, mais aussi par d'autres cellules telles que la microglie.

Nos travaux ont montré qu'après une hémisection médullaire, des neutrophiles infiltrants étaient présents au niveau de la lésion et qu'une partie d'entre eux formait des NETs un jour après. Cette étude a aussi démontré pour la première fois que la microglie présente dans la moelle épinière formait des MiETs suite à ce type de traumatisme. De plus, nos travaux ont mis en évidence que les NETs et les MiETS sont majoritairement produits autour du site de la lésion. Cela a aussi été observé chez les animaux sham ayant subi une durotomie sans lésion médullaire, mais en moindre mesure, ce qui démontre que la lésion en elle-même induit bien une production de ETs.

Il reste cependant à déterminer les mécanismes exacts et la cinétique de formation des pièges extracellulaires produits par les neutrophiles et la microglie après une lésion de la moelle épinière. Ces informations permettraient de mieux atténuer ce processus inflammatoire pouvant contribuer à des lésions secondaires, et de cibler efficacement les pièges extracellulaires pour améliorer les résultats fonctionnels après un traumatisme médullaire.



Received: 3 August 2022 | Revised: 20 November 2022 | Accepted: 11 December 2022

DOI: 10.1111/ejn.15902

## RESEARCH REPORT

EJN European Journal of Neuroscience FENS WILEY

## Extracellular traps formation following cervical spinal cord injury

Pauline Michel-Flutot<sup>1</sup> | Camille H. Bourcier<sup>1,2</sup> | Laila Emam<sup>2</sup> |  
Adeline Gasser<sup>2</sup> | Simon Glatigny<sup>2</sup> | Stéphane Vinit<sup>1</sup> | Arnaud Mansart<sup>2</sup><sup>1</sup>Université Paris-Saclay, UVSQ, Inserm U1179, END-ICAP, Versailles, France<sup>2</sup>Université Paris-Saclay, UVSQ, Inserm U1173, Infection et Inflammation (2I), France**Correspondence**Pauline Michel-Flutot, Université Paris-Saclay, UVSQ, Inserm U1179, END-ICAP, Versailles 78000, France.  
Email: pauline.michel78280@yahoo.fr**Funding information**

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale; Chancellerie des Universités de Paris, Grant/Award Number: Legs Poix; INSERM; Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines; Fondation pour la recherche médicale, Grant/Award Number: ECO202106013756

Edited by: Francisco Alvarez

**Abstract**

Spinal cord injuries involve a primary injury that can lead to permanent loss of function and a secondary injury associated with pathologic and inflammatory processes. Extracellular traps are extracellular structures expressed by immune cells that are primarily composed of chromatin, granular enzymes and histones. Extracellular traps are known to induce tissue damage when overexpressed and could be associated in the occurrence of secondary damage. In the present study, we used flow cytometry to demonstrate that at 1 day following a C2 spinal cord lateral hemisection in male Swiss mice, resident microglia form vital microglia extracellular traps, and infiltrating neutrophils form vital neutrophil extracellular traps. We also used immunolabelling to show that microglia near the lesion area are most likely to form these microglia extracellular traps. As expected, infiltrating neutrophils are located at the site of injury, though only some of them engage in post-injury extracellular trap formation. We also observed the formation of microglia and neutrophil extracellular traps in our sham animal models of durotomy, but formation was less frequent than following the C2 hemisection. Our results demonstrate for the first time that microglia form extracellular traps in the spinal cord following injury and durotomy. It remains however to determine the exact mechanisms and kinetics of neutrophil and microglia extracellular traps formation following spinal cord injury. This information would allow to better mitigate this inflammatory process that may contribute to secondary injury and to effectively target extracellular traps to improve functional outcomes following spinal cord injury.

**Abbreviations:** C2, second cervical; DAPI, 4',6'-diamidino-2-phenylindole; dnase1, deoxyribonuclease-1; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; ETs, extracellular traps; FMO, fluorescence minus one; h3cit, citrullinated histone H3; MDMs, monocyte-derived macrophages; METs, macrophage ETs; MFI, mean fluorescence intensity; MiETs, microglia ETs; MPO, myeloperoxidase; NDS, normal donkey serum; NETs, neutrophil extracellular traps; P.I., post-injury; PAD4, peptidylarginine deiminase 4; PBS, phosphate-buffered saline; ROS, reactive oxygen species; RPMI, Roswell Park Memorial Institute RT, room temperature.

Stéphane Vinit and Arnaud Mansart contributed equally to this work.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2022 The Authors. *European Journal of Neuroscience* published by Federation of European Neuroscience Societies and John Wiley & Sons Ltd.

## KEYWORDS

central nervous system injury, mice, microglia, neutrophils

## 1 | INTRODUCTION

Injuries of the upper spinal cord induce a permanent loss of function caused by the axotomy of spinal pathways. This primary injury results in a cascade of inflammatory processes leading to the activation and recruitment of immune cells at and around the site of injury (Bradbury & Burnside, 2019; Hawthorne & Popovich, 2011). This includes activation of resident macrophages called microglia (Kroner & Rosas Almanza, 2019), recruitment of circulating neutrophils (Zivkovic et al., 2021), inflammatory monocytes and monocyte-derived macrophages (MDMs) (Milich et al., 2019).

Microglia are myeloid cells found in the central nervous system that clear dead and surplus cells in healthy organisms (Prinz et al., 2019). Microglia that survive the initial spinal cord injury are activated within minutes following injury (Donnelly & Popovich, 2008). They consequently proliferate and adopt an amoeboid form at the site of injury, making them difficult to distinguish from infiltrating MDMs recruited to the lesion site (Kigerl et al., 2009; Popovich et al., 2002; Rabchevsky & Streit, 1998; Subhramanyam et al., 2019). Microglia activation leads to the retraction of their processes and the secretion of inflammatory cytokines and chemokines. This secretion attracts other immune cells to the injured area to help restore cellular and molecular homeostasis (Gensel & Zhang, 2015). Following spinal cord injury, activated microglia remain indefinitely at the injured site and primarily display a proinflammatory profile during the chronic phase (Donnelly & Popovich, 2008; Kigerl et al., 2009).

Neutrophils are the first immune cells recruited after spinal cord injury, mobilizing at the area of injury in the course of hours to days and peaking around 24 h post-injury (Donnelly & Popovich, 2008; Popovich & Jones, 2003). They are attracted to the lesion site by proinflammatory chemokines and cytokines produced by resident and newly recruited cells, which detect danger-associated molecular patterns following the initial trauma (Zivkovic et al., 2021). The role of recruited neutrophils is principally degranulation and phagocytosis at the lesion site (Zivkovic et al., 2021). These neutrophils also secrete cytokines to recruit other immune cells from circulation and release proteases and oxidative enzymes involved in tissue damage, including reactive oxygen species (ROS) and

myeloperoxidase (MPO) (Nguyen et al., 2007; Noble et al., 2002; Orr & Gensel, 2018).

Extracellular traps (ETs) formation was first described in 2004 as an antimicrobial function of neutrophils (Brinkmann et al., 2004). These neutrophil extracellular traps (NETs) are primarily composed of decondensed chromatin, histones and granular enzymes such as MPO and neutrophil elastase. ETs formation has since been demonstrated in monocytes and MDMs (Aulik et al., 2012; Doster et al., 2018; Weng et al., 2022). In vivo, ETs are involved in pathogen clearance, and their antimicrobial properties are used for host defence against it (Papayannopoulos, 2017). However, in some pathologies, ETs have been demonstrated to be involved in tissue damage due to their inappropriate persistence, overexpression and aggregation (Guglietta et al., 2016; Nomura et al., 2019; Novotny et al., 2020). It has also been shown that NETs exacerbate neurological deficits in a preclinical model of traumatic brain injury (Vaibhav et al., 2020). Recently, the presence of ETs has been observed in rat spinal cord following thoracic compression (Feng et al., 2021) but without a clear identification of the cells producing these traps. Indeed, MPO positive cell can express not only by neutrophils as suggested but also by other cell types such as microglia (Agrawal et al., 2021), macrophages (Boe et al., 2015; Gurski & Dittel, 2022) and monocytes (Gurski & Dittel, 2022). Interestingly, the inhibition of these ETs led to some functional recovery in the rats and a reduction in neuroinflammatory processes, suggesting a detrimental role of ETs following spinal cord injury.

The formation of microglia ETs (MiETs) has been reported in vitro and in a preclinical model of *Listeria* infection but has never been demonstrated in the spinal cord. Moreover, the implication of neutrophils in ETs formation remains unclear in the context of spinal cord injury. We therefore hypothesized that resident microglia and recruited neutrophils could both form ETs acutely, that is, at 1-day post-injury (P.I.), following cervical spinal cord injury.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

## 2.1 | Ethics statement

Adult Swiss male mice (Janvier, France;  $n = 35$ , 30–35 g, 8-weeks old) were used in this study. The Ethics Committee



of the University of Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines approved this study, and all experiments complied with French and European laws regarding animal experimentation (EU Directive 2010/63/EU) (Apafis #2021080910063249\_v3). The animals were housed in individual ventilated cages in a state-of-the-art animal care facility (2CARE animal facility, accreditation A78-322-3, France) with access to food and water ad libitum on a 12-hour light/dark cycle. Animals were separated in three groups: Control, Sham and 1d P.I.

## 2.2 | Second cervical (C2) spinal cord lateral hemisection surgery

To investigate ET formation after spinal cord injury, a preclinical model was produced by performing C2 spinal cord lateral hemisection surgery on adult Swiss male mice ( $n = 16$ ) (Michel-Flutot et al., 2021). Animals were anaesthetized with isoflurane (5% in 100% O<sub>2</sub>) in a closed chamber. Anaesthesia was maintained throughout the procedure (1.5%–2% isoflurane in 100% O<sub>2</sub>) through a nose cone. Animals were placed on a heating pad, and the skin and muscles above the first vertebrae were retracted. A laminectomy and a durotomy were performed at the C2 spinal cord segment. Microscissors were used to ventro-laterally hemisect the spinal cord caudal to the C2 dorsal roots, then a microsurgical scalpel was used to ensure the sectioning of all remaining fibres. The wounds and the skin were sutured closed. 1d Sham mice ( $n = 9$ ) underwent the same procedures without hemisection. The isoflurane vaporizer was then turned off, and mice received subcutaneous injections of analgesic: buprenorphine, 375 µg/kg (BupreCare from Axience, Pantin, France) and antibiotics (40 mg/kg trimethoprim and 200 mg/kg sulphadoxine: Borgal 24%, from Virbac, Carros, France).

## 2.3 | Flow cytometry

At 1-day post-surgery, mice (Control:  $n = 8$ ; Sham:  $n = 7$ ; 1d P.I.:  $n = 8$ ) were anaesthetized using 5% isoflurane in 100% O<sub>2</sub> for induction. Anaesthesia was maintained (2.5% in 21% O<sub>2</sub> balanced) through a nose cone. The left carotid was then cannulated, and animals were euthanized and perfused with 30 ml of 20 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, BP2482-1, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in phosphate-buffered saline (PBS, BP399-1, Thermo Fisher Scientific) 1X. The C1–C3 spinal cord was then dissected out and placed in collagenase D (2.5 mg/ml in (Roswell Park Memorial Institute) RPMI medium 1640, 21875-034, Thermo Fisher Scientific), cut into small pieces with microscissors and digested in an incubator (5% CO<sub>2</sub>) for 20 min at 37°C. Spinal cord samples were passed through a nylon mesh (100 µm pore size) in a 50 ml tube using RPMI as rinsing medium to obtain cell suspensions. Cells were washed for 5 min at 1500 rpm at room temperature (RT). The supernatant was eliminated, and the pellet was resuspended in 1 ml of PBS 1×. 3 × 200 µl of cell suspension was transferred to a 96-well plate (650 185, Greiner bio-one, Les Ulis, France). Cells were centrifugated for 2 min at 2000 rpm at RT. Cells were then incubated for 5 min at RT in 100 µl/well of a mix composed of Fixable Viability Dye eFluor™ 780 (1/2000, 65-0865-18, Invitrogen, Waltham, MA, USA) and SYTOX™ Green Nucleic Acid Stain (1/40000, S7020, Invitrogen, Waltham, MA, USA) in PBS 1×. One hundred microliters of PBS 1× was added in each well, and the plate was centrifugated for 2 min at 2000 rpm at RT. Cells were then incubated for 30 min at 4°C in 25 µl/well with a panel of antibodies conjugated to a fluorophore (Table 1) in PBS 1× and directed against the following markers: CD45 (30-F11), CD11b (M1/70), IA/IE (M5/114.15.2), Ly6C (HK1.4), Ly6G (1A8), citrullinated (R2 + R8 + R17) histone H3 (H3cit) and myeloperoxidase (8F4; MPO). One hundred fifty microliters of PBS 1× was

TABLE 1 List of fluorochrome-coupled antibodies used for flow cytometry analysis

Marker	Fluorochrome	Reference
CD45	Brilliant Violet 510	103138, BioLegend
CD11b	Pacific Blue	101223, BioLegend
IA/IE	Alexa Fluor 700	107621, BioLegend
Ly6C	PerCp	128011, BioLegend
Ly6G	PECy7	127617, BioLegend
Citrullinated histone H3	Alexa Fluor 594	ab5103, Abcam
MPO	PE	HM1051PE-100, Hycult Biotech

Note: BioLegend is from San Diego, CA, USA. Abcam is from Cambridge, UK. Hycult Biotech is from Uden, The Netherlands. Abbreviation: MPO, myeloperoxidase.



added in each well, and the plate was centrifugated for 2 min at 2000 rpm at RT. To properly interpret flow cytometry data, fluorescence minus one (FMO) was realized as controls for H3cit, MPO and SYTOX (Control ( $n = 2$ ), 1d Sham ( $n = 2$ ) and 1d P.I. ( $n = 2$ ) supplemental animals were used for this last experiment) (Figure S1). Cells were resuspended in PBS 1× before acquisition on a BD LSRFortessa™ III (BD Life Sciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Analysis was performed using FlowJo™ v10.8.1 Software (BD Life Sciences, Franklin Lakes, NJ, USA).

## 2.4 | Immunohistochemistry

Animals (1d P.I.:  $n = 6$ ) were anaesthetized using 5% isoflurane in 100% O<sub>2</sub> for induction. Anaesthesia was maintained (2.5% in 21% O<sub>2</sub> balanced) through a nose cone. Mice were then euthanized by intracardiac perfusion of heparinized 0.9% NaCl (10 ml), followed by Antigenfix solution (DIAPATH, Martinengo [BG], Italy) for tissue harvesting. After perfusion, the C1–C3 spinal cord was carefully dissected and stored at 4°C in fixative for 24 h. After fixation, tissues were cryo-protected for 48 h in 30% sucrose (in 0.9% NaCl) and stored at –80°C. Frozen longitudinal (C1–C3 spinal cord) free-floating sections (30 μm) were cut using a cryostat (NX70, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). C1–C3 sections were stored in a cryoprotectant solution (Sucrose 30% (Pharmagrade, 141621, AppliChem, Darmstadt, Germany), ethylene glycol 30% (BP230-4, Fisher Scientific, Illkirch, France) and polyvinylpyrrolidone 40 (PVP40-100G, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) 1% in PBS 1×) at –22°C. For immunofluorescence experiments, free-floating transverse sections of the C3–C6 spinal cord were washed and incubated 12 h in citrate buffer solution (antigen retrieval). After washing, sections were placed in blocking solution (normal donkey serum [NDS] 5% in PBS 1×) for 30 min and then incubated with primary antibodies directed against histone H3 (citruiline R2 + R8 + R17) (rabbit, 1/100, ab5103, Abcam, Cambridge, UK), Ly6G (1A8, rat, 1/100, 127601, BioLegend, San Diego, CA, USA) and Iba1 (goat, 1/400, ab5076, Abcam, Cambridge, UK) in blocking solution (NDS 5%) 12 h on an orbital shaker at RT. After several PBS 1× washes, sections were incubated with secondary antibodies linked to the fluorochromes Alexa Fluor 488 (donkey anti-rat, 1/2000, A21208, Invitrogen, Waltham, MA, USA), Alexa Fluor 594 (donkey anti-rabbit, 1/2000, A21207, Invitrogen, Waltham, MA, USA) and Alexa Fluor 647 (donkey anti-goat, 1/2000, A21447, Invitrogen, Waltham, MA, USA) for 2 h at RT, then washed again with PBS. Images of the different sections were captured with a Hamamatsu ORCA-R<sup>2</sup> camera

mounted on an Olympus IX83 P2ZF microscope (Tokyo, Japan). Images were analyzed using ImageJ 1.53n software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

## 2.5 | Experimental design and statistical analysis

All data were presented as mean ± SD. Prior to any procedures or testing, animals were randomized to one of three groups as defined previously: Control, 1d Sham or 1d P.I. groups. For mean fluorescence intensity (MFI) analyses, 1d Sham and 1d P.I. values were normalized to the Control group (value = 1). For the Control group, two Control animals were included in each experiment, and the mean of the values from each animal was set to 1. A one sample *t* test was used to compare Control ( $n = 8$ ) and 1d Sham values ( $n = 7$ ), and a Student *t* test was used to compare 1d Sham ( $n = 7$ ) and 1d P.I. ( $n = 8$ ) values. For the number of microglia and neutrophils per C1–C3 spinal cord segment and the frequency of their coexpression of H3cit, MPO and SYTOX, a Student *t* test or Mann–Whitney rank sum test (when normality test or variance test failed) was used to compare the Control ( $n = 8$ ) versus 1d Sham ( $n = 7$ ) and the 1d Sham versus 1d P.I. ( $n = 8$ ) groups. For the coexpression of H3cit, MPO and SYTOX in microglia, the threshold was set to between 0% and 0.60% of cells coexpressing ET markers for the Control group, and then this threshold was applied for analysis on 1d Sham and 1d P.I. groups. For the coexpression of H3cit, MPO and SYTOX in neutrophils, the threshold was set to between 0% and 2% of cells coexpressing ET markers for the Control group, and then this threshold was applied for analysis on 1d Sham and 1d P.I. groups. For the expression of H3cit in microglia by immunofluorescence on C1–C3 spinal cord longitudinal sections ( $n = 6$  1d P.I. mice), two way repeated measures ANOVA was used to compare the differences between the injured and non-injured sides and between 300 μm width rectangular subsections. Results were considered statistically significant when  $p < 0.05$ . SigmaPlot 12.5 software (Systat Software, San Jose, CA, USA) was used for all analyses.

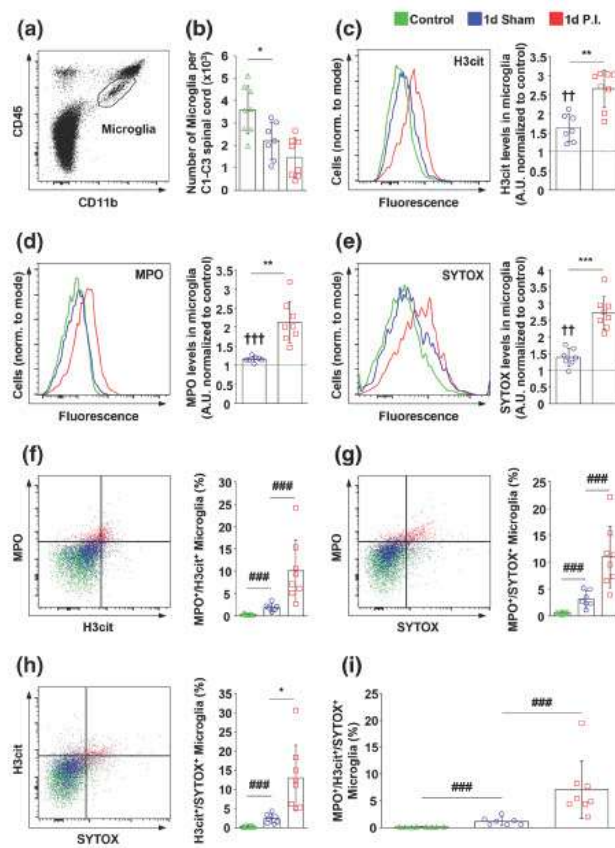
## 3 | RESULTS

### 3.1 | Effect of C2 spinal cord hemisection on the production of ETs by living resident microglia

Microglia residing in the central nervous system are activated within the minutes following a spinal cord injury.

We used flow cytometry to evaluate the formation of ETs by these resident microglia at 1 day following injury at the C2 section of the spinal cord. Microglia were identified as CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>int</sup> cells (Figures 1a and S2). The absolute number of microglia was significantly lower in 1d Sham compared with Control mice ( $2217 \pm 823$  vs.  $3600 \pm 1073$  per C1–C3 spinal cord segment respectively,  $p = 0.016$ ). This number also differed between 1d Sham and 1d P.I. groups, though not to a statistically significant extent ( $1459 \pm 880$  per C1–C3 spinal cord segment in 1d P. I group,  $p = 0.110$ ) (Figure 1b). The expression of three individual known markers of ETs in microglia was investigated: citrullinated histone H3

(H3cit), which is involved in chromatin decondensation; myeloperoxidase (MPO), a granular enzyme; and SYTOX, a DNA intercalating agent. Expression of these markers was increased in 1d Sham compared with Control mice. Expression of H3cit was  $1.63 \pm 0.36$  AU versus 1 AU,  $p = 0.003$  (Figure 1c). Expression of MPO was  $1.16 \pm 0.07$  AU versus 1 AU,  $p < 0.001$  (Figure 1d). Expression of SYTOX was  $1.39 \pm 0.27$  AU versus 1 AU,  $p = 0.009$  (Figure 1e). This increased expression was further amplified in 1d P.I. mice (H3cit:  $2.66 \pm 0.49$  AU,  $p < 0.001$ ; MPO:  $2.14 \pm 0.54$  AU,  $p < 0.001$ ; SYTOX:  $2.72 \pm 0.50$  AU,  $p < 0.001$ ) compared with 1d Sham animals (Figure 1c–e).



**FIGURE 1** Microglia extracellular traps formation following a C2 spinal cord injury in 1-day post-injury (1d P.I.) mice. (a) Representative gating of CD45<sup>int</sup>CD11b<sup>+</sup> living microglia from the C1 to C3 spinal cord segment of a 1d P.I. mouse. (b) Number of microglia per C1–C3 spinal cord segment in Control (green), 1d Sham (blue) and 1d P.I. (red) groups. (c, d, e) Representative histogram and corresponding expression of citrullinated histone H3 (H3cit) (c), myeloperoxidase (MPO) (d) and SYTOX (e) in Control (green), 1d Sham (blue) and 1d P.I. (red) groups. 1-d Sham and 1d P.I. animal values have been normalized to the values of control animals (dotted line at 1 U.A.). (f, g, h) Representative dot plot and corresponding percentage of living microglia co-expressing MPO and H3cit (f), MPO and SYTOX (g) and H3cit and SYTOX (h) in Control (green), 1d Sham (blue) and 1d P.I. (red) groups. (i) Percentage of living microglia co-expressing MPO, H3cit and SYTOX in Control (green), 1d Sham (blue) and 1d P.I. (red) groups. \* $p < 0.05$ ; Student *t* test. \*\* $p < 0.001$ ; Student *t* test. \*\*\* $p < 0.0001$ ; Student *t* test. †† $p < 0.01$ ; compared with Control group, two-tailed one-sample *t* test. ††† $p < 0.001$ ; compared with Control group, two-tailed one-sample *t* test. ### $p \leq 0.001$ ; Mann–Whitney rank sum test



### 3.2 | Colocalization of ETs markers in resident microglia

Our results display individual expression levels of H3cit, MPO and SYTOX. However, the coexpression of these ETs markers is a better proxy for ET formation, considering that an increased expression of MPO alone, for instance, could alternatively reflect cell degranulation. We therefore additionally evaluated the frequency of microglia coexpression of H3cit/MPO, SYTOX/MPO and SYTOX/H3cit. The C2 spinal cord hemisection induced a dramatic increase in the frequency of microglia coexpressing these markers in 1d P.I. mice (H3cit/MPO:  $10.04 \pm 6.89\%$ ; SYTOX/MPO:  $12.96 \pm 8.58\%$ ; SYTOX/H3cit:  $10.95 \pm 5.74\%$ ) compared with 1d Sham mice (H3cit/MPO:  $1.81 \pm 0.88\%$ ,  $p < 0.001$ ; SYTOX/MPO:  $2.37 \pm 1.25\%$ ,  $p < 0.001$ ; SYTOX/H3cit:  $3.14 \pm 1.50\%$ ,  $p = 0.004$ ) (Figure 1f–h). Interestingly, coexpression was also increased in the 1d Sham group compared with the Control group (H3cit/MPO:  $0.32 \pm 0.11\%$ ,  $p < 0.001$ ; SYTOX/MPO:  $0.39 \pm 0.19\%$ ,  $p < 0.001$ ; SYTOX/H3cit:  $0.60 \pm 0.17\%$ ,  $p < 0.001$ ) (Figure 1f–h). Furthermore, the coexpression of all three markers was evaluated. A significant increase in the frequency of microglia cells coexpressing H3cit, MPO and SYTOX was observed in 1d P.I. mice ( $7.07 \pm 5.42\%$ ) compared with 1d Sham mice ( $1.18 \pm 0.71\%$ ,  $p < 0.001$ ) (Figure 1i). A significant increase was likewise observed in the 1d Sham group compared with the Control group ( $0.12 \pm 0.05\%$ ;  $p < 0.001$ ) (Figure 1i).

### 3.3 | Prediction of ETs production by microglia in the C1–C3 injured spinal cord

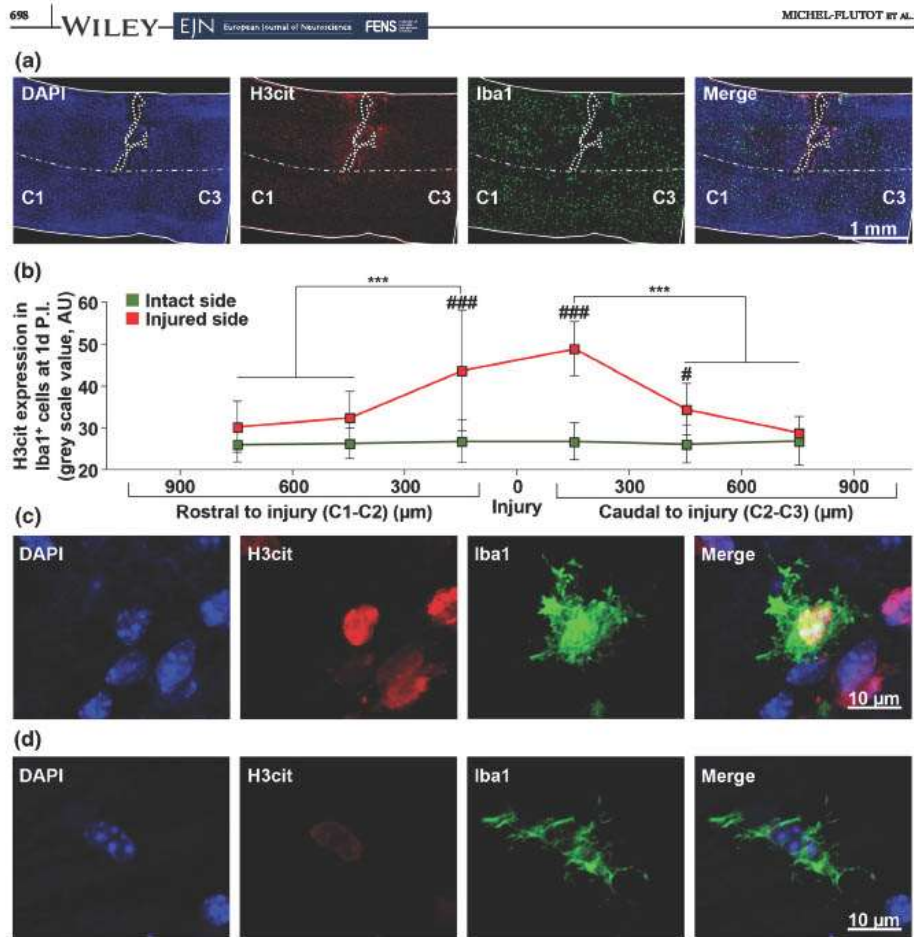
Evaluation of ET production in fixed tissue sections is frequently evaluated by quantification of the H3cit in cells. Quantification of H3cit serves as a proxy not only for cells producing ETs but also for cells on the verge of producing ETs. In this study, we quantified the expression of H3cit in identified microglia (Iba1+ cells) in the 1d injured spinal cord to confirm MiET production across tissue sections (Figure 2a). On the injured side, H3cit expression was significantly higher in segments between 0 and 300  $\mu\text{m}$  rostrally ( $43.72 \pm 6.25$  AU) compared with more rostral segments, that is, between 300 and 600  $\mu\text{m}$  ( $32.49 \pm 6.11$  AU,  $p < 0.001$ ) and between 600 and 900  $\mu\text{m}$  ( $30.28 \pm 5.03$  AU,  $p < 0.001$ ). Similarly, the expression of H3cit was significantly higher in segments between 0 and 300  $\mu\text{m}$  caudally ( $48.93 \pm 14.31$  AU) compared with more caudal segments, that is, between 300 and 600  $\mu\text{m}$  ( $34.44 \pm 6.51$  AU,  $p < 0.001$ ), and between 600 and 900  $\mu\text{m}$  ( $28.86 \pm 6.14$  AU,  $p < 0.001$ ) (Figure 2b). Conversely, this

expression did not vary significantly between the different segments of the intact side ( $p > 0.05$ ). We then compared the expression of H3cit in microglia between the injured and the intact sides. At the level of the injury, this expression was significantly increased in the injured side compared with the intact side rostrally between 0 and 300  $\mu\text{m}$  from the injured area ( $26.82 \pm 5.16$  AU,  $p < 0.001$ ) and caudally between 0 and 300  $\mu\text{m}$  ( $26.79 \pm 4.41$  AU,  $p < 0.001$ ) and between 300 and 600  $\mu\text{m}$  ( $26.15 \pm 4.58$  AU,  $p = 0.022$ ) from the injured area (Figure 2b). These results suggest that microglia located near the injury site are most likely to form ETs, in agreement with our flow cytometry results. These microglia express higher nuclear H3cit labelling compared with more distal microglia (Figure 2b,c). Note the clear deposition of H3cit labelling at the border around the lesion site (Figure 2a), which likely represents the separation between the viable tissue and a zone of necrosis as described in other pathologies.

Taken together, these results display that after a durotomy, resident microglia produce ETs, and this production is increased following spinal cord injury particularly in tissue closest to the injury site.

### 3.4 | Effect of C2 spinal cord injury on the recruitment of neutrophils and the production of markers of NETs

Neutrophils are the first peripheral immune cells to be recruited to the injured site following spinal cord injury. The formation of ETs by neutrophils (NETs) is well described in other organs and models (Boettcher et al., 2020; Li & Tablin, 2018; Nomura et al., 2019), leading us to wonder if infiltrating neutrophils could form ETs in the injured spinal cord. Neutrophils have been identified as CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>high</sup>Ly6G<sup>+</sup> cells (Figures 3a and S2). In agreement with findings of other studies (Donnelly & Popovich, 2008), absolute number of neutrophils was increased in the C1–C3 spinal cord at 1 day following C2 spinal cord hemisection ( $3255 \pm 1878$  per C1–C3 spinal cord segment) compared with 1d Sham group ( $251 \pm 141$  vs.  $70 \pm 37$  per C1–C3 spinal cord segment,  $p < 0.001$ ; Figure 3i). Interestingly, the durotomy performed in the 1d Sham group also led to an increase in infiltrating neutrophils compared with the Control group ( $70 \pm 37$  per C1–C3 spinal cord segment,  $p = 0.002$ ). As with microglia, we measured neutrophil H3cit, MPO and SYTOX expression using flow cytometry. A significant increase in H3cit expression was observed in the 1d Sham group ( $1.64 \pm 0.32$  AU) compared with the Control group (1 AU,  $p = 0.002$ ; Figure 3b). There was no difference in MPO expression between the



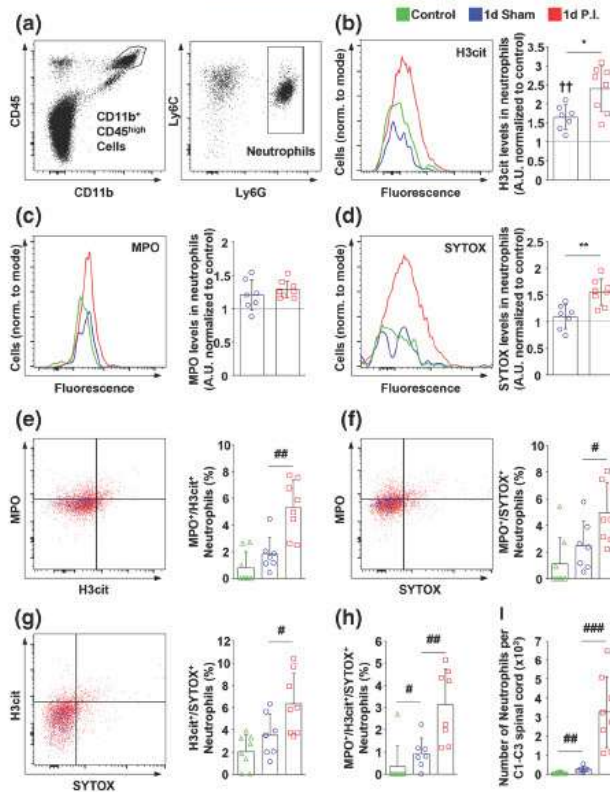
**FIGURE 2** H3cit expression in microglia following a C2 spinal cord injury in 1-day post-injury (1d P.I.) mice. (a) Representative pictures of Iba1<sup>+</sup> microglia in green expressing citrullinated histone H3 (H3cit, red) from the C1 to C3 spinal cord segment of a 1d P.I. mouse. The nucleus of cells is labelled with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) in blue. The spinal cord is delineated with the white solid line, the median is delineated with the white dashed line and the injury area is contoured with the white dotted line. (b) Expression of H3cit for the intact side (green line) and the injured side (red line) depending on distance to the site of injury. (c) Representative pictures, showing a magnified microglia near the site of injury, from panel (a). (d) Representative pictures, showing a magnified microglia far from the site of injury (caudal part), from panel (a). \*\*\* $p < 0.001$ ; injured side versus intact side from 0 to 300  $\mu\text{m}$  rostral and caudal to injury, two way repeated measures ANOVA. # $p = 0.022$ ; injured side versus intact side from 300 to 600  $\mu\text{m}$  caudal to injury, two way repeated measures ANOVA. \*\*\* $p < 0.001$ ; 0 to 300  $\mu\text{m}$  rostral versus 300 to 600  $\mu\text{m}$ , 600 to 900  $\mu\text{m}$  and 900 to 1200  $\mu\text{m}$  rostral to injury, two way repeated measures ANOVA

Control and 1d Sham groups (1 AU vs.  $1.21 \pm 0.23$  AU, respectively,  $p = 0.051$ ; Figure 3c) or SYTOX expression between the Control and 1d Sham groups (1 AU vs.  $1.10$

$\pm 0.23$  AU, respectively,  $p = 0.31$ ; Figure 3d). The increased H3cit expression was amplified in 1d P.I. mice ( $2.39 \pm 0.60$  AU,  $p = 0.011$ ) compared with 1d Sham



**FIGURE 3** Neutrophil extracellular traps formation following a C2 spinal cord injury in 1-day post-injury (1d P.I.) mice. (a) Representative gating of CD45<sup>high</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup> living neutrophils from the C1 to C3 spinal cord segment of a 1d P.I. mouse. (b, c, d) Representative histogram and corresponding expression of citrullinated histone H3 (H3cit) (b), myeloperoxidase (MPO) (c) and SYTOX (d) in Control (green), 1d Sham (blue) and 1d P.I. (red) groups. 1d Sham and 1d P.I. animal values have been normalized to the values of Control animals (dotted line at 1 U.A.). (e, f, g) Representative dot plot and corresponding percentage of living neutrophils co-expressing MPO and H3cit (e), MPO and SYTOX (f) and H3cit and SYTOX (g) in Control (green), 1d Sham (blue) and 1d P.I. (red) groups. (h) Percentage of living neutrophils co-expressing MPO, H3cit and SYTOX in Control (green), 1d Sham (blue) and 1d P.I. (red) groups. (i) Number of living neutrophils per C1–C3 spinal cord segment in Control (green), 1d Sham (blue) and 1d P.I. (red) groups. \* $p < 0.05$ ; Student  $t$  test. \*\* $p < 0.01$ , Student  $t$  test. †† $p < 0.01$ ; compared with Control group, two-tailed one-sample  $t$  test. # $p < 0.05$ ; Mann–Whitney rank sum test. ## $p < 0.01$ ; Mann–Whitney rank sum test. ### $p \leq 0.001$ ; Mann–Whitney rank sum test



mice (Figure 2b). An increase in SYTOX expression was also observed in 1d P.I. mice ( $1.55 \pm 0.24$  AU) compared with 1d Sham mice ( $p = 0.002$ ; Figure 3d). No difference in MPO expression was observed between the 1d P.I. ( $1.29 \pm 0.13$  AU) and 1d Sham groups ( $p = 0.41$ ; Figure 3c).

### 3.5 | Colocalization of ETs markers in infiltrating neutrophils

We evaluated the changes in the frequency of neutrophils coexpressing H3cit/MPO, SYTOX/MPO and SYTOX/H3cit. There was no significant difference between the Control and 1d Sham groups in the percentage of neutrophils coexpressing H3cit/MPO ( $0.79 \pm 1.21\%$  vs.  $1.81 \pm 1.28\%$ , respectively,  $p = 0.094$ ; Figure 3e),

SYTOX/MPO ( $1.13 \pm 1.97\%$  vs.  $2.45 \pm 1.87\%$ , respectively,  $p = 0.094$ ; Figure 3f) and SYTOX/H3cit ( $2.03 \pm 1.49\%$  vs.  $3.49 \pm 1.94\%$ , respectively,  $p = 0.125$ ; Figure 3g). The C2 spinal cord hemisection, however, induced an increased coexpression of these markers in 1d P.I. mice (H3cit/MPO:  $5.30 \pm 2.04\%$ ,  $p = 0.002$ ; SYTOX/MPO:  $4.95 \pm 2.24\%$ ,  $p = 0.037$ ; SYTOX/H3cit:  $6.30 \pm 2.76\%$ ,  $p < 0.043$ ) compared with 1d Sham mice (Figure 3e–g). We also assessed the percentage of neutrophils coexpressing all three markers. The percentage of neutrophils expressing H3cit, MPO and SYTOX was significantly higher in the 1d P.I. group ( $3.11 \pm 1.62\%$ ) compared with the 1d Sham group ( $0.92 \pm 0.70\%$ ,  $p = 0.002$ ; Figure 3h). The durotomy in 1d Sham mice also led to an increase in neutrophils expressing all three markers compared with Control mice ( $0.34 \pm 0.96\%$ ,  $p = 0.040$ ; Figure 3h).

### 3.6 | Neutrophil localization and H3cit expression

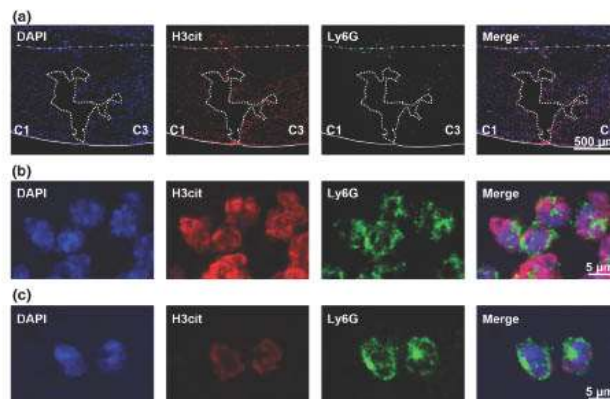
Finally, we observed the presence and location of infiltrating neutrophils in the injured spinal cord. We found that these neutrophils are located around the lesion site (Figure 4a). Among these neutrophils, some presented a strong H3cit labelling (Figure 4b) whereas others presented a weaker H3cit labelling (Figure 4c). Taken together, these results display that after spinal cord injury, infiltrating neutrophils produce ETs at the site of injury.

## 4 | DISCUSSION

In the present study, we demonstrated the involvement of resident microglia and infiltrating neutrophils in the formation of ETs in the spinal cord following injury. To date, the formation of ETs has been reported in neutrophils (Brinkmann et al., 2004), monocytes (Webster et al., 2010), MDMs (Boe et al., 2015) and more recently, in microglia (Wang et al., 2019). However, the formation of ETs by these specific cells was never observed in spinal cord. At 1-day P.I., activated microglia and infiltrating neutrophils are fully present at the injured site in rodents, but monocytes and MDMs do not invade the

injury area until later (Donnelly & Popovich, 2008). To identify these cells, Ly6G marker for neutrophils and Iba1 for microglia (Sasaki et al., 2001) were used in immunostaining and gated as CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>high</sup>Ly6G<sup>+</sup> cells and CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>int</sup> cells, respectively, in flow cytometry (Figure S1). Our results indicate that resident microglia and infiltrating neutrophils form ETs soon (1 day) after a spinal cord injury. More specifically, these ETs can be considered vital ETs, meaning leading to release of ETs in the extracellular space without compromising cell survival (Papayannopoulos, 2017). This is compared with suicidal ETs, formation of which leads to membrane permeabilization and cell death. In this study, we evaluated ET formation only in living cells by flow cytometry, but this does not exclude the presence of suicidal ETs.

By immunolabelling, we observed an increase of H3cit expression in microglia around the lesion site, as well as in some of the infiltrating neutrophils (Figures 2 and 4). This correlates with our cytometry results showing that not all microglia and neutrophils increase their expression of markers of ET formation. However, it remains to be determined if suicidal ETs formation also occurs, what might be the ratio of vital and suicidal ETs in microglia and neutrophils, as well as the timing and the duration of ETs formation following spinal cord injury. We also did not evaluate whether invading MDMs



**FIGURE 4** Presence of neutrophils expressing H3cit at the site of injury following a C2 spinal cord injury in 1-day post-injury (1d P.I.) mice. (a) Representative pictures of Ly6G<sup>+</sup> neutrophils in green and labelling of citrullinated histone H3 (H3cit) in red from the C1 to C3 spinal cord segment of a 1d P.I. mouse. The nucleus of cells is labelled with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) in blue. The spinal cord is delineated with the white solid line, the median is delineated with the white dashed line and the injury area is contoured with the white dotted line. (b) Representative pictures, showing magnified neutrophils expressing high levels of H3cit, from panel (a). (c) Representative pictures, showing magnified neutrophils expressing low levels of H3cit, from panel (a)



also participate in ET formation. A study of the kinetics of NET, MiET and macrophage ET (MET) production could lead to a better understanding of the role of these ETs in the neuroinflammatory processes following spinal cord injury. However, precautions must be taken in kinetic evaluation. Activated microglia adopt an amoeboid form and upregulate markers also expressed by MDMs, which make them hardly distinguishable from infiltrating MDMs by immunolabelling and flow cytometry (Kroner & Rosas Almanza, 2019). More specifically, activated microglia upregulate their expression of CD45 and become CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>high</sup>, like MDMs (Martin et al., 2017). This could explain the reduction in the number of microglia observed in our 1d Sham animals compared with the Control group, and the similar number observed between the 1d Sham and 1d P.I. groups. Perhaps some microglia became CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>high</sup> and were excluded from microglia gating (Cosenza-Nashat et al., 2006). It is likely these microglia have a higher level of activation than gated microglia and therefore could produce MiETs as CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>int</sup>. To solve this problem of identification, transgenic mice produced by crossbreeding would allow expression of a fluorescent molecule under CX3CR1 promoter, which is tamoxifen-inducible. MDMs, which have a quicker turnover than microglia, would lose their fluorescence, leaving only microglia labelled (Yona et al., 2013). This study design would facilitate further study of ETs produced specifically by microglia and MDMs after spinal cord injury.

We also observed that living microglia and neutrophils increase their ET formation following durotomy. This result correlates with other studies demonstrating the formation of NETs by infiltrating neutrophils in mouse models of durotomy (Jin et al., 2020). However, this is the first report of MiET formation in the spinal cord following durotomy. This phenomenon should be considered in cases of spine operation, as the occurrence of this neuroinflammatory process can result in late neurological deficits.

NETs are already known to exacerbate neurological deficits, and their inhibition using deoxyribonuclease-1 (DNase1; cleave DNA) or peptidylarginine deiminase 4 (PAD4; involved in the citrullination of histone H3) inhibitors leads to improved functional outcomes following traumatic brain (Vaibhav et al., 2020) and spinal cord injury (Feng et al., 2021). Other studies have demonstrated that administration of ET inhibitors such as neutrophil elastase inhibitor (sivelestat) induces beneficial effects following spinal cord injury but without mentioning ETs or evaluating the expression of their constituents (Kumar et al., 2018). This supports a potential harmful effect of ETs following central nervous system injury. Moreover, in cases of spinal cord injury, inhibition of ETs

leads to reduced glial scarring (Feng et al., 2021). This correlates with our immunolabelling results suggesting that microglia near the lesion site are most likely to form MiETs. The inhibition of these MiETs could indeed result in reduced neuroinflammation in this area and, consequently, reduced scar tissue formation. However, the drug administration was done immediately following the induction of the model (Feng et al., 2021; Vaibhav et al., 2020), meaning only ETs formed by microglia and infiltrating neutrophils, but not infiltrating MDM and chronically activated microglia at later time-points, were targeted. It is likely that a more defined and chronically delivered therapeutic could maximize the benefits of ET inhibition. ET-inhibiting drugs should be compared to determine the most appropriate one, as different drugs target different stages of ET formation (histone H3 citrullination, DNA, formation of pore to expel the ETs, etc.). Some of these inhibitors are under clinical trial (Chiang et al., 2020). It remains unclear how ET inhibition leads to improved functional outcome, especially following spinal cord injury. The impact of this inhibition on the inflammatory and plasticity processes that take place following injury represents a worthy research topic. This could be achieved by studying the effect of ET inhibitors on the overexpression of chondroitin sulphate proteoglycan (known to inhibit plasticity processes) (Bartus et al., 2012; Kwok et al., 2014) or on axonal sprouting or rewiring (Ballermann & Fouad, 2006; Darlot et al., 2012) and the expression of neural growth factors (Keefe et al., 2017). The potential beneficial effects of ETs should also be explored, such as ET facilitation of myelin debris clearing following injury.

To conclude, our results highlight a new role of resident microglia following spinal cord injury: the formation of MiETs. We also showed that infiltrating neutrophils produce ETs 1 day following injury. These two types of immune cells are more likely to form ETs in tissue closest to the site of injury. However, it remains unknown if more chronically infiltrating MDMs also form ETs in the injured spinal cord. We also did not evaluate the proportion of vital versus suicidal ETs and their specific roles in the pathology. To this aim, a study of the kinetics of NET, MiET and MET formation should be performed to better understand this inflammatory process and pave the way for post-injury therapies that effectively target ETs.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by funding from the Chancellerie des Universités de Paris (Legs Poix) (SV), INSERM (SV and AM), Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines (SV and AM) and Fondation pour la recherche médicale ECO202106013756 (AM and LE).

The supporters had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript. This work has benefited from the Department of Biotechnologies of the University of Versailles Saint-Quentin en Yvelines (CYMAGES and histology facilities, UFR SVS, UVSQ, Université Paris-Saclay, 78180 Montigny-le Bretonneux, France). We thank Lucille Adam for her precious advice. The graphical abstract includes modified templates from Servier Medical Art, provided by Servier, licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 unported licence.

#### CONFLICT OF INTEREST

None.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

**Pauline Michel-Flutot:** conceptualization, investigation, formal analysis, visualization, project administration, writing—original draft and review and editing. **Camille H Bourcier:** investigation and writing—review and editing. **Laila Emam:** investigation, formal analysis and writing—review and editing. **Adeline Gasser:** writing—review and editing. **Simon Glatigny:** writing—review and editing. **Stéphane Vinit:** conceptualization, methodology, supervision, project administration, funding acquisition and writing—review and editing. **Arnaud Mansart:** conceptualization, methodology, supervision, project administration, funding acquisition and writing—review and editing.

#### PEER REVIEW

The peer review history for this article is available at <https://publons.com/publon/10.1111/ejn.15902>.

#### DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data presented in this study are available here: <https://1drv.ms/u/s!Auu8ZYHjFnnHhL4gAmBsDHk61EbkbQ?e=LmW5NE>.

#### ORCID

**Pauline Michel-Flutot**  <https://orcid.org/0000-0002-5003-217X>

**Stéphane Vinit**  <https://orcid.org/0000-0001-7013-1741>

#### REFERENCES

- Agrawal, I., Sharma, N., Saxena, S., Arvind, S., Chakraborty, D., Chakraborty, D. B., Jha, D., Ghatak, S., Epari, S., Gupta, T., & Jha, S. (2021). Dopamine induces functional extracellular traps in microglia. *iScience*, *24*(1), 101968. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101968>
- Aulik, N. A., Hellenbrand, K. M., Czuprynski, C. J., & Urban, J. F. (2012). Mannheimia haemolytica and its leukotoxin cause macrophage extracellular trap formation by bovine macrophages. *Infection and Immunity*, *80*(5), 1923–1933. <https://doi.org/10.1128/1AI.06120-11>
- Ballermann, M., & Fouad, K. (2006). Spontaneous locomotor recovery in spinal cord injured rats is accompanied by anatomical plasticity of reticulospinal fibers. *European Journal of Neuroscience*, *23*(8), 1988–1996. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04726.x>
- Bartus, K., James, N. D., Bosch, K. D., & Bradbury, E. J. (2012). Chondroitin sulphate proteoglycans: Key modulators of spinal cord and brain plasticity. *Experimental Neurology*, *235*(1), 5–17. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.08.008>
- Boe, D. M., Curtis, B. J., Chen, M. M., Ippolito, J. A., & Kovacs, E. J. (2015). Extracellular traps and macrophages: New roles for the versatile phagocyte. *Journal of Leukocyte Biology*, *97*(6), 1023–1035. <https://doi.org/10.1189/jlb.4RI1014-521R>
- Boettcher, M., Esser, M., Trah, J., Klohs, S., Mokhaberi, N., Wenskus, J., Trochimuk, M., Appl, B., Reinshagen, K., Raluy, L. P., & Klinke, M. (2020). Markers of neutrophil activation and extracellular traps formation are predictive of appendicitis in mice and humans: A pilot study. *Scientific Reports*, *10*(1), 18240. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74370-9>
- Bradbury, E. J., & Burnside, E. R. (2019). Moving beyond the glial scar for spinal cord repair. *Nature Communications*, *10*(1), 3879. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11707-7>
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y., & Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, *303*(5663), 1532–1535. <https://doi.org/10.1126/science.1092385>
- Chiang, C.-C., Korinek, M., Cheng, W.-J., & Hwang, T.-L. (2020). Targeting neutrophils to treat acute respiratory distress syndrome in coronavirus disease. *Frontiers in Pharmacology*, *11*, 572009. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.572009>
- Cosenza-Nashat, M. A., Kim, M.-O., Zhao, M.-L., Suh, H.-S., & Lee, S. C. (2006). CD45 isoform expression in microglia and inflammatory cells in HIV-1 encephalitis. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, *16*(4), 256–265. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2006.00027.x>
- Darlot, F., Cayetanot, F., Gauthier, P., Matarazzo, V., & Kastner, A. (2012). Extensive respiratory plasticity after cervical spinal cord injury in rats: Axonal sprouting and rerouting of ventrolateral bulbospinal pathways. *Experimental Neurology*, *236*(1), 88–102. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.04.004>
- Donnelly, D. J., & Popovich, P. G. (2008). Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Experimental Neurology*, *209*(2), 378–388. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.06.009>
- Doster, R. S., Rogers, L. M., Gaddy, J. A., & Aronoff, D. M. (2018). Macrophage extracellular traps: A scoping review. *Journal of Innate Immunity*, *10*(1), 3–13. <https://doi.org/10.1159/000480373>
- Feng, Z., Min, L., Liang, L., Chen, B., Chen, H., Zhou, Y., Deng, W., Liu, H., & Hou, J. (2021). Neutrophil extracellular traps exacerbate secondary injury via promoting neuroinflammation and blood–spinal cord barrier disruption in spinal cord injury. *Frontiers in Immunology*, *12*, 698249. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.698249>
- Gensel, J. C., & Zhang, B. (2015). Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury. *Brain*



- Research, 1619, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.12.045>
- Guglietta, S., Chiavelli, A., Zagato, E., Krieg, C., Gandini, S., Ravenda, P. S., Bazolli, B., Lu, B., Penna, G., & Rescigno, M. (2016). Coagulation induced by C3aR-dependent NETosis drives protumorigenic neutrophils during small intestinal tumorigenesis. *Nature Communications*, 7, 11037. <https://doi.org/10.1038/ncomms11037>
- Gurski, C. J., & Dittel, B. N. (2022). Myeloperoxidase as a marker to differentiate mouse monocyte/macrophage subsets. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15), 8246. <https://doi.org/10.3390/ijms23158246>
- Hawthorne, A. L., & Popovich, P. G. (2011). Emerging concepts in myeloid cell biology after spinal cord injury. *Neurotherapeutics*, 8(2), 252–261. <https://doi.org/10.1007/s13311-011-0032-6>
- Jin, Z., Sun, J., Song, Z., Chen, K., Nicolas, Y. S. M., Kc, R., Ma, Q., Liu, J., & Zhang, M. (2020). Neutrophil extracellular traps promote scar formation in post-epidural fibrosis. *Regenerative Medicine*, 5(1), 19. <https://doi.org/10.1038/s41536-020-00103-1>
- Keefe, K. M., Sheikh, I. S., & Smith, G. M. (2017). Targeting neurotrophins to specific populations of neurons: NGF, BDNF, and NT-3 and their relevance for treatment of spinal cord injury. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3), 548. <https://doi.org/10.3390/ijms18030548>
- Kigerl, K. A., Gensel, J. C., Ankeny, D. P., Alexander, J. K., Donnelly, D. J., & Popovich, P. G. (2009). Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *The Journal of Neuroscience*, 29(43), 13435–13444. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3257-09.2009>
- Kroner, A., & Rosas Almanza, J. (2019). Role of microglia in spinal cord injury. *Neuroscience Letters*, 709, 134370. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134370>
- Kumar, H., Choi, H., Jo, M. J., Joshi, H. P., Muttigi, M., Bonanomi, D., Kim, S. B., Ban, E., Kim, A., Lee, S. H., Kim, K. T., Sohn, S., Zeng, X., & Han, I. (2018). Neutrophil elastase inhibition effectively rescued angiotensin-1 decrease and inhibits glial scar after spinal cord injury. *Acta Neuro-pathologica Communications*, 6(1), 73. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0576-3>
- Kwok, J. C. F., Heller, J. P., Zhao, R.-R., & Fawcett, J. W. (2014). Targeting inhibitory chondroitin sulphate proteoglycans to promote plasticity after injury. In A. J. Murray (Ed.), *Axon growth and regeneration: Methods and protocols* (pp. 127–138). Springer New York.
- Li, R. H. L., & Tablin, F. (2018). A comparative review of neutrophil extracellular traps in sepsis. *Frontiers in Veterinary Science*, 5, 291. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00291>
- Martin, E., El-Behi, M., Fontaine, B., & Delarasse, C. (2017). Analysis of microglia and monocyte-derived macrophages from the central nervous system by flow cytometry. *Journal of Visualized Experiments*, (124), e55781. <https://doi.org/10.3791/55781>
- Michel-Flutot, P., Mansart, A., Deramandt, B. T., Jesus, I., Lee, K., Bonay, M., & Vinit, S. (2021). Permanent diaphragmatic deficits and spontaneous respiratory plasticity in a mouse model of incomplete cervical spinal cord injury. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 284, 103568. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2020.103568>
- Milich, L. M., Ryan, C. B., & Lee, J. K. (2019). The origin, fate, and contribution of macrophages to spinal cord injury pathology. *Acta Neuropathologica*, 137(5), 785–797. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-01992-3>
- Nguyen, H. X., O'Barr, T. J., & Anderson, A. J. (2007). Polymorphonuclear leukocytes promote neurotoxicity through release of matrix metalloproteinases, reactive oxygen species, and TNF- $\alpha$ . *Journal of Neurochemistry*, 102(3), 900–912. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04643.x>
- Noble, L. J., Donovan, F., Igarashi, T., Goussev, S., & Werb, Z. (2002). Matrix metalloproteinases limit functional recovery after spinal cord injury by modulation of early vascular events. *The Journal of Neuroscience*, 22(17), 7526–7535. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-17-07526.2002>
- Nomura, K., Miyashita, T., Yamamoto, Y., Munesue, S., Harashima, A., Takayama, H., Fushida, S., & Ohta, T. (2019). Citrullinated histone H3: Early biomarker of neutrophil extracellular traps in septic liver damage. *The Journal of Surgical Research*, 234, 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2018.08.014>
- Novotny, J., Oberdieck, P., Titova, A., Pellsek, J., Chandraratne, S., Nicol, P., Hapfelmeier, A., Jonek, M., Maegdefessel, L., Poppert, H., Pircher, J., Massberg, S., Friedrich, B., Zimmer, C., Schulz, C., & Boeckh-Behrens, T. (2020). Thrombus NET content is associated with clinical outcome in stroke and myocardial infarction. *Neurology*, 94(22), e2346–e2360. <https://doi.org/10.1212/wnl.0000000000009532>
- Orr, M. B., & Gensel, J. C. (2018). Spinal cord injury scarring and inflammation: Therapies targeting glial and inflammatory responses. *Neurotherapeutics*, 15(3), 541–553. <https://doi.org/10.1007/s13311-018-0631-6>
- Papayannopoulos, V. (2017). Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nature Reviews Immunology*, 18(2), 134–147. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.105>
- Popovich, P. G., Guan, Z., McGaughy, V., Fisher, L., Hickey, W. F., & Basso, D. M. (2002). The neuropathological and behavioral consequences of intraspinal microglial/macrophage activation. *Journal of Neuro-pathology and Experimental Neurology*, 61(7), 623–633. <https://doi.org/10.1093/jnen/61.7.623>
- Popovich, P. G., & Jones, T. B. (2003). Manipulating neuroinflammatory reactions in the injured spinal cord: Back to basics. *Trends in Pharmacological Sciences*, 24(1), 13–17. [https://doi.org/10.1016/s0165-6147\(02\)00006-8](https://doi.org/10.1016/s0165-6147(02)00006-8)
- Prinz, M., Jung, S., & Priller, J. (2019). Microglia biology: One century of evolving concepts. *Cell*, 179(2), 292–311. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.053>
- Rabchevsky, A. G., & Streit, W. J. (1998). Role of microglia in postinjury repair and regeneration of the CNS. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, 4(3), 187–192. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2779\(1998\)4:3<187::AID-MRDD6>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2779(1998)4:3<187::AID-MRDD6>3.0.CO;2-L)
- Sasaki, Y., Ohsawa, K., Kanazawa, H., Kohsaka, S., & Imai, Y. (2001). Iba1 is an actin-cross-linking protein in macrophages/microglia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 286(2), 292–297. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5388>
- Subhramayam, C. S., Wang, C., Hu, Q., & Dheen, S. T. (2019). Microglia-mediated neuroinflammation in neurodegenerative

- diseases. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 94, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.05.004>
- Vaibhav, K., Braun, M., Alverson, K., Khodadadi, H., Kutiyawalla, A., Ward, A., Banerjee, C., Sparks, T., Malik, A., Rashid, M. H., Khan, M. B., Waters, M. F., Hess, D. C., Arbab, A. S., Vender, J. R., Hoda, N., Baban, B., & Dhandapani, K. M. (2020). Neutrophil extracellular traps exacerbate neurological deficits after traumatic brain injury. *Science Advances*, 6(22), eaax8847. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax8847>
- Wang, C., Wang, Y., Shi, X., Tang, X., Cheng, W., Wang, X., An, Y., Li, S., Xu, H., Li, Y., Luan, W., Wang, X., Chen, Z., Liu, M., & Yu, L. (2019). The TRAPs from microglial vesicles protect against listeria infection in the CNS. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13(199), 199. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00199>
- Webster, S. J., Daigneault, M., Bewley, M. A., Preston, J. A., Marriott, H. M., Walmsley, S. R., Read, R. C., Whyte, M. K. B., & Dockrell, D. H. (2010). Distinct cell death programs in monocytes regulate innate responses following challenge with common causes of invasive bacterial disease. *The Journal of Immunology*, 185(5), 2968–2979. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000805>
- Weng, W., Hu, Z., & Pan, Y. (2022). Macrophage extracellular traps: Current opinions and the state of research regarding various diseases. *Journal of Immunology Research*, 2022, 7050807–10. <https://doi.org/10.1155/2022/7050807>
- Yona, S., Kim, K.-W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Guillemins, M., Misharin, A., Hume, D. A., Periman, H., Malissen, B., Zelzer, E., & Jung, S. (2013). Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity*, 38(1), 79–91. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.12.001>
- Zivkovic, S., Ayazi, M., Hammel, G., & Ren, Y. (2021). For better or for worse: A look into neutrophils in traumatic spinal cord injury. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 15, 648076. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.648076>

#### SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

**How to cite this article:** Michel-Flutot, P., Bourcier, C. H., Emam, L., Gasser, A., Glatigny, S., Vinit, S., & Mansart, A. (2023). Extracellular traps formation following cervical spinal cord injury. *European Journal of Neuroscience*, 57(4), 692–704. <https://doi.org/10.1111/ejn.15902>

## 5. EFFETS D'UN PROTOCOLE CHRONIQUE DE rTMS SUITE À UNE LÉSION DE LA MOELLE ÉPINIÈRE

---

### Publication :

Michel-Flutot P, Jesus I, Vanhee V, **Bourcier CH**, Emam L, Ouguerroudj A, Lee KZ, Zholudeva LV, Lane MA, Mansart A, Bonay M, Vinit S (2022).

*Effects of Chronic High-Frequency rTMS Protocol on Respiratory Neuroplasticity Following C2 Spinal Cord Hemisection in Rats.*

Biology (Basel). 2022 Mar 19;11(3):473. doi: 10.3390/biology11030473.

Au cours de nos différentes études, nous avons montré un effet positif des  $\beta$ 1-bloquants sur différentes fonctions d'organes, dont le système nerveux, et sur la modulation des ETs dans des modèles infectieux de sepsis. Nous avons également mis en évidence des similitudes entre ces modèles et un modèle traumatique considéré comme stérile à travers la réponse immunitaire, et notamment de la production de ETs. Dans le modèle d'inflammation traumatique de la moelle épinière, nous aurions donc pu tester cette thérapeutique et moduler l'inflammation à l'aide de  $\beta$ 1-bloquants adrénergiques pour étudier leurs effets sur la récupération fonctionnelle, mais nous avons choisi une autre approche qui est déjà utilisée en clinique pour certaines pathologies du système nerveux central. Il s'agit de la stimulation magnétique transcrânienne répétée (rTMS) qui est un traitement thérapeutique non-invasif utilisé chez l'Homme pour soigner différentes pathologies neuro-inflammatoires comme les douleurs neuropathiques chroniques par exemple (Guo et al. 2023).

La rTMS pourrait être une piste de traitement afin de moduler la neuro-inflammation pour induire une récupération fonctionnelle après une hémisection médullaire en C2. Cet effet de la rTMS dans la diminution de la neuro-inflammation en post-traumatique a déjà observée dans une étude récente (Uzair et al. 2021). Dans le cadre des lésions de la moelle épinière, cette approche a montré une amélioration de la récupération fonctionnelle locomotrice ainsi que sensorimotrice, et une diminution de la densité cellulaire astrocytaire et microgliale (Kim et al.

2013). Cependant, nous ne savons que très peu de choses de ses effets moléculaires et cellulaires : les protocoles de rTMS ont entraîné une réduction des marqueurs de l'apoptose, de la mort neuronale, et de la démyélinisation axonale, tandis que ceux de la croissance et de la plasticité neuronale étaient augmentés (Bao et al. 2021; King et al. 2022).

Dans ces travaux, j'ai été impliqué dans l'étude de l'effet moléculaire et cellulaire *in vivo* d'un protocole de rTMS sans m'intéresser à la récupération fonctionnelle qui n'est pas dans mon domaine de compétence. Nous avons testé l'effet de la rTMS durant différents temps post-lésionnels (de 7 jours à 2 mois) chez des rats ayant subi une hémisection en C2, dans le but d'étudier son rôle dans les phénomènes neuro-inflammatoires.

Nos travaux ont mis en évidence qu'un protocole de rTMS chronique permet une réduction des processus inflammatoires en post-traumatique (diminution du marquage Iba1 et CD68 à respectivement 1 mois et 2 mois de traitement dans la moelle épinière). Nous avons également observé une plasticité neuronale (augmentation du marquage GAP-43, marquant les cônes de croissance des axones). Cet outil thérapeutique pourrait donc être utilisé pour atténuer les symptômes induits par une lésion spinale, et éventuellement être combiné à d'autres traitements pour potentialiser les résultats bénéfiques observés.



Article

## Effects of Chronic High-Frequency rTMS Protocol on Respiratory Neuroplasticity Following C2 Spinal Cord Hemisection in Rats

Pauline Michel-Flutot<sup>1</sup>, Isley Jesus<sup>1</sup>, Valentin Vanhee<sup>1</sup>, Camille H. Bourcier<sup>1,2</sup>, Laila Emam<sup>2</sup>, Abderrahim Ouguerrouj<sup>1</sup>, Kun-Ze Lee<sup>3</sup>, Lyandysha V. Zholudeva<sup>4</sup>, Michael A. Lane<sup>5</sup>, Arnaud Mansart<sup>2</sup>, Marcel Bonay<sup>1</sup> and Stéphane Vinit<sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Université Paris-Saclay, UVSQ, Inserm, END-ICAP, 78000 Versailles, France; pauline.michel78280@yahoo.fr (P.M.-F.); isleyj@yahoo.com.br (I.J.); valentin.vanhee.pro@gmail.com (V.V.); camille.bourcier@uvsq.fr (C.H.B.); ouguerrouj.a@gmail.com (A.O.); marcel.bonay@bch.aphp.fr (M.B.)
- <sup>2</sup> Université Paris-Saclay, UVSQ, Inserm, Infection et Inflammation (2I), 78000 Versailles, France; laila.emam@uvsq.fr (L.E.); arnaud.mansart@uvsq.fr (A.M.)
- <sup>3</sup> Department of Biological Sciences, National Sun Yat-sen University, Kaohsiung 80424, Taiwan; kzlee@mail.nsysu.edu.tw
- <sup>4</sup> Gladstone Institutes, San Francisco, CA 94158, USA; lvzholudeva@gmail.com
- <sup>5</sup> Marion Murray Spinal Cord Research Center, Department of Neurobiology and Anatomy, Drexel University College of Medicine, Philadelphia, PA 19129, USA; mlane.neuro@gmail.com
- \* Correspondence: stephane.vinit@uvsq.fr; Tel: +33-170-429-427



Citation: Michel-Flutot, P.; Jesus, I.; Vanhee, V.; Bourcier, C.H.; Emam, L.; Ouguerrouj, A.; Lee, K.-Z.; Zholudeva, L.V.; Lane, M.A.; Mansart, A.; et al. Effects of Chronic High-Frequency rTMS Protocol on Respiratory Neuroplasticity Following C2 Spinal Cord Hemisection in Rats. *Biology* 2022, 11, 473. <https://doi.org/10.3390/biology11030473>

Academic Editors: Cédric G. Geoffroy and Warren Allilain

Received: 14 February 2022  
Accepted: 16 March 2022  
Published: 19 March 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Simple Summary:** High spinal cord injuries (SCIs) are known to lead to permanent diaphragmatic paralysis, and to induce deleterious post-traumatic inflammatory processes following cervical spinal cord injury. We used a noninvasive therapeutic tool (repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS)), to harness plasticity in spared descending respiratory circuit and reduce the inflammatory processes. Briefly, the results obtained in this present study suggest that chronic high-frequency rTMS can ameliorate respiratory dysfunction and elicit neuronal plasticity with a reduction in deleterious post-traumatic inflammatory processes in the cervical spinal cord post-SCI. Thus, this therapeutic tool could be adopted and/or combined with other therapeutic interventions in order to further enhance beneficial outcomes.

**Abstract:** High spinal cord injuries (SCIs) lead to permanent diaphragmatic paralysis. The search for therapeutics to induce functional motor recovery is essential. One promising noninvasive therapeutic tool that could harness plasticity in a spared descending respiratory circuit is repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS). Here, we tested the effect of chronic high-frequency (10 Hz) rTMS above the cortical areas in C2 hemisected rats when applied for 7 days, 1 month, or 2 months. An increase in intact hemidiaphragm electromyogram (EMG) activity and excitability (diaphragm motor evoked potentials) was observed after 1 month of rTMS application. Interestingly, despite no real functional effects of rTMS treatment on the injured hemidiaphragm activity during eupnea, 2 months of rTMS treatment strengthened the existing crossed phrenic pathways, allowing the injured hemidiaphragm to increase its activity during the respiratory challenge (i.e., asphyxia). This effect could be explained by a strengthening of respiratory descending fibers in the ventrolateral funiculi (an increase in GAP-43 positive fibers), sustained by a reduction in inflammation in the C1–C3 spinal cord (reduction in CD68 and Iba1 labeling), and acceleration of intracellular plasticity processes in phrenic motoneurons after chronic rTMS treatment. These results suggest that chronic high-frequency rTMS can ameliorate respiratory dysfunction and elicit neuronal plasticity with a reduction in deleterious post-traumatic inflammatory processes in the cervical spinal cord post-SCI. Thus, this therapeutic tool could be adopted and/or combined with other therapeutic interventions in order to further enhance beneficial outcomes.

**Keywords:** spinal cord injury; repetitive transcranial magnetic stimulation; phrenic motor network; neuroplasticity; motoneuron excitability; diaphragm muscle

## 1. Introduction

High spinal cord injuries (SCIs) induce long-lasting neuromotor deficits, such as respiratory insufficiency [1]. Patients living with such injuries often rely on ventilatory assistance to survive, although some can be weaned off with time, exemplifying spontaneous plasticity. The rodent C2 hemisection (C2HS) model is one of the most common preclinical models to study respiratory system neuroplasticity and neuroinflammation. A C2HS disrupts descending input to ipsilateral phrenic motoneurons that innervate the diaphragm, the main inspiratory muscle, thus resulting in diaphragm hemiplegia [2–10]. The contralateral side remains intact, allowing the animal to survive.

Limited spontaneous recovery of the injured hemidiaphragm activity is observed in this model of SCI, characterized by a partial reactivation of phrenic motor networks and diaphragm activities. This reactivation is sustained by normally silent respiratory pathways crossing the spinal midline at the C3–C6 spinal cord levels, called the crossed phrenic phenomenon (CPP) [11–14]. However, this marginal spontaneous plasticity is too weak to contribute to significant ventilatory recovery following C2HS [15]. Strengthening the CPP and providing new intraspinal connections to the denervated motoneurons is a potential target for developing novel therapeutic tools in order to further improve respiratory function following high SCI.

A noninvasive approach to stimulate neural activity is transcranial magnetic stimulation (TMS), which involves applying a high output magnetic field above the neuronal areas. In fact, TMS applied as a single pulse or in a repetitive way (rTMS) is a noninvasive and painless method already used in the clinic to diagnose and treat many disorders [16–20], as well as a potential therapeutic tool in preclinical models of cognitive impairment [21,22]. This technique operates through its neuromodulatory effects on neuronal circuitry [23,24]. The potential of rTMS to improve outcomes following incomplete SCI has gained recognition in the past few years but has mainly been applied to enhance locomotor recovery [25–27] and sensorimotor restoration [27–29] in preclinical models of SCI.

We recently demonstrated that a single train of TMS delivered above the animals' motor threshold can induce a long-lasting increase in phrenic system excitability, as measured with diaphragm motor evoked potentials (MEP<sub>dia</sub>) [30]. While this study was focused on determining stimulation parameters in naïve, anesthetized rats, it demonstrated that MEP<sub>dia</sub> can be used as a reliable and reproducible technique for assessing phrenic system excitability during TMS [31–34]. While there is interest in the therapeutic potential of rTMS following SCI among researchers, little is known about the cellular and molecular mechanisms that sustain the neuromodulatory effects of acute or chronic rTMS. A few *in vivo* and *in vitro* studies have been conducted to elucidate potential cellular mechanisms [35–38], including excitatory neurotransmission via N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) and  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate (AMPA) (GluR1 subunit) receptor pathways [37,39,40], and inhibitory neurotransmission via  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) system [41,42]. For example, rTMS protocols can modulate the expression of neuronal activity markers such as c-fos. Low-frequency repetitive magnetic stimulation (rMS) has been shown to increase nuclear, neuronal c-fos expression in rat organotypic cortex brain slices [43], whereas rTMS theta-burst stimulation resulted in decreased neuronal c-fos expression [38]. In addition, repetitive magnetic stimulation (rMS) protocol on SH-SY5Y neuroblastoma cells induced an increase in cAMP and phospho-CREB expression [44]. *In vivo*, protocols using high-frequency repetitive trans-spinal magnetic stimulation (rTMS) also resulted in reduced expression of markers for apoptosis and neuronal death, while the expression of markers of axonal growth and neuronal proliferation were upregulated. These results were accompanied by reduced axonal demyelination.

nation [45]. A deeper understanding of rTMS-regulated molecular signaling pathways following SCI could, therefore, help to harness the potential beneficial effects of rTMS as a therapeutic intervention.

The putative effects of rTMS on neuroinflammation are also of great interest. A few studies have used rTMS on glial cells, but its effects are diverse and depend on the stimulation parameters used and the model studied [46]. Chronic low-frequency rTMS used on naive rats did not induce observable changes in astrocyte and microglial density, supporting the safety of this protocol regarding glial cell homeostasis in the normal/control condition [47]. However, conflicting results have been observed in *in vivo* studies. For instance, chronic high-frequency rTMS increased astrocytic and microglial density in a preclinical model of ischemia in gerbils (hippocampus) [48], whereas a decrease in cellular density in a preclinical model of T9 dorsal SCI (compression) [49]. In addition, some studies also showed a beneficial neuroinflammatory effect, observed through the decreased release of TNF $\alpha$  (proinflammatory cytokine) in substantia nigra in a model of Parkinson's disease [50,51].

To our knowledge, there have been no studies investigating the potential therapeutic effects of high-frequency rTMS on impaired respiratory function following cervical SCI, specifically at the phrenic circuit level. The present study aimed to test the hypothesis that chronic 10 Hz rTMS can improve respiratory function after SCI. Here, we test this hypothesis using cellular, molecular, and electrophysiological outcome measures to assess the potential therapeutic benefits of rTMS in a preclinical model of C2HS in adult, Sprague Dawley rats.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Ethics Statement

Adult Sprague Dawley male rats (Janvier, France;  $n = 41$ , 350–450 g) were used for this study. Experiments were approved by the Ethics Committee of the University of Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines and complied with the French and European laws (EU Directive 2010/63/EU) regarding animal experimentation (Aparis #2017111516297308\_v3).

Animals were dually housed in ventilated cages in a state-of-the-art animal care facility (2CARE animal facility, accreditation A78-322-3, France) on a 12 h light–dark cycle, with access to food and water *ad libitum*.

### 2.2. Chronic C2 Hemisection

#### 2.2.1. Intrapleural CTB Injection and Surgery

Prior to anesthesia, animals were premedicated subcutaneously with buprenorphine (Buprécare, 0.03 mg/kg), trimethoprim, and sulfadoxine (Borgal 24%, 30 mg/kg), medetomidine (Médétor, 0.1 mg/kg) and carprofen (Rimadyl, 5 mg/kg). 10 min after the injections, animals were anesthetized with isoflurane (5% in 100% O<sub>2</sub>) in a closed chamber. Rats were then intubated and ventilated with a rodent ventilator (model 683; Harvard Apparatus, South Natick, MA, USA), and anesthesia was maintained throughout the surgical procedure with isoflurane (2.5% in 100% O<sub>2</sub>). For phrenic motoneuron retrograde labeling, intrapleural injections of cholera toxin B fragment were performed bilaterally in all animals (15  $\mu$ L/side) using a custom needle (6 mm, 23 gauge, semi-blunt to avoid puncturing of the lung) and a 50  $\mu$ L Hamilton syringe as described previously [52]. After skin and muscles were retracted, laminectomy and durotomy were performed at the C2 level. The spinal cord was then sectioned unilaterally (left side) with microscissors. To ensure the section of potentially remaining fibers, a microscalpel was used immediately after microscissors, as described previously [7].

#### 2.2.2. Brainstem Neuronal Retrograde Labeling with Hydroxystilbamidine

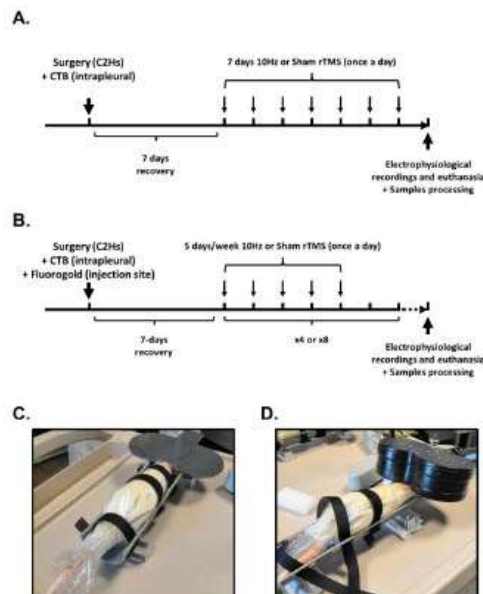
For respiratory brainstem neuronal retrograde labeling, a sterilized piece of cotton was impregnated with 2  $\mu$ L of 7% hydroxystilbamidine (Fluorogold) and left into the injury site for 20 min. Then, the lesion site was flushed with sterilized saline, and muscles and



skin were then sutured closed. To reverse medetomidine-induced anesthesia, atipamezole (Revertor, 0.5 mg/kg) was intramuscularly injected. Isoflurane anesthesia was then turned off, and the endotracheal tube was removed when animals showed signs of wakefulness. All animals were kept 7 days postsurgery in their cage to recover before rTMS or Sham rTMS protocol was applied.

### 2.3. Repetitive TMS (rTMS) Protocol

rTMS protocol was performed using the magnetic stimulator MAGPRO R30 (Magventure, Farum, Denmark) connected to a figure-of-eight coil (Cool-B65), delivering a unique biphasic pulse with the intensity of the stimulus expressed as a percentage of a maximum output of the stimulator (% MO). The protocol (9 trains of 100 biphasic pulses, separated by 30 s intervals between trains delivered at 50% MO, 900 stimulations per protocol) was applied in awake restrained animals at  $-6$  mm caudal to Bregma. This protocol induced a long-lasting increase in phrenic excitability in anesthetized, intact rats [30]. Control animals received a Sham rTMS protocol (e.g., no stimulation but the same time spent in the custom-designed restraining device, Figure 1). This rTMS protocol was applied 7 days postinjury for either 7 days (once a day), 1 month, or 2 months (once a day, 5 days per week) (Figure 1).



**Figure 1.** Protocols for 10 Hz or Sham rTMS following C2 spinal cord hemisection: (A) rTMS protocols for 7-day-treated groups; (B) rTMS protocols for 1-month- and 2-month-treated groups; (C) image of rat receiving Sham rTMS protocol; (D) image of rat receiving 10 Hz rTMS protocol.

## 2.4. Electrophysiological Recordings

### 2.4.1. Animal Preparation

Animals were randomly divided into 6 groups: 7-day Sham rTMS ( $n = 8$ ); 7-day 10 Hz rTMS ( $n = 9$ ); 1-month Sham rTMS ( $n = 6$ ); 1-month 10 Hz rTMS ( $n = 6$ ); 2-month Sham

rTMS ( $n = 6$ ); 2-month 10 Hz rTMS ( $n = 6$ ). Electrophysiological recordings of diaphragm activity and excitability were used to functionally evaluate the effects of rTMS treatment on the phrenic motor circuit after completion of sham or 10 Hz rTMS. Briefly, anesthesia was induced using isoflurane (5% in 21% O<sub>2</sub> balanced) in an anesthesia chamber and maintained through a nose cone (2.5% in 100% air balanced). Animals were tracheotomized and pump-ventilated (Rodent Ventilator, model 683; Harvard Apparatus, South Natick, MA, USA). The ventilation rate (frequency > 72 breaths per minute, tidal volume: 2.5 mL) was adjusted to reduce the end-tidal CO<sub>2</sub> value below the animals' central apneic threshold throughout the experiment to avoid recording spontaneous diaphragm contractions. During the recordings, animals were placed on a heating pad to maintain a constant body temperature ( $37.5 \pm 0.5$  °C), and their rectal temperature was continuously monitored throughout the experiment. Arterial pressure was measured through a catheter inserted into the right femoral artery. Arterial and tracheal pressures were monitored continuously with transducers connected to a bridge amplifier (AD Instruments, Dunedin, New Zealand). The depth of anesthesia was confirmed by the absence of response to toe pinch. A laparotomy was performed, and the liver was gently moved dorsally to access the diaphragm. Gauze soaked with warm phosphate-buffered saline was placed on the liver to prevent dehydration. Both sides (ipsilateral and contralateral to the spinal cord lesion) of the diaphragm were implanted with two custom-made hooked bipolar electrodes into each mid-costal part of the diaphragm and left in place for the duration of the experiment for the measurement of (1) spontaneous diaphragm EMG during spontaneous postkilocapnic normoxic or transient mild asphyxia breathing (by occlusion of the animal's nose for 15 s after disconnection of a tracheal tube from the ventilator) and (2) diaphragm MEP when PETCO<sub>2</sub> was below the apneic threshold.

#### 2.4.2. Diaphragmatic EMG Recordings

EMGs were amplified (Model 1800; gain, 100; A-M Systems, Everett, WA, USA) and band pass-filtered (100 Hz to 10 kHz). The signals were digitized with an 8-channel Powerlab data acquisition device (Acquisition rate: 4 k/s; AD Instruments, Dunedin, New Zealand), connected to a computer, and analyzed using LabChart 7 Pro software (AD Instruments, Dunedin, New Zealand). The bilateral diaphragmatic EMGs were integrated (50 ms decay).

#### 2.4.3. Diaphragmatic MEP Recordings

Next, the head of the animal was placed on a nonmagnetic, custom-made stereotaxic apparatus, which allowed its positioning from the center of the figure-of-eight coil to  $-6$  mm from Bregma, at an angle of 0°, as previously described [30,31]. MEPs induced by a single pulse of TMS was recorded (summation of 5 to 10 TMS pulses between 2 heartbeats, max 10 trials at 90% MO). These electromyographic signals were amplified (gain, 1 k; A-M Systems, Everett, WA, USA) and band pass-filtered (100 Hz to 10 kHz). The signals were then digitized with an 8-channel Powerlab data acquisition device (Acquisition rate: 100 k/s; AD Instruments, Dunedin, New Zealand) connected to a computer and analyzed using LabChart 8 Pro software (AD Instruments, Dunedin, New Zealand).

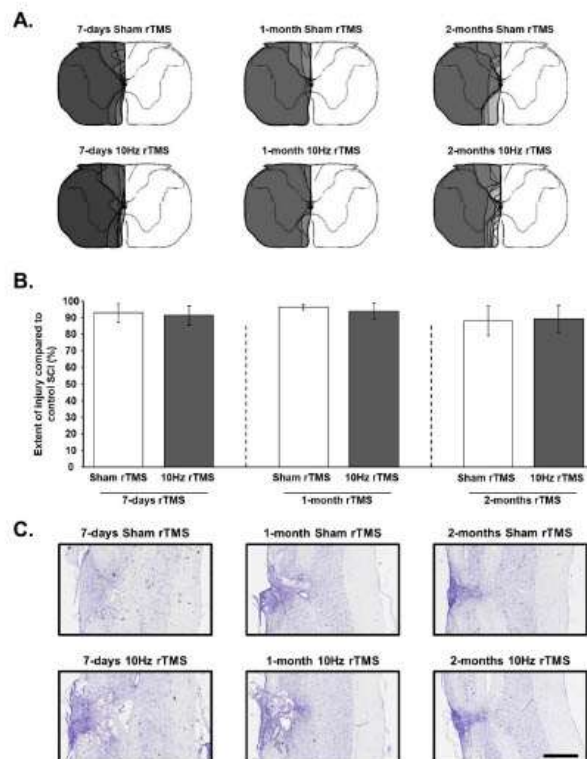
#### 2.5. Tissue Processing

At the end of the experiment, animals were euthanized by intracardiac injection of pentobarbital (EXAGON, Axience), intracardially perfused with heparinized 0.9% NaCl (10 mL), followed by Antigenfix solution (DIAPATH). After perfusion, the C1–C6 spinal cord and brainstem were carefully dissected and stored at 4 °C in fixative for 24 h. After postfixation, tissues were cryoprotected for 48 h in 30% sucrose (in 0.9% NaCl), and stored at  $-80$  °C. Frozen longitudinal (C1–C3 spinal cord) and transverse (C3–C6 spinal cord and brainstem) free-floating sections (30  $\mu$ m) were cut using a Thermo Fisher cryostat. C1–C3, C3–C6, and brainstem sections were stored in a cryoprotectant solution (Sucrose 30%, ethylene glycol 30%, and PVP40 1% in PBS 1 $\times$ ) at  $-22$  °C. Every fifth section from

C1–C3 was used for lesion reconstruction to examine the extent of C2 injury using cresyl violet histochemistry.

### 2.6. Histological Reconstruction of the Extent of C2 Injury

Longitudinal sections from the C1–C3 cord were used to assess the dorsoventral and mediolateral extent of injury in all animals. Brightfield microscopy was used to examine the cresyl violet-stained sections and recorded on a stereotaxic transverse plane of the C2 spinal cord. Each injury was then digitized and analyzed with ImageJ software (NIH). The extent of the injury on the injured side was calculated using a reference to a complete hemisection (which is 100% of the hemicord) and reported as a percentage (Figure 2), as described in our previous publication [7].



**Figure 2.** Extent of injury following a C2 spinal cord hemisection: (A) representative schematic diagrams of the extent of injury in each animal at 15 days postinjury (P.I.) for 7-day Sham and 10 Hz rTMS groups, 36 days P.I. for 1-month Sham and 10 Hz rTMS groups, and 64 days P.I. for 2-month Sham and 10 Hz rTMS groups; (B) extent of injury quantification in percentage compared with control spinal cord injury (SCI) 100%. The quantification has been made only in the ventral part where the phrenic motoneurons are located. There is no difference between the different groups (One Way ANOVA,  $p = 0.235$ ); (C) representative image for each group stained in cresyl violet. Scale Bar: 1 mm.



### 2.7. Immunofluorescence

For immunofluorescence experiments, free-floating transverse sections of the C3–C6 spinal cord and brainstem were washed and placed in blocking solution (NDS 5% in PBS 1×) for 30 min and then incubated with the corresponding antibody in blocking solution (NDS 5%) overnight on an orbital shaker at 4 °C. After several PBS washes, sections were incubated in the corresponding secondary antibody for 2 h at room temperature, then washed again with PBS. The following primary antibodies were used: cholera toxin, B-subunit (CTB, Calbiochem, Saint-Quentin-Fallavier, France, 1/1000, goat polyclonal), CREB (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France, 1/2000, rabbit polyclonal), GAP-43 (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France, 1/2000, mouse monoclonal), nitric oxide synthase II (iNOS, Millipore-Merck, Guyancourt, France, 1/3000, rabbit polyclonal), CD68 (Millipore-Merck, Guyancourt, France, 1/300, mouse monoclonal), Iba1 (Abcam, Paris, France, 1/400, goat polyclonal), phospho-c-Jun (Ser63) II (Cell Signaling, Saint-Cyr-L'Ecole, France, 1/200, rabbit polyclonal), and GFAP (Millipore-Merck, Guyancourt, France, 1/4000, rabbit polyclonal). The secondary antibodies were linked to the fluorochromes Alexa Fluor 488, 594 (Molecular Probes, Illkirch, France, 1/2000) or 647 (Invitrogen, Illkirch, France, 1/2000). Biotinylated wisteria floribunda lectin (WFA, Vector laboratories, Les Ulis, France, 1/2000) with Alexa Fluor 488 Avidin (Molecular Probes, Illkirch, France, 1/1000) were used to labeled chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs). Images of the different sections were captured with a Hamamatsu ORCA-R<sup>2</sup> camera mounted on an Olympus IX83 PZLF microscope or a 3dhitech panoramic slide scanner. Images were analyzed using ImageJ 1.53n software (NIH, USA).

### 2.8. Data Processing and Statistical Analyses

The amplitude (normalized to the corresponding sham group in arbitrary units, AU) of at least 5 double-integrated diaphragm EMG inspiratory bursts during normoxia and mild asphyxia was calculated for each animal from the injured and the intact sides with LabChart 7 Pro software (AD Instruments). Diaphragm MEP traces for each side (at least 5 MEPdia) were averaged and superimposed using LabChart Pro software (AD Instruments). The baseline-to-peak amplitude of the first wave of each superimposed MEPdia was calculated.

One-way ANOVA was performed between different groups for the extent of injury evaluation. Comparisons between intact and injured sides for diaphragmatic EMG and MEP and between eupnea and asphyxia for diaphragmatic EMG were performed by Student's paired *t*-test. Two-way ANOVA (Fisher LSD Method for multiple comparisons) was used to compare MEPdia throughout the experiment and between different rTMS protocols. Student's *t*-tests were used to compare values of the same side (intact or injured) between the different protocols (between 7-day, 1-month, and 2-month Sham rTMS or between 7-day, 1-month, and 2-month 10 Hz rTMS) and to compare Sham and 10 Hz rTMS group values for the same time point (at 7 days, 1 month, and 2 months). Paired *t*-tests were used to compare data from intact and injured sides of the same animal.

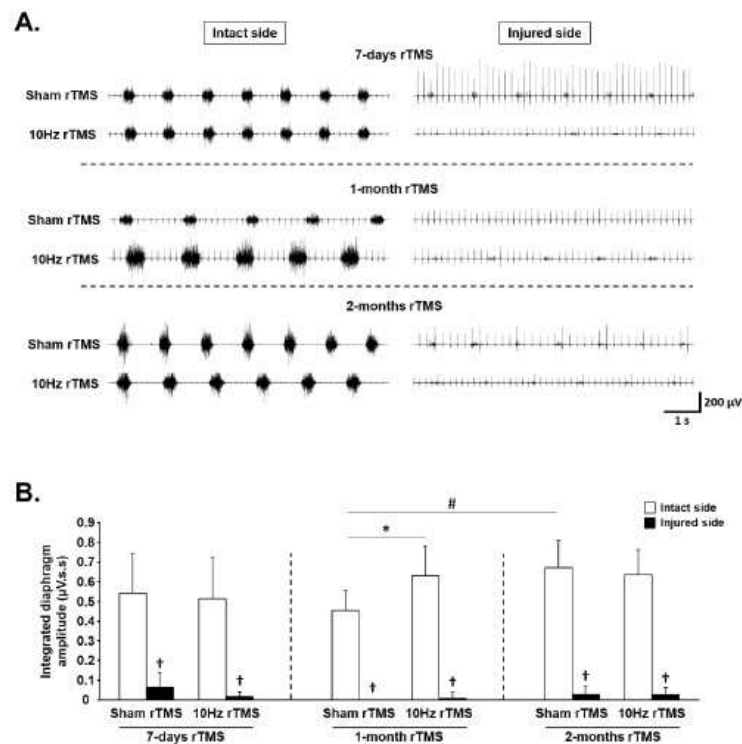
All data are presented as mean ± SD, and statistics were considered significant when  $p < 0.05$ . SigmaPlot 12.5 software was used for all analyses.

## 3. Results

### 3.1. rTMS-Induced Effects on Diaphragm Activity during Eupnea

Diaphragm activity was assessed by recording EMGdia amplitude for both intact and injured sides (Figure 3A). A reduction in EMGdia amplitude was observed 15 days postinjury (P.I.) for the injured side (7-day Sham rTMS =  $0.06 \pm 0.08$   $\mu$ V.s.s), compared with intact side ( $0.54 \pm 0.20$   $\mu$ V.s.s,  $p < 0.001$ ). This reduced diaphragm activity persisted for the injured side in Sham rTMS-treated animals at 36 days P.I. ( $0.00 \pm 0.00$   $\mu$ V.s.s) and 64 days P.I. ( $0.03 \pm 0.04$   $\mu$ V.s.s) ( $p > 0.05$ ). The 10 Hz rTMS protocol did not induce a significant change in EMGdia amplitude on the side of the injury at any experimental time point (7 days:  $0.01 \pm 0.02$   $\mu$ V.s.s; 1-month rTMS:  $0.01 \pm 0.03$   $\mu$ V.s.s; 2-month rTMS:  $0.03 \pm 0.03$   $\mu$ V.s.s). For the intact side, no differences in diaphragm activity were observed

between Sham rTMS group ( $0.54 \pm 0.20 \mu\text{V.s.s}$ ) and 10 Hz rTMS group ( $0.51 \pm 0.21 \mu\text{V.s.s}$ ) following 7 days of stimulation ( $p = 0.772$ ). However, following 1 month of rTMS, 10 Hz treated animals ( $0.63 \pm 0.15 \mu\text{V.s.s}$ ) presented a significantly higher EMGdia amplitude, compared with Sham-treated animals ( $0.45 \pm 0.10 \mu\text{V.s.s}$ ,  $p = 0.011$ ). After 2 months of rTMS, this difference between Sham-treated animals ( $0.67 \pm 0.14 \mu\text{V.s.s}$ ) and 10 Hz treated animals ( $0.64 \pm 0.12 \mu\text{V.s.s}$ ) disappeared ( $p = 0.656$ ) due to an increase in EMGdia amplitude between 1 month ( $0.45 \pm 0.10 \mu\text{V.s.s}$ ) and 2 months ( $0.67 \pm 0.14 \mu\text{V.s.s}$ ) in the Sham group ( $p = 0.039$ ) (Figure 3B).

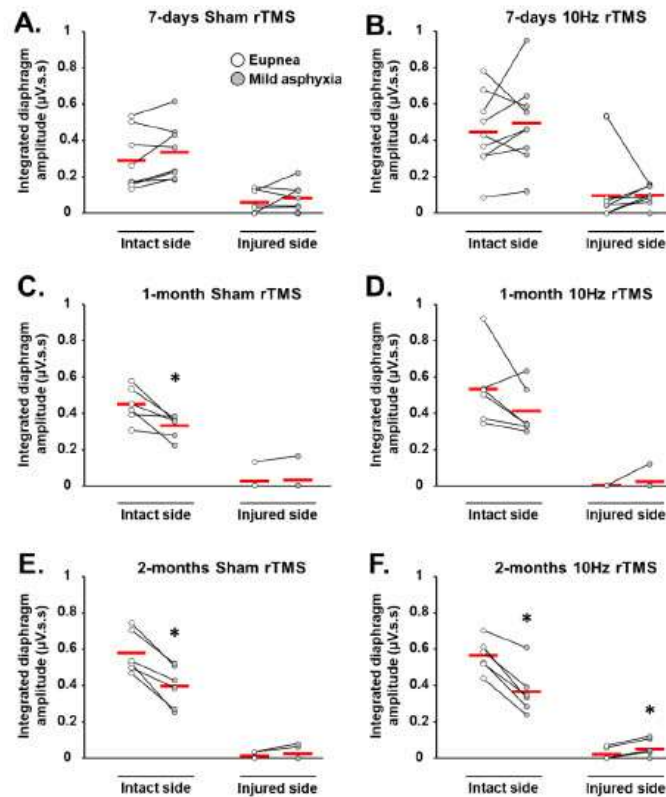


**Figure 3.** Diaphragm activity in C2 hemisectioned rats following chronic Sham and 10 Hz rTMS: (A) representative traces of raw diaphragm EMG of C2 hemisectioned rats, following 7-day, 1-month, or 2-month Sham or 10 Hz rTMS treatment; (B) integrated diaphragm amplitude for intact and injured sides of Sham or 10 Hz rTMS treated C2 hemisectioned animals following 7 days, 1 month, or 2 months of treatment. †  $p < 0.001$ , compared with intact side; \*  $p = 0.011$ , intact side of Sham rTMS group vs. intact side of 10 Hz rTMS group following 1-month treatment. #  $p = 0.039$ , intact side of Sham rTMS group following 1-month treatment vs. corresponding group following 2 months of treatment.

### 3.2. rTMS-Induced Effects on Diaphragm Muscle Response to Respiratory Challenge

In addition to analyzing diaphragm activity during eupneic breathing, muscle activity was also analyzed during respiratory challenges (i.e., mild asphyxia). When challenged with mild asphyxia, there was no significant change in EMGdia amplitude, compared

with eupneic breathing on the intact side at 7 days in Sham-treated animals, and 7-day and 1-month 10 Hz rTMS groups (Figure 4A,B,D, respectively). EMGdia on the intact side, however, significantly decreased with mild asphyxia challenge, compared to eupneic breathing, in 1- and 2-month Sham-treated groups, as well as the 2-month 10 Hz rTMS group (Figure 4C,E,F, respectively). In contrast, EMGdia on the injured side significantly increased with 10 Hz rTMS 2 months poststimulation (Figure 4F). No other statistically significant differences were observed.

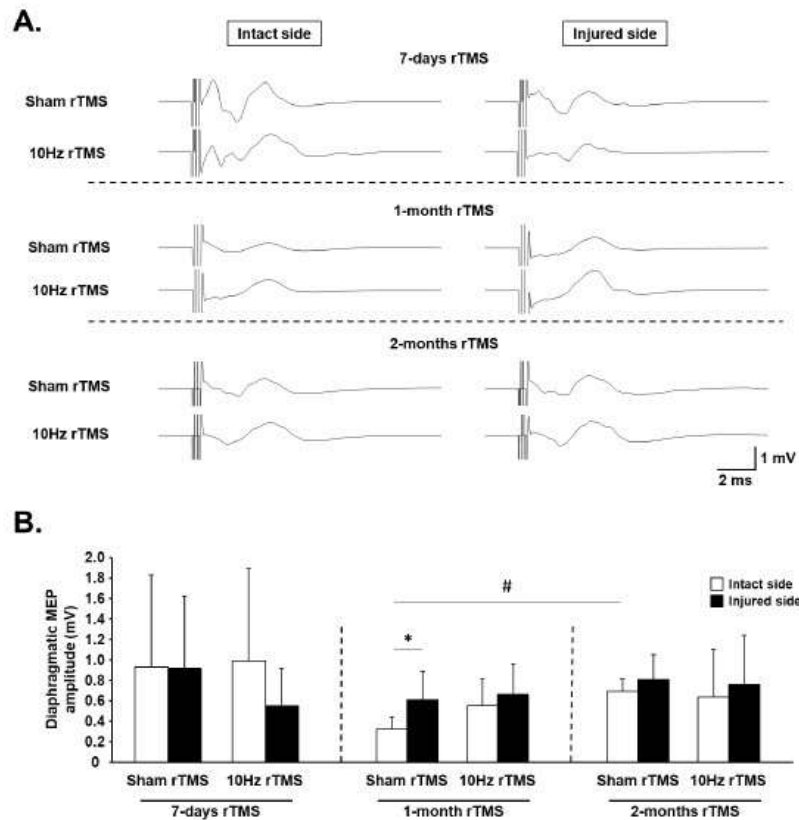


**Figure 4.** Diaphragm activity in C2 hemisectioned rats following chronic Sham and 10 Hz rTMS during respiratory challenge: integrated diaphragm amplitude for (A) 7-day Sham, (B) 7-day 10 Hz rTMS, (C) 1-month Sham, (D) 1-month 10 Hz rTMS, (E) 2-month Sham, and (F) 2-month 10 Hz rTMS groups in eupnea and during mild asphyxia. \*  $p < 0.05$  mild asphyxia, compared with eupnea (paired  $t$ -test). The red short line represent the mean value.

### 3.3. rTMS-Induced Effects on Phrenic System Excitability

MEPdia amplitudes were measured in response to a single pulse of TMS to evaluate phrenic excitability following rTMS protocols (Figure 5A). Significant differences in response were seen only between Sham-treated animals on the intact side from 1 to 2 months postinjury (MEPdia increased), and between intact and injured sides of Sham-treated an-

imals at 1 month, with the injured side being significantly greater (Figure 5B). No other statistically significant differences were observed.

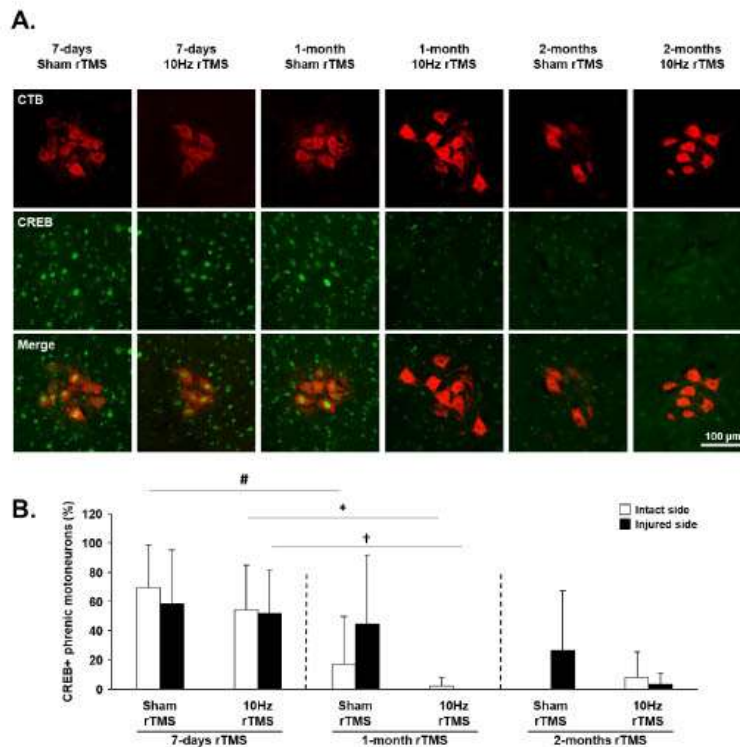


**Figure 5.** Diaphragm excitability in C2 hemisected rats following chronic Sham and 10 Hz rTMS: (A) representative traces of raw diaphragm MEP of C2 hemisected rats, following 7 days, 1 month, or 2 months of Sham or 10 Hz rTMS treatment; (B) MEP amplitude for intact and injured sides of Sham- or 10 Hz rTMS-treated C2 hemisected animals following 7 days, 1 month, or 2 months of treatment. \*  $p = 0.028$ , intact side vs. injured side of Sham rTMS group following 1-month treatment. #  $p < 0.001$ , intact side of Sham rTMS group following 1-month treatment vs. corresponding group following 2 months of treatment.

#### 3.4. rTMS-Induced Effects on Plasticity Markers in C3–C6 Spinal Cord

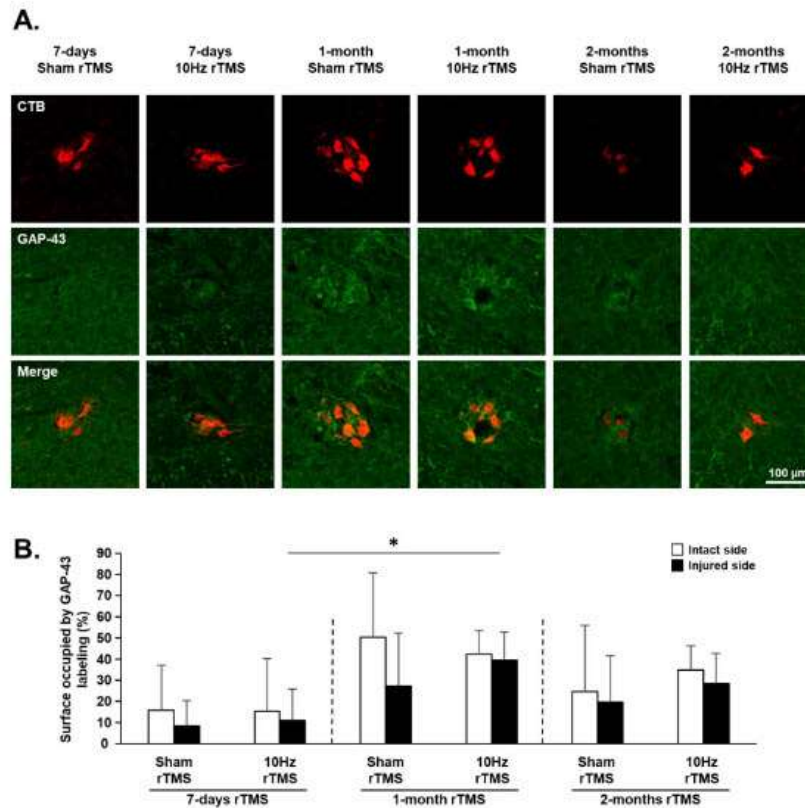
The expression of plasticity markers CREB and GAP-43 was evaluated at the C3–C6 spinal cord, the anatomical location of the phrenic motoneuron nucleus (Figure 6A). The percentage of cholera toxin beta (CTB, Figure 6A)-labeled phrenic motoneurons expressing CREB (Figure 51A) was significantly reduced for the intact side after 1 month of Sham or 10 Hz rTMS. In contrast, a reduction in CREB expression was seen on the injured side only in those animals treated with 10 Hz rTMS for 1 month (Figure 6B).





**Figure 6.** CREB expression in phrenic motoneurons following C2 hemisection: (A) representative images showing expression of CREB in denervated phrenic motoneurons labeled with CTB in C2 hemisectioned rats, following 7 days, 1 month or 2 months of Sham or 10 Hz rTMS treatment; (B) quantification of the percentage of CREB expressing phrenic motoneurons for intact and injured sides of Sham- or 10 Hz rTMS-treated C2 hemisectioned animals following 7 days, 1 month, or 2 months of treatment. There is no difference between the intact and the injured sides for the different groups (paired *t*-test for intact vs. injured side,  $p > 0.05$ ); # 7-day Sham rTMS intact side, compared with 1-month Sham rTMS intact side,  $p = 0.012$ . \* 7-day 10 Hz rTMS intact side, compared with 1-month 10 Hz rTMS intact side,  $p = 0.007$ . † 7-day 10 Hz rTMS injured side, compared with 1-month 10 Hz rTMS injured side,  $p = 0.004$ .

GAP-43 is normally synthesized in axonal growth cones; therefore, changes in GAP-43 immunofluorescence were evaluated in the phrenic motoneuron area in the C3–C6 spinal cord (Figure S1B and Figure 7A). The area labeled by antibodies against GAP-43 increased on the side of the injury 1 month after 10 Hz rTMS. No other significant differences were observed at any experimental time point on the intact or injured side (Figure 7B). Although there was significantly less GAP-43 labeling on the injured side, compared with the intact side in the ventrolateral funiculi of the spinal cord, no significant differences were seen between Sham- or 10 Hz treated animals across any of the time points exemplified (Figure S2).



**Figure 7.** GAP-43 expression approximate to phrenic motoneurons following C2 hemisection: (A) representative images showing the surface occupied by GAP-43 labeling around denervated phrenic motoneurons labeled with CTB in C2 hemisectioned rats, following 7 days, 1 month, or 2 months of Sham or 10 Hz rTMS treatment; (B) quantification of the area occupied by GAP-43 labeling approximate to phrenic motoneurons on the intact and injured sides of Sham or 10 Hz rTMS-treated C2 hemisectioned animals following 7 days, 1 month, or 2 months of treatment. There is no difference between the intact and the injured sides for the different groups (paired *t*-test for intact vs. injured side,  $p > 0.05$ ; \* 7-day 10 Hz rTMS compared with 1-month 10 Hz rTMS for the injured side (Student's *t*-test,  $p = 0.017$ ).

There was no difference in the expression of iNOS, which produces the reactive oxygen species nitric oxide, in phrenic motoneurons despite their denervation in any of the groups (Figure S3). There was also no difference in p-c-Jun and CREB expression in Fluorogold positive identified rostral ventral respiratory group (rVRG) neurons on the side of the injury when compared between 1 and 2 months of Sham or 10 Hz rTMS treatment (Figures S4 and S5, respectively), nor were there differences in CSPG expression in the rVRG (Figure S6).

### 3.5. rTMS-Induced Effects on Neuroinflammation

Immunohistochemistry against Iba1 (microglia) and CD68 (macrophages) was used to evaluate neuroinflammation in the injured C1–C3 spinal cord following 1 month and 2 months of rTMS treatment (Figure S7A). For the injured side, the area occupied by Iba1 labeling was reduced in 1-month 10 Hz rTMS-treated animals ( $10.72 \pm 5.73\%$ ), compared with 1-month Sham rTMS-treated animals ( $23.74 \pm 8.45\%$ ;  $p < 0.05$ ) between  $-345 \mu\text{m}$  and  $+345 \mu\text{m}$  from lesion epicenter, as well as between  $-690 \mu\text{m}$  and  $-345 \mu\text{m}$  from lesion epicenter (1-month 10 Hz rTMS:  $13.72 \pm 9.42\%$  vs. 1-month Sham rTMS:  $24.46 \pm 6.31\%$ ;  $p < 0.05$ ) (Figure S7B). No difference in CD68 labeling on the side of the injury was observed between groups (Figure S7D). For the intact side, there was no difference in Iba1 labeling between groups (Figure S7C). However, the area occupied by CD68 positive cells was reduced in the 2-month 10 Hz rTMS group ( $0.02 \pm 0.03\%$ ), compared with 2-month Sham rTMS ( $0.33 \pm 0.39\%$ ;  $p < 0.05$ ) between  $-345 \mu\text{m}$  and  $+345 \mu\text{m}$  from lesion epicenter (Figure S7E).

Immunohistochemistry against GFAP (astrocytes) and WFA (CSPGs) was used to evaluate any rTMS-induced changes in the astroglial border of the lesion (Figure S8A). No difference in GFAP immunofluorescence was detected on either the injured or the intact sides (Figure S8B,C). WFA labeling was reduced in 2-month 10 Hz rTMS ( $9.04 \pm 3.42\%$ ), compared with 1-month 10 Hz rTMS-treated animals ( $17.14 \pm 9.54\%$ ;  $p < 0.05$ ) on the side of the injury (Figure S8D). No differences were observed in WFA immunofluorescence on the intact side (Figure S8E).

## 4. Discussion

The present study is the first to investigate the therapeutic effects of chronic rTMS for enhancing respiratory function following cervical spinal cord injury (SCI) in a preclinical model. Our previous study already demonstrated that a single acute delivery of 10 Hz rTMS in anesthetized rats induced an increase in phrenic network excitability [30]. This 10 Hz magnetic stimulation is recognized for its long-term potentiation (LTP)-like effect [42,52]. We, therefore, hypothesized that chronic delivery of this protocol would induce beneficial effects on respiratory recovery after cervical SCI.

Contrary to our expectations, the analysis of EMG<sub>dia</sub> recordings showed the application of chronic 10 Hz rTMS had no effect on diaphragm activity on the side of the injury during eupnea, regardless of the duration of treatment. Conversely, an increase in diaphragm activity on the intact side after 1 month of treatment in injured animals was observed. Nontreated animals reached an EMG<sub>dia</sub> amplitude similar to those of treated animals at 9 weeks postinjury. These results might suggest that chronic 10 Hz rTMS strengthens spared descending respiratory pathways, reflecting a recovery plateau. Indeed, between 4 and 8 weeks post-C2 hemisection, a plateau in diaphragm activity has been observed when treated with intermittent hypoxia [53]. A similar observation was also found when a chronic protocol of intermittent hypoxia was applied following C2 hemisection in rats on diaphragm activity, with no difference between treated animals and normoxic animals after 3 weeks of treatment (spontaneous recovery reaches a ceiling/plateau by that time postinjury) [54]. Additionally, consistent with MEP<sub>dia</sub> results, the intact hemidiaphragm could better compensate for the paralyzed hemidiaphragm. Indeed, animals treated with 10 Hz rTMS did not differ significantly in MEP amplitude over time in either intact or injured hemidiaphragm. In contrast, Sham-treated animals had a reduced amplitude for the intact side, compared with the injured side following 1 month of treatment, and similar to those of rTMS-treated rats after 2 months of treatment. These results suggest that excitability of spared phrenic motoneurons is reduced in Sham-treated animals, whereas rTMS treatment maintained basal excitability in these motoneurons. Moreover, at 2 months post-rTMS treatment, an increased response to asphyxia was observed on the injured side, whereas no response was observed in Sham-treated animals. This reflects a strengthening of the existing CPP, which is consistent with evidence for spontaneous CPP 3 months post-C2 hemisection but not seen at 7 days postinjury [5].



The reduction in CREB expression in phrenic motoneurons occurred earlier postinjury in treated animals, suggesting that CREB signaling may contribute to treatment-driven plasticity. Moreover, the reduction in CD68 positive cells on the intact side of the C1–C3 spinal cord could reflect the anti-inflammatory effect of rTMS treatment, which may also contribute to neuroplasticity. Consistent with this finding, others have shown a reduction in GFAP and Iba1 labeling, which correlated with increased neuronal plasticity after rTMS treatment [45,55]. Although these effects correlate with neuroplastic processes, no change in CREB or p-c-Jun expression was observed in respiratory brainstem neurons (putative ventral respiratory column) on the side of the injury, despite these molecules being involved in synaptic plasticity and axonal regeneration [56].

The present study also demonstrated no significant change in GAP-43 expression within white matter regions with treatment. This raises the question as to whether neuroplasticity is being mediated by spinal networks, which many recruit spinal interneurons within the phrenic network. This would be consistent with injured mice [57] and rats [58,59] displaying increased connectivity of spinal interneurons after cervical spinal cord injury. Furthermore, stimulating activity within spinal networks has also been shown to increase spinal interneuron activity and plasticity [60]. Based on these prior results, it is likely that stimulation with rTMS may also drive a degree of plasticity within these same phrenic interneuronal networks. This could also explain why phrenic motor activity on the side of injury was increased during asphyxia 2 months after chronic rTMS. Indeed, this observation could be an indication of strengthening of the CPP involving both spared descending pathways and interneuronal connectivity.

In this study, we chose to specifically stimulate at the cortical level to target neuronal networks connected to brainstem respiratory centers. Previous studies using repetitive magnetic stimulation employed a thoracic model of SCI, applying magnetic stimulation at the side of injury. Studies in mice demonstrated that 10 Hz acute or chronic rTMS improved locomotor function after thoracic injury [45,61], but a lower frequency (0.2 Hz) of rTMS in rats did not [40]. However, when combining stimulation with growth factor delivery and activity-based therapy, improved functional effects were observed [40].

More invasive spinal stimulation approaches, such as intraspinal and epidural stimulation, have also been used to elicit spinal neural plasticity [62–65]. High-frequency epidural stimulation was used at the level of the phrenic motor nucleus (C4 segment) in C1-transected animals to induce short-term facilitation of the phrenic motor circuit [64]. This has been demonstrated within the denervated phrenic motor pool after C2HS in rats with increased growth factor expression (e.g., VEGF and BDNF) [66].

## 5. Conclusions

Even though epidural stimulation is a promising technique, it is surgically invasive, and accordingly, less invasive approaches than that used in the present study may be more readily applied in the clinic. Despite some promise with TMS, the results from the present study may reflect the fact that 10 Hz rTMS alone may be insufficient to stimulate significant functional diaphragmatic recovery. Combining the rTMS protocol employed in the present study with other therapeutic interventions (e.g., activity-based therapy [40,67]) may be more efficacious.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biology11030473/s1>, Figure S1: Representative C3–C6 spinal cord sections labeled for CTB and CREB or GAP-43, Figure S2: GAP-43 expression in C3–C6 ventrolateral funiculi following C2 hemisection, Figure S3: iNOS expression in phrenic motoneurons following C2 hemisection, Figure S4: p-c-Jun expression in injured rVRG neurons, Figure S5: CREB expression in injured rVRG neurons, Figure S6: CSPG expression in the area around injured rVRG neurons, Figure S7: Iba1 and CD68 expression in the C1–C3 spinal cord following C2 hemisection, Figure S8: GFAP and WFA expression in the C1–C3 spinal cord following C2 hemisection.

**Author Contributions:** P.M.-E.: Conceptualization, experimental design, investigation, project administration, formal analysis, visualization, writing—original draft preparation. I.J.: investigation. V.V.: investigation. C.H.B.: investigation. L.E.: investigation. A.O.: investigation. K.-Z.L.: writing—review and editing. L.V.Z.: writing—review and editing. M.A.L.: writing—review and editing. A.M.: investigation, writing—review and editing. M.B.: writing—review and editing. S.V.: conceptualization, experimental design, investigation, supervision, project administration, funding acquisition, writing—review and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the Chancellerie des Universités de Paris (Legs Poix) (SV, MB), the Fondation de France (SV), the Fondation Médicite (SV), INSERM (MB, SV, AM), Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines (SV, AM), the National Institutes of Health, NINDS, R01 NS104291 (MAL) and F32 NS119348 (LVZ), the Lisa Dean Moseley Foundation (MAL), and Ministry of Science and Technology 109-2636-B-110-001 (KZL). The supporters had no role in study design, data collection, and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of the University of Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines (Comité d'éthique n°047) and complied with the French and European laws (EU Directive 2010/63/EU) regarding animal experimentation (Apafis #2017111516297308\_v3).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

**Acknowledgments:** This study has benefited from the facilities of CYMAGES and histology (UFR SVS, UVSQ, Université Paris-Saclay, 78180 Montigny-le-Bretonneux, France).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Winslow, C.; Rozovsky, J. Effect of spinal cord injury on the respiratory system. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* **2003**, *82*, 803–814. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Golder, F.J.; Reier, P.J.; Bolser, D.C. Altered respiratory motor drive after spinal cord injury: Supraspinal and bilateral effects of a unilateral lesion. *J. Neurosci.* **2001**, *21*, 8680–8689. [[CrossRef](#)]
- Lane, M.A.; Lee, K.-Z.; Fuller, D.D.; Reier, P.J. Spinal circuitry and respiratory recovery following spinal cord injury. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **2009**, *169*, 123–132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Vinit, S.; Gauthier, P.; Stamegna, J.C.; Kastner, A. High cervical lateral spinal cord injury results in long-term ipsilateral hemidiaphragm paralysis. *J. Neurotrauma* **2006**, *23*, 1137–1146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Vinit, S.; Kastner, A. Descending bulbospinal pathways and recovery of respiratory motor function following spinal cord injury. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **2009**, *169*, 115–122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Allilain, W.J.; Horn, K.P.; Hu, H.; Dick, T.E.; Silver, J. Functional regeneration of respiratory pathways after spinal cord injury. *Nature* **2011**, *475*, 196–200. [[CrossRef](#)]
- Keomani, E.; Deramaudt, T.B.; Petitjean, M.; Bonay, M.; Lofaso, E.; Vinit, S. A murine model of cervical spinal cord injury to study post-lesional respiratory neuroplasticity. *J. Vis. Exp.* **2014**, *87*, e51235. [[CrossRef](#)]
- Porter, W.T. The Path of the Respiratory Impulse from the Bulb to the Phrenic Nuclei. *J. Physiol.* **1895**, *17*, 455–485. [[CrossRef](#)]
- Nantwi, K.D.; El-Bohy, A.A.; Schrimsher, G.W.; Reier, P.J.; Goshgarian, H.G. Spontaneous Functional Recovery in a Paralyzed Hemidiaphragm Following Upper Cervical Spinal Cord Injury in Adult Rats. *Neurorehabil. Neural Repair* **1999**, *13*, 225–234. [[CrossRef](#)]
- Lee, K.Z.; Huang, Y.J.; Tsai, I.L. Respiratory motor outputs following unilateral midcervical spinal cord injury in the adult rat. *J. Appl. Physiol.* **2014**, *116*, 395–405. [[CrossRef](#)]
- Goshgarian, H.G. Invited Review: The crossed phrenic phenomenon: A model for plasticity in the respiratory pathways following spinal cord injury. *J. Appl. Physiol.* **2003**, *94*, 795–810. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ghali, M.G.Z. The crossed phrenic phenomenon. *Neural Regen. Res.* **2017**, *12*, 845–864. [[CrossRef](#)]
- Goshgarian, H.G. The crossed phrenic phenomenon and recovery of function following spinal cord injury. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **2009**, *169*, 85–93. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Fuller, D.D.; Golder, F.J.; Olson, E.B., Jr.; Mitchell, G.S. Recovery of phrenic activity and ventilation after cervical spinal hemisection in rats. *J. Appl. Physiol.* **2006**, *100*, 800–806. [[CrossRef](#)]
- Dougherty, B.J.; Lee, K.Z.; Lane, M.A.; Reier, P.J.; Fuller, D.D. Contribution of the spontaneous crossed-phrenic phenomenon to inspiratory tidal volume in spontaneously breathing rats. *J. Appl. Physiol.* **2012**, *112*, 96–105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

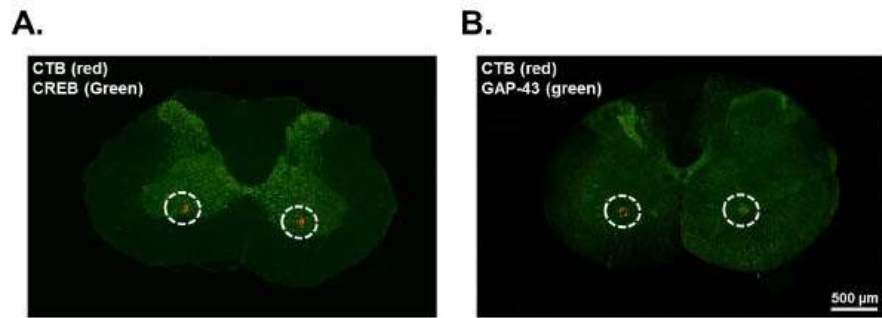


16. Martin, D.M.; McClintock, S.M.; Forster, J.J.; Lo, T.Y.; Loo, C.K. Cognitive enhancing effects of rTMS administered to the prefrontal cortex in patients with depression: A systematic review and meta-analysis of individual task effects. *Depress. Anxiety* **2017**, *34*, 1029–1039. [\[CrossRef\]](#)
17. Jassova, K.; Albrecht, J.; Ceresnakova, S.; Papezova, H.; Anders, M. Repetitive transcranial magnetic stimulation significantly influences the eating behavior in depressive patients. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **2019**, *15*, 2579–2586. [\[CrossRef\]](#)
18. McClintock, S.M.; Reti, I.M.; Carpenter, L.L.; McDonald, W.M.; Dubin, M.; Taylor, S.E.; Cook, I.A.; O'Reardon, J.; Husain, M.M.; Wall, C.; et al. Consensus Recommendations for the Clinical Application of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation (rTMS) in the Treatment of Depression. *J. Clin. Psychiatry* **2018**, *79*, 3651. [\[CrossRef\]](#)
19. Yan, T.; Xie, Q.; Zheng, Z.; Zou, K.; Wang, L. Different frequency repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) for posttraumatic stress disorder (PTSD): A systematic review and meta-analysis. *J. Psychiatr. Res.* **2017**, *89*, 125–135. [\[CrossRef\]](#)
20. Kozel, F.A. Clinical Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation for Posttraumatic Stress Disorder, Generalized Anxiety Disorder, and Bipolar Disorder. *Psychiatr. Clin. N. Am.* **2018**, *41*, 433–446. [\[CrossRef\]](#)
21. Ma, Q.; Geng, Y.; Wang, H.L.; Han, B.; Wang, Y.Y.; Li, X.L.; Wang, L.; Wang, M.W. High Frequency Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation Alleviates Cognitive Impairment and Modulates Hippocampal Synaptic Structural Plasticity in Aged Mice. *Front. Aging Neurosci.* **2019**, *11*, 235. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Wang, H.; Geng, Y.; Han, B.; Qiang, J.; Li, X.; Sun, M.; Wang, Q.; Wang, M. Repetitive transcranial magnetic stimulation applications normalized prefrontal dysfunctions and cognitive-related metabolic profiling in aged mice. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e81482. [\[CrossRef\]](#)
23. Kobayashi, M.; Pascual-Leone, A. Transcranial magnetic stimulation in neurology. *Lancet Neurol.* **2003**, *2*, 145–156. [\[CrossRef\]](#)
24. Ziemann, U.; Paulus, W.; Nitsche, M.A.; Pascual-Leone, A.; Byblow, W.D.; Berardelli, A.; Siebner, H.R.; Classen, J.; Cohen, L.G.; Rothwell, J.C. Consensus: Motor cortex plasticity protocols. *Brain Stimul.* **2008**, *1*, 164–182. [\[CrossRef\]](#)
25. Poirrier, A.L.; Nyssen, Y.; Scholtes, E.; Multon, S.; Rinkin, C.; Weber, G.; Bouhy, D.; Brook, G.; Franzen, R.; Schoenen, J. Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation Improves Open Field Locomotor Recovery after Low but Not High Thoracic Spinal Cord Compression-Injury in Adult Rats. *J. Neurosci. Res.* **2004**, *75*, 253–261. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Marufo, S.A.; Hsieh, T.H.; Liou, J.C.; Chen, H.Y.; Peng, C.W. Neuromodulatory effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on neural plasticity and motor functions in rats with an incomplete spinal cord injury: A preliminary study. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0252965. [\[CrossRef\]](#)
27. Krishnan, V.S.; Shin, S.S.; Belegu, V.; Celnik, P.; Reimers, M.; Smith, K.R.; Pelled, G. Multimodal Evaluation of TMS—Induced Somatosensory Plasticity and Behavioral Recovery in Rats with Contusion Spinal Cord Injury. *Front. Neurosci.* **2019**, *13*, 387. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Ellaway, P.H.; Vásquez, N.; Craggs, M. Induction of central nervous system plasticity by repetitive transcranial magnetic stimulation to promote sensorimotor recovery in incomplete spinal cord injury. *Front. Integr. Neurosci.* **2014**, *8*, 42. [\[CrossRef\]](#)
29. Petrosyan, H.A.; Alessi, V.; Sieto, S.A.; Kaufman, M.; Arvanian, V.L. Transcranial magnetic stimulation (TMS) responses elicited in hindlimb muscles as an assessment of synaptic plasticity in spino-muscular circuitry after chronic spinal cord injury. *Neurosci. Lett.* **2017**, *642*, 37–42. [\[CrossRef\]](#)
30. Michel-Flutot, P.; Zholudeva, L.V.; Randelman, M.L.; Deramaudt, T.B.; Mansart, A.; Alvarez, J.-C.; Lee, K.-Z.; Petitjean, M.; Bonay, M.; Lane, M.A.; et al. High frequency repetitive Transcranial Magnetic Stimulation promotes long lasting phrenic motoneuron excitability via GABAergic networks. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **2021**, *292*, 103704. [\[CrossRef\]](#)
31. Vinit, S.; Keomani, E.; Deramaudt, T.B.; Spruance, V.M.; Bezudnaya, T.; Lane, M.A.; Bonay, M.; Petitjean, M. Interdisciplinary approaches of transcranial magnetic stimulation applied to a respiratory neuronal circuitry model. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e113251. [\[CrossRef\]](#)
32. Vinit, S.; Keomani, E.; Deramaudt, T.B.; Bonay, M.; Petitjean, M. Reorganization of Respiratory Descending Pathways following Cervical Spinal Partial Section Investigated by Transcranial Magnetic Stimulation in the Rat. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0148180. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Lee, K.Z.; Liou, L.M.; Vinit, S.; Ren, M.Y. Rostral-Caudal Effect of Cervical Magnetic Stimulation on the Diaphragm Motor Evoked Potential after Cervical Spinal Cord Contusion in the Rat. *J. Neurotrauma* **2022**. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Lee, K.Z.; Liou, L.M.; Vinit, S. Diaphragm Motor-Evoked Potential Induced by Cervical Magnetic Stimulation following Cervical Spinal Cord Contusion in the Rat. *J. Neurotrauma* **2021**, *38*, 2122–2140. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Gersner, R.; Kravetz, E.; Feil, J.; Pell, G.; Zangen, A. Long-term effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on markers for neuroplasticity: Differential outcomes in anesthetized and awake animals. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **2011**, *31*, 7521–7526. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Benali, A.; Trippe, J.; Weiler, E.; Mix, A.; Petrasch-Parwez, E.; Girzalsky, W.; Eysel, U.T.; Erdmann, R.; Funke, K. Theta-burst transcranial magnetic stimulation alters cortical inhibition. *J. Neurosci.* **2011**, *31*, 1193–1203. [\[CrossRef\]](#)
37. Vlaches, A.; Muller-Dahlhaus, F.; Roskopp, J.; Lenz, M.; Ziemann, U.; Deller, T. Repetitive magnetic stimulation induces functional and structural plasticity of excitatory postsynapses in mouse organotypic hippocampal slice cultures. *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 17514–17523. [\[CrossRef\]](#)
38. Volz, L.J.; Benali, A.; Mix, A.; Neubacher, U.; Funke, K. Dose-dependence of changes in cortical protein expression induced with repeated transcranial magnetic theta-burst stimulation in the rat. *Brain Stimul.* **2013**, *6*, 598–606. [\[CrossRef\]](#)
39. Hunanyan, A.S.; Petrosyan, H.A.; Alessi, V.; Arvanian, V.L. Repetitive spinal electromagnetic stimulation opens a window of synaptic plasticity in damaged spinal cord: Role of NMDA receptors. *J. Neurophysiol.* **2012**, *107*, 3027–3039. [\[CrossRef\]](#)

40. Petrosyan, H.A.; Alessi, V.; Hunanyan, A.S.; Sisto, S.A.; Arvanian, V.L. Spinal electro-magnetic stimulation combined with transgene delivery of neurotrophin NT-3 and exercise: Novel combination therapy for spinal contusion injury. *J. Neurophysiol.* **2015**, *114*, 2923–2940. [\[CrossRef\]](#)
41. Trippe, J.; Mix, A.; Aydin-Abidin, S.; Funke, K.; Benali, A. theta burst and conventional low-frequency rTMS differentially affect GABAergic neurotransmission in the rat cortex. *Exp. Brain Res.* **2009**, *199*, 411–421. [\[CrossRef\]](#)
42. Lenz, M.; Galaris, C.; Müller-Dahlhaus, F.; Opitz, A.; Wierenga, C.J.; Szabo, G.; Ziemann, U.; Deller, T.; Funke, K.; Vlachos, A. Repetitive magnetic stimulation induces plasticity of inhibitory synapses. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 10020. [\[CrossRef\]](#)
43. Hausmann, A.; Marksteiner, J.; Hinterhuber, H.; Humpel, C. Magnetic stimulation induces neuronal c-fos via tetrodotoxin-sensitive sodium channels in organotypic cortex brain slices of the rat. *Neurosci. Lett.* **2001**, *310*, 105–108. [\[CrossRef\]](#)
44. Hellmann, J.; Jüttner, R.; Roth, C.; Bajbouj, M.; Kirste, I.; Heuser, L.; Gertz, K.; Endres, M.; Kronenberg, G. Repetitive magnetic stimulation of human-derived neuron-like cells activates cAMP-CREB pathway. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* **2012**, *262*, 87–91. [\[CrossRef\]](#)
45. Chalifoux, C.; Guillou, C.; Hardouin, J.; Delarue, Q.; Li, X.; Dudos, C.; Schapmar, D.; Marie, J.P.; Cosette, P.; Guérout, N. The Regenerative Effect of Trans-spinal Magnetic Stimulation After Spinal Cord Injury: Mechanisms and Pathways Underlying the Effect. *Neurotherapeutics* **2020**, *17*, 2069–2088. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Cullen, C.L.; Young, K.M. How Does Transcranial Magnetic Stimulation Influence Glial Cells in the Central Nervous System? *Front. Neural Circuits* **2016**, *10*, 26. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Liebetanz, D.; Fausser, S.; Michaelis, T.; Czéh, B.; Watanabe, T.; Paulus, W.; Frahm, J.; Fuchs, E. Safety aspects of chronic low-frequency transcranial magnetic stimulation based on localized proton magnetic resonance spectroscopy and histology of the rat brain. *J. Psychiatr. Res.* **2003**, *37*, 277–286. [\[CrossRef\]](#)
48. Rauš, S.; Selaković, V.; Manojlović-Stojanowski, M.; Radenović, L.; Prolić, Z.; Janač, B. Response of hippocampal neurons and glial cells to alternating magnetic field in gerbils submitted to global cerebral ischemia. *Neurotox. Res.* **2013**, *23*, 79–91. [\[CrossRef\]](#)
49. Kim, J.Y.; Choi, G.S.; Cho, Y.W.; Cho, H.; Hwang, S.J.; Ahn, S.H. Attenuation of spinal cord injury-induced astroglial and microglial activation by repetitive transcranial magnetic stimulation in rats. *J. Korean Med. Sci.* **2013**, *28*, 295–299. [\[CrossRef\]](#)
50. Yang, X.; Song, L.; Liu, Z. The effect of repetitive transcranial magnetic stimulation on a model rat of Parkinson's disease. *Neuroreport* **2010**, *21*, 268–272. [\[CrossRef\]](#)
51. Aftanas, L.I.; Gevorgyan, M.M.; Zhanaeva, S.Y.; Dzemidovich, S.S.; Kulikova, K.I.; Al'perina, E.L.; Danilenko, K.V.; Idova, G.V. Therapeutic Effects of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation (rTMS) on Neuroinflammation and Neuroplasticity in Patients with Parkinson's Disease: A Placebo-Controlled Study. *Bull. Exp. Biol. Med.* **2018**, *165*, 195–199. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Lenz, M.; Platschek, S.; Priesemann, V.; Becker, D.; Willems, L.M.; Ziemann, U.; Deller, T.; Müller-Dahlhaus, F.; Jedlicka, P.; Vlachos, A. Repetitive magnetic stimulation induces plasticity of excitatory postsynapses on proximal dendrites of cultured mouse CA1 pyramidal neurons. *Brain Struct. Funct.* **2015**, *220*, 3323–3337. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Doperalski, N.J.; Fuller, D.D. Long-term facilitation of ipsilateral but not contralateral phrenic output after cervical spinal cord hemisection. *Exp. Neurol.* **2006**, *200*, 74–81. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Navarrete-Opazo, A.; Vinit, S.; Dougherty, B.J.; Mitchell, G.S. Daily acute intermittent hypoxia elicits functional recovery of diaphragm and inspiratory intercostal muscle activity after acute cervical spinal injury. *Exp. Neurol.* **2015**, *266*, 1–10. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Robac, A.; Neveu, P.; Hugede, A.; Garrido, E.; Nicol, L.; Delarue, Q.; Guérout, N. Repetitive Trans Spinal Magnetic Stimulation Improves Functional Recovery and Tissue Repair in Contusive and Penetrating Spinal Cord Injury Models in Rats. *Biomedicines* **2021**, *9*, 1827. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
56. Mahar, M.; Cavalli, V. Intrinsic mechanisms of neuronal axon regeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* **2018**, *19*, 323–337. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
57. Zholudeva, L.V.; Karliner, J.S.; Dougherty, K.J.; Lane, M.A. Anatomical Recruitment of Spinal V2a Interneurons into Phrenic Motor Circuitry after High Cervical Spinal Cord Injury. *J. Neurotrauma* **2017**, *34*, 3058–3065. [\[CrossRef\]](#)
58. Lane, M.A.; Lee, K.Z.; Salazar, K.; O'Steen, B.E.; Bloom, D.C.; Fuller, D.D.; Reier, P.J. Respiratory function following bilateral mid-cervical contusion injury in the adult rat. *Exp. Neurol.* **2012**, *235*, 197–210. [\[CrossRef\]](#)
59. Satkunendrarajah, K.; Karadimas, S.K.; Laliberte, A.M.; Montandon, G.; Fehlings, M.G. Cervical excitatory neurons sustain breathing after spinal cord injury. *Nature* **2018**, *562*, 419–422. [\[CrossRef\]](#)
60. Streeter, K.A.; Sunshine, M.D.; Patel, S.R.; Gonzalez-Rothi, E.J.; Reier, P.J.; Baekey, D.M.; Fuller, D.D. Mid-cervical interneuron networks following high cervical spinal cord injury. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **2020**, *271*, 103305. [\[CrossRef\]](#)
61. Leydeker, M.; Delva, S.; Tserlyuk, I.; Yau, J.; Wagdy, M.; Hawash, A.; Bendaoud, S.; Mohamed, S.; Wieraszko, A.; Ahmed, Z. The effects of 15 Hz trans-spinal magnetic stimulation on locomotor control in mice with chronic contusive spinal cord injury. *Electromagn. Biol. Med.* **2013**, *32*, 155–164. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
62. Edgerton, V.R.; Harkema, S. Epidural stimulation of the spinal cord in spinal cord injury: Current status and future challenges. *Expert Rev. Neurother.* **2011**, *11*, 1351–1353. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
63. Bonizzato, M.; James, N.D.; Pidpruzhnykova, G.; Pavlova, N.; Shkorbatova, P.; Baud, L.; Martinez-Gonzalez, C.; Squair, J.W.; DiGiovanna, J.; Barraud, Q.; et al. Multi-pronged neuromodulation intervention engages the residual motor circuitry to facilitate walking in a rat model of spinal cord injury. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 1925. [\[CrossRef\]](#)

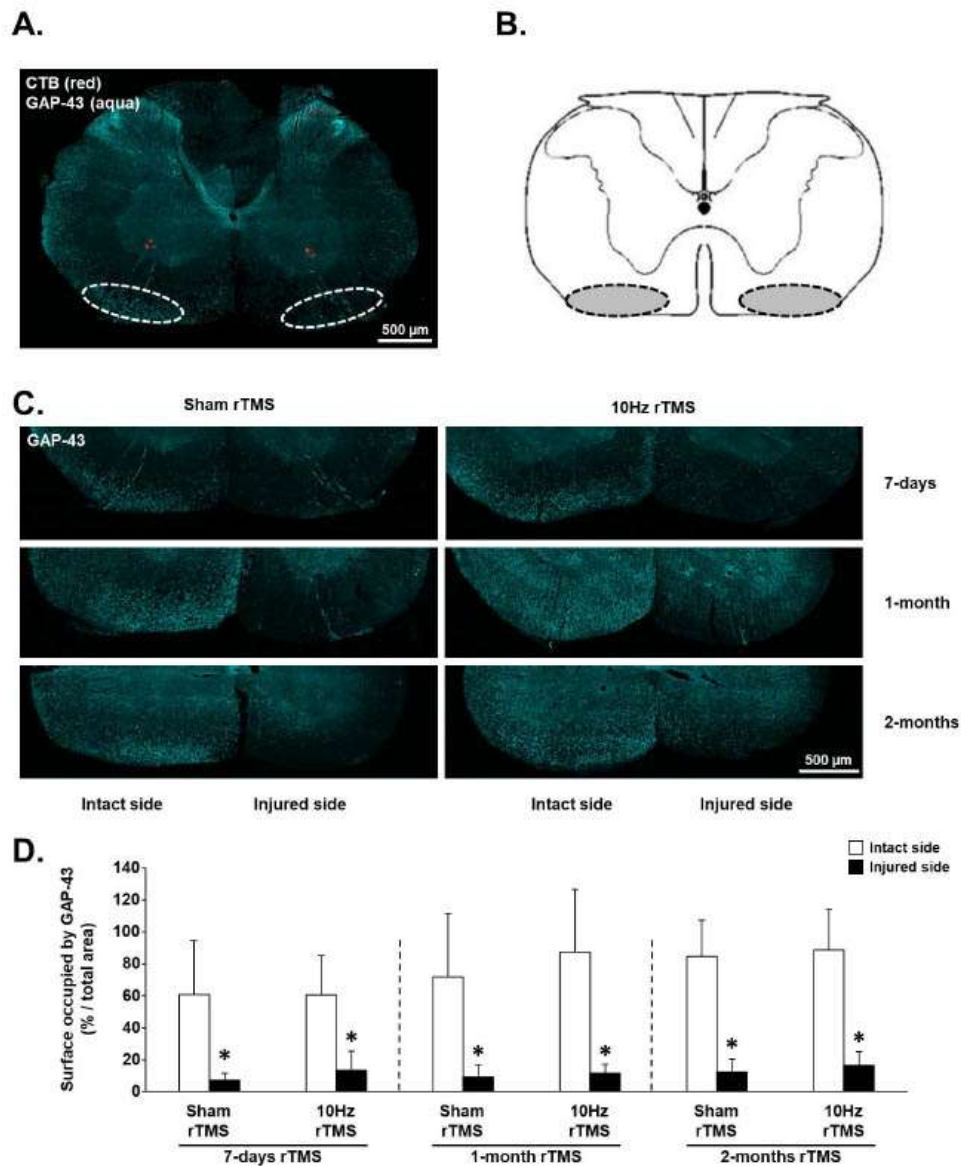


64. Bezudnaya, T.; Lane, M.A.; Marchenko, V. Paced breathing and phrenic nerve responses evoked by epidural stimulation following complete high cervical spinal cord injury in rats. *J. Appl. Physiol.* **2018**, *125*, 687–696. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Mercier, L.M.; Gorzalez-Rothi, E.J.; Streete, K.A.; Posgai, S.S.; Poirier, A.S.; Fuller, D.D.; Reier, P.J.; Baekey, D.M. Intraspinal microstimulation and diaphragm activation after cervical spinal cord injury. *J. Neurophysiol.* **2017**, *117*, 767–776. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Dale, E.A.; Sunshine, M.D.; Kelly, M.N.; Mitchell, G.S.; Fuller, D.D.; Reier, P.J. Chronic, closed-loop, cervical epidural stimulation elicits plasticity in diaphragm motor output and upregulates spinal neurotrophic factor gene expression. *FASEB J.* **2019**, *33*, 843.10 [[CrossRef](#)]
67. Jesus, I.; Michel-Flutot, P.; Deramaudt, T.B.; Paucard, A.; Vanhee, V.; Vinit, S.; Bonay, M. Effects of aerobic exercise training on muscle plasticity in a mouse model of cervical spinal cord injury. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



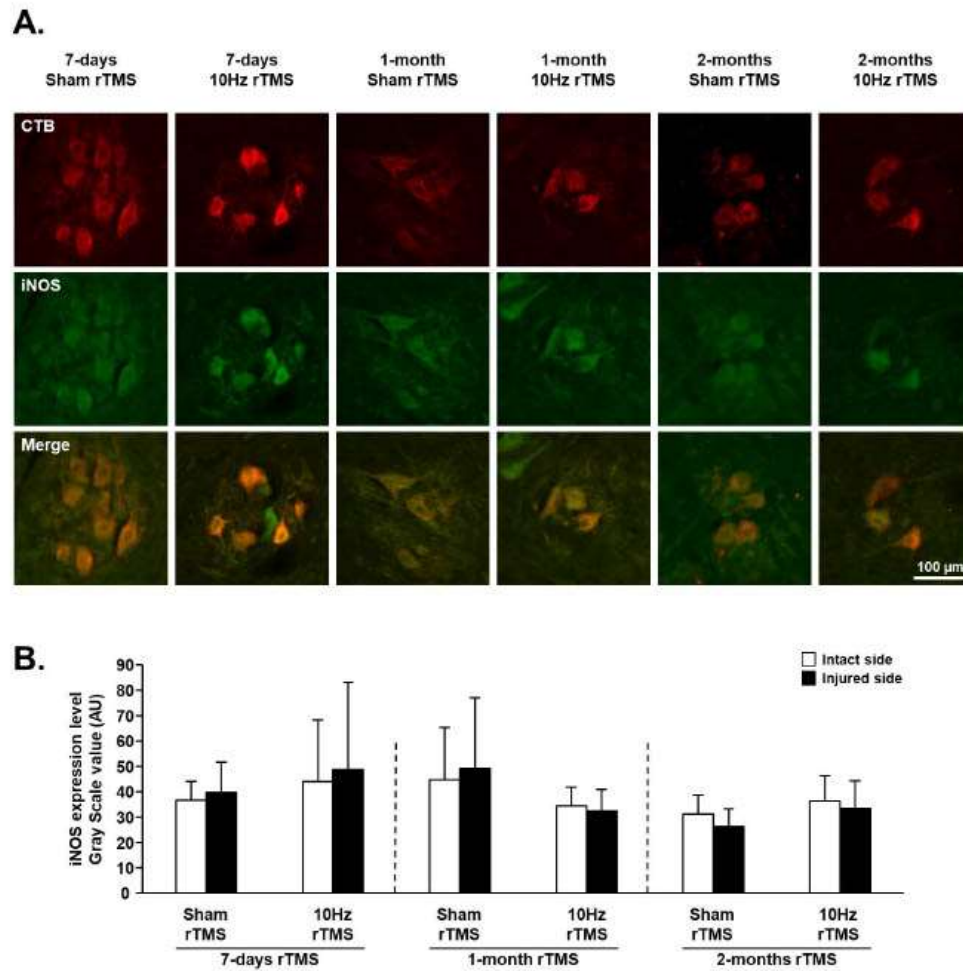
**Figure S1: Representative C3-C6 spinal cord sections labeled for CTB and CREB or GAP-43**

**A.** Representative image showing the phrenic motoneurons labeling in red and CREB labeling in green in the C3-C6 spinal cord. **B.** Representative image showing the phrenic motoneurons labeling in red and GAP-43 labeling in green in the C3-C6 spinal cord.



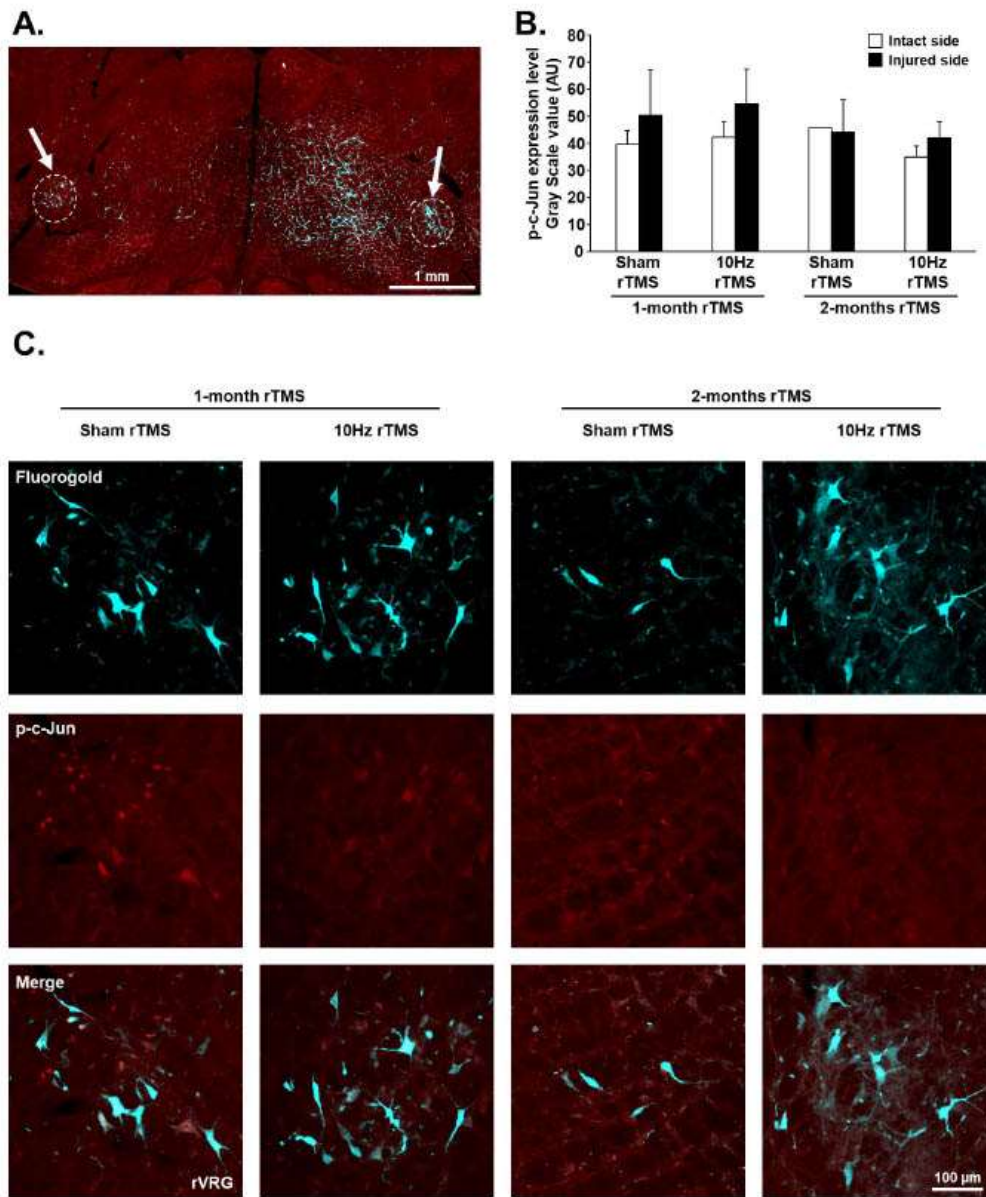
**Figure S2: GAP-43 expression in C3-C6 ventrolateral funiculi following C2 hemisection**

**A.** Representative image showing location of phrenic motoneurons in red and the location of the ventrolateral funiculi (white dashed line). **B.** Schematic representation of a transversal section of the spinal cord showing the ventrolateral funiculi (black dashed line). **C.** Representative images showing expression of GAP-43 expression in C3-C6 ventrolateral funiculi in C2 hemisected rats, following 7-days, 1-month or 2-months Sham or 10Hz rTMS treatment. **D.** Quantitative analysis of the GAP-43 immunolabeled area in the ventrolateral funiculi for intact and injured sides of Sham or 10Hz rTMS treated C2 hemisected animals following 7-days, 1-month or 2 months treatment. There is no difference between intact side groups, and between injured groups (T-test,  $p > 0.05$ ). \* compared to intact side,  $p < 0.01$ .



**Figure S3: iNOS expression in phrenic motoneurons following C2 hemisection**

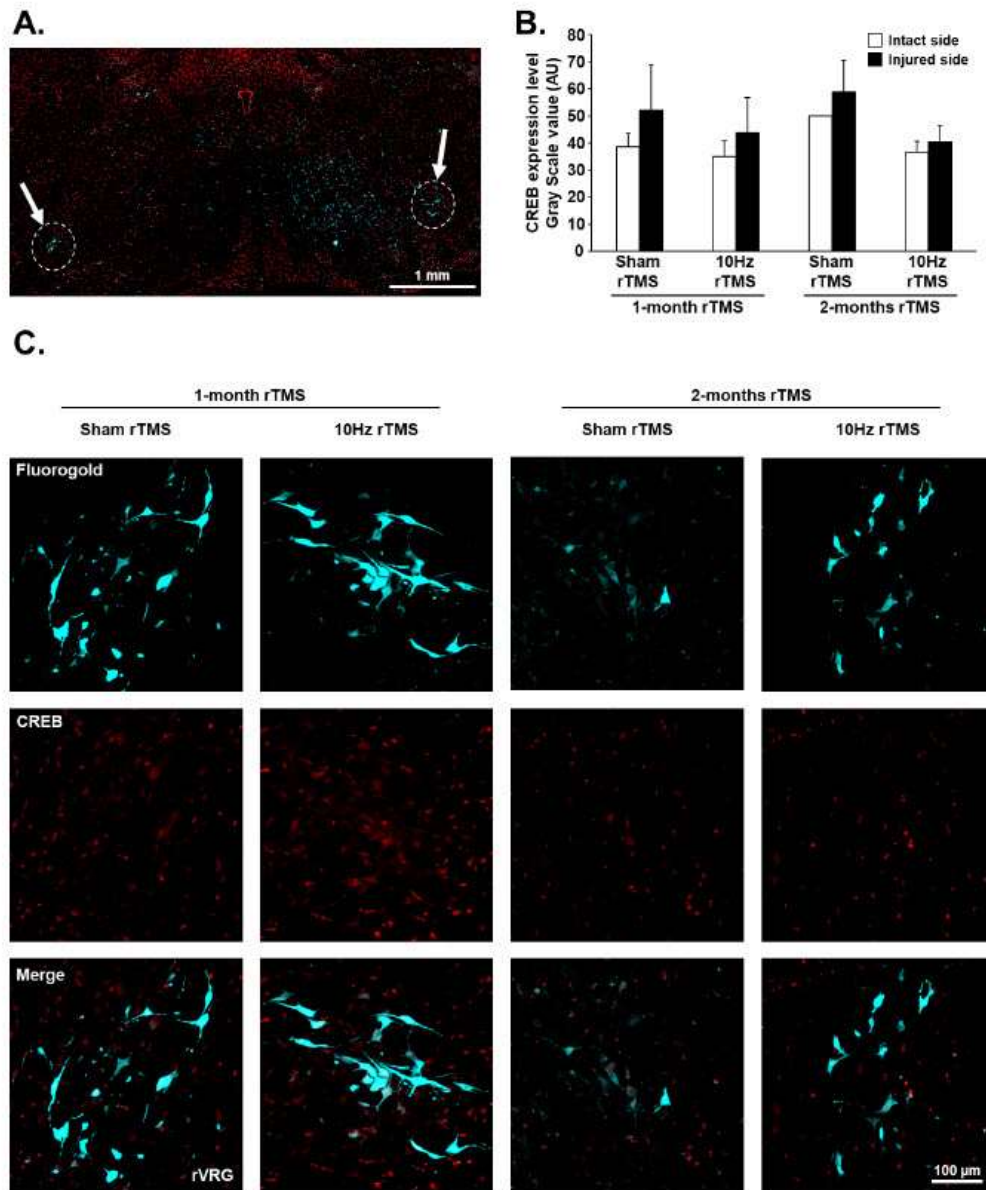
**A.** Representative images showing expression of iNOS in intact side phrenic motoneurons labeled with CTB in C2 hemisected rats, following 7-days, 1-month or 2-months Sham or 10Hz rTMS treatment. **B.** Quantification of iNOS expression in phrenic motoneurons for intact and injured sides of Sham or 10Hz rTMS treated C2 hemisected animals following 7-days, 1-month or 2 months treatment. There is no difference between the intact and the injured sides for the different groups (Paired t-test for intact vs injured side,  $p > 0.05$ ). There is no difference between intact side groups, and between injured groups (T-test,  $p > 0.05$ ).

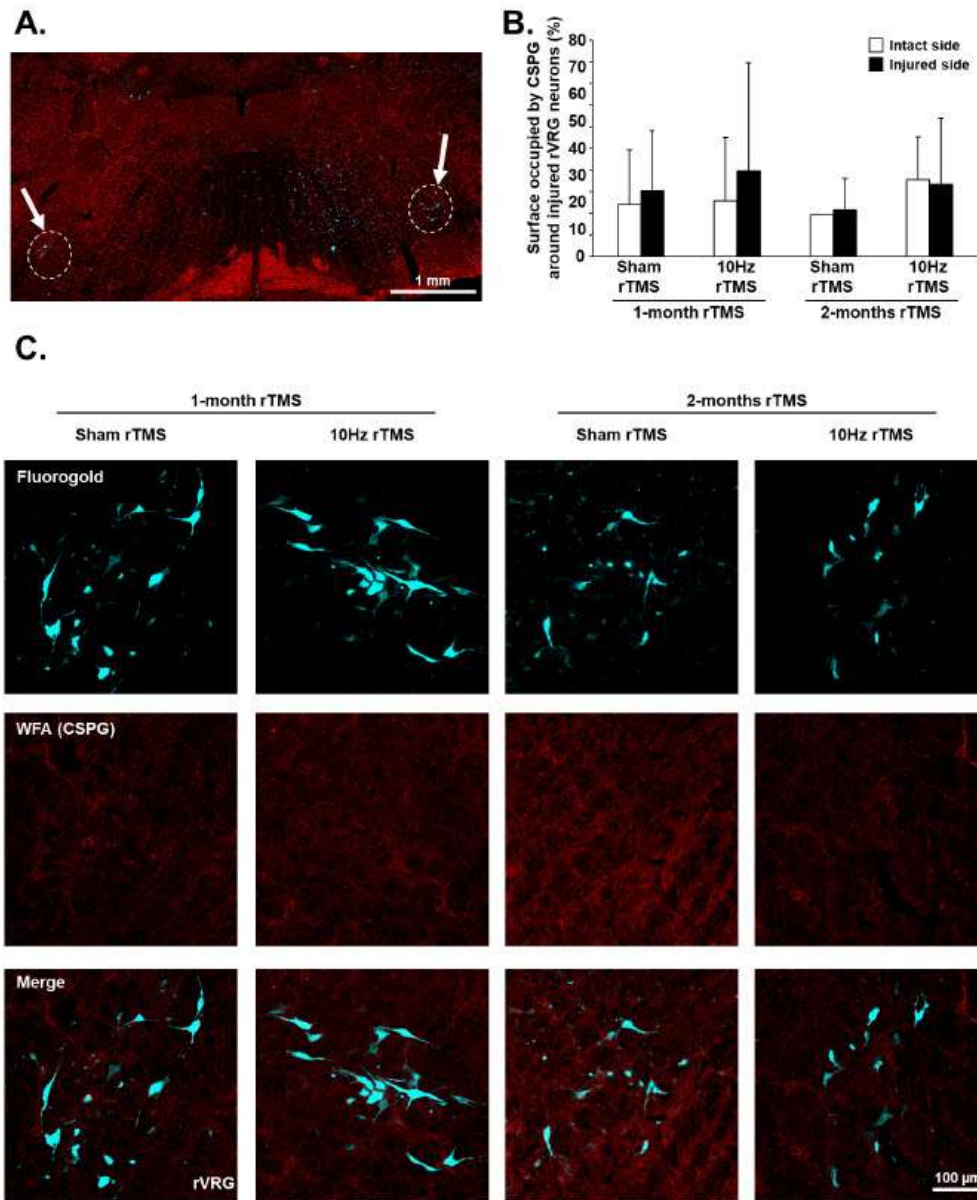


**Figure S4: p-c-Jun expression in injured rVRG neurons.**

**A.** Representative images showing rVRG in the brainstem. rVRG neurons are labeled with Fluorogold. **B.** Quantification of p-c-Jun expression in injured rVRG neurons following 1-month and 2-months 10Hz rTMS or Sham rTMS. **C.** representative images of p-c-Jun expression in injured rVRG neurons following 1-month and 2-months 10Hz rTMS or Sham rTMS. There is no difference between the different groups (t-test when possible,  $p > 0.05$ ).



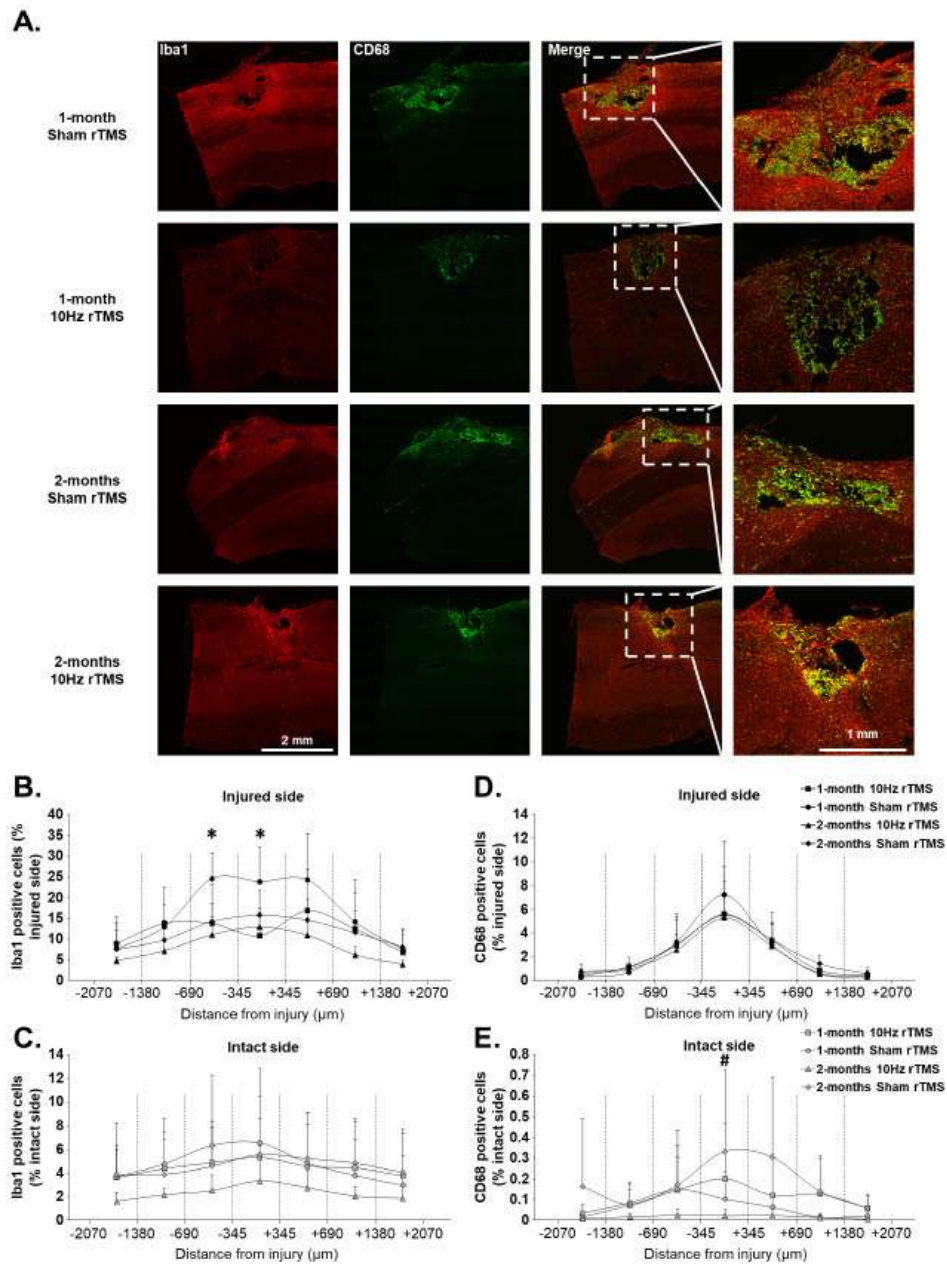




**Figure S6: CSPG expression in the area around injured rVRG neurons.**

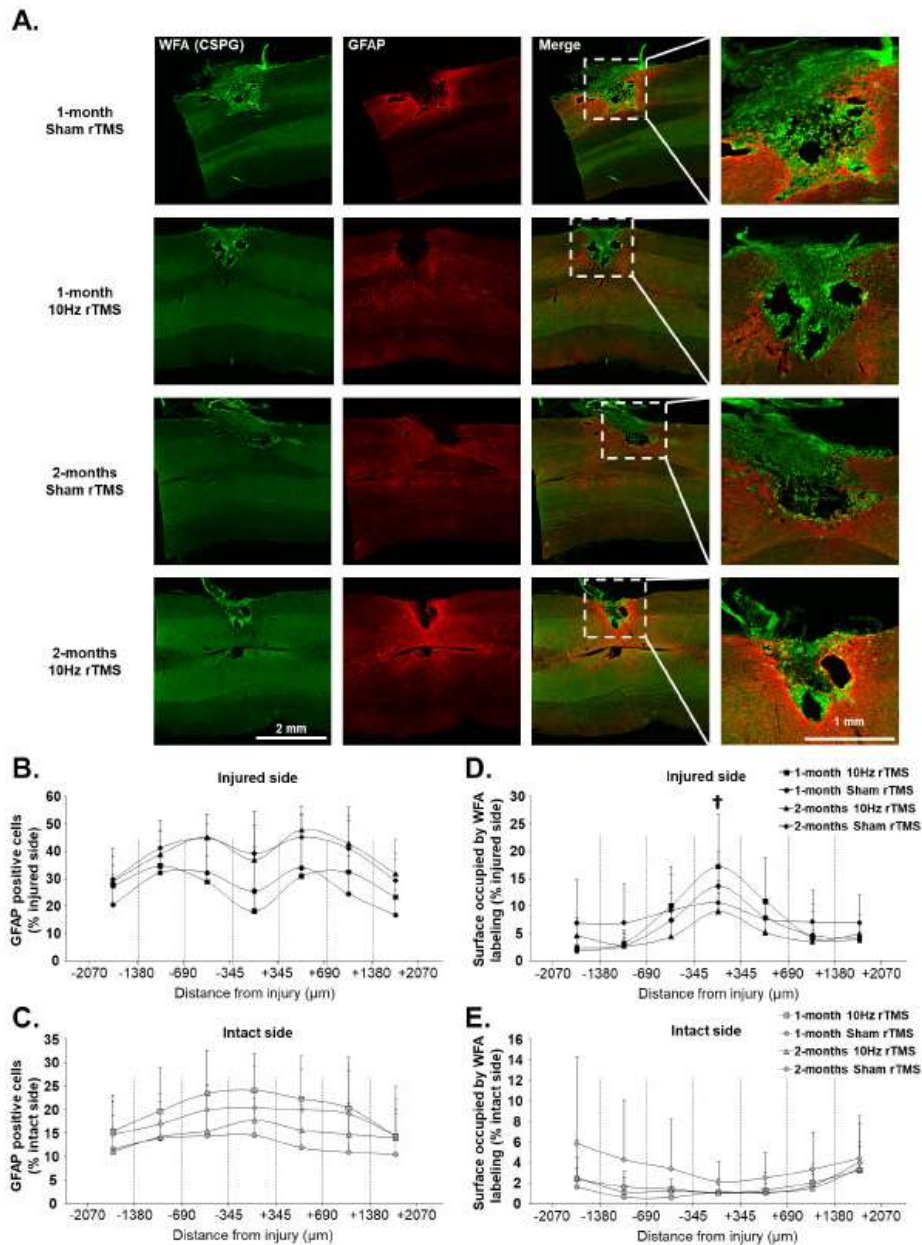
**A.** Representative images showing rVRG in the brainstem. rVRG neurons are labeled with Fluorogold. **B.** Quantification of CSPG expression in the area around injured rVRG neurons following 1-month and 2-months 10Hz rTMS or Sham rTMS. **C.** representative images of CSPG expression in the area around injured rVRG neurons following 1-month and 2-months 10Hz rTMS or Sham rTMS. There is no difference between the different groups (t-test when possible,  $p > 0.05$ ).





**Figure S7 : Iba1 and CD68 expression in the C1-C3 spinal cord following C2 hemisection**

**A.** Representative images showing expression of Iba1 and CD68 at the site of the lesion in C2 hemisected rats, following 1-month or 2-months Sham or 10Hz rTMS treatment. Quantification of Iba1 expression intact side (**B**) or injured side (**C**) of Sham or 10Hz rTMS treated C2 hemisected animals following 1-month or 2 months treatment. Quantification of CD68 expression intact side (**D**) or injured side (**E**) of Sham or 10Hz rTMS treated C2 hemisected animals following 1-month or 2-months treatment. \* 1-month 10 Hz rTMS vs 1-month Sham Hz rTMS, Two-way-ANOVA,  $p < 0.05$ . # 2-months 10 Hz rTMS vs 2-months Sham Hz rTMS, Two-way-ANOVA,  $p < 0.05$ .



**Figure S8 : GFAP and WFA expression in the C1-C3 spinal cord following C2 hemisection**

**A.** Representative images showing expression of GFAP and WFA (CSPG) at the site of the lesion in C2 hemisected rats, following 1-month or 2-months Sham or 10Hz rTMS treatment. Quantification of Iba1 expression intact side (**B**) or injured side (**C**) of Sham or 10Hz rTMS treated C2 hemisected animals following 1-month or 2-months treatment. Quantification of CD68 expression intact side (**D**) or injured side (**E**) of Sham or 10Hz rTMS treated C2 hemisected animals following 1-month or 2-months treatment. † 1-month 10 Hz rTMS vs 2-months 10 Hz rTMS, Two-way-ANOVA,  $p < 0.05$ .

## **DISCUSSION**

---

Qu'il soit déclenché par une infection ou par un traumatisme, un dérèglement de la réponse immunitaire peut avoir de graves conséquences. Généralement étudiées indépendamment, ces origines différentes peuvent toutefois mettre en jeu des mécanismes communs. Au cours de ma thèse, j'ai donc cherché à étudier plusieurs de ces mécanismes. L'un d'entre eux a plus particulièrement retenu mon attention : la production de pièges extracellulaires (ETs).

Pour évaluer ces possibles interactions, j'ai travaillé sur deux pathologies : le sepsis, en tant que facteur infectieux, et la lésion de la moelle épinière, en tant que facteur d'origine traumatique.

Les études menées après lésion de la moelle épinière ont permis de caractériser les types cellulaires produisant les ETs dans ce modèle. Celles menées sur deux modèles précliniques de sepsis ont permis de caractériser et explorer les effets des ETs sur les troubles neuromusculaires au cours de cette pathologie. Par ailleurs, j'ai également évalué des traitements potentiels que sont la modulation adrénergique au cours du sepsis ou la stimulation magnétique transcrânienne répétée suite à une lésion de la moelle épinière.

## 1. IMPLICATION DE LA MODULATION ADRÉNERGIQUE AU COURS DU SEPSIS (ARTICLE 1)

---

Malgré un traitement principalement symptomatique, le sepsis provoque près de 11 millions de décès par an. Pour améliorer la prise en charge de ces patients, une piste thérapeutique innovante pourrait être la modulation adrénérergique, avec notamment l'administration d'antagonistes des récepteurs  $\beta$ 1-adrénérergiques, appelés  $\beta$ 1-bloquants, en raison de leur capacité à atténuer la réponse inflammatoire excessive du système immunitaire et à moduler la réponse neuroendocrine. Afin d'explorer les effets des  $\beta$ 1-bloquants, des modèles précliniques ont été utilisés et ont permis de montrer une modulation de la réponse inflammatoire et une préservation des grandes fonctions d'organes, dont la fonction cardiaque. De plus, l'administration de  $\beta$ 1-bloquants chez des patients septiques hypertendus a montré des effets positifs sur leur survie (Morelli et al. 2013). Cependant, les mécanismes expliquant ces effets protecteurs des  $\beta$ 1-bloquants sélectifs sur les fonctions des organes, et par conséquent sur la survie, n'ont jamais été clairement mis en évidence.

Pour répondre à cette question, nous avons, dans un premier temps, cherché à reproduire les effets connus du choc septique humain (hypovolémie, réponse inflammatoire exagérée, dysfonctions organes) sur des modèles précliniques murins de sepsis, les modèles LPS et CLP, qui comportent chacun des caractéristiques différentes mais complémentaires (tableau 2, page 70), avant d'évaluer deux  $\beta$ 1-bloquants potentiels, pour ensuite étudier les mécanismes expliquant leurs effets.

La sélectivité des  $\beta$ -bloquants pour les récepteurs  $\beta$ 1-adrénérergiques au cours du sepsis est importante afin de ne pas affecter les récepteurs  $\beta$ 2-adrénérergiques, dont la stimulation a un rôle positif au cours de cette pathologie, notamment par son effet plutôt anti-inflammatoire. Au cours de ce projet, nous avons donc sélectionné comme  $\beta$ 1-bloquants l'aténolol et l'esmolol (sélectivité  $\beta$ 1/ $\beta$ 2 : respectivement 30/1 et 35/1) (Page et al. 2016). Ces deux molécules donnent des résultats similaires sur la survie et les fonctions d'organe. Notre choix s'est donc porté sur l'aténolol pour la suite de mon projet, car cet antagoniste permet de réaliser une seule injection (demi-vie longue) et ainsi de limiter le stress induit par la manipulation des animaux.

Nous avons montré un effet positif de l'administration de  $\beta$ 1-bloquants sur la survie dans nos deux modèles précliniques de souris. Chez l'Homme, les résultats sur ce paramètre sont parfois contradictoires : certaines études concluent à des effets bénéfiques de ce type de traitement, avec notamment une amélioration de la survie des patients à 28 jours (Liu et al. 2018; Morelli et al. 2013), tandis que d'autres travaux supposent l'inverse (Ackland et al. 2010). Les raisons de cette divergence sont difficiles à déterminer, mais le choix de la dose à employer pourrait être une de ces raisons. En effet, notre étude a permis de reproduire la variabilité des résultats de la littérature en fonction de la dose. Nous avons montré dans le modèle LPS qu'une dose faible (0,1mg/kg, IP) diminuant de façon non significative la fréquence cardiaque ( $8,7 \pm 1,4$  %) améliorait la survie et les fonctions d'organes (cœur, foie, rein) comme l'avait déjà montré Wei et al en 2016 (Wei et al. 2016). Par contre, une dose plus élevée (1mg/kg, IP), diminuant la fréquence cardiaque de façon significative ( $18,4 \pm 3,8$  %) aggravait les dysfonctions d'organes et augmentait le risque de décès des animaux.

Suite à cela, nous avons observé une préservation des fonctions d'organes, notamment de la fraction d'éjection du ventricule gauche chez les animaux traités (LPS  $33 \pm 2,8$  % vs LPS + aténolol  $55 \pm 5$  %) pour la dose de 0,1mg/kg IP, ce qui avait déjà été observé dans des modèles de sepsis par CLP (Suzuki et al. 2005; Wei et al. 2016). Afin d'expliquer cet effet bénéfique, nous avons mené une étude sans *a priori* et non ciblée par microarray en comparant l'expression de gènes pour les groupes LPS et LPS traité par  $\beta$ 1-bloquants, ou CLP et CLP traité par  $\beta$ 1-bloquants. Nos résultats ont montré que la majorité des gènes dont l'expression est modulée par l'administration de l'aténolol est impliquée dans les réponses inflammatoire et immunitaire. Cet effet génomique a été confirmé au niveau protéique avec une diminution de la production des principales cytokines pro-inflammatoires. Cet effet d'un  $\beta$ 1-bloquant sur l'inflammation a déjà été montré dans des modèles précliniques (Hagiwara et al. 2008) de sepsis ou en clinique (Hong et al. 2023; Levy et al. 2021), mais également dans d'autres pathologies comme par exemple la Covid-19 (Clemente-Moragón et al. 2021), un modèle d'ischémie-reperfusion (Clemente-Moragón et al. 2020) ou la dénervation sino-aortique (Zhang et al. 2004).

Pour approfondir le rôle de la modulation adrénérgique sur la réponse immunitaire, nous nous sommes intéressés aux neutrophiles car ils constituent la première ligne de défense au cours d'une infection, en étant parmi les premières cellules impliquées dans l'initiation de la réponse immunitaire. Comme attendu, nous avons observé une augmentation du nombre de neutrophiles

circulants, qui peut être expliquée par l'augmentation de la concentration de facteurs (GM-CSF, G-CSF) qui permettent leur libération massive par la moelle osseuse et une augmentation de leur durée de vie. Au cours du sepsis, des études ont déjà montré qu'ils étaient libérés de manière inadéquate et importante, et que leur durée de vie était augmentée, du fait d'une apoptose retardée (Kovach et al. 2012).

La réponse immunitaire implique non seulement la présence des neutrophiles, mais aussi leurs activités. Notre étude n'a pas montré d'effets majeurs des  $\beta$ 1-bloquants sur la dégranulation ou la phagocytose dans le modèle LPS. En revanche, la production de pièges extracellulaires (ETs) par les neutrophiles a été impactée par ce traitement avec une diminution de cette activité. Découverts il y a 20 ans (Brinkmann et al. 2004), les ETs sont principalement composés de chromatine, d'histones et de diverses protéines telles que la MPO et l'élastase. En plus de leur fonction antimicrobienne, ils aident l'organisme à éliminer de nombreux pathogènes comme les bactéries (Brinkmann et al. 2004) car ils agissent comme une barrière physique qui empêche leur propagation. Le rôle bénéfique des ETs pendant l'infection a été clairement démontré dans la littérature : une déficience dans la production de ETs (Bianchi et al. 2009) ou la destruction des NETs par les DNases entraîne une sensibilité accrue à l'infection (Meng et al. 2012). Néanmoins, des études ont montré que la dérégulation de leur formation peut conduire à des résultats délétères tels que des occlusions vasculaires, des dommages endothéliaux (Sônego et al. 2016) et des lésions tissulaires (Dale et al. 1998; O'Connell et al. 2015), notamment au cours du sepsis (Li et al. 2011).

Cette diminution de la production des ETs par un  $\beta$ 1-bloquant a également été mise en évidence en clinique : chez des patients atteints de COVID-19, l'administration d'un  $\beta$ 1-bloquant a permis de réduire la production de NETs. Elle était associée à une meilleure oxygénation, et à une diminution du nombre de jours sous ventilation mécanique (Clemente-Moragón et al. 2020). De même, cet impact des ETs sur les dysfonctions d'organes a déjà été montré dans une étude où leur production a été inhibée à l'aide du disulfirame dans un modèle de sepsis. Cette étude a conclu à une diminution des dysfonctions d'organes et à une amélioration de la survie qui pourraient s'expliquer par une réduction des effets négatifs des protéines antimicrobiennes associées, et avoir des effets bénéfiques sur la coagulation intravasculaire ou la perfusion microvasculaire (McDonald et al. 2017). Des études récentes ont suggéré que la présence accrue de ETs pourrait contribuer à l'induction de l'inflammation chronique, jouant ainsi un rôle dans la



progression de diverses maladies, y compris les dysfonctions d'organes (Klopf et al. 2021). Elle pourrait également contribuer à la réponse inflammatoire exacerbée, entraînant des dommages tissulaires et des altérations fonctionnelles. De même, dans des troubles systémiques tels que les maladies auto-immunes, les ETs pourraient agir comme des déclencheurs de cascades inflammatoires qui seraient capables d'affecter la fonction normale des organes (Klopf et al. 2021). Cependant, la découverte de ces ETs est encore récente et les mécanismes complexes par lesquels passent leurs effets sur le développement des pathologies ne sont que partiellement connus et restent à étudier.

Il existe d'ailleurs deux principaux types de ETs : vitaux et suicidaires. Leurs différences fondamentales résident dans la nature des stimuli incitatifs et dans le moment de la libération de l'ET. La formation de ETs suicidaires a été principalement démontrée dans le cadre d'une stimulation chimique telle que celle par la PMA (Phorbol 12-myristate 13-acétate) et nécessite plusieurs heures. En revanche, la formation de ETs vitaux est réalisée beaucoup plus rapidement. Elle a été mise en évidence dans des modèles moléculaires microbiens, en particulier après l'administration de LPS (Comim et al. 2011). Ainsi, l'analyse de la formation de ETs dans nos études a été limitée à la forme vitale avec l'expression de marqueurs spécifiques sur des cellules vivantes aux membranes intactes.

Afin de confirmer que les effets positifs des  $\beta$ 1-bloquants passent par la modulation de la production de ETs, nous avons par la suite utilisé une approche ciblée en évaluant les conséquences de ces ETs sur la fonction neuromusculaire, qui est une approche indirecte de l'étude du SNC. Afin d'étudier cette fonction, nous disposons au laboratoire d'une technique non invasive basée sur la stimulation magnétique transcrânienne (TMS) : une bobine délivre un champ magnétique qui se change en champ électrique et induit une dépolarisation des motoneurones, si le champ magnétique est assez puissant pour le permettre. Lorsque le signal nerveux atteint le muscle cible, une contraction involontaire du muscle se produit, appelée potentiel évoqué moteur (PEM) qui peut être enregistrée par des méthodes électrophysiologiques.

## 2. IMPLICATION DES ETs DANS LES DYSFONCTIONS DU SYSTÈME NEUROMUSCULAIRE AU COURS DU SEPSIS (ARTICLES 2 ET 3)

---

Au cours du sepsis, le SNC est peu étudié alors que paradoxalement, il est fortement impacté avec une neuro-inflammation associée à diverses altérations de ses fonctions, comme des troubles neuromusculaires. De plus, le SNC joue un rôle crucial dans la régulation de la réponse immunitaire, les signaux neuronaux pouvant moduler l'activité des cellules immunitaires et influencer la gravité de l'inflammation.

Dans notre modèle de choc endotoxinique, nous avons mis en évidence que les neutrophiles infiltrent la moelle épinière, et que ce phénomène est associé à une perméabilité de la BHE et à la formation de NETs. Mais cette production n'est pas limitée aux seuls neutrophiles. En effet, la microglie est activée et forme également des pièges extracellulaires (MiETs), ce qui n'avait encore jamais été montré dans un modèle préclinique de sepsis. La première démonstration de l'existence des MiETs est très récente et a été faite après infection à la *Listeria in vivo* (Wang et al., 2019), ou *in vitro* après stimulation à la dopamine (Agrawal et al., 2021). Tout comme dans le sang ou le cœur, cette production de ETs est diminuée par l'administration d'aténolol, ce qui confirme le rôle immunomodulateur de ce  $\beta$ 1-bloquant dans le SNC, comme mis en évidence précédemment au niveau systémique. Cet effet d'un  $\beta$ 1-bloquant sur la production de ETs n'avait jamais été prouvé dans le SNC. En revanche, l'intérêt de l'administration de ce type de traitement l'était. Comme nous l'avons montré en systémique avec les cytokines pro-inflammatoires, une étude a mis en évidence que l'esmolol permet de diminuer l'inflammation dans le cerveau et de limiter les troubles cognitifs dans un modèle de choc endotoxinique (Y. Li et al. 2023).

Cette diminution de la production de ETs par les  $\beta$ 1-bloquants pourrait être due à une modulation soit du nombre de cellules immunitaires infiltrées, soit du nombre de récepteurs  $\beta$ 1-adrénergiques exprimés par ces cellules immunitaires. La première hypothèse n'est pas confirmée car le pourcentage de neutrophiles ou de microglie parmi les cellules CD45 positives était similaire entre les groupes LPS et LPS + aténolol. Concernant le nombre de récepteurs  $\beta$ 1-adrénergiques présents sur les cellules immunitaires, leur expression à leur surface a été débattue. Les récepteurs

$\beta$ 1-adrénergiques, traditionnellement associés au système cardiovasculaire, ont été identifiés relativement récemment sur diverses populations cellulaires du système immunitaire, y compris les neutrophiles. Cela a permis d'élargir notre compréhension des interactions entre le système nerveux et le système immunitaire (Clemente-Moragón et al. 2020; Yousefi et al. 2019). Nos résultats ont pu confirmer la présence de ces récepteurs à la surface des neutrophiles et de la microglie, mais ont également montré une augmentation de leur nombre sur ces types cellulaires dans un modèle de choc endotoxinique. Cette hausse a probablement pour conséquence une augmentation de l'impact de la stimulation adrénérigique lors du sepsis.

La fonction neuromusculaire étant l'un des composants du SNC affectés au cours du sepsis, nous l'avons étudiée pour évaluer les conséquences des ETs sur le SNC. Nous avons montré que notre modèle de choc endotoxinique reproduit les dysfonctions neuromusculaires grâce à l'étude de l'amplitude des PEMs qui est le reflet de l'excitabilité des motoneurones. Ces conséquences peuvent être limitées par la diminution de la production des ETs grâce à l'administration d'aténolol ou d'un inhibiteur spécifique de leur production, le sivelestat. Celui-ci permet d'inhiber spécifiquement l'élastase nécessaire à la formation des ETs, car elle agit sur les histones afin de décondenser l'ADN (Papayannopoulos et al. 2010). Ce lien entre les ETs et la fonction neuromusculaire a été démontré dans d'autres pathologies, telles que les lésions de la moelle épinière, lors de l'administration de différents inhibiteurs des ETs. Une amélioration de la fonction motrice, mesurée par le score du test de Basso, Beattie et Bresnahan (BBB Score), a été observée après administration de Cl-amidine, qui inhibe l'enzyme peptidylarginine déiminase 4 (PAD4) impliquée dans la citrullination des histones (Feng et al. 2021). Cette amélioration a également été observée dans une autre étude ne mentionnant pas les ETs, mais utilisant le sivelestat, avec la mesure de l'amplitude des PEM et du BBB Score (Kumar et al. 2018). Dans le sepsis, une étude a montré des effets positifs sur la fonction neuromusculaire suite à l'administration d'ulinastatine, un inhibiteur des protéases à sérine dont l'élastase, qui permettait potentiellement d'inhiber la production de ETs (Xie et al. 2017).

Cependant, nous ne savons pas par quels mécanismes les  $\beta$ 1-bloquants inhibent la production des ETs. Une hypothèse pourrait être un effet indirect des  $\beta$ 1-bloquants sur la production des ETs grâce à la modulation de la production des cytokines. En effet, nous avons montré que l'administration de  $\beta$ 1-bloquant permet de limiter la production de cytokines, connues comme étant un facteur induisant la production de ETs (Keshari et al. 2012).

Dans l'article 2, nous avons employé un modèle hyper-inflammatoire de sepsis peu représentatif du sepsis humain. Dans l'article 3, nous avons donc choisi de le comparer avec le modèle CLP (ponction et ligation caecale), un modèle moins inflammatoire, plus proche de la pathologie humaine et considéré comme le « gold standard » des modèles de sepsis, afin de confirmer le lien entre la réponse neuromusculaire et la production de ETs. Il induit bien une neuro-inflammation mesurée par la production de cytokines (IL-1 $\beta$  et IL-6) comme déjà montré dans d'autres études (Jin et al. 2021; Zhao et al. 2022), mais à un niveau plus faible que dans le modèle LPS. Pourtant, cette inflammation était suffisante pour produire des ETs. En effet, des études ont mis en évidence une production de ETs suite à l'incubation de cellules avec des cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ou IL-8), ou au contraire une réduction de la production de ces ETs suite à une préincubation avec des anticorps dirigés contre ces mêmes cytokines (Keshari et al. 2012). Cette production de ETs est retrouvée associée à la microglie, aux neutrophiles et aux monocytes présents dans la moelle épinière mais en faible proportion par rapport au modèle LPS. De plus, nous n'avons pas retrouvé d'infiltration significative de neutrophiles dans le modèle CLP comme nous avons pu l'observer dans le modèle LPS.

Suite à cette observation sur la différence de présence des neutrophiles dans les deux modèles, nous avons cherché quelle pouvait être leur influence sur la production de ETs par les autres types cellulaires. Nous avons montré que la présence des neutrophiles induit une production de ETs par la microglie et les monocytes, car nous avons mis évidence une corrélation positive entre la quantité de neutrophiles infiltrés et le pourcentage de microglie ayant produit des MiETs ( $r=0,84$ ,  $p<0,001$ ). Des travaux avaient déjà prouvé que les neutrophiles sont capables d'interagir avec la microglie, notamment suite à une injection de LPS, mais également dans d'autres modèles dans lesquels les neutrophiles infiltrés pouvaient pousser les cellules de la microglie vers un phénotype pro-inflammatoire et donc contribuer à la neuro-inflammation (Y. R. Kim et al. 2020; Neumann et al. 2018). Cependant, un possible rôle des neutrophiles dans l'induction de ETs sur d'autres types cellulaires n'avait jamais été démontré.

Toutefois, cette production d'ETs dans le modèle CLP, moindre en quantité, ne permet pas d'observer une diminution significative de l'amplitude des PEMs, et donc des dysfonctions neuromusculaires. Face à ce constat, nous avons voulu savoir s'il existait un lien entre les ETs et la

fonction neuromusculaire et nous avons montré que ce sont les MiETs qui sont responsables de la diminution de cette fonction : les animaux qui avaient une amplitude de PEMs affectée, avaient une production de MiETs significativement supérieure à celle des animaux ayant une amplitude de PEMs non affectée. La microglie étant le type cellulaire le plus abondant dans le SNC, son impact majeur sur la fonction neuromusculaire comparé aux autres types cellulaires n'est pas surprenant. Cette contribution de la microglie est connue : les études montrent qu'une activation soutenue ou chronique de la microglie peut entraîner des lésions irréversibles du SNC. En effet, une inflammation persistante dans le SNC affecte la plasticité neuronale, altère la mémoire et est généralement considérée comme un facteur typique de lésions tissulaires et de troubles neurodégénératifs (Muzio et al. 2021).

En résumé, cette étude a permis de mettre en évidence que les troubles neuromusculaires semblent majoritairement induits par les MiETs mais pas causés par l'inflammation seule, comme nous avons pu le montrer avec le sivelestat. Ces MiETs sont eux-mêmes induits par l'activation de la microglie suite à l'infiltration de neutrophiles, indiquant l'existence d'un lien indirect entre les neutrophiles et les troubles neuromusculaires.

Cette étude possède tout de même quelques limites. En effet, les PEMs gastrocnémiens (latence et amplitude) peuvent refléter au moins en partie l'état des motoneurones, la conduction nerveuse, la jonction neuromusculaire et l'état de contractilité musculaire. Les modèles de sepsis LPS et CLP étant caractérisés par une inflammation systémique, nous ne pouvons pas exclure que l'effet fonctionnel observé (réduction de l'amplitude des PEM) ne soit pas également dû en partie à une inflammation musculaire *via*, par exemple, la production de ETs par les neutrophiles, les monocytes ou les macrophages dérivés des monocytes qui infiltrent le muscle. Pour vérifier cela, un marquage des ETs dans le muscle pourrait permettre de déterminer si les effets positifs de l'inhibition de la production de ETs sont uniquement dus à une modulation dans le SNC ou également dans le muscle.

Par ailleurs, pour l'étude des NETs, nous avons utilisé une combinaison de marqueurs pour s'assurer que l'on étudiait bien ces structures. En effet, certains des marqueurs des ETs les plus couramment utilisés comme la MPO ou l'élastase, sont des enzymes présentes dans les granules que l'on va également retrouver lors de la dégranulation par exemple. C'est pourquoi nous avons fait le choix de les associer à un second marqueur comme H3 citr qui est le plus couramment

utilisé dans ce type d'études. Afin de compléter l'étude de ces ETs de notre projet, j'ai également ajouté un marqueur d'ADN non perméant, le SYTOX, qui permet de marquer l'ADN extracellulaire et donc de sélectionner uniquement des ETs. Enfin, j'ai également ajouté un marqueur d'ADN mitochondrial, TFAM, car il a été montré que l'ADN composant les NETs n'est pas seulement d'origine nucléaire et peut également provenir de la mitochondrie (Yousefi et al. 2009). Nos résultats ont permis de montrer que ces marqueurs forment une combinaison pertinente pour l'étude des ETs vitaux. Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant des combinaisons de ces marqueurs deux à deux, suggérant que tous ces marqueurs peuvent être utilisés de façon courante pour l'étude des ETs vitaux. Néanmoins, nos travaux se sont limités à l'étude des ETs vitaux, car la production de ETs suicidaires implique la lyse de la cellule, ce qui rend complexe leur étude, notamment en cytométrie en flux.

La mise en place des processus impliqués dans la réponse immunitaire n'est pas uniquement induite par un facteur d'origine infectieux comme nous l'avons étudié jusqu'à présent, mais est également induite par des facteurs dits « stériles » comme lors de pathologies auto-immunes ou lors de traumatismes. Dans ce cas, une réponse immunitaire inadaptée peut également entraîner des dommages secondaires induits par la libération prolongée de substances pro-inflammatoires et néfastes pour la récupération. Les cellules immunitaires peuvent libérer des radicaux libres, des enzymes destructrices de la cellule et des médiateurs inflammatoires qui peuvent endommager les cellules nerveuses saines et aggraver la lésion. Afin de mieux caractériser cette réponse, nous avons par la suite centré nos recherches sur un modèle de lésion de la moelle épinière, afin de déterminer si les mêmes mécanismes sont mis en jeu dans une inflammation d'origine traumatique ou d'origine infectieuse, et notamment en ce qui concerne la production de ETs. En effet, l'implication des ETs dans le développement de pathologies ne se limite pas au sepsis : on les retrouve dans de nombreux autres types de pathologies non infectieuses comme lors de pathologies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose (An et al. 2019) ou les thromboses (S.-W. Kim et al. 2020), d'anévrisme (Meher et al. 2018), de maladies auto-immunes (comme la polyarthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn) (Mutua et al. 2021), ou encore lors de pathologies métaboliques comme le diabète de type 2 (Joshi et al. 2016).

### 3. PRODUCTION DE ETs DANS UN MODÈLE D'INFLAMMATION D'ORIGINE TRAUMATIQUE (ARTICLE 4)

---

Afin d'étudier l'inflammation résultant d'un traumatisme, nous avons utilisé un modèle d'hémisection de la moelle épinière au niveau du segment cervical C2. Celle-ci induit une réponse immunitaire impliquant entre autres les neutrophiles et la microglie (Bradbury et al. 2019; Hawthorne et al. 2011). L'identification des MiETs n'a jamais été démontrée suite à un traumatisme spinal. La première démonstration de l'existence *in vivo* de MiETs a été faite dans un modèle d'infection à la *Listeria* (Wang et al., 2019) ou *in vitro* après stimulation à la dopamine (Agrawal et al., 2021).

Nous avons observé une production de NETs chez les animaux ayant subi la lésion, comparés aux animaux sham ayant subi une durotomie, c'est-à-dire la même procédure chirurgicale mais sans aller jusqu'à la lésion spinale. Cela nous a permis de confirmer que ce sont bien les dommages résultant de la lésion de la moelle épinière qui induisent la production de ces NETs, et non pas la procédure chirurgicale nécessitant une durotomie pour accéder à la moelle épinière. Cependant, la procédure sham a induit une légère production de NETs, comparée aux animaux n'ayant subi aucune procédure. Ce résultat est en corrélation avec d'autres études ayant montré la formation de NETs dans un modèle murin de durotomie (Jin et al. 2020). Récemment, la présence de ETs a été observée dans la moelle épinière de rats suite à une compression thoracique (Feng et al. 2021) mais sans identification claire du type cellulaire produisant ces pièges. En effet, les cellules positives à la MPO peuvent être exprimées non seulement par les neutrophiles comme suggéré dans cette publication, mais aussi par d'autres types de cellules comme la microglie (Agrawal et al. 2021), les macrophages (Boe et al. 2015; Gurski et al. 2022) et les monocytes (Gurski et al. 2022).

Concernant la microglie, la lésion de la moelle épinière induit une production de MiETs comparée aux animaux ayant subi la procédure sham. Comme pour les NETs, la procédure sham induit également une légère production de MiETs comparée aux animaux contrôles, mais en moindre mesure. Cependant, il s'agit de la première étude faisant état de la formation de MiETs dans la moelle épinière après ce type de procédure. Ce phénomène devrait être davantage étudié,



notamment dans le cas d'opération de la moelle épinière, car l'apparition de ce processus neuro-inflammatoire peut entraîner des déficits neurologiques tardifs.

Nos analyses par immunomarquages ont confirmé une infiltration de neutrophiles sur le site de la lésion, et une production de MiETs et de NETs majoritairement autour de la lésion. Ces résultats concordent avec ceux de la littérature, puisque cette accumulation de neutrophiles proches du site lésionnel ainsi que la production de NETs à l'épicentre de la lésion ont déjà été observées (Bradbury et al. 2019; Feng et al. 2021), contrairement à la présence de MiETs.

Ce projet a permis de mettre en évidence une production de NETs et de MiETs un jour après une hémisection en C2, ce qui n'avait été mis en évidence dans ce modèle. Comme observée dans nos études sur le sepsis, cette production de ETs semble également délétère. Plusieurs études vont dans ce sens : des travaux ont montré que l'inhibition de la production de ETs par le sivelestat a des effets bénéfiques suite à une lésion, mais sans mentionner clairement les ETs (Kumar et al., 2018). Dans une autre étude, leur inhibition a conduit à une certaine récupération fonctionnelle (amélioration du BBB score et de l'amplitude des PEMs) chez les rats, ainsi qu'à une réduction des processus neuro-inflammatoires comme la cicatrice gliale, ce qui suggère un rôle néfaste des ETs après une lésion de la moelle épinière (Feng et al., 2021). Enfin, il a aussi été mis en évidence que les NETs exacerbent les déficits neurologiques dans un modèle préclinique de lésion cérébrale traumatique (Vaibhav et al. 2020). Il serait donc pertinent d'entreprendre une analyse cinétique de l'expression des ETs afin de compléter nos travaux car si la microglie réagit dans les minutes suivant le traumatisme, la présence de macrophages différenciés sur le site n'est effective qu'une semaine après la lésion. D'autre part, il serait essentiel d'examiner l'expression de ces pièges par les monocytes inflammatoires et/ou les macrophages présents sur le site de la lésion. Parallèlement, l'étude de l'expression des ETs au niveau des motoneurones permettrait de mettre en lumière leur éventuel rôle dans les processus inflammatoires ou de plasticité, ouvrant ainsi la voie à de nouvelles perspectives thérapeutiques.

Au cours de nos différentes études, nous avons montré non seulement un effet positif de l'aténolol sur différentes fonctions d'organes, dont le système nerveux, *via* la modulation des ETs dans un modèle infectieux, mais également des similitudes entre les deux modèles, infectieux et traumatique, concernant la réponse immunitaire et notamment la production de ETs. Dans le

modèle d'inflammation traumatique de la moelle épinière, nous aurions donc pu moduler l'inflammation à l'aide d'un  $\beta$ 1-bloquant pour étudier son effet sur la récupération fonctionnelle. Cependant, nous avons choisi une autre approche qui est déjà utilisée en clinique en tant que traitement thérapeutique non invasif de plusieurs pathologies liées à une neuro-inflammation, comme les douleurs neuropathiques chroniques : il s'agit de la stimulation magnétique transcrânienne répétée (rTMS), une utilisation particulière de la TMS, qui dans ce cas permet de neuro-moduler l'excitabilité des motoneurones . Ainsi, la rTMS pourrait être une piste de traitement pour moduler la neuro-inflammation afin d'améliorer la récupération fonctionnelle après lésion.

#### 4. EFFET DE L'APPLICATION D'UN PROTOCOLE DE rTMS SUR LA RÉCUPÉRATION NEURORESPIRATOIRE (ARTICLE 5)

---

Les lésions médullaires hautes entraînent une paralysie diaphragmatique permanente. Dans un modèle de lésion spinale incomplète en C2, nous avons appliqué un protocole de traitement chronique dans l'objectif de moduler la neuro-inflammation induite par le traumatisme initial et de mesurer son potentiel effet thérapeutique sur la récupération fonctionnelle au niveau du diaphragme paralysé. Mon travail sur ce projet s'étant limité à l'étude de la neuro-inflammation, je ne discuterai donc pas de la partie concernant son effet fonctionnel sur l'organe neurorespiratoire.

Ce type de lésion est connu pour entraîner une neuro-inflammation avec une infiltration de cellules immunitaires et une activation de la microglie présente (Donnelly et al. 2008) qui, à long terme, peut être néfaste pour la récupération fonctionnelle. Nous avons donc testé l'effet d'un protocole de rTMS à haute fréquence sur différents acteurs de la réponse neuro-inflammatoire en réponse à la lésion initiale en cervical chez le rat. Le protocole de rTMS appliqué après une hémisection en C2 a permis d'induire une réduction de l'inflammation : une diminution du nombre de macrophages, de monocytes et de granulocytes présents dans la zone de la lésion (marqués à l'aide du CD68) ainsi qu'une diminution de la surface occupée par la microglie (marquage Iba1) ont été observées.

Cette diminution de l'inflammation était associée à une possible augmentation du potentiel régénératif des axones lésés du fait de l'observation d'une augmentation du marquage GAP-43 (dans la zone des motoneurones phréniques). En effet, la « growth-associated protein-43 » (GAP-43) est une molécule impliquée dans la croissance axonale durant le développement, ainsi que dans les processus de neuroplasticité dans le système nerveux central mature (Skene and Willard, 1981). Elle est synthétisée au niveau du corps cellulaire des neurones, puis elle est transportée à la membrane des cônes de croissance axonaux et à la membrane cytoplasmique le long de l'axone. GAP-43 permet la repousse axonale *via* ses interactions avec les protéines du cytosquelette (Oestreicher et al., 1997). Il a ainsi été montré que, du côté lésé, le niveau d'expression de l'ARNm de GAP-43 est augmenté dans les neurones rubrospinaux après axotomie

(Tetzlaff et al., 1991). Son expression protéique est aussi augmentée autour des motoneurones phréniques après lésion chez le rat (Vinit et al., 2009). La rTMS pourrait donc accélérer la régénération axonale et permettre une récupération fonctionnelle efficace au niveau du réseau neurorespiratoire.

D'autres études ont montré elles aussi une réduction du marquage des astrocytes (GFAP) et de la microglie (Iba1), corrélée à une augmentation de la plasticité neuronale après un protocole de rTMS. Ces résultats confirment son potentiel thérapeutique suite à une lésion de la moelle épinière (Chalfouh et al. 2020; Robac et al. 2021). Notre protocole a également permis d'induire une certaine récupération fonctionnelle avec une amélioration de la capacité de l'hémi-diaphragme sain à compenser la perte d'activité de celui impacté par la lésion initiale. Notre protocole accélérerait donc le processus de récupération fonctionnelle grâce à une augmentation du nombre de cônes de croissance axonaux (fibres positives GAP-43) possiblement facilitée par une modulation de l'inflammation, modulation qui permettrait un environnement post-traumatique intraspinal plus favorable à la plasticité axonale.

Cependant, les mécanismes expliquant les voies de signalisation impactées par la rTMS pour moduler l'inflammation restent à explorer afin de comprendre son impact dans le traitement de la neuro-inflammation.

## 5. CONCLUSION

---

Durant ma thèse, j'ai pu mettre en évidence des processus communs de la réponse immunitaire au cours d'une inflammation d'origine infectieuse ou traumatique, notamment la production de ETs. Néanmoins, lors d'un traumatisme, leur production se restreint au site endommagé, tandis qu'elle se généralise au reste de l'organisme lors du sepsis. J'ai également montré que ces ETs produits dans des modèles précliniques de sepsis entraînent des dysfonctions neuromusculaires. Ces effets indésirables peuvent être atténués par l'administration d'un inhibiteur spécifique de la production de ETs ou par une modulation spécifique du système adrénergique, ce qui a pour conséquence de réduire les dysfonctions d'organes et d'améliorer la survie.

Cette piste thérapeutique semble prometteuse et pourrait être envisagée afin d'améliorer la prise en charge du sepsis ou toute autre pathologie faisant intervenir les pièges extracellulaires dans son développement.

## RÉFÉRENCES

---

- Abbott, N. Joan, Adjanie A. K. Patabendige, Diana E. M. Dolman, Siti R. Yusof, et David J. Begley. 2010. « Structure and function of the blood–brain barrier ». *Neurobiology of Disease* 37(1):13-25. doi: 10.1016/j.nbd.2009.07.030.
- Ackland, Gareth L., Song T. Yao, Alain Rudiger, Alex Dyson, Ray Stidwill, Dmitry Poputnikov, Mervyn Singer, et Alexander V. Gourine. 2010. « Cardioprotection, Attenuated Systemic Inflammation, and Survival Benefit of Beta1-Adrenoceptor Blockade in Severe Sepsis in Rats ». *Critical Care Medicine* 38(2):388-94. doi: 10.1097/CCM.0b013e3181c03dfa.
- Adams, Katrina L., et Vittorio Gallo. 2018. « The Diversity and Disparity of the Glial Scar ». *Nature Neuroscience* 21(1):9-15. doi: 10.1038/s41593-017-0033-9.
- Adib-Conquy, Minou, et Jean-Marc Cavaillon. 2009. « Compensatory Anti-Inflammatory Response Syndrome ». *Thrombosis and Haemostasis* 101(01):36-47. doi: 10.1160/TH08-07-0421.
- Aftanas, L. I., M. M. Gevorgyan, S. Ya Zhanaeva, S. S. Dzemidovich, K. I. Kulikova, E. L. Al'perina, K. V. Danilenko, et G. V. Idova. 2018. « Therapeutic Effects of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation (rTMS) on Neuroinflammation and Neuroplasticity in Patients with Parkinson's Disease: A Placebo-Controlled Study ». *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 165(2):195-99. doi: 10.1007/s10517-018-4128-4.
- Agrawal, Ishan, Nidhi Sharma, Shivanjali Saxena, S. Arvind, Debayani Chakraborty, Debarati Bhunia Chakraborty, Deepak Jha, Surajit Ghatak, Sridhar Epari, Tejpal Gupta, et Sushmita Jha. 2021. « Dopamine induces functional extracellular traps in microglia ». *iScience* 24(1):101968. doi: 10.1016/j.isci.2020.101968.
- Ahmed, Najma A., Sandra McGill, John Yee, Fu Hu, René P. Michel, et Nicolas V. Christou. 1999. « Mechanisms for the diminished neutrophil exudation to secondary inflammatory sites in infected patients with a systemic inflammatory response (sepsis) ». *Critical Care Medicine* 27(11):2459.
- Ahuja, Christopher S., Jefferson R. Wilson, Satoshi Nori, Mark R. N. Kotter, Claudia Druschel, Armin Curt, et Michael G. Fehlings. 2017. « Traumatic Spinal Cord Injury ». *Nature Reviews Disease Primers* 3(1):1-21. doi: 10.1038/nrdp.2017.18.
- Akira, Shizuo, Satoshi Uematsu, et Osamu Takeuchi. 2006. « Pathogen Recognition and Innate Immunity ». *Cell* 124(4):783-801. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.015.
- Akuzawa, Satoshi, Teruhisa Kazui, Enyi Shi, Katsushi Yamashita, Abul Hasan Muhammad Bashar, et Hitoshi Terada. 2008. « Interleukin-1 Receptor Antagonist Attenuates the Severity of Spinal Cord Ischemic Injury in Rabbits ». *Journal of Vascular Surgery* 48(3):694-700. doi: 10.1016/j.jvs.2008.04.011.
- Alexander, H. R., G. M. Doherty, D. J. Venzon, M. J. Merino, D. L. Fraker, et J. A. Norton. 1992. « Recombinant Interleukin-1 Receptor Antagonist (IL-1ra): Effective Therapy against Gram-Negative Sepsis in Rats ». *Surgery* 112(2):188-93; discussion 193-194.
- Alizadeh, Arsalan, Scott Matthew Dyck, et Soheila Karimi-Abdolrezaee. 2019. « Traumatic Spinal Cord Injury: An Overview of Pathophysiology, Models and Acute Injury Mechanisms ».



- Frontiers in Neurology* 10:282. doi: 10.3389/fneur.2019.00282.
- Aloisi, F. 2001. « Immune Function of Microglia ». *Glia* 36(2):165-79. doi: 10.1002/glia.1106.
- An, Zhujun, Jiawen Li, Jiangbo Yu, Xiaoli Wang, Hailai Gao, Wei Zhang, Zeren Wei, Jianchun Zhang, Yinli Zhang, Jiye Zhao, et Xiao Liang. 2019. « Neutrophil Extracellular Traps Induced by IL-8 Aggravate Atherosclerosis via Activation NF- $\kappa$ B Signaling in Macrophages ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 18(21):2928-38. doi: 10.1080/15384101.2019.1662678.
- Angus, Derek C., et Tom van der Poll. 2013. « Severe Sepsis and Septic Shock ». *New England Journal of Medicine* 369(9):840-51. doi: 10.1056/NEJMra1208623.
- Annane, Djillali, Eric Bellissant, Pierre Edouard Bollaert, Josef Briegel, Didier Keh, Yizhak Kupfer, Romain Pirracchio, et Bram Rochweg. 2019. « Corticosteroids for Treating Sepsis in Children and Adults ». *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 12(12):CD002243. doi: 10.1002/14651858.CD002243.pub4.
- Annane, Djillali, et Tarek Sharshar. 2015. « Cognitive Decline after Sepsis ». *The Lancet. Respiratory Medicine* 3(1):61-69. doi: 10.1016/S2213-2600(14)70246-2.
- Anon. s. d. « Sepsis ». Consulté 29 décembre 2022 (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sepsis>).
- Appelgren, Daniel, Helena Enocsson, Barbro H. Skogman, Marika Nordberg, Linda Perander, Dag Nyman, Clara Nyberg, Jasmin Knopf, Luis E. Muñoz, Christopher Sjöwall, et Johanna Sjöwall. 2019. « Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in the Cerebrospinal Fluid Samples from Children and Adults with Central Nervous System Infections ». *Cells* 9(1):43. doi: 10.3390/cells9010043.
- Armao, D., M. Kornfeld, E. Y. Estrada, M. Grossetete, et G. A. Rosenberg. 1997. « Neutral Proteases and Disruption of the Blood-Brain Barrier in Rat ». *Brain Research* 767(2):259-64. doi: 10.1016/s0006-8993(97)00567-2.
- Aronson, D., et A. J. Burger. 2001. « Effect of Beta-Blockade on Heart Rate Variability in Decompensated Heart Failure ». *International Journal of Cardiology* 79(1):31-39. doi: 10.1016/s0167-5273(01)00401-6.
- Arora, Shweta, Kapil Dev, Beamon Agarwal, Pragnya Das, et Mansoor Ali Syed. 2018. « Macrophages: Their Role, Activation and Polarization in Pulmonary Diseases ». *Immunobiology* 223(4):383-96. doi: 10.1016/j.imbio.2017.11.001.
- Atri, Chiraz, Fatma Z. Guerfali, et Dhafer Laouini. 2018. « Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases ». *International Journal of Molecular Sciences* 19(6):1801. doi: 10.3390/ijms19061801.
- Azevedo, Estefania P. C., Anderson B. Guimarães-Costa, Guilherme S. Torezani, Carolina A. Braga, Fernando L. Palhano, Jeffery W. Kelly, Elvira M. Saraiva, et Debora Foguel. 2012. « Amyloid Fibrils Trigger the Release of Neutrophil Extracellular Traps (NETs), Causing Fibril Fragmentation by NET-Associated Elastase ». *The Journal of Biological Chemistry*

287(44):37206-18. doi: 10.1074/jbc.M112.369942.

- Bagshaw, Sean M., Stephen Lapinsky, Sandra Dial, Yaseen Arabi, Peter Dodek, Gordon Wood, Paul Ellis, Jorge Guzman, John Marshall, Joseph E. Parrillo, Yoanna Skrobik, Anand Kumar, et Cooperative Antimicrobial Therapy of Septic Shock (CATSS) Database Research Group. 2009. « Acute Kidney Injury in Septic Shock: Clinical Outcomes and Impact of Duration of Hypotension Prior to Initiation of Antimicrobial Therapy ». *Intensive Care Medicine* 35(5):871-81. doi: 10.1007/s00134-008-1367-2.
- Baik, Sung Hoon, Moon-Yong Cha, Young-Min Hyun, Hansang Cho, Bashar Hamza, Dong Kyu Kim, Sun-Ho Han, Heesun Choi, Kyung Ho Kim, Minho Moon, Jeewoo Lee, Minsoo Kim, Daniel Irimia, et Inhee Mook-Jung. 2014. « Migration of neutrophils targeting amyloid plaques in Alzheimer's disease mouse model ». *Neurobiology of aging* 35(6):1286-92. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.01.003.
- Bajaj, M. S., M. Ghosh, et S. P. Bajaj. 2007. « Fibronectin-Adherent Monocytes Express Tissue Factor and Tissue Factor Pathway Inhibitor Whereas Endotoxin-Stimulated Monocytes Primarily Express Tissue Factor: Physiologic and Pathologic Implications ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 5(7):1493-99. doi: 10.1111/j.1538-7836.2007.02604.x.
- Ballabh, Praveen, Alex Braun, et Maiken Nedergaard. 2004. « The Blood-Brain Barrier: An Overview: Structure, Regulation, and Clinical Implications ». *Neurobiology of Disease* 16(1):1-13. doi: 10.1016/j.nbd.2003.12.016.
- Banati, R. B., J. Gehrmann, P. Schubert, et G. W. Kreutzberg. 1993. « Cytotoxicity of Microglia ». *Glia* 7(1):111-18. doi: 10.1002/glia.440070117.
- Bao, Zheng, Li Bao, Na Han, Yueyun Hou, et Fumin Feng. 2021. « rTMS alleviates AD-induced cognitive impairment by inhibiting apoptosis in SAMP8 mouse ». *Aging (Albany NY)* 13(24):26034-45. doi: 10.18632/aging.203796.
- Barki-Harrington, Liza, Cinzia Perrino, et Howard A. Rockman. 2004. « Network Integration of the Adrenergic System in Cardiac Hypertrophy ». *Cardiovascular Research* 63(3):391-402. doi: 10.1016/j.cardiores.2004.03.011.
- Barrett, Lucinda K., Mervyn Singer, et Lucie H. Clapp. 2007. « Vasopressin: Mechanisms of Action on the Vasculature in Health and in Septic Shock ». *Critical Care Medicine* 35(1):33-40. doi: 10.1097/01.CCM.0000251127.45385.CD.
- Bauer, Michael, Herwig Gerlach, Tobias Vogelmann, Franziska Preissing, Julia Stiefel, et Daniel Adam. 2020. « Mortality in sepsis and septic shock in Europe, North America and Australia between 2009 and 2019— results from a systematic review and meta-analysis ». *Critical Care* 24(1):239. doi: 10.1186/s13054-020-02950-2.
- Bedet, Alexandre, Guillaume Voiriot, Julien Ternacle, Elisabeth Marcos, Serge Adnot, Geneviève Derumeaux, et Armand Mekontso Dessap. 2020. « Heart Rate Control during Experimental Sepsis in Mice: Comparison of Ivabradine and  $\beta$ -Blockers ». *Anesthesiology* 132(2):321-29. doi: 10.1097/ALN.0000000000003045.

- Beladi, Roxana N., Kyle S. Varkoly, Lauren Schutz, Liqiang Zhang, Jordan R. Yaron, Qiuyun Guo, Michelle Burgin, Ian Hogue, Wesley Tierney, Wojciech Dobrowski, et Alexandra R. Lucas. 2021. « Serine Proteases and Chemokines in Neurotrauma: New Targets for Immune Modulating Therapeutics in Spinal Cord Injury ». *Current Neuropharmacology* 19(11):1835-54. doi: 10.2174/1570159X19666210225154835.
- Bellani, Giacomo, John G. Laffey, Tàì Pham, Eddy Fan, Laurent Brochard, Andres Esteban, Luciano Gattinoni, Frank van Haren, Anders Larsson, Daniel F. McAuley, Marco Ranieri, Gordon Rubinfeld, B. Taylor Thompson, Hermann Wrigge, Arthur S. Slutsky, Antonio Pesenti, LUNG SAFE Investigators, et ESICM Trials Group. 2016. « Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries ». *JAMA* 315(8):788-800. doi: 10.1001/jama.2016.0291.
- Bellomo, Rinaldo, John A. Kellum, Claudio Ronco, Ron Wald, Johan Martensson, Matthew Maiden, Sean M. Bagshaw, Neil J. Glassford, Yugeesh Lankadeva, Suvi T. Vaara, et Antoine Schneider. 2017. « Acute Kidney Injury in Sepsis ». *Intensive Care Medicine* 43(6):816-28. doi: 10.1007/s00134-017-4755-7.
- Bennike, Tue Bjerg, Thomas Gelsing Carlsen, Torkell Ellingsen, Ole Kristian Bonderup, Henning Glerup, Martin Bøggsted, Gunna Christiansen, Svend Birkelund, Allan Stensballe, et Vibeke Andersen. 2015. « Neutrophil Extracellular Traps in Ulcerative Colitis: A Proteome Analysis of Intestinal Biopsies ». *Inflammatory Bowel Diseases* 21(9):2052-67. doi: 10.1097/MIB.0000000000000460.
- Benveniste, E. N. 1997. « Role of Macrophages/Microglia in Multiple Sclerosis and Experimental Allergic Encephalomyelitis ». *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 75(3):165-73. doi: 10.1007/s001090050101.
- van den Berghe, G., P. Wouters, F. Weekers, C. Verwaest, F. Bruyninckx, M. Schetz, D. Vlasselaers, P. Ferdinande, P. Lauwers, et R. Bouillon. 2001. « Intensive Insulin Therapy in Critically Ill Patients ». *The New England Journal of Medicine* 345(19):1359-67. doi: 10.1056/NEJMoa011300.
- Berk, J. L., J. F. Hagen, W. H. Beyer, M. J. Gerber, et G. R. Dochat. 1969. « The Treatment of Endotoxin Shock by Beta Adrenergic Blockade ». *Annals of Surgery* 169(1):74-81. doi: 10.1097/00000658-196901000-00007.
- Berk, J. L., J. F. Hagen, G. Maly, et R. Koo. 1972. « The Treatment of Shock with Beta Adrenergic Blockade ». *Archives of Surgery (Chicago, Ill.: 1960)* 104(1):46-51. doi: 10.1001/archsurg.1972.04180010040011.
- Bernstein, Daniel, Giovanni Fajardo, et Mingming Zhao. 2011. « THE ROLE OF  $\beta$ -ADRENERGIC RECEPTORS IN HEART FAILURE: DIFFERENTIAL REGULATION OF CARDIOTOXICITY AND CARDIOPROTECTION ». *Progress in pediatric cardiology* 31(1):35-38. doi: 10.1016/j.ppedcard.2010.11.007.
- Berthoud, H. R., et W. L. Neuhuber. 2000. « Functional and Chemical Anatomy of the Afferent Vagal System ». *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical* 85(1-3):1-17. doi: 10.1016/S1566-0702(00)00215-0.

- Beutler, B., et A. Poltorak. 2001. « Sepsis and Evolution of the Innate Immune Response ». *Critical Care Medicine* 29(7 Suppl):S2-6; discussion S6-7. doi: 10.1097/00003246-200107001-00002.
- Bianchi, Matteo, Abdul Hakkim, Volker Brinkmann, Ulrich Siler, Reinhard A. Seger, Arturo Zychlinsky, et Janine Reichenbach. 2009. « Restoration of NET Formation by Gene Therapy in CGD Controls Aspergillosis ». *Blood* 114(13):2619-22. doi: 10.1182/blood-2009-05-221606.
- Biet, Franck, Camille Loch, et Laurent Kremer. 2002. « Immunoregulatory Functions of Interleukin 18 and Its Role in Defense against Bacterial Pathogens ». *Journal of Molecular Medicine* 80(3):147-62. doi: 10.1007/s00109-001-0307-1.
- Biron, Bethany M., Chun-Shiang Chung, Xian M. O'Brien, Yaping Chen, Jonathan S. Reichner, et Alfred Ayala. 2017. « CI-Amidine Prevents Histone 3 Citrullination and Neutrophil Extracellular Trap Formation, and Improves Survival in a Murine Sepsis Model ». *Journal of Innate Immunity* 9(1):22-32. doi: 10.1159/000448808.
- Boato, Francesco, Karen Rosenberger, Sofie Nelissen, Lies Geboes, Eva M. Peters, Robert Nitsch, et Sven Hendrix. 2013. « Absence of IL-1 $\beta$  Positively Affects Neurological Outcome, Lesion Development and Axonal Plasticity after Spinal Cord Injury ». *Journal of Neuroinflammation* 10:6. doi: 10.1186/1742-2094-10-6.
- Boe, Devin M., Brenda J. Curtis, Michael M. Chen, Jill A. Ippolito, et Elizabeth J. Kovacs. 2015. « Extracellular Traps and Macrophages: New Roles for the Versatile Phagocyte ». *Journal of Leukocyte Biology* 97(6):1023-35. doi: 10.1189/jlb.4RI1014-521R.
- Bombeli, T., B. R. Schwartz, et J. M. Harlan. 1998. « Adhesion of Activated Platelets to Endothelial Cells: Evidence for a GPIIb/IIIa-Dependent Bridging Mechanism and Novel Roles for Endothelial Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1), Alpha $\nu$ beta3 Integrin, and GPIIb/IIIa ». *The Journal of Experimental Medicine* 187(3):329-39. doi: 10.1084/jem.187.3.329.
- Bonaz, Bruno, Valérie Sinniger, et Sonia Pellissier. 2016. « Anti-inflammatory properties of the vagus nerve: potential therapeutic implications of vagus nerve stimulation ». *The Journal of Physiology* 594(20):5781-90. doi: 10.1113/JP271539.
- Bone, Roger C., Robert A. Balk, Frank B. Cerra, R. Phillip Dellinger, Alan M. Fein, William A. Knaus, Roland M. H. Schein, et William J. Sibbald. 1992. « Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis ». *Chest* 101(6):1644-55. doi: 10.1378/chest.101.6.1644.
- Boomer, Jonathan S., Jonathan M. Green, et Richard S. Hotchkiss. 2014. « The changing immune system in sepsis ». *Virulence* 5(1):45-56. doi: 10.4161/viru.26516.
- Boraschi, Diana, et Charles A. Dinarello. 2006. « IL-18 in Autoimmunity: Review ». *European Cytokine Network* 17(4):224-52.
- Borovikova, Lyudmila V., Svetlana Ivanova, Minghuang Zhang, Huan Yang, Galina I. Botchkina,

- Linda R. Watkins, Haichao Wang, Naji Abumrad, John W. Eaton, et Kevin J. Tracey. 2000. « Vagus Nerve Stimulation Attenuates the Systemic Inflammatory Response to Endotoxin ». *Nature* 405(6785):458-62. doi: 10.1038/35013070.
- Bozza, Fernando A., Jorge I. Salluh, André M. Japiassu, Marcio Soares, Edson F. Assis, Rachel N. Gomes, Marcelo T. Bozza, Hugo C. Castro-Faria-Neto, et Patrícia T. Bozza. 2007. « Cytokine Profiles as Markers of Disease Severity in Sepsis: A Multiplex Analysis ». *Critical Care (London, England)* 11(2):R49. doi: 10.1186/cc5783.
- Bradbury, Elizabeth J., et Emily R. Burnside. 2019. « Moving beyond the Glial Scar for Spinal Cord Repair ». *Nature Communications* 10(1):3879. doi: 10.1038/s41467-019-11707-7.
- Brady, Jack, Shahd Horie, et John G. Laffey. 2020. « Role of the Adaptive Immune Response in Sepsis ». *Intensive Care Medicine Experimental* 8(Suppl 1):20. doi: 10.1186/s40635-020-00309-z.
- Bratton, Donna L., et Peter M. Henson. 2011. « Neutrophil Clearance: When the Party Is over, Clean-up Begins ». *Trends in Immunology* 32(8):350-57. doi: 10.1016/j.it.2011.04.009.
- Breda, Cristiane Naffah de Souza, Leandro Carvalho Dantas Breda, Larissa Anastácio da Costa Carvalho, Mariane Tami Amano, Fernanda Fernandes Terra, Reinaldo Correia Silva, Matheus Garcia Fragas, Maria Fernanda Forni, Monique Thaís Costa Fonseca, Gabriela Venturini, Amanda Campelo Melo Feitosa, Bruno Ghirotto, Mario Costa Cruz, Flávia Franco Cunha, Aline Ignacio, Marcela Latância, Angela Castoldi, Vinícius Andrade-Oliveira, Eloisa Martins da Silva, Meire Ioshie Hiyane, Alexandre da Costa Pereira, William Festuccia, Flávia Carla Meotti, et Niels Olsen Saraiva Câmara. 2021. « Loss of mTORC2 Activity in Neutrophils Impairs Fusion of Granules and Affects Cellular Metabolism Favoring Increased Bacterial Burden in Sepsis ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 207(2):626-39. doi: 10.4049/jimmunol.2000573.
- Brierre, Stephen, Rekha Kumari, et Bennett P. Deboisblanc. 2004. « The Endocrine System during Sepsis ». *The American Journal of the Medical Sciences* 328(4):238-47. doi: 10.1097/00000441-200410000-00007.
- Brill, A., T. A. Fuchs, A. S. Savchenko, G. M. Thomas, K. Martinod, S. F. De Meyer, A. A. Bhandari, et Denisa D. Wagner. 2012. « Neutrophil Extracellular Traps Promote Deep Vein Thrombosis in Mice ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 10(1):136-44. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04544.x.
- Brinkmann, Volker, Ulrike Reichard, Christian Goosmann, Beatrix Fauler, Yvonne Uhlemann, David S. Weiss, Yvette Weinrauch, et Arturo Zychlinsky. 2004. « Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria ». *Science* 303(5663):1532-35. doi: 10.1126/science.1092385.
- Brodbelt, A. R., et M. A. Stoodley. 2003. « Post-traumatic syringomyelia: a review ». *Journal of Clinical Neuroscience* 10(4):401-8. doi: 10.1016/S0967-5868(02)00326-0.
- Brown, Rachael, David Celermajer, Vaughan Macefield, et Mikael Sander. 2016. « The Effect of Nitric Oxide Inhibition in Spinal Cord Injured Humans with and without Preserved Sympathetic Control of the Vasculature ». *Frontiers in Neuroscience* 10.

- Brown, Samuel M., Michael J. Lanspa, Jason P. Jones, Kathryn G. Kuttler, Yao Li, Rick Carlson, Russell R. Miller, Eliotte L. Hirshberg, Colin K. Grissom, et Alan H. Morris. 2013. « Survival after Shock Requiring High-Dose Vasopressor Therapy ». *Chest* 143(3):664-71. doi: 10.1378/chest.12-1106.
- Brun-Buisson, C., P. Meshaka, P. Pinton, B. Vallet, et EPISEPSIS Study Group. 2004. « EPISEPSIS: A Reappraisal of the Epidemiology and Outcome of Severe Sepsis in French Intensive Care Units ». *Intensive Care Medicine* 30(4):580-88. doi: 10.1007/s00134-003-2121-4.
- Bruno, Lucrezia, Simge Karagil, Almas Mahmood, Ahmed Elbediwy, Michael Stolinski, et Francesca E. Mackenzie. 2021. « Mechanosensing and the Hippo Pathway in Microglia: A Potential Link to Alzheimer's Disease Pathogenesis? » *Cells* 10(11):3144. doi: 10.3390/cells10113144.
- von Büdingen, H. C., N. Tanuma, P. Villoslada, J. C. Ouallet, S. L. Hauser, et C. P. Genain. 2001. « Immune Responses against the Myelin/Oligodendrocyte Glycoprotein in Experimental Autoimmune Demyelination ». *Journal of Clinical Immunology* 21(3):155-70. doi: 10.1023/a:1011031014433.
- Buras, Jon A., Bernhard Holzmann, et Michail Sitkovsky. 2005. « Animal Models of Sepsis: Setting the Stage ». *Nature Reviews Drug Discovery* 4(10):854-65. doi: 10.1038/nrd1854.
- Burgdorff, A. M., M. Bucher, et J. Schumann. 2018. « Vasoplegia in Patients with Sepsis and Septic Shock: Pathways and Mechanisms ». *The Journal of International Medical Research* 46(4):1303-10. doi: 10.1177/0300060517743836.
- Bylund, D. B., D. C. Eikenberg, J. P. Hieble, S. Z. Langer, R. J. Lefkowitz, K. P. Minneman, P. B. Molinoff, R. R. Ruffolo, et U. Trendelenburg. 1994. « International Union of Pharmacology Nomenclature of Adrenoceptors ». *Pharmacological Reviews* 46(2):121-36.
- Byrd, Angel S., Xian M. O'Brien, Courtney M. Johnson, Liz M. Lavigne, et Jonathan S. Reichner. 2013. « An Extracellular Matrix-Based Mechanism of Rapid Neutrophil Extracellular Trap Formation in Response to *Candida Albicans* ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 190(8):4136-48. doi: 10.4049/jimmunol.1202671.
- Cacalano, Grace, James Lee, Kristine Kikly, Ann M. Ryan, Sharon Pitts-Meek, Bruce Hultgren, William I. Wood, et Mark W. Moore. 1994. « Neutrophil and B Cell Expansion in Mice That Lack the Murine IL-8 Receptor Homolog ». *Science* 265(5172):682-84. doi: 10.1126/science.8036519.
- Cai, Zhiyou, M. Delwar Hussain, et Liang-Jun Yan. 2014. « Microglia, Neuroinflammation, and Beta-Amyloid Protein in Alzheimer's Disease ». *The International Journal of Neuroscience* 124(5):307-21. doi: 10.3109/00207454.2013.833510.
- Callahan, Leigh Ann, et Gerald S. Supinski. 2009. « Sepsis-induced myopathy ». *Critical care medicine* 37(10 0):S354-67. doi: 10.1097/CCM.0b013e3181b6e439.
- Capucetti, Arianna, Francesca Albano, et Raffaella Bonocchi. 2020. « Multiple Roles for Chemokines in Neutrophil Biology ». *Frontiers in Immunology* 11:533351. doi:

10.3389/fimmu.2020.01259.

- Carrara, Marta, Manuela Ferrario, Bernardo Bollen Pinto, et Antoine Herpain. 2021. « The autonomic nervous system in septic shock and its role as a future therapeutic target: a narrative review ». *Annals of Intensive Care* 11(1):80. doi: 10.1186/s13613-021-00869-7.
- Carrara, Marta, Arianna Niccolò, Antoine Herpain, et Manuela Ferrario. 2020. « Reducing tachycardia in septic shock patients: do esmolol and ivabradine have a chronotropic effect only? » P. 382-85 in *2020 42nd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society (EMBC)*.
- de Castilho, Fábio M., Antonio Luiz P. Ribeiro, Vandack Nobre, Guilherme Barros, et Marcos R. de Sousa. 2018. « Heart rate variability as predictor of mortality in sepsis: A systematic review ». *PLoS ONE* 13(9):e0203487. doi: 10.1371/journal.pone.0203487.
- de Castilho, Fábio M., Antonio Luiz P. Ribeiro, José Luiz P. da Silva, Vandack Nobre, et Marcos R. de Sousa. 2017. « Heart rate variability as predictor of mortality in sepsis: A prospective cohort study ». *PLoS ONE* 12(6):e0180060. doi: 10.1371/journal.pone.0180060.
- Cavaillon, Jean-Marc, et Minou Adib-Conquy. 2005. « Monocytes/Macrophages and Sepsis ». *Critical Care Medicine* 33(12):S506. doi: 10.1097/01.CCM.0000185502.21012.37.
- CDC. 2022. « Sepsis Is A Life-Threatening Medical Emergency. ACT FAST. » *Centers for Disease Control and Prevention*. Consulté 29 décembre 2022 (<https://www.cdc.gov/sepsis/index.html>).
- Chacko, Cyril Jacob, et Shameer Gopal. 2015. « Systematic Review of Use of  $\beta$ -Blockers in Sepsis ». *Journal of Anaesthesiology, Clinical Pharmacology* 31(4):460. doi: 10.4103/0970-9185.169063.
- Chalfouh, C., C. Guillou, J. Hardouin, Q. Delarue, X. Li, C. Duclos, D. Schapman, J. P. Marie, P. Cosette, et N. Guérout. 2020. « The Regenerative Effect of Trans-spinal Magnetic Stimulation After Spinal Cord Injury: Mechanisms and Pathways Underlying the Effect ». *Neurotherapeutics* 17(4):2069-88. doi: 10.1007/s13311-020-00915-5.
- Chambrier, C., M. Laville, null Rhzioual Berrada K, M. Odeon, P. Boulétreau, et M. Beylot. 2000. « Insulin Sensitivity of Glucose and Fat Metabolism in Severe Sepsis ». *Clinical Science (London, England: 1979)* 99(4):321-28.
- Chand, Nisha, et Arun J. Sanyal. 2007. « Sepsis-Induced Cholestasis ». *Hepatology* 45(1):230-41. doi: 10.1002/hep.21480.
- Chaudhry, HINA, JUHUA ZHOU, YIN ZHONG, MIR MUSTAFA ALI, FRANKLIN MCGUIRE, PRAKASH S. NAGARKATTI, et MITZI NAGARKATTI. 2013. « Role of Cytokines as a Double-edged Sword in Sepsis ». *In vivo (Athens, Greece)* 27(6):669-84.
- Chen, Grace Y., et Gabriel Nuñez. 2010. « Sterile Inflammation: Sensing and Reacting to Damage ». *Nature Reviews Immunology* 10(12):826-37. doi: 10.1038/nri2873.



- Chen, Hui, Zhou Feng, Lingxia Min, Weiwei Deng, Mingliang Tan, Jian Hong, Qiuwen Gong, Dongyun Zhang, Hongliang Liu, et Jingming Hou. 2022. « Vagus Nerve Stimulation Reduces Neuroinflammation Through Microglia Polarization Regulation to Improve Functional Recovery After Spinal Cord Injury ». *Frontiers in Neuroscience* 16.
- Chen, I.-Chen, Jane Kuo, Wen-Je Ko, Hsin-Chin Shih, et Cheng-Deng Kuo. 2016. « Increased Flow Resistance and Decreased Flow Rate in Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome: The Role of Autonomic Nervous Modulation ». *Journal of the Chinese Medical Association: JCMA* 79(1):17-24. doi: 10.1016/j.jcma.2015.10.001.
- Chen, Kaiwen W., Mercedes Monteleone, Dave Boucher, Gabriel Sollberger, Divya Ramnath, Nicholas D. Condon, Jessica B. von Pein, Petr Broz, Matthew J. Sweet, et Kate Schroder. 2018. « Noncanonical Inflammasome Signaling Elicits Gasdermin D-Dependent Neutrophil Extracellular Traps ». *Science Immunology* 3(26):eaar6676. doi: 10.1126/sciimmunol.aar6676.
- Chen, Linlin, Huidan Deng, Hengmin Cui, Jing Fang, Zhicai Zuo, Junliang Deng, Yinglun Li, Xun Wang, et Ling Zhao. 2017. « Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs ». *Oncotarget* 9(6):7204-18. doi: 10.18632/oncotarget.23208.
- Chen, Wei-Wei, Xia Zhang, et Wen-Juan Huang. 2016. « Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (Review) ». *Molecular Medicine Reports* 13(4):3391-96. doi: 10.3892/mmr.2016.4948.
- Chen, Yituo, Haojie Zhang, Xinli Hu, Wanta Cai, Wenfei Ni, et Kailiang Zhou. 2022. « Role of NETosis in Central Nervous System Injury ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2022. doi: 10.1155/2022/3235524.
- Chen, Zhaoyuan, Hao Zhang, Mengdi Qu, Ke Nan, Hanzhong Cao, Juan P. Cata, Wankun Chen, et Changhong Miao. 2021. « Review: The Emerging Role of Neutrophil Extracellular Traps in Sepsis and Sepsis-Associated Thrombosis ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 11.
- Cheriyian, T., D. J. Ryan, J. H. Weinreb, J. Cheriyian, J. C. Paul, V. Lafage, T. Kirsch, et T. J. Errico. 2014. « Spinal Cord Injury Models: A Review ». *Spinal Cord* 52(8):588-95. doi: 10.1038/sc.2014.91.
- Chishti, Ahmad D., Brian K. Shenton, John A. Kirby, et Simon V. Baudouin. 2004. « Neutrophil Chemotaxis and Receptor Expression in Clinical Septic Shock ». *Intensive Care Medicine* 30(4):605-11. doi: 10.1007/s00134-004-2175-y.
- Clark, Stephen R., Adrienne C. Ma, Samantha A. Tavener, Braedon McDonald, Zahra Goodarzi, Margaret M. Kelly, Kamala D. Patel, Subhadeep Chakrabarti, Erin McAvoy, Gary D. Sinclair, Elizabeth M. Keys, Emma Allen-Vercoe, Rebekah Deviney, Christopher J. Doig, Francis H. Y. Green, et Paul Kubes. 2007. « Platelet TLR4 Activates Neutrophil Extracellular Traps to Ensnare Bacteria in Septic Blood ». *Nature Medicine* 13(4):463-69. doi: 10.1038/nm1565.
- Clemente-Moragón, Agustín, Mónica Gómez, Rocío Villena-Gutiérrez, Doménica V. Lalama, Jaime García-Prieto, Fernando Martínez, Fátima Sánchez-Cabo, Valentín Fuster, Eduardo Oliver,

- et Borja Ibáñez. 2020. « Metoprolol exerts a non-class effect against ischaemia-reperfusion injury by abrogating exacerbated inflammation ». *European Heart Journal* 41(46):4425-40. doi: 10.1093/eurheartj/ehaa733.
- Clemente-Moragón, Agustín, ínez-Milla Juan Mart, Eduardo Oliver, Arnoldo Santos, Javier Flandes, ández Iker Fern, íguez-González Lorena Rodr, del Castillo Cristina Serrano, Ana-María Ioan, ópez-Álvarez María L, ómez-Talavera Sandra G, án-Arriola Carlos Gal, Valentín Fuster, érez-Calvo César P, et áñez Borja Ib. 2021. « Metoprolol in Critically Ill Patients With COVID-19 ». *Journal of the American College of Cardiology* 78(10):1001-11. doi: 10.1016/j.jacc.2021.07.003.
- Clemente-Moragón, Agustín, Eduardo Oliver, Daniel Calle, Lorena Cussó, Mónica Gómez Tech, Jesús M. Pradillo, Raquel Castejón, Norma Rallón, José M. Benito, José C. Fernández-Ferro, Joaquín Carneado-Ruiz, María A. Moro, Javier Sánchez-González, Valentín Fuster, Marta Cortés-Canteli, Manuel Desco, et Borja Ibáñez. 2017. « Neutrophil B1 Adrenergic Receptor Blockade Blunts Stroke-Associated Neuroinflammation ». *British Journal of Pharmacology* n/a(n/a). doi: 10.1111/bph.15963.
- Clowes, George H. A., Mikailo Vucinic, et Michael G. Weidner. 1966. « Circulatory and Metabolic Alterations Associated with Survival or Death in Peritonitis: Clinical Analysis of 25 Cases ». *Annals of Surgery* 163(6):866.
- Colditz, I., R. Zwahlen, B. Dewald, et M. Baggiolini. 1989. « In Vivo Inflammatory Activity of Neutrophil-Activating Factor, a Novel Chemotactic Peptide Derived from Human Monocytes ». *The American Journal of Pathology* 134(4):755-60.
- Colonna, Marco, et Oleg Butovsky. 2017. « Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration ». *Annual Review of Immunology* 35:441-68. doi: 10.1146/annurev-immunol-051116-052358.
- Colucci-D'Amato, Luca, Luisa Speranza, et Floriana Volpicelli. 2020. « Neurotrophic Factor BDNF, Physiological Functions and Therapeutic Potential in Depression, Neurodegeneration and Brain Cancer ». *International Journal of Molecular Sciences* 21(20):7777. doi: 10.3390/ijms21207777.
- Comim, Clarissa M., Márcia C. Vilela, Larissa S. Constantino, Fabrícia Petronilho, Franciele Vuolo, Norinne Lacerda-Queiroz, David H. Rodrigues, João Luiz da Rocha, Antônio L. Teixeira, João Quevedo, et Felipe Dal-Pizzol. 2011. « Traffic of Leukocytes and Cytokine Up-Regulation in the Central Nervous System in Sepsis ». *Intensive Care Medicine* 37(4):711-18. doi: 10.1007/s00134-011-2151-2.
- Constantinescu, Cris S., Nasr Farooqi, Kate O'Brien, et Bruno Gran. 2011. « Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) as a Model for Multiple Sclerosis (MS) ». *British Journal of Pharmacology* 164(4):1079-1106. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01302.x.
- Cools-Lartigue, Jonathan, Jonathan Spicer, Braedon McDonald, Stephen Gowing, Simon Chow, Betty Giannias, France Bourdeau, Paul Kubes, et Lorenzo Ferri. 2013. « Neutrophil Extracellular Traps Sequester Circulating Tumor Cells and Promote Metastasis ». *The Journal of Clinical Investigation* 123(8):3446-58. doi: 10.1172/JCI67484.

- Costa, Vinicius Silva, Teresa Cristina Colvara Mattana, et Maria Elizabeth Rossi da Silva. 2010. « Unregulated IL-23/IL-17 Immune Response in Autoimmune Diseases ». *Diabetes Research and Clinical Practice* 88(3):222-26. doi: 10.1016/j.diabres.2010.03.014.
- Cougoule, Céline, Patricia Constant, Gilles Etienne, Mamadou Daffé, et Isabelle Maridonneau-Parini. 2002. « Lack of Fusion of Azurophil Granules with Phagosomes during Phagocytosis of Mycobacterium smegmatis by Human Neutrophils Is Not Actively Controlled by the Bacterium ». *Infection and Immunity* 70(3):1591-98. doi: 10.1128/IAI.70.3.1591-1598.2002.
- Cregg, Jared M., Marc A. DePaul, Angela R. Filous, Bradley T. Lang, Amanda Tran, et Jerry Silver. 2014. « Functional Regeneration beyond the Glial Scar ». *Experimental Neurology* 253:197-207. doi: 10.1016/j.expneurol.2013.12.024.
- Dale, D. C., W. C. Liles, C. Llewellyn, et T. H. Price. 1998. « Effects of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) on Neutrophil Kinetics and Function in Normal Human Volunteers ». *American Journal of Hematology* 57(1):7-15. doi: 10.1002/(sici)1096-8652(199801)57:1<7::aid-ajh2>3.0.co;2-0.
- Dal-Secco, Daniela, Silvia DalBó, Natalia E. S. Lautherbach, Fábio N. Gava, Mara R. N. Celes, Patricia O. Benedet, Adriana H. Souza, Juliana Akinaga, Vanessa Lima, Katiussia P. Silva, Luiz Ricardo A. Kiguti, Marcos A. Rossi, Isis C. Kettelhut, André S. Pupo, Fernando Q. Cunha, et Jamil Assreuy. 2017. « Cardiac Hyporesponsiveness in Severe Sepsis Is Associated with Nitric Oxide-Dependent Activation of G Protein Receptor Kinase ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 313(1):H149-63. doi: 10.1152/ajpheart.00052.2016.
- Daneman, Richard, et Alexandre Prat. 2015. « The Blood–Brain Barrier ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7(1):a020412. doi: 10.1101/cshperspect.a020412.
- Davalos, Dimitrios, Jaime Grutzendler, Guang Yang, Jiyun V. Kim, Yi Zuo, Steffen Jung, Dan R. Littman, Michael L. Dustin, et Wen-Biao Gan. 2005. « ATP Mediates Rapid Microglial Response to Local Brain Injury in Vivo ». *Nature Neuroscience* 8(6):752-58. doi: 10.1038/nn1472.
- Deitch, Edwin A. 2005. « RODENT MODELS OF INTRA-ABDOMINAL INFECTION ». *Shock* 24:19. doi: 10.1097/01.shk.0000191386.18818.0a.
- Delabranche, Xavier, Laure Stiel, François Severac, Anne-Cécile Galois, Laurent Mauvieux, Fatiha Zobairi, Thierry Lavigne, Florence Toti, Eduardo Anglès-Cano, Ferhat Meziani, et Julie Boisramé-Helms. 2017. « Evidence of Netosis in Septic Shock-Induced Disseminated Intravascular Coagulation ». *Shock: Injury, Inflammation, and Sepsis: Laboratory and Clinical Approaches* 47(3):313-17. doi: 10.1097/SHK.0000000000000719.
- Delano, Matthew J., Kindra M. Kelly-Scumpia, Terri C. Thayer, Robert D. Winfield, Philip O. Scumpia, Alex G. Cuenca, Phillips B. Harrington, Kerri A. O'Malley, Elizabeth Warner, Sonia Gabrilovich, Clayton E. Mathews, Drake Laface, Paul G. Heyworth, Reuben Ramphal, Robert M. Strieter, Lyle L. Moldawer, et Philip A. Efron. 2011. « Neutrophil Mobilization from the Bone Marrow during Polymicrobial Sepsis Is Dependent on CXCL12 Signaling ».

- Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 187(2):911-18. doi: 10.4049/jimmunol.1100588.
- Delano, Matthew J., Terri Thayer, Sonia Gabrilovich, Kindra M. Kelly-Scumpia, Robert D. Winfield, Philip O. Scumpia, Alex G. Cuenca, Elizabeth Warner, Shannon M. Wallet, Mark A. Wallet, Kerri A. O'Malley, Reuben Ramphal, Michael Clare-Salzer, Philip A. Efron, Clayton E. Mathews, et Lyle L. Moldawer. 2011. « Sepsis Induces Early Alterations in Innate Immunity That Impact Mortality to Secondary Infection ». *The Journal of Immunology* 186(1):195-202. doi: 10.4049/jimmunol.1002104.
- Delano, Matthew J., et Peter A. Ward. 2016. « Sepsis-induced immune dysfunction: can immune therapies reduce mortality? » *The Journal of Clinical Investigation* 126(1):23-31. doi: 10.1172/JCI82224.
- Dellinger, R. Phillip, Mitchell M. Levy, Andrew Rhodes, Djillali Annane, Herwig Gerlach, Steven M. Opal, Jonathan E. Sevransky, Charles L. Sprung, Ivor S. Douglas, Roman Jaeschke, Tiffany M. Osborn, Mark E. Nunnally, Sean R. Townsend, Konrad Reinhart, Ruth M. Kleinpell, Derek C. Angus, Clifford S. Deutschman, Flavia R. Machado, Gordon D. Rubenfeld, Steven A. Webb, Richard J. Beale, Jean-Louis Vincent, Rui Moreno, et Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee including the Pediatric Subgroup. 2013. « Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock: 2012 ». *Critical Care Medicine* 41(2):580-637. doi: 10.1097/CCM.0b013e31827e83af.
- Deng, Jiangping, Kuzhali Muthu, Richard Gamelli, Ravi Shankar, et Stephen B. Jones. 2004. « Adrenergic Modulation of Splenic Macrophage Cytokine Release in Polymicrobial Sepsis ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 287(3):C730-736. doi: 10.1152/ajpcell.00562.2003.
- Denning, Naomi-Liza, Monowar Aziz, Steven D. Gurien, et Ping Wang. 2019. « DAMPs and NETs in Sepsis ». *Frontiers in Immunology* 10.
- Desai, Jyaysi, Santhosh V. Kumar, Shrikant R. Mulay, Lukas Konrad, Simone Romoli, Christine Schauer, Martin Herrmann, Rostyslav Bilyy, Susanna Müller, Bastian Popper, Daigo Nakazawa, Marc Weidenbusch, Dana Thomasova, Stefan Krautwald, Andreas Linkermann, et Hans-Joachim Anders. 2016. « PMA and Crystal-Induced Neutrophil Extracellular Trap Formation Involves RIPK1-RIPK3-MLKL Signaling ». *European Journal of Immunology* 46(1):223-29. doi: 10.1002/eji.201545605.
- DeVivo, M. J. 2012. « Epidemiology of Traumatic Spinal Cord Injury: Trends and Future Implications ». *Spinal Cord* 50(5):365-72. doi: 10.1038/sc.2011.178.
- Di Giorgio, Francesco Paolo, Monica A. Carrasco, Michelle C. Siao, Tom Maniatis, et Kevin Eggan. 2007. « Non-Cell Autonomous Effect of Glia on Motor Neurons in an Embryonic Stem Cell-Based ALS Model ». *Nature Neuroscience* 10(5):608-14. doi: 10.1038/nn1885.
- Di Lazzaro, V., A. Oliviero, F. Pilato, E. Saturno, M. Dileone, M. Meglio, G. Colicchio, C. Barba, F. Papacci, et P. A. Tonali. 2004. « Effects of Vagus Nerve Stimulation on Cortical Excitability in Epileptic Patients ». *Neurology* 62(12):2310-12. doi: 10.1212/01.wnl.0000131743.45131.ae.

- Dias, David Oliveira, Hoseok Kim, Daniel Holl, Beata Werne Solnestam, Joakim Lundeberg, Marie Carlén, Christian Göritz, et Jonas Frisén. 2018. « Reducing Pericyte-Derived Scarring Promotes Recovery after Spinal Cord Injury ». *Cell* 173(1):153-165.e22. doi: 10.1016/j.cell.2018.02.004.
- Dickerson, R. N., R. C. Fried, P. M. Bailey, T. P. Stein, J. L. Mullen, et G. P. Buzby. 1990. « Effect of Propranolol on Nitrogen and Energy Metabolism in Sepsis ». *The Journal of Surgical Research* 48(1):38-41. doi: 10.1016/0022-4804(90)90142-o.
- Dinarello, C. A. 1997. « Induction of Interleukin-1 and Interleukin-1 Receptor Antagonist ». *Seminars in Oncology* 24(3 Suppl 9):S9-81-S9-93.
- Dinarello, Charles A. 2009. « Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family ». *Annual Review of Immunology* 27:519-50. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132612.
- DiProspero, N. A., S. Meiners, et H. M. Geller. 1997. « Inflammatory Cytokines Interact to Modulate Extracellular Matrix and Astrocytic Support of Neurite Outgrowth ». *Experimental Neurology* 148(2):628-39. doi: 10.1006/exnr.1997.6700.
- Dobson, R., et G. Giovannoni. 2019. « Multiple Sclerosis - a Review ». *European Journal of Neurology* 26(1):27-40. doi: 10.1111/ene.13819.
- Dombrowskiy, Viktor Y., Andrew A. Martin, Jagadeeshan Sunderram, et Harold L. Paz. 2007. « Occurrence and Outcomes of Sepsis: Influence of Race ». *Critical Care Medicine* 35(3):763-68. doi: 10.1097/01.CCM.0000256726.80998.BF.
- Domercq, Maria, Nuria Vazquez, et Carlos Matute. 2013. « Neurotransmitter signaling in the pathophysiology of microglia ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7.
- Donnelly, Dustin J., et Phillip G. Popovich. 2008. « Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury ». *Experimental neurology* 209(2):378-88. doi: 10.1016/j.expneurol.2007.06.009.
- Douda, David Nobuhiro, Meraj A. Khan, Hartmut Grasemann, et Nades Palaniyar. 2015. « SK3 Channel and Mitochondrial ROS Mediate NADPH Oxidase-Independent NETosis Induced by Calcium Influx ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(9):2817-22. doi: 10.1073/pnas.1414055112.
- Dougherty, Brendan J., Kun-Ze Lee, Michael A. Lane, Paul J. Reier, et David D. Fuller. 2012. « Contribution of the spontaneous crossed-phrenic phenomenon to inspiratory tidal volume in spontaneously breathing rats ». *Journal of Applied Physiology* 112(1):96-105. doi: 10.1152/jappphysiol.00690.2011.
- Driss, Virginie, Fanny Legrand, Sylvie Loiseau, et Monique Capron. 2010. « L'éosinophile: nouvel acteur de la réponse immunitaire innée? » *médecine/sciences* 26(6-7):621-26. doi: 10.1051/medsci/2010266-7621.
- Dünser, Martin W., et Walter R. Hasibeder. 2009. « Sympathetic Overstimulation during Critical

- Illness: Adverse Effects of Adrenergic Stress ». *Journal of Intensive Care Medicine* 24(5):293-316. doi: 10.1177/0885066609340519.
- Eash, Kyle J., Adam M. Greenbaum, Priya K. Gopalan, et Daniel C. Link. 2010. « CXCR2 and CXCR4 Antagonistically Regulate Neutrophil Trafficking from Murine Bone Marrow ». *The Journal of Clinical Investigation* 120(7):2423-31. doi: 10.1172/JCI41649.
- Elenkov, I. J., R. L. Wilder, G. P. Chrousos, et E. S. Vizi. 2000. « The Sympathetic Nerve--an Integrative Interface between Two Supersystems: The Brain and the Immune System ». *Pharmacological Reviews* 52(4):595-638.
- Elieh Ali Komi, Daniel, Stefan Wöhr, et Leonard Bielory. 2020. « Mast Cell Biology at Molecular Level: A Comprehensive Review ». *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 58(3):342-65. doi: 10.1007/s12016-019-08769-2.
- Ellaway, Peter H., Natalia Vásquez, et Michael Craggs. 2014. « Induction of Central Nervous System Plasticity by Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation to Promote Sensorimotor Recovery in Incomplete Spinal Cord Injury ». *Frontiers in Integrative Neuroscience* 8:42. doi: 10.3389/fnint.2014.00042.
- Eto, Silas F., Dayanne C. Fernandes, Michelli I. G. Funicelli, João V. C. Alecrim, Pedro G. Souza, Fabíola C. A. Carvalho, Marco A. A. Belo, et João M. Pizauro. 2021. « Microglia Extracellular Traps in *Oreochromis niloticus* Infected with *Weissella cibaria* ». *Fish & Shellfish Immunology* 113:148-53. doi: 10.1016/j.fsi.2021.03.020.
- Evans, Colin E., et You-Yang Zhao. 2017. « Impact of Thrombosis on Pulmonary Endothelial Injury and Repair Following Sepsis ». *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 312(4):L441-51. doi: 10.1152/ajplung.00441.2016.
- Evans, Laura, Andrew Rhodes, Waleed Alhazzani, Massimo Antonelli, Craig M. Cooper, Craig French, Flávia R. Machado, Lauralyn Mcintyre, Marlies Ostermann, Hallie C. Prescott, Christa Schorr, Steven Simpson, W. Joost Wiersinga, Faye Alshamsi, Derek C. Angus, Yaseen Arabi, Luciano Azevedo, Richard Beale, Gregory Beilman, Emilie Belley-Cote, Lisa Burry, Maurizio Cecconi, John Centofanti, Angel Coz Yataco, Jan De Waele, R. Phillip Dellinger, Kent Doi, Bin Du, Elisa Estenssoro, Ricard Ferrer, Charles Gomersall, Carol Hodgson, Morten Hylander Møller, Theodore Iwashyna, Shevin Jacob, Ruth Kleinpell, Michael Klompas, Younsuck Koh, Anand Kumar, Arthur Kwizera, Suzana Lobo, Henry Masur, Steven McGloughlin, Sangeeta Mehta, Yatin Mehta, Mervyn Mer, Mark Nunnally, Simon Oczkowski, Tiffany Osborn, Elizabeth Papatheofinou, Anders Perner, Michael Puskarich, Jason Roberts, William Schweickert, Maureen Seckel, Jonathan Sevransky, Charles L. Sprung, Tobias Welte, Janice Zimmerman, et Mitchell Levy. 2021. « Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock 2021 ». *Intensive Care Medicine* 47(11):1181-1247. doi: 10.1007/s00134-021-06506-y.
- Fang, Yingying, Chunsheng Li, Rui Shao, Han Yu, Qing Zhang, et Lianxing Zhao. 2015. « Prognostic Significance of the Angiotensin II/Angiotensin I and Angiotensin I/Tie-2 Ratios for Early Sepsis in an Emergency Department ». *Critical Care (London, England)* 19:367. doi: 10.1186/s13054-015-1075-6.

- Faulkner, Jill R., Julia E. Herrmann, Michael J. Woo, Keith E. Tansey, Ngan B. Doan, et Michael V. Sofroniew. 2004. « Reactive Astrocytes Protect Tissue and Preserve Function after Spinal Cord Injury ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24(9):2143-55. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3547-03.2004.
- Faurschou, Mikkel, et Niels Borregaard. 2003. « Neutrophil Granules and Secretory Vesicles in Inflammation ». *Microbes and Infection* 5(14):1317-27. doi: 10.1016/j.micinf.2003.09.008.
- Feldman, Jack L., Christopher A. Del Negro, et Paul A. Gray. 2013. « Understanding the rhythm of breathing: so near yet so far ». *Annual review of physiology* 75:423-52. doi: 10.1146/annurev-physiol-040510-130049.
- Feng, Zhou, Lingxia Min, Liang Liang, Beike Chen, Hui Chen, Yi Zhou, Weiwei Deng, Hongliang Liu, et Jingming Hou. 2021. « Neutrophil Extracellular Traps Exacerbate Secondary Injury via Promoting Neuroinflammation and Blood–Spinal Cord Barrier Disruption in Spinal Cord Injury ». *Frontiers in Immunology* 12:698249. doi: 10.3389/fimmu.2021.698249.
- Ferreira, Jason A., et Brittany D. Bissell. 2018. « Misdirected Sympathy: The Role of Sympatholysis in Sepsis and Septic Shock ». *Journal of Intensive Care Medicine* 33(2):74-86. doi: 10.1177/0885066616689548.
- Ferrero-Miliani, L., O. H. Nielsen, P. S. Andersen, et S. E. Girardin. 2007. « Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 $\beta$  generation ». *Clinical and Experimental Immunology* 147(2):227-35. doi: 10.1111/j.1365-2249.2006.03261.x.
- Feterowski, Carolin, Matthias Mack, Heike Weighardt, Bernadett Bartsch, Simone Kaiser-Moore, et Bernhard Holzmann. 2004. « CC Chemokine Receptor 2 Regulates Leukocyte Recruitment and IL-10 Production during Acute Polymicrobial Sepsis ». *European Journal of Immunology* 34(12):3664-73. doi: 10.1002/eji.200425294.
- Fiedler, Ulrike, et Hellmut G. Augustin. 2006. « Angiopoietins: A Link between Angiogenesis and Inflammation ». *Trends in Immunology* 27(12):552-58. doi: 10.1016/j.it.2006.10.004.
- Fink, M. P. 2001. « Cytopathic Hypoxia. Mitochondrial Dysfunction as Mechanism Contributing to Organ Dysfunction in Sepsis ». *Critical Care Clinics* 17(1):219-37. doi: 10.1016/s0749-0704(05)70161-5.
- Fink, M. P., et S. O. Heard. 1990. « Laboratory Models of Sepsis and Septic Shock ». *The Journal of Surgical Research* 49(2):186-96. doi: 10.1016/0022-4804(90)90260-9.
- Fink, Mitchell P. 2002. « Bench-to-Bedside Review: Cytopathic Hypoxia ». *Critical Care (London, England)* 6(6):491-99. doi: 10.1186/cc1824.
- Fox, Elizabeth D., Daithi S. Heffernan, William G. Cioffi, et Jonathan S. Reichner. 2013. « Neutrophils from Critically Ill Septic Patients Mediate Profound Loss of Endothelial Barrier Integrity ». *Critical Care (London, England)* 17(5):R226. doi: 10.1186/cc13049.
- Frencken, Jos F., Dirk W. Donker, Cristian Spitoni, Marlies E. Koster-Brouwer, Ivo W. Soliman, David S. Y. Ong, Janneke Horn, Tom van der Poll, Wilton A. van Klei, Marc J. M. Bonten, et Olaf



- L. Cremer. 2018. « Myocardial Injury in Patients With Sepsis and Its Association With Long-Term Outcome ». *Circulation. Cardiovascular Quality and Outcomes* 11(2):e004040. doi: 10.1161/CIRCOUTCOMES.117.004040.
- Fuchs, Tobias A., Alexander Brill, Daniel Duerschmied, Daphne Schatzberg, Marc Monestier, Daniel D. Myers, Shirley K. Wroblewski, Thomas W. Wakefield, John H. Hartwig, et Denisa D. Wagner. 2010. « Extracellular DNA Traps Promote Thrombosis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(36):15880-85. doi: 10.1073/pnas.1005743107.
- Fujishima, Seitaro, Satoshi Gando, Saitoh Daizoh, Shigeki Kushimoto, Hiroshi Ogura, Toshihiko Mayumi, Kiyotsugu Takuma, Joji Kotani, Norio Yamashita, Ryosuke Tsuruta, Naoshi Takeyama, Shin-Ichiro Shiraishi, Tsunetoshi Araki, Koichiro Suzuki, Hiroto Ikeda, Yasuo Miki, Yasushi Suzuki, Yoshihiro Yamaguchi, Naoki Aikawa, et Japanese Association for Acute Medicine Sepsis Registry (JAAM SR) Study Group. 2016. « Infection Site Is Predictive of Outcome in Acute Lung Injury Associated with Severe Sepsis and Septic Shock ». *Respirology (Carlton, Vic.)* 21(5):898-904. doi: 10.1111/resp.12769.
- Fuller, D. D., N. J. Doperalski, B. J. Dougherty, M. S. Sandhu, D. C. Bolser, et P. J. Reier. 2008. « Modest spontaneous recovery of ventilation following chronic high cervical hemisection in rats ». *Experimental neurology* 211(1):97-106. doi: 10.1016/j.expneurol.2008.01.013.
- Fuller, David D., Francis J. Golder, E. B. Olson, et Gordon S. Mitchell. 2006. « Recovery of Phrenic Activity and Ventilation after Cervical Spinal Hemisection in Rats ». *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 100(3):800-806. doi: 10.1152/jappphysiol.00960.2005.
- Gadallah, Raouf Ramzy, Eman Mohamed Kamal Aboseif, Dalia Ahmed Ibrahim, Hany Victor Zaki, et Mohamed Nabil Mohamed Abdelmaksoud. 2020. « Evaluation of the safety and efficacy of beta blockers in septic patients: a randomized control trial ». *Ain-Shams Journal of Anesthesiology* 12(1):57. doi: 10.1186/s42077-020-00107-5.
- Gadani, Sachin P., James T. Walsh, Igor Smirnov, Jingjing Zheng, et Jonathan Kipnis. 2015. « The Glia-Derived Alarmin IL-33 Orchestrates the Immune Response and Promotes Recovery Following CNS Injury ». *Neuron* 85(4):703-9. doi: 10.1016/j.neuron.2015.01.013.
- Gahhos, Fivos N., Ray C. J. Chiu, Drew Bethune, Yves Dion, E. John Hinchey, et Geoffrey K. Richards. 1981. « Hemodynamic responses to sepsis: Hypodynamic versus hyperdynamic states ». *Journal of Surgical Research* 31(6):475-81. doi: 10.1016/0022-4804(81)90185-2.
- Galanaud, P., D. Emilie, et C. Leprince. 1989. « Une cytokine aux frontières de l'inflammation et de l'immunologie: l'interleukine-6 (IL-6) ». *M/S. Médecine sciences [revue papier, ISSN: 0767-0974], 1989, Vol. 5, N° 5; p.338-340.* doi: 10.4267/10608/3975.
- Galkina, Elena, et Klaus Ley. 2009. « Immune and Inflammatory Mechanisms of Atherosclerosis (\*) ». *Annual Review of Immunology* 27:165-97. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132620.
- Gao, Yu-lei, Ying Yao, Xiang Zhang, Fang Chen, Xiang-long Meng, Xin-sen Chen, Chao-lan Wang, Yan-cun Liu, Xin Tian, Song-tao Shou, et Yan-fen Chai. 2022. « Regulatory T Cells: Angels

- or Demons in the Pathophysiology of Sepsis? » *Frontiers in Immunology* 13:829210. doi: 10.3389/fimmu.2022.829210.
- Geissmann, Frederic, Steffen Jung, et Dan R. Littman. 2003. « Blood Monocytes Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties ». *Immunity* 19(1):71-82. doi: 10.1016/s1074-7613(03)00174-2.
- Gentek, Rebecca, Kaaweh Molawi, et Michael H. Sieweke. 2014. « Tissue Macrophage Identity and Self-Renewal ». *Immunological Reviews* 262(1):56-73. doi: 10.1111/imr.12224.
- Ghali, Michael George Zaki. 2017. « The crossed phrenic phenomenon ». *Neural Regeneration Research* 12(6):845-64. doi: 10.4103/1673-5374.208539.
- Gierlikowska, Barbara, Albert Stachura, Wojciech Gierlikowski, et Urszula Demkow. 2021. « Phagocytosis, Degranulation and Extracellular Traps Release by Neutrophils—The Current Knowledge, Pharmacological Modulation and Future Prospects ». *Frontiers in Pharmacology* 12.
- Ginhoux, Florent, Melanie Greter, Marylene Leboeuf, Sayan Nandi, Peter See, Solen Gokhan, Mark F. Mehler, Simon J. Conway, Lai Guan Ng, E. Richard Stanley, Igor M. Samokhvalov, et Miriam Merad. 2010. « Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages ». *Science*. doi: 10.1126/science.1194637.
- Gioannini, Theresa L., et Jerrold P. Weiss. 2007. « Regulation of Interactions of Gram-Negative Bacterial Endotoxins with Mammalian Cells ». *Immunologic Research* 39(1-3):249-60. doi: 10.1007/s12026-007-0069-0.
- Girard, Timothy D., Steven M. Opal, et E. Wesley Ely. 2005. « Insights into Severe Sepsis in Older Patients: From Epidemiology to Evidence-Based Management ». *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 40(5):719-27. doi: 10.1086/427876.
- Gofton, Teneille E., et G. Bryan Young. 2012. « Sepsis-Associated Encephalopathy ». *Nature Reviews. Neurology* 8(10):557-66. doi: 10.1038/nrneurol.2012.183.
- Gogos, C. A., E. Drosou, H. P. Bassaris, et A. Skoutelis. 2000. « Pro- versus Anti-Inflammatory Cytokine Profile in Patients with Severe Sepsis: A Marker for Prognosis and Future Therapeutic Options ». *The Journal of Infectious Diseases* 181(1):176-80. doi: 10.1086/315214.
- Gomez, Henry G., Sandra M. Gonzalez, Jessica M. Londoño, Natalia A. Hoyos, Cesar D. Niño, Alba L. Leon, Paula A. Velilla, Maria T. Rugeles, et Fabián A. Jaimes. 2014. « Immunological Characterization of Compensatory Anti-Inflammatory Response Syndrome in Patients with Severe Sepsis: A Longitudinal Study\* ». *Critical Care Medicine* 42(4):771-80. doi: 10.1097/CCM.000000000000100.
- González, Hernán F. J., Aaron Yengo-Kahn, et Dario J. Englot. 2019. « Vagus Nerve Stimulation for the Treatment of Epilepsy ». *Neurosurgery Clinics of North America* 30(2):219-30. doi: 10.1016/j.nec.2018.12.005.

- Gore, Dennis C., et Robert R. Wolfe. 2006. « Hemodynamic and Metabolic Effects of Selective Beta1 Adrenergic Blockade during Sepsis ». *Surgery* 139(5):686-94. doi: 10.1016/j.surg.2005.10.010.
- Göriz, Christian, David O. Dias, Nikolay Tomilin, Mariano Barbacid, Oleg Shupliakov, et Jonas Frisé. 2011. « A Pericyte Origin of Spinal Cord Scar Tissue ». *Science (New York, N.Y.)* 333(6039):238-42. doi: 10.1126/science.1203165.
- Görlach, Agnes, Katharina Bertram, Sona Hudecova, et Olga Krizanova. 2015. « Calcium and ROS: A Mutual Interplay ». *Redox Biology* 6:260-71. doi: 10.1016/j.redox.2015.08.010.
- Goshgarian, Harry G. 2003. « Invited Review: The crossed phrenic phenomenon: a model for plasticity in the respiratory pathways following spinal cord injury ». *Journal of Applied Physiology* 94(2):795-810. doi: 10.1152/jappphysiol.00847.2002.
- Grailer, Jamison J., Mikel D. Haggadone, J. Vidya Sarma, Firas S. Zetoune, et Peter A. Ward. 2014. « Induction of M2 Regulatory Macrophages through the  $\beta$ 2-Adrenergic Receptor with Protection during Endotoxemia and Acute Lung Injury ». *Journal of Innate Immunity* 6(5):607-18. doi: 10.1159/000358524.
- Granger, Vanessa, Dorothée Faille, Vanessa Marani, Benoît Noël, Yann Gallais, Natacha Szely, Héloïse Flament, Marc Pallardy, Sylvie Chollet-Martin, et Luc de Chaisemartin. 2017. « Human Blood Monocytes Are Able to Form Extracellular Traps ». *Journal of Leukocyte Biology* 102(3):775-81. doi: 10.1189/jlb.3MA0916-411R.
- Grant, D. M. 1991. « Detoxification Pathways in the Liver ». *Journal of Inherited Metabolic Disease* 14(4):421-30. doi: 10.1007/BF01797915.
- Greer, JR. 2015. « Pathophysiology of cardiovascular dysfunction in sepsis ». *BJA Education* 15(6):316-21. doi: 10.1093/bjaceaccp/mkv003.
- Grimaldi, D., S. Louis, F. Pène, G. Sirgo, C. Rousseau, Y. E. Claessens, L. Vimeux, A. Cariou, J. P. Mira, A. Hosmalin, et J. D. Chiche. 2011. « Profound and Persistent Decrease of Circulating Dendritic Cells Is Associated with ICU-Acquired Infection in Patients with Septic Shock ». *Intensive Care Medicine* 37(9):1438-46. doi: 10.1007/s00134-011-2306-1.
- Gruner, John A. 1992. « A Monitored Contusion Model of Spinal Cord Injury in the Rat ». *Journal of Neurotrauma* 9(2):123-28. doi: 10.1089/neu.1992.9.123.
- Grunhaus, Leon, Pinhas N. Dannon, et Ari A. Gershon. 2002. « Transcranial magnetic stimulation: a new tool in the fight against depression ». *Dialogues in Clinical Neuroscience* 4(1):93-103. doi: 10.31887/DCNS.2002.4.1/lgrunhaus.
- Gu, Yakun, Xueyan Cheng, Xiao Huang, Yimin Yuan, Shangyao Qin, Zijian Tan, Dan Wang, Xin Hu, Cheng He, et Zhida Su. 2019. « Conditional Ablation of Reactive Astrocytes to Dissect Their Roles in Spinal Cord Injury and Repair ». *Brain, Behavior, and Immunity* 80:394-405. doi: 10.1016/j.bbi.2019.04.016.
- Guisset, Olivier, Marie-Sarah Dilhuydy, Rodolphe Thiébaud, Jérôme Lefèvre, Fabrice Camou, Anne

- Sarrat, Claude Gabinski, Jean-François Moreau, et Patrick Blanco. 2007. « Decrease in Circulating Dendritic Cells Predicts Fatal Outcome in Septic Shock ». *Intensive Care Medicine* 33(1):148-52. doi: 10.1007/s00134-006-0436-7.
- Guo, Bingqi, Mengyao Zhang, Wensi Hao, Yuping Wang, Tingting Zhang, et Chunyan Liu. 2023. « Neuroinflammation Mechanisms of Neuromodulation Therapies for Anxiety and Depression ». *Translational Psychiatry* 13(1):5. doi: 10.1038/s41398-022-02297-y.
- Guo, Ren-Feng, Lei Sun, Hongwei Gao, Kevin X. Shi, Daniel Rittirsch, Vidya J. Sarma, Firas S. Zetoune, et Peter A. Ward. 2006. « In Vivo Regulation of Neutrophil Apoptosis by C5a during Sepsis ». *Journal of Leukocyte Biology* 80(6):1575-83. doi: 10.1189/jlb.0106065.
- Gurguis, George N. M., Jaishri E. Blakeley, Deborah Antai-Otong, Stephanie P. Vo, Paul J. Orsulak, Frederick Petty, et A. John Rush. 1999. « Adrenergic receptor function in panic disorder II. Neutrophil  $\beta_2$  receptors: Gs protein coupling, effects of imipramine treatment and relationship to treatment outcome ». *Journal of Psychiatric Research* 33(4):309-21. doi: 10.1016/S0022-3956(99)00008-4.
- Gurski, Cody J., et Bonnie N. Dittel. 2022. « Myeloperoxidase as a Marker to Differentiate Mouse Monocyte/Macrophage Subsets ». *International Journal of Molecular Sciences* 23(15):8246. doi: 10.3390/ijms23158246.
- Gusev, Eugeny Yu, et Natalia V. Zotova. 2019. « Cellular Stress and General Pathological Processes ». *Current Pharmaceutical Design* 25(3):251-97. doi: 10.2174/1381612825666190319114641.
- Gusev, Evgenii, et Yulia Zhuravleva. 2022. « Inflammation: A New Look at an Old Problem ». *International Journal of Molecular Sciences* 23(9):4596. doi: 10.3390/ijms23094596.
- Gyawali, Bishal, Karan Ramakrishna, et Amit S. Dhamoon. 2019. « Sepsis: The evolution in definition, pathophysiology, and management ». *SAGE Open Medicine* 7:2050312119835043. doi: 10.1177/2050312119835043.
- Habimana, Reverien, Insu Choi, Hwa Jin Cho, Dowan Kim, Kyoseon Lee, et Inseok Jeong. 2020. « Sepsis-induced cardiac dysfunction: a review of pathophysiology ». *Acute and Critical Care* 35(2):57-66. doi: 10.4266/acc.2020.00248.
- Haffner, C. A., et M. J. Kendall. 1992. « Metabolic Effects of Beta 2-Agonists ». *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 17(3):155-64. doi: 10.1111/j.1365-2710.1992.tb01285.x.
- Hagiwara, Satoshi, Hideo Iwasaka, Hayato Maeda, et Noguchi Takayuki. 2008. « Landiolol, an ultrashort-acting beta1-adrenoceptor antagonist, has protective effects in an LPS-induced systemic inflammation model ». *Shock (Augusta, Ga.)* 31:515-20. doi: 10.1097/SHK.0b013e3181863689.
- Hakkim, Abdul, Tobias A. Fuchs, Nancy E. Martinez, Simone Hess, Heino Prinz, Arturo Zychlinsky, et Herbert Waldmann. 2011. « Activation of the Raf-MEK-ERK Pathway Is Required for Neutrophil Extracellular Trap Formation ». *Nature Chemical Biology* 7(2):75-77. doi: 10.1038/nchembio.496.

- Hakkim, Abdul, Barbara G. Fürnrohr, Kerstin Amann, Britta Laube, Ulrike Abu Abed, Volker Brinkmann, Martin Herrmann, Reinhard E. Voll, et Arturo Zychlinsky. 2010. « Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(21):9813-18. doi: 10.1073/pnas.0909927107.
- Hallgren, Jenny, et Michael F. Gurish. 2014. « Granule Maturation in Mast Cells: Histamine in Control ». *European Journal of Immunology* 44(1):33-36. doi: 10.1002/eji.201344262.
- Hamilton, John A. 2002. « GM-CSF in Inflammation and Autoimmunity ». *Trends in Immunology* 23(8):403-8. doi: 10.1016/s1471-4906(02)02260-3.
- Hamilton, John A., et Gary P. Anderson. 2004. « GM-CSF Biology ». *Growth Factors (Chur, Switzerland)* 22(4):225-31. doi: 10.1080/08977190412331279881.
- Hargrove, D. M., G. J. Bagby, C. H. Lang, et J. J. Spitzer. 1988. « Adrenergic Blockade Prevents Endotoxin-Induced Increases in Glucose Metabolism ». *The American Journal of Physiology* 255(5 Pt 1):E629-635. doi: 10.1152/ajpendo.1988.255.5.E629.
- Hariri, Geoffroy, Jérémie Joffre, Guillaume Leblanc, Michael Bonsey, Jean-Remi Laviglegrand, Tomas Urbina, Bertrand Guidet, Eric Maury, Jan Bakker, et Hafid Ait-Oufella. 2019. « Narrative review: clinical assessment of peripheral tissue perfusion in septic shock ». *Annals of Intensive Care* 9:37. doi: 10.1186/s13613-019-0511-1.
- Hasegawa, Daisuke, Ryota Sato, et Osamu Nishida. 2021. «  $\beta$ 1-blocker in sepsis ». *Journal of Intensive Care* 9(1):39. doi: 10.1186/s40560-021-00552-w.
- Hashimoto, Manabu, Atsumi Nitta, Hidefumi Fukumitsu, Hiroshi Nomoto, Liya Shen, et Shoei Furukawa. 2005. « Involvement of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor in Activation Processes of Rodent Macrophages ». *Journal of Neuroscience Research* 79(4):476-87. doi: 10.1002/jnr.20368.
- Hawthorne, Alicia L., et Phillip G. Popovich. 2011. « Emerging Concepts in Myeloid Cell Biology after Spinal Cord Injury ». *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 8(2):252-61. doi: 10.1007/s13311-011-0032-6.
- Hayakawa, Mineji, Kenichi Katabami, Takeshi Wada, Masahiro Sugano, Hirokatsu Hoshino, Atsushi Sawamura, et Satoshi Gando. 2010. « Sivelestat (Selective Neutrophil Elastase Inhibitor) Improves the Mortality Rate of Sepsis Associated with Both Acute Respiratory Distress Syndrome and Disseminated Intravascular Coagulation Patients ». *Shock (Augusta, Ga.)* 33(1):14-18. doi: 10.1097/SHK.0b013e3181aa95c4.
- Headland, Sarah E., et Lucy V. Norling. 2015. « The Resolution of Inflammation: Principles and Challenges ». *Seminars in Immunology* 27(3):149-60. doi: 10.1016/j.smim.2015.03.014.
- Hermann, G. E., R. C. Rogers, J. C. Bresnahan, et M. S. Beattie. 2001. « Tumor Necrosis Factor-Alpha Induces cFOS and Strongly Potentiates Glutamate-Mediated Cell Death in the Rat Spinal Cord ». *Neurobiology of Disease* 8(4):590-99. doi: 10.1006/nbdi.2001.0414.

- Hirano, Toshio, Kiyoshi Yasukawa, Hisashi Harada, Tetsuya Taga, Yasuo Watanabe, Tadashi Matsuda, Shin-ichiro Kashiwamura, Koichi Nakajima, Koichi Koyama, Akihiro Iwamatsu, Susumu Tsunasawa, Fumio Sakiyama, Hiroshi Matsui, Yoshiyuki Takahara, Tadatsugu Taniguchi, et Tadimitsu Kishimoto. 1986. « Complementary DNA for a Novel Human Interleukin (BSF-2) That Induces B Lymphocytes to Produce Immunoglobulin ». *Nature* 324(6092):73-76. doi: 10.1038/324073a0.
- Hoffman, B. B., et R. J. Lefkowitz. 1980. « Alpha-Adrenergic Receptor Subtypes ». *The New England Journal of Medicine* 302(25):1390-96. doi: 10.1056/NEJM198006193022504.
- Holdsworth, Stephen R., et Poh-Yi Gan. 2015. « Cytokines: Names and Numbers You Should Care About ». *Clinical Journal of the American Society of Nephrology: CJASN* 10(12):2243-54. doi: 10.2215/CJN.07590714.
- Hong, Shiao-Ya, Chih-Cheng Lai, Nai-Chi Teng, Chao-Hsien Chen, Chun-Chun Hsu, Nai-Ju Chan, Cheng-Yi Wang, Ya-Hui Wang, You Shuei Lin, et Likwang Chen. 2023. « Premorbid use of selective beta-blockers improves sepsis incidence and course: Human cohort and animal model studies ». *Frontiers in Medicine* 10:1105894. doi: 10.3389/fmed.2023.1105894.
- Hotchkiss, Richard S., Lyle L. Moldawer, Steven M. Opal, Konrad Reinhart, Isaiah R. Turnbull, et Jean-Louis Vincent. 2016. « Sepsis and septic shock ». *Nature reviews. Disease primers* 2:16045. doi: 10.1038/nrdp.2016.45.
- Hotchkiss, Richard S., Guillaume Monneret, et Didier Payen. 2013. « Immunosuppression in Sepsis: A Novel Understanding of the Disorder and a New Therapeutic Approach ». *The Lancet. Infectious Diseases* 13(3):260-68. doi: 10.1016/S1473-3099(13)70001-X.
- Hou, Shaoping, et Alexander G. Rabchevsky. 2014. « Autonomic Consequences of Spinal Cord Injury ». *Comprehensive Physiology* 4(4):1419-53. doi: 10.1002/cphy.c130045.
- Hu, Caroline K., Fabienne Venet, David S. Heffernan, Yvonne L. Wang, Brian Horner, Xin Huang, Chun-Shiang Chung, Stephen H. Gregory, et Alfred Ayala. 2009. « The Role of Hepatic Invariant NKT Cells in Systemic/Local Inflammation and Mortality during Polymicrobial Septic Shock ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182(4):2467-75. doi: 10.4049/jimmunol.0801463.
- Huang, Jiayu, Weiqi Hong, Meihua Wan, et Limin Zheng. 2022. « Molecular Mechanisms and Therapeutic Target of NETosis in Diseases ». *MedComm* 3(3). doi: 10.1002/mco2.162.
- Huang, Xiaowen, Basharat Hussain, et Junlei Chang. 2021. « Peripheral Inflammation and Blood-Brain Barrier Disruption: Effects and Mechanisms ». *CNS Neuroscience & Therapeutics* 27(1):36-47. doi: 10.1111/cns.13569.
- Iba, Toshiaki, Naoyuki Hashiguchi, Isao Nagaoka, Yoko Tabe, et Miwa Murai. 2013. « Neutrophil Cell Death in Response to Infection and Its Relation to Coagulation ». *Journal of Intensive Care* 1(1):13. doi: 10.1186/2052-0492-1-13.
- Imamura, Yukio, Hisatake Matsumoto, Jun Imamura, Naoya Matsumoto, Kazuma Yamakawa, Nao Yoshikawa, Yuki Murakami, Satoko Mitani, Junichiro Nakagawa, Tomoki Yamada, Hiroshi

- Ogura, Jun Oda, et Takeshi Shimazu. 2023. « Ultrasound stimulation of the vagal nerve improves acute septic encephalopathy in mice ». *Frontiers in Neuroscience* 17.
- Imhof, Beat A., et Michel Aurrand-Lions. 2004. « Adhesion Mechanisms Regulating the Migration of Monocytes ». *Nature Reviews. Immunology* 4(6):432-44. doi: 10.1038/nri1375.
- Ishii, Tomoko, Kent Doi, Koji Okamoto, Mitsuru Imamura, Makoto Dohi, Kazuhiko Yamamoto, Toshiro Fujita, et Eisei Noiri. 2010. « Neutrophil Elastase Contributes to Acute Lung Injury Induced by Bilateral Nephrectomy ». *The American Journal of Pathology* 177(4):1665-73. doi: 10.2353/ajpath.2010.090793.
- Izeboud, C. A., K. H. N. Hoebe, A. F. Grootendorst, S. M. Nijmeijer, A. S. van Miert, R. R. Witkamp, et R. J. T. Rodenburg. 2004. « Endotoxin-Induced Liver Damage in Rats Is Minimized by B2-Adrenoceptor Stimulation ». *Inflammation Research* 53(3):93-99. doi: 10.1007/s00011-003-1228-y.
- Jabbour, Henry N., Kurt J. Sales, Rob D. Catalano, et Jane E. Norman. 2009. « Inflammatory Pathways in Female Reproductive Health and Disease ». *Reproduction (Cambridge, England)* 138(6):903-19. doi: 10.1530/REP-09-0247.
- Jaeger, Laura B., Shinya Dohgu, Rukhsana Sultana, Jessica L. Lynch, Joshua B. Owen, Michelle A. Erickson, Gul N. Shah, Tulin O. Price, Melissa A. Fleegal-Demotta, D. Allan Butterfield, et William A. Banks. 2009. « Lipopolysaccharide Alters the Blood-Brain Barrier Transport of Amyloid Beta Protein: A Mechanism for Inflammation in the Progression of Alzheimer's Disease ». *Brain, Behavior, and Immunity* 23(4):507-17. doi: 10.1016/j.bbi.2009.01.017.
- Jahns, Roland, Valérie Boivin, et Martin J. Lohse. 2006. «  $\beta$ 1-Adrenergic Receptor Function, Autoimmunity, and Pathogenesis of Dilated Cardiomyopathy ». *Trends in Cardiovascular Medicine* 16(1):20-24. doi: 10.1016/j.tcm.2005.11.002.
- Jaššová, Katarína, Jakub Albrecht, Silvie Čerešňáková, Hana Papežová, et Martin Anders. 2019. « Repetitive transcranial magnetic stimulation significantly influences the eating behavior in depressive patients ». *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 15:2579-86. doi: 10.2147/NDT.S203486.
- Jeong, Hun-Jin, Yeomin Yun, Seung-Jae Lee, Yoon Ha, et So-Jung Gwak. 2021. « Biomaterials and strategies for repairing spinal cord lesions ». *Neurochemistry International* 144:104973. doi: 10.1016/j.neuint.2021.104973.
- Jia, Ming, Steve A. Noutong Njapo, Vaibhav Rastogi, et Vishnumurthy Shushrutha Hedna. 2015. « Taming Glutamate Excitotoxicity: Strategic Pathway Modulation for Neuroprotection ». *CNS Drugs* 29(2):153-62. doi: 10.1007/s40263-015-0225-3.
- Jiménez-Alcázar, Miguel, Chandini Rangaswamy, Rachita Panda, Josephine Bitterling, Yashin J. Simsek, Andy T. Long, Rostyslav Bilyy, Veit Krenn, Christoph Renné, Thomas Renné, Stefan Kluge, Ulf Panzer, Ryushin Mizuta, Hans Georg Mannherz, Daisuke Kitamura, Martin Herrmann, Markus Napirei, et Tobias A. Fuchs. 2017. « Host DNases prevent vascular occlusion by neutrophil extracellular traps ». *Science* 358(6367):1202-6. doi: 10.1126/science.aam8897.



- Jin, Jingyu, Sharada Tilve, Zhonghai Huang, Libing Zhou, Herbert M. Geller, et Panpan Yu. 2018. « Effect of chondroitin sulfate proteoglycans on neuronal cell adhesion, spreading and neurite growth in culture ». *Neural Regeneration Research* 13(2):289-97. doi: 10.4103/1673-5374.226398.
- Jin, Peng, Shuixiang Deng, Mi Tian, Cameron Lenahan, Pengju Wei, Yao Wang, Jiaying Tan, Huimei Wen, Feng Zhao, Yanqin Gao, et Ye Gong. 2021. « INT-777 prevents cognitive impairment by activating Takeda G protein-coupled receptor 5 (TGR5) and attenuating neuroinflammation via cAMP/ PKA/ CREB signaling axis in a rat model of sepsis ». *Experimental Neurology* 335:113504. doi: 10.1016/j.expneurol.2020.113504.
- Jin, Zhen, Jinpeng Sun, Zeyuan Song, Kun Chen, Yap San Min Nicolas, Rupesh Kc, Qiyun Ma, Jun Liu, et Mingshun Zhang. 2020. « Neutrophil Extracellular Traps Promote Scar Formation in Post-Epidural Fibrosis ». *Npj Regenerative Medicine* 5(1):1-9. doi: 10.1038/s41536-020-00103-1.
- John, G. W., J. C. Doxey, D. S. Walter, et J. L. Reid. 1990. « The role of alpha- and beta-adrenoceptor subtypes in mediating the effects of catecholamines on fasting glucose and insulin concentrations in the rat. » *British Journal of Pharmacology* 100(4):699-704.
- Joshi, Manjunath B., Guruprasad Baipadithaya, Aswath Balakrishnan, Mangala Hegde, Manik Vohra, Rayees Ahamed, Shivashankara K. Nagri, Lingadakai Ramachandra, et Kapaettu Satyamoorthy. 2016. « Elevated homocysteine levels in type 2 diabetes induce constitutive neutrophil extracellular traps ». *Scientific Reports* 6:36362. doi: 10.1038/srep36362.
- Joshi, Mital, et Michael G. Fehlings. 2002. « Development and Characterization of a Novel, Graded Model of Clip Compressive Spinal Cord Injury in the Mouse: Part 1. Clip Design, Behavioral Outcomes, and Histopathology ». *Journal of Neurotrauma* 19(2):175-90. doi: 10.1089/08977150252806947.
- Ju, Cunxiang, Juan Liang, Mingkun Zhang, Jinlong Zhao, Ling'en Li, Shuai Chen, Jing Zhao, et Xiang Gao. 2022. « The Mouse Resource at National Resource Center for Mutant Mice ». *Mammalian Genome* 33(1):143-56. doi: 10.1007/s00335-021-09940-x.
- Kang, Yu Hui, et Subhra K. Biswas. 2013. « Basophil-Macrophage Dialog in Allergic Inflammation ». *Immunity* 38(3):408-10. doi: 10.1016/j.immuni.2013.02.015.
- Karemaker, John M. 2017. « An Introduction into Autonomic Nervous Function ». *Physiological Measurement* 38(5):R89-118. doi: 10.1088/1361-6579/aa6782.
- Karimi-Abdolrezaee, Soheila, et Rohini Billakanti. 2012. « Reactive Astrogliosis after Spinal Cord Injury-Beneficial and Detrimental Effects ». *Molecular Neurobiology* 46(2):251-64. doi: 10.1007/s12035-012-8287-4.
- Karnad, Dilip R., Rakesh Bhadade, Pradeep K. Verma, Nivedita D. Moullick, Mradul K. Daga, Neelima D. Chafekar, et Shivakumar Iyer. 2014. « Intravenous Administration of Ulinastatin (Human Urinary Trypsin Inhibitor) in Severe Sepsis: A Multicenter Randomized Controlled Study ». *Intensive Care Medicine* 40(6):830-38. doi: 10.1007/s00134-014-3278-8.

- Kaur, Parmeet, et Saurabh Sharma. 2018. « Recent Advances in Pathophysiology of Traumatic Brain Injury ». *Current Neuropharmacology* 16(8):1224-38. doi: 10.2174/1570159X15666170613083606.
- Kavelaars, Annemieke, Marion van de Pol, Jitske Zijlstra, et Cobi J. Heijnen. 1997. «  $\beta$ 2-Adrenergic activation enhances interleukin-8 production by human monocytes ». *Journal of Neuroimmunology* 77(2):211-16. doi: 10.1016/S0165-5728(97)00076-3.
- Kawai, T., O. Adachi, T. Ogawa, K. Takeda, et S. Akira. 1999. « Unresponsiveness of MyD88-Deficient Mice to Endotoxin ». *Immunity* 11(1):115-22. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80086-2.
- Kawai, T., et S. Akira. 2006. « TLR Signaling ». *Cell Death & Differentiation* 13(5):816-25. doi: 10.1038/sj.cdd.4401850.
- Kawai, T., O. Takeuchi, T. Fujita, J. Inoue, P. F. Mühlradt, S. Sato, K. Hoshino, et S. Akira. 2001. « Lipopolysaccharide Stimulates the MyD88-Independent Pathway and Results in Activation of IFN-Regulatory Factor 3 and the Expression of a Subset of Lipopolysaccharide-Inducible Genes ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 167(10):5887-94. doi: 10.4049/jimmunol.167.10.5887.
- Kawamoto, Hiroshi, et Nagahiro Minato. 2004. « Myeloid cells ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36(8):1374-79. doi: 10.1016/j.biocel.2004.01.020.
- Keeley, Alexander, Paul Hine, et Emmanuel Nsutebu. 2017. « The Recognition and Management of Sepsis and Septic Shock: A Guide for Non-Intensivists ». *Postgraduate Medical Journal* 93(1104):626-34. doi: 10.1136/postgradmedj-2016-134519.
- Kellum, John A., Lan Kong, Mitchell P. Fink, Lisa A. Weissfeld, Donald M. Yealy, Michael R. Pinsky, Jonathan Fine, Alexander Krichevsky, Russell L. Delude, Derek C. Angus, et GenIMS Investigators. 2007. « Understanding the Inflammatory Cytokine Response in Pneumonia and Sepsis: Results of the Genetic and Inflammatory Markers of Sepsis (GenIMS) Study ». *Archives of Internal Medicine* 167(15):1655-63. doi: 10.1001/archinte.167.15.1655.
- Kent, K. M., S. E. Epstein, T. Cooper, et D. M. Jacobowitz. 1974. « Cholinergic Innervation of the Canine and Human Ventricular Conducting System. Anatomic and Electrophysiologic Correlations ». *Circulation* 50(5):948-55. doi: 10.1161/01.cir.50.5.948.
- Keomani, Emilie, Thérèse B. Deramautd, Michel Petitjean, Marcel Bonay, Frédéric Lofaso, et Stéphane Vinit. 2014. « A Murine Model of Cervical Spinal Cord Injury to Study Post-lesional Respiratory Neuroplasticity ». *Journal of Visualized Experiments: JoVE* (87):51235. doi: 10.3791/51235.
- Kerschensteiner, Martin, Eike Gallmeier, Lüder Behrens, Vivian Vargas Leal, Thomas Misgeld, Wolfgang E. F. Klinkert, Roland Kolbeck, Edmund Hoppe, Rosa-Laura Oropeza-Wekerle, Ilse Bartke, Christine Stadelmann, Hans Lassmann, Hartmut Wekerle, et Reinhard Hohlfeld. 1999. « Activated Human T Cells, B Cells, and Monocytes Produce Brain-derived Neurotrophic Factor In Vitro and in Inflammatory Brain Lesions: A Neuroprotective Role of Inflammation? » *The Journal of Experimental Medicine* 189(5):865-70.

- Keshari, Ravi S., Anupam Jyoti, Megha Dubey, Nikhil Kothari, Monica Kohli, Jaishri Bogra, Manoj K. Barthwal, et Madhu Dikshit. 2012. « Cytokines Induced Neutrophil Extracellular Traps Formation: Implication for the Inflammatory Disease Condition ». *PLoS ONE* 7(10):e48111. doi: 10.1371/journal.pone.0048111.
- Khandpur, Ritika, Carmelo Carmona-Rivera, Anuradha Vivekanandan-Giri, Alison Gizinski, Srilakshmi Yalavarthi, Jason S. Knight, Sean Friday, Sam Li, Rajiv M. Patel, Venkataraman Subramanian, Paul Thompson, Pojen Chen, David A. Fox, Subramaniam Pennathur, et Mariana J. Kaplan. 2013. « NETs Are a Source of Citrullinated Autoantigens and Stimulate Inflammatory Responses in Rheumatoid Arthritis ». *Science Translational Medicine* 5(178):178ra40-178ra40. doi: 10.1126/scitranslmed.3005580.
- Khwaja, Arif. 2012. « KDIGO Clinical Practice Guidelines for Acute Kidney Injury ». *Nephron. Clinical Practice* 120(4):c179-184. doi: 10.1159/000339789.
- Kierdorf, Katrin, et Marco Prinz. s. d. « Microglia in steady state ». *The Journal of Clinical Investigation* 127(9):3201-9. doi: 10.1172/JCI90602.
- Kim, Ji Young, Gyu-Sik Choi, Yun-Woo Cho, HeeKyung Cho, Se-Jin Hwang, et Sang-Ho Ahn. 2013. « Attenuation of Spinal Cord Injury-Induced Astroglial and Microglial Activation by Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation in Rats ». *Journal of Korean Medical Science* 28(2):295-99. doi: 10.3346/jkms.2013.28.2.295.
- Kim, Seung-Woo, et Ja-Kyeong Lee. 2020. « Role of HMGB1 in the Interplay between NETosis and Thrombosis in Ischemic Stroke: A Review ». *Cells* 9(8). doi: 10.3390/cells9081794.
- Kim, Yu Rim, Young Min Kim, Jaeho Lee, Joohyun Park, Jong Eun Lee, et Young-Min Hyun. 2020. « Neutrophils Return to Bloodstream Through the Brain Blood Vessel After Crosstalk With Microglia During LPS-Induced Neuroinflammation ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8:613733. doi: 10.3389/fcell.2020.613733.
- Kimmoun, Antoine, Huguette Louis, Narimane Al Kattani, Julie Delemazure, Nicolas Dessales, Chaojie Wei, Pierre Yves Marie, Khodor Issa, et Bruno Levy. 2015. «  $\beta$ 1-Adrenergic Inhibition Improves Cardiac and Vascular Function in Experimental Septic Shock\* ». *Critical Care Medicine* 43(9):e332. doi: 10.1097/CCM.0000000000001078.
- King, Emily S., et Alexander D. Tang. 2022. « Intrinsic Plasticity Mechanisms of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation ». *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry* 10738584221118262. doi: 10.1177/10738584221118262.
- Klopf, Johannes, Christine Brostjan, Wolf Eilenberg, et Christoph Neumayer. 2021. « Neutrophil Extracellular Traps and Their Implications in Cardiovascular and Inflammatory Disease ». *International Journal of Molecular Sciences* 22(2):559. doi: 10.3390/ijms22020559.
- Knight, Jason S., Wei Luo, Alexander A. O'Dell, Srilakshmi Yalavarthi, Wenpu Zhao, Venkataraman Subramanian, Chiao Guo, Robert C. Grenn, Paul R. Thompson, Daniel T. Eitzman, et Mariana J. Kaplan. 2014. « Peptidylarginine Deiminase Inhibition Reduces Vascular Damage and Modulates Innate Immune Responses in Murine Models of

- Atherosclerosis ». *Circulation Research* 114(6):947-56. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.303312.
- Kobayashi, Masahito, et Alvaro Pascual-Leone. 2003. « Transcranial Magnetic Stimulation in Neurology ». *The Lancet. Neurology* 2(3):145-56. doi: 10.1016/s1474-4422(03)00321-1.
- von Köckritz-Blickwede, Maren, Oliver Goldmann, Pontus Thulin, Katja Heinemann, Anna Norrby-Teglund, Manfred Rohde, et Eva Medina. 2008. « Phagocytosis-Independent Antimicrobial Activity of Mast Cells by Means of Extracellular Trap Formation ». *Blood* 111(6):3070-80. doi: 10.1182/blood-2007-07-104018.
- Kolaczowska, Elzbieta, et Paul Kubes. 2013. « Neutrophil Recruitment and Function in Health and Inflammation ». *Nature Reviews. Immunology* 13(3):159-75. doi: 10.1038/nri3399.
- Korach, M., T. Sharshar, I. Jarrin, J. P. Fouillot, J. C. Raphaël, P. Gajdos, et D. Annane. 2001. « Cardiac Variability in Critically Ill Adults: Influence of Sepsis ». *Critical Care Medicine* 29(7):1380-85. doi: 10.1097/00003246-200107000-00013.
- Kovach, Melissa A., et Theodore J. Standiford. 2012. « The Function of Neutrophils in Sepsis ». *Current Opinion in Infectious Diseases* 25(3):321. doi: 10.1097/QCO.0b013e3283528c9b.
- Kozel, F. Andrew. 2018. « Clinical Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation for Posttraumatic Stress Disorder, Generalized Anxiety Disorder, and Bipolar Disorder ». *The Psychiatric Clinics of North America* 41(3):433-46. doi: 10.1016/j.psc.2018.04.007.
- Kraus, J. F., C. E. Franti, R. S. Riggins, D. Richards, et N. O. Borhani. 1975. « Incidence of Traumatic Spinal Cord Lesions ». *Journal of Chronic Diseases* 28(9):471-92. doi: 10.1016/0021-9681(75)90057-0.
- Kreutzberg, G. W. 1995. « Microglia, the First Line of Defence in Brain Pathologies ». *Arzneimittel-Forschung* 45(3A):357-60.
- Kreutzberg, G. W. 1996. « Microglia: A Sensor for Pathological Events in the CNS ». *Trends in Neurosciences* 19(8):312-18. doi: 10.1016/0166-2236(96)10049-7.
- Krishnan, Vijai S., Samuel S. Shin, Visar Belegu, Pablo Celnik, Mark Reimers, Kylie R. Smith, et Galit Pelled. 2019. « Multimodal Evaluation of TMS - Induced Somatosensory Plasticity and Behavioral Recovery in Rats With Contusion Spinal Cord Injury ». *Frontiers in Neuroscience* 13:387. doi: 10.3389/fnins.2019.00387.
- Kumar, Anil T., U. Sudhir, K. Punith, Rahul Kumar, V. N. Ravi Kumar, et Medha Y. Rao. 2009. « Cytokine Profile in Elderly Patients with Sepsis ». *Indian Journal of Critical Care Medicine: Peer-Reviewed, Official Publication of Indian Society of Critical Care Medicine* 13(2):74. doi: 10.4103/0972-5229.56052.
- Kumar, Hemant, Hyemin Choi, Min-Jae Jo, Hari Joshi, Manjunatha Muttigi, Dario Bonanomi, Sung Kim, Eunmi Ban, Aeri Kim, Soo-Hong Lee, Kyoung-Tae Kim, Seil Sohn, Xiang Zeng, et Inbo Han. 2018. « Neutrophil elastase inhibition effectively rescued angiotensin-1 decrease and inhibits glial scar after spinal cord injury ». *Acta Neuropathologica Communications* 6.

doi: 10.1186/s40478-018-0576-3.

- Kumar, Sanni, Ena Gupta, Sanket Kaushik, Vijay Kumar Srivastava, Juhi Saxena, Sudhir Mehta, et Anupam Jyoti. 2019. « Quantification of NETs formation in neutrophil and its correlation with the severity of sepsis and organ dysfunction ». *Clinica Chimica Acta* 495:606-10. doi: 10.1016/j.cca.2019.06.008.
- Kwon, Hyuk Sung, et Seong-Ho Koh. 2020. « Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes ». *Translational Neurodegeneration* 9(1):42. doi: 10.1186/s40035-020-00221-2.
- Labonte, Adam C., Annie-Carole Tosello-Tramont, et Young S. Hahn. 2014. « The Role of Macrophage Polarization in Infectious and Inflammatory Diseases ». *Molecules and Cells* 37(4):275-85. doi: 10.14348/molcells.2014.2374.
- Lagord, C., M. Berry, et A. Logan. 2002. « Expression of TGFbeta2 but Not TGFbeta1 Correlates with the Deposition of Scar Tissue in the Lesioned Spinal Cord ». *Molecular and Cellular Neurosciences* 20(1):69-92. doi: 10.1006/mcne.2002.1121.
- Lang, Charles H., Robert A. Frost, et Thomas C. Vary. 2007. « Regulation of Muscle Protein Synthesis during Sepsis and Inflammation ». *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 293(2):E453-459. doi: 10.1152/ajpendo.00204.2007.
- Larsson, Britt-Marie, Kjell Larsson, Per Malmberg, et Lena Palmberg. 1999. « Gram Positive Bacteria Induce IL-6 and IL-8 Production in Human Alveolar Macrophages and Epithelial Cells ». *Inflammation* 23(3):217-30. doi: 10.1023/A:1020269802315.
- Lawson, L. J., V. H. Perry, P. Dri, et S. Gordon. 1990. « Heterogeneity in the Distribution and Morphology of Microglia in the Normal Adult Mouse Brain ». *Neuroscience* 39(1):151-70. doi: 10.1016/0306-4522(90)90229-W.
- Lee, Jin-Seok, Yoo-Jin Jeon, Ji-Yun Kang, Sam-Keun Lee, Hwa-Dong Lee, et Chang-Gue Son. 2020. « Aquilariae Lignum Methylene Chloride Fraction Attenuates IL-1 $\beta$ -Driven Neuroinflammation in BV2 Microglial Cells ». *International Journal of Molecular Sciences* 21(15):5465. doi: 10.3390/ijms21155465.
- Lee, Warren L., Rene E. Harrison, et Sergio Grinstein. 2003. « Phagocytosis by Neutrophils ». *Microbes and Infection* 5(14):1299-1306. doi: 10.1016/j.micinf.2003.09.014.
- Lee, Y. B., T. Y. Yune, S. Y. Baik, Y. H. Shin, S. Du, H. Rhim, E. B. Lee, Y. C. Kim, M. L. Shin, G. J. Markelonis, et T. H. Oh. 2000. « Role of Tumor Necrosis Factor-Alpha in Neuronal and Glial Apoptosis after Spinal Cord Injury ». *Experimental Neurology* 166(1):190-95. doi: 10.1006/exnr.2000.7494.
- Lekkou, A., M. Karakantza, A. Mouzaki, F. Kalfarentzos, et C. A. Gogos. 2004. « Cytokine Production and Monocyte HLA-DR Expression as Predictors of Outcome for Patients with Community-Acquired Severe Infections ». *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 11(1):161-67. doi: 10.1128/CDLI.11.1.161-167.2004.

- Lemstra, Afina W., Jacqueline CM Groen in't Woud, Jeroen JM Hoozemans, Elise S. van Haastert, Annemiek JM Rozemuller, Piet Eikelenboom, et Willem A. van Gool. 2007. « Microglia activation in sepsis: a case-control study ». *Journal of Neuroinflammation* 4:4. doi: 10.1186/1742-2094-4-4.
- Lenahan, Brian, John Street, Brian K. Kwon, Vanessa Noonan, Hongbin Zhang, Charles G. Fisher, et Marcel F. Dvorak. 2012. « The Epidemiology of Traumatic Spinal Cord Injury in British Columbia, Canada ». *Spine* 37(4):321. doi: 10.1097/BRS.0b013e31822e5ff8.
- Leppkes, Moritz, Jasmin Knopf, Elisabeth Naschberger, Aylin Lindemann, Jeeshan Singh, Irmgard Herrmann, Michael Stürzl, Léonie Staats, Aparna Mahajan, Christine Schauer, Anita N. Kremer, Simon Völkl, Kerstin Amann, Katja Evert, Christina Falkeis, Andreas Wehrfritz, Ralf J. Rieker, Arndt Hartmann, Andreas E. Kremer, Markus F. Neurath, Luis E. Muñoz, Georg Schett, et Martin Herrmann. 2020. « Vascular Occlusion by Neutrophil Extracellular Traps in COVID-19 ». *EBioMedicine* 58:102925. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102925.
- Lerman, Yelena V., et Minsoo Kim. 2015. « Neutrophil Migration under normal and sepsis conditions ». *Cardiovascular & hematological disorders drug targets* 15(1):19-28.
- Lerolle, Nicolas, Dominique Nochy, Emmanuel Guérot, Patrick Bruneval, Jean-Yves Fagon, Jean-Luc Diehl, et Gary Hill. 2010. « Histopathology of Septic Shock Induced Acute Kidney Injury: Apoptosis and Leukocytic Infiltration ». *Intensive Care Medicine* 36(3):471-78. doi: 10.1007/s00134-009-1723-x.
- Leshner, Marc, Shu Wang, Carrie Lewis, Han Zheng, Xiangyun Amy Chen, Lorraine Santy, et Yanming Wang. 2012. « PAD4 Mediated Histone Hypercitrullination Induces Heterochromatin Decondensation and Chromatin Unfolding to Form Neutrophil Extracellular Trap-like Structures ». *Frontiers in Immunology* 3. doi: 10.3389/fimmu.2012.00307.
- Levi, M., et T. Van Der Poll. 2013. « Thrombomodulin in Sepsis ». *Minerva Anestesiologica* 79(3):294-98.
- Levy, Bruno, Caroline Fritz, Caroline Piona, Kevin Duarte, Andrea Morelli, Philippe Guerci, Antoine Kimmoun, et Nicolas Girerd. 2021. « Hemodynamic and Anti-Inflammatory Effects of Early Esmolol Use in Hyperkinetic Septic Shock: A Pilot Study ». *Critical Care (London, England)* 25(1):21. doi: 10.1186/s13054-020-03445-w.
- Levy, M. N. 1997. « Neural Control of Cardiac Function ». *Bailliere's Clinical Neurology* 6(2):227-44.
- Levy, Mitchell M., Mitchell P. Fink, John C. Marshall, Edward Abraham, Derek Angus, Deborah Cook, Jonathan Cohen, Steven M. Opal, Jean-Louis Vincent, Graham Ramsay, et For the International Sepsis Definitions Conference. 2003. « 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference ». *Critical Care Medicine* 31(4):1250. doi: 10.1097/01.CCM.0000050454.01978.3B.
- Li, Danyang, et Minghua Wu. 2021. « Pattern Recognition Receptors in Health and Diseases ». *Signal Transduction and Targeted Therapy* 6(1):1-24. doi: 10.1038/s41392-021-00687-0.

- Li, Guan-Hong, Yoshinori Mine, Maxwell T. Hincke, et Yves Nys. 2007. « Isolation and Characterization of Antimicrobial Proteins and Peptide from Chicken Liver ». *Journal of Peptide Science: An Official Publication of the European Peptide Society* 13(6):368-78. doi: 10.1002/psc.851.
- Li, Pingxin, Ming Li, Michael R. Lindberg, Mary J. Kennett, Na Xiong, et Yanming Wang. 2010. « PAD4 Is Essential for Antibacterial Innate Immunity Mediated by Neutrophil Extracellular Traps ». *The Journal of Experimental Medicine* 207(9):1853-62. doi: 10.1084/jem.20100239.
- Li, Wen-Wu, Anna Setzu, Chao Zhao, et Robin J. M. Franklin. 2005. « Minocycline-Mediated Inhibition of Microglia Activation Impairs Oligodendrocyte Progenitor Cell Responses and Remyelination in a Non-Immune Model of Demyelination ». *Journal of Neuroimmunology* 158(1-2):58-66. doi: 10.1016/j.jneuroim.2004.08.011.
- Li, Yanpeng, Junli Ma, Jianjun Diao, Wei Chen, et Zhihua Wang. 2023. « Esmolol Inhibits Cognitive Impairment and Neuronal Inflammation in Mice with Sepsis-Induced Brain Injury ». *Translational Neuroscience* 14(1):20220297. doi: 10.1515/tnsci-2022-0297.
- Li, Yongqing, Baoling Liu, Eugene Y. Fukudome, Jenifer Lu, Wei Chong, Guang Jin, Zhengcai Liu, George C. Velmahos, Marc deMoya, David R. King, et Hasan B. Alam. 2011. « Identification of Cit H3 as a Potential Serum Protein Biomarker in a Lethal Model of LPS-induced Shock ». *Surgery* 150(3):442-51. doi: 10.1016/j.surg.2011.07.003.
- Li, Ziming, Tengfei Zhao, Jie Ding, Haochen Gu, Qiaoxuan Wang, Yifan Wang, Deteng Zhang, et Changyou Gao. 2023. « A reactive oxygen species-responsive hydrogel encapsulated with bone marrow derived stem cells promotes repair and regeneration of spinal cord injury ». *Bioactive Materials* 19:550-68. doi: 10.1016/j.bioactmat.2022.04.029.
- Lin, Chih-Chung, et Brian T. Edelson. 2017. « New Insights into the Role of IL-1 $\beta$  in EAE and MS ». *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 198(12):4553-60. doi: 10.4049/jimmunol.1700263.
- Lipski, J., A. Bektas, et R. Porter. 1986. « Short Latency Inputs to Phrenic Motoneurons from the Sensorimotor Cortex in the Cat ». *Experimental Brain Research* 61(2):280-90. doi: 10.1007/BF00239518.
- Liu, Ping, Qi Wu, Yu Tang, Zhiguo Zhou, et Malong Feng. 2018. « The Influence of Esmolol on Septic Shock and Sepsis: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Studies ». *The American Journal of Emergency Medicine* 36(3):470-74. doi: 10.1016/j.ajem.2017.11.013.
- Liu, Ting, Lingyun Zhang, Donghyun Joo, et Shao-Cong Sun. 2017. « NF- $\kappa$ B Signaling in Inflammation ». *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2(1):1-9. doi: 10.1038/sigtrans.2017.23.
- Liu, Yan-Cun, Mu-Ming Yu, Song-Tao Shou, et Yan-Fen Chai. 2017. « Sepsis-Induced Cardiomyopathy: Mechanisms and Treatments ». *Frontiers in Immunology* 8:1021. doi: 10.3389/fimmu.2017.01021.
- Locksley, Richard M., Nigel Killeen, et Michael J. Lenardo. 2001. « The TNF and TNF Receptor



- Superfamilies: Integrating Mammalian Biology ». *Cell* 104(4):487-501. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00237-9.
- López-Vales, Rubèn, Guillermo García-Álías, Joaquim Forés, José M. Vela, Xavier Navarro, et Enrique Verdú. 2004. « Transplanted Olfactory Ensheathing Cells Modulate the Inflammatory Response in the Injured Spinal Cord ». *Neuron Glia Biology* 1(3):201-9. doi: 10.1017/S1740925X05000037.
- Lorente-Sorolla, Clara, Antonio Garcia-Gomez, Francesc Català-Moll, Víctor Toledano, Laura Ciudad, José Avendaño-Ortiz, Charbel Maroun-Eid, Alejandro Martín-Quirós, Mónica Martínez-Gallo, Adolfo Ruiz-Sanmartín, Álvaro García del Campo, Ricard Ferrer-Roca, Juan Carlos Ruiz-Rodriguez, Damiana Álvarez-Errico, Eduardo López-Collazo, et Esteban Ballestar. 2019. « Inflammatory cytokines and organ dysfunction associate with the aberrant DNA methylation of monocytes in sepsis ». *Genome Medicine* 11(1):66. doi: 10.1186/s13073-019-0674-2.
- Loures, Flávio V., Marc Röhm, Chrono K. Lee, Evelyn Santos, Jennifer P. Wang, Charles A. Specht, Vera L. G. Calich, Constantin F. Urban, et Stuart M. Levitz. 2015. « Recognition of *Aspergillus fumigatus* Hyphae by Human Plasmacytoid Dendritic Cells Is Mediated by Dectin-2 and Results in Formation of Extracellular Traps ». *PLoS Pathogens* 11(2):e1004643. doi: 10.1371/journal.ppat.1004643.
- Lu, Kwok-Tung, Yi-Wen Wang, Jen-Tsung Yang, Yi-Ling Yang, et Hsing-I. Chen. 2005. « Effect of Interleukin-1 on Traumatic Brain Injury-Induced Damage to Hippocampal Neurons ». *Journal of Neurotrauma* 22(8):885-95. doi: 10.1089/neu.2005.22.885.
- Lu, Yong-Chen, Wen-Chen Yeh, et Pamela S. Ohashi. 2008. « LPS/TLR4 Signal Transduction Pathway ». *Cytokine* 42(2):145-51. doi: 10.1016/j.cyto.2008.01.006.
- Luan, Ying-Yi, Ning Dong, Meng Xie, Xian-Zhong Xiao, et Yong-Ming Yao. 2014. « The Significance and Regulatory Mechanisms of Innate Immune Cells in the Development of Sepsis ». *Journal of Interferon & Cytokine Research* 34(1):2-15. doi: 10.1089/jir.2013.0042.
- Luan, Ying-yi, Yong-ming Yao, Xian-zhong Xiao, et Zhi-yong Sheng. 2015. « Insights into the Apoptotic Death of Immune Cells in Sepsis ». *Journal of Interferon & Cytokine Research* 35(1):17-22. doi: 10.1089/jir.2014.0069.
- Lukacs-Kornek, Veronika, et Shannon J. Turley. 2011. « Self-antigen presentation by dendritic cells and lymphoid stroma and its implications for autoimmunity ». *Current Opinion in Immunology* 23(1):138-45. doi: 10.1016/j.coi.2010.11.012.
- Lull, Melinda E., et Michelle L. Block. 2010. « Microglial activation and chronic neurodegeneration ». *Neurotherapeutics* 7(4):354-65. doi: 10.1016/j.nurt.2010.05.014.
- Luo, Keqin, Huibao Long, Bincan Xu, et Yanling Luo. 2015. « Metallothionein ameliorates burn sepsis partly via activation of Akt signaling pathway in mice: A randomized animal study ». *World journal of emergency surgery: WJES* 10:53. doi: 10.1186/s13017-015-0044-3.
- Ma, Qinying, Yuan Geng, Hua-long Wang, Bing Han, Yan-yong Wang, Xiao-li Li, Lin Wang, et

- Ming-wei Wang. 2019. « High Frequency Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation Alleviates Cognitive Impairment and Modulates Hippocampal Synaptic Structural Plasticity in Aged Mice ». *Frontiers in Aging Neuroscience* 11:235. doi: 10.3389/fnagi.2019.00235.
- Ma, Shuai, Roger G. Evans, Naoya Iguchi, Marianne Tare, Helena C. Parkinson, Rinaldo Bellomo, Clive N. May, et Yugeesh R. Lankadeva. 2019. « Sepsis-Induced Acute Kidney Injury: A Disease of the Microcirculation ». *Microcirculation (New York, N.Y.: 1994)* 26(2):e12483. doi: 10.1111/micc.12483.
- Ma, Yonggang, Andriy Yabluchanskiy, et Merry L. Lindsey. 2013. « Neutrophil roles in left ventricular remodeling following myocardial infarction ». *Fibrogenesis & Tissue Repair* 6(1):11. doi: 10.1186/1755-1536-6-11.
- Maier, Stefan, Tobias Traeger, Markus Entleutner, Alexandra Westerholt, Britta Kleist, Norbert Hüser, Bernhard Holzmann, Albrecht Stier, Klaus Pfeffer, et Claus-Dieter Heidecke. 2004. « Cecal Ligation and Puncture versus Colon Ascendens Stent Peritonitis: Two Distinct Animal Models for Polymicrobial Sepsis ». *Shock (Augusta, Ga.)* 21(6):505-11. doi: 10.1097/01.shk.0000126906.52367.dd.
- Mäkelä, Sanna M., Pamela Österlund, et Ilkka Julkunen. 2011. « TLR Ligands Induce Synergistic Interferon- $\beta$  and Interferon- $\lambda$ 1 Gene Expression in Human Monocyte-Derived Dendritic Cells ». *Molecular Immunology* 48(4):505-15. doi: 10.1016/j.molimm.2010.10.005.
- Manda-Handzlik, Aneta, et Urszula Demkow. 2019. « The Brain Entangled: The Contribution of Neutrophil Extracellular Traps to the Diseases of the Central Nervous System ». *Cells* 8(12):1477. doi: 10.3390/cells8121477.
- March, C. J., B. Mosley, A. Larsen, D. P. Cerretti, G. Braedt, V. Price, S. Gillis, C. S. Henney, S. R. Kronheim, et K. Grabstein. 1985. « Cloning, Sequence and Expression of Two Distinct Human Interleukin-1 Complementary DNAs ». *Nature* 315(6021):641-47. doi: 10.1038/315641a0.
- Marcol, Wiesław, Wojciech Ślusarczyk, Marek Gzik, Magdalena Larysz-Brysz, Michał Bobrowski, Beata Gryniewicz-Bylina, Paulina Rosicka, Katarzyna Kalita, Władysław Węglarz, Jarosław J. Barski, Katarzyna Kotulska, Krzysztof Łabuzek, et Joanna Lewin-Kowalik. 2012. « Air Gun Impactor—A Novel Model of Graded White Matter Spinal Cord Injury in Rodents ». *Journal of Reconstructive Microsurgery* 28(08):561-68. doi: 10.1055/s-0032-1315779.
- Marques, Suelen Adriani, Valéria Ferreira Garcez, Elaine A. Del Bel, et Ana Maria Blanco Martinez. 2009. « A Simple, Inexpensive and Easily Reproducible Model of Spinal Cord Injury in Mice: Morphological and Functional Assessment ». *Journal of Neuroscience Methods* 177(1):183-93. doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.10.015.
- Martin, Donel M., Shawn M. McClintock, Jane J. Forster, Tin Yan Lo, et Colleen K. Loo. 2017. « Cognitive Enhancing Effects of rTMS Administered to the Prefrontal Cortex in Patients with Depression: A Systematic Review and Meta-Analysis of Individual Task Effects ». *Depression and Anxiety* 34(11):1029-39. doi: 10.1002/da.22658.

- Martin, Greg S., David M. Mannino, Stephanie Eaton, et Marc Moss. 2003. « The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000 ». *New England Journal of Medicine* 348(16):1546-54. doi: 10.1056/NEJMoa022139.
- Martin, Greg S., David M. Mannino, et Marc Moss. 2006. « The Effect of Age on the Development and Outcome of Adult Sepsis ». *Critical Care Medicine* 34(1):15-21. doi: 10.1097/01.ccm.0000194535.82812.ba.
- Martin-Fernandez, M., L. M. Vaquero-Roncero, R. Almansa, E. Gómez-Sánchez, S. Martín, E. Tamayo, M. C. Esteban-Velasco, P. Ruiz-Granado, M. Aragón, D. Calvo, J. Rico-Feijoo, A. Ortega, E. Gómez-Pesquera, M. Lorenzo-López, J. López, C. Doncel, C. González-Sanchez, D. Álvarez, E. Zarca, A. Ríos-Llorente, A. Díaz-Alvarez, E. Sanchez-Barrado, D. Andaluz-Ojeda, J. M. Calvo-Vecino, L. Muñoz-Bellví, J. I. Gomez-Herrerias, C. Abad-Molina, J. F. Bermejo-Martin, C. Aldecoa, et M. Heredia-Rodríguez. 2020. « Endothelial Dysfunction Is an Early Indicator of Sepsis and Neutrophil Degranulation of Septic Shock in Surgical Patients ». *BJS Open* 4(3):524-34. doi: 10.1002/bjs5.50265.
- Martinod, K., T. Witsch, K. Farley, M. Gallant, E. Remold-O'Donnell, et D. D. Wagner. 2016. « Neutrophil Elastase-Deficient Mice Form Neutrophil Extracellular Traps in an Experimental Model of Deep Vein Thrombosis ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 14(3):551-58. doi: 10.1111/jth.13239.
- Martins, Paulo Sergio, Esper Georges Kallas, Miguel Cendoroglo Neto, Maria Aparecida Dalboni, Sérgio Blecher, et Reinaldo Salomão. 2003. « Upregulation of Reactive Oxygen Species Generation and Phagocytosis, and Increased Apoptosis in Human Neutrophils During Severe Sepsis and Septic Shock ». *Shock* 20(3):208. doi: 10.1097/01.shk.0000079425.52617.db.
- Marufa, Siti Ainun, Tsung-Hsun Hsieh, Jian-Chiun Liou, Hsin-Yung Chen, et Chih-Wei Peng. 2021. « Neuromodulatory effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on neural plasticity and motor functions in rats with an incomplete spinal cord injury: A preliminary study ». *PLoS ONE* 16(6):e0252965. doi: 10.1371/journal.pone.0252965.
- Matthay, Michael A., Lorraine B. Ware, et Guy A. Zimmerman. 2012. « The Acute Respiratory Distress Syndrome ». *The Journal of Clinical Investigation* 122(8):2731-40. doi: 10.1172/JCI60331.
- Mayr, Florian B., Sachin Yende, Walter T. Linde-Zwirble, Octavia M. Peck-Palmer, Amber E. Barnato, Lisa A. Weissfeld, et Derek C. Angus. 2010. « Infection Rate and Acute Organ Dysfunction Risk as Explanations for Racial Differences in Severe Sepsis ». *JAMA* 303(24):2495-2503. doi: 10.1001/jama.2010.851.
- McCorry, Laurie Kelly. 2007. « Physiology of the Autonomic Nervous System ». *American Journal of Pharmaceutical Education* 71(4):78.
- McDonald, Braedon, Rachelle P. Davis, Seok-Joo Kim, Mandy Tse, Charles T. Esmon, Elzbieta Kolaczowska, et Craig N. Jenne. 2017. « Platelets and neutrophil extracellular traps collaborate to promote intravascular coagulation during sepsis in mice ». *Blood* 129(10):1357-67. doi: 10.1182/blood-2016-09-741298.

- McMaster University. 2022. *Intravenous DNase I for the Treatment of Sepsis: A Phase I Safety and Feasibility Study in ICU Patients*. *Clinical trial registration*. NCT05453695. clinicaltrials.gov.
- McTigue, D. M., P. G. Popovich, T. E. Morgan, et B. T. Stokes. 2000. « Localization of Transforming Growth Factor-Beta1 and Receptor mRNA after Experimental Spinal Cord Injury ». *Experimental Neurology* 163(1):220-30. doi: 10.1006/exnr.2000.7372.
- Medzhitov, Ruslan. 2008. « Origin and Physiological Roles of Inflammation ». *Nature* 454(7203):428-35. doi: 10.1038/nature07201.
- Meher, Akshaya K., Michael Spinosa, John P. Davis, Nicolas Pope, Victor E. Laubach, Gang Su, Vlad Serbulea, Norbert Leitinger, Gorav Ailawadi, et Gilbert R. Upchurch. 2018. « Novel Role of IL (Interleukin)-1 $\beta$  in Neutrophil Extracellular Trap Formation and Abdominal Aortic Aneurysms ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 38(4):843-53. doi: 10.1161/ATVBAHA.117.309897.
- Menegazzo, Lisa, Stefano Ciciliot, Nicol Poncina, Marta Mazzucato, Mariasara Persano, Benedetta Bonora, Mattia Albiero, Saula Vigili de Kreutzenberg, Angelo Avogaro, et Gian Paolo Fadini. 2015. « NETosis Is Induced by High Glucose and Associated with Type 2 Diabetes ». *Acta Diabetologica* 52(3):497-503. doi: 10.1007/s00592-014-0676-x.
- Meng, Wei, Adnana Paunel-Görgülü, Sascha Flohé, Almuth Hoffmann, Ingo Witte, Colin MacKenzie, Stephan E. Baldus, Joachim Windolf, et Tim T. Lögters. 2012. « Depletion of Neutrophil Extracellular Traps in Vivo Results in Hypersusceptibility to Polymicrobial Sepsis in Mice ». *Critical Care (London, England)* 16(4):R137. doi: 10.1186/cc11442.
- Mera, Simona, Doina Tatulescu, Cristina Cismaru, Cosmina Bondor, Adriana Slavcovici, Virginia Zanc, Dumitru Carstina, et Mihai Oltean. 2011. « Multiplex Cytokine Profiling in Patients with Sepsis ». *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* 119(2):155-63. doi: 10.1111/j.1600-0463.2010.02705.x.
- Merdji, Hamid, Valérie Schini-Kerth, Ferhat Meziani, et Florence Toti. 2021. « Long-term cardiovascular complications following sepsis: is senescence the missing link? ». *Annals of Intensive Care* 11(1):166. doi: 10.1186/s13613-021-00937-y.
- Michel-Flutot, Pauline, Camille H. Bourcier, Laila Emam, Adeline Gasser, Simon Glatigny, Stéphane Vinit, et Arnaud Mansart. 2022. « Extracellular Traps Formation Following Cervical Spinal Cord Injury ». *The European Journal of Neuroscience*.
- Michel-Flutot, Pauline, Laurie Efthimiadi, Lynda Djerbal, Therese B. Deramautd, Marcel Bonay, et Stéphane Vinit. 2022. « AMPK-Nrf2 Signaling Pathway in Phrenic Motoneurons Following Cervical Spinal Cord Injury ». *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 11(9):1665. doi: 10.3390/antiox11091665.
- Michel-Flutot, Pauline, Arnaud Mansart, Abdallah Faysoil, et Stéphane Vinit. 2022. « Effects of C2 hemisection on respiratory and cardiovascular functions in rats ». *Neural Regeneration Research* 18(2):428-33. doi: 10.4103/1673-5374.346469.
- Mihaylova, Stanka, Anke Killian, Konstantin Mayer, Soni Savai Pullamsetti, Ralph Schermuly, et

- Bernhard Rosengarten. 2012. « Effects of anti-inflammatory vagus nerve stimulation on the cerebral microcirculation in endotoxemic rats ». *Journal of Neuroinflammation* 9(1):183. doi: 10.1186/1742-2094-9-183.
- Mikacenic, Carmen, Richard Moore, Victoria Dmyterko, T. Eoin West, William A. Altemeier, W. Conrad Liles, et Christian Lood. 2018. « Neutrophil Extracellular Traps (NETs) Are Increased in the Alveolar Spaces of Patients with Ventilator-Associated Pneumonia ». *Critical Care* 22(1):358. doi: 10.1186/s13054-018-2290-8.
- Mills, Charles D., Kristi Kincaid, Jennifer M. Alt, Michelle J. Heilman, et Annette M. Hill. 2000. « M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm1 ». *The Journal of Immunology* 164(12):6166-73. doi: 10.4049/jimmunol.164.12.6166.
- Mishra, Meenu, Matthew S. Byrd, Susan Sergeant, Abul K. Azad, Matthew R. Parsek, Linda McPhail, Larry S. Schlesinger, et Daniel J. Wozniak. 2012. « Pseudomonas Aeruginosa Psl Polysaccharide Reduces Neutrophil Phagocytosis and the Oxidative Response by Limiting Complement-Mediated Opsonization ». *Cellular Microbiology* 14(1):95-106. doi: 10.1111/j.1462-5822.2011.01704.x.
- Mizuno, Kenji, Hideo Kohka Takahashi, Hiromi Iwagaki, Goutaro Katsuno, Huda A. S. M. Kamurul, Satoru Ohtani, Shuji Mori, Tadashi Yoshino, Masahiro Nishibori, et Noriaki Tanaka. 2005. «  $\beta$ 2-Adrenergic receptor stimulation inhibits LPS-induced IL-18 and IL-12 production in monocytes ». *Immunology Letters* 101(2):168-72. doi: 10.1016/j.imlet.2005.05.008.
- Mohanan, Sunish, Sachi Horibata, John L. McElwee, Andrew J. Dannenberg, et Scott A. Coonrod. 2013. « Identification of Macrophage Extracellular Trap-Like Structures in Mammary Gland Adipose Tissue: A Preliminary Study ». *Frontiers in Immunology* 4:67. doi: 10.3389/fimmu.2013.00067.
- Monnier, Philippe P., Ana Sierra, Jan M. Schwab, Sigrid Henke-Fahle, et Bernhard K. Mueller. 2003. « The Rho/ROCK Pathway Mediates Neurite Growth-Inhibitory Activity Associated with the Chondroitin Sulfate Proteoglycans of the CNS Glial Scar ». *Molecular and Cellular Neurosciences* 22(3):319-30. doi: 10.1016/s1044-7431(02)00035-0.
- Morelli, Andrea, Christian Ertmer, Martin Westphal, Sebastian Rehberg, Tim Kampmeier, Sandra Ligges, Alessandra Orecchioni, Annalia D'Egidio, Fiorella D'Ippoliti, Cristina Raffone, Mario Venditti, Fabio Guarracino, Massimo Girardis, Luigi Tritapepe, Paolo Pietropaoli, Alexander Mebazaa, et Mervyn Singer. 2013. « Effect of Heart Rate Control With Esmolol on Hemodynamic and Clinical Outcomes in Patients With Septic Shock: A Randomized Clinical Trial ». *JAMA* 310(16):1683-91. doi: 10.1001/jama.2013.278477.
- Morelli, Andrea, et Maurizio Passariello. 2016. « Hemodynamic Coherence in Sepsis ». *Best Practice & Research. Clinical Anaesthesiology* 30(4):453-63. doi: 10.1016/j.bpa.2016.10.009.
- Morshed, Mahbulbul, Ruslan Hlushchuk, Dagmar Simon, Andrew F. Walls, Kazushige Obata-Ninomiya, Hajime Karasuyama, Valentin Djonov, Alexander Egel, Thomas Kaufmann, Hans-Uwe Simon, et Shida Yousefi. 2014. « NADPH Oxidase-Independent Formation of Extracellular DNA Traps by Basophils ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 192(11):5314-23. doi: 10.4049/jimmunol.1303418.

- Mossman, B. T., et A. Churg. 1998. « Mechanisms in the Pathogenesis of Asbestosis and Silicosis ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 157(5 Pt 1):1666-80. doi: 10.1164/ajrccm.157.5.9707141.
- Mostel, Zachary, Abraham Perl, Matthew Marck, Syed F. Mehdi, Barbara Lowell, Sagar Bathija, Ramchandani Santosh, Valentin A. Pavlov, Sangeeta S. Chavan, et Jesse Roth. 2019. « Post-sepsis syndrome – an evolving entity that afflicts survivors of sepsis ». *Molecular Medicine* 26(1):6. doi: 10.1186/s10020-019-0132-z.
- Mukai, K., et S. J. Galli. 2013. « Basophils ». in *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Mukai, Kaori, Mindy Tsai, Hirohisa Saito, et Stephen J. Galli. 2018. « Mast Cells as Sources of Cytokines, Chemokines, and Growth Factors ». *Immunological Reviews* 282(1):121-50. doi: 10.1111/imr.12634.
- Muñoz-Caro, Tamara, Liliana M. R. Silva, Christin Ritter, Anja Taubert, et Carlos Herмосilla. 2014. « Besnoitia Besnoiti Tachyzoites Induce Monocyte Extracellular Trap Formation ». *Parasitology Research* 113(11):4189-97. doi: 10.1007/s00436-014-4094-3.
- van Munster, Barbara C., Eleonora Aronica, Aeilko H. Zwinderman, Piet Eikelenboom, Colm Cunningham, et Sophia E. J. A. de Rooij. 2011. « Neuroinflammation in Delirium: A Postmortem Case-Control Study ». *Rejuvenation Research* 14(6):615-22. doi: 10.1089/rej.2011.1185.
- Muraki, TAKAMURA, TOSHIO Nakaki, et RYUICHI Kato. 1984. « Predominance of  $\alpha$ 2-Adrenoceptors in Porcine Thyroid: Biochemical and Pharmacological Correlations\* ». *Endocrinology* 114(5):1645-51. doi: 10.1210/endo-114-5-1645.
- Murao, Atsushi, Takayuki Kato, Tetsunobu Yamane, Goichi Honda, et Yutaka Eguchi. 2022. « Benefit Profile of Thrombomodulin Alfa Combined with Antithrombin Concentrate in Patients with Sepsis-Induced Disseminated Intravascular Coagulation ». *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis: Official Journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* 28:10760296221077096. doi: 10.1177/10760296221077096.
- Murray, D. R., S. D. Prabhu, et B. Chandrasekar. 2000. « Chronic Beta-Adrenergic Stimulation Induces Myocardial Proinflammatory Cytokine Expression ». *Circulation* 101(20):2338-41. doi: 10.1161/01.cir.101.20.2338.
- Muthu, Kuzhali, Jiangping Deng, Richard Gamelli, Ravi Shankar, et Stephen B. Jones. 2005. « Adrenergic Modulation of Cytokine Release in Bone Marrow Progenitor-Derived Macrophage Following Polymicrobial Sepsis ». *Journal of Neuroimmunology* 158(1-2):50-57. doi: 10.1016/j.jneuroim.2004.08.003.
- Mutua, Victoria, et Laurel J. Gershwin. 2021. « A Review of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Disease: Potential Anti-NETs Therapeutics ». *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 61(2):194-211. doi: 10.1007/s12016-020-08804-7.
- Muzio, Luca, Alice Viotti, et Gianvito Martino. 2021. « Microglia in Neuroinflammation and

- Neurodegeneration: From Understanding to Therapy ». *Frontiers in Neuroscience* 15.
- Nachtigall, Irit, Sascha Tafelski, Andreas Rothbart, Lutz Kaufner, Maren Schmidt, Andrey Tamarkin, Maxim Kartachov, Daniela Zebedies, Tanja Trefzer, Klaus-Dieter Wernecke, et Claudia Spies. 2011. « Gender-related outcome difference is related to course of sepsis on mixed ICUs: a prospective, observational clinical study ». *Critical Care* 15(3):R151. doi: 10.1186/cc10277.
- Nag, S., P. Picard, et D. J. Stewart. 2000. « Increased Immunolocalization of Nitric Oxide Synthases during Blood-Brain Barrier Breakdown and Cerebral Edema ». *Acta Neurochirurgica. Supplement* 76:65-68. doi: 10.1007/978-3-7091-6346-7\_13.
- Nakajima, K., S. Honda, Y. Tohyama, Y. Imai, S. Kohsaka, et T. Kurihara. 2001. « Neurotrophin Secretion from Cultured Microglia ». *Journal of Neuroscience Research* 65(4):322-31. doi: 10.1002/jnr.1157.
- Nakajima, Kazuyuki, et Shinichi Kohsaka. 2004. « Microglia: Neuroprotective and Neurotrophic Cells in the Central Nervous System ». *Current Drug Targets. Cardiovascular & Haematological Disorders* 4(1):65-84. doi: 10.2174/1568006043481284.
- Nardelli, Paul, Jacob A. Vincent, Randall Powers, Tim C. Cope, et Mark M. Rich. 2016. « Reduced motor neuron excitability is an important contributor to weakness in a rat model of sepsis ». *Experimental neurology* 282:1-8. doi: 10.1016/j.expneurol.2016.04.020.
- Nathan, Carl, et Aihao Ding. 2010. « Nonresolving Inflammation ». *Cell* 140(6):871-82. doi: 10.1016/j.cell.2010.02.029.
- National Spinal Cord Injury Statistical Center. 2013. « Spinal Cord Injury Facts and Figures at a Glance ». *The Journal of Spinal Cord Medicine* 36(1):1-2. doi: 10.1179/1079026813Z.000000000136.
- Nauseef, William M. 2007. « How Human Neutrophils Kill and Degrade Microbes: An Integrated View ». *Immunological Reviews* 219(1):88-102. doi: 10.1111/j.1600-065X.2007.00550.x.
- Nesic, O., G. Y. Xu, D. McAdoo, K. W. High, C. Hulsebosch, et R. Perez-Pol. 2001. « IL-1 Receptor Antagonist Prevents Apoptosis and Caspase-3 Activation after Spinal Cord Injury ». *Journal of Neurotrauma* 18(9):947-56. doi: 10.1089/089771501750451857.
- Nessler, Nicolas, Yoann Launey, Caroline Aninat, Fabrice Morel, Yannick Mallédant, et Philippe Seguin. 2012. « Clinical review: The liver in sepsis ». *Critical Care* 16(5):235. doi: 10.1186/cc11381.
- Neumann, Jens, Sophie Henneberg, Susanne von Kenne, Niklas Nolte, Andreas J. Müller, Burkhart Schraven, Michael W. Görtler, Klaus G. Reymann, Matthias Gunzer, et Monika Riek-Burchardt. 2018. « Beware the Intruder: Real Time Observation of Infiltrated Neutrophils and Neutrophil—Microglia Interaction during Stroke in Vivo ». *PLOS ONE* 13(3):e0193970. doi: 10.1371/journal.pone.0193970.
- Nguyen, Hai M., Eva M. Grössinger, Makoto Horiuchi, Kyle W. Davis, Lee-Way Jin, Izumi Maezawa,



- et Heike Wulff. 2017. « Differential Kv1.3, KCa3.1, and Kir2.1 Expression in “Classically” and “Alternatively” Activated Microglia ». *Glia* 65(1):106-21. doi: 10.1002/glia.23078.
- Nguyen, Hal X., Thaddeus J. O’Barr, et Aileen J. Anderson. 2007. « Polymorphonuclear Leukocytes Promote Neurotoxicity through Release of Matrix Metalloproteinases, Reactive Oxygen Species, and TNF-Alpha ». *Journal of Neurochemistry* 102(3):900-912. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04643.x.
- Nicola, F. C., L. P. Rodrigues, T. Crestani, K. Quintiliano, E. F. Sanches, S. Willborn, D. Aristimunha, L. Boisserand, P. Pranke, et C. A. Netto. 2016. « Human Dental Pulp Stem Cells Transplantation Combined with Treadmill Training in Rats after Traumatic Spinal Cord Injury ». *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas* 49(9):e5319. doi: 10.1590/1414-431X20165319.
- Niemelä, M. J., K. E. Airaksinen, et H. V. Huikuri. 1994. « Effect of Beta-Blockade on Heart Rate Variability in Patients with Coronary Artery Disease ». *Journal of the American College of Cardiology* 23(6):1370-77. doi: 10.1016/0735-1097(94)90379-4.
- Niessen, Frank, Florence Schaffner, Christian Furlan-Freguia, Rafal Pawlinski, Gourab Bhattacharjee, Jerold Chun, Claudia K. Derian, Patricia Andrade-Gordon, Hugh Rosen, et Wolfram Ruf. 2008. « Dendritic Cell PAR1-S1P3 Signalling Couples Coagulation and Inflammation ». *Nature* 452(7187):654-58. doi: 10.1038/nature06663.
- Nimmerjahn, Axel, Frank Kirchhoff, et Fritjof Helmchen. 2005. « Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo ». *Science* 308(5726):1314-18. doi: 10.1126/science.1110647.
- Norbury, William B., Marc G. Jeschke, et David N. Herndon. 2007. « Metabolism Modulators in Sepsis: Propranolol ». *Critical Care Medicine* 35(9 Suppl):S616-620. doi: 10.1097/01.CCM.0000278599.30298.80.
- Nuki, George, et Peter A. Simkin. 2006. « A concise history of gout and hyperuricemia and their treatment ». *Arthritis Research & Therapy* 8(Suppl 1):S1. doi: 10.1186/ar1906.
- O’Connell, Karyn E., Amy M. Mikkola, Aaron M. Stepanek, Andyna Vernet, Christopher D. Hall, Chia C. Sun, Eda Yildirim, John F. Staropoli, Jeannie T. Lee, et Diane E. Brown. 2015. « Practical Murine Hematopathology: A Comparative Review and Implications for Research ». *Comparative Medicine* 65(2):96-113.
- Okeke, Emeka B., Cameron Louttit, Chris Fry, Alireza Hassani Najafabadi, Kai Han, Jean Nemzek, et James J. Moon. 2020. « Inhibition of Neutrophil Elastase Prevents Neutrophil Extracellular Trap Formation and Rescues Mice from Endotoxic Shock ». *Biomaterials* 238:119836. doi: 10.1016/j.biomaterials.2020.119836.
- OMS. 2013. « Spinal cord injury ». Consulté 14 février 2023 (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/spinal-cord-injury>).
- O’Neill, Luke A. J., et Andrew G. Bowie. 2007. « The Family of Five: TIR-Domain-Containing Adaptors in Toll-like Receptor Signalling ». *Nature Reviews Immunology* 7(5):353-64. doi:

- 10.1038/nri2079.
- Opal, S. M., et V. A. DePalo. 2000. « Anti-Inflammatory Cytokines ». *Chest* 117(4):1162-72. doi: 10.1378/chest.117.4.1162.
- Ostrowski, Sisse R., Shahin Gâini, Court Pedersen, et Pär I. Johansson. 2015. « Sympathoadrenal Activation and Endothelial Damage in Patients with Varying Degrees of Acute Infectious Disease: An Observational Study ». *Journal of Critical Care* 30(1):90-96. doi: 10.1016/j.jcrc.2014.10.006.
- Page, Richard L., José A. Joglar, Mary A. Caldwell, Hugh Calkins, Jamie B. Conti, Barbara J. Deal, N. A. Mark Estes, Michael E. Field, Zachary D. Goldberger, Stephen C. Hammill, Julia H. Indik, Bruce D. Lindsay, Brian Olshansky, Andrea M. Russo, Win-Kuang Shen, Cynthia M. Tracy, Sana M. Al-Khatib, et Evidence Review Committee Chair#. 2016. « 2015 ACC/AHA/HRS Guideline for the Management of Adult Patients With Supraventricular Tachycardia: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines and the Heart Rhythm Society ». *Circulation* 133(14):e506-574. doi: 10.1161/CIR.0000000000000311.
- Pan, Jonathan Z., Li Ni, Ajeet Sodhi, Ann Aguanno, Wise Young, et Ronald P. Hart. 2002. « Cytokine Activity Contributes to Induction of Inflammatory Cytokine mRNAs in Spinal Cord Following Contusion ». *Journal of Neuroscience Research* 68(3):315-22. doi: 10.1002/jnr.10215.
- Pancoto, João Alexandre Trés, Pollyanna Barbosa Farias Corrêa, Gabriela Ravanelli Oliveira-Pelegrin, et Maria José Alves Rocha. 2008. « Autonomic Dysfunction in Experimental Sepsis Induced by Cecal Ligation and Puncture ». *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 138(1):57-63. doi: 10.1016/j.autneu.2007.10.006.
- Panico, Karine, Mariana V. Abrahão, Mayra Trentin-Sonoda, Humberto Muzi-Filho, Adalberto Vieyra, et Marcela S. Carneiro-Ramos. 2019. « Cardiac Inflammation after Ischemia-Reperfusion of the Kidney: Role of the Sympathetic Nervous System and the Renin-Angiotensin System | Cell Physiol Biochem ». *Cellular Physiology & Biochemistry* 53(4):587-605.
- Papayannopoulos, Venizelos, Kathleen D. Metzler, Abdul Hakkim, et Arturo Zychlinsky. 2010. « Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps ». *Journal of Cell Biology* 191(3):677-91. doi: 10.1083/jcb.201006052.
- Park, Inwon, Mingyo Kim, Kibaek Choe, Eunjoo Song, Howon Seo, Yoonha Hwang, Jinhyo Ahn, Seung-Hyo Lee, Jae Hyuk Lee, You Hwan Jo, Kyuseok Kim, Gou Young Koh, et Pilhan Kim. 2019. « Neutrophils Disturb Pulmonary Microcirculation in Sepsis-Induced Acute Lung Injury ». *The European Respiratory Journal* 53(3):1800786. doi: 10.1183/13993003.00786-2018.
- Parker, Heather, Mike Dragunow, Mark B. Hampton, Anthony J. Kettle, et Christine C. Winterbourn. 2012. « Requirements for NADPH Oxidase and Myeloperoxidase in Neutrophil Extracellular Trap Formation Differ Depending on the Stimulus ». *Journal of Leukocyte Biology* 92(4):841-49. doi: 10.1189/jlb.1211601.

- Patel, Urmi, Sheeja Rajasingh, Saheli Samanta, Thuy Cao, Buddhadeb Dawn, et Johnson Rajasingh. 2017. « Macrophage Polarization in Response to Epigenetic Modifiers during Infection and Inflammation ». *Drug Discovery Today* 22(1):186-93. doi: 10.1016/j.drudis.2016.08.006.
- Patterson, Andrew J., Weizhong Zhu, Amy Chow, Rani Agrawal, Jon Kosek, Rui Ping Xiao, et Brian Kobilka. 2004. « Protecting the Myocardium: A Role for the Beta2 Adrenergic Receptor in the Heart ». *Critical Care Medicine* 32(4):1041-48. doi: 10.1097/01.ccm.0000120049.43113.90.
- Pendleton, James C., Michael J. Shambloott, Devin S. Gary, Visar Belegu, Andres Hurtado, Misti L. Malone, et John W. McDonald. 2013. « Chondroitin Sulfate Proteoglycans Inhibit Oligodendrocyte Myelination through PTP $\sigma$  ». *Experimental Neurology* 247:113-21. doi: 10.1016/j.expneurol.2013.04.003.
- Peng, Xiaoyao, Zhixuan Luo, Shuang He, Luhua Zhang, et Ying Li. 2021. « Blood-Brain Barrier Disruption by Lipopolysaccharide and Sepsis-Associated Encephalopathy ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 11:768108. doi: 10.3389/fcimb.2021.768108.
- Perianayagam, M. C., V. S. Balakrishnan, B. J. G. Pereira, et B. L. Jaber. 2004. « C5a Delays Apoptosis of Human Neutrophils via an Extracellular Signal-Regulated Kinase and Bad-Mediated Signalling Pathway ». *European Journal of Clinical Investigation* 34(1):50-56. doi: 10.1111/j.1365-2362.2004.01273.x.
- Peter S. Tobias, Katrin Soldau, et Richard J. Ulevitch. 1986. « Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum ». *The Journal of Experimental Medicine* 164(3):777-93.
- Peterson, M. W., M. E. Walter, et S. D. Nygaard. 1995. « Effect of neutrophil mediators on epithelial permeability. » *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 13(6):719-27. doi: 10.1165/ajrcmb.13.6.7576710.
- Petrosyan, Hayk A., Valentina Alessi, Sue A. Sisto, Mark Kaufman, et Victor L. Arvanian. 2017. « Transcranial Magnetic Stimulation (TMS) Responses Elicited in Hindlimb Muscles as an Assessment of Synaptic Plasticity in Spino-Muscular Circuitry after Chronic Spinal Cord Injury ». *Neuroscience Letters* 642:37-42. doi: 10.1016/j.neulet.2017.01.065.
- Pieterse, Elmar, Nils Rother, Cansu Yanginlar, Jelle Gerretsen, Sebastian Boeltz, Luis Enrique Munoz, Martin Herrmann, Peter Pickkers, Luuk B. Hilbrands, et Johan van der Vlag. 2018. « Cleaved N-Terminal Histone Tails Distinguish between NADPH Oxidase (NOX)-Dependent and NOX-Independent Pathways of Neutrophil Extracellular Trap Formation ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 77(12):1790-98. doi: 10.1136/annrheumdis-2018-213223.
- Pietronigro, Enrica Caterina, Vittorina Della Bianca, Elena Zenaro, et Gabriela Constantin. 2017. « NETosis in Alzheimer's Disease ». *Frontiers in Immunology* 8:211. doi: 10.3389/fimmu.2017.00211.
- Piliponsky, Adrian M., Manasa Acharya, et Nicholas J. Shubin. 2019. « Mast Cells in Viral, Bacterial,

- and Fungal Infection Immunity ». *International Journal of Molecular Sciences* 20(12):2851. doi: 10.3390/ijms20122851.
- Pilsczek, Florian H., Davide Salina, Karen K. H. Poon, Candace Fahey, Bryan G. Yipp, Christopher D. Sibley, Stephen M. Robbins, Francis H. Y. Green, Mike G. Surette, Motoyuki Sugai, M. Gabriela Bowden, Muzaffar Hussain, Kunyan Zhang, et Paul Kubes. 2010. « A Novel Mechanism of Rapid Nuclear Neutrophil Extracellular Trap Formation in Response to *Staphylococcus Aureus* ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 185(12):7413-25. doi: 10.4049/jimmunol.1000675.
- Poehlmann, Holger, Joerg C. Scheffold, Heidrun Zuckermann-Becker, Hans-Dieter Volk, et Christian Meisel. 2009. « Phenotype Changes and Impaired Function of Dendritic Cell Subsets in Patients with Sepsis: A Prospective Observational Analysis ». *Critical Care (London, England)* 13(4):R119. doi: 10.1186/cc7969.
- Poirrier, Anne-Lise, Yves Nyssen, Felix Scholtes, Sylvie Multon, Charline Rinkin, Géraldine Weber, Delphine Bouhy, Gary Brook, Rachelle Franzen, et Jean Schoenen. 2004. « Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation Improves Open Field Locomotor Recovery after Low but Not High Thoracic Spinal Cord Compression-Injury in Adult Rats ». *Journal of Neuroscience Research* 75(2):253-61. doi: 10.1002/jnr.10852.
- Polito, Andrea, Jean-Philippe Brouland, Raphael Porcher, Romain Sonnevile, Shidasp Siami, Robert D. Stevens, Céline Guidoux, Virginie Maxime, Geoffroy Lorin de la Grandmaison, Fabrice C. Chrétien, Françoise Gray, Djillali Annane, et Tarek Sharshar. 2011. « Hyperglycaemia and apoptosis of microglial cells in human septic shock ». *Critical Care* 15(3):R131. doi: 10.1186/cc10244.
- Polito, Andrea, Frédéric Eischwald, Anne-Laure Le Maho, Angelo Polito, Eric Azabou, Djillali Annane, Fabrice Chrétien, Robert D. Stevens, Robert Carlier, et Tarek Sharshar. 2013. « Pattern of Brain Injury in the Acute Setting of Human Septic Shock ». *Critical Care* 17(5):R204. doi: 10.1186/cc12899.
- Popovich, P. G., P. Wei, et B. T. Stokes. 1997. « Cellular Inflammatory Response after Spinal Cord Injury in Sprague-Dawley and Lewis Rats ». *The Journal of Comparative Neurology* 377(3):443-64. doi: 10.1002/(sici)1096-9861(19970120)377:3<443::aid-cne10>3.0.co;2-s.
- Porcheray, F., S. Viaud, A. C. Rimaniol, C. Léone, B. Samah, N. Dereuddre-Bosquet, D. Dormont, et G. Gras. 2005. « Macrophage Activation Switching: An Asset for the Resolution of Inflammation ». *Clinical and Experimental Immunology* 142(3):481-89. doi: 10.1111/j.1365-2249.2005.02934.x.
- Porta, Chiara, Elena Riboldi, Alessandro Ippolito, et Antonio Sica. 2015. « Molecular and Epigenetic Basis of Macrophage Polarized Activation ». *Seminars in Immunology* 27(4):237-48. doi: 10.1016/j.smim.2015.10.003.
- Porter, W. T. 1895. « The Path of the Respiratory Impulse from the Bulb to the Phrenic Nuclei ». *The Journal of Physiology* 17(6):455-85. doi: 10.1113/jphysiol.1895.sp000553.
- Poston, Jason T., et Jay L. Koyner. 2019. « Sepsis Associated Acute Kidney Injury ». *BMJ (Clinical*

- Research Ed.*) 364:k4891. doi: 10.1136/bmj.k4891.
- Poukkanen, M., S. T. Vaara, V. Pettilä, K. M. Kaukonen, A. M. Korhonen, S. Hovilehto, O. Inkinen, R. Laru-Sompa, T. Kaminski, M. Reinikainen, V. Lund, S. Karlsson, et FINNAKI study Group. 2013. « Acute Kidney Injury in Patients with Severe Sepsis in Finnish Intensive Care Units ». *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* 57(7):863-72. doi: 10.1111/aas.12133.
- Rabuel, C., et A. Mebazaa. 2006. « Septic Shock: A Heart Story since the 1960s ». *Intensive Care Medicine* 32(6):799-807. doi: 10.1007/s00134-006-0142-5.
- Raichvarg, D., M. Guenounou, et M. Zenou. 1981. « Phagocytose et mécanismes bactéricides du polynucléaire neutrophile ». *Médecine et Maladies Infectieuses* 11(11):581-87. doi: 10.1016/S0399-077X(81)80044-3.
- Rajeeve, Karthika, Sudip Das, Bhupesh K. Prusty, et Thomas Rudel. 2018. « Chlamydia Trachomatis Paralyzes Neutrophils to Evade the Host Innate Immune Response ». *Nature Microbiology* 3(7):824-35. doi: 10.1038/s41564-018-0182-y.
- Rana, Sabhya, Michael D. Sunshine, John J. Greer, et David D. Fuller. 2021. « Ampakines Stimulate Diaphragm Activity after Spinal Cord Injury ». *Journal of Neurotrauma* 38(24):3467-82. doi: 10.1089/neu.2021.0301.
- Ranieri, V. Marco, Gordon D. Rubenfeld, B. Taylor Thompson, Niall D. Ferguson, Ellen Caldwell, Eddy Fan, Luigi Camporota, et Arthur S. Slutsky. 2012. « Acute Respiratory Distress Syndrome: The Berlin Definition ». *JAMA* 307(23):2526-33. doi: 10.1001/jama.2012.5669.
- Rau, Monika, Martin Schiller, Stefan Krienke, Petra Heyder, Hannes Lorenz, et Norbert Blank. 2010. « Clinical Manifestations but Not Cytokine Profiles Differentiate Adult-Onset Still's Disease and Sepsis ». *The Journal of Rheumatology* 37(11):2369-76. doi: 10.3899/jrheum.100247.
- Reizis, Boris. 2012. « Classical Dendritic Cells as a Unique Immune Cell Lineage ». *The Journal of Experimental Medicine* 209(6):1053-56. doi: 10.1084/jem.20121038.
- Remick, Daniel G., Gerald Bolgos, Shannon Copeland, et Javed Siddiqui. 2005. « Role of Interleukin-6 in Mortality from and Physiologic Response to Sepsis ». *Infection and Immunity* 73(5):2751-57. doi: 10.1128/IAI.73.5.2751-2757.2005.
- Remijsen, Quinten, Tom Vanden Berghe, Ellen Wirawan, Bob Asselbergh, Eef Parthoens, Riet De Rycke, Sam Noppen, Michel Delforge, Jean Willems, et Peter Vandenabeele. 2011. « Neutrophil Extracellular Trap Cell Death Requires Both Autophagy and Superoxide Generation ». *Cell Research* 21(2):290-304. doi: 10.1038/cr.2010.150.
- Rhodes, Andrew, Laura E. Evans, Waleed Alhazzani, Mitchell M. Levy, Massimo Antonelli, Ricard Ferrer, Anand Kumar, Jonathan E. Sevransky, Charles L. Sprung, Mark E. Nunnally, Bram Rochweg, Gordon D. Rubenfeld, Derek C. Angus, Djillali Annane, Richard J. Beale, Geoffrey J. Bellingham, Gordon R. Bernard, Jean-Daniel Chiche, Craig Coopersmith, Daniel P. De Backer, Craig J. French, Seitaro Fujishima, Herwig Gerlach, Jorge Luis Hidalgo, Steven M. Hollenberg, Alan E. Jones, Dilip R. Karnad, Ruth M. Kleinpell, Younsuk Koh, Thiago

- Costa Lisboa, Flavia R. Machado, John J. Marini, John C. Marshall, John E. Mazuski, Lauralyn A. McIntyre, Anthony S. McLean, Sangeeta Mehta, Rui P. Moreno, John Myburgh, Paolo Navalesi, Osamu Nishida, Tiffany M. Osborn, Anders Perner, Colleen M. Plunkett, Marco Ranieri, Christa A. Schorr, Maureen A. Seckel, Christopher W. Seymour, Lisa Shieh, Khalid A. Shukri, Steven Q. Simpson, Mervyn Singer, B. Taylor Thompson, Sean R. Townsend, Thomas Van der Poll, Jean-Louis Vincent, W. Joost Wiersinga, Janice L. Zimmerman, et R. Phillip Dellinger. 2017. « Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016 ». *Intensive Care Medicine* 43(3):304-77. doi: 10.1007/s00134-017-4683-6.
- Ricciuto, Daniel R., Claudia C. dos Santos, Michael Hawkes, Lisa J. Toltl, Andrea L. Conroy, Nimerta Rajwans, Erin I. Lafferty, Deborah J. Cook, Alison Fox-Robichaud, Kamyar Kahnemou, Kevin C. Kain, Patricia C. Liaw, et W. Conrad Liles. 2011. « Angiopoietin-1 and Angiopoietin-2 as Clinically Informative Prognostic Biomarkers of Morbidity and Mortality in Severe Sepsis ». *Critical Care Medicine* 39(4):702-10. doi: 10.1097/CCM.0b013e318206d285.
- Rimmelé, Thomas, Didier Payen, Vincenzo Cantaluppi, John Marshall, Hernando Gomez, Alonso Gomez, Patrick Murray, et John A. Kellum. 2016. « Immune cell phenotype and function in sepsis ». *Shock (Augusta, Ga.)* 45(3):282-91. doi: 10.1097/SHK.0000000000000495.
- Rios-Santos, Fabrício, José C. Alves-Filho, Fabrício Oliveira Souto, Fernando Spiller, Addressa Freitas, Celina Monteiro C. Lotufo, Milena Botelho Pereira Soares, Ricardo Ribeiro Dos Santos, Mauro M. Teixeira, et Fernando de Queiroz Cunha. 2007. « Down-Regulation of CXCR2 on Neutrophils in Severe Sepsis Is Mediated by Inducible Nitric Oxide Synthase-Derived Nitric Oxide ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 175(5):490-97. doi: 10.1164/rccm.200601-103OC.
- Robac, Amandine, Pauline Neveu, Alizée Hugede, Elisabeth Garrido, Lionel Nicol, Quentin Delarue, et Nicolas Guérout. 2021. « Repetitive Trans Spinal Magnetic Stimulation Improves Functional Recovery and Tissue Repair in Contusive and Penetrating Spinal Cord Injury Models in Rats ». *Biomedicines* 9(12):1827. doi: 10.3390/biomedicines9121827.
- Rochael, Natalia C., Anderson B. Guimarães-Costa, Michelle T. C. Nascimento, Thiago S. DeSouza-Vieira, Matheus P. Oliveira, Luiz F. Garcia e Souza, Marcus F. Oliveira, et Elvira M. Saraiva. 2015. « Classical ROS-Dependent and Early/Rapid ROS-Independent Release of Neutrophil Extracellular Traps Triggered by Leishmania Parasites ». *Scientific Reports* 5(1):18302. doi: 10.1038/srep18302.
- Rochwerg, Bram, Waleed Alhazzani, Anees Sindi, Diane Heels-Ansdell, Lehana Thabane, Alison Fox-Robichaud, Lawrence Mbuagbaw, Wojciech Szczeklik, Fayez Alshamsi, Sultan Altayyar, Wang-Chun Ip, Guowei Li, Michael Wang, Anna Wludarczyk, Qi Zhou, Gordon H. Guyatt, Deborah J. Cook, Roman Jaeschke, Djillali Annane, et Fluids in Sepsis and Septic Shock Group. 2014. « Fluid Resuscitation in Sepsis: A Systematic Review and Network Meta-Analysis ». *Annals of Internal Medicine* 161(5):347-55. doi: 10.7326/M14-0178.
- Rockman, Howard A., Walter J. Koch, et Robert J. Lefkowitz. 2002. « Seven-Transmembrane-Spanning Receptors and Heart Function ». *Nature* 415(6868):206-12. doi: 10.1038/415206a.

- Rodríguez Murúa, Sofía, Mauricio F. Farez, et Francisco J. Quintana. 2022. « The Immune Response in Multiple Sclerosis ». *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 17(1):121-39. doi: 10.1146/annurev-pathol-052920-040318.
- Roger, Thierry, et Thierry Calandra. 2010. « Interleukin-33 Safeguards Neutrophils in Sepsis ». *Nature Medicine* 16(6):638-39. doi: 10.1038/nm0610-638.
- Rowe, Theresa A., et June M. McKoy. 2017. « Sepsis in Older Adults ». *Infectious Disease Clinics of North America* 31(4):731-42. doi: 10.1016/j.idc.2017.07.010.
- Rubinfeld, Gordon D., Ellen Caldwell, Eve Peabody, Jim Weaver, Diane P. Martin, Margaret Neff, Eric J. Stern, et Leonard D. Hudson. 2005. « Incidence and Outcomes of Acute Lung Injury ». *The New England Journal of Medicine* 353(16):1685-93. doi: 10.1056/NEJMoa050333.
- Rudiger, Alain. 2010. « Beta-Block the Septic Heart ». *Critical Care Medicine* 38(10):S608. doi: 10.1097/CCM.0b013e3181f204ca.
- Rudiger, Alain, et Mervyn Singer. 2016. « Decatecholaminisation during Sepsis ». *Critical Care (London, England)* 20(1):309. doi: 10.1186/s13054-016-1488-x.
- Sae-Khow, Kritsanawan, Sasipha Tachaboon, Helen L. Wright, Steven W. Edwards, Nattachai Srisawat, Asada Leelahavanichkul, et Direkrit Chiewchengchol. 2020. « Defective Neutrophil Function in Patients with Sepsis Is Mostly Restored by Ex Vivo Ascorbate Incubation ». *Journal of Inflammation Research* 13:263-74. doi: 10.2147/JIR.S252433.
- Saffarzadeh, Mona, Christiane Juenemann, Markus A. Queisser, Guenter Lochnit, Guillermo Barreto, Sebastian P. Galuska, Juergen Lohmeyer, et Klaus T. Preissner. 2012. « Neutrophil Extracellular Traps Directly Induce Epithelial and Endothelial Cell Death: A Predominant Role of Histones ». *PLoS One* 7(2):e32366. doi: 10.1371/journal.pone.0032366.
- Saijo, Kaoru, et Christopher K. Glass. 2011. « Microglial Cell Origin and Phenotypes in Health and Disease ». *Nature Reviews. Immunology* 11(11):775-87. doi: 10.1038/nri3086.
- Saito, Shinjiro, Shigehiko Uchino, Mineji Hayakawa, Kazuma Yamakawa, Daisuke Kudo, Yusuke Iizuka, Masamitsu Sanui, Kohei Takimoto, Toshihiko Mayumi, Yusuke Sasabuchi, et Japan Septic Disseminated Intravascular Coagulation (JSEPTIC DIC) study group. 2019. « Epidemiology of Disseminated Intravascular Coagulation in Sepsis and Validation of Scoring Systems ». *Journal of Critical Care* 50:23-30. doi: 10.1016/j.jc.2018.11.009.
- Sanderson, K. L., R. Raghupathi, K. E. Saatman, D. Martin, G. Miller, et T. K. McIntosh. 1999. « Interleukin-1 Receptor Antagonist Attenuates Regional Neuronal Cell Death and Cognitive Dysfunction after Experimental Brain Injury ». *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 19(10):1118-25. doi: 10.1097/00004647-199910000-00008.
- Sanfilippo, Filippo, Carlos Corredor, Nick Fletcher, Giora Landesberg, Umberto Benedetto, Pierre Foex, et Maurizio Cecconi. 2015. « Diastolic Dysfunction and Mortality in Septic Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *Intensive Care Medicine* 41(6):1004-13. doi:



10.1007/s00134-015-3748-7.

- Santos, Sidnéia Sousa, Milena Karina Colo Brunialti, Otelo Rigato, Flavia Ribeiro Machado, Eliezer Silva, et Reinaldo Salomao. 2012. « Generation of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species by Neutrophils and Monocytes from Septic Patients and Association with Outcomes ». *Shock (Augusta, Ga.)* 38(1):18-23. doi: 10.1097/SHK.0b013e318257114e.
- Sarker, M. H., A. S. Easton, et P. A. Fraser. 1998. « Regulation of cerebral microvascular permeability by histamine in the anaesthetized rat ». *The Journal of Physiology* 507(Pt 3):909-18. doi: 10.1111/j.1469-7793.1998.909bs.x.
- Savage, Julie C., Micaël Carrier, et Marie-Ève Tremblay. 2019. « Morphology of Microglia Across Contexts of Health and Disease ». P. 13-26 in *Microglia: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, édité par O. Garaschuk et A. Verkhratsky. New York, NY: Springer.
- Scheeren, Thomas W. L., Jan Bakker, Daniel De Backer, Djillali Annane, Pierre Asfar, E. Christiaan Boerma, Maurizio Cecconi, Arnaldo Dubin, Martin W. Dünser, Jacques Duranteau, Anthony C. Gordon, Olfa Hamzaoui, Glenn Hernández, Marc Leone, Bruno Levy, Claude Martin, Alexandre Mebazaa, Xavier Monnet, Andrea Morelli, Didier Payen, Rupert Pearse, Michael R. Pinsky, Peter Radermacher, Daniel Reuter, Bernd Saugel, Yasser Sakr, Mervyn Singer, Pierre Squara, Antoine Vieillard-Baron, Philippe Vignon, Simon T. Vistisen, Iwan C. C. van der Horst, Jean-Louis Vincent, et Jean-Louis Teboul. 2019. « Current Use of Vasopressors in Septic Shock ». *Annals of Intensive Care* 9(1):20. doi: 10.1186/s13613-019-0498-7.
- Scheff, Stephen W., Alexander G. Rabchevsky, Isabella Fugaccia, John A. Main, et James E. Lump. 2003. « Experimental Modeling of Spinal Cord Injury: Characterization of a Force-Defined Injury Device ». *Journal of Neurotrauma* 20(2):179-93. doi: 10.1089/08977150360547099.
- Schefold, Joerg C., Jeffrey Bierbrauer, et Steffen Weber-Carstens. 2010. « Intensive care unit—acquired weakness (ICUAW) and muscle wasting in critically ill patients with severe sepsis and septic shock ». *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 1(2):147-57. doi: 10.1007/s13539-010-0010-6.
- Schmidt, Christoph, Birgül Kurt, Klaus Höcherl, et Michael Bucher. 2009. « Inhibition of NF-kappaB Activity Prevents Downregulation of Alpha1-Adrenergic Receptors and Circulatory Failure during CLP-Induced Sepsis ». *Shock (Augusta, Ga.)* 32(3):239-46. doi: 10.1097/SHK.0b013e3181994752.
- Schmittinger, Christian A., Christian Torgersen, Günter Luckner, Daniel C. H. Schröder, Ingo Lorenz, et Martin W. Dünser. 2012. « Adverse Cardiac Events during Catecholamine Vasopressor Therapy: A Prospective Observational Study ». *Intensive Care Medicine* 38(6):950-58. doi: 10.1007/s00134-012-2531-2.
- Schnell, L., S. Fearn, M. E. Schwab, V. H. Perry, et D. C. Anthony. 1999. « Cytokine-Induced Acute Inflammation in the Brain and Spinal Cord ». *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 58(3):245-54. doi: 10.1097/00005072-199903000-00004.
- Schoenborn, Jamie R., et Christopher B. Wilson. 2007. « Regulation of Interferon-Gamma during

- Innate and Adaptive Immune Responses ». *Advances in Immunology* 96:41-101. doi: 10.1016/S0065-2776(07)96002-2.
- Schönrich, Günther, et Martin J. Raftery. 2016. « Neutrophil Extracellular Traps Go Viral ». *Frontiers in Immunology* 7:366. doi: 10.3389/fimmu.2016.00366.
- Schorn, Christine, Christina Janko, Melanie Latzko, Ricardo Chaurio, Georg Schett, et Martin Herrmann. 2012. « Monosodium urate crystals induce extracellular DNA traps in neutrophils, eosinophils, and basophils but not in mononuclear cells ». *Frontiers in Immunology* 3:277. doi: 10.3389/fimmu.2012.00277.
- Schreuder, H., C. Tardif, S. Trump-Kallmeyer, A. Soffientini, E. Sarubbi, A. Akesson, T. Bowlin, S. Yanofsky, et R. W. Barrett. 1997. « A New Cytokine-Receptor Binding Mode Revealed by the Crystal Structure of the IL-1 Receptor with an Antagonist ». *Nature* 386(6621):194-200. doi: 10.1038/386194a0.
- Schroeter, Michael, et Sebastian Jander. 2005. « T-Cell Cytokines in Injury-Induced Neural Damage and Repair ». *Neuromolecular Medicine* 7(3):183-95. doi: 10.1385/NMM:7:3:183.
- Schuetz, Philipp, Pedro Castro, et Nathan I. Shapiro. 2011. « Diabetes and Sepsis: Preclinical Findings and Clinical Relevance ». *Diabetes Care* 34(3):771-78. doi: 10.2337/dc10-1185.
- Schuld, Christian, Steffen Franz, Karin Brüggemann, Laura Heutehaus, Norbert Weidner, Steven C. Kirshblum, et Rüdiger Rupp. 2016. « International standards for neurological classification of spinal cord injury: impact of the revised worksheet (revision 02/13) on classification performance ». *The Journal of Spinal Cord Medicine* 39(5):504-12. doi: 10.1080/10790268.2016.1180831.
- Schulze-Osthoff, K., D. Ferrari, M. Los, S. Wesselborg, et M. E. Peter. 1998. « Apoptosis Signaling by Death Receptors ». *European Journal of Biochemistry* 254(3):439-59. doi: 10.1046/j.1432-1327.1998.2540439.x.
- Scumpia, Philip O., Priscilla F. McAuliffe, Kerri A. O'Malley, Ricardo Ungaro, Takefumi Uchida, Tadashi Matsumoto, Daniel G. Remick, Michael J. Clare-Salzler, Lyle L. Moldawer, et Philip A. Efron. 2005. « CD11c+ Dendritic Cells Are Required for Survival in Murine Polymicrobial Sepsis1 ». *The Journal of Immunology* 175(5):3282-86. doi: 10.4049/jimmunol.175.5.3282.
- Seki, Yoshinobu, Hideo Wada, Kazuo Kawasugi, Kohji Okamoto, Toshimasa Uchiyama, Shigeki Kushimoto, Tsuyoshi Hatada, Takashi Matsumoto, Hiroshi Imai, et Japanese Society of Thrombosis Hemostasis/DIC Subcommittee. 2013. « A Prospective Analysis of Disseminated Intravascular Coagulation in Patients with Infections ». *Internal Medicine (Tokyo, Japan)* 52(17):1893-98. doi: 10.2169/internalmedicine.52.0571.
- Sekut, L., B. R. Champion, K. Page, J. A. Menius, et K. M. Connolly. 1995. « Anti-Inflammatory Activity of Salmeterol: Down-Regulation of Cytokine Production ». *Clinical and Experimental Immunology* 99(3):461-66. doi: 10.1111/j.1365-2249.1995.tb05573.x.
- Serbina, Natalya V., Ting Jia, Tobias M. Hohl, et Eric G. Pamer. 2008. « Monocyte-Mediated Defense against Microbial Pathogens ». *Annual Review of Immunology* 26:421-52. doi:

10.1146/annurev.immunol.26.021607.090326.

- Sergi, Consolato, Fan Shen, David W. Lim, Weiyong Liu, Mingyong Zhang, Brian Chiu, Vijay Anand, et Ziyong Sun. 2017. « Cardiovascular Dysfunction in Sepsis at the Dawn of Emerging Mediators ». *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 95:153-60. doi: 10.1016/j.biopha.2017.08.066.
- Sevilla Berrios, Ronaldo A., John C. O'Horo, Venu Velagapudi, et Juan N. Pulido. 2014. « Correlation of Left Ventricular Systolic Dysfunction Determined by Low Ejection Fraction and 30-Day Mortality in Patients with Severe Sepsis and Septic Shock: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *Journal of Critical Care* 29(4):495-99. doi: 10.1016/j.jccr.2014.03.007.
- Shahreyar, Muhammad, Regina Fahhoum, Oluwaseun Akinseye, Sanjay Bhandari, Geetanjali Dang, et Rami N. Khouzam. 2018. « Severe sepsis and cardiac arrhythmias ». *Annals of Translational Medicine* 6(1):6. doi: 10.21037/atm.2017.12.26.
- Shapouri-Moghaddam, Abbas, Saeed Mohammadian, Hossein Vazini, Mahdi Taghadosi, Seyed-Alireza Esmaeili, Fatemeh Mardani, Bita Seifi, Asadollah Mohammadi, Jalil T. Afshari, et Amirhossein Sahebkar. 2018. « Macrophage Plasticity, Polarization, and Function in Health and Disease ». *Journal of Cellular Physiology* 233(9):6425-40. doi: 10.1002/jcp.26429.
- Sharif-Alhoseini, M., M. Khormali, M. Rezaei, M. Safdarian, A. Hajighadery, M. M. Khalatbari, M. Safdarian, S. Meknatkhah, M. Rezvan, M. Chalangari, P. Derakhshan, et V. Rahimi-Movaghar. 2017. « Animal Models of Spinal Cord Injury: A Systematic Review ». *Spinal Cord* 55(8):714-21. doi: 10.1038/sc.2016.187.
- Sharma, Drashya, et J. David Farrar. 2020. « Adrenergic regulation of immune cell function and inflammation ». *Seminars in Immunopathology* 42(6):709-17. doi: 10.1007/s00281-020-00829-6.
- Sharma, H. S., T. Winkler, E. Stålberg, T. Gordh, P. Alm, et J. Westman. 2003. « Topical Application of TNF-Alpha Antiserum Attenuates Spinal Cord Trauma Induced Edema Formation, Microvascular Permeability Disturbances and Cell Injury in the Rat ». *Acta Neurochirurgica. Supplement* 86:407-13. doi: 10.1007/978-3-7091-0651-8\_85.
- Sharma, Roleen, Kim M. O'Sullivan, Stephen R. Holdsworth, Philip G. Bardin, et Paul T. King. 2017. « Visualizing Macrophage Extracellular Traps Using Confocal Microscopy ». *Journal of Visualized Experiments: JoVE* (128). doi: 10.3791/56459.
- Sharshar, Tarek, Fernando Bozza, et Fabrice Chrétien. 2014. « Neuropathological Processes in Sepsis ». *The Lancet Neurology* 13(6):534-36. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70064-X.
- Shaw, Andrew D., Karthik Raghunathan, Fred W. Peyerl, Sibyl H. Munson, Scott M. Paluszkiwicz, et Carol R. Schermer. 2014. « Association between Intravenous Chloride Load during Resuscitation and In-Hospital Mortality among Patients with SIRS ». *Intensive Care Medicine* 40(12):1897-1905. doi: 10.1007/s00134-014-3505-3.
- Shea-Donohue, Terez, Jennifer Stiltz, Aiping Zhao, et Luigi Notari. 2010. « Mast Cells ». *Current*

- Gastroenterology Reports* 12(5):349-57. doi: 10.1007/s11894-010-0132-1.
- Shen, Xiao-Fei, Ke Cao, Jin-peng Jiang, Wen-Xian Guan, et Jun-Feng Du. 2017. « Neutrophil dysregulation during sepsis: an overview and update ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 21(9):1687-97. doi: 10.1111/jcmm.13112.
- Shimazu, R., S. Akashi, H. Ogata, Y. Nagai, K. Fukudome, K. Miyake, et M. Kimoto. 1999. « MD-2, a Molecule That Confers Lipopolysaccharide Responsiveness on Toll-like Receptor 4 ». *The Journal of Experimental Medicine* 189(11):1777-82. doi: 10.1084/jem.189.11.1777.
- Siarni, Shidasp, Djillali Annane, et Tarek Sharshar. 2008. « The Encephalopathy in Sepsis ». *Critical Care Clinics* 24(1):67-82, viii. doi: 10.1016/j.ccc.2007.10.001.
- Sica, Antonio, Marco Erreni, Paola Allavena, et Chiara Porta. 2015. « Macrophage Polarization in Pathology ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 72(21):4111-26. doi: 10.1007/s00018-015-1995-y.
- Siebert, Justin R., Amanda Conta Steencken, et Donna J. Osterhout. 2014. « Chondroitin Sulfate Proteoglycans in the Nervous System: Inhibitors to Repair ». *BioMed Research International* 2014:845323. doi: 10.1155/2014/845323.
- Silver, Jerry, et Jared H. Miller. 2004. « Regeneration beyond the Glial Scar ». *Nature Reviews Neuroscience* 5(2):146-56. doi: 10.1038/nrn1326.
- Silvestre-Roig, Carlos, Quinte Braster, Kanin Wichapong, Ernest Y. Lee, Jean Marie Teulon, Nihel Berrebeh, Janine Winter, José M. Adrover, Giancarlo Santiago Santos, Alexander Froese, Patricia Lemnitzer, Almudena Ortega-Gómez, Raphael Chevre, Julian Marschner, Ariane Schumski, Carla Winter, Laura Perez-Olivares, Chang Pan, Nicole Paulin, Tom Schoufour, Helene Hartwig, Silvia González-Ramos, Frits Kamp, Remco T. A. Megens, Kerri A. Mowen, Matthias Gunzer, Lars Maegdefessel, Tilman Hackeng, Esther Lutgens, Mat Daemen, Julia von Blume, Hans-Joachim Anders, Viacheslav O. Nikolaev, Jean-Luc Pellequer, Christian Weber, Andrés Hidalgo, Gerry A. F. Nicolaes, Gerard C. L. Wong, et Oliver Soehnlein. 2019. « Externalized Histone H4 Orchestrates Chronic Inflammation by Inducing Lytic Cell Death ». *Nature* 569(7755):236-40. doi: 10.1038/s41586-019-1167-6.
- Simmons, Jeff, et Jean-Francois Pittet. 2015. « The Coagulopathy of Acute Sepsis ». *Current opinion in anaesthesiology* 28(2):227-36. doi: 10.1097/ACO.000000000000163.
- Singer, Benjamin H., Robert P. Dickson, Scott J. Denstaedt, Michael W. Newstead, Kwi Kim, Nicole R. Falkowski, John R. Erb-Downward, Thomas M. Schmidt, Gary B. Huffnagle, et Theodore J. Standiford. 2018. « Bacterial Dissemination to the Brain in Sepsis ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 197(6):747-56. doi: 10.1164/rccm.201708-1559OC.
- Singer, Benjamin H., Michael W. Newstead, Xianying Zeng, Christopher L. Cooke, Robert C. Thompson, Kanakadurga Singer, Ramya Ghantasala, Jack M. Parent, Geoffrey G. Murphy, Theodore J. Iwashyna, et Theodore J. Standiford. 2016. « Cecal Ligation and Puncture Results in Long-Term Central Nervous System Myeloid Inflammation ». *PLOS ONE* 11(2):e0149136. doi: 10.1371/journal.pone.0149136.

- Singer, Mervyn, Clifford S. Deutschman, Christopher Warren Seymour, Manu Shankar-Hari, Djillali Annane, Michael Bauer, Rinaldo Bellomo, Gordon R. Bernard, Jean-Daniel Chiche, Craig M. Coopersmith, Richard S. Hotchkiss, Mitchell M. Levy, John C. Marshall, Greg S. Martin, Steven M. Opal, Gordon D. Rubenfeld, Tom van der Poll, Jean-Louis Vincent, et Derek C. Angus. 2016. « The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3) ». *JAMA* 315(8):801-10. doi: 10.1001/jama.2016.0287.
- Skinner, Stanley A., et Ensor E. Transfeldt. 2009. « Electromyography in the Detection of Mechanically Induced Spinal Motor Tract Injury: Observations in Diverse Porcine Models: Laboratory Investigation ». *Journal of Neurosurgery: Spine* 11(3):369-74. doi: 10.3171/2009.3.SPINE08881.
- Sokol, Caroline L., et Andrew D. Luster. 2015. « The Chemokine System in Innate Immunity ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7(5):a016303. doi: 10.1101/cshperspect.a016303.
- Sollberger, Gabriel, Axel Choidas, Garth Lawrence Burn, Peter Habenberger, Raffaella Di Lucrezia, Susanne Kordes, Sascha Menninger, Jan Eickhoff, Peter Nussbaumer, Bert Klebl, Renate Krüger, Alf Herzig, et Arturo Zychlinsky. 2018. « Gasdermin D Plays a Vital Role in the Generation of Neutrophil Extracellular Traps ». *Science Immunology* 3(26):eaar6689. doi: 10.1126/sciimmunol.aar6689.
- Sônego, Fabiane, Fernanda Vargas e Silva Castanheira, Raphael Gomes Ferreira, Alexandre Kanashiro, Caio Abner Vitorino Gonçalves Leite, Daniele Carvalho Nascimento, David Fernando Colón, Vanessa de Fátima Borges, José Carlos Alves-Filho, et Fernando Queiróz Cunha. 2016. « Paradoxical Roles of the Neutrophil in Sepsis: Protective and Deleterious ». *Frontiers in Immunology* 7:155. doi: 10.3389/fimmu.2016.00155.
- Song, Gaofei, Huoyan Liang, Heng Song, Xianfei Ding, Dong Wang, Xiaojuan Zhang, et Tongwen Sun. 2022. « Metformin Improves the Prognosis of Adult Mice with Sepsis-Associated Encephalopathy Better than That of Aged Mice ». *Journal of Immunology Research* 2022:3218452. doi: 10.1155/2022/3218452.
- Specht, Harrison, Edward Emmott, Aleksandra A. Petelski, R. Gray Huffman, David H. Perlman, Marco Serra, Peter Kharchenko, Antonius Koller, et Nikolai Slavov. 2021. « Single-cell proteomic and transcriptomic analysis of macrophage heterogeneity using SCoPE2 ». *Genome Biology* 22:50. doi: 10.1186/s13059-021-02267-5.
- Stamatovic, Svetlana M., Richard F. Keep, et Anuska V. Andjelkovic. 2008. « Brain Endothelial Cell-Cell Junctions: How to "Open" the Blood Brain Barrier ». *Current Neuropharmacology* 6(3):179-92. doi: 10.2174/157015908785777210.
- Steeland, Sophie, Claude Libert, et Roosmarijn E. Vandenbroucke. 2018. « A New Venue of TNF Targeting ». *International Journal of Molecular Sciences* 19(5):1442. doi: 10.3390/ijms19051442.
- Stephenson, Erin L., et V. Wee Yong. 2018. « Pro-inflammatory roles of chondroitin sulfate proteoglycans in disorders of the central nervous system ». *Matrix Biology* 71-72:432-42. doi: 10.1016/j.matbio.2018.04.010.

- Sternini, C. 1997. « Organization of the Peripheral Nervous System: Autonomic and Sensory Ganglia ». *The Journal of Investigative Dermatology. Symposium Proceedings* 2(1):1-7. doi: 10.1038/jidsymp.1997.2.
- Stinissen, P., J. Raus, et J. Zhang. 1997. « Autoimmune Pathogenesis of Multiple Sclerosis: Role of Autoreactive T Lymphocytes and New Immunotherapeutic Strategies ». *Critical Reviews in Immunology* 17(1):33-75. doi: 10.1615/critrevimmunol.v17.i1.20.
- Strieter, R. M., S. L. Kunkel, H. J. Showell, D. G. Remick, S. H. Phan, P. A. Ward, et R. M. Marks. 1989. « Endothelial Cell Gene Expression of a Neutrophil Chemotactic Factor by TNF-Alpha, LPS, and IL-1 Beta ». *Science (New York, N.Y.)* 243(4897):1467-69. doi: 10.1126/science.2648570.
- Strnad, Pavel, Frank Tacke, Alexander Koch, et Christian Trautwein. 2017. « Liver - Guardian, Modifier and Target of Sepsis ». *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 14(1):55-66. doi: 10.1038/nrgastro.2016.168.
- Surbatovic, Maja, Nikola Filipovic, Sonja Radakovic, Nebojsa Stankovic, et Zoran Slavkovic. 2007. « Immune Cytokine Response in Combat Casualties: Blast or Explosive Trauma with or without Secondary Sepsis ». *Military Medicine* 172(2):190-95. doi: 10.7205/milmed.172.2.190.
- Suthahar, Navin, Wouter C. Meijers, Herman H. W. Silljé, et Rudolf A. de Boer. 2017. « From Inflammation to Fibrosis—Molecular and Cellular Mechanisms of Myocardial Tissue Remodelling and Perspectives on Differential Treatment Opportunities ». *Current Heart Failure Reports* 14(4):235-50. doi: 10.1007/s11897-017-0343-y.
- Suzuki, Takeshi, Hiroshi Morisaki, Ryohei Serita, Michiko Yamamoto, Yoshifumi Kotake, Akitoshi Ishizaka, et Junzo Takeda. 2005. « Infusion of the Beta-Adrenergic Blocker Esmolol Attenuates Myocardial Dysfunction in Septic Rats ». *Critical Care Medicine* 33(10):2294-2301. doi: 10.1097/01.ccm.0000182796.11329.3b.
- Sweeney, Melanie D., Zhen Zhao, Axel Montagne, Amy R. Nelson, et Berislav V. Zlokovic. 2019. « Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back ». *Physiological Reviews* 99(1):21-78. doi: 10.1152/physrev.00050.2017.
- Sweis, Rochelle, Jorge Ortiz, et José Biller. 2016. « Neurology of Sepsis ». *Current Neurology and Neuroscience Reports* 16(3):21. doi: 10.1007/s11910-016-0623-z.
- Taheri, Nayyer, Anna Fahlgren, et Maria Fällman. 2016. « Yersinia pseudotuberculosis Blocks Neutrophil Degranulation ». *Infection and Immunity* 84(12):3369-78. doi: 10.1128/IAI.00760-16.
- Tak, Tamar, Roger van Groenendaal, Peter Pickkers, et Leo Koenderman. 2017. « Monocyte Subsets Are Differentially Lost from the Circulation during Acute Inflammation Induced by Human Experimental Endotoxemia ». *Journal of Innate Immunity* 9(5):464-74. doi: 10.1159/000475665.
- Taneja, Ravi, Ajay P. Sharma, Maurice B. Hallett, George P. Findlay, et M. Rachel Morris. 2008.

- « IMMATURE CIRCULATING NEUTROPHILS IN SEPSIS HAVE IMPAIRED PHAGOCYTOSIS AND CALCIUM SIGNALING ». *Shock* 30(6):618. doi: 10.1097/SHK.0b013e318173ef9c.
- Tang, Xiufeng, Jeannette E. Davies, et Stephen J. A. Davies. 2003. « Changes in Distribution, Cell Associations, and Protein Expression Levels of NG2, Neurocan, Phosphacan, Brevican, Versican V2, and Tenascin-C during Acute to Chronic Maturation of Spinal Cord Scar Tissue ». *Journal of Neuroscience Research* 71(3):427-44. doi: 10.1002/jnr.10523.
- Tao, Weike, Donald J. Deyo, Daniel L. Traber, William E. Johnston, et Edward R. Sherwood. 2004. « Hemodynamic and Cardiac Contractile Function during Sepsis Caused by Cecal Ligation and Puncture in Mice ». *Shock (Augusta, Ga.)* 21(1):31-37. doi: 10.1097/01.shk.0000101673.49265.5d.
- Tedder, T. F., D. A. Steeber, et P. Pizcueta. 1995. « L-selectin-deficient mice have impaired leukocyte recruitment into inflammatory sites. » *Journal of Experimental Medicine* 181(6):2259-64. doi: 10.1084/jem.181.6.2259.
- Tinsley, Kevin W., Mitchell H. Grayson, Paul E. Swanson, Anne M. Drewry, Katherine C. Chang, Irene E. Karl, et Richard S. Hotchkiss. 2003. « Sepsis Induces Apoptosis and Profound Depletion of Splenic Interdigitating and Follicular Dendritic Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 171(2):909-14. doi: 10.4049/jimmunol.171.2.909.
- Toledo, Roberta Ströher, Dirson João Stein, Paulo Roberto Stefani Sanches, Lisiane Santos da Silva, Helouise Richardt Medeiros, Felipe Fregni, Wolnei Caumo, et Iraci L. S. Torres. 2021. « rTMS Induces Analgesia and Modulates Neuroinflammation and Neuroplasticity in Neuropathic Pain Model Rats ». *Brain Research* 1762:147427. doi: 10.1016/j.brainres.2021.147427.
- Torio Celeste M et Brian J Moore. 2016. « National Inpatient Hospital Costs: The Most Expensive Conditions by Payer, 2013 ». mai.
- Träger, Karl, Daniel DeBacker, et Peter Radermacher. 2003. « Metabolic Alterations in Sepsis and Vasoactive Drug-Related Metabolic Effects ». *Current Opinion in Critical Care* 9(4):271-78. doi: 10.1097/00075198-200308000-00004.
- Tsai, Yung-Fong, Huang-Ping Yu, Wen-Yi Chang, Fu-Chao Liu, Zhen-Cheng Huang, et Tsong-Long Hwang. 2015. « Sirtinol Inhibits Neutrophil Elastase Activity and Attenuates Lipopolysaccharide-Mediated Acute Lung Injury in Mice ». *Scientific Reports* 5(1):8347. doi: 10.1038/srep08347.
- Tschoeke, Sven K., Andreas Oberholzer, et Lyle L. Moldawer. 2006. « Interleukin-18: A Novel Prognostic Cytokine in Bacteria-Induced Sepsis ». *Critical Care Medicine* 34(4):1225-33. doi: 10.1097/01.CCM.0000208356.05575.16.
- Ueki, Shigeharu, Yasunori Konno, Masahide Takeda, Yuki Moritoki, Makoto Hirokawa, Yoshinori Matsuwaki, Kohei Honda, Nobuo Ohta, Shiori Yamamoto, Yuri Takagi, Atsushi Wada, et Peter F. Weller. 2016. « Eosinophil ETosis-derived DNA traps: their presence in secretions and their functional attributes ». *The Journal of allergy and clinical immunology* 137(1):258-67. doi: 10.1016/j.jaci.2015.04.041.



- Ueki, Shigeharu, Rossana C. N. Melo, Ionita Ghiran, Lisa A. Spencer, Ann M. Dvorak, et Peter F. Weller. 2013. « Eosinophil extracellular DNA trap cell death mediates lytic release of free secretion-competent eosinophil granules in humans ». *Blood* 121(11):2074-83. doi: 10.1182/blood-2012-05-432088.
- Unterberg, A., M. Wahl, et A. Baethmann. 1988. « Effects of Free Radicals on Permeability and Vasomotor Response of Cerebral Vessels ». *Acta Neuropathologica* 76(3):238-44. doi: 10.1007/BF00687770.
- Ushach, Irina, et Albert Zlotnik. 2016. « Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage ». *Journal of Leukocyte Biology* 100(3):481-89. doi: 10.1189/jlb.3RU0316-144R.
- Uzair, Mohammad, Turki Abualait, Muhammad Arshad, Woo-Kyoung Yoo, Ali Mir, Reem Fahd Bunyan, et Shahid Bashir. 2021. « Transcranial magnetic stimulation in animal models of neurodegeneration ». *Neural Regeneration Research* 17(2):251-65. doi: 10.4103/1673-5374.317962.
- Vaibhav, Kumar, Molly Braun, Katelyn Alverson, Hesam Khodadadi, Ammar Kutiyawalla, Ayobami Ward, Christopher Banerjee, Tyler Sparks, Aneeq Malik, Mohammad H. Rashid, Mohammad Badruzzaman Khan, Michael F. Waters, David C. Hess, Ali S. Arbab, John R. Vender, Nasrul Hoda, Babak Baban, et Krishnan M. Dhandapani. 2020. « Neutrophil Extracellular Traps Exacerbate Neurological Deficits after Traumatic Brain Injury ». *Science Advances* 6(22):eaax8847. doi: 10.1126/sciadv.aax8847.
- Vallabhajosyula, Saraschandra, Mukesh Kumar, Govind Pandompatam, Ankit Sakhuja, Rahul Kashyap, Kianoush Kashani, Ognjen Gajic, Jeffrey B. Geske, et Jacob C. Jentzer. 2017. « Prognostic Impact of Isolated Right Ventricular Dysfunction in Sepsis and Septic Shock: An 8-Year Historical Cohort Study ». *Annals of Intensive Care* 7(1):94. doi: 10.1186/s13613-017-0319-9.
- Van den Berghe, Greet, Pieter J. Wouters, Roger Bouillon, Frank Weekers, Charles Verwaest, Miet Schetz, Dirk Vlasselaers, Patrick Ferdinande, et Peter Lauwers. 2003. « Outcome Benefit of Intensive Insulin Therapy in the Critically Ill: Insulin Dose versus Glycemic Control ». *Critical Care Medicine* 31(2):359-66. doi: 10.1097/01.CCM.0000045568.12881.10.
- Vandeweerd, Jean-Michel, Fanny Hontoir, Alexis De Knoop, Kathleen De Swert, et Charles Nicaise. 2018. « Retrograde Neuroanatomical Tracing of Phrenic Motor Neurons in Mice ». *Journal of Visualized Experiments: JoVE* (132):56758. doi: 10.3791/56758.
- Vasudevan, Neelakantan T., Maradumane L. Mohan, Shyamal K. Goswami, et Sathyamangla V. Naga Prasad. 2011. « Regulation of  $\beta$ -Adrenergic Receptor Function: An Emphasis on Receptor Resensitization ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 10(21):3684-91. doi: 10.4161/cc.10.21.18042.
- Villanueva, Eneida, Srilakshmi Yalavarthi, Celine C. Berthier, Jeffrey B. Hodgjin, Ritika Khandpur, Andrew M. Lin, Cory J. Rubin, Wenpu Zhao, Stephen H. Olsen, Matthew Klinker, David Shealy, Michael F. Denny, Joel Plumas, Laurence Chaperot, Matthias Kretzler, Allen T.

- Bruce, et Mariana J. Kaplan. 2011. « Netting Neutrophils Induce Endothelial Damage, Infiltrate Tissues, and Expose Immunostimulatory Molecules in Systemic Lupus Erythematosus ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 187(1):538-52. doi: 10.4049/jimmunol.1100450.
- Vinit, Stéphane, Patrick Gauthier, Jean-Claude Stamegna, et Anne Kastner. 2006. « High Cervical Lateral Spinal Cord Injury Results in Long-Term Ipsilateral Hemidiaphragm Paralysis ». *Journal of Neurotrauma* 23(7):1137-46. doi: 10.1089/neu.2006.23.1137.
- Vinit, Stéphane, Mary Rachael Lovett-Barr, et Gordon S. Mitchell. 2009. « Intermittent hypoxia induces functional recovery following cervical spinal injury ». *Respiratory physiology & neurobiology* 169(2):210-17. doi: 10.1016/j.resp.2009.07.023.
- Vlahos, Ross, John Stambas, Steven Bozinovski, Brad R. S. Broughton, Grant R. Drummond, et Stavros Selemidis. 2011. « Inhibition of Nox2 Oxidase Activity Ameliorates Influenza A Virus-Induced Lung Inflammation ». *PLoS Pathogens* 7(2):e1001271. doi: 10.1371/journal.ppat.1001271.
- Vogel, Daphne Y. S., Judith E. Glim, Andrea W. D. Stavenuiter, Marjolein Breur, Priscilla Heijnen, Sandra Amor, Christine D. Dijkstra, et Robert H. J. Beelen. 2014. « Human Macrophage Polarization in Vitro: Maturation and Activation Methods Compared ». *Immunobiology* 219(9):695-703. doi: 10.1016/j.imbio.2014.05.002.
- Wa, van Gool, van de Beek D, et Eikelenboom P. 2010. « Systemic Infection and Delirium: When Cytokines and Acetylcholine Collide ». *Lancet (London, England)* 375(9716). doi: 10.1016/S0140-6736(09)61158-2.
- Wachter, S. Blake, et Edward M. Gilbert. 2012. « Beta-Adrenergic Receptors, from Their Discovery and Characterization through Their Manipulation to Beneficial Clinical Application ». *Cardiology* 122(2):104-12. doi: 10.1159/000339271.
- Waetzig, Georg H., Philip Rosenstiel, Alexander Arlt, Andreas Till, Karen Bräutigam, Heiner Schäfer, Stefan Rose-John, Dirk Seegert, et Stefan Schreiber. 2005. « Soluble Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptor-1 Induces Apoptosis via Reverse TNF Signaling and Autocrine Transforming Growth Factor-Beta1 ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19(1):91-93. doi: 10.1096/fj.04-2073fje.
- Walkey, Allan J., Bradley G. Hammill, Lesley H. Curtis, et Emelia J. Benjamin. 2014. « Long-term Outcomes Following Development of New-Onset Atrial Fibrillation During Sepsis ». *Chest* 146(5):1187-95. doi: 10.1378/chest.14-0003.
- Wang, Chao, Yang Wang, Xiaochen Shi, Xudong Tang, Wei Cheng, Xueyan Wang, Yanan An, Shulin Li, Hongyue Xu, Yan Li, Wenjing Luan, Xuefei Wang, Zhaobin Chen, Mingyuan Liu, et Lu Yu. 2019. « The TRAPs From Microglial Vesicles Protect Against Listeria Infection in the CNS ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 0. doi: 10.3389/fncel.2019.00199.
- Wang, Da-Wei, Yi-Mei Yin, et Yong-Ming Yao. 2016. « Vagal Modulation of the Inflammatory Response in Sepsis ». *International Reviews of Immunology* 35(5):415-33. doi: 10.3109/08830185.2015.1127369.

- Wang, Henry E., Justin X. Moore, John P. Donnelly, Emily B. Levitan, et Monika M. Safford. 2017. « Risk of Acute Coronary Heart Disease After Sepsis Hospitalization in the REasons for Geographic and Racial Differences in Stroke (REGARDS) Cohort ». *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 65(1):29-36. doi: 10.1093/cid/cix248.
- Wang, Hualong, Yuan Geng, Bing Han, Jing Qiang, Xiaoli Li, Meiyu Sun, Qian Wang, et Mingwei Wang. 2013. « Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation Applications Normalized Prefrontal Dysfunctions and Cognitive-Related Metabolic Profiling in Aged Mice ». *PLoS ONE* 8(11):e81482. doi: 10.1371/journal.pone.0081482.
- Wang, Ning, Yongling Lu, Jiang Zheng, et Xin Liu. 2022. « Of mice and men: Laboratory murine models for recapitulating the immunosuppression of human sepsis ». *Frontiers in Immunology* 13.
- Wang, Tisha S., et Jane C. Deng. 2008. « Molecular and Cellular Aspects of Sepsis-Induced Immunosuppression ». *Journal of Molecular Medicine* 86(5):495-506. doi: 10.1007/s00109-007-0300-4.
- Wanner, Ina B., Mark A. Anderson, Bingbing Song, Jaclynn Levine, Ana Fernandez, Zachary Gray-Thompson, Yan Ao, et Michael V. Sofroniew. 2013. « Glial Scar Borders Are Formed by Newly Proliferated, Elongated Astrocytes That Interact to Corral Inflammatory and Fibrotic Cells via STAT3-Dependent Mechanisms after Spinal Cord Injury ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 33(31):12870-86. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2121-13.2013.
- Waseem, Najeff, et Po-Hung Chen. 2016. « Hypoxic Hepatitis: A Review and Clinical Update ». *Journal of Clinical and Translational Hepatology* 4(3):263-68. doi: 10.14218/JCTH.2016.00022.
- Waxenbaum, Joshua A., Vamsi Reddy, et Matthew Varacallo. 2023. « Anatomy, Autonomic Nervous System ». in *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- Weckbach, Ludwig T., Ulrich Grabmaier, Andreas Uhl, Sebastian Gess, Felicitas Boehm, Annette Zehrer, Robert Pick, Melanie Salvermoser, Thomas Czermak, Joachim Pircher, Noah Sorrelle, Mary Migliorini, Dudley K. Strickland, Karin Klingel, Volker Brinkmann, Ulrike Abu Abed, Urs Eriksson, Steffen Massberg, Stefan Brunner, et Barbara Walzog. 2019. « Midkine Drives Cardiac Inflammation by Promoting Neutrophil Trafficking and NETosis in Myocarditis ». *The Journal of Experimental Medicine* 216(2):350-68. doi: 10.1084/jem.20181102.
- Wei, Chaojie, Huguette Louis, Margaux Schmitt, Eliane Albuison, Sophie Orlowski, Bruno Levy, et Antoine Kimmoun. 2016. « Effects of low doses of esmolol on cardiac and vascular function in experimental septic shock ». *Critical Care* 20(1):407. doi: 10.1186/s13054-016-1580-2.
- Weinrauch, Yvette, Doreen Drujan, Steven D. Shapiro, Jerrold Weiss, et Arturo Zychlinsky. 2002. « Neutrophil Elastase Targets Virulence Factors of Enterobacteria ». *Nature* 417(6884):91-94. doi: 10.1038/417091a.

- Wichterman, Keith A., Arthur E. Baue, et Irshad H. Chaudry. 1980. « Sepsis and Septic Shock—A Review of Laboratory Models and a Proposal ». *Journal of Surgical Research* 29(2):189-201. doi: 10.1016/0022-4804(80)90037-2.
- Wincek, Agnieszka, Juliusz Huber, Katarzyna Leszczyńska, Wojciech Fortuna, Stefan Okurowski, Krzysztof Chmielak, et Paweł Tabakow. 2021. « The Long-Term Effect of Treatment Using the Transcranial Magnetic Stimulation rTMS in Patients after Incomplete Cervical or Thoracic Spinal Cord Injury ». *Journal of Clinical Medicine* 10(13):2975. doi: 10.3390/jcm10132975.
- Windelborn, James A., et Gordon S. Mitchell. 2012. « Glial Activation in the Spinal Ventral Horn Caudal to Cervical Injury ». *Respiratory Physiology & Neurobiology* 180(1):61-68. doi: 10.1016/j.resp.2011.10.011.
- Wink, D. A., et J. B. Mitchell. 1998. « Chemical Biology of Nitric Oxide: Insights into Regulatory, Cytotoxic, and Cytoprotective Mechanisms of Nitric Oxide ». *Free Radical Biology & Medicine* 25(4-5):434-56. doi: 10.1016/s0891-5849(98)00092-6.
- Witowski, J., K. Pawlaczyk, A. Breborowicz, A. Scheuren, M. Kuzlan-Pawlaczyk, J. Wisniewska, A. Polubinska, H. Friess, G. M. Gahl, U. Frei, et A. Jörres. 2000. « IL-17 Stimulates Intraperitoneal Neutrophil Infiltration through the Release of GRO Alpha Chemokine from Mesothelial Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 165(10):5814-21. doi: 10.4049/jimmunol.165.10.5814.
- Wright, S. D., R. A. Ramos, P. S. Tobias, R. J. Ulevitch, et J. C. Mathison. 1990. « CD14, a Receptor for Complexes of Lipopolysaccharide (LPS) and LPS Binding Protein ». *Science (New York, N.Y.)* 249(4975):1431-33. doi: 10.1126/science.1698311.
- Wu, Huang-Pin, Chian-Kuang Chen, Kong Chung, Jo-Chi Tseng, Chung-Ching Hua, Yu-Chih Liu, Duen-Yau Chuang, et Chung-Han Yang. 2009. « Serial Cytokine Levels in Patients with Severe Sepsis ». *Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et AL.]* 58(7):385-93. doi: 10.1007/s00011-009-0003-0.
- Wu, Zhiyang, Xin Zhang, Tiantian Cai, Yankun Li, Xi Guo, Xiangyang Zhao, Dawei Wu, Zhi Li, et Luyao Zhang. 2023. « Transcutaneous auricular vagus nerve stimulation reduces cytokine production in sepsis: An open double-blind, sham-controlled, pilot study ». *Brain Stimulation* 16(2):507-14. doi: 10.1016/j.brs.2023.02.008.
- Wyss-Coray, Tony, et Joseph Rogers. 2012. « Inflammation in Alzheimer Disease—A Brief Review of the Basic Science and Clinical Literature ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2(1):a006346. doi: 10.1101/cshperspect.a006346.
- Xiao, Hongyan, Javed Siddiqui, et Daniel G. Remick. 2006. « Mechanisms of Mortality in Early and Late Sepsis ». *Infection and Immunity* 74(9):5227-35. doi: 10.1128/IAI.01220-05.
- Xie, Fei, Su Min, Jingyuan Chen, Jun Yang, et Xin Wang. 2017. « Ulinastatin Inhibited Sepsis-Induced Spinal Inflammation to Alleviate Peripheral Neuromuscular Dysfunction in an Experimental Rat Model of Neuromyopathy ». *Journal of Neurochemistry* 143(2):225-35. doi: 10.1111/jnc.14145.

- Xu, Jun, Xiaomei Zhang, Marc Monestier, Naomi L. Esmon, et Charles T. Esmon. 2011. « Extracellular Histones Are Mediators of Death through TLR2 and TLR4 in Mouse Fatal Liver Injury ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 187(5):2626-31. doi: 10.4049/jimmunol.1003930.
- Xu, Jun, Xiaomei Zhang, Rosana Pelayo, Marc Monestier, Concetta T. Ammollo, Fabrizio Semeraro, Fletcher B. Taylor, Naomi L. Esmon, Florea Lupu, et Charles T. Esmon. 2009. « Extracellular Histones Are Major Mediators of Death in Sepsis ». *Nature Medicine* 15(11):1318-21. doi: 10.1038/nm.2053.
- Yan, Jun, Song Li, et Shulin Li. 2014. « The role of the liver in sepsis ». *International reviews of immunology* 33(6):498-510. doi: 10.3109/08830185.2014.889129.
- Yan, Tingting, Qinglian Xie, Zhong Zheng, Ke Zou, et Lijuan Wang. 2017. « Different Frequency Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation (rTMS) for Posttraumatic Stress Disorder (PTSD): A Systematic Review and Meta-Analysis ». *Journal of Psychiatric Research* 89:125-35. doi: 10.1016/j.jpsychires.2017.02.021.
- Yan, Xiaoqian, Kaiying Yang, Qi Xiao, Rongyao Hou, Xudong Pan, et Xiaoyan Zhu. 2022. « Central role of microglia in sepsis-associated encephalopathy: From mechanism to therapy ». *Frontiers in Immunology* 13.
- Yang, Chao, Xinghan Li, Liang Sun, Weihua Guo, et Weidong Tian. 2017. « Potential of Human Dental Stem Cells in Repairing the Complete Transection of Rat Spinal Cord ». *Journal of Neural Engineering* 14(2):026005. doi: 10.1088/1741-2552/aa596b.
- Yang, Liu, Zhen Li, Zujin Xu, Bin Zhang, Anpeng Liu, Qianwen He, Feng Zheng, et Jia Zhan. 2022. « Protective Effects of Cannabinoid Type 2 Receptor Activation Against Microglia Overactivation and Neuronal Pyroptosis in Sepsis-Associated Encephalopathy ». *Neuroscience* 493:99-108. doi: 10.1016/j.neuroscience.2022.04.011.
- Yang, Shuofei, Haozhe Qi, Kejia Kan, Jiaquan Chen, Hui Xie, Xiangjiang Guo, et Lan Zhang. 2017. « Neutrophil Extracellular Traps Promote Hypercoagulability in Patients With Sepsis ». *Shock: Injury, Inflammation, and Sepsis: Laboratory and Clinical Approaches* 47(2):132-39. doi: 10.1097/SHK.0000000000000741.
- Yende, Sachin, et Derek C. Angus. 2007. « Long-Term Outcomes from Sepsis ». *Current Infectious Disease Reports* 9(5):382-86. doi: 10.1007/s11908-007-0059-3.
- Yipp, Bryan G., et Paul Kubes. 2013. « NETosis: how vital is it? » *Blood* 122(16):2784-94. doi: 10.1182/blood-2013-04-457671.
- Yong, Heather Y. F., Khalil S. Rawji, Samira Ghorbani, Mengzhou Xue, et V. Wee Yong. 2019. « The benefits of neuroinflammation for the repair of the injured central nervous system ». *Cellular and Molecular Immunology* 16(6):540-46. doi: 10.1038/s41423-019-0223-3.
- Yousefi, S., C. Mihalache, E. Kozlowski, I. Schmid, et H. U. Simon. 2009. « Viable Neutrophils Release Mitochondrial DNA to Form Neutrophil Extracellular Traps ». *Cell Death & Differentiation* 16(11):1438-44. doi: 10.1038/cdd.2009.96.

- Yousefi, Shida, Darko Stojkov, Nina Germic, Dagmar Simon, Xiaoliang Wang, Charaf Benarafa, et Hans-Uwe Simon. 2019. « Untangling "NETosis" from NETs ». *European Journal of Immunology* 49(2):221-27. doi: 10.1002/eji.201747053.
- Yuan, Yi-Min, et Cheng He. 2013. « The glial scar in spinal cord injury and repair ». *Neuroscience Bulletin* 29(4):421-35. doi: 10.1007/s12264-013-1358-3.
- Zampieri, Fernando G., et Bruno Mazza. 2017. « Mechanical Ventilation in Sepsis: A Reappraisal ». *Shock (Augusta, Ga.)* 47(1S Suppl 1):41-46. doi: 10.1097/SHK.0000000000000702.
- Zanotti-Cavazzoni, Sergio L., et Roy D. Goldfarb. 2009. « Animal Models of Sepsis ». *Critical Care Clinics* 25(4):703-19. doi: 10.1016/j.ccc.2009.08.005.
- Zantl, N., A. Uebe, B. Neumann, H. Wagner, J. R. Siewert, B. Holzmann, C. D. Heidecke, et K. Pfeffer. 1998. « Essential Role of Gamma Interferon in Survival of Colon Ascendens Stent Peritonitis, a Novel Murine Model of Abdominal Sepsis ». *Infection and Immunity* 66(5):2300-2309. doi: 10.1128/IAI.66.5.2300-2309.1998.
- Zenaro, Elena, Enrica Pietronigro, Vittorina Della Bianca, Gennj Piacentino, Laura Marongiu, Simona Budui, Ermanna Turano, Barbara Rossi, Stefano Angiari, Silvia Dusi, Alessio Montresor, Tommaso Carlucci, Sara Nani, Gabriele Tosadori, Lucia Calciano, Daniele Catalucci, Giorgio Berton, Bruno Bonetti, et Gabriela Constantin. 2015. « Neutrophils Promote Alzheimer's Disease-like Pathology and Cognitive Decline via LFA-1 Integrin ». *Nature Medicine* 21(8):880-86. doi: 10.1038/nm.3913.
- Zhang, Chuan, He-Hui Xie, Ze-An Lu, Min-Juan Zhu, et Ding-Feng Su. 2004. « Inhibition of Inflammation Contributes to Organ Protection of Atenolol in Sinoaortic-Denervated Rats ». *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 43(5):663.
- Zhang, Jieyuan, Huijun Chen, Zhaoxia Duan, Kuijun Chen, Zeng Liu, Lu Zhang, Dongdong Yao, et Bingcang Li. 2017. « The Effects of Co-Transplantation of Olfactory Ensheathing Cells and Schwann Cells on Local Inflammation Environment in the Contused Spinal Cord of Rats ». *Molecular Neurobiology* 54(2):943-53. doi: 10.1007/s12035-016-9709-5.
- Zhao, Huayan, Yuanjun Lyu, Ruiqing Zhai, Guiying Sun, et Xianfei Ding. 2022. « Metformin Mitigates Sepsis-Related Neuroinflammation via Modulating Gut Microbiota and Metabolites ». *Frontiers in Immunology* 13.
- Zhao, Jiayi, Wei Bi, Shu Xiao, Xin Lan, Xiaofeng Cheng, Jiawei Zhang, Daxiang Lu, Wei Wei, Yanping Wang, Hongmei Li, Yongmei Fu, et Lihong Zhu. 2019. « Neuroinflammation Induced by Lipopolysaccharide Causes Cognitive Impairment in Mice ». *Scientific Reports* 9(1):5790. doi: 10.1038/s41598-019-42286-8.
- Zhao, Ming-li, Heng Chi, et Li Sun. 2017. « Neutrophil Extracellular Traps of *Cynoglossus semilaevis*: Production Characteristics and Antibacterial Effect ». *Frontiers in Immunology* 8.
- Zhao, Shuai, Fan Chen, Qiliang Yin, Dunwei Wang, Wei Han, et Yuan Zhang. 2020. « Reactive Oxygen Species Interact With NLRP3 Inflammasomes and Are Involved in the

- Inflammation of Sepsis: From Mechanism to Treatment of Progression ». *Frontiers in Physiology* 11:571810. doi: 10.3389/fphys.2020.571810.
- Zhao, Weihua, David R. Beers, Jason R. Thonhoff, Aaron D. Thome, Alireza Faridar, Jinghong Wang, Shixiang Wen, Loren Ornelas, Dhruv Sareen, Helen S. Goodridge, Clive N. Svendsen, et Stanley H. Appel. 2020. « Immunosuppressive Functions of M2 Macrophages Derived from iPSCs of Patients with ALS and Healthy Controls ». *iScience* 23(6):101192. doi: 10.1016/j.isci.2020.101192.
- Zhu, Xiao-Mei, Yong-Ming Yao, Hua-Ping Liang, Feng Liu, Ning Dong, Yan Yu, et Zhi-Yong Sheng. 2009. « Effect of High Mobility Group Box-1 Protein on Apoptosis of Peritoneal Macrophages ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 492(1):54-61. doi: 10.1016/j.abb.2009.09.016.
- Ziemann, Ulf, Walter Paulus, Michael A. Nitsche, Alvaro Pascual-Leone, Winston D. Byblow, Alfredo Berardelli, Hartwig R. Siebner, Joseph Classen, Leonardo G. Cohen, et John C. Rothwell. 2008. « Consensus: Motor Cortex Plasticity Protocols ». *Brain Stimulation* 1(3):164-82. doi: 10.1016/j.brs.2008.06.006.
- Ziemssen, Tjalf, Tania Kümpfel, Hauke Schneider, Wolfgang E. F. Klinkert, Oliver Neuhaus, et Reinhard Hohlfeld. 2005. « Secretion of Brain-Derived Neurotrophic Factor by Glatiramer Acetate-Reactive T-Helper Cell Lines: Implications for Multiple Sclerosis Therapy ». *Journal of the Neurological Sciences* 233(1-2):109-12. doi: 10.1016/j.jns.2005.03.010.
- Zivkovic, Sandra, Maryam Ayazi, Grace Hammel, et Yi Ren. 2021. « For Better or for Worse: A Look Into Neutrophils in Traumatic Spinal Cord Injury ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 0. doi: 10.3389/fncel.2021.648076.
- Zörner, Björn, Linard Filli, Michelle L. Starkey, Roman Gonzenbach, Hansjörg Kasper, Martina Röthlisberger, Marc Bolliger, et Martin E. Schwab. 2010. « Profiling Locomotor Recovery: Comprehensive Quantification of Impairments after CNS Damage in Rodents ». *Nature Methods* 7(9):701-8. doi: 10.1038/nmeth.1484.
- Zrzavy, T., R. Höftberger, T. Berger, H. Rauschka, O. Butovsky, H. Weiner, et H. Lassmann. 2019. « Pro-inflammatory activation of microglia in the brain of patients with sepsis ». *Neuropathology and Applied Neurobiology* 45(3):278-90. doi: 10.1111/nan.12502.
- Zuo, Chengchao, Huan Cao, Fang Feng, Guo Li, Yaqi Huang, Liudi Zhu, Zhongya Gu, Yuyan Yang, Jianguo Chen, Yongsheng Jiang, et Furong Wang. 2022. « Repetitive transcranial magnetic stimulation exerts anti-inflammatory effects via modulating glial activation in mice with chronic unpredictable mild stress-induced depression ». *International Immunopharmacology* 109:108788. doi: 10.1016/j.intimp.2022.108788.



