



**HAL**  
open science

# Impact du sepsis sur les circuits neuronaux et le comportement à long-terme

Lena Bourhy

► **To cite this version:**

Lena Bourhy. Impact du sepsis sur les circuits neuronaux et le comportement à long-terme. Neurobiologie. Université Paris Cité, 2021. Français. NNT : 2021UNIP5198 . tel-04621807

**HAL Id: tel-04621807**

**<https://theses.hal.science/tel-04621807>**

Submitted on 24 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.

Université de Paris

**BIO SORBONNE PARIS CITE (BIOSPC, 562)**

Unités « Neuropathologie Expérimentale » et « Perception et mémoire »  
Institut Pasteur, Paris

# Impact du sepsis sur les circuits neuronaux et le comportement à long-terme

Par Lena BOURHY

**Thèse de doctorat de Neurobiologie**

Dirigée par Tarek SHARSHAR

Présentée et soutenue publiquement à Paris le 15 décembre 2021

Rapportrice : Aline DESMEDT, Professeure, Université de Bordeaux

Rapportrice : Lucile CAPURON, Directrice de Recherche, Université de Bordeaux

Examinateur : Pierre GRESSENS, Directeur de Recherche, Université de Paris

Examinatrice : Marion PLAZE, Chargée de Recherche, Université de Paris

Examinateur : Cyril HERRY, Directeur de Recherche, Université de Bordeaux

Directeur de thèse : Tarek SHARSHAR, Professeur, Université de Paris

Co-encadrant de thèse : Gabriel LEPOUSEZ, Chargé de Recherche, Sorbonne Université

Membre invité : Pierre-Marie LLEDO, Professeur, Sorbonne Université

# RESUME

Le sepsis se définit comme une réponse immunitaire dérégulée de l'hôte face à une infection qui entraîne une dysfonction d'organe mettant en jeu le pronostic vital. Dans 70% des cas, les patients développent une encéphalopathie qui augmente significativement la létalité et se caractérise par des lésions cérébrales essentiellement localisées dans le tronc cérébral et l'amygdale, régions contrôlant respectivement les réponses neurovégétative et comportementale à l'inflammation. Parmi les patients survivant au sepsis, près de la moitié développe dans les mois à années suivant leur hospitalisation de graves séquelles psychiatriques telles que des troubles de l'anxiété, de dépression et des syndromes de stress post-traumatique (SSPT). Bien que les récents progrès de diagnostic et de réanimation aient permis une diminution de la mortalité, l'incidence du sepsis ne cesse d'augmenter et rend d'autant plus importante la recherche de stratégies préventives pour lutter contre les séquelles qu'il engendre.

Au cours de mon travail de thèse, j'ai cherché à établir un lien de causalité entre les phénomènes neuronaux ayant lieu lors de l'encéphalopathie liée au sepsis et les modifications pathologiques du comportement à long-terme. Pour répondre à cet enjeu, j'ai utilisé un modèle murin de sepsis par ligature et ponction caecale (CLP).

Dans une première étude, nous avons montré que le sepsis induit une activation transitoire d'une sous-population neuronale du noyau central de l'amygdale (CeA) qui projette vers la partie ventrale du noyau du lit de la strie terminale (vBNST). En combinant des techniques de traçage viral à de l'imagerie calcique *in vivo*, nous avons observé que le sepsis provoque des changements persistants de la connectivité et de la réponse fonctionnelle des neurones de la CeA projetant vers le vBNST. L'inhibition transitoire et ciblée de cette sous-population uniquement pendant la phase aiguë du sepsis avec le médicament antiépileptique Levetiracetam, ou avec une approche pharmacogénétique, prévient le développement ultérieur des comportements de type anxiété ou SSPT.

Dans une seconde étude, nous avons souhaité évaluer la contribution du nerf vague pendant le sepsis dans le recrutement du circuit responsable des séquelles comportementales. La réalisation préalable d'une chirurgie de vagotomie sous-diaphragmatique limite l'activation pathologique transitoire du complexe vagal et du BNST dans les heures suivant la CLP et réduit les séquelles anxiodépressives à long-terme.

L'ensemble de ces résultats démontrent que l'activation pathologique transitoire de certains circuits amygdaliens induite par le sepsis – et probablement médiée par le nerf vague – entraîne des altérations durables des propriétés anatomiques et fonctionnelles de ces neurones, responsables des modifications comportementales observées post-sepsis.



# ABSTRACT

Sepsis is defined as a life-threatening organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection. In 70% of cases, patients develop encephalopathy, which significantly increases lethality. It is also characterized by a strong neuronal activation and apoptosis in specific brain areas, notably the brainstem and the amygdala, regions controlling neurovegetative and behavioral responses to inflammation, respectively. Interestingly, patients who clear the infection and survive sepsis later develop severe psychiatric disorders including depression, anxiety, and post-traumatic stress disorder (PTSD) that lead to increased suicide rates. Despite the medical, epidemiological, and social burden of these post-sepsis psychiatric disorders, there is no specific treatment to date that prevents or diminishes their occurrence.

In this thesis, I sought to establish a causal link between the neuronal events occurring during sepsis-associated encephalopathy and long-term pathological behavioral outcomes. To address this issue, I used a rodent model of sepsis induced by cecal ligation and puncture (CLP).

In a first study, we highlighted that sepsis induces a transient activation of a neuronal subpopulation of the central nucleus of the amygdala (CeA) that projects to the ventral part of the bed nucleus of the stria terminalis (vBNST). Combining viral tracing techniques with *in vivo* calcium imaging, we noticed that sepsis induces persistent changes in the connectivity and functional response of CeA neurons projecting to the vBNST. Transient targeted inhibition of this subpopulation only during the acute phase of sepsis with the antiepileptic drug Levetiracetam, or with a pharmacogenetic approach, prevents the subsequent development of anxiety and PTSD-like behaviors.

In a second study, our objective was to evaluate the contribution of the vagus nerve in the recruitment of the circuits responsible for post-sepsis behavioral changes. Prior subdiaphragmatic vagotomy surgery limits transient pathological activation of the vagal complex and the BNST in the hours following CLP and reduces long-term anxio-depressive behavior.

Taken together, these results demonstrate that the sepsis-induced transient activation of amygdala circuits –probably mediated by the vagus nerve - results in lasting alterations of the anatomical and functional properties of these neurons, responsible for the post-sepsis behavioral outcomes.

# TABLE DES MATIERES

<i>Introduction</i> .....	<b>10</b>
<b>1. Le sepsis</b> .....	<b>10</b>
1. Définition .....	10
2. Histoire et découverte de la maladie .....	10
3. Incidence .....	12
4. Étiologie et facteurs de risque .....	13
5. Physiopathologie .....	15
6. Signes cliniques .....	18
7. Diagnostic .....	18
8. Traitement.....	20
<b>2. Impact de l'inflammation sur le cerveau</b> .....	<b>22</b>
1. Réponse cérébrale physiologique à l'inflammation .....	22
2. Encéphalopathie liée au sepsis .....	36
3. Séquelles psycho-cognitives post-sepsis.....	42
4. Modèles animaux d'encéphalopathie liée au sepsis .....	45
<b>3. Neurobiologie des troubles comportementaux liés à la peur et à l'anxiété</b>	<b>49</b>
1. Peur et anxiété en psychiatrie .....	49
2. Modèles animaux d'évaluation de la peur et de l'anxiété .....	53
3. Circuits neuronaux impliqués.....	57
4. Anxiété, syndrome de stress post-traumatique et inflammation.....	63
<i>Problématiques de la thèse</i> .....	<b>67</b>
<i>Article #1</i> .....	<b>70</b>
<i>Article #2</i> .....	<b>127</b>
<i>Discussion</i> .....	<b>147</b>
1. La CLP : un nouveau modèle de troubles psychiatriques ? .....	149
2. L'activation pathologique d'un circuit neuronal spécifique lors du sepsis à l'origine des séquelles comportementales.....	155
3. Mécanismes à l'origine des modifications durables du comportement....	164
4. Le nerf vague : une cible thérapeutique contre les séquelles du sepsis ?.	173
<i>Bibliographie</i> .....	<b>182</b>
<i>Annexes</i> .....	<b>208</b>

# TABLE DES FIGURES

Figure 1 - Mortalité liée au sepsis dans le monde.....	13
Figure 2 - Principales infections primaires à l'origine de sepsis.....	14
Figure 3 - Populations les plus à risque de développer un sepsis .....	14
Figure 4 - Physiopathologie générale du sepsis .....	17
Figure 5 - Traitement du sepsis .....	21
Figure 6 - Voie neurale.....	24
Figure 7 - Voie humorale au niveau des organes circumventriculaires.....	26
Figure 8 - Organisation anatomique du plexus choroïde .....	27
Figure 9 – Voies de communication entre périphérie et cerveau .....	29
Figure 10 – Circuits neuronaux recrutés lors de l'inflammation .....	31
Figure 11 -Neuroanatomie et mécanismes du réflexe immunitaire.....	33
Figure 12 - Axe hypothalamo-hypophysaire.....	35
Figure 13 - Physiopathologie de l'Encéphalopathie liée au sepsis .....	38
Figure 14 – Séquelles cognitives et fonctionnelles post-sepsis .....	43
Figure 15 - Modèle des interactions déterminantes de l'évolution clinique à court et long termes des patients atteints de sepsis.....	44
Figure 16 - Protocole de la CLP .....	47
Figure 17 - Modèles d'anxiété chez le rongeur .....	54
Figure 18 - Principe du test de conditionnement à la peur .....	56
Figure 19 – Modèles de SSPT actuels .....	57
Figure 20 - Circuits de la peur et de l'anxiété .....	58
Figure 21 - Organisation en quatre étapes des circuits de l'anxiété .....	61
Figure 22 - Microcircuit de la CEA.....	63
Figure 23 - Bilan des résultats de l'étude .....	147
Figure 24 - La CLP comme modèle de SSPT .....	152
Figure 25 - Principe de l'étude de sous-types de patients en psychiatrie, modèle des troubles dépressifs.....	153
Figure 26 - Impact de la vagotomie sur les séquelles de peur post-sepsis.....	158
Figure 27 - Perspectives : manipulation pharmacogénétique des branches sensibles du nerf vague.....	161
Figure 28 - Connectivité des différentes sous-régions de l'hippocampe.....	163

Figure 29 - Circuits opposés de régulation de l'anxiété dans le BNST.....	166
Figure 30 - Perspective.....	168
Figure 31 - Perspective.....	169
Figure 32 - Stimulation du nerf vague par implant.....	173
Figure 33- Modèle de modulation de la réponse émotionnelle médiée par SNV .....	174
Figure 34 - Impact de l'administration ICV de LEV sur les séquelles comportementales du sepsis .....	178

# TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 - Diagnostic du sepsis par évaluation du score SOFA (Sequential [Sepsis-related] Organ Failure Assessment) .....	19
Tableau 2 - Comparaison des principaux modèles animaux de sepsis .....	46
Tableau 3 - Score d'évaluation de la sévérité du sepsis induit par CLP .....	47
Tableau 4 - Définition et incidence des troubles anxieux.....	50

# INTRODUCTION

# INTRODUCTION

## 1. LE SEPSIS

### 1. DEFINITION

---

Depuis 2016, le sepsis se définit comme une infection associée à une dysfonction d'organe mettant en jeu le pronostic vital et causée par une réponse immunitaire dérégulée de l'hôte face à l'infection (*Singer et al. 2016*).

Cette définition est le fruit de la troisième conférence de consensus international sur la définition du sepsis et du choc septique (Sepsis-3). En effet, le sepsis est un syndrome complexe, qui correspond à des physiopathologies multiples, et dont la définition ne cesse d'être modifiée. Au cours des 30 dernières années, les progrès des techniques de réanimation se sont traduits par une augmentation du nombre de patients soignés en soins intensifs pour sepsis et ont suscité une prise de conscience quant à l'importance médicale et économique de ce syndrome. Accompagnée des progrès dans la compréhension de la physiopathologie de la maladie, cette prise de conscience a poussé le corps médical à définir le plus précisément possible les états septiques, dans le but d'améliorer le diagnostic et la prise en charge précoces des patients. Ainsi cette 3<sup>ème</sup> et dernière définition s'est appuyée sur des analyses de cohortes à grandes échelles, qui ont permis de définir les nouveaux critères de diagnostic du sepsis (*Shankar-Hari et al. 2016; Seymour et al. 2012*).

À noter qu'il ne faut pas confondre le terme « sepsis » avec le terme « septicémie », qui désigne uniquement la présence d'agents infectieux dans le sang.

### 2. HISTOIRE ET DECOUVERTE DE LA MALADIE

---

Le terme « sepsis » date d'Hippocrate, qui le considérait à l'époque comme le procédé lié à la suppuration et à la putréfaction des blessures (*Cavaillon 2017*). À



partir du XVII<sup>e</sup> siècle, la principale forme de sepsis qui sévissait était la fièvre puerpérale chez les femmes peu de temps après l'accouchement. Fléau des premières maternités hospitalières entre le XVII<sup>e</sup> et le XIX<sup>e</sup> siècle, il en découla de véritables épidémies, dont la première fut déclarée à l'Hôtel Dieu à Paris en 1664. Les techniques médicales de l'époque se sont avérées alors totalement impuissantes face à cette fatalité qui décima des millions de femmes en *post-partum*. En 1751, le médecin anglais John Burton fut le premier à suggérer la contagiosité des fièvres puerpérales. Les études qui suivirent sur cette maladie associèrent la survenue rapide du décès avec l'inflammation de l'utérus ou du tube digestif. Dès la seconde moitié du XVIII<sup>e</sup> siècle, certains médecins pionniers pointèrent du doigt le rôle du corps médical et du matériel de maternité comme vecteurs de contagiosité et préconisèrent des mesures strictes d'hygiène. Cependant, les institutions médicales se montrèrent réticentes et restèrent longtemps sourdes à ces préconisations. Il fallut attendre près d'un siècle pour que les hôpitaux et les médecins reconnaissent les mesures d'hygiène comme la technique de prévention majeure des fièvres puerpérales.

En 1858, le médecin français Armand Trousseau fut frappé par les similitudes de l'évolution de la maladie entre la fièvre puerpérale et la fièvre des hôpitaux (encore appelée gangrène des hôpitaux) qui entraînait la mort des blessés dont les plaies s'infectaient. Il déclara alors : « La maladie que l'on appelle la fièvre puerpérale est une maladie spécifique ; mais elle n'est pas propre aux femmes en couches ; elle peut aussi atteindre des femmes qui ne sont pas accouchées, le fœtus, le nouveau-né, les blessés, tous les hommes enfin. ».

En 1869, Victor Feltz et Léon Coze, deux médecins alsaciens, injectèrent le sang d'une patiente décédée de fièvre puerpérale chez des lapins, qui moururent dans les jours qui suivirent des symptômes classiques d'une infection généralisée. Ces résultats ont démontré la possibilité de transmettre une septicémie et ont mis en évidence la présence de germes dans le sang de la malade. Ce germe responsable du sepsis fut tout d'abord considéré comme unique, mais les travaux de Louis Pasteur sur le sujet en 1879 conclurent qu'il n'y avait pas de germe spécifique de la fièvre puerpérale et du sepsis. Les premiers traitements par des antibiotiques de patients atteints de sepsis ont été réalisés à partir des années 1930-1940.

### 3. INCIDENCE

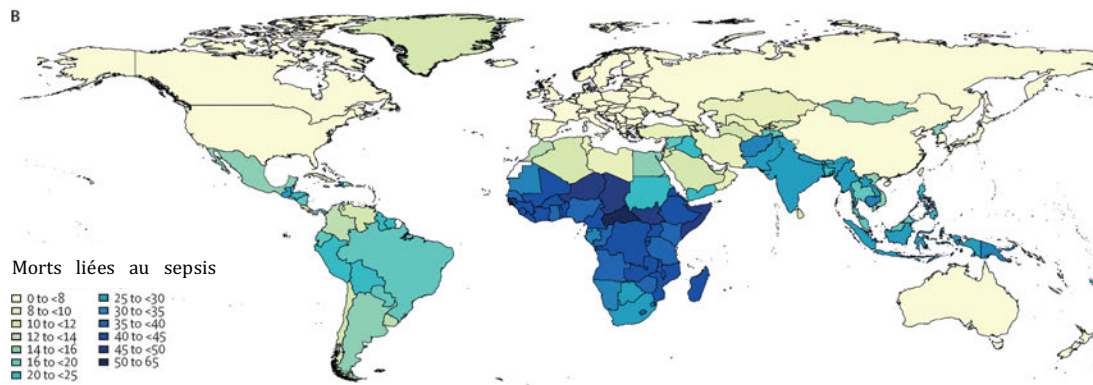
---

Actuellement, le sepsis est considéré comme une des premières causes de mortalité en réanimation. Aux États-Unis, on estime que le sepsis est responsable de 30 à 50 % de l'ensemble des décès répertoriés à l'hôpital (*Liu et al. 2014*). Une étude réalisée au sein d'un service d'urgences américain a montré que le nombre d'admissions annuelles pour sepsis a quasiment triplé en 10 ans, passant d'environ 150 pour 100 000 patients admis aux urgences en 2004 à plus de 400 en 2009. Ce chiffre surpasse le nombre de cas estimés pour les cancers des poumons, du sein et de la prostate cumulés (*Seymour et al. 2012*).

En Europe, la mortalité moyenne des patients admis en soins intensifs pour sepsis s'élève à 27 % (*Vincent et al. 2006*). Ces 20 dernières années, la mortalité liée au sepsis est en baisse, principalement grâce au progrès médicaux et techniques de réanimation. En revanche, l'incidence ne cesse d'augmenter, paramètre que l'on explique principalement par le vieillissement de la population dans les pays développés, mais aussi par un meilleur diagnostic du syndrome ces dernières décennies.

Au niveau mondial, le sepsis affecte 50 millions de personnes par an et on estime qu'une personne meurt de sepsis toutes les 3 à 4 secondes (*Fleischmann et al. 2016; Rudd et al. 2020*). Si le sepsis est une maladie qui frappe tout particulièrement les personnes âgées dans les pays développés, elle est au contraire principalement une pathologie du nouveau-né dans les pays en voie de développement. On considère que l'incidence et la mortalité les plus élevées liées au sepsis se situent dans les pays les plus pauvres, cependant l'incidence exacte y est très difficile à évaluer. On estime toutefois qu'environ 70 % des 9 millions de décès infantiles par infections respiratoires sont associés à un sepsis, principalement en Asie et en Afrique.

À noter que le sepsis peut aussi s'avérer être une complication et un syndrome terminal pour de nombreuses maladies graves (cancer (*Hensley et al. 2019*), Sars-CoV-2 (*Hui Li et al. 2020*), etc...).



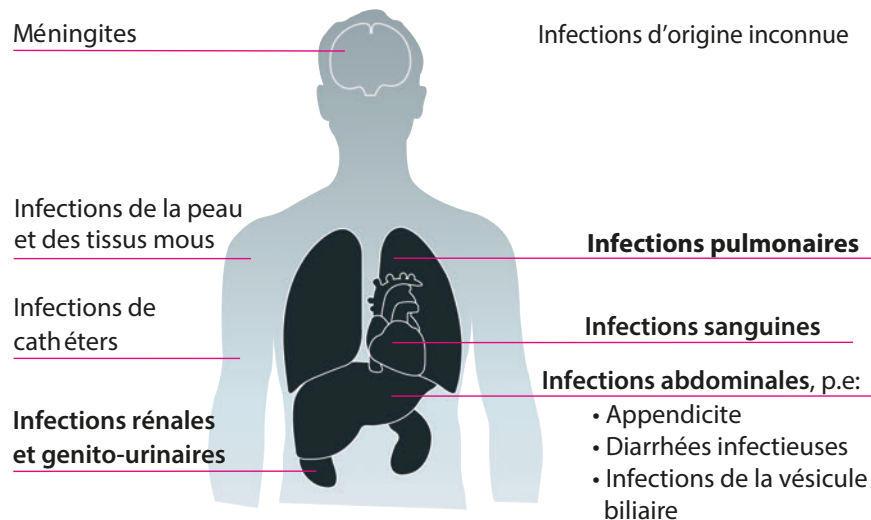
**FIGURE 1 - MORTALITE LIEE AU SEPSIS DANS LE MONDE**

Adapté de Rudd et al., The Lancet, 2020

Malgré cette forte incidence et gravité, un sondage effectué en 2018 a montré que seuls 10 % des Français répondaient favorablement à la question « Avez-vous déjà entendu parler du sepsis ? » (*Kerrigan et Martin-Loeches 2018*). Ce pourcentage monte à près de 60 % en Allemagne ou au Royaume-Uni, pays où la communication et la prise en compte du sepsis comme priorité de santé publique ont été développées depuis des années. En juin 2017, face à la gravité de la situation, l'Organisation mondiale de la santé a émis une résolution promouvant le sepsis au rang de priorité de santé publique mondiale (*Reinhart et al. 2017*). Elle y préconise une série de mesures, principalement focalisées sur l'information au patient et au personnel médical, pour progresser vers un diagnostic précoce du sepsis et sa reconnaissance comme urgence médicale absolue.

#### 4. ÉTIOLOGIE ET FACTEURS DE RISQUE

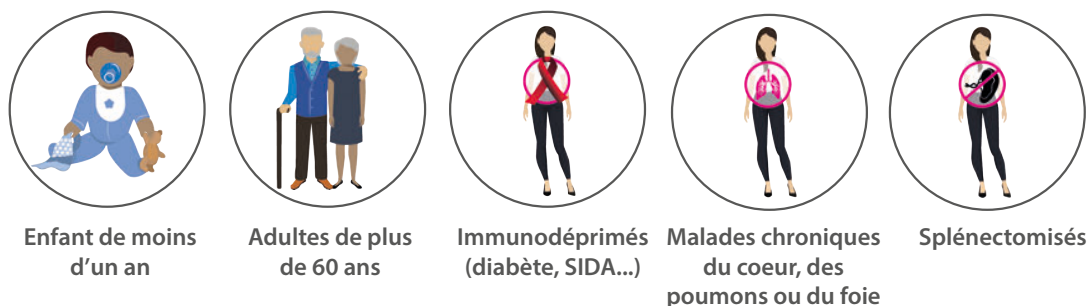
Tout type d'agent infectieux peut être à l'origine d'un sepsis. Toutefois, les bactéries sont les agents les plus souvent mis en cause dans le développement de la maladie. Chez les patients décédés de sepsis, les principaux agents bactériens incriminés sont *Staphylococcus aureus* (30 %), *Streptococcus pneumoniae* (18 %), *Pseudomonas aeruginosa* (14 %) et *Escherichia coli* (13 %) (*Vincent et al. 2006*). L'infection primaire à l'origine du sepsis est variable et la progression de l'infection au sepsis peut être insidieuse et imprévisible. Toutefois, les pneumonies représentent 64 % des étiologies primaires, suivies par les infections abdominales (20 %), sanguines (15 %) et génito-urinaires (14 %) (*Vincent et al. 2006; 2009; Karlsson et al. 2007*).



**FIGURE 2 - PRINCIPALES INFECTIONS PRIMAIRES A L'ORIGINE DE SEPSIS**

Adapté de [www.worldsepsisday.org](http://www.worldsepsisday.org)

Les principaux facteurs de risque au développement du sepsis varient en fonction de l'étape de progression de la maladie (*Angus et van der Poll 2013*). Le premier facteur concerne la prédisposition propre au patient à développer une infection primaire (maladie chronique, utilisation d'agents immunosuppresseurs). Le deuxième critère correspond à la probabilité d'apparition d'une dysfonction d'organe aiguë dans le cas où cette infection se déclare. Ce facteur inclut l'agent infectieux impliqué, mais aussi une composante intrinsèque au patient (âge, sexe, origine, maladies concomitantes) (*Mayr et al. 2010*). Ainsi les populations les plus à risque sont les enfants, les personnes âgées et immunodéprimées. On remarque également que les hommes sont plus touchés que les femmes.



**FIGURE 3 - POPULATIONS LES PLUS A RISQUE DE DEVELOPPER UN SEPSIS**

Adapté de [www.worldsepsisday.org](http://www.worldsepsisday.org)

Des études s'interrogent sur une éventuelle contribution des caractéristiques génétiques de l'hôte sur l'incidence et la réponse au traitement du sepsis (*Man et al. 2013*). Les polymorphismes les plus étudiés sont ceux concernant le facteur de

nécrose tumorale (*Tumoral necrosis factor* ou TNF) et les récepteurs de type Toll (*Toll-like receptor* ou TLR) sans qu'aucune conclusion significative n'ait pu être mise en évidence (*Boyd, Russell, et Fjell 2014*).

## 5. PHYSIOPATHOLOGIE

---

L'infection entraîne une réponse innée impliquant des phénomènes à la fois pro et anti-inflammatoires dont la direction, la durée, et l'intensité varient en fonction de l'agent pathogène en cause et du profil génétique et médical du patient (*Angus et van der Poll 2013*).

Le système immunitaire inné, composé principalement de macrophages, de monocytes, de granulocytes, de lymphocytes Natural Killer (NK) et de cellules dendritiques, détecte les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) et les motifs moléculaires associés aux dommages (DAMP). Les PAMP désignent les motifs moléculaires caractéristiques des micro-organismes détectables par le système immunitaire inné, par exemple des composants des parois bactériennes (lipopolysaccharides (LPS), peptidoglycanes) et des flagelles (flagelline) ou encore des acides nucléiques bactériens et viraux. Les DAMP comprennent les molécules endogènes libérées par les cellules hôtes endommagées, y compris l'ATP, l'ADN mitochondrial ou des protéines constitutives de la chromatine comme HMGB1. Les DAMP et les PAMP interagissent avec les cellules du système immunitaire inné et certaines cellules épithéliales par l'intermédiaire d'un ensemble de récepteurs (*Pattern recognition receptor* ou PRR) présents à la surface des cellules (*Toll-like receptor* ou TLR, et récepteurs à la lectine de type C) ou dans le cytoplasme (récepteurs de type NOD1/2, récepteurs de type RIG-I). Ces interactions déclenchent une réponse transcriptionnelle, notamment l'activation de la voie NF- $\kappa$ B, qui se traduit par la néosynthèse de protéines parmi lesquelles les interférons de type I et les cytokines pro-inflammatoires comme le TNF, les interleukines IL-1 et IL-6. La reconnaissance de ces signaux inflammatoires dans le cytoplasme entraîne le recrutement de protéines, notamment de la famille NLRP, qui s'assemblent en complexes moléculaires appelés inflammasomes. Les inflammasomes jouent un rôle important dans la maturation et la sécrétion des

cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$  et IL-18, et peuvent déclencher la mort cellulaire programmée par rupture rapide de la membrane plasmique médiée par les caspases. Cette réponse immunitaire excessive entraîne des lésions collatérales et la mort cellulaire par nécrose, libérant des DAMP qui entretiennent et perpétuent l'inflammation en intégrant la boucle de stimulation de l'immunité innée.

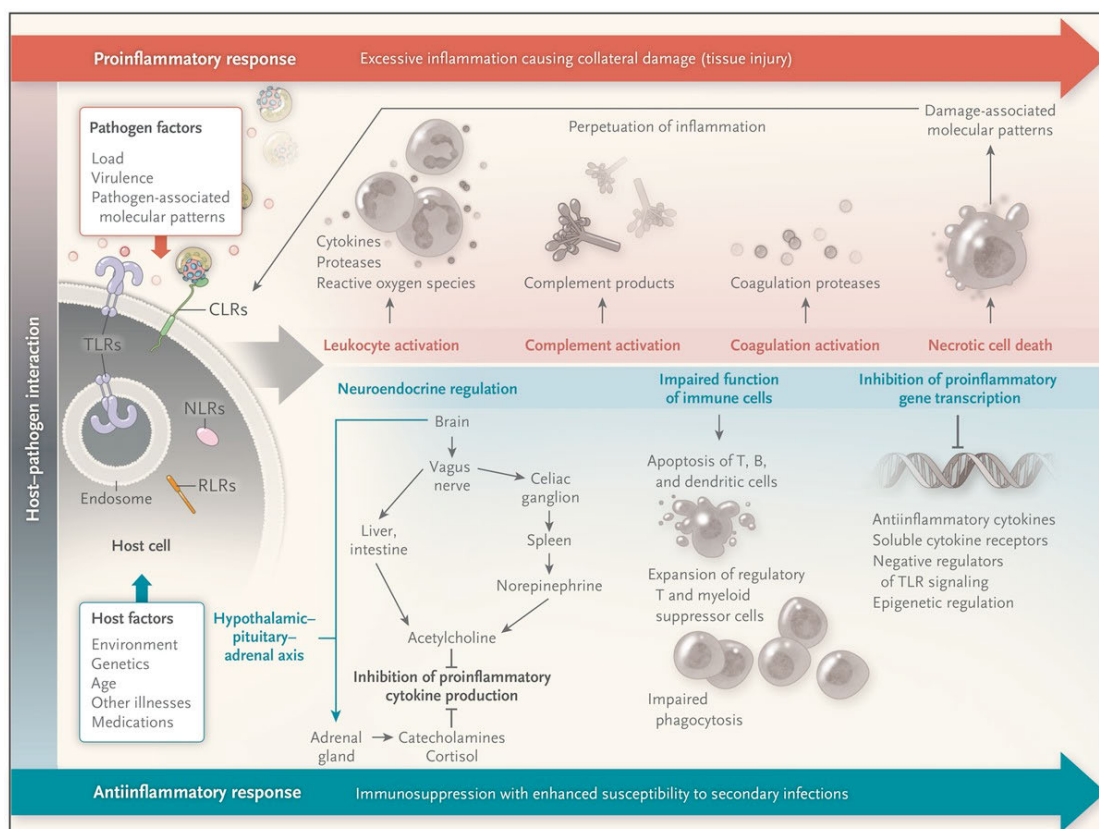
On parle alors de tempête cytokinique. Ces cytokines pro-inflammatoires entraînent l'activation et l'augmentation prolongée du nombre de cellules immunitaires ainsi que l'expression accrue de molécules d'adhésion et de chimiokines à la surface des cellules endothéliales. Le sepsis sévère conduit également dans la quasi-totalité des cas à des troubles de la coagulation, avec à l'extrême une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD). La thrombose vasculaire est due à une coagulation excessive médiée par le récepteur cellulaire transmembranaire Thromboplastine, à l'activation du complément, et à un défaut des mécanismes anticoagulants consécutif à l'inhibition des voies anticoagulantes endogènes. Des troubles de la fibrinolyse sont également observés avec une inhibition accrue de l'activateur du plasminogène 1 (PAL 1). De même, les neutrophiles en mort cellulaire libèrent des pièges extracellulaires des neutrophiles ou *neutrophil extracellular traps* (NETs) qui facilitent la formation de thrombi. Ces phénomènes favorisent une hypoperfusion tissulaire, aggravée par la vasodilatation, la baisse de pression artérielle et l'augmentation de la rigidité des hématies caractéristiques des états septiques.

Enfin, l'augmentation des besoins métaboliques et énergétiques pendant le sepsis entraîne un stress oxydatif à l'origine de la libération de dérivés réactifs de l'oxygène (comme le monoxyde d'azote (NO)). Ces phénomènes entraînent des altérations de la fonction mitochondriale et par conséquent un défaut de production d'ATP qui concourent aux dysfonctions d'organes.

Parallèlement, une réponse anti-inflammatoire à médiation cellulaire et humorale atténue les effets lésionnels liés à la réponse pro-inflammatoire. Ces processus anti-inflammatoires associent plus particulièrement une activation de l'axe hypothalamo-hypophysaire (HPA), une altération des cellules immunitaires, leur autophagie, ainsi qu'une régulation épigénétique des gènes pro-inflammatoires. Toutefois, la réponse anti-inflammatoire augmente les risques d'infections

nosocomiales chez les patients hospitalisés pour sepsis (*Hotchkiss, Monneret, et Payen 2013*).

Cette réponse de l'hôte à l'infection est complexe, variable et prolongée, et associe des mécanismes pro- et anti-inflammatoires qui peuvent à la fois contribuer à l'élimination de l'infection et à la récupération des tissus d'une part, et aux dysfonctions d'organes et aux infections secondaires d'autre part. La réponse spécifique de chaque patient dépend de l'agent pathogène responsable (charge et virulence) et de l'hôte (caractéristiques génétiques et maladies coexistantes), avec des réponses différentielles aux niveaux local, régional et systémique, qui concourent à l'évolution de l'infection en sepsis. La composition et la direction de la réponse de l'hôte changent probablement au fil du temps, parallèlement à l'évolution clinique. En général, on pense que les réactions pro-inflammatoires sont responsables des lésions tissulaires collatérales et des défaillances d'organes dans le cas d'un sepsis grave, tandis que les réponses anti-inflammatoires sont impliquées dans la susceptibilité accrue aux infections secondaires (*Angus et van der Poll 2013*).



**FIGURE 4 - PHYSIOPATHOLOGIE GENERALE DU SEPSIS**

Angus et al., N Engl J Med, 2013  
 TLRs : récepteurs de type Toll, NLRs : récepteurs de type NOD, RLRs : récepteurs de type Rig,  
 CLRs : récepteurs de lectine de type C

## 6. SIGNES CLINIQUES

---

En raison de la diversité des sites d'infection primaire, du type d'agent causal, mais aussi de la susceptibilité du patient et du délai d'instauration du traitement, les signes cliniques associés au sepsis varient et sont parfois difficiles à identifier (*Angus et van der Poll 2013*). Les patients présentent toutefois les signes classiques d'une infection (fièvre, frissons, somnolence) auxquels s'ajoutent les symptômes liés à la (ou les) dysfonction(s) d'organe associée(s).

Ces dysfonctions d'organes touchent le plus souvent le système respiratoire, avec l'apparition de signe d'insuffisance, voire de détresse respiratoire aiguë. Elles concernent également fréquemment le système cardio-vasculaire, entraînant une hypotension responsable d'une hypo-perfusion tissulaire qui entraîne l'augmentation de la lactatémie, mais également des défaillances d'organe, notamment hépatique, rénale et neurologique. L'atteinte cérébrale se manifeste par des troubles de la vigilance, un délirium (état de confusion soudain et temporaire), ou à l'extrême un coma. Le sepsis peut également se compliquer de troubles endocrinologiques (telle qu'une insuffisance surrénalienne relative), métaboliques (hyperglycémie et/ou désordre acido-basique), et de l'hémostase (thrombopénie qui peut être en rapport avec une CIVD). Cette dernière concourt à l'hypoperfusion tissulaire par la formation de thrombi intravasculaires (1).

## 7. DIAGNOSTIC

---

Le diagnostic du sepsis prend en compte différents critères incluant les manifestations :

1. Cliniques : tachycardie, hypotension artérielle, marbrures cutanées, polypnée, encéphalopathie liée au sepsis (agitation, confusion, troubles de conscience pouvant aller jusqu'au coma profond) et oligoanurie.
2. Et biologiques : acidose métabolique, hyperlactatémie, insuffisance rénale aiguë avec une augmentation de la concentration sanguine en urée et créatinine, CIVD.



Cependant, depuis la conférence Sepsis-3 en 2016, la dysfonction d'organe est objectivée par le score SOFA ou *Sequential [Sepsis-related] Organ Failure Assessment*. Un score SOFA supérieur ou égal à 2 correspond à une mortalité hospitalière supérieure à 10 %.

SCORE	0	1	2	3	4
<b>Respiration</b> PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> , mmHg (kPa)	≥400	< 400 (53,3)	< 300 (40)	< 200 (26,7) avec support respiratoire	< 100 (13,3) avec support respiratoire
<b>Coagulation</b> Plaquettes x 10 <sup>3</sup> /μL	≥ 150	< 150	< 100	< 50	< 20
<b>Fonction hépatique</b> Bilirubine, mg/dL	< 1,2	1,2 – 1,9	2,0 – 5,9	6,0 – 11,9	> 12,0
<b>Fonction cardio- vasculaire</b>	Pression artérielle moyenne ≥70 mmHg	Pression artérielle moyenne < 70 mmHg	Dobutamine (quelle que soit la dose)	Noradrénaline ≤ 0.1 μg/kg/min	Noradrénaline > 0.1 μg/kg/min
<b>Fonction cérébrale</b> Score de coma de Glasgow	15	13 - 14	10 - 12	6 - 9	< 6
<b>Fonction rénale</b> Créatinine, mg/dL Diurèse, mL	< 1,2	1,2 – 1,9	2,0 – 3,4	3,5 – 4,9  < 500	> 5,0  < 200

**TABLEAU 1 - DIAGNOSTIC DU SEPSIS PAR EVALUATION DU SCORE SOFA (SEQUENTIAL [SEPSIS-RELATED] ORGAN FAILURE ASSESSMENT)**

Les travaux émanant de la conférence Sepsis-3 proposent également l'utilisation du score « quick SOFA » (qSOFA) comme un outil de dépistage rapide du sepsis (*Shankar-Hari et al. 2016*). Tout comme le score SOFA, si celui-ci est supérieur ou égal à 2, il prédit l'admission en soins intensifs et une augmentation du risque de décès hospitalier, avec des performances similaires au SOFA.

Critères du qSOFA
Fréquence respiratoire ≥ 22 cycles par minutes Pression artérielle systolique ≤ 100 mmHg Troubles de la vigilance

Ces scores permettent de distinguer le sepsis de sa forme plus sévère : le choc septique.

Critères du choc septique
Définition du sepsis + Besoin de vasopresseurs pour maintenir la PAM ≥ 65 mmHg Taux de lactate sérique > 2 mmol/L en l'absence d'hypovolémie

## 8. TRAITEMENT

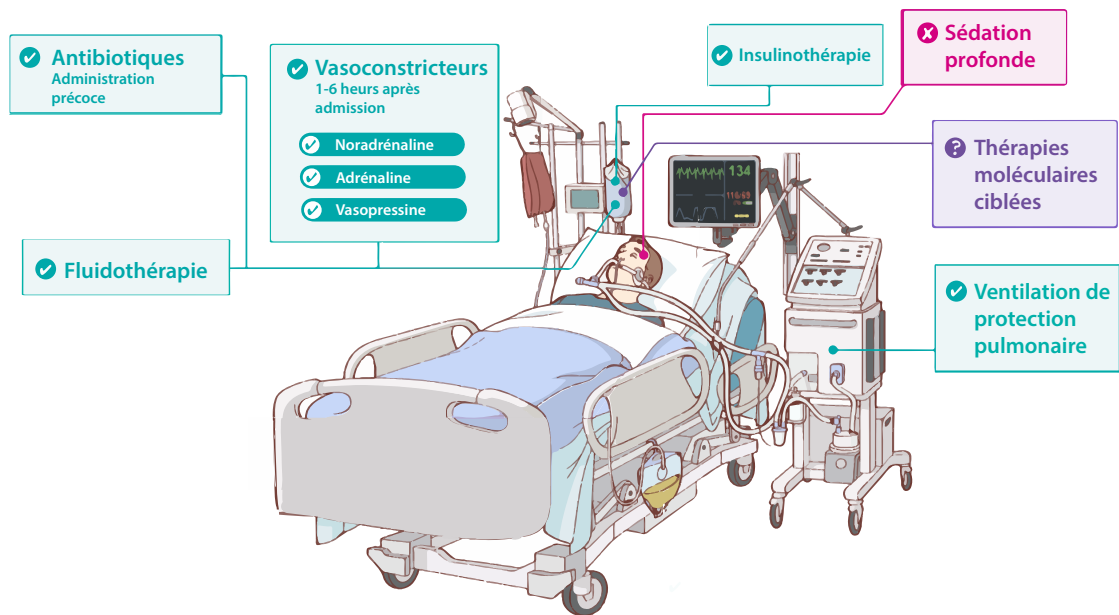
---

Le traitement des états septiques en service de réanimation inclut à la fois la mise en place d'une antibiothérapie et le traitement de l'état de choc (*Gotts et Matthay 2016*).

La mise en place précoce d'une antibiothérapie appropriée est l'arme thérapeutique essentielle (*Seymour et al. 2017*). Chaque heure de retard dans l'administration d'antibiotiques après le début du choc septique réduit de près de 12 % la survie des malades (*Kumar et al. 2006*). Malheureusement, en raison d'une administration excessive d'antibiotiques dans le passé, le sepsis est aujourd'hui souvent causé par des bactéries multirésistantes aux antibiotiques, ou bien par des bactéries sensibles aux antibiotiques, mais très virulentes.

Le traitement de l'état de choc doit être réalisé immédiatement à l'admission du patient à l'hôpital et consiste en une restitution de la volémie par perfusion et administration par voie intraveineuse d'une drogue vasopressive, associée à une oxygénothérapie avec ventilation mécanique si besoin (*Angus et van der Poll 2013*). Les patients septiques présentent souvent une hyperglycémie, qu'il est recommandé de traiter par insulinothérapie. L'utilisation de sédatif est souvent nécessaire à cause de ces traitements invasifs, cependant les recommandations sont en faveur d'en trouver la dose minimale efficace. En effet, la sédation a pour inconvénient de limiter l'évaluation neurologique du patient, de prolonger la ventilation mécanique et de favoriser la survenue d'un syndrome confusionnel (c.-à-d. delirium) (*Schweickert et al. 2009*).

Au cours des 40 dernières années, des études précliniques et cliniques de phases I et II ont montré des résultats prometteurs quant à l'utilisation d'agents bloquants de la cascade pro-inflammatoire activée au cours du sepsis dans la réduction de la mortalité, par exemple les anti-TNF ou les corticoïdes (*Fisher et al. 1996; Schumer 1976*). Malheureusement, les phases III et IV de ces essais thérapeutiques se sont avérées extrêmement décevantes. Ces résultats contrastés pourraient être dus à l'hétérogénéité intrinsèque des patients et à la pluralité des entités cliniques que recouvre ce syndrome (*Fink et Warren 2014*). Les nouvelles recherches se focalisent à présent sur l'étude phénotypique de sous-groupes de patients.



**FIGURE 5 - TRAITEMENT DU SEPSIS**

Adapté de Will Stahl-Timmins – BMJ Publishing group, 2016

## 2. IMPACT DE L'INFLAMMATION SUR LE CERVEAU

### 1. REPONSE CEREBRALE PHYSIOLOGIQUE A L'INFLAMMATION

---

#### I. COMPORTEMENT DE MALADIE

---

Le comportement de maladie est une réponse cérébrale physiologique à une réponse inflammatoire systémique, notamment induite par une infection, et qui se caractérise par un retrait social, une baisse des performances cognitives (ralentissement psychomoteur, troubles de l'attention), une altération de la vigilance (anxiété, insomnie, hypersomnie, fatigue, somnolence), des troubles thymiques (irritabilité, dépression) ainsi que des modifications du comportement alimentaire (anorexie, perte de poids, soif) (*Dantzer et al. 2008*). Il est considéré comme un comportement physiologique de protection de l'individu face à une situation d'agression, et précède toute évolution vers les réponses comportementales pathologiques développées quand l'infection progresse vers un sepsis.

Ce comportement de maladie est induit par l'action de cytokines pro-inflammatoires qui sont libérées au niveau du site d'infection et qui modulent la réponse endocrine, autonome et comportementale de l'hôte face à l'agent pathogène.

#### II. VOIES RELAIS DE L'INFLAMMATION PERIPHERIQUE AU CERVEAU

---

La réponse immunitaire innée de l'hôte face à l'infection est transmise au système nerveux central par plusieurs voies parallèles :

##### a) LA VOIE NEURALE

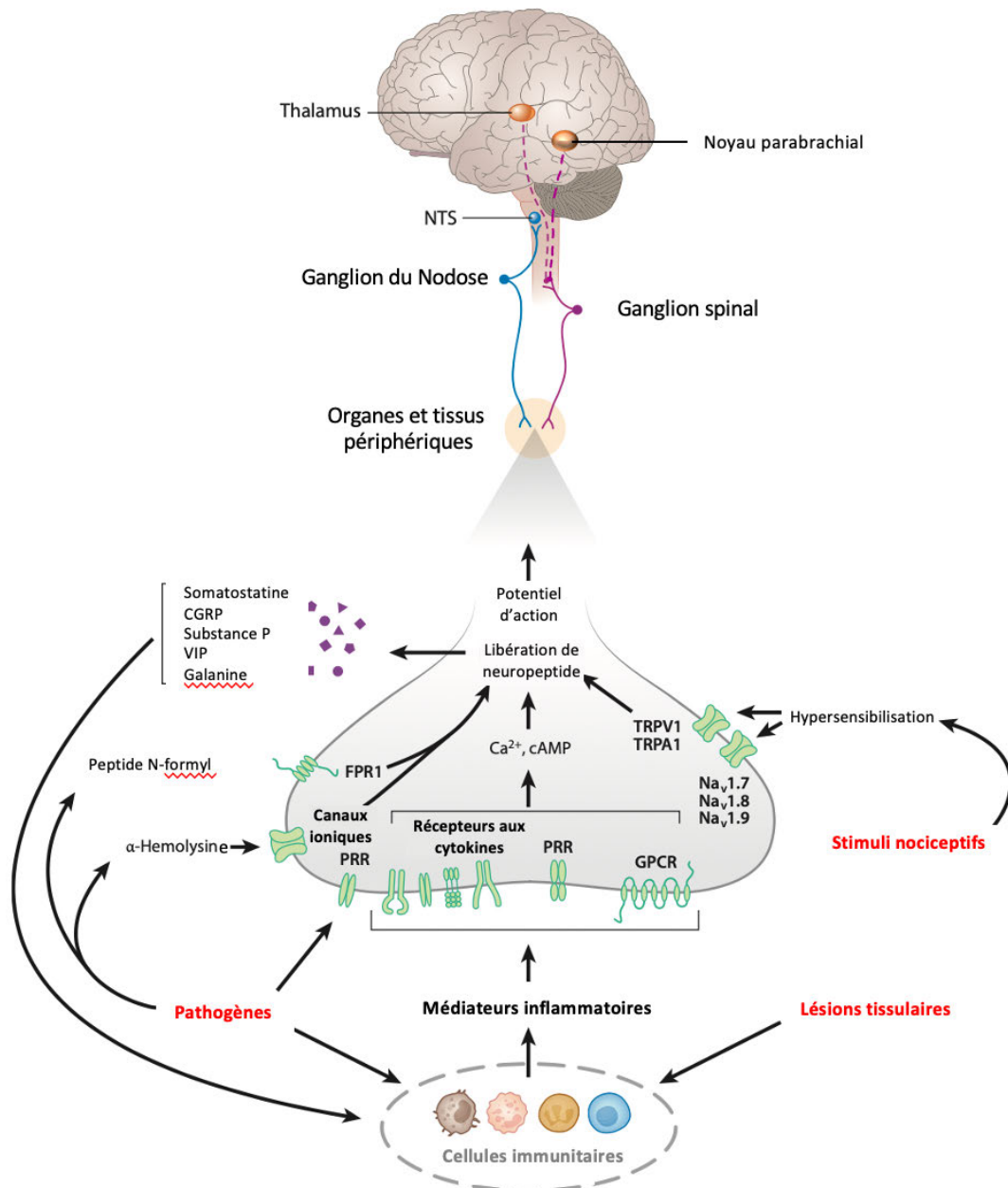
La première voie de la réponse immunitaire innée est la voie nerveuse via l'activation des nerfs périphériques activés par la libération locale de cytokines au site d'infection (*Pavlov, Chavan, et Tracey 2018*). Les neurones sensoriels qui les constituent sont des cellules pseudo-unipolaires dotées d'un seul processus

formant un axone bidirectionnel et dont les corps cellulaires sont situés dans des ganglions en dehors du système nerveux central. On distingue :

- Les neurones, dont les corps cellulaires, appartiennent aux ganglions spinaux de la racine dorsale (ou *dorsal root ganglia*). Ils sont composés d'afférences somatosensorielles (innervant les muscles, des articulations et de la peau) et viscérales (innervant le système gastro-intestinal, le foie, le pancréas, les poumons, le cœur et d'autres organes). Les terminaisons crânielles de ces neurones pénètrent dans la moelle épinière via la corne dorsale et forment des synapses avec des interneurons et des neurones relais qui projettent vers le cerveau, notamment le thalamus et le noyau parabrachial (PBN).
- Les neurones du nerf vague (nerf X) dont les corps cellulaires se trouvent dans le ganglion du nodose, situé dans la région cervicale. Ces neurones ont des afférences strictement viscérales et thoraciques et projettent vers le complexe vagal dans le tronc cérébral, composé du noyau du tractus solitaire (NTS) et l'area postrema (AP) (*Mazzone et Undem 2016*). Le nerf vague comporte également des fibres motrices motrices descendantes, initiées par des neurones cholinergiques du noyau moteur vagal dorsal (DMN). Les fibres sensorielles représentent 80 % des fibres qui composent le nerf vague (*Berthoud et Neuhuber 2000*).

Les interactions entre le système immunitaire et le système nerveux sont facilitées au niveau des extrémités périphériques des nerfs par la proximité anatomique des deux systèmes et la présence à la surface des neurones de récepteurs sensibles aux molécules libérées localement lors d'une réaction infectieuse ou inflammatoire. En effet, des récepteurs aux cytokines (TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6...), ou encore des TLR ont été identifiés à la surface des neurones sensoriels (*Ek et al. 1998; Hosoi et al. 2005; Park et al. 2014; Xu et al. 2015*). Les DAMP et des toxines comme l' $\alpha$ -hémolysine libérée par les pathogènes à l'origine de l'infection (par exemple *Staphylococcus aureus*) se lient respectivement au récepteur 1 du peptide formyl (FPR1) ou à des canaux ioniques qui entraînent secondairement la libération de neuropeptides. Plusieurs canaux impliqués dans la nociception tels que les canaux sodiques voltage-dépendant Nav1.7, Nav1.8 ou Nav1.9 ou encore

les canaux *transient receptor potential* (TRP) sont également exprimés à la surface des neurones et sont activés par les stimuli nociceptifs générés au site d'infection. L'activation de ces récepteurs entraîne une cascade de signaux conduisant à la génération d'un potentiel d'action et/ou la diminution du seuil d'activation des récepteurs nociceptifs (aussi appelé nocicepteurs).



**FIGURE 6 - VOIE NEURALE**

Adapté de Pavlov et al, Ann. Rev. Immunol., 2018

TRP : *transient receptor potential*, PRR: pattern recognition récepteur, GPCR : récepteur couplé aux protéines G, NTS : noyau du tractus solitaire, FPR : récepteur du peptide formyl, CGRP : calcitonine, VIP : peptide vasoactif intestinal.

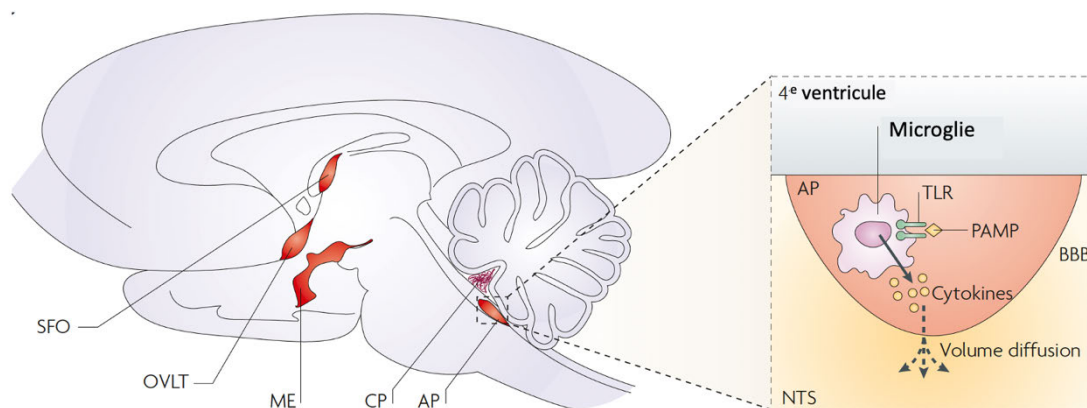
En complément de leur rôle de détection, les neurones afférents modulent également activement la réponse immunitaire locale par la libération de neuropeptides (substance P, le peptide relié au gène calcitonine (CGRP), le peptide vasoactif intestinal (VIP)...) qui interagissent avec l'endothélium, les neutrophiles, les macrophages et autres cellules immunitaires à proximité des terminaisons axonales (*Pavlov, Chavan, et Tracey 2018; Chiu et al. 2013; Steinberg et al. 2016*). Le nerf vague joue un rôle prépondérant dans le relai au cerveau du message inflammatoire lié à l'infection. En effet, il a été démontré que l'administration de LPS, de cytokines (dont IL-1 $\beta$  et TNF) et d'agents pathogènes tels que *Campylobacter jejuni* stimule chez les rongeurs la signalisation afférente du nerf vague, objectivée par l'augmentation de l'expression du marqueur d'activation neuronale cFos dans le NTS (*Wan et al. 1993; Lisa E. Goehler et al. 2005; L. E. Goehler et al. 1998; Marvel et al. 2004; Niiijima 1996*). De plus, une vagotomie sous-diaphragmatique (section de la ramification abdominale du nerf vague) bloque le développement du comportement de maladie normalement provoqué par l'injection intrapéritonéale de LPS (*Bluthé et al. 1996*). Enfin, des enregistrements électrophysiologiques chez la souris ont montré que l'administration intrapéritonéale de TNF ou d'IL-1 $\beta$  entraîne une augmentation de l'activité du nerf vague ainsi que des motifs de potentiels d'action spécifiques, qui sont fortement diminués chez les souris dont les récepteurs du TNF et de l'IL-1 $\beta$  ont été génétiquement supprimés (*Lisa E. Goehler et al. 2005*).

## **b) LA VOIE HUMORALE**

- **VIA LES ORGANES CIRCUMVENTRICULAIRES**

Contrairement à la vaste majorité des régions du cerveau, les organes circumventriculaires (CVO) ne possèdent pas de barrière hémato-encéphalique proprement dite, mais présentent des capillaires fenêtrés qui permettent un passage direct de molécules entre la circulation générale et le cerveau (*Dantzer et al. 2008; D'Mello et Swain 2017*). Les CVO se situent autour du troisième et du quatrième ventricule.

On distingue les CVO sécrétoires (épiphyse, hypophyse, éminence médiane...) et les CVO sensitifs parmi lesquels sont comptés l'AP, l'organe subfornical ou encore l'organe vasculaire de la lame terminale (*C et Ea 2017*). Ces derniers s'avèrent être des points d'accès au cerveau pour les cytokines et chimiokines circulantes, ainsi que les DAMP et les PAMP, qui activent les récepteurs à la surface des cellules endothéliales et de la microglie résidente au niveau des CVOs et induisent ainsi des cascades d'activation qui aboutissent à la production locale d'IL-1 $\beta$ , interféron- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), TNF et prostaglandine E2 (PGE2). Ces molécules peuvent circuler par diffusion simple dans le parenchyme cérébral et se fixent à des récepteurs neuronaux. Ils permettent également la migration de cellules immunitaires circulantes dans le cerveau. En effet, des études chez des modèles murins d'inflammation périphériques ou d'encéphalites auto-immunes ont démontré la présence de leucocytes non microgliaux dans certains CVO (*D'Mello et Swain 2017; D'Mello, Le, et Swain 2009; Schulz et Engelhardt 2005*).



**FIGURE 7 - VOIE HUMORALE AU NIVEAU DES ORGANES CIRCUMVENTRICULAIRES**

Adapté de Dantzer et al. 2008, Nature Neuroscience

SFO : organe subfornical, OVLT : organe vasculaire de la lame terminale, ME : éminence médiane, CP : plexus choroïde, AP : area postrema, NTS : noyau du tractus solitaire ; TLR : récepteurs de type Toll, PAMP : motifs moléculaires associés aux pathogènes, BBB : barrière hémato-encéphalique.

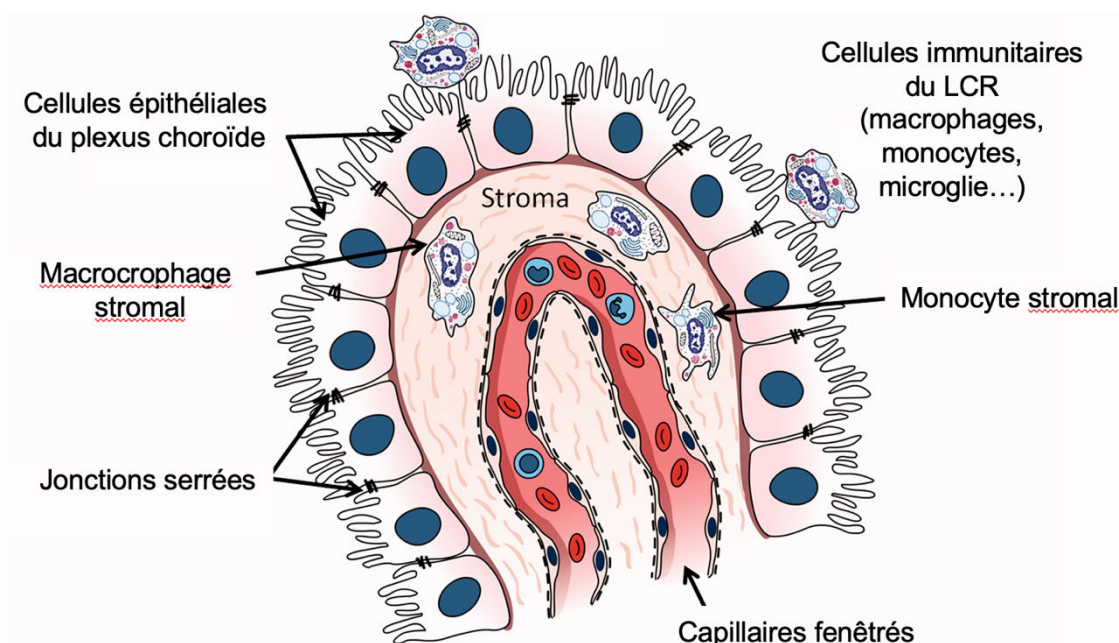
- **VIA LE PLEXUS CHOROÏDE**

Le plexus choroïde (PCh) est un tissu sécrétoire situé autour des ventricules cérébraux, dont la principale fonction est de produire du liquide céphalo-rachidien (LCR) (*Javed, Reddy, et Lui 2021; Kaur, Rathnasamy, et Ling 2016; Lun, Monuki, et Lehtinen 2015*). Tissu hautement organisé, le PCh est constitué de cellules épithéliales qui présentent des microvillosités du côté du lumen ventriculaire et entourent un noyau de capillaires fenêtrés et de tissu conjonctif.



En tant qu'interface entre la circulation périphérique et le système nerveux central, le PCh forme la barrière entre le sang et le LCR par le biais de jonctions serrées entre les cellules épithéliales qui limitent le libre passage des solutés du sang vers le LCR, et vice versa. Il abrite également diverses cellules immunitaires, dont des cellules microgliales, des macrophages et des cellules dendritiques, et constitue une porte d'entrée pour les cellules immunitaires dans le système nerveux central.

Des études récentes montrent que la ChP exprime des molécules d'adhésion et des cytokines et chimiokines, notamment la molécule d'adhésion intercellulaire 1 (ICAM-1) et les interférons, qui facilitent la détection de messages inflammatoires et entraîne le recrutement et le passage trans-épithélial des leucocytes dans le LCR. Ces cellules immunitaires activées peuvent ainsi migrer dans le parenchyme cérébral et libèrent à leur tour des messagers inflammatoires qui sont détectés par les neurones.



**FIGURE 8 - ORGANISATION ANATOMIQUE DU PLEXUS CHOROÏDE**

Adapté de Kaur et al. 2016, Journal of Neuropathology & Experimental Neurology

À noter que la dura, qui constitue la couche externe des méninges entourant le cerveau et la moelle épinière, est une aire de circulation du LCR et contient les vaisseaux lymphatiques qui drainent le cerveau. Cette zone est particulièrement riche en cellules présentatrices d'antigènes, notamment en cellules dendritiques

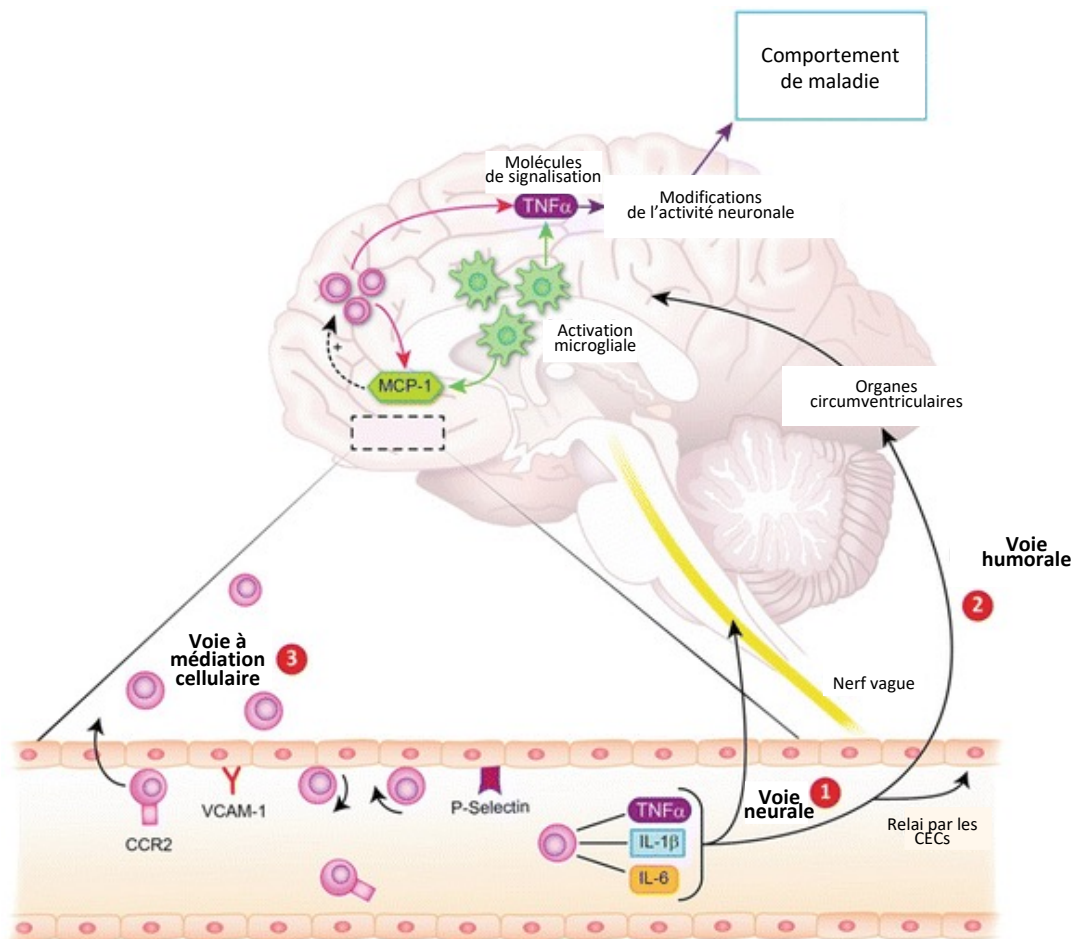
et en macrophages qui présentent les antigènes véhiculés par le LCR aux lymphocytes T provenant des ganglions lymphatiques cervicaux qui patrouillent spécifiquement dans le système nerveux central. Ces lymphocytes T circulants activés libèrent à leur tour des cytokines et chimiokines et peuvent infiltrer le parenchyme cérébral, entraînant conjointement l'activation des neurones et de la glie environnante (*Croese, Castellani, et Schwartz 2021*).

- VIA LES CELLULES ENDOTHELIALES DU CERVEAU

Les cellules endothéliales cérébrales (CEC) présentent elles aussi des récepteurs au TNF $\alpha$  et à l'IL-1 $\beta$  à leur surface. L'activation de ces récepteurs favorise l'induction de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B qui conduit à la production et la libération par ces cellules endothéliales de messagers secondaires. Parmi ces messagers secondaires figurent le NO et les PG (*Rivest et al. 2000; D'Mello et Swain 2017*). Le NO est produit par l'enzyme oxyde nitrique synthase (NOS) dont la synthèse est augmentée dans sa forme inductible (iNOS) dans les cellules endothéliales et immunitaires lors d'épisodes inflammatoires. Le NO agit principalement en tant qu'agent vasodilatateur et immunomodulateur (*Kobayashi 2010*). Parallèlement, le sous-type de PG-E2 est capable de diffuser étant donné sa nature lipidique, et modère ainsi certains effets cérébraux centraux de la réponse inflammatoire. En effet, ses récepteurs se situent dans les zones du cerveau impliquées dans la réponse comportementale et neuroendocrine à l'inflammation (par exemple hypothalamus et amygdale) (*Zhang et Rivest 1999*). Les CEC activées libèrent également des chimiokines, qui diffusent et interagissent avec les cellules neuronales et gliales environnantes (*Herz et Kipnis 2016*).

De même, le récepteur à l'IL-6 (IL-6R) synthétisé à la surface des leucocytes peut se détacher de la membrane plasmique lorsque le leucocyte est activé. L'IL-6 peut ainsi se lier à la membrane ou à la forme soluble de l'IL-6R, et le complexe IL-6-IL-6R interagit alors avec le composant transmembranaire glycoprotéine 130, qui est exprimée par les cellules endothéliales. Ce processus de la trans-signalisation (*Vallières et Rivest 1997*), par l'activation de la voie de signalisation *signal transducer and activator of transcription* (ou STAT), peut induire la production de molécules d'adhésion telles que ICAM-1 (*Rivest et al. 2000*).

Enfin, les dernières recherches suggèrent une quatrième voie de signalisation par l'interaction CEC-leucocytes circulants. Dans un modèle murin d'inflammation hépatique, l'imagerie vasculaire par microscopie intravitale 5 jours après l'induction de l'inflammation a mis en évidence une augmentation de l'interaction CEC-monocytes médiée par la protéine d'adhésion sélectine-P, ainsi qu'une activation microgliale préférentielle dans ces mêmes zones. L'augmentation de l'interaction monocytes-CEC est primordiale à l'activation microgliale locale, car l'inhibition de cette interaction par l'administration d'anticorps anti-sélectine-P réduit significativement l'activation microgliale (D'Mello *et al.* 2013). De même, il a été démontré dans un modèle d'épilepsie induite que l'interaction monocytes-CEC modulait également l'excitabilité neuronale (Fabene *et al.* 2008). Des modèles d'inflammation hépatique plus longs (>10 jours) se caractérisent par davantage d'interactions monocytes-CEC et d'activation microgliale (D'Mello, Le, et Swain 2009). Mais cette augmentation est cette fois-ci associée à une infiltration des monocytes dans le cerveau, elle-même inhibée par les anticorps anti-sélectine-P.



**FIGURE 9 – VOIES DE COMMUNICATION ENTRE PERIPHERIE ET CERVEAU**

Adapté de D'Mello et al. Curr. Topics Behav. Neurosci, 2017  
 CCR2 : récepteur aux chimiokines 2, VCAM-1 : protéine d'adhésion des cellules vasculaires 1,  
 CEC : cellules endothéliales du cerveau, MCP-1 : protéine chimio-attractante des monocytes 1

Ces différents relais de l'inflammation périphérique induisent une réponse immunitaire cérébrale médiée par les cellules gliales résidentes (microglie et astrocytes) et les cellules périphériques infiltrées dans le parenchyme, qui aboutit à la libération *in situ* de cytokines et de chimiokines dans le cerveau, mais aussi des seconds messagers comme le NO ou les PG qui entretiennent et relai l'information inflammatoire aux neurones.

Il est important de noter que les différentes voies décrites ci-dessus ont des organisations temporelles très différentes. L'activation de la voie neuronale afférente est très rapide tandis que la propagation du message humoral est plus lente.

### III. REPOSE CEREBRALE A L'INFLAMMATION PERIPHERIQUE

---

#### ▪ INTEGRATION AU NIVEAU CENTRAL

Le site d'action des cytokines et chimiokines dépend principalement des zones d'expression de leurs récepteurs. Les principales cytokines impliquées dans le comportement de maladie sont l'IL-1 $\beta$ , l'IFN- $\gamma$  et le TNF. Ces récepteurs sont exprimés dans la plupart des types cellulaires résidents du cerveau et dans une multitude de régions cérébrales parmi lesquelles les CVOs, le thalamus, le striatum, l'hippocampe, l'hypothalamus ou encore l'amygdale.

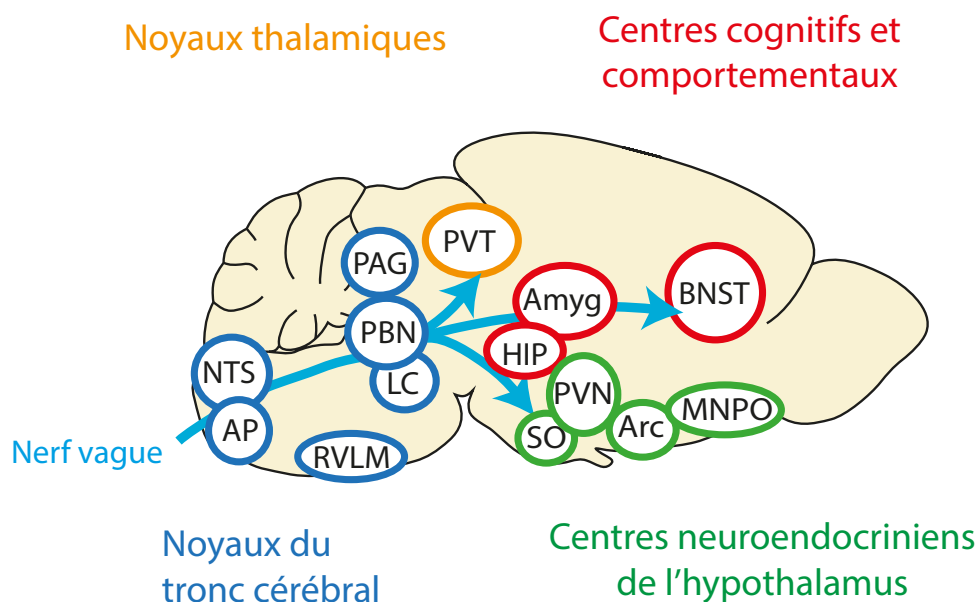
L'observation des variations de l'expression de gènes neuronaux induit de façon précoce comme le gène cFos permet d'établir une première cartographie des zones cérébrales activées lors de l'inflammation.

Les régions du complexe vagal comprenant le NTS et l'AP, activées par les voies neurales et humorales, constituent le point d'entrée principal du message inflammatoire. Elles contrôlent des mécanismes compensatoires à l'inflammation tels que la régulation de la température, de la pression artérielle, de la fréquence cardiaque et de l'éveil (*Aurelien Mazeraud et al. 2016*). Le complexe vagal transmet ensuite le signal aux autres noyaux du tronc cérébral parmi lesquels (*Dantzer et al. 2008*). :

- L'aire médullaire ventromédiale rostrale (RVLM) : centre régulateur de la fonction cardio-vasculaire et des baro-reflexes.
- La substance grise périaqueducale (PAG) : aire impliquée dans la nociception et les comportements de défense.
- Le PBN : centre d'intégration des signaux inflammatoires périphériques et modulateur des réponses appétitives et aversives.
- Le locus coeruleus (LC) : principal site d'activation de la voie sympathique en réponse au stress.

À leur tour, le PBN et le LC projettent massivement vers :

- Les régions du thalamus qui régulent la perception de la douleur (noyau paraventriculaire ou PVT).
- Les centres neuroendocriniens de l'hypothalamus qui jouent une multitude de rôles parmi lesquels la libération d'hormones en réponse au stress (noyau paraventriculaire ou PVN, noyau supraoptique ou SO), la prise alimentaire (noyau arqué ou Arc), la fonction cardio-vasculaire, la thermorégulation, ou encore le cycle du sommeil (noyau préoptique médian ou MNPO).
- Les aires du système limbique qui contrôlent les fonctions cognitives et comportementales (hippocampe, amygdale et noyau du lit de la strie terminale (BNST)).



**FIGURE 10 – CIRCUITS NEURONAUX RECRUTES LORS DE L'INFLAMMATION**

NTS : noyau du tractus solitaire, AP : area postrema, RVLM : aire médullaire ventromédiale rostrale, PBN : noyau parabrachial, LC : locus coeruleus, PAG : substance périaqueducale, PVT : noyau paraventriculaire du thalamus, HIP : hippocampe, Amyg : amygdale, BNST : noyau du lit de la strie terminale, SO : noyau supra-optique, PVN : noyau paraventriculaire de l'hypothalamus, Arc : noyau arqué, MNPO : noyau préoptique médian.

## ▪ REPONSE SYSTEMIQUE DESCENDANTE

### i. REPONSES AUTONOMIQUES ET NEUROENDOCRINES

Les structures ainsi activées sont interconnectées et régulent en retour la réponse immunitaire par le processus de « réflexe inflammatoire ».

#### • REGULATION NERVEUSE

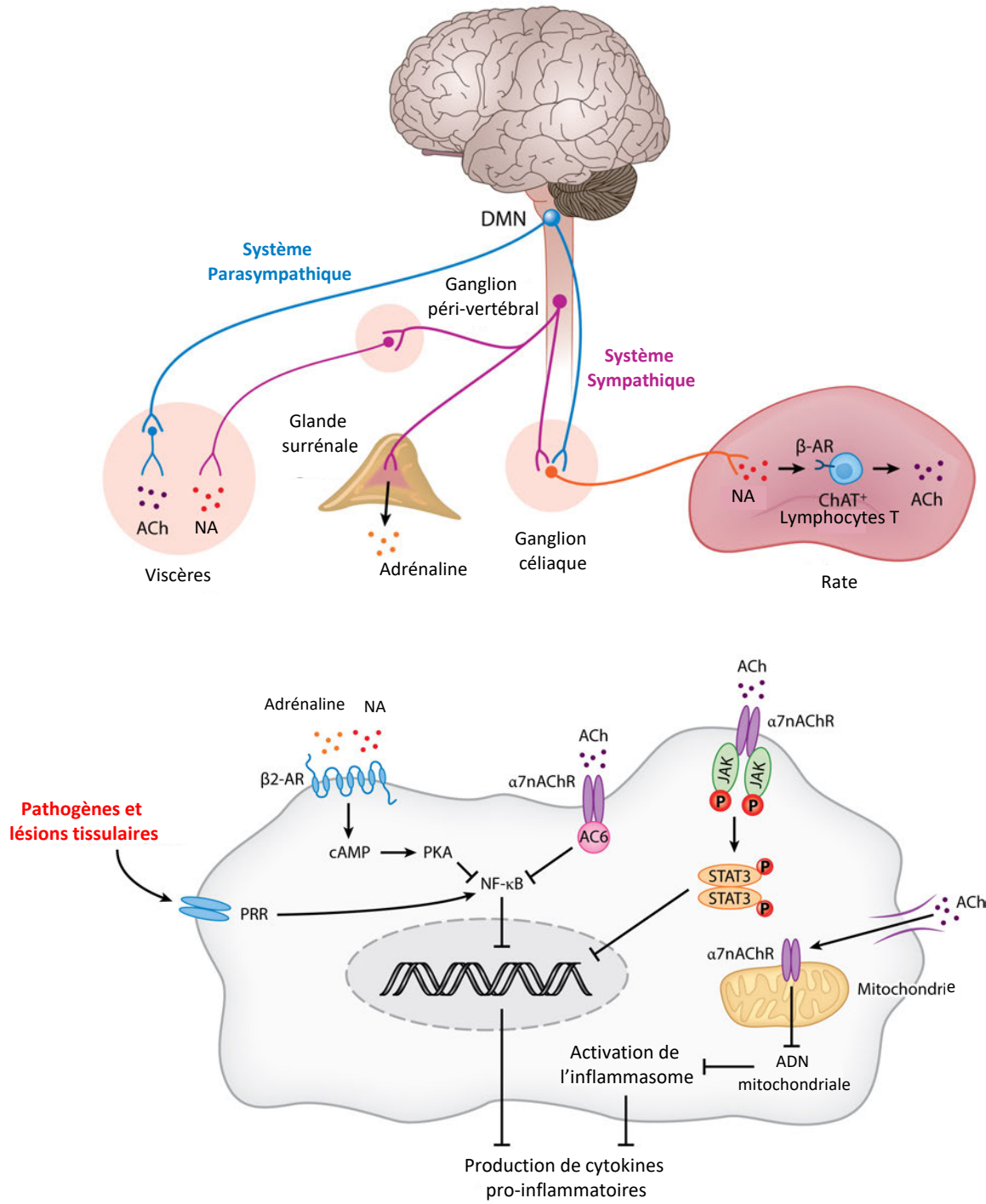
Les études sur le réflexe inflammatoire ont mis en évidence une coopération fonctionnelle entre le système nerveux parasympathique (nerf vague) et sympathique dans la régulation de la réponse immunitaire innée (*Pavlov et Tracey 2017; Pavlov, Chavan, et Tracey 2018*). Dans ce réflexe, le message d'inflammation délivré par les neurones sensoriels du nerf vague converge vers le NTS, est intégré au niveau central puis stimule une réponse anti-inflammatoire descendante médiée par les efférences cholinergiques du nerf vague provenant du noyau moteur dorsal du nerf vague (DMN) (*Tracey 2002*).

En coopération avec le nerf vague, le nerf splénique participe également à ce réflexe inflammatoire (*Jared M. Huston et al. 2006*). Les fibres du nerf vague provenant du DMN innervent les ganglions cœliaques et mésentériques supérieurs, qui constituent les centres de regroupement majeurs de neurones noradrénergiques du nerf splénique (*Pavlov et Tracey 2015*). Les terminaisons axonales qui proviennent de ces ganglions libèrent de la noradrénaline (NA) au niveau de la rate et stimulent les lymphocytes T spléniques, qui expriment des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques ( $\beta$ -NAR) ainsi que l'enzyme responsable de la synthèse de l'acétylcholine (ACh) : la choline acétyltransférase (ChAT) (*Straub 2004; Rosas-Ballina et al. 2011*). Ainsi, la stimulation du nerf splénique entraîne la synthèse et la libération d'ACh chez les lymphocytes T de la rate exprimant la ChAT.

En parallèle, les neurones du système sympathique, localisés dans la moelle épinière, projettent vers les ganglions para- et pré-vertébraux et forment une synapse avec des fibres postganglionnaires relativement longues qui innervent de nombreux organes viscéraux (*Pavlov et Tracey 2015*). Dans ce cas-ci, la



transmission synaptique ganglionnaire est cholinergique, tandis que les neurones postganglionnaires libèrent de la NA. Les fibres sympathiques pré-ganglionnaires contrôlent également la sécrétion d'adrénaline par les glandes surrénales qui agit directement comme une hormone.



**FIGURE 11 -NEUROANATOMIE ET MECANISMES DU REFLEXE IMMUNITAIRE**

Adapté de Pavlov et al. Annu. Rev. Immunol, 2018

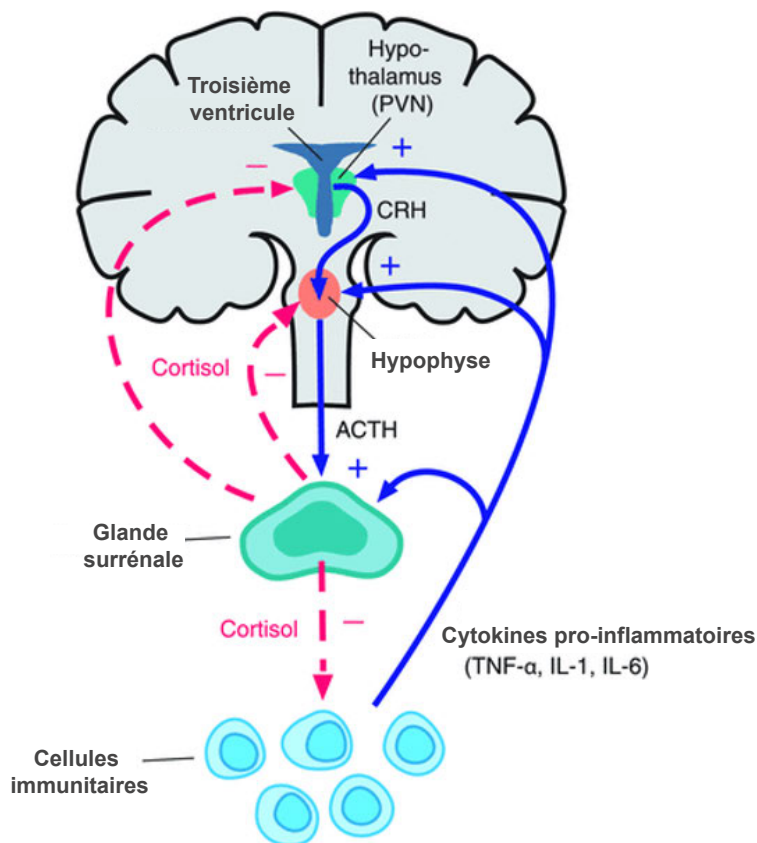
ACh : acétylcholine, NA : noradrénaline, DMN : noyau moteur dorsal du nerf vague, AR : récepteur à la NA et l'adrénaline, ChAT : choline acétyltransférase,  $\alpha 7nAChR$  : récepteur nicotinique  $\alpha 7$  de l'acétylcholine, PKA : protéine kinase A, AMPc : adénosine monophosphate cyclique, PRR : *pattern recognition receptor*,

Finalement, la libération d'Ach et de NA régule la production de cytokines par les cellules immunitaires activées. L'Ach se lie au récepteur nicotinique  $\alpha 7$  de l'acétylcholine ( $\alpha 7nAChR$ ) exprimé notamment à la surface des macrophages. Cette interaction active la signalisation intracellulaire, avec une inhibition de la voie NF- $\kappa$ B au profit de la voie JAK2/STAT3, ce qui entraîne la suppression de la production de cytokines pro-inflammatoires. De plus, l'Ach se lie aux récepteurs  $\alpha 7nAChR$  exprimés à la surface des mitochondries et induit ainsi une diminution de la production et de la libération d'ADN mitochondrial, qui entraîne une diminution de l'activation de l'inflammasome dans la cellule. Enfin, la NA et l'adrénaline se lient aux récepteurs  $\beta 2$ -adrénergiques exprimés à la surface des cellules immunitaires et induisent une signalisation intracellulaire impliquant l'AMP cyclique et la protéine kinase A (PKA), qui conduit également à l'inhibition de la voie NF- $\kappa$ B et de la libération de cytokines pro-inflammatoires (*Pavlov, Chavan, et Tracey 2018*). Parallèlement, l'Ach interagit avec les récepteurs muscariniques de l'acétylcholine couplés aux protéines G (mAChR) qui interviennent dans la régulation par le nerf vague du rythme cardiaque, de la fonction gastro-intestinale, et de la sécrétion exocrine et endocrine pancréatique entre autres. La NA et l'adrénaline interagissent quant à elles avec les récepteurs  $\beta$ - et  $\alpha$ -adrénergiques couplés aux protéines G, et assurent le contrôle sympathique notamment de la fréquence cardiaque, de la pression sanguine, de la fonction pulmonaire, de l'hématopoïèse. Ces processus conduisent aux phénomènes physiologiques observés lors du comportement de maladie.

- AXE HYPOTHALAMO-HYPHOPHYSAIRE

En parallèle, les cytokines pro-inflammatoires stimulent la libération de glucocorticoïdes en agissant aux trois niveaux de l'HPA : le PVN avec la libération de corticolibérine (CRH), l'hypophyse avec l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) et enfin les glandes surrénales avec la libération directe de cortisol chez l'homme (corticostérone chez les rongeurs). À leur tour, les glucocorticoïdes exercent un contrôle négatif sur le système immunitaire en inhibant la synthèse et la libération de cytokines pro-inflammatoires. De plus, les glucocorticoïdes régulent leur propre production par un rétrocontrôle négatif sur les niveaux supérieurs de l'HPA (*Silverman et Sternberg 2012*).





**FIGURE 12 - AXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSAIRE**

Adapté de Silverman et al.,  
Ann N Y Acad Science, 2012  
CRH : corticolibérine, ACTH :  
hormone adrénocorticope

Enfin, il a été démontré qu'une sous population de neurones catéchomalinergiques du NTS et du RVLM projetait directement vers le PVN, favorisant une réponse corticoïde à l'inflammation périphérique directement médiée par le nerf vague (Bienkowski et Rinaman 2008).

## ii. REPONSE COMPORTEMENTALE

Il est frappant de constater que certaines caractéristiques tardives du comportement de maladie induit par une infection sont comparables aux symptômes cliniques de la dépression. Il s'agit d'une modification de l'humeur et des capacités cognitives, une sensibilité atténuée à rechercher une récompense et une consommation alimentaire réduite (Dantzer 2018). Chez l'homme, l'association entre dépression, anxiété et inflammation a été confirmée par plusieurs méta-analyses (Dantzer 2018; Howren, Lamkin, et Suls 2009). Dans le contexte d'une inflammation systémique, plusieurs régions cérébrales sont recrutées, notamment celles orchestrant des comportements défensifs afin d'assurer la survie. Le comportement défensif inclut une réponse adaptative rapide, la peur, qui dépend d'un circuit distribué centré sur l'amygdale et

convergeant sur le noyau central de l'amygdale (CeA). Des études menées chez l'Homme et chez le rongeur montrent que l'amygdale constitue un relai déterminant pour les circuits de la peur et de l'anxiété et est directement impliquée dans les modifications comportementales observées lors du comportement de maladie (*Tovote, Fadok, et Lüthi 2015; Adhikari 2014*).

## 2. ENCEPHALOPATHIE LIEE AU SEPSIS

---

### I. DEFINITION

---

Chez environ 50 % des patients atteints de sepsis, au comportement de maladie s'ajoute une défaillance cérébrale, appelée encéphalopathie liée au sepsis (ELS), qui entraîne une surmortalité (*Heming et al. 2017; Sprung et al. 1990; Eidelman et al. 1996*). Elle se caractérise par des troubles de la conscience, allant du delirium (50 %) au coma (46 %) (*Semmler et al. 2013*).

Enfin, elle s'accompagne d'anomalies électroencéphalographiques (EEG) non spécifiques, caractérisées par un ralentissement avec une prédominance d'activités thêta et delta, une perte de la réactivité et dans les formes sévères des ondes triphasiques et des suppressions de salves (*Azabou et al. 2015*), des crises d'épilepsie pouvant être détectées chez 10 % des patients. En outre, il existe depuis 1992 une classification électrophysiologique pour évaluer le degré de sévérité de l'ELS (*Young et al. 1992*). En effet, la mortalité est quasi nulle chez les patients ayant un EEG normal, alors qu'elle s'élève à 50-60 % en cas d'ondes triphasiques et de suppression des salves.

### II. PHYSIOPATHOLOGIE

---

La physiopathologie de l'ELS est complexe et combine trois grands processus : la neuroinflammation, l'ischémie cérébrale et l'excitotoxicité (*Gofton et Young 2012; Aurélien Mazeraud, Righy, et al. 2020*).

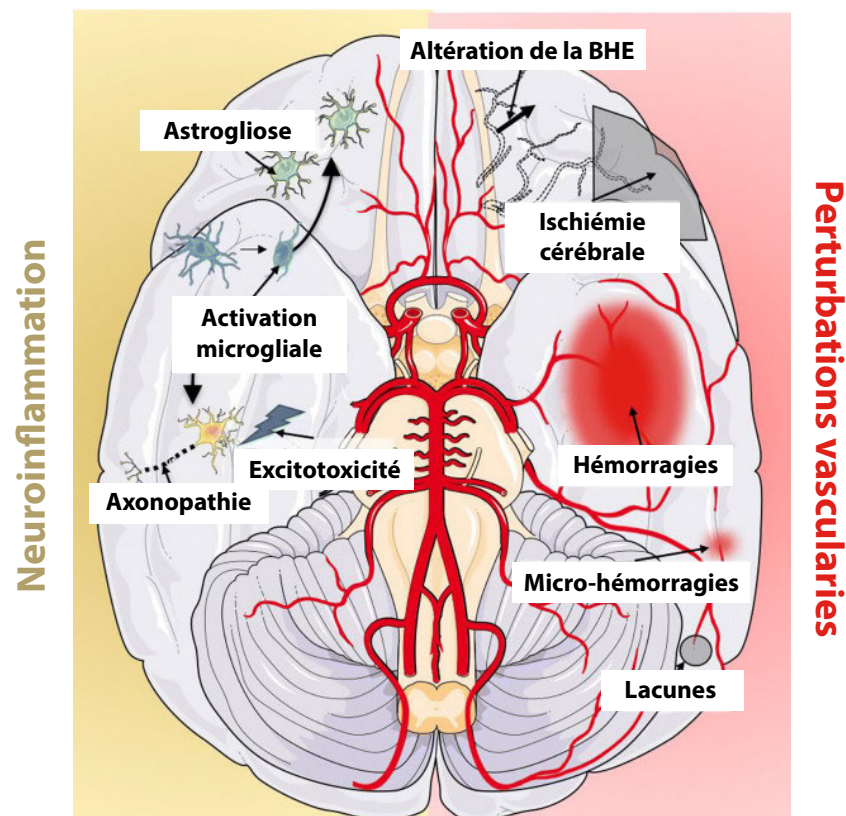
La neuroinflammation se caractérise principalement par l'activation des cellules immunitaires résidentes du parenchyme cérébral : les cellules microgliales. La

microglie présente de multiples propriétés. Comme les macrophages, elles sont capables de s'activer en conséquence directe de l'augmentation de la concentration en médiateurs pro-inflammatoires produits au niveau central, ou qui traversent la barrière hémato-encéphalique (BHE). Elles peuvent également reconnaître des PAMP ou DAMP circulants. L'activation microgliale se traduit par des modifications de leur morphologie (déramification) et de leurs propriétés immunologiques avec un relargage de composés pro-inflammatoires (TNF, INF- $\gamma$ ) ou anti-inflammatoires (IL-4, IL-10).

Ces dernières années, tout un ensemble de travaux a montré que la microglie est capable d'interagir dynamiquement avec les neurones, influençant le développement, la structure et la fonction des réseaux neuronaux, pendant le développement embryonnaire, mais également à l'âge adulte. Par exemple, la microglie joue un rôle primordial dans la neurogenèse adulte, la formation et le remodelage des synapses, l'élimination des neurones apoptotiques ou encore le guidage axonal (*Cserép, Pósfai, et Dénes 2021*). Elle est aussi responsable d'une synchronisation de l'activité neuronale, qui est supprimée par l'activation microgliale induite par une injection de LPS (*Akiyoshi et al. 2018*).

Le séquençage de l'ARN sur cellule unique indique que la microglie n'est pas une population homogène, mais plutôt qu'il existe une diversité fonctionnelle de cellules microgliales associées à des contextes spatio-temporels (*Masuda et al. 2020*). Ainsi bien que la microglie puisse présenter des propriétés neuroprotectrices dans certaines conditions, son activation en situation d'agression peut être à l'origine d'un effet secondaire neurotoxique caractérisé par une hyperactivation neuronale et une excitotoxicité (*Aurélien Mazeraud, Righy, et al. 2020; Wolf, Boddeke, et Kettenmann 2017; Moraes et al. 2015*). Ces processus excitotoxiques d'origine neuroinflammatoire sont exacerbés par d'autres perturbations systémiques (hypoxie, hyperglycémie, déséquilibres ioniques, toxicité des médicaments...) qui ont pour conséquence une altération de la neurotransmission, notamment au niveau des synapses au glutamate, et une dysfonction neuronale qui détermine la mort cellulaire programmée des neurones. Ces processus peuvent expliquer en partie les caractéristiques cliniques et électrophysiologiques de l'ELS.

Parallèlement, une prolifération et activation des astrocytes, appelée astrogliose, est observée chez des modèles animaux expérimentaux d'ELS, sans qu'elle n'ait jamais pu être objectivée chez l'Homme en raison de limitations techniques (Moraes et al. 2015). Les astrocytes jouent un rôle majeur dans le contrôle de la perméabilité de la BHE et de l'homéostasie cérébrale. L'astrogliose et l'activation endothéliale liées au sepsis entraînent une dysfonction des jonctions serrées qui permet le passage de cellules sanguines ainsi que de médiateurs inflammatoires et neurotoxiques dans le parenchyme cérébral.



**FIGURE 13 - PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ENCEPHALOPATHIE LIEE AU SEPSIS**

Adaptée de Mazeraud et al., Neurotherapeutics, 2020

Cette activation endothéliale stimule également la cascade de coagulation, entraînant la formation de microthrombi cérébraux. Des anomalies de la micro et de la macro-circulation cérébrale sont fréquentes au cours de l'ELS, associant des phénomènes ischémiques et hémorragiques. Des études *post-mortem* réalisées chez l'homme mettent en évidence des lacunes ischémiques chez la totalité des patients décédés de sepsis et sont associées à la présence d'un syndrome de CIVD chez 20 % d'entre eux (Taccone et al. 2010). Une série neuroradiologique a mis

en évidence qu'un tiers des patients en choc septique ayant développé un trouble neurologique aigu pouvaient développer des accidents ischémiques cérébraux souvent en rapport avec une CIVD et qui étaient associés à un surcroît de mortalité (*Sharshar et al. 2004*). Une perte de l'autorégulation vasculaire cérébrale chez les patients septiques a été également incriminée dans la survenue d'une encéphalopathie (*Crippa et al. 2018*).

Enfin, comme au niveau systémique, l'ELS entraîne un stress oxydatif et une dysfonction mitochondriale pro-apoptotique.

### III. NEUROANATOMIE

---

Les processus décrits ci-dessus ont lieu de manière hétérogène dans le cerveau et peuvent provoquer des lésions spécifiques à certaines régions cérébrales, comme les aires impliquées dans le contrôle de la réponse neurovégétative au stress ou encore la mémoire ou l'attention. L'étude neuropathologique de patients décédés de sepsis a mis en évidence une augmentation de l'activation microgliale et de l'apoptose neuronale dans des zones cérébrales clés (c.-à-d. l'hippocampe, l'amygdale, le NTS, le LC (*Sharshar et al. 2003*)). Ces structures présentent également une forte activation neuronale pendant le sepsis, ce qui suggère une excitabilité neuronale altérée pouvant aboutir à des séquelles neuronales structurelles et fonctionnelles.

Certains travaux indiquent l'existence d'une dysfonction du tronc cérébral chez les patients septiques, notamment au niveau du NTS, de l'AP, du PBN et du LC (*Tracey 2009*). Les structures du tronc cérébral contrôlent les fonctions vitales, le cycle du sommeil, les nerfs crâniens et la modulation de la réponse inflammatoire. Ces quatre grandes fonctions sont particulièrement altérées chez les patients septiques, et leur perturbation contribuerait à la survenue d'une dysfonction d'organe et du décès (*Aurélien Mazerand, Righy, et al. 2020*). Il a été démontré chez les patients septiques que l'abolition de certains réflexes du tronc cérébral était fréquente et associée à une surmortalité (*Rohaut et al. 2017*). De même, la chute des variations de fréquence cardiaque chez les patients septiques est corrélée à un mauvais pronostic (*Annane et al. 1999*). Enfin, l'examen de cerveaux de patients

décédés de sepsis montre la présence de lésions nécrotiques multifocales dans la partie pédonculaire du tronc cérébral (*Sharshar et al. 2002*).

Des lésions d'origine neuroinflammatoire, excitotoxique ou ischémique ont également été mises en évidence dans le cortex préfrontal et l'hippocampe chez des modèles murins de sepsis. Ces lésions peuvent perdurer et mener à une atrophie, principalement hippocampique (*Semmler et al. 2013*). Il est considéré que ces processus sont à l'origine des troubles cognitifs précédemment décrits (*Iwashyna et al. 2010*).

Enfin, le système limbique semble être activé précocement et parallèlement aux autres centres autonomes. Les patients décédés du sepsis présentent notamment des lésions amygdaliennes majeures de nature neuroinflammatoire et excitotoxique (*Sharshar et al. 2003*). L'amygdale, en connexion avec d'autres régions telles que le HIP ou le BNST, est impliquée dans les phénomènes de peur et d'anxiété. Le rôle de l'amygdale dans les phénomènes aigus et chroniques induits par le sepsis a été insuffisamment évalué, alors que son dysfonctionnement est souvent mentionné dans la pathogénie des troubles psychiatriques post-sepsis (*Tovote, Fadok, et Lüthi 2015*). Il est envisageable qu'un tel dysfonctionnement de l'amygdale puisse compromettre la réponse comportementale, neuroendocrinienne et autonome au stress, contribuant ainsi à une surmortalité et morbidité du sepsis. Une étude observationnelle multicentrique sur les changements comportementaux à l'admission en réanimation notamment pour un sepsis a montré que l'anxiété était un facteur prédictif de la survenue d'une défaillance d'organe (*Aurélien Mazerand, Polito, et al. 2020*). Par conséquent, un tel dysfonctionnement de l'amygdale pourrait être à la fois un marqueur de la gravité du sepsis ou pourrait influencer sur son évolution.

#### IV. TRAITEMENT

---

Il n'existe à ce jour aucun traitement spécifique pour soigner l'ELS. Il a toutefois été mis en évidence que le contrôle glycémique pouvait être neuroprotecteur, notamment en réduisant la neurotoxicité microgliale (*Plummer et Deane 2016*).

Il a également été montré que les statines pouvaient réduire l'activation endothéliale, les dysfonctions de la BHE et l'activation microgliale et ainsi favoriser un meilleur devenir sur le plan cognitif des rats septiques (*Catalão et al. 2020*). En revanche, il n'a pas été démontré que les statines prévenaient le syndrome confusionnel et les séquelles à long terme chez les patients septiques (*Needham et al. 2016*). La kétamine, dont nous connaissons les propriétés antidépressives, pourrait également être un modulateur en agissant sur la microglie selon une étude publiée récemment (*Hristovska et al. 2020*). Les corticoïdes, qui diminuent la mortalité du choc septique, pourraient également réduire la survenue d'un syndrome post-traumatique d'après une étude observationnelle, ainsi que celle du delirium selon un essai thérapeutique (*Keh et al. 2016*). Parmi les molécules de la famille des corticoïdes, rappelons que l'administration de la rivastigmine n'a pas d'effet sur la durée du delirium et s'est avérée même délétère chez les patients de réanimation (*van Eijk et al. 2010*). La place de la dexmédétomidine dans le traitement ou la prévention du delirium chez les patients septiques reste débattue (*Kawazoe et al. 2017*).

La liste des agents thérapeutiques testés expérimentalement est longue. Des travaux effectués dans notre laboratoire indiquent que l'agent antiépileptique Levetiracetam modulerait les cellules microgliales et réduirait la sévérité du comportement de maladie dans un modèle murin de sepsis (voir Annexe 1). Nous conduirons prochainement un essai thérapeutique qui vise à déterminer si cet antiépileptique diminue l'incidence et la durée d'une encéphalopathie chez les patients en choc septique.

Rappelons que le sepsis induit une forte activation microgliale. En considérant les propriétés neurotoxiques de la microglie au cours de l'ELS, des études ont tenté d'utiliser des composés pour moduler son activation. Malheureusement, les essais cliniques ont dû être interrompus à cause d'une augmentation de la mortalité (*van Eijk et al. 2010*). L'absence de biomarqueurs pour différencier les deux phénotypes de microglies limite la recherche clinique dans ce domaine.

Pour conclure, il n'y a pas de traitement spécifique de l'encéphalopathie associée au sepsis ni de ses complications. Sa prise en charge consiste avant tout dans le contrôle de sepsis et des facteurs d'agression cérébrale secondaires d'origine systémique.

### 3. SEQUELLES PSYCHO-COGNITIVES POST-SEPSIS

---

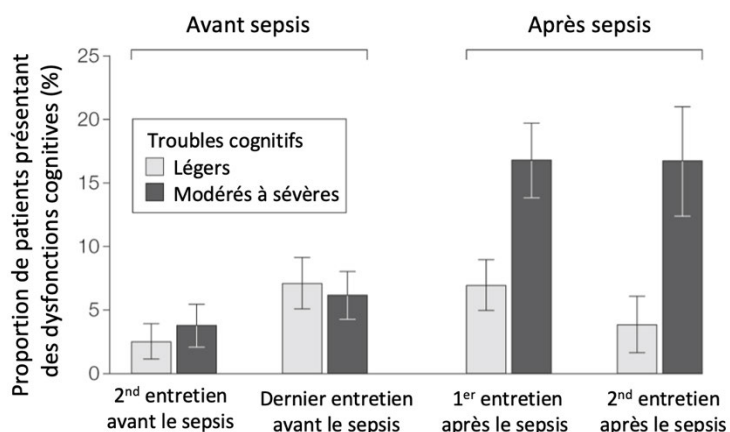
Le sepsis engage également fortement le pronostic vital et fonctionnel des patients sur le long terme. En effet, la mortalité et la morbidité à long terme sont nettement plus élevées après un choc septique ou un sepsis. La mortalité à cinq ans post-hospitalisation est estimée à 56,1 % après un choc septique, de 62,1 % pour le sepsis (Rahmel et al. 2020). De nombreux survivants sont admis dans des établissements de soins de suite ou de longue durée. On note que les patients traités dans des établissements de soins longue durée présentent un risque de mortalité à cinq ans nettement inférieur à celui des patients renvoyés chez eux après un sepsis. Toutefois, les frais cumulés moyens de soins médicaux dans l'année suivant l'hospitalisation s'élèvent en moyenne à 10 500 € pour les survivants au choc septique et à 8 200 € pour le sepsis (Rahmel et al. 2020).

Les résultats défavorables à long terme ne se limitent pas à un risque accru de mortalité. Les patients guéris du sepsis ont une fonction immunitaire altérée et un état d'inflammation chronique. Environ 40 % des patients sont ré-hospitalisés dans les 90 jours suivant leur sortie, souvent pour des affections qui pourraient être traitées en ambulatoire, comme une infection (11,9 %) ou une exacerbation de l'insuffisance cardiaque (5,5 %) (Karlsson et al. 2007; Barichello et al. 2019; Seymour et al. 2012; Prescott et Angus 2018). Le sepsis peut également aggraver des maladies chroniques préexistantes ou en faire apparaître de nouvelles. Par rapport aux patients hospitalisés pour d'autres diagnostics, ceux qui survivent à un sepsis ont un risque plus élevé d'infection récurrente que les patients appariés (+8,0 %), d'insuffisance rénale aiguë (+ 2,1 %) et de nouveaux événements cardiovasculaires (Prescott et Angus 2018).

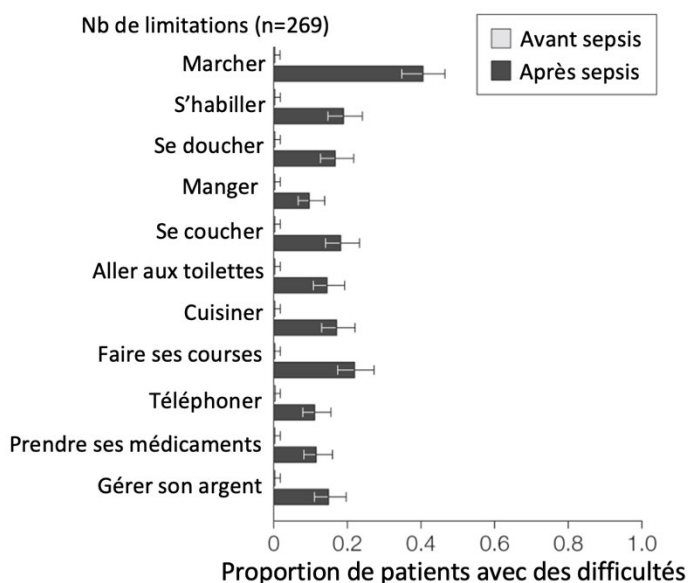
En outre, de nombreux survivants rapportent une diminution de leur qualité de vie. Les symptômes dont se plaignent principalement les patients sont des troubles cognitifs, un amoindrissement des capacités physiques et des difficultés à accomplir les activités de routine. Parmi les patients survivant au sepsis, 59,3 % d'entre eux présentent une détérioration de leurs fonctions cognitives et/ou physiques à la première enquête post-sepsis. Les séquelles cognitives se caractérisent par des troubles de la mémoire, de l'attention ou encore de l'élocution. La prévalence des troubles cognitifs modérés à sévères est multipliée



par 3 entre la dernière enquête pré-sepsis et la première enquête après sepsis (Iwashyna et al. 2010). Les personnes ayant survécu à une hospitalisation pour sepsis sévère présentent également un risque plus élevé de limitations fonctionnelles, avec le développement en moyenne de 1,57 nouvelle limitation chez les patients qui n'en avaient aucune pré-sepsis. Les limitations fonctionnelles sont très diverses, mais elles affectent toutes profondément le quotidien des patients post-sepsis.



**FIGURE 14 – SEQUELLES COGNITIVES ET FONCTIONNELLES POST-SEPSIS**

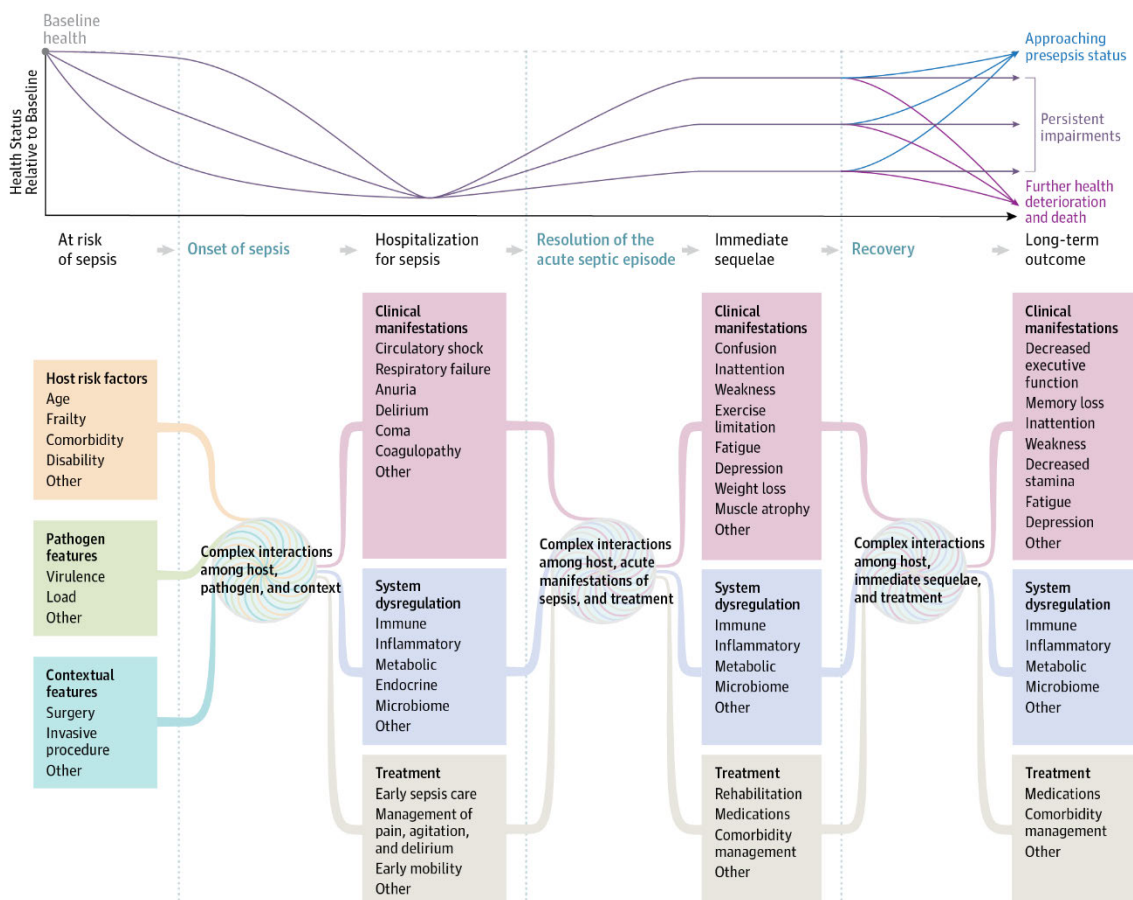


Adapté de Iwashyna et al. JAMA 2010

Seuls 43 % des patients qui travaillaient auparavant ont repris le travail dans l'année qui suit leur hospitalisation pour choc septique (Winster et al. 2010), et seuls 33 % des patients qui vivaient à domicile avant de contracter le sepsis ont repris une vie indépendante six mois après leur sortie de l'hôpital (Yende et al. 2016). Les conjoints et les membres de la famille doivent souvent servir d'aidants et présentent eux-mêmes deux fois plus de troubles dépressifs que la population générale (Davydow et al. 2012).

On observe également une prévalence élevée de désordres psychiatriques chez les patients ayant survécu au sepsis dans les mois à années suivant leur hospitalisation, notamment l'anxiété (32 % des survivants), la dépression (29 %) ou le syndrome de stress post-traumatique (SSPT, 44 %)(*Prescott et Angus 2018*). Les symptômes somatiques de la dépression, tels que la faiblesse, la modification de l'appétit et la fatigue, sont courants. Ces troubles psychiatriques sont très sévères puisqu'ils entraînent une augmentation de 50 % du risque de suicide chez les survivants au sepsis (*Lund-Sørensen et al. 2016*).

Ainsi, il existe de nombreuses trajectoires cliniques potentielles qu'un patient peut connaître après une hospitalisation pour sepsis, allant d'un rétablissement complet rapide à des complications récurrentes voire au décès. Les facteurs de survie ou de récupération sont difficilement identifiables et présentent des interactions complexes et non mesurables. La figure ci-dessous présente un modèle conceptuel des facteurs importants qui façonnent l'évolution clinique et le devenir à long terme d'un patient (*Prescott et Angus 2018*).



**FIGURE 15 - MODELE DES INTERACTIONS DETERMINANTES DE L'EVOLUTION CLINIQUE A COURT ET LONG TERMES DES PATIENTS ATTEINTS DE SEPSIS**

Toutefois, les mécanismes physiopathologiques adjacents sont pour le moment méconnus. Ainsi, malgré les progrès réalisés dans la prise en charge diagnostique et thérapeutique du sepsis qui ont permis une diminution de la mortalité, l'incidence de la maladie ne cesse d'augmenter (*Seymour et al. 2012*), et rend la prévention et le traitement des séquelles post-sepsis. Une problématique de santé publique d'importance majeure.

#### **4. MODELES ANIMAUX D'ENCEPHALOPATHIE LIEE AU SEPSIS**

---

##### **I. COMPARAISON DES DIFFERENTS MODELES DE SEPSIS**

---

On retrouve trois grands groupes de modèles murins d'induction de sepsis : les modèles d'induction par administration de pathogènes, par administration de toxines ou encore par altérations des barrières intestinales (*Lilley et al. 2015; Savi et al. 2020*). Bien que ces modèles précliniques de sepsis soient intéressants, ils ne peuvent reproduire toute la complexité clinique et l'hétérogénéité intrinsèque des patients. Le principe de ces différentes techniques, ainsi que leurs avantages et inconvénients, sont décrits dans le Tableau 2.

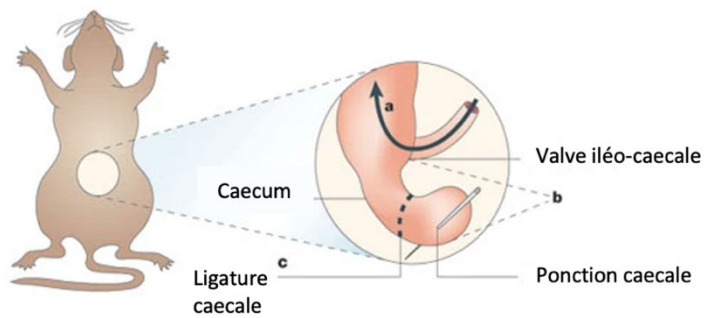
##### **II. TECHNIQUE DE LA LIGATURE ET PONCTION CÆCALE**

---

Après une injection sous-cutanée d'analgésique (buprénorphine) et de sérum physiologique, les souris sont anesthésiées par inhalation d'isoflurane. La cavité abdominale de la souris est ouverte par laparotomie, le cæcum est isolé, ligaturé dans sa partie terminale puis deux ponctions transfixiantes avec une aiguille de diamètre important sont réalisées dans la partie ligaturée du cæcum, permettant la libération des matières fécales dans le péritoine. Le cæcum est ensuite replacé dans la cavité abdominale, puis les plans musculaires et cutanés de la laparotomie sont suturés.

**TABEAU 2 - COMPARAISON DES PRINCIPAUX MODELES ANIMAUX DE SEPSIS**

	Techniques	Intervention chirurgicale	Avantages	Inconvénients
Administration de pathogènes	Injection intra-péritonéale ou sous-cutanée de bactéries	-	- Peu invasif et facilement reproductible - Étude de la cascade inflammatoire liée à un certain type bactérien	- Une seule souche bactérienne - Persistance courte des bactéries dans l'organisme - Similitude faible/partielle avec la physiopathologie du sepsis
	Administration de bactéries par voies pulmonaires	-	- Simple et reproductible - Infections pulmonaires fréquentes dans le sepsis humain	- Anesthésie nécessaire pour les administrations intra-trachéale et intra-bronchiale - Manipulation de souches pathogènes en grandes quantités - Copie partielle de la physiopathologie liée au sepsis
	Injection intra-péritonéale de fèces	-	- Reproductible - Sepsis polymicrobien - Degré de sévérité déterminable par la composition et la concentration des matières injectées	- Collecte et standardisation des matières fécales injectées - Reproduction parfois partielle de la physiopathologie liée au sepsis - Tolérance à certaines souches du microbiote
	Implantation d'un caillot de fibrine chargé de bactéries dans l'abdomen	+	- Libération prolongée de bactéries mimant une péritonite infectieuse - Degré de sévérité déterminable par la concentration bactérienne	- Reproductibilité - Une seule souche bactérienne
Administration de toxines	Administration systémique de lipopolysaccharide (LPS)	-	- Peu invasif, facile et standardisé - Reproduction de la réponse aigüe à une infection par une bactérie Gram- - Pas de manipulation de pathogènes - Degré de sévérité déterminable par la concentration en LPS et la voie d'administration - Étude et documentation approfondie dans le champ de littérature lié au sepsis	- Similitude faible/partielle avec la physiopathologie du sepsis polymicrobien - Réponse immunitaire limitée dans le temps
	Ligature et ponction caecale ( <i>Cecal ligation and puncture</i> ou CLP)	+	- Reproduction des caractéristiques du sepsis polymicrobien humain avec des lésions d'ischémie - Activation parallèle des voies pro- et anti-inflammatoires - Étude et documentation approfondie dans le champ de littérature lié au sepsis	- Reproductibilité - Sévérité de la procédure - Longueur de la chirurgie - Potentielle perturbation de la réponse inflammatoire liée à l'anesthésie
Altération des barrières intestinales				



**FIGURE 16 -  
PROTOCOLE DE LA  
CLP**

Adapté de Dajager et al.  
Trends in microbiology, 2011

Les souris sont ensuite monitorées pendant les jours suivant la procédure chirurgicale. Toutes les 12 heures, elles reçoivent une injection sous-cutanée de buprénorphine et de sérum physiologique. Au même moment, leur état est évalué avec l'établissement d'un score de sepsis prenant en compte des symptômes et mesures physiologiques résumés ci-dessous. Si le score dépasse un total de 6 ou si la température rectale de la souris descend en dessous de 35 °C, le point limite de la procédure est atteint et les souris sont euthanasiées. Ce paramètre d'ordre éthique est aussi utile pour évaluer le degré de sévérité du sepsis assez hétérogène chez les souris post-CLP. Les souris CLP sont habituellement comparées à des souris témoins (dites « Sham » dans les articles) pour lesquelles le même protocole est appliqué à l'exception de la ligature et de la ponction du cæcum.

Paramètres	Noté 1 lorsque l'altération est présente, 0 lorsqu'elle est absente.
Pilo-érection	La fourrure normale est brillante et non dressée.
Spasmes abdominaux	La taille de l'animal semble plus fine que celle des souris normales en raison de la contraction de la paroi abdominale.
Tonus corporel	Lorsque la queue de l'animal est tordue, l'animal tombe et reste sur le côté.
Altération des fèces	Les excréments sont collés à l'arrière ou sur la queue de l'animal.
Larmolement	On peut voir des sécrétions autour de l'œil de l'animal (un seul suffit).
Fermeture palpébrale	L'animal ne peut pas ouvrir complètement au moins un de ses yeux.
Activité locomotrice	La locomotion de l'animal n'est pas régulière sur la paille.
Température rectale	La température rectale de l'animal est inférieure à 36,5°.
Fuite au toucher	L'animal ne tente pas de s'échapper lorsqu'on lui pince la queue.
Activité spontanée	Activité spontanée lorsque la cage est ouverte sur la paille.
Force de préhension	L'animal peut tenir 10 secondes agrippé à une pince à 40 cm au-dessus de la paille.
Fréquence respiratoire	La respiration de l'animal est anormalement ample.

**TABLEAU 3 - SCORE D'ÉVALUATION DE LA SEVERITE DU SEPSIS INDUIT PAR CLP**

L'association dans ce modèle d'un traumatisme tissulaire dû à la laparotomie, de la nécrose causée par la ligature du cæcum et de l'infection induite par la fuite du microbiote cæcale dans le péritoine reproduisent les conditions de péritonite induite par blessure traumatique chez l'Homme (*Dejager et al. 2011*). Elle imite les grandes caractéristiques du sepsis : réponses pro- et anti-inflammatoire caractéristiques et comportement de maladie associé à une mortalité élevée proche de 50 %. De même, la CLP induit des phénomènes physiopathologiques cérébraux qui coïncident avec les caractéristiques de l'ELS : neuro-inflammation, altération de la BHE et modifications de l'EEG.

Au-delà du comportement de maladie développé dans quelques jours suivant la CLP, les souris guéries du sepsis présentent également des modifications durables du comportement. En effet, de nombreuses études ont montré que les souris ayant survécu à la CLP présentent dans les deux à quatre semaines suivant l'induction du sepsis des altérations cognitives (mémoire spatiale et de reconnaissance), un comportement d'évitement et d'anxiété et une mémoire de la peur altérée plusieurs semaines après la chirurgie. Ces symptômes rappellent fortement les troubles développés chez l'Homme après le sepsis (*Savi et al. 2020; Barichello et al. 2019*). Toutes ces caractéristiques appuient la validité du modèle de la CLP pour l'étude expérimentale à la fois de l'atteinte cérébrale lors du sepsis et des modifications à long terme du comportement.

Il est toutefois important de noter que, bien que la plupart des études précliniques aient mis en évidence une anxiété durable post-sepsis, les données concernant les altérations de la mémoire aversive à long terme présentent une grande variabilité. Ces divergences peuvent s'expliquer par une grande diversité de paramètres, notamment la gravité de l'induction du sepsis, le microbiote et l'état de digestion des animaux au moment de l'opération, les traitements post-chirurgicaux, l'espèce animale, la génétique, l'âge et le sexe, et enfin les protocoles et la temporalité de l'évaluation comportementale. Par exemple, la CLP altère la reconnaissance de nouveaux objets 10 jours après la chirurgie, mais n'a eu aucun effet à 30 jours (*Barichello et al. 2019*). Cette variabilité de la CLP est une des principales limites de ce modèle. Afin de la réduire autant que possible, les CLP de notre étude ont été réalisées par les mêmes expérimentateurs sur les mêmes lignées de souris (C57Bl/6JRj) suivant le même protocole, à heure fixe et dans la même animalerie.

### 3. NEUROBIOLOGIE DES TROUBLES COMPORTEMENTAUX LIES A LA PEUR ET A L'ANXIETE

#### 1. PEUR ET ANXIETE EN PSYCHIATRIE

---

##### I. DEFINITION DES ETATS DE PEUR ET D'ANXIETE

---

La peur et l'anxiété sont considérées comme des réactions comportementales adaptatives de défense qui ont été sélectionnées et qui ont évolué pour favoriser la survie (*Tovote, Fadok, et Lüthi 2015*). On retrouve ces comportements chez de nombreuses espèces animales, ce qui reflète leur importance adaptative à un environnement potentiellement dangereux. Cependant, de cette réponse physiologique peut émerger une réponse inadaptée de peur excessive et/ou d'anxiété persistante, qui consistent alors en une surestimation du potentiel de menace dans des situations incertaines. D'un point de vue conceptuel, la peur et l'anxiété peuvent être considérées comme des états cérébraux induits par des stimuli externes ou internes qui sous-tendent un ensemble spécifique de réactions comportementales, physiologiques, hormonales et autonomes mesurables (*LeDoux 2014; 2000; Davis et al. 2010; Blanchard, Griebel, et Nutt 2011*).

Chez l'Homme, l'aspect pathologique de ces réponses comportementales présente un fardeau important pour les personnes qui les développent et, étant donnée leur forte prévalence, pour la société en général.

##### II. TROUBLES ANXIEUX

---

La peur est considérée comme le résultat de la perception d'une menace imminente, tandis que l'anxiété se définit plutôt comme un état d'anticipation face à des menaces potentielles (*Craske et Stein 2016; Craske et al. 2009*). On définit les troubles anxieux comme une anxiété forte et durable disproportionnée ou sans lien par rapport au danger ou à la menace réelle, qui perturbe le fonctionnement normal et les activités quotidiennes du patient. Ces troubles apparaissent le plus



souvent pendant l'enfance ou l'adolescence, avec une aggravation des symptômes au cours de la vie. Les troubles de l'anxiété présentent la plus forte prévalence au sein des maladies psychiatriques (Kessler et al. 2010). On estime qu'une personne sur neuf développe des troubles d'anxiété chaque année (Baxter et al. 2013). Cette maladie touche deux fois plus les femmes que les hommes (Kessler et al. 2010). D'après les études menées par le programme de recherche mondial *Global Burden of Disease Study*, les troubles anxieux seraient la sixième cause d'invalidité dans le monde, la charge la plus élevée concernant la catégorie d'âge de 15 à 34 ans (Baxter et al. 2014).

Les symptômes des troubles anxieux varient de la crise de panique à des comportements d'évitement prononcés. D'après la cinquième édition du Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* ou DSM-5), on distingue 6 types majeurs de troubles de l'anxiété résumés dans le Tableau 4 (« *Troubles anxieux, Inserm, La science pour la santé* » s. d.; Craske et Stein 2016).

	Définition	Symptômes	Prévalence au cours de la vie (Baxter et al. 2013)
<b>Anxiété généralisée</b>	Inquiétude marquée et permanente, sentiment d'insécurité, le plus souvent alimenté par les activités quotidiennes (travail, école, famille, etc.)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Agitation</li> <li>- Fatigue</li> <li>- Troubles du sommeil</li> <li>- Tension musculaire</li> <li>- Difficultés de concentration</li> </ul>	3-5 %
<b>Trouble panique</b>	Crises de panique récurrentes (survenue brutale d'une peur intense)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Palpitations, tachycardie</li> <li>- Étourdissements</li> <li>- Transpiration</li> <li>- Essoufflement</li> <li>- Nausées ou douleurs abdominales</li> </ul> <p>La crise dure environ 30 minutes.</p>	2-5 %
<b>Phobies spécifiques</b>	Peur marquée, anxiété et évitement disproportionnés de certains objets ou situations	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Symptômes de panique</li> <li>- Évitement prononcé</li> </ul>	6-12 %
<b>Agoraphobie</b>	Peur irraisonnée et marquée des espaces publics bondés où la fuite peut être difficile	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Symptômes de panique</li> <li>- Évitement prononcé</li> </ul>	2 %
<b>Trouble d'anxiété sociale</b>	Sentiment de gêne, d'humiliation ou de rejet lors d'interactions sociales	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Symptômes de panique</li> <li>- Évitement prononcé</li> </ul>	10 %
<b>Trouble d'anxiété de séparation</b>	Peur irrationnelle d'être séparé de la figure dont le patient est le plus proche. Existe chez l'enfant et l'adulte	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Refus de s'en éloigner</li> <li>- Peur constante de la perdre</li> <li>- Symptômes de panique</li> </ul>	2-3 %

**TABLEAU 4 - DEFINITION ET INCIDENCE DES TROUBLES ANXIEUX**



On remarque également que les patients souffrant de troubles anxieux présentent une très forte comorbidité avec des troubles dépressifs (*Hettema et al. 2015*). Le diagnostic de ces maladies se réalise majoritairement par des interrogatoires cliniques avec un rapport subjectif.

La prise en charge des patients comprend le plus souvent un traitement médicamenteux à base d'antidépresseurs (inhibiteurs de la recapture de sérotonine) et/ou une prise en charge psychologique qui s'appuie sur une thérapie comportementale cognitive (TCC). La TCC est généralement conceptualisée comme un traitement à court terme qui vise à modifier les réponses émotionnelles inadaptées (*Kaczurkin et Foa 2015*). Deux méthodes de traitement TCC sont très couramment utilisées : l'exposition et la thérapie cognitive. L'exposition est proposée pour modifier la structure de la peur pathologique en l'activant dans un premier temps, puis en fournissant de nouvelles informations qui infirment les associations pathologiques et irréalistes de la peur pathologique. En confrontant le stimulus ou les réponses redoutés et en intégrant des informations correctives dans la mémoire de la peur, la peur diminue. La thérapie cognitive cible les pensées déformées à l'aide d'un certain nombre de techniques telles que l'identification, la remise en question et la modification des pensées inaccoutumées, l'examen des preuves pour et contre les pensées automatiques et la modification des comportements problématiques. Des devoirs sont généralement assignés pour donner aux patients l'occasion de mettre en pratique ces compétences dans leur vie quotidienne. La thérapie cognitive est généralement limitée dans le temps à une vingtaine de séances ou moins, et est axée sur les problèmes que le patient identifie comme étant les plus préoccupants.

Bien que ces traitements soient efficaces, on note un taux de rechute de 40 % chez le jeune et de 5 à 30 % chez l'adulte souffrant de troubles paniques dans les deux ans suivant l'arrêt de la thérapie comportementale (*Ginsburg et al. 2014; van Apeldoorn et al. 2010*).

### III. SYNDROME DE STRESS POST-TRAUMATIQUE

---

Le syndrome de stress post-traumatique (SSPT) se développe chez des enfants ou des adultes ayant été exposés à un événement marquant, comme une menace de

mort imminente, de blessure grave ou d'atteinte de l'intégrité physique dont ils ont été victimes ou témoins (*Shalev, Liberzon, et Marmar 2017; « Troubles du stress post-traumatique - Inserm, La science pour la santé » s. d.*).

Le SSPT se caractérise chez l'homme par une triade de symptômes ( *Armour, Müllerová, et Elhai 2016*) :

- Un état d'hyper-vigilance qui se traduit par des insomnies, de l'irritabilité et la crainte perpétuelle de la survenue d'un événement grave.
- Un syndrome d'évitement envers un quelconque environnement rappelant le traumatisme.
- Des symptômes de reviviscence au cours desquels des souvenirs traumatiques resurgissent parfois de manière incontrôlée.

Ces symptômes altèrent de façon significative la vie personnelle, sociale et/ou professionnelle des patients. L'état de stress aigu qui se déclare juste après l'événement peut être considéré comme un SSPT aigu s'il persiste plus de 4 semaines. La rémission a souvent lieu au bout de quelques semaines, mais le phénomène peut se prolonger pendant des mois voire des années. On parle alors de forme chronique du syndrome. D'autres symptômes de fatigue chronique, de troubles de l'alimentation, de migraine ou encore d'hypertension artérielle s'ajoutent alors au tableau clinique. À noter que le SSPT s'accompagne souvent de nombreuses comorbidités psychiatriques telles que la dépression, l'addiction ou encore le suicide (*Sareen et al. 2007; Kessler et al. 1995*).

Le SSPT peut également s'installer de manière plus progressive, dans les mois à année suivant l'événement traumatisant. La prévalence de cette maladie est d'environ 3 % dans la population générale (*McManus et al. 2009*). Cependant, au sein d'une population traumatisée, l'incidence atteint 25 à 75 % des sujets dans l'année suivant le traumatisme (*Bisson et al. 2015*). Certains facteurs de risque génétiques ont été mis en évidence.

Le SSPT doit être traité le plus rapidement possible, avec l'intervention de cellules de soutien d'urgence et la mise en place de psychothérapies : la TCC comme dans les troubles anxieux ou la thérapie d'intégration neuro-émotionnelle par mouvement oculaire (*Eye movement desensitization and reprocessing* ou EMDR)

(Bisson et al. 2013). Pendant la thérapie d'EMDR, les patients sont dans un premier temps exposé à une stimulation sensorielle (visuelle, tactile ou auditive) tout en gardant à l'esprit les composantes spécifiques d'un souvenir ciblé traumatisant, ainsi que les émotions et les sensations corporelles qui y sont liées. Le stimulus sensoriel est ensuite à nouveau présenté, cette fois-ci pendant que le patient se concentre sur de nouvelles informations, émotions et sensations. À la fin du traitement, les personnes souffrant de SSPT ne présentent généralement plus de comportements d'évitement ni de distorsions cognitives, et signalent que le souvenir ciblé est devenu moins vif émotionnellement (Calancie et al. 2018).

Des traitements pharmacologiques tels que des antidépresseurs peuvent être administrés en complément de la psychothérapie (Hoskins et al. 2015; *Guidelines for the Management of Conditions Specifically Related to Stress* 2013). Cependant, 20 à 40 % des patients souffrant de SSPT ne répondent pas au traitement (Bisson et al. 2013; Bienvenu et al. 2021).

## **2. MODELES ANIMAUX D'EVALUATION DE LA PEUR ET DE L'ANXIETE**

---

L'établissement de modèles précliniques permettant d'évaluer les comportements de peur et d'anxiété chez le rongeur a été et reste essentiel à la compréhension des phénomènes physiopathologiques à l'origine des troubles de la peur et de l'anxiété (Calhoon et Tye 2015).

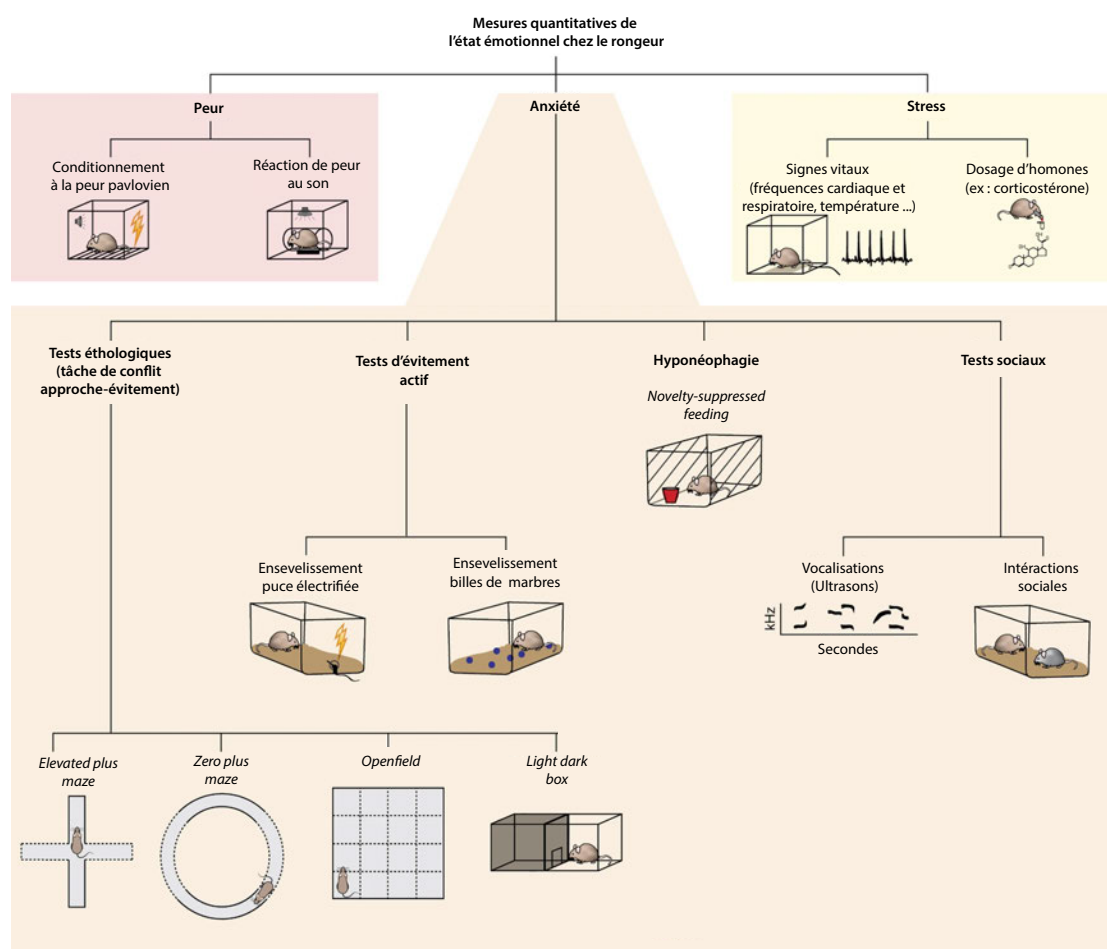
### **I. MODELES D'ANXIETE**

---

La plupart des tests d'anxiété adaptés aux souris s'appuient sur l'éthologie (Calhoon et Tye 2015). Ces tâches se fondent sur le comportement inné et conflictuel des rongeurs qui les poussent à la fois à explorer de nouveaux espaces et à éviter les zones ouvertes et exposées où ils pourraient être plus vulnérables aux menaces environnementales.

Dans ces tâches de conflit approche-évitement, les souris présentant un phénotype anxieux ont tendance à passer plus de temps dans les zones fermées ou "sûres" de l'appareil comportemental que les témoins (Tovote, Fadok, et Lüthi

2015). De nombreux tests de ce genre ont été développés. Par exemple, dans les tests *elevated plus maze* (EPM) ou *elevated zero maze* (EZM), les souris anxieuses évitent les zones ouvertes du labyrinthe en faveur des zones fermées. Le test d'*openfield* (OF) consiste en une grande arène où les individus peuvent se déplacer librement. Les souris anxieuses ont tendance à éviter le centre de l'arène (plus lumineux). Enfin, le test *light dark box* (LDB) est constitué de deux boîtes communiquant par une porte : une boîte noire et fermée et une boîte blanche et ouverte à la lumière. Les souris anxieuses passent proportionnellement plus de temps dans la zone sombre que la zone éclairée comparées aux souris témoins.



**FIGURE 17 - MODELES D'ANXIETE CHEZ LE RONGEUR**

Adapté de Calhoon et al., Nature neuroscience, 2015

Ces tests sont très utilisés, car faciles à mettre en place, mettant en évidence des comportements anxieux sensibles aux anxiolytiques, et ne demandant pas ou peu d'entraînement chez les animaux. Toutefois, il faut garder en tête que les résultats de ces tests peuvent être grandement influencés par de potentielles altérations de la locomotion chez les animaux. De plus, ces tâches de conflit approche-évitements

ne permettent pas de différencier la réduction de l'anxiété de l'augmentation accrue du comportement d'exploration (*Cryan et Holmes 2005*).

D'autres tests alternatifs dits d'évitement actif (où l'action de la souris est dirigée directement vers la réduction du stimulus de menace) permettent de faire cette distinction, comme la tâche d'enveloppement d'une puce électrisée ou de billes en marbres nouvellement introduites dans la cage de vie (*Degroot et Nomikos 2004; Njung'e et Handley 1991*). De même, l'anxiété chez la souris peut se manifester par une latence supérieure à s'alimenter dans un nouvel environnement comparativement aux souris témoins (test d'hyponéophagie) (*Merali, Levac, et Anisman 2003*). Enfin, les comportements sociaux peuvent également être perturbés par l'anxiété, avec une augmentation des vocalisations et une diminution des interactions entre individus (*Sánchez 2003*). En complément, les mesures physiologiques du stress (fréquences cardiaque et respiratoire, température corporelle, dosage des hormones du stress) et les tests comportementaux traditionnellement utilisés pour évaluer la mémoire de la peur sont des indicateurs additionnels de l'anxiété.

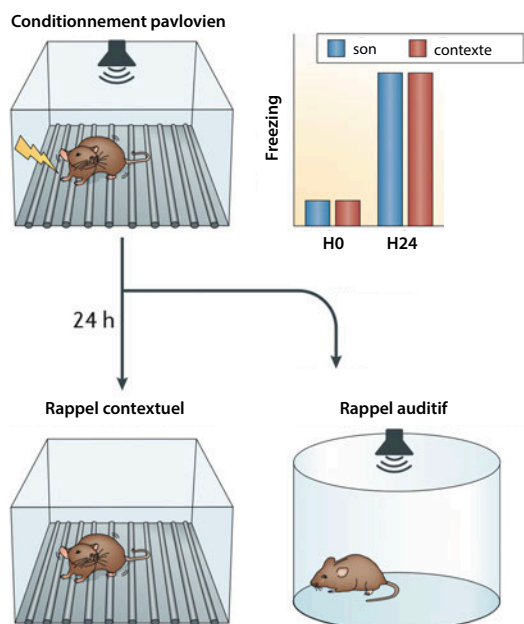
## II. MODELES DE SYNDROME DE STRESS POST-TRAUMATIQUE

Les modèles animaux du SSPT utilisent des paradigmes mettant en scène des événements stressants, aversifs ou des rappels de situations traumatisantes chez l'animal, qui ont des effets à long terme sur les réponses comportementales, autonomes et hormonales rappelant le SSPT humain (*Fenster et al. 2018; Richter-Levin, Stork, et Schmidt 2019*).

Les tests comportementaux couramment utilisés pour évaluer les symptômes de type SSPT chez les rongeurs comprennent des modèles de stress (stress social, stress chronique, stress lié aux prédateurs, stress de séparation de la mère et des souriceaux en début de la vie) et des modèles d'apprentissage dit de conditionnement à la peur.

Le conditionnement à la peur pavlovien (ou *fear conditioning*) a été un des premiers modèles de SSPT développés, car il fut surtout utilisé pour étudier les mécanismes et circuits qui sous-tendent les émotions et s'adaptait facilement aux

nouvelles techniques de neuroscience apparues à ce moment-là (enregistrement et manipulation *in vivo* de l'activité neuronale) (Tovote, Fadok, et Lüthi 2015). Dans ce paradigme utilisé chez les rongeurs, un stimulus normalement inoffensif appelé stimulus non conditionné (*unconditioned stimulus* ou US), tel qu'un contexte particulier ou un indice distinct (par exemple, un son, une lumière ou une odeur), est présenté en même temps qu'un événement aversif, comme un léger choc électrique. L'événement aversif induit une réponse de peur, qui se caractérise chez la souris par un comportement d'immobilisation (ou *freezing*). Le stimulus précédemment neutre acquiert alors des propriétés aversives par un processus d'apprentissage associatif et devient ainsi le stimulus conditionné (*conditioned stimulus* ou CS). Après une période de repos d'environ 24 h, le CS présenté seul provoque des réactions de peur, mesurées par un comportement défensif accru, la libération d'hormones de stress et l'activation du système nerveux sympathique. On parle alors de rappel auditif quand le CS est un son ou de rappel contextuel quand le CS est un contexte.



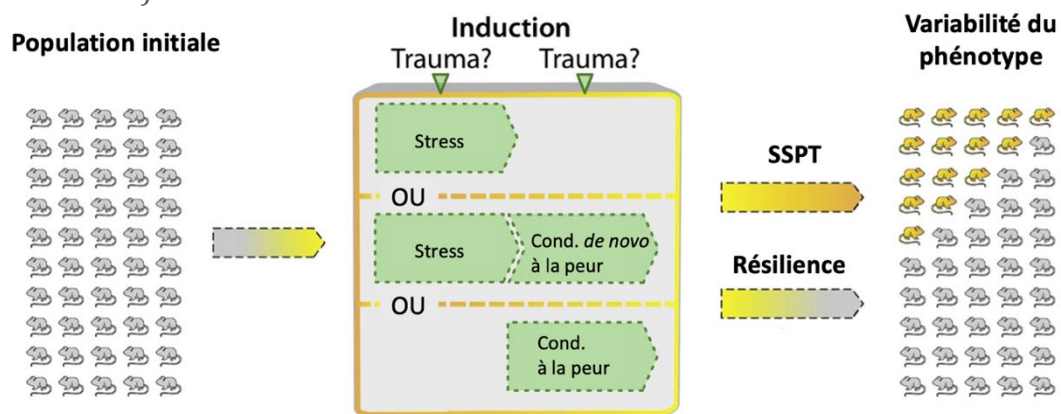
**FIGURE 18 - PRINCIPE DU TEST DE CONDITIONNEMENT A LA PEUR**

Adapté de Tovote et al.  
Nature Neuroscience, 2015

Le test de conditionnement par la peur permet d'étudier à la fois les processus d'apprentissage de la peur à court et long termes. La phase de conditionnement est généralement caractérisée par une augmentation progressive de l'expression de la peur lorsque de nombreux appariements CS-US sont présentés pendant l'entraînement. Des présentations répétées du CS seul entraînent une diminution de la réponse conditionnée, appelée extinction (Myers et Davis 2007). En outre, la peur du CS peut être rétablie par l'exposition à un seul US. De plus, la souris est

susceptible de développer des comportements de peur quand elle est confrontée à des contextes, des odeurs ou des sons différents, mais proches de CS, on parle alors du processus de généralisation (Asok, Kandel, et Rayman 2019). La plupart des études estiment que les souris présentant un comportement de type SSPT montrent à la fois une réponse augmentée lors du rappel de conditionnement à la peur, un retard à l'extinction de la peur et une attitude de peur généralisée (Fenster et al. 2018).

Bienvenu et al. 2021 proposent de distinguer les différents modèles de SSPT selon le type d'induction : un stress unique prolongé, ou un conditionnement à la peur, ou encore la combinaison successive d'un stress et d'un conditionnement à la peur (dit *de novo*).



**FIGURE 19 – MODELES DE SSPT ACTUELS**

Adapté de Bienvenu et al. Neuron, 2021

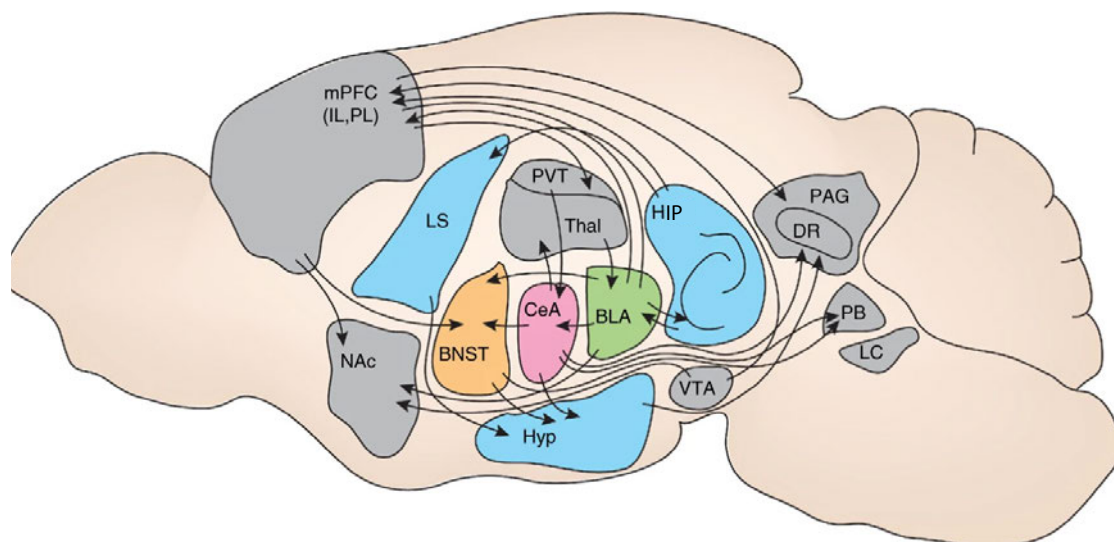
Les principales critiques qui sont formulées à l'encontre des modèles animaux de SSPT sont 1) les considérations éthiques et 2) les réponses au stress sont généralement mesurées chez tous les animaux, plutôt que dans un groupe sélectionné d'animaux vulnérables, comme c'est le cas avec le SSPT humain (Bienvenu et al. 2021). Il existe en effet toujours une variabilité dans ces modèles animaux, certains animaux étant sensibles au stress et d'autres résistants.

### 3. CIRCUITS NEURONAUX IMPLIQUES

#### I. MACRO-CIRCUIT DE LA PEUR ET DE L'ANXIETE



De manière très précoce, les travaux sur la neurobiologie des émotions ont mis en évidence l'implication de régions clés dans le contrôle de la peur et de l'anxiété : l'amygdale, le BNST, l'hippocampe ventral (vHIP) et le cortex préfrontal (PFC) (Calhoun et Tye 2015; Janak et Tye 2015; Tovote, Fadok, et Lüthi 2015). Les nouveaux outils de traçage viral, d'enregistrements calciques et les approches optogénétiques et pharmacogénétiques plus récentes ont permis d'identifier des réseaux complexes au sein du système limbique, qui fonctionnent en boucles d'autorégulation. L'évaluation d'une situation potentiellement dangereuse passe dans un premier temps par la détection de stimuli environnementaux *via* le système sensoriel (thalamus, cortex sensitif, colliculus) (McDonald 1998). Ces régions projettent directement vers l'amygdale, le BNST, le vHIP et le PFC qui sont interconnectés et coordonnent l'interprétation de la situation environnementale qui aboutit à une réponse comportementale, physiologique et hormonale à la situation de stress médiée par le cortex moteur, l'hypothalamus (PVN) et les noyaux du tronc cérébral (PBN, PAG, complexe vagal). Ces régions agissent également de manière rétrograde pour initier une potentielle augmentation ou diminution de la vigilance.



**FIGURE 20 - CIRCUITS DE LA PEUR ET DE L'ANXIÉTÉ**

Adapté de Calhoun et al., Nature neuroscience, 2015

PB : noyau parabrachial, LC : locus coeruleus, PAG : substance périaqueducale, DR : noyau raphé dorsal, VTA : aire tegmentale ventrale, PVT : noyau paraventriculaire du thalamus, Thal : thalamus, HIP : hippocampe, CeA : amygdale centrale, BLA : amygdale basolatérale, BNST : noyau du lit de la strie terminale, Hyp : hypothalamus, NAc : noyau accumbens, LS : septum latéral, mPFC : cortex préfrontal médial, IL : cortex infra-limbique, PL : cortex pré-limbique

L'amygdale est une région déterminante dans l'interprétation des afférences sensorielles. Elle est constituée de deux grands groupes de noyaux distincts dans



leur organisation structurelle et fonctionnelle : l'amygdale basolatérale (BLA) et l'amygdale centrale (CeA). La BLA se compose principalement de neurones de projection glutamatergiques (80 %) et d'interneurones GABAergiques (20 %). Elle tient un rôle fondamental dans le processus de mémorisation de la peur et d'apprentissage via des phénomènes de plasticité synaptique dépendante de l'activité neuronale.

La BLA est particulièrement impliquée dans la détermination de la valence attribuée à un stimulus, qu'elle évaluera comme plaisant ou aversif (*Namburi et al. 2015*). Les stimuli à valeur positive activent les projections de la BLA vers le noyau accumbens (NAc) alors que les stimuli à valence négative de peur ou d'anxiété stimulent les projections de la BLA vers la CeA et le BNST (*Miles et Maren 2019, 201; Duvarci et Pare 2014; Kim et al. 2013; Tye et Deisseroth 2012*).

La CeA se compose d'un noyau médial (CeM) et d'un noyau latéral (CeL), majoritairement constitués de neurones GABAergiques qui projettent vers des régions cérébrales impliquées dans les processus de comportement défensif. Ces deux noyaux sont séparés par un groupe d'interneurones intercalaires inhibiteurs (ITC) qui génère un rétrocontrôle négatif sur les neurones de la CeA, dont l'intensité varie en fonction des afférences reçues depuis la BLA (*Paré et al. 2003*).

Le BNST, qui reçoit des afférences directes de la BLA, du vHIP et du PFC est particulièrement important dans la survenue de la peur et la régulation de la réponse anxieuse (*Davis et al. 2010; Stamatakis et al. 2014*). En effet, en absence de BLA fonctionnelle, le BNST agit comme un centre compensatoire de la mémoire de la peur (*Poulos et al. 2010*). Le BNST est lui-même divisé en trois sous-régions qui régulent de manière opposée le comportement d'anxiété : le BNST ventral (vBNST), le BNST dorsal ou antérodorsal (dBNST ou adBNST) et enfin le noyau oval du BNST (ov). La projection BLA-vBNST favorise le comportement de peur tandis que la projection BLA-dBNST s'avère anxiolytique (*Kim et al. 2013*). Le BNST projette vers l'aire tegmentale ventrale (VTA), l'hypothalamus latéral (LH) et le PBN qui coordonnent respectivement la préférence, l'évitement du risque et la réponse cardiorespiratoire au stress.

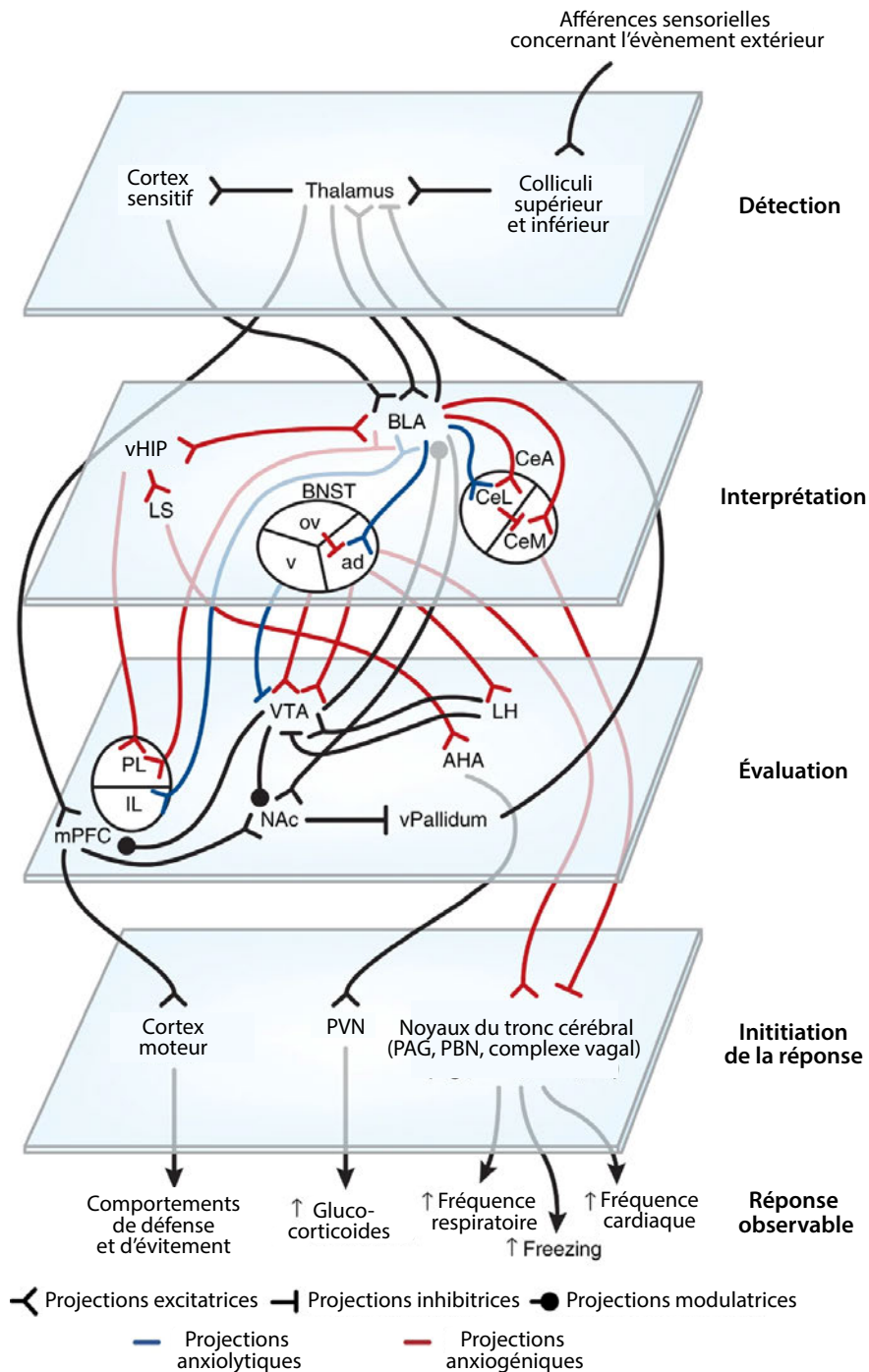
Dans la littérature, la CeA et le BNST sont décrits comme faisant partie d'une structure fonctionnelle plus large connue sous le nom d'amygdale centrale

étendue, qui joue un rôle majeur dans la régulation de la peur et de l'anxiété et qui est impliquée dans le développement de toute une gamme de désordres neuropsychiatriques tels que le syndrome d'anxiété généralisée, le syndrome de stress post-traumatique, ou encore les comportements pathologiques d'agressivité ou de retrait social (*Lebow et Chen 2016; Shalev, Liberzon, et Marmar 2017*).

Le vHIP reçoit également des afférences de la BLA qui régulent directement l'anxiété et la mémoire de la peur (*Witter et al. 2014; Izquierdo, Furini, et Myskiw 2016*). L'anxiété médiée par le vHIP agit principalement par ses projections avec le septum latéral (LS), qui est lui-même interconnecté avec l'hypothalamus qui amplifie encore la réponse neuroendocrine au stress initiée par l'activation de l'amygdale et du BNST (aire antérieure (AHA) et PVN). Les travaux actuels attribuent un rôle fondamental dans la mémoire de la peur à la plasticité ayant lieu dans l'hippocampe et dans le complexe amygdalien. Il existe aujourd'hui un consensus sur le fait que, dans le cas du conditionnement à la peur contextuelle, la détection du CS (contexte) a lieu dans l'hippocampe, tandis que dans le cas du conditionnement auditif, la détection que le CS (son) implique l'amygdale latérale (LA) (*Orsini et Maren 2012; Izquierdo, Furini, et Myskiw 2016*). Ainsi l'apprentissage de la peur contextuelle est sous-tendu par une plasticité à long terme ayant lieu dans l'hippocampe (*Gruart, Muñoz, et Delgado-García 2006*). Si les projections de la BLA vers l'hippocampe sont uniquement sur sa partie ventrale et régulent la réponse émotionnelle, le dHIP est indispensable à l'acquisition de la mémoire spatiale et joue par conséquent un rôle essentiel dans l'intégration du contexte lié à la peur (*Fanselow et Dong 2010*).

Enfin, les connexions réciproques entre la BLA et le PFC jouent également un rôle central dans l'anxiété et la mémoire de la peur. Il constitue un centre d'évaluation majeur de l'interprétation émise par le système limbique. Chez la souris, le PFC intègre le cortex pré- limbique (PL) et infra- limbique (IL). Les projections du PL vers l'amygdale facilitent la réponse à la menace tandis que les projections d'IL vers l'amygdale les suppriment. De plus, étant donné ses projections vers le NAc, le PFC est lui aussi impliqué dans l'évaluation de la valence des situations (*Groenewegen, Wright, et Uylings 1997*).

Calhoun et Tye 2015 propose précisément un modèle d'organisation du circuit de l'anxiété selon ces quatre grandes étapes de traitement de l'information de peur : la détection, l'interprétation, l'évaluation et enfin l'initiation de la réponse.



**FIGURE 21 - ORGANISATION EN QUATRE ETAPES DES CIRCUITS DE L'ANXIETE**

Adapté de Calhoun et al., Nature neuroscience, 2015

PBN : noyau parabrachial, PAG : substance périaqueducale, PVN : noyau paraventriculaire de l'hypothalamus, VTA : aire tegmentale ventrale, NAc : noyau accumbens, mPFC : cortex préfrontal médial, IL : cortex infra-limbique, PL : cortex prélimbique, AHA : aire hypothalamique antérieure, LH : aire hypothalamique latérale, vHIP : hippocampe ventral, CeA : amygdale centrale, CeL : noyau latéral de la CeA, CeM : noyau médial de la CeA, BLA : amygdale basolatérale, BNST : noyau du lit de la strie terminale, ov : noyau oval, vBNST : BNST ventral, adBNST : BNST antéro-dorsal, Hyp : hypothalamus, LS : septum latéral.

Ainsi, deux individus peuvent détecter de manière équivalente un stimulus particulier, mais la différence d'interprétation peut entraîner la sélection de réponses comportementales opposées. L'anxiété émanerait alors des différents processus internes se déroulant entre la détection et la réponse au stimulus sensoriel.

Dans le cas plus particulier du SSPT, les études d'imagerie chez les patients ont montré que les circuits neuronaux qui semblent jouer un rôle prépondérant sont les aires impliquées dans l'apprentissage de la peur (amygdale), la détection des menaces (amygdale, cortex insulaire et cortex cingulaire antéro-dorsal), la fonction exécutive et la régulation des émotions (PFC), ainsi que le traitement contextuel (hippocampe, thalamus et PFC)(*Shalev, Liberzon, et Marmar 2017*).

## II. FOCUS SUR LES MICROCIRCUITS DE LA CEA

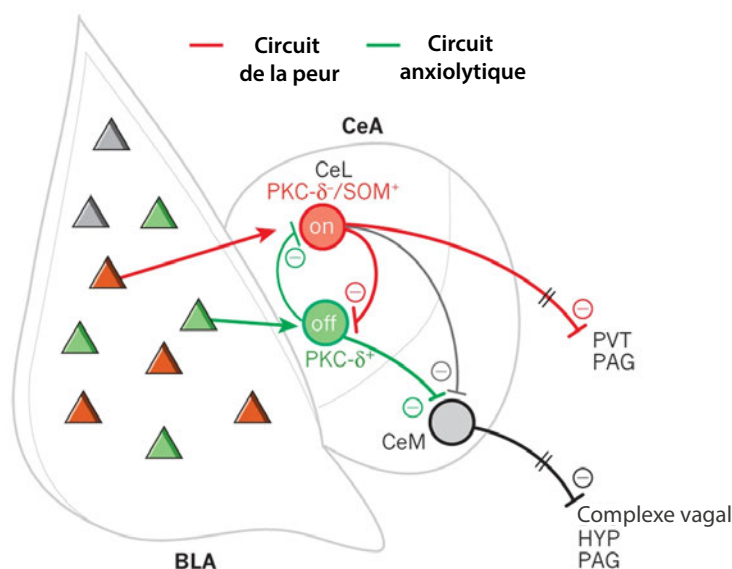
---

À ces circuits à l'échelle du système nerveux central s'ajoutent au sein même des noyaux amygdaliens des microcircuits de régulation (*Tovote, Fadok, et Lüthi 2015; Janak et Tye 2015*), qui jouent également un rôle majeur dans l'acquisition de la mémoire de la peur.

Des enregistrements *in vivo* ont mis en évidence l'existence de deux sous-populations distinctes de neurones inhibiteurs : les cellules CeL<sup>ON</sup>, activées par un stimulus conditionnant la peur (CS) et exprimant la somatostatine (SOM), et les cellules CeL<sup>OFF</sup>, inhibées par ce même stimulus et exprimant la protéine kinase C  $\delta$ (PKC $\delta$ ). Les cellules CeL<sup>OFF</sup> sont inhibées par les cellules CeL<sup>ON</sup> activées lors d'un CS. L'inhibition des cellules CeL<sup>OFF</sup> résulte en la désinhibition des neurones de projection partant de la CeM vers différentes régions du cerveau (PAG, thalamus, hypothalamus, complexe vagal) qui régulent de façon directe la réponse comportementale face à la peur (immobilisation, etc).

La protéine PKC est sécrétée dans les neurones après activation des récepteurs au facteur CRF, libéré dans les situations de stress (*Toth et al. 2013*). Ils reçoivent des afférences directes du PBN, une structure du tronc cérébral qui fournit les signaux nociceptifs (*Han et al. 2015*). De plus, les projections des neurones PKC  $\delta+$  de la CeA vers la *Substantia Innominata* (SI), une région du pallidum impliquée dans la

modulation de la réponse émotionnelle, semblent impliquées dans un circuit de régulation bidirectionnelle de l'apprentissage lié à la mémoire aversive (Cui et al. 2017). Récemment, une étude a montré que les neurones PKC  $\delta$  de la CeA étaient indispensables à la plasticité synaptique liée à l'apprentissage et à la mémorisation de la peur dans la LA, avec l'hypothèse d'une connexion CeA-LA via la SI (Yu et al. 2017).



**FIGURE 22 -  
MICROCIRCUIT DE LA CEA**

Adapté de Janak et al. Nature, 2015

CeA : amygdale centrale, CeL : noyau latéral de la CeA, CeM : noyau médial de la CeA, BLA : amygdale basolatérale, PAG : substance périaqueducule, PVT : noyau paraventriculaire du thalamus, HYP : hypothalamus, PKC  $\delta$  : protéine kinase C  $\delta$  SOM : somatostatine

Des études plus récentes ont montré qu'en supplément de leur rôle dans le contrôle de la réponse à la peur, l'activation optogénétique des neurones PKC  $\delta$ + dans la CeL était aussi anxiogénique (Botta et al. 2015) et anorexigénique (Cai et al. 2014), ce qui suggère une diversité de sous-circuits dans la population des neurones PKC  $\delta$ .

#### 4. ANXIÉTÉ, SYNDROME DE STRESS POST-TRAUMATIQUE ET INFLAMMATION

Depuis maintenant quelques dizaines d'années, les études se sont multipliées pour caractériser le profil inflammatoire des patients atteints de troubles de la peur et de l'anxiété (Michopoulos et al. 2017; 2017; Salim, Chugh, et Asghar 2012).

Tout d'abord, des études de méta-analyses ont démontré que l'exposition à un traumatisme est significativement corrélée à une réponse pro-inflammatoire, caractérisée par une augmentation de la concentration en cytokines pro-

inflammatoires circulantes (IL1b, IL-6, TNF) et de marqueurs protéiques de l'inflammation comme la protéine C-réactive (*C-reactive protein* ou CRP) (*Tursich et al. 2014*). En effet, les personnes ayant été exposées à des traumatismes pendant leur enfance (enfant maltraité, difficultés socio-économiques, séparation des parents) présentent à l'âge adulte des concentrations en CRP et cytokines pro-inflammatoires supérieures à la population moyenne (*Bertone-Johnson et al. 2012; Lin et al. 2016; Matthews et al. 2014; Tietjen et al. 2012*). En outre, l'exposition à des traumatismes pendant l'enfance est un facteur de risque connu du développement ultérieur de troubles de l'anxiété ou de SSPT.

Ensuite, des taux élevés de marqueurs pro-inflammatoires sont détectés chez les patients atteints de SSPT ou de troubles de l'anxiété (*Guo et al. 2012; Passos et al. 2015*). Certaines études montrent même que les concentrations en TNF sont corrélées au degré de sévérité, à la symptomatologie et à la durée de la maladie chez les patients souffrant de SSPT (*von Känel et al. 2007; Passos et al. 2015*). De même, la fonction et la distribution des cellules immunitaires semblent altérées chez ces mêmes individus, avec l'observation d'une augmentation des taux de leucocytes circulants (*Michopoulos et al. 2017*). Enfin, des modifications de l'expression des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire sont observées dans les échantillons sanguins de ces patients, comme l'activation de la voie pro-inflammatoire NF- $\kappa$ B (*Guardado et al. 2016*) ou encore des altérations du profil de méthylation des gènes inflammatoires (*Heinzelmann et Gill 2013*). Une étude d'association pangénomique (*Genome-wide association studies* ou GWAS) montre que le SSPT est associé à un enrichissement des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire chez la femme (*Guffanti et al. 2013*).

Toutes les études traitant de ce sujet n'ont toutefois pas rapporté une association positive entre l'augmentation de l'inflammation et le SSPT (*McCanlies et al. 2011; von Känel et al. 2007*). Cette divergence dans la littérature souligne l'importance d'autres facteurs qui peuvent influencer cette corrélation, tels que le type et la chronicité de l'exposition au traumatisme, les mesures du diagnostic du SSPT ou encore les caractéristiques sociodémographiques des personnes étudiées.

Il n'est toutefois pas établi si l'augmentation des marqueurs pro-inflammatoires précède ou suit l'apparition des troubles anxieux ou le SSPT. Des études réalisées

chez des vétérans de guerre ont montré que des concentrations plus élevées en CRP ou une expression augmentée de gènes impliqués dans l'immunité innée et la signalisation aux interférons avant le déploiement augmentent la susceptibilité à développer un SSPT après le déploiement (*Eraly et al. 2014; Breen et al. 2015*). De même, un taux élevé en IL-6 immédiatement après un accident de voiture est prédictif d'un risque de développer un SSPT chez l'enfant (*Pervanidou et al. 2007*).

Les mécanismes sous-tendant ces observations sont pour le moment très peu connus. Il est établi que la réponse au stress est particulièrement altérée dans les troubles de la peur et de l'anxiété. Ce dysfonctionnement explique en partie les modifications des paramètres inflammatoires observés chez ces patients. En effet, l'exposition à un traumatisme entraîne des modifications chroniques du HPA et du tonus sympathique qui se traduisent respectivement par une diminution de l'action des glucocorticoïdes et une augmentation des concentrations en NA, menant à une augmentation de l'inflammation (*Hori et Kim 2019*). On observe chez des modèles animaux de stress chronique une forte augmentation du stress oxydatif et des symptômes d'anxiété à long terme. Ces symptômes sont supprimés par l'administration d'inhibiteur de la voie oxydative comme l'inhibiteur de la cyclo-oxygénase (COX) (*Poulos et al. 2010*). Il a aussi été démontré que l'inflammation et la libération de cytokines pouvaient entraîner des lésions excitotoxiques ou neuroinflammatoires au niveau cérébral, localisées préférentiellement dans certaines régions, comme les aires cérébrales directement impliquées dans la réponse comportementale de peur et d'anxiété (amygdale, HIP, PFC, NAc, insula). On soupçonne que ces processus inflammatoires peuvent entraîner des lésions chroniques dans ces régions cérébrales, à l'origine de modifications à long terme du comportement. Par exemple, plusieurs études ont montré que l'activation microgliale lors de l'exposition à des cytokines entraînait une inhibition de la neurogenèse et promouvait l'apoptose neuronale dans l'hippocampe, menant à une atrophie hippocampique (*Cunningham et al. 2005; Ekdahl et al. 2003*). Cette atrophie hippocampique est retrouvée chez les patients atteints de SSPT (*Elzinga et Bremner 2002*).

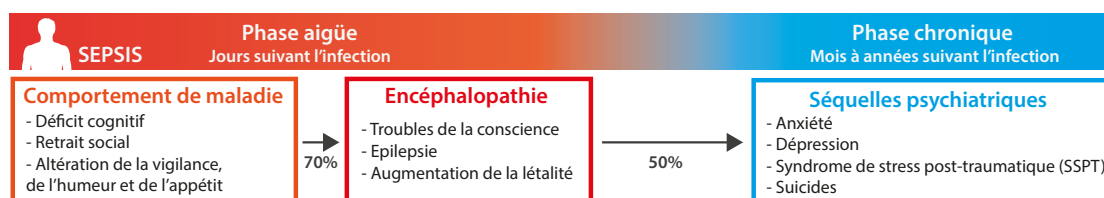
Ces divers résultats pourraient suggérer que les deux sens de la relation temporelle entre l'inflammation et l'apparition du SSPT ou des troubles anxieux sont probables. Il est également possible que l'inflammation préexistante s'aggrave après le développement de ces troubles psychiatriques.

Toutefois, de plus amples recherches sont nécessaires pour établir le lien de causalité et élucider les mécanismes à l'origine de cette corrélation entre inflammation et troubles psychiatriques.



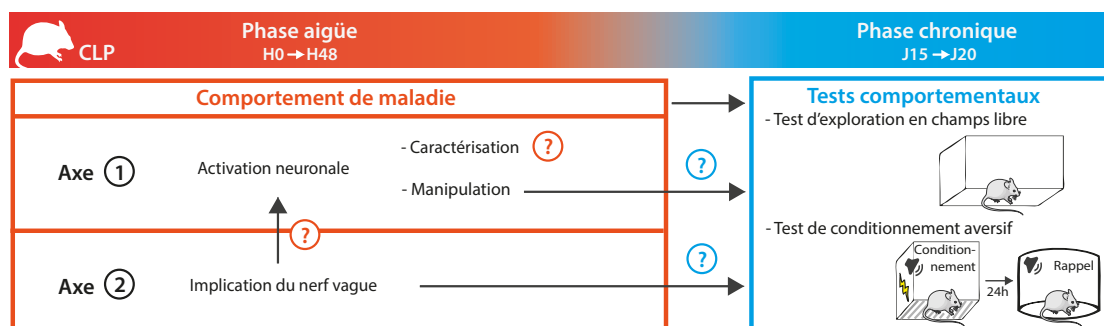
# PROBLEMATIQUES DE LA THESE

Les études qui tendent à relier inflammation et troubles psychiatriques sont nombreuses et diverses. Pour autant, elles abordent tous les types de chronologie entre inflammations et troubles du comportement : mesure simultanée ou différée, lors d'épisodes inflammatoires aigus, chroniques ou passés, sur des échelles de temps très différentes. Cette multiplicité dans le type de données récoltées complique d'autant plus l'identification des mécanismes à l'origine de cette causalité. Au cours de mon doctorat, nous avons décidé de nous focaliser sur l'étude d'une réalité clinique d'importance majeure que constituent les séquelles comportementales développées à long terme post-sepsis, quand les patients ne présentent plus aucun signe résiduel de l'épisode inflammatoire aigu.



Pour aborder cette problématique, nous avons utilisé un modèle murin d'induction de sepsis par CLP dans le schéma expérimental suivant qui permet à la fois :

- D'étudier la réponse cérébrale au sepsis lors du comportement de maladie (phase aiguë c'est-à-dire les heures suivant la CLP)
- D'évaluer les séquelles à long terme, en réalisant des tests comportementaux lorsque les souris se sont complètement rétablies de l'épisode septique (phase chronique, 15 à 20 jours après CLP)



Ainsi, mon travail de thèse est structuré en deux axes principaux visant conjointement à caractériser l'impact du sepsis sur les circuits neuronaux impliqués dans la réponse émotionnelle.

- **Axe 1 : Quel est le lien entre l'activation cérébrale lors de la phase aiguë du sepsis et les séquelles comportementales de peur et d'anxiété observées à long terme ?**

Ce projet a pour double objectif :

- a. la caractérisation de la réponse cérébrale lors de la phase aiguë du sepsis
- b. la manipulation transitoire de cette réponse neuronale et ses conséquences sur le comportement à long terme, dans une optique thérapeutique

Les résultats de cette étude font l'objet d'un article intitulé « *Silencing of amygdala circuits during sepsis prevents the development of anxiety-related behaviors* » en cours de révision dans la revue *Brain*, et sont détaillés dans le Chapitre 1 de la section Résultats de cette thèse.

- **Axe 2 : Dans quelle mesure le nerf vague est-il impliqué dans le relai de l'inflammation périphérique au cerveau lors du sepsis et la survenue ultérieure des séquelles anxio-dépressives ?**

Dans ce deuxième projet, nous avons associé le modèle de sepsis induit par péritonite CLP avec une chirurgie de vagotomie sous-diaphragmatique, qui consiste à sectionner les branches abdominales du nerf vague. Cette méthode nous a permis d'étudier l'effet de l'absence de relai vagal abdominal sur l'activation cérébrale lors de la phase aiguë du sepsis et les altérations comportementales qui s'en suivent.

Les résultats de cette étude font l'objet d'un article non finalisé intitulé « *Impact of the vagus nerve on the extended amygdala recruitment and long-term anxiodepressive behavior following sepsis* » toujours en cours de préparation, et sont détaillés dans le Chapitre 2 de la section Résultats de cette thèse.

RESULTATS

-

ARTICLE #1

# ARTICLE #1

## **L'inhibition des circuits amygdaliens pendant le sepsis prévient le développement ultérieur des séquelles de peur et d'anxiété.**

Article en cours de révision dans la revue *Brain*.

### **Résumé**

Le sepsis se définit comme une dysfonction d'organe mettant en jeu le pronostic vital et causée par une réponse immunitaire dérégulée de l'hôte face à une infection grave. Parmi les patients survivant au sepsis, près de la moitié développe dans les mois à années suivant leur hospitalisation de graves séquelles psychiatriques telles que l'anxiété et le syndrome de stress post-traumatique (SSPT), dont les mécanismes neurobiologiques restent inconnus. Au niveau cérébral, le sepsis induit l'activation pathologique transitoire d'une sous-population neuronale du noyau central de l'amygdale (CeA) qui projette vers la partie ventrale du noyau du lit de la strie terminale (vBNST). En combinant des techniques de traçage viral et d'imagerie calcique *in vivo*, nous avons observé que le sepsis provoque des changements persistants de la connectivité et de la réponse fonctionnelle des neurones de la CeA projetant vers le vBNST. L'inhibition transitoire et ciblée de cette sous-population uniquement pendant la phase aiguë du sepsis avec le médicament antiépileptique et neuromodulateur Levetiracetam, ou avec une approche pharmacogénétique, prévient le développement ultérieur des comportements de type anxiété ou SSPT. L'inhibition spécifique des circuits cérébraux de l'anxiété et de la peur pendant la phase aiguë du sepsis constitue une approche préventive des altérations comportementales à long-terme.

N.B. Une partie de ce travail a été initiée par Aurélien Mazeraud lors de son doctorat (2014-2017).

# **Silencing of amygdala circuits during sepsis prevents the development of anxiety-related behaviors**

Lena Bourhy<sup>1,2,3,4†</sup>, Aurélien Mazeraud<sup>1,5†</sup>, Luis H A Costa<sup>1,6</sup>, Jarod Levy<sup>2,3</sup>, Damien Rei<sup>2,3</sup>, Estéban Hecquet<sup>2,3</sup>, Ilana Gabanyi<sup>2,3</sup>, Fernando A Bozza<sup>7,8</sup>, Fabrice Chrétien<sup>1,4,9</sup>, Pierre-Marie Lledo<sup>2,3‡\*</sup>, Tarek Sharshar<sup>1,4,5‡</sup>, Gabriel Lepousez<sup>2,3‡\*</sup>.

† These authors contributed equally to this work

‡ These authors jointly supervised this work

## **Abstract**

Sepsis is a life-threatening condition induced by a deregulated host response to severe infection. Post-sepsis syndrome includes long-term psychiatric disorders, such as persistent anxiety and post-traumatic stress disorder (PTSD), which neurobiological mechanisms remain unknown. Using a reference mouse model of sepsis, we showed that mice that recovered from sepsis further developed anxiety-related behaviors associated with an exaggerated fear memory. In the brain, sepsis induced an acute pathological activation of a specific neuronal population of the central nucleus of the amygdala (CeA) which projects to the ventral bed nucleus of the stria terminalis (vBNST). Using viral-genetic circuit tracing and *in vivo* calcium imaging, we observed that sepsis induced persistent changes in the connectivity matrix and in the responsiveness of vBNST-projecting CeA neurons. The transient and targeted silencing of this subpopulation only during the acute phase of sepsis with the antiepileptic and neuroprotective drug Levetiracetam, or with a viral pharmacogenetic approach, prevented the subsequent development of anxiety-related behaviors. Specific inhibition of brain anxiety- and fear circuits during the sepsis acute phase constitutes a preventive approach to preclude the post-infection psychiatric outcomes.

## Author affiliations

<sup>1</sup> Laboratory for Experimental Neuropathology, Institut Pasteur, Paris, France

<sup>2</sup> Laboratory for Perception and Memory, Institut Pasteur, Paris, France

<sup>3</sup> CNRS UMR 3571, Paris, France

<sup>4</sup> Université de Paris, Paris, France

<sup>5</sup> GHU Paris Psychiatrie Neurosciences, Service hospitalo-universitaire de Neuro-anesthésie réanimation, Paris, France

<sup>6</sup> Department of Basic and Oral Biology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.

<sup>7</sup> National Institute of Infectious Disease Evandro Chagas (INI), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil

<sup>8</sup> D'Or Institute for Research and Education (IDOR), Rio de Janeiro, Brazil

<sup>9</sup> GHU Paris Psychiatrie Neurosciences, Service hospitalo-universitaire de Neuropathologie, Paris, France

† These authors contributed equally

‡ These authors jointly supervised this work

\* Correspondence to Gabriel Lepousez & Pierre-Marie Lledo, Laboratory for Perception and Memory, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France. Email: [gabriel.lepousez@pasteur.fr](mailto:gabriel.lepousez@pasteur.fr), [pierre-marie.lledo@pasteur.fr](mailto:pierre-marie.lledo@pasteur.fr)

**Running title:** Impact of sepsis on anxiety circuits

**Keywords:** neuroinflammation, neuro-immune interactions, cecal ligation and puncture, CLP, rabies virus-based tracing

## Abbreviations

AAV: adeno-associated virus

AI: agranular insular cortex

AP: area postrema

BLA: basolateral amygdala

CeA: central nucleus of the amygdala

CeL: lateral subdivision of the CeA

CLP: cecal ligation and puncture

CNO: clozapine-N-oxide

CS: conditional stimulus  
CTB: cholera toxin B  
DREADD: designer receptor exclusively activated by designer drugs  
EEG: electroencephalogram  
EMG: electromyogram  
FC: fear conditioning  
IL: interleukin  
IP: intra-peritoneal  
LDB: light/dark box test  
LEV: levetiracetam  
LFP: local field potential  
LPS: liposaccharide  
NOL: novel object localization  
NOR: novel object recognition  
NTS: solitary tract nucleus  
OF: openfield  
PBN: parabrachial nucleus  
PBS: phosphate buffered saline  
PKC $\delta$ : protein kinase C $\delta$   
PTSD: post-traumatic stress disorder  
PVT: paraventricular thalamus  
SAE: sepsis-associated encephalopathy  
SC: subcutaneous  
SI: substantia innominata  
SO: supraoptic nucleus of the hypothalamus  
SOM: somatostatin  
TNF: tumor necrosis factor  
US: unconditional stimulus  
vBNST: ventral bed nucleus of the stria terminalis  
vHIP: ventral hippocampus

## Introduction

Sepsis is defined as a life-threatening organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection (1). It is a medical emergency that, despite adequate early treatment, remains associated with a high mortality and increased long-term morbidities impacting the survivors' quality of life. It affects 30 million patients per year worldwide, with a growing incidence, making it an increasing burden in public health (2). In 2017, considering its importance and complexity, the World Health Organization declared sepsis a global health priority, adopting a resolution to improve its prevention, detection and clinical management (3).

Sepsis acute effects on the central nervous system induce behavioral and neuroendocrine adaptive response to systemic inflammation, referred to as sickness behavior (4). In addition to the sickness behavior, 50 to 70% of patients develop a sepsis-associated encephalopathy (SAE), characterized by electroencephalographic alterations (5) and consciousness impairments — ranging from delirium to coma— which highly increases short-term morbidity without being related to direct brain infection. Interestingly, patients who clear the infection and survive sepsis develop later on severe psychiatric disorders including depression, anxiety and post-traumatic stress disorder (PTSD) that lead to increased suicide rates (5,12–14). For instance, considering that lifetime PTSD prevalence is only 1 to 12% in the general population (10–13), it reaches 24 to 50% in patients who recover from abdominal or respiratory sepsis. Despite the medical, epidemiological and social burden of these post-sepsis psychiatric disorders, there is to date no specific treatment to prevent or diminish their occurrence.

The pathophysiology and the mechanisms of the SAE are currently poorly understood. Some brain regions are preferentially targeted during sepsis. Studies of the brain of patients who died of sepsis demonstrate a strong neuronal activation and apoptosis in specific areas, notably the brainstem and the amygdala (14). The amygdala, composed of two groups of nuclei i.e. the basolateral region (BLA) and the central region (CeA), is a crucial node in the fear and anxiety circuitry in both human and rodent studies (15, 16). The CeA, and more specifically its lateral subdivision (CeL), contains mainly GABAergic neurons that project to



the centers controlling defensive and appetitive behavior (17). These CeA output neurons are composed of two non-overlapping subpopulations of inhibitory neurons, which express the markers protein kinase C $\delta$  (PKC $\delta^+$ ) or somatostatine (SOM $^+$ ) that reciprocally control each other, leading to the expression of conditioned fear, notably in fear learning, extinction and generalization (15, 17). Importantly, PKC $\delta^+$  neurons receive direct inputs from the parabrachial nucleus (PBN), a brainstem structure which provides nociceptive and vagal signals (18). Moreover, PKC $\delta^+$  neurons inhibition is sufficient to drive the formation of artificial aversive memories (19), indicating the crucial role of PKC $\delta^+$  neurons in the fear memory network (20). In addition, optogenetic activation of PKC $\delta^+$  neurons in the CeL promotes anxiogenic (21) and anorexic effects (22), suggesting a diversity of subcircuits within the overall PKC $\delta^+$  neurons population. From the acute adaptative defensive behaviour controlled by the CeA can emerge a delayed sustained maladaptive response. This response is characterized by an overestimation of the threat potential in uncertain situations and involves an overlapping circuit centred on the amygdala, whose dysfunction has been highlighted in various psychiatric disorders (23). Additionally, the extended amygdala—which includes the CeA and the Bed Nucleus of the stria terminalis (BNST)—has been shown to play a predominant role in the outcome of anxiety-related disorders including PTSD (24, 25).

Using the common murine sepsis model of cecal ligation and puncture (CLP) that induces sepsis by an intra-abdominal infection, it is possible to experimentally reproduce the sepsis-induced brain responses herein described. It mimics the major features of human sepsis, including strong inflammatory response and sickness behavior (26–28). Studies have shown that mice present anxiety-like behavior and altered fear memory several weeks after CLP induction, reminiscent of the anxiety and PTSD-like symptoms developed by human sepsis survivors (29–33). In the present study, this preclinical model has been used to study the causal link between the sepsis-induced brain dysfunction during the acute phase and the subsequent development of PTSD-like fear expression. We demonstrated that sepsis induced an acute and transient pathological activation of a specific circuit of the extended amygdala. The inhibition of this neuronal subpopulation only during the acute phase of sepsis prevented the development of post-sepsis PTSD-

like symptoms. From a therapeutic perspective, it is noteworthy that, in addition to this transient neuronal hyperactivation, SAE has been characterized by electroencephalogram (EEG) changes (5, 34), including a shift of alpha and beta activities to increased delta and theta activities with in most severe cases triphasic waves and burst suppression. Epileptic discharges are detected in more than 10% of SAE patients (35). In rodent studies, the injection of the bacterial endotoxin liposaccharide (LPS) increases seizure susceptibility by lowering seizure threshold (36). Given these observations, we tested the effect of the administration during sepsis of the Levetiracetam (LEV), an antiepileptic and neuromodulatory drug. LEV is a presynaptic inhibitor of the neurotransmitter release and the most frequently used antiepileptic drug, very well tolerated even in critically ill patients (37). LEV acts on the synaptic vesicle glycoprotein 2A (Sv2a) located at the surface of the neurotransmitter vesicle in the presynaptic terminal and inhibits vesicle release in the synaptic cleft (38). LEV has a pan-synaptic activity specifically on bursts of activity and is non-sedative. Moreover, studies demonstrated its capacity to restore alpha and beta activities with reducing the delta and theta ones in epileptic patients (39). Besides its classical anti-epileptic action, LEV has been used to dampen pathological hyperexcitability of neocortical circuits in neurodegenerative diseases (40) and in ischemic brain injuries (41). In the present study, we administrated LEV during the acute phase of sepsis to investigate whether LEV could significantly prevent the CLP-induced transient neuronal activation of amygdala circuits and reduced the magnitude of post-sepsis anxiety and PTSD-like fear expression.

## Materials and Methods

**Animals.** Adult (2-5 months old) wild-type male C57Bl/6Jrj mice (Janvier labs, Le Genest-Saint-Isle, France) and adult male and female FOS-CreERT2 ( $Fos^{tm1.1(cre/ERT2)Luo}$ ; Jackson labs; (42)) and VGAT-ires-Cre mice ( $Slc32a1^{tm2(cre)Lowl}$ ; Jackson labs; (43)) were housed under a 12-h light/dark cycle, with dry food and water available *ad libitum*. All procedures were consistent with the European Union guidelines (EU Directive 2010/63/EU) for animal experiments and were reviewed and approved by the Animal Welfare Committee of the Institut Pasteur (Projects numbers: 2015-004, 2013-0086, dap180018 and dap200025).

**Cecal ligation and puncture (CLP) surgery.** Mice were treated for analgesia and rehydration 30 minutes before surgery with subcutaneous (SC) injection of buprenorphine (0.1mg/Kg, Buprecare, Axience, Pantin, France) and saline (NaCl 0.9%). The CLP surgery (~10 min) was achieved under general anesthesia (Isoflurane, 4% for induction in inhalation chamber, then maintained during the surgery at 1.5% with 98.5% oxygen). Mice were placed on a heating pad to maintain the body temperature at 37°C during the procedure. Absence of reaction to leg and tail pinch was checked before incision of the abdominal wall previously cleaned with ethanol 70%, and then incision of the peritoneum. Caecum was exposed and a loose ligation was achieved at its external third with Mersilk 4.0 (Ethicon, Cincinatti, USA). Two transfixing punctures were performed avoiding blood vessels with a 21G needle. Feces were expressed and spread on caecum before suturing abdominal muscles and peritoneum in two separate plans. Buprenorphine and saline SC injections were then performed every 12 hours until complete recovery. We evaluated sepsis severity every 12 hours for 72 hours using the sepsis score, which evaluates the clinical signs of local (abdominal spasm) and systemic reaction to sepsis (rectal temperature, fur erection, abnormal breathing), the behavioral changes (feces cleaning, presence of periocular dried eye drop, incomplete palpebral opening, spontaneous activity in the cage, the escape attempt after tail grabbing) and muscular weakness (ability to grip to forceps, body tone, difficulty to walk). Each item of the scale was scored 0 or 1, with a total score range from 0 (normal) to 12 (highly severe). For ethical

reason, mice with a sepsis score  $\geq 6$  and a temperature  $\leq 35.3^{\circ}\text{C}$  were euthanized. CLP mice were compared either to Sham animals, that only underwent a laparotomy procedure with the same anesthetic and analgesic protocol than CLP mice, or to control naïve animals that only underwent the same anesthetic and analgesic protocol than CLP mice. CLP, sham and control surgery were performed in the morning (Zeitgeber time 3-5). Significant variability in the sepsis score was observed using such CLP protocol. Variability factors include surgical procedure itself, but also the microbiota and the digestion state of the animals at the time of the surgery. To avoid this variability as much as possible, CLP surgeries were carried out by the same experimenters following the similar protocol at the same period of the day and into the same animal facility. Compared to previous works, the mean features of our CLP protocol are that it is performed on a heating pad under isoflurane anesthesia (which allows a very rapid awakening of the animal), and under analgesia with buprenorphine without any other post-surgical treatment such as antibiotics. Mice were kept warmed-up by the heating pad and regularly injected with buprenorphine and saline during the 72 hours following surgery. The final lethality of the CLP protocol was approximately 50%.

**Stereotaxic injections.** Mice were transported to the room where the surgery was performed and underwent a SC injection of buprenorphine (0.1mg/Kg, Buprecare, Axience, Pantin, France) and saline (NaCl 0.9%) 30 minutes before anesthesia. Mice were anesthetized with an intra-peritoneal (IP) injection of xylazine (10mg/Kg, Rompun 2%, Bayer, Leverkusen, Germany), and ketamine (50mg/Kg, Imalgene, Merial, Lyon, France) and then placed on a heating pad to maintain body temperature at  $37^{\circ}\text{C}$ . Stereotaxic injections of viral vectors in adult mice were performed as previously described (44). Briefly, the animal's head was inserted into a stereotaxic frame (David Kopf Instruments). Following local anesthesia (lidocaine, Xylovet, France), the animal's head was shaved, the scalp sterilized with an iodine solution and cut to reveal the skull. Small craniotomies were drilled and the tip of the pulled glass pipettes (tip diameter,  $\sim 30\text{-}50\ \mu\text{m}$ ) of the injection system (Nanoinject II, Drummond) were slowly lowered to the target

coordinates. AAV9-hSyn-FLEX-ChrimsonR-TdTomato-WPRE (Penn vector core,  $4.5 \cdot 10^{12}$  vg/mL, 100nL injected bilaterally, speed: 1nL/sec), AAV9-hSyn-FLEX-GFP-2A-Synaptophysin-mRuby-WPRE (Addgene plasmid 71760; production by the Vector core of the Gene Therapy Laboratory of Nantes, INSERM UMR1089,  $5.5 \cdot 10^{12}$  vg/mL, 100nL injected bilaterally), AAV9-Syn-FLEX-GCamp6F.WPRE.SV40 (Addgene 100833,  $3 \cdot 10^{13}$  vg/mL, 50nL injected bilaterally), AAV5-hSyn-DIO-mCherry-WPRE (Addgene 50459,  $2.5 \cdot 10^{13}$  vg/mL, diluted 1:5 in Saline 0.9%, 50nL injected bilaterally), AAV5-hSyn-DIO-hM4D-mCherry (Addgene 44362,  $4.5 \cdot 10^{12}$  vg/mL, 50nL injected bilaterally), AAV5-hSyn-DIO-hM3D-mCherry (Addgene 44361,  $5 \cdot 10^{12}$  vg/mL, 50nL injected bilaterally), pAAV-synP-FLEX-splitTVA-EGFP-B19G (Addgene 52473,  $1 \cdot 10^{13}$  vg/mL, 50nL injected bilaterally) or (EnvA)SAD- $\Delta$ G-mCherry (provided by Karl-Klaus Conzelmann,  $10^9$  vg/ $\mu$ l, 50nL injected bilaterally) were injected in the CeA (from bregma, AP: -1.25, ML:  $\pm 2.85$ , DV from brain surface: -4.0). AAVretro-EF1a-mCherry-IRES-Cre (Addgene 55632,  $1.4 \cdot 10^{12}$  vg/mL, 100nL injected bilaterally), AAVretro-PGK-Cre (Addgene 24593,  $2 \cdot 10^{13}$ vg/ml, 100nL injected bilaterally), AAV9-hSyn-GCaMP6f-WPRE (Addgene 100837,  $2 \cdot 10^{13}$ vg/ml, 100nL injected bilaterally) or CTB A647 (Invitrogen C34778, 1mg/mL, 300nL injected bilaterally) was injected in the vBNST (AP: +0.2, ML:  $\pm 1.0$ , DV: -4.2). Injection in the vBNST encompassed the lateral and medial part of the vBNST below the anterior commissure (45), with the commissure limiting the diffusion of the virus to dorsal regions of BNST. CTB A568 (Invitrogen C34777, 1mg/mL, 300nL injected bilaterally) was injected in the SI (AP: -0.3, ML:  $\pm 1.9$ , DV: -5.0 from brain surface). At the end of the injection, the skin was sutured and then sterilized with iodine solution. The animal was left to recover and then transferred back to its home cage. Animals in which post-hoc histological examination showed that viral injection were not in the correct location were excluded from analysis.

**EEG and amygdala local field potentials (LFP) recordings.** Following analgesia (buprenorphine, 0.1mg/kg SC) and anesthesia (ketamine and xylazine, 50 and 10 mg/kg, respectively, IP), mice were placed into a stereotaxic frame (David Kopf Instruments). Following craniotomy, two EEG silver-wire electrodes (250 $\mu$ m silver wire with a 1mm ball tip head, A-M systems Inc.) were implanted

epidurally above the dorsal hippocampus (from bregma, AP: -2 mm, ML: -1.5 mm), two reference electrodes implanted on the occipital crest (250 $\mu$ m silver wire with a 1mm ball tip head), and two electromyogram (EMG) wire inserted between the neck muscles (280 $\mu$ m insulated silver wire), the six electrodes been previously soldered to a miniature eight-pin connector (Omnetics). For LFP recordings in the amygdala, a bipolar electrode (twisted 50 $\mu$ m coated-platinum wires, impedance 0.2-0.5M $\Omega$ , A-M systems Inc.) was lowered into the left amygdala, with the tip of the bipolar electrode positioned into the CeA (From bregma, AP -1.25, ML  $\pm$ 2.9, DV -4.15). The whole system was stabilized with a liquid bonding resin (Superbond, Sun Medical) and dental acrylic (Unifast). The animals were left in their individual cage to recover for 2 weeks. Mice were then habituated to the connection/disconnection of a flexible connection cable for several days and then continuously recorded within their individual cage for 3-5 consecutive days. Following this baseline recording, animals were disconnected, experienced just a general anesthesia/analgesia ( $\sim$ 10min isoflurane anesthesia), and were then immediately reconnected to the cable for a 24h recording. The day after, following a baseline recording, mice underwent a CLP surgery under anesthesia/analgesia ( $\sim$ 10min surgery performed at Zeitgeber time 4-5) and were then immediately reconnected to the cable. EEG, EMG and LFP signals were amplified ( $\times$ 1000, 0.1-300Hz, WPI) and sampled (Micro1401-3 A/D interface, CED, UK) at 1kHz. The signals were filtered by a digital (FIR) filter (EEG: 0.1-30 Hz; EMG: 10-300Hz; LFP: 1-300Hz). For EEG/EMG, we extracted the EEG power spectrum for non-overlapping 3-hour epochs before and after the treatment. We computed the total power (0.1-100Hz), the ratio between the delta band (1-5Hz) power and the theta band (6-10Hz) power (delta/theta ratio), and the mean frequency in the theta-delta band (0.1-10Hz). Given the massive EEG alterations in both power and frequency after CLP, classical sleep scoring algorithms could not be used properly. As an alternative to evaluate total sleep time and sleep bout duration during the 6 hours post-CLP (compared to control recordings under just anesthesia/analgesia), we analyzed the EMG signal to extract all the time bouts the animals spent immobile for more than 20s, and then calculated the mean resting bout duration, the cumulative time the animal spent at rest and the cumulative time the animals spent in prolonged rest (more than 120s). For LFP

post-hoc analysis and epileptiform-like spike extraction, we applied spike detection (time window, -100ms; +300ms), spike sorting, spike clustering function and spike waveform analysis using Spike2 software (CED) followed by a manual adjustment of the clusters. Using this analysis, we could extract stereotyped epileptiform spikes —characterized by a fast and sharp spike (~50msec; 50-100 $\mu$ V) followed by a slow wave-like component, which clearly distinguished from the background activity— and excluded most electrical/movement artifactual events. Investigators were not blinded to the group identity, but automatic analysis routines were performed with the same script executed for each experimental group.

**Tamoxifen-inducible recombination.** Three hours after CLP, we injected 4-hydroxy-tamoxifen (1 mg/Kg diluted in saline with 2.5% DMSO, 2.5% Kolliphor). Half the amount of tamoxifen was administered SC, the other half IP. The control mice were injected with a vehicle solution without 4-hydroxy-tamoxifen (Saline with 2.5% DMSO, 2.5% Kolliphor).

***In vivo* calcium imaging with fiber photometry.** Following the injection of the GCaMP6f-expressing viral vector, optic fibers (multimode,  $\emptyset$  430 $\mu$ m, NA 0.5, LC zirconia ferrule) were implanted bilaterally at the same injection coordinates and fixed to the skull with a liquid bonding resin (Superbond, Sun Medical) and dental acrylic (Unifast). Three weeks after implantation, neurons infected with GCaMP6f vector were chronically excited with a 473nm solid-state laser (Crystal Lasers) via a 430 $\mu$ m multimode optical fiber (output intensity < 0.1mW). The emitted fluorescence was collected by the same fiber, filtered through a dichroic mirror and a GFP-emission filter (452-490 nm/505-800 nm; MDF-GFP, Thorlabs), filtered (525  $\pm$  19 nm), and then focused on a NewFocus 2151 Femtowatt photodetector (Newport). Blue light reflected in the light path was also filtered and measured with a second amplifying photodetector (PDA36A; Thorlabs). The signals from the two photodetectors were digitized by a digital-to-analog converter (Micro3 1401, CED, UK) at 5000 Hz and then recorded using Spike2 software (CED, UK). For light-stimulation of ChRimson-expressing axon terminals coupled in GCaMP6f recordings, red light (589 nm, 10 mW, pulse duration: 15ms) was collimated in the recording optic fiber to selectively activate ChRimsonR-

expressing axon terminals while GCaMP6f was independently excited with low blue light intensity ( $< 0.1$  mW), thereby avoiding cross-excitation of Chrimson. Mice were progressively habituated to the bilateral connection of two flexible optical patchcord cables (Doric Lenses Inc, Quebec) within their individual home cage. Recordings were made *in situ* in the home cage 4 h before and up to 24 h after surgery (CLP or sham). For each animal, we also performed a control recording before and after general anesthesia without surgery (10 min of Isoflurane 4% induction followed by 10 min maintained at 1-1.5% with 98.5% oxygen). Recordings with low fluorescence signals (mean fluorescence  $< 0.2$  mV and/or spontaneous events in  $\Delta F/F < 1\%$ ) or displaying movement/laser artefacts (visible in the reflected blue light channel) were discarded from the analysis. For analysis of fluorescence signals, the raw GCaMP6f signal traces from each detector were first smoothed (smoothing window = 0.02s) and then used to calculate a continuous  $\Delta F/F$ , defined as  $[F(t) - F_0(t)]/F_0(t)$ , where  $F(t)$  is the raw smoothed GCaMP6f signal trace and  $F_0(t)$  is the mean fluorescence intensity within sliding window (10s) centered on time  $t$ . To extract spontaneous calcium transient with the same threshold in all individuals independently of their  $\Delta F/F$  amplitude, we also calculated a z-score-normalized fluorescence  $F'$ , defined as  $[F(t) - F_0(t)]/\sigma(t)$ , where  $\sigma(t)$  is the standard deviation of the  $F(t)$  signal in a sliding window (100s) centered on time  $t$ . From this z-score-normalized fluorescence  $F'$ , all the events above 3SD were automatically extracted with custom scripts (Spike2, CED, UK; minimum time interval between events, 0.2s) and the peak amplitude of each event was then extracted from the  $\Delta F/F$  signal. The frequency of the sorted spontaneous events was then reported as the number of events per unit of time (30 min) and normalized to the 2-hour baseline activity before treatment (baseline set to 1). For the mean fluorescence analysis, the raw GCaMP6f signal traces were down-sampled (0.5Hz), smoothed (100s), averaged every 30 min and normalized to the 2-h baseline mean fluorescence before treatment. Investigators were not blinded to the group identity, but automatic analysis routines were performed with the same script executed for each experimental group. Animals in which post-hoc histological examination showed that viral injection or implanted optic fiber were mislocated were excluded from further analysis.



**Pharmacology.** Clozapine-N-oxide (C0832; Sigma-Aldrich, resuspended in 0.9% NaCl saline, 1mg/kg) was injected IP at H0, H6, H12, H24, H30, H36 and H48, according to the experiment. Levetiracetam (UCB, resuspended in 0.9% NaCl saline, 300mg/kg) was injected IP at H0, H12, H24, H36 and H48 post-CLP.

**Behavioral experiments.** Behavioral assays started 15 days after CLP. For each experiment, mice were transported in their home cage to the experiment room 45 min prior experiments. A 100-lux light was used, and mice were tracked with a JVC lowlux camera (Yokohama, Japan) fixed to the ceiling above the arenas. The same experimenter blinded to the experimental treatment analyzed the videos with ethovision XT (Noldus, Wageningen, Netherlands).

**Openfield.** Open field arenas were composed of four opaque 50x50x50 cm squared cages without bedding, disposed in a 2x2 rectangle. Spatial cues consisted in three vertical lines or a triangle of green labeling tape onto opposing north and south walls. Mice were released in the center facing a given wall and were allowed to freely move and explore the cage for 15 min. Total distance moved (cm), mean distance to center (cm) and time spent moving (s) were computed from tracked videos with ethovision XT software.

**Novel object location / Novel object recognition (NOL/NOR).** NOL/NOR arenas were the same arenas as used in the open field. Animals were habituated to the behavioral arena for 3 days (15 min the first day and then 10 min per day the next 2 days) before beginning the object training. On the third day, after the last habituation period, training phase of the novel object location (NOL) protocol was started: Two identical objects (either two 50mL falcon tube caps or two four-plot yellow Lego Duplo bricks) were placed on one side of each arena. At the beginning of the trial, the mouse was placed facing the middle of the wall opposite to the objects. During two 10-min training sessions, mice got familiarized with the objects —sessions being separated by an inter-trial interval of 1 h. One hour after the last habituation phase, the novel location task trial was started after moving one object to the opposite corner. Mice were placed into the arenas for 10 more min. Training phase for the novel object recognition (NOR) began immediately after the NOL trial. Mice explored freely the arenas for 10 more min after the two

objects were placed in their original location. 24 h later, one of the objects was substituted with a different one (for instance, one of the two 50mL falcon tube caps by a four-plot yellow Lego Duplo brick and vice-versa). For both tests, the time spent with each object (old and new locations or old and new objects) was recorded during a 5-min test period. Mice were considered exploring when obvious signs of directed attention were observed (i.e. sniffing or prolonged observation). Time spent on top of the objects was not counted, unless the mice showed simultaneously a direct attention to the object. For NOL and NOR experiments, the discrimination index was calculated by dividing the time (in seconds) spent exploring a new object (or new location) by the sum of the time (in seconds) exploring the familiar and new objects (or location).

**Light/dark box.** Light dark box (LDB) arena consisted in two joint equal-size arenas, a white and opened one and black and covered one, communicating through an opened door of a mouse size. Mice were placed at the beginning of the test in the light arena and were recorded during a 6-min trial. The percentage of time spent in the light arena was calculated with the ethovision XT software.

**Olfactory habituation.** Mice were habituated to a transparent cage with perforated aluminum soil without bedding (46x24x20cm) for 20 minutes before the test. Paper filter soaked with 10 $\mu$ l of amyl acetate (1% in Mineral Oil, Sigma-aldrich) were presented lying on a parafilm® sheet for 2 min, three times, with an intertrial interval of 2 min. Mice were considered sniffing when their nose was directly above the filter paper. On the fourth trial, a new odor (10 $\mu$ l of eugenol, 1% in Mineral oil, Sigma aldrich) was presented for 3 min. The sniffing times between the fourth and the third trial were then compared. For each mouse, each investigation time was normalized to investigation time during the first odor presentation.

**Morris water maze.** Morris water maze task was performed in a 120 cm-water tank filled with opacified water (white painting, Crayola, Easton, USA) maintained at 21 $\pm$ 1°C during the experiment. Spatial cues (triangle, circle, rectangle, cross) were disposed at each cardinal point. A circular platform (11cm) was placed in the southwest quadrant 2 cm above water level for the two first trials of the first day,

and then 2 cm below water surface for the all-remaining trials. The test encompassed a training period and a probe trial. The training period consisted of four trials per day until the learning was considered satisfactory (see below). To avoid track memorization, mice were released in the water tank at a different position from one trial to the other, always facing the closest wall. Trial was stopped when the mouse found the platform and, if not, systematically after 60 s from the release. Mice were allowed to stay 10 s on the platform before placing them back in their home cage. When mice failed to find the platform, they were placed on it for 10 s. For each trial, the latency before reaching the platform (s), path length (cm) and time spent in each quadrant (s) were computed. When latency before reaching the platform was < 20 s, learning was considered completed and the probe trial test was then achieved 24 h later. During the probe trial, the platform was removed, and mice were released in the quadrant opposite to the previous site of the platform. Time spent in the quadrant where the platform was placed was then calculated. Ethovision XT and MUST-C algorithm were used to analyze individual mice track and strategy to reach the platform site. MUST-C provides an unbiased classification and scoring of the strategy used to find the platform from highly cognitive to non-cognitive strategies (6/6=direct, 5/6=corrected, 4/6=focused search, 3/6=circling, 3/6=accidental circling, 3/6=chaining, 2/6=random, 1/6=thigmotaxis and 1/6=passivity)(46).

***Auditory and contextual fear conditioning.*** For the fear conditioning (FC), mice were individually placed in a homemade electrifiable grid floor Plexiglas arena (20x15cm) contained in a sound-proof box connected to a constant-current (DC) shock generator (Supertech instruments, Switzerland) and equipped with a camera and an audio speaker. Before each conditioning session, cage was washed with Surfa'safe® premium (Anios, Lille). After a 3-minute habituation period, mice underwent two sequences of a 28-second 2.5 kHz tone (conditional stimulus (CS), repetition frequency: 440 Hz, 75 Db) followed by a 2-s electric shock (0.4 mA, unconditional stimulus (US)) separated by a 15-s silence period, then followed by a 1-min resting period. Movement following shock was monitored through a camera placed above the arena. Fear recall was performed 24 h after conditioning. The conditioning and the contextual recall environment were identical. Mice behavior was recorded for 3 minutes. Immediately after the contextual exposure

trial, the auditory exposure trial was started. Mice were moved to a different 20x20 cm cage, with a smooth floor (Plexiglas) and different olfactory cue (as the cage was washed with ethanol 75% and odorized with amyl acetate 1%). After a 2-min habituation time, mice were exposed for 2 min to the 2.5kHz unconditional auditory stimulus (repetition frequency: 440 Hz, 75 Db). For the contextual and the auditory fear recalls, live freezing time was evaluated. Freezing was defined as the absence of movement except for breathing. A blind second evaluation of the freezing time was achieved based on the videos recorded during the sessions. Animals not showing proper active avoidance during the two consecutive foot shocks were discarded from the analysis (<5% of animals).

***Fear extinction.*** For auditory fear extinction, mice were exposed immediately after auditory recall to a series of ten 30-s conditional auditory stimuli (2.5kHz, repetition frequency: 440Hz, 75 Db), separated by an inter-trial period of 15 s in the same cage context as the auditory fear recall. Auditory fear retention was tested 48 hours later with a series of two 30-s conditional auditory stimuli. For contextual fear extinction, mice were placed 3 min in the contextual fear recall context every 24 h for 5 consecutive days starting the day after contextual fear recall. Contextual fear retention was tested 48 h after the last extinction session. For each trial, a camera recorded mice behavior. A double-blind evaluation of the freezing time was achieved live and then post-hoc using the videos.

***Fear generalization.*** One week after fear conditioning and extinction sessions, a second fear conditioning trial was achieved with two sequences of 28-s 2.5 kHz tone (CS, repetition frequency: 440 Hz, 75 Db) followed by a 2-s electric shock (0.8 mA, US) in an original context (context A: original shape Plexiglas arena with red tape and a new odorant atmosphere with limonene scent). 24 h after conditioning, mice were placed for 5 consecutive 3-min trials successively in context A, context B (different 20x20 cm cage, with a smooth floor in plexiglass but same olfactory cue ([+]-limonene)), context C (same cage as context B but without the odor, with an auditory 7.5 kHz CS), context D (same cage as context B but with a new odor ([-]-carvone)), and context A again to measure extinction. Each 3-min context exposure was separated by an intertrial period of 1 min where the mouse was placed in its home cage. For each trial, a camera recorded mice

behavior. A double-blind evaluation of the freezing time was achieved live and post-hoc using the videos.

**Immunohistochemistry.** Mice were euthanized by an intra-cardiac infusion of 0.9% NaCl and 4% Formol under deep anesthesia (xylazine 20 mg/kg, ketamine 100 mg/kg). Brains were extracted with forceps after incision of the skin and medial section of the skull with fine scissors. Brains were post-fixed with Formol 4% over night at 4°C (or only 2 hours for c-fos labelling), then rinsed with phosphate buffered saline (PBS) before being stored in PBS with 30% sucrose. Brains were then coronally cut into 60 µm thick sections with a freezing microtome (Leica). The sections of interest were stored in PBS with 0.01% Azide. The immuno-labelling protocol begun with a permeabilization step using PBS with 0.2% Triton X-100 and 10% Normal Donkey Serum (NDS, Abcam, Ab7475) blocking agent (or Normal Goat Serum, NGS, Abcam, Ab7481; depending on the experiments) for 2 hours under constant agitation. Primary antibodies diluted according to the supplier's recommendations were then incubated with PBS with 0.2% triton (PBST), NDS 10% (or NGS) and azide 0.01%, at 4°C with constant agitation for a variable duration (between 1 and 4 days). Primary antibodies used were PKCδ (1:1000, Mouse, BD Biosciences, 610398), SOM (1:500, Goat, Santa Cruz, Sc-7819), c-fos (1:1000, Rabbit, Santa Cruz, Sc-52/Ch; 1:1000, Rabbit, Abcam, Ab190289), GFP (1:500, Chicken, Abcam, Ab13970) and RFP (1:4000, Rabbit, Rockland, 600-401-379). After three 5-minute washes with PBS, sections were incubated with either Alexa Fluor 488, 568 or 647-conjugated secondary antibodies (Invitrogen, ThermoFisher) with PBST 0.2%, NDS 2% (or NGS 2%) and DAPI (0.01%) at room temperature with constant agitation for 2 hours. After three 5-minute washes with PBS, slices were mounted on slides with a mounting medium (FluoroMount-G, Interchim). Image acquisition was carried out either with an apotome microscope (ZEISS), a confocal microscope (LSM 700, ZEISS) or a digital slide scanner (Axio Scan, ZEISS), according to the experiments. c-fos quantification was achieved using the “spot detection” function of ICY software (Institut Pasteur, France Bioimaging), allowing to count the number of c-fos+ cells in brain areas previously drawn on the slides' images via the ROI (Region of interest) function of the same software. For analysis of rabies virus-labeled

neurons, 60 $\mu$ m-thick coronal sections were cut and one section out of three was serially collected for RFP/DAPI staining before mounting. We analyzed sections from the anterior insular cortex to the end of the brain stem, based on the Paxinos atlas (45). mCherry-positive somas were counted from all selected slices except for regions surrounding the rabies virus injection ( $\sim$ 300 $\mu$ m radius), due to the reported non-specific expression of virus at the site of injection (47). The fraction of total presynaptic neurons for each animal was obtained by dividing the number of mCherry+ somas for each brain region by the total number of somas counted in the entire hemisphere, to then produced a color-coded map. Regions with less than 1% of total cells were not further represented. All BNST sub-regions were pooled, except the Oval Nucleus (ON).

**RNA Purification and quantification by qPCR.** Whole brain for RNA analysis was collected in liquid nitrogen and stored at -80 $^{\circ}$ C before processing. Tissues were thawed in 1mL of Qiazol (Qiagen, Nederland) then shredded using a TissueLyzer II and metallic beads (Qiagen, Nederland). Two hundred microliters of chloroform (Merck, Darmstadt, Deutschland) were added before spinning for 15 minutes at 4 $^{\circ}$ C, 20000 g. The upper aqueous phase was collected for RNA purification and quantification. Total nucleic acid from the whole brain were purified using RNEasy Minikit with a DNase step (Qiagen, Nederland) to remove any remaining genomic DNA. Purified RNA was quantified and a reverse transcription on 500 ng of RNA using SuperScript $^{\circledR}$  II Reverse Transcriptase (Life Technologies) was performed. qPCR amplification was achieved on 500pg of cDNA using StepOne Plus RealTime PCR system (Applied Biosystemes) and Sybr Green PCR select master mix (Roche, France). Cycling conditions were 50 $^{\circ}$ C for 2 minutes, 95 $^{\circ}$ C for 10 minutes, and 40 cycles of 95 $^{\circ}$ C for 15 seconds and 60 $^{\circ}$ C for 1 minute. All experiments were performed in triplicates. The relative abundance of amplified cDNA was calculated as  $2^{-\Delta Ct}$ , where  $\Delta Ct$  (change in cycle threshold) equals  $Ct$  in the target gene minus  $Ct$  in the control gene. Results are expressed as the ratio of  $2^{-\Delta Ct}$  from the tested group to the control group. For the data presented in SFig.1.m, mice were perfused with 20 mL of PBS under deep anesthesia (xylazine 20mg/kg, ketamine 100mg/kg). The brain was quickly removed and cooled down in cold PBS. Then a 2mm $^2$  fragment containing the amygdala was cut.

The region of interest was immediately put in RNA lysis solution and kept at 4°C until processing. RNA extraction was performed following the PureLink RNA Mini Kit protocol (ThermoFischer). cDNA synthesis was done using SuperScript IV (ThermoFischer) according to the manufacturer's instructions. Real-time quantitative PCR was performed using SybrGreen and primers from BioRad. Ct values were normalized to the mean Ct obtained with Gapdh and Hsp90 as housekeeping genes.

**Cytokine multiplex.** After blood collection in 1.5 mL tubes (Eppendorf), serum was obtained with centrifugation for 10 min at 9000g, immediately frozen in dry ice and stored at -80°C until assay. Cytokines and chemokines were measured using Bio-Plex magnetic bead fluorescence measurements. Bio-Plex pro Mouse Cytokine Standard 23-Plex Group 1 kit (BioRad, California) was used following manufacturer's recommendations, which allow measurement of Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-17A, KC, MCP-1 (MCAF), MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, TNF. Cytokines' concentrations were normalized to the total protein concentration in each serum aliquot. Cytokines which did not reach the level of detection were not included in the analysis.

**Statistical analysis.** All experiments and data analyses were achieved blinded, unless otherwise stated. In the figures are indicated the number of subjects used in each experimental condition and the data are expressed as mean  $\pm$ SD (or  $\pm$ SEM if stated). Two-sided statistical analyses were performed with GraphPad Prism 6.0. No statistical methods were used to pre-determine sample size, or to randomize. Samples normality was previously tested using D'Agostino & Pearson omnibus normality test. For comparison of two means tests, Unpaired t-test was used if the sample passed normality test, with Welch's correction if the compared groups' standard deviations were significantly different. If the sample did not pass the normality test, we used Mann Whitney test. For analysis of variance tests, we used ANOVA tests. In behavioral experiments, outliers were identified using Grubbs' Method ( $\alpha=0.05$ ) and then removed. For correlation analysis, we use Pearson test. Statistical significance was set at \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001.

**Data availability.** The datasets generated during the current study as well as the custom code used to analyze the data are available from the corresponding authors upon reasonable request.

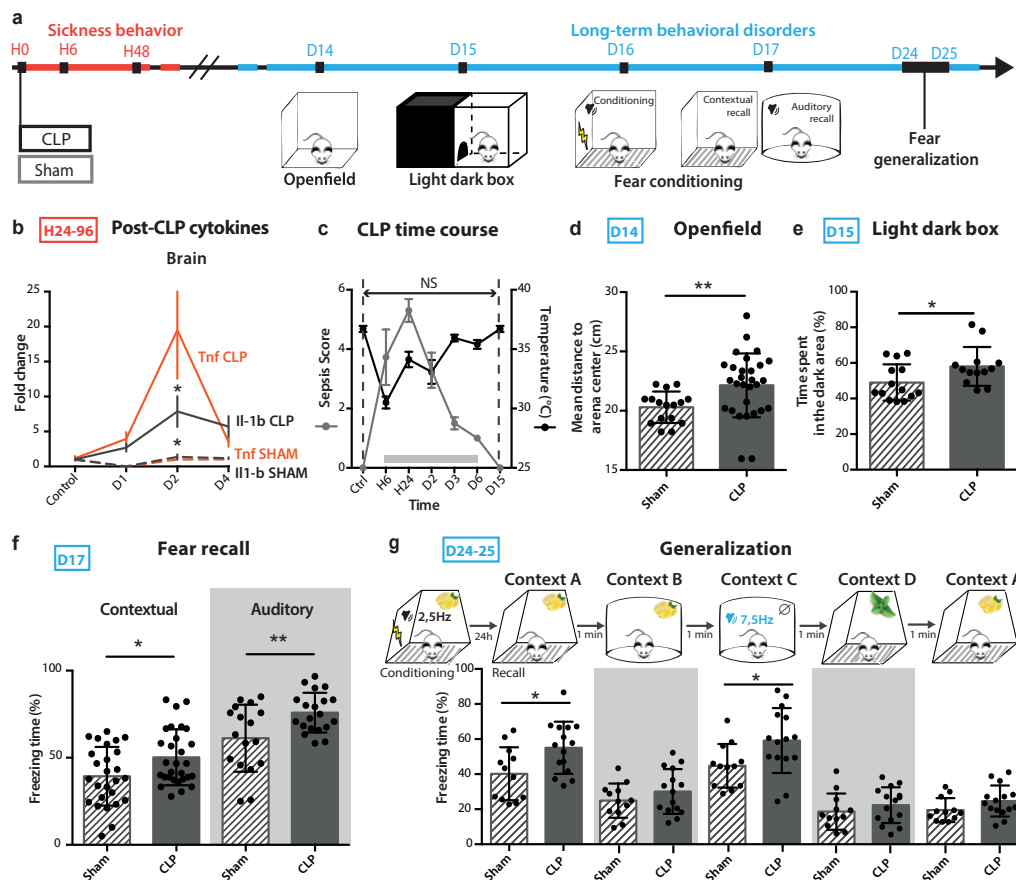


## Results

### **CLP mice develop long-term anxiety and PTSD-like conditioned fear expression.**

To assess the neurobiological mechanisms of long-term behavioral disorders following sepsis, we used the validated murine model of sepsis induced by peritonitis after CLP (26). We confirmed that this model reproduces the major features of human sepsis, including a severe systemic and brain inflammatory response and transient neuroinflammation as assessed by increased expression of circulating cytokines and brain mRNA coding for IL-1 $\beta$  and TNF (Fig.1b, SFig.1a). CLP was also associated with sickness behavior (Fig.1c), sleep alterations characterized by sleep fragmentation with frequent arousal (26, 27) as well as EEG abnormalities, characterized by slower rhythms and power decrease (SFig.1c). This EEG feature is classically observed in human sepsis patients (5) and is thought to be a consequence of the sepsis-induced decrease of cerebral blood flow and metabolism (48). CLP lethality was approximately 50% (SFig.1b). A sepsis score using clinical and behavioral criteria was set to regularly evaluate over time the symptoms developed post-surgery. CLP mice were compared to sham animals, that only underwent a laparotomy procedure with the same anesthetic and analgesic protocol as CLP mice, or control naïve animals that only underwent the same anesthetic and analgesic protocol. Fifteen days post-CLP (D15), mice that recovered from sepsis showed no sign of remaining sickness behavior (Fig.1a-c, SFig.1a). However, these mice displayed enhanced anxiety, with a significant avoidance of the arena center in the open field test (OF; Fig.1d) and an increased time spent in the dark arena in the light/dark box test (LDB; Fig.1e) when compared to sham mice. In addition to anxiety-like spontaneous avoidance behaviors, we also assessed fear memory in CLP recovered mice using a contextual and auditory fear conditioning paradigm (FC), in which an electric foot shock (aversive unconditional stimulus, US) is paired with a discrete auditory cue in a specific context (conditional stimulus, CS) (23, 49). Twenty-four hours after the acquisition phase, we monitored the fear memory retrieval, assessed by context- or tone-induced freezing behavior. CLP mice showed an increased freezing time in both the contextual and auditory recalls (Fig.1f), despite exhibiting a similar

behavior than sham animals during the acquisition phase (SFig.1f). This facilitated freezing response was also detected for auditory stimulus that had not been previously paired with the CS (Fig.1g). On the contrary, contextual fear generalization was similar to sham animals (Fig.1g), indicating that CLP mice display only a partial fear generalization to auditory cues. We observed only a limited deficit in fear extinction, with a non-significant trend toward higher freezing responses in CLP mice tested for short-term spontaneous recovery of fear retention following repeated presentations of the CS (SFig.1g).

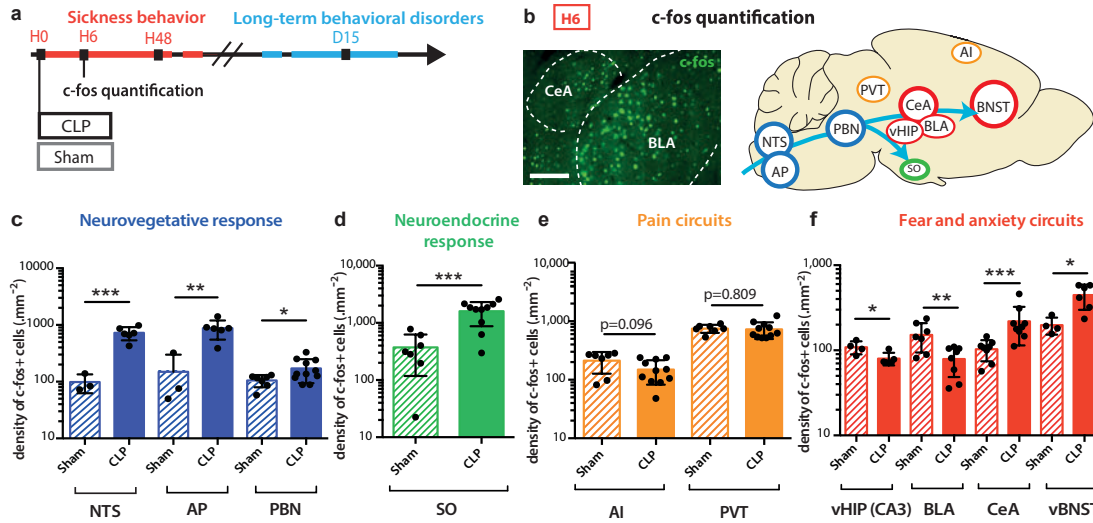


**Figure 1. CLP mice developed long-term anxiety and PTSD-like conditioned fear expression.** **a.** Timeline of the experiment: long-term anxiety and fear-related behaviors were tested from 2 weeks post-surgery. **b.** Brain cytokines levels were significantly increased post-CLP ( $n_{control}=5$ ,  $n_{D1-sham}=1$ ,  $n_{D1-CLP}=5$ ,  $n_{D2-sham}=4$ ,  $n_{D2-CLP}=8$ ,  $n_{D3-sham}=5$ ,  $n_{D3-CLP}=5$ . Il1-b: group  $F_{(1,30)}=2.931$ ,  $P=0.0972$ , D2:  $*P=0.0119$ ; Tnf: group  $F_{(1,30)}=7.354$ ,  $*P=0.0110$ , D2:  $*P=0.0141$ ). **c.** CLP-induced sickness behavior ( $n_{control}=9$ ,  $n_{CLP}=90$ ) was transient and totally disappeared at D15. **d.e.** CLP caused long-term anxiety behavior illustrated by an increased mean distance to arena center in the OF (**d**) ( $n_{Sham}=16$ ,  $n_{CLP}=23$ ,  $**P=0.0037$ ) and an increased time spent in the LDB dark area (**e**) ( $n_{Sham}=14$ ,  $n_{CLP}=13$ ,  $*P=0.0348$ ). **f.** 24 hours after aversive conditioning, CLP mice displayed an enhanced freezing behavior during both contextual and auditory FC recall (Contextual:  $n_{Sham}=27$ ,  $n_{CLP}=29$ ,  $*P=0.0176$ ; Auditory:  $n_{Sham}=18$ ,  $n_{CLP}=20$ ,  $*P=0.0108$ ). **g.** CLP mice showed an increased freezing behavior when confronted to stimuli partially related to the conditional stimulus in the generalization test ( $n_{sham}=12$ ,  $n_{CLP}=15$ , group,  $F_{(1,25)}=9.243$ ,  $**P=0.0055$ ; Context A,  $*P=0.0136$ ; Context C,  $*P=0.0183$ ). Statistics: **d.e.f.** Mann-Whitney test or unpaired t-test, **b.c.g.** Two-way ANOVA and Sidak's multiple comparison tests (gray bar when significant). Data shown as mean  $\pm$  s.d. H: hours post-surgery, D: days post-surgery.

These exaggerated fear responses did not result from a diminished pain threshold (monitored as motor reactivity to the shock, SFig.1f), and was not observed anymore 45 days post-sepsis (SFig.1h). In contrast to fear memory, CLP mice did not show any impairment of neither recognition memory —assessed by novel object recognition test (NOR; SFig.1j) and olfactory habituation-dishabituation tests (SFig.1k)— nor spatial contextual learning —assessed both by novel object localization (NOL; SFig.1j) and Morris water maze (SFig.1i). Lastly, long-term fear impairments at D15 positively correlated with the magnitude of the sepsis score (maximum score between H24-48), which also correlated with the brain expression level of cytokines and chemokines at H48 (SFig.1.l-m). Together these results demonstrate that 15 days after CLP-induced sepsis, mice exhibit both anxiety in spontaneous exploration tests and exacerbated PTSD-like conditioned fear response with partial fear generalization.

### **CLP induces transient brain activation.**

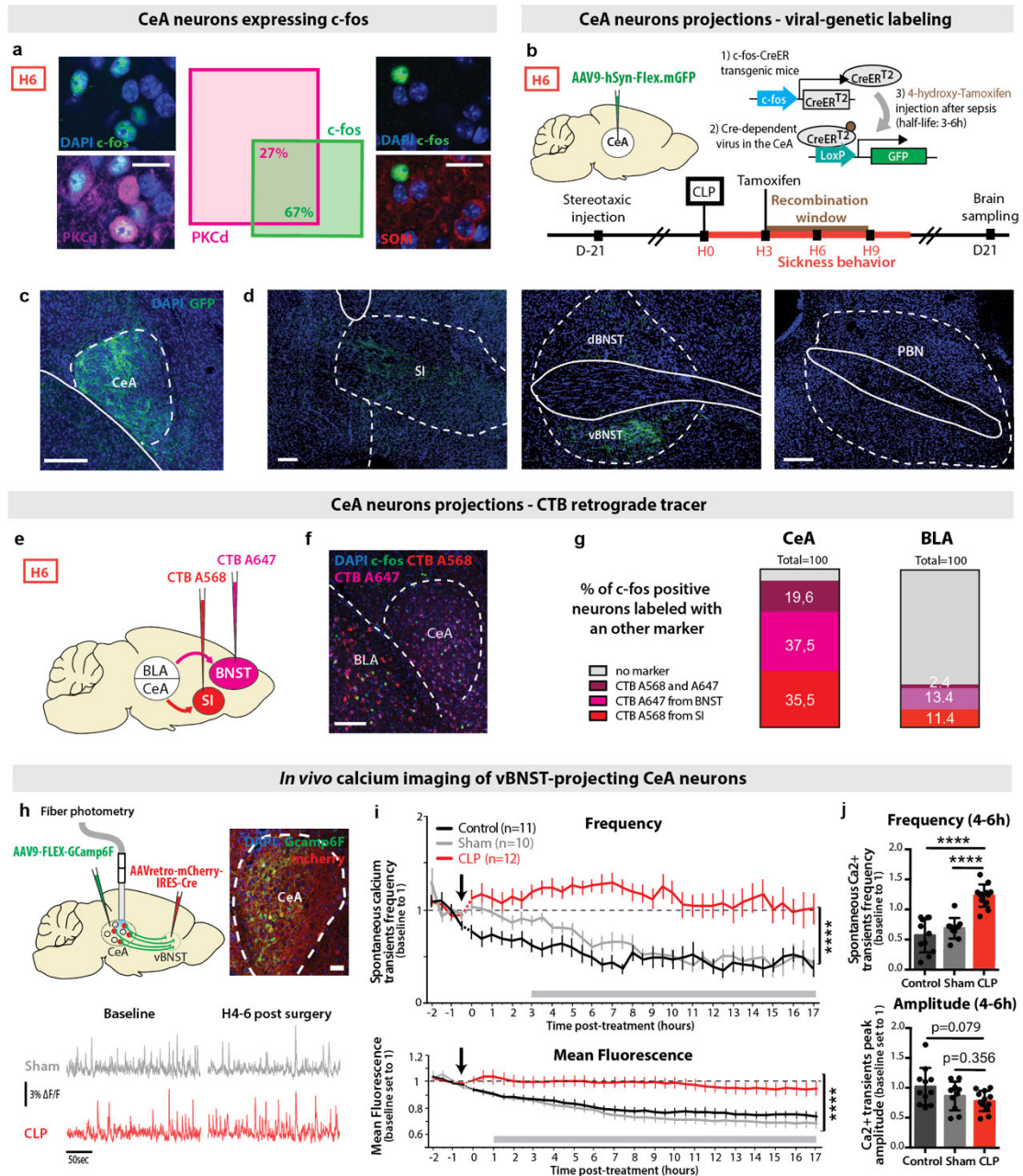
To decipher the origin of the sepsis-induced long-term behavioral alterations, we characterized the brain activity changes during the acute phase of sepsis. The expression level of the neuronal activation marker gene *c-fos* was monitored during the 24 h following sepsis (Fig.2a-b, SFig.2a). At 6 h (H6) post-CLP, *c-fos* expression was increased in nuclei of the autonomic, vagal and neuroendocrine systems such as the nucleus of the solitary tract (NTS), the area postrema (AP), the PBN and the supraoptic nucleus of the hypothalamus (SO) (Fig.2c-d). The lack of significant activation in areas strictly involved in pain perception, such as the paraventricular thalamus (PVT) and the agranular insular cortex (AI), rules out any contribution of nociception to the sepsis-induced brain activation (Fig.2e). Remarkably, high level of *c-fos* protein was observed in brain regions classically involved in fear and anxiety, with a transient activation in the CeA and the ventral BNST (vBNST), and decreased activity in the ventral hippocampus (vHIP) and the BLA (Fig.2f) (50). Those activated brain regions - converging on the CeA - are known to be involved in feedback loops orchestrating defensive behaviour (15, 16, 51). This activation pattern at H6 was transient and returned to baseline levels at H24 (SFig.2b-e).



**Figure 2. CLP induced transient brain activation.** **a.b.** Neuronal activation marker c-fos was quantified at H6 post-surgery (scale=200  $\mu$ m). **c.d.** H6 c-fos quantification showed transient neuronal activation in CLP compared to Sham mice in areas involved in the neurovegetative response (**c**) (Nucleus of the Solitary Tract (NTS):  $n_{sham}=3$ ,  $n_{CLP}=6$ , \*\*\* $P=0.0009$ ; Area Postrema (AP):  $n_{sham}=3$ ,  $n_{CLP}=6$ , \*\* $P=0.0089$ ; Parabrachial Nucleus (PBN):  $n_{sham}=7$ ,  $n_{CLP}=12$ , \* $P=0.0255$ ) and the neuroendocrine system (**d**) (Supra-optic Nucleus (SO):  $n_{sham}=7$ ,  $n_{CLP}=10$ , \*\*\* $P=0.0003$ ). **e.** At H6, CLP showed no effect on the activation of pain related areas compared to Sham group (Agranular Insular Area (AI), Paraventricular Nucleus of the Thalamus (PVT)  $n_{sham}=7$ ,  $n_{CLP}=11$ ). **f.** CLP induced c-fos expression variations at H6 in areas involved in fear and anxiety circuits (Ventral Hippocampus (vHIP) Cornu Ammonis 3 (CA3):  $n_{sham}=4$ ,  $n_{CLP}=5$ , \* $P=0.0328$ ; BLA:  $n_{sham}=7$ ,  $n_{CLP}=8$ , \*\* $P=0.0079$ ; CeA:  $n_{sham}=8$ ,  $n_{CLP}=9$ , \*\*\* $P=0.0006$ ; vBNST:  $n_{sham}=4$ ,  $n_{CLP}=6$ , \* $P=0.0121$ ), Statistics: **c.d.e.f.** Mann-Whitney test or unpaired t-test. Data shown as mean  $\pm$  s.d.

## CLP triggers the activation of PKC $\delta$ <sup>+</sup> CeA neurons projecting to the vBNST and the Substantia Innominata (SI).

To further characterize the neuronal populations of the CeA transiently activated during sepsis, we performed co-immunolabelling with markers of CeA subpopulations. c-fos-positive (c-fos<sup>+</sup>) CeA neurons primarily expressed PKC $\delta$  and did not colocalize with SOM (Fig.3a). We then labelled these c-fos<sup>+</sup> neurons by injecting into the CeA a Cre-dependent GFP-positive adeno-associated virus (AAV) into transgenic mice expressing the tamoxifen-inducible Cre-recombinase enzyme under the control of c-fos promoter (42). Three hours after CLP, tamoxifen was injected, restricting the recombination window around H6 (Fig.3b). Labelled CeA neurons (Fig.3c) exclusively projected to the vBNST and the Substantia Innominata (SI) (Fig.3d, SFig.3a), two pallidal regions involved in emotional encoding (52–54). Labelled CeA neurons did not project to the other reported output regions of the PKC $\delta$ <sup>+</sup> CeA neurons, like PBN (Fig.3d, SFig.3a) (55).



**Figure 3. CLP triggered the activation of PKC $\delta$ <sup>+</sup> CeA neurons projecting to the vBNST and the Substantia Innominata (SI).** **a.** CeA c-fos<sup>+</sup> neurons at H6 post-CLP were 67% co-localizing with PKC $\delta$ <sup>+</sup> neurons, but 0% with SOM<sup>+</sup> neurons (n=6, total cell counted,  $n_{c-fos^+/PKC\delta^+}=301/453$ ,  $n_{c-fos^+/SOM^+}=0/144$ ; scale=20  $\mu$ m). **b.c.d.** Viral trapping of CeA c-fos<sup>+</sup> neurons at H6. **(b)** A cre-dependent GFP<sup>+</sup> AAV virus was injected in the CeA of transgenic mice expressing the tamoxifen-inducible Cre-recombinase enzyme under the control of the c-fos gene promoter. 4-hydroxy-tamoxifen was injected into these mice 3 hours after CLP for restricting the recombination window between H3 and H9 post-CLP. **(c)** Recombination site in the CeA (scale=200  $\mu$ m). **(d)** GFP<sup>+</sup> fibers only projected to the vBNST and the SI but not to other reported projection regions of CeA PKC $\delta$ <sup>+</sup> neurons such as the PBN (n=3, scale=200  $\mu$ m). **e.f.g.** CTB retrograde tracing. **(e)** CTB A568 was injected in the SI and CTB A647 in the BNST. Mice underwent a CLP surgery 5 days after stereotaxic injection and were sacrificed at H6. **(f)** representative picture of c-fos<sup>+</sup> staining and CTB labeling. **(g)** c-fos<sup>+</sup> neurons colocalized at 92.6% with retrograde CTB A568 and/or CTB A647 tracers in the CeA. In a control region such as the BLA, only 27.2% of the H6 c-fos<sup>+</sup> neurons were colocalizing with both CTB tracers (n=3, total cell counted,  $n_{c-fos^+}=173$  scale=200  $\mu$ m). **h.i.j.** *In vivo* calcium imaging of vBNST-projecting CeA neurons. **(h)** Gcamp6f specific expression and recordings in the vBNST-projecting CeA neurons (scale=50  $\mu$ m) before and after surgery (CLP, red; Sham, grey). **(i)** Post-surgery spontaneous calcium events frequency (top) and mean fluorescence (bottom) in the vBNST-projecting CeA neurons were higher in CLP compared to Control or Sham mice.../...

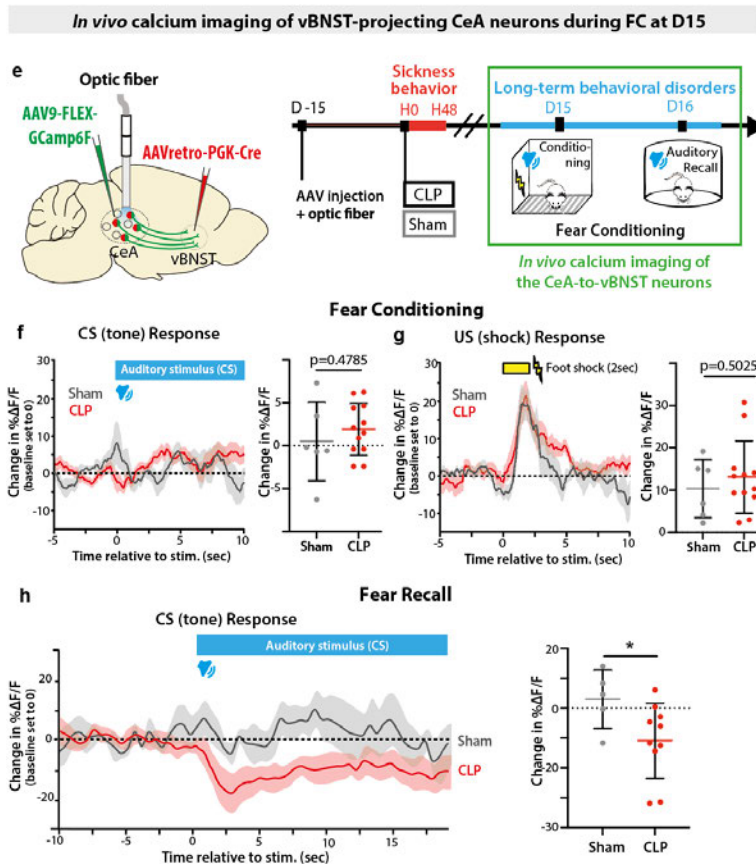
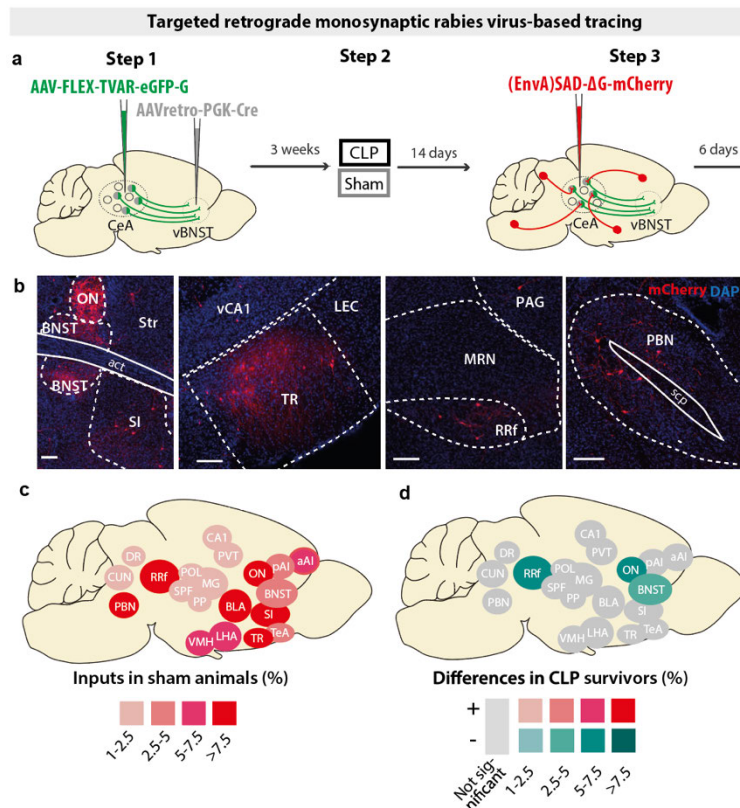
.../...(Frequency: interaction:  $F_{(76,1075)}=2.268$ ; group:  $F_{(2,1075)}=381.6$ , \*\*\*\* $P<0.0001$ ; Mean fluorescence: interaction:  $F_{(76,1107)}=1.602$ ,  $P=0.0011$ ; group:  $F_{(2,1107)}=336.1$ , \*\*\*\* $P<0.0001$ ). **(j)** Between H4 and H6 ( $n_{\text{Control}}=11$   $n_{\text{Sham}}=10$ ,  $n_{\text{CLP}}=12$ ), CLP mice (compared to Control or Sham animals) displayed a higher frequency of calcium events with a non-significant decrease in amplitude of those events. Statistics: **i.** Two-way ANOVA and Sidak's multiple comparison tests (gray bar when significant). **j.** Mann-Whitney test or unpaired t-test, \*\*\*\* $P<0.0001$ . Data shown as mean $\pm$ s.e.m (**i**) and mean $\pm$ s.d. (**j**).

To confirm these results, we retrogradely labeled CeA neurons projecting to the SI and BNST with two different retrograde cholera toxin B (CTB) tracers (Fig.3e-f) and observed that a vast majority of c-fos<sup>+</sup> CeA neurons at H6 post-CLP colocalized with these CTB markers (Fig.3g). Considering that vBNST is highly activated post-sepsis and is involved in anxiety-related disorders (25, 56), we targeted the expression of the fluorescent calcium reporter GCaMP6f in vBNST-projecting CeA neurons. For this, we injected in the vBNST a retrograde Cre-expressing virus and in the CeA a conditional Cre-dependent virus expressing GCaMP6f. Finally, we implanted an optic fiber above the CeA to chronically monitor the activity of vBNST-projecting CeA neurons before and after CLP (Fig.3h). CLP induced a rapid and sustained increase in the frequency of spontaneous population calcium transients as well as in the mean fluorescence intensity (Fig.3i), compared to sham and control animals. Corroborating the c-fos gene expression data, this effect was already visible at H4-H6 (Fig.3j). The increased frequency of calcium events following CLP was associated by a slight decrease in mean peak amplitude (Fig.3j). Altogether, these data revealed that brain regions involved in anxiety and fear expression are activated during the acute phase of sepsis, with an important activation of a subpopulation of PKC $\delta^+$  CeA neurons projecting to the vBNST. Given that in humans, epileptic discharges are observed in a significant proportion of sepsis patients, we also performed *in vivo* local field potentials (LFP) recordings in the CeA (SFig.3b). Following CLP, seizure or epileptic sharpwave discharges were absent in the CeA. However, the transient occurrence of some large isolated stereotyped epileptiform-like spikes was observed in 20% of the animals within 1 to 4 h following CLP, indicative of the potential emergence of focal epileptic-like abnormalities in the amygdala during the sepsis acute phase (SFig.3b-c).

## **CLP induces long-term alterations of synaptic connectivity and functional activity of vBNST-projecting CeA neurons.**

To better understand how sepsis imprinted durable anatomical and functional changes in brain circuits at D15, we investigated the impact of CLP on the presynaptic connectivity of the vBNST-projecting CeA neurons, using targeted retrograde rabies virus-based monosynaptic tracing. In this approach, we restricted the rabies infection only to vBNST-projecting CeA neurons with a retrograde Cre-expressing virus injected in the vBNST and, in the CeA, a conditional Cre-dependent ‘helper’ virus to express the avian-specific retroviral receptor (TVA) and the rabies glycoprotein. Three weeks later, injected animals were divided into two groups and experienced either CLP or sham surgery. Two weeks post-surgery, we injected a glycoprotein-deleted EnvA-pseudotyped mCherry-expressing rabies virus ((EnvA)SAD-ΔG-mCherry) that only infected neurons expressing TVA and spread only from cells expressing the glycoprotein. Six-days post-injection, we examined sections of the entire brain to quantify the location and the relative number of mCherry-positive neurons (Fig4a-b). To visualize the connectivity map of presynaptic neurons to vBNST-projecting CeA neurons, we generated a map of the relative proportion of each brain region in the control condition (showing regions with >1% total inputs). Labelled brain regions directly projecting onto CeA neurons were similar to those reported previously for PKC $\delta$ + CeA neurons (22), with major inputs originating from midbrain (PBN, retrorubral field (RRf)), cortical regions (BLA, AI, post-piriform transition area (TR)), hypothalamus (lateral hypothalamic area (LHA), ventro-medial hypothalamic nucleus (VMH)) and BNST (Fig4.c). By comparing CLP to sham mice, we established a map of the differential contribution of input regions. This brain map revealed which regions exhibit a distinct connectivity pattern at D15 post-CLP (relative to sham). We observed that BNST (including the oval nucleus (ON)) and the midbrain dopaminergic region RRf —two regions involved in threat and aversive signal processing— contained less labelled neurons in the CLP group (Fig4.d). In complement to this anatomical characterization, we investigated the functional activity of vBNST-projecting CeA neurons at D15 during behavioral tests.





**Figure 4. CLP induces long-term alterations of synaptic connectivity and functional activity of vBNST-projecting CeA neurons.** **a.** Experimental design for targeting mCherry-expressing pseudotyped rabies virus to CeA neurons projecting to the vBNST in Sham versus CLP survivors, two weeks after surgery. **b.** Trans-synaptically labelled neurons in different brain regions (scale=100 μm). **c.** Map of the brain regions providing the largest fraction of presynaptic neurons to the vBNST-projecting CeA neurons in Sham animals (relative to the total). Regions providing less than 1% of total inputs are not displayed (n=4). BNST included all BNST subdivisions except Oval Nucleus (ON). **d.** Map of the differences in presynaptic neurons to vBNST-projecting CeA neurons in CLP survivors compared to Sham survivors. Only regions showing significant difference are color-coded (n<sub>CLP</sub>=4, Mann-Whitney tests; BNST: \*P=0.028, ON: \*P=0.017, \*RRf: P=0.049). **e.** vBNST-projecting CeA neurons were chronically recorded during fear conditioning at D15 using fiber photometry. **f.g.** Averaged ΔF/F traces (baseline set to 0) showing the responses to conditioned stimulus (tone; CS) (**f**) and unconditional stimulus (foot shock; US) (**g**) during fear conditioning in CLP and Sham mice (n<sub>Sham</sub>=6, n<sub>CLP</sub>=12). Mean ΔF/F changes relative to baseline during CS response (0-5sec window) and during US response (0-4sec window) showed no difference between CLP and Sham mice. **h.** Averaged ΔF/F traces (baseline set to 0) during FC recall exhibited a stronger inhibitory response to CS in CLP mice compared to Sham animals (n<sub>Sham</sub>=5, n<sub>CLP</sub>=10, \*P=0.0426). Statistics: **d.f.g.h.** Mann-Whitney tests. Data shown as mean ± s.d. (except traces in **f.g.h.** ± s.e.m). pAI: posterior Agranular Insular cortex, aAI: anterior Agranular Insular cortex, BLA: Basolateral Amygdala, CUN: cuneiform nucleus, DR: dorsal raphe nucleus, LEC, lateral Entorhinal Cortex, LHA: Lateral Hypothalamic area, MG: medial geniculate nucleus, MRN: midbrain reticular nucleus, OV: Oval Nucleus, PAG: periaqueductal gray, POL: posterior limiting nucleus of the thalamus, PP: peripeduncular nucleus, Rrf: retrorubral field, SPF: subparafascicular nucleus, TeA: temporal association area, TR: post-piriform transition area, vCA1: ventral CA1, VMH, ventro-medial hypothalamic nucleus.



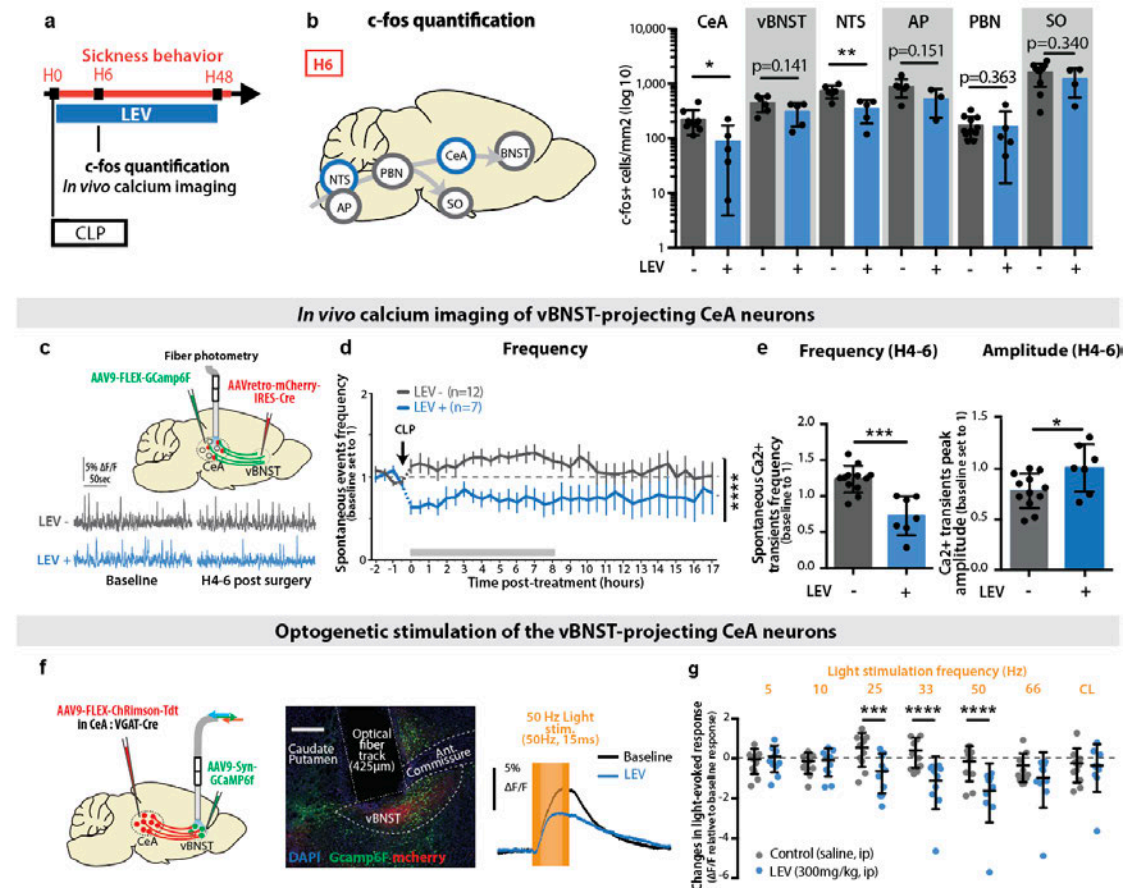
To express the calcium reporter *Gcamp6f* in the CeA neurons projecting to the vBNST, we used the same genetic design as described in Fig3 in both CLP and sham mice (Fig4.e). We performed *in vivo* fiber photometry recordings of those neurons during auditory fear conditioning and fear recall at D15 (Fig4.e).

During the learning phase, CeA neuronal activity did not significantly change in response to the auditory CS (Fig.4f), but exhibit a strong excitatory response to foot shock, without any difference between CLP and sham animals (Fig4.g). During fear recall, we observed that the CS induced a significant inhibitory response in CLP mice, compared to sham animals (Fig4.h) as previously reported in *PKC $\delta$* + CeA neurons (57). Thus, at D15 post-CLP, vBNST-projecting CeA neurons exhibited an altered synaptic connectivity and a marked responsiveness to CS.

### **LEV administration during sepsis suppresses the transient neuronal activation in vBNST-projecting CeA neurons.**

Considering that the acute brain response to CLP was characterized by the transient hyperactivation of specific circuits, associated with epileptic-like abnormalities, we hypothesize that the sepsis-induced transient activation of brain anxiety circuits could be responsible for the long-term PTSD-like condition fear expression. To test this hypothesis, and implement a potential preventive therapeutic approach aiming at alleviating the emergence of long-term anxiety-related behaviors (58, 59), we evaluated the effect of the neuromodulatory and antiepileptic drug LEV. To test its impact on sepsis-induced brain hyperactivation in our CLP model, we administered LEV by intraperitoneal injection immediately after surgery (Fig.5a). LEV administration at H0 prevented the transient neuronal *c-fos* gene expression observed at H6 in CLP mice specifically in the extended amygdala (CeA and vBNST) and the vagal system (NTS and AP) (Fig.5b) and had nearly no effect in control mice (SFig.4a). Analysis of the blood cytokines in CLP animals treated with LEV indicated that LEV had no peripheral anti-inflammatory effects (SFig.4b). *In vivo* calcium imaging of the vBNST-projecting CeA neurons showed that LEV suppressed the transient sepsis-induced increase in the frequency of spontaneous calcium transients while restoring the mean peak amplitude of these transients (Fig.5c-e). To further characterize the activity-

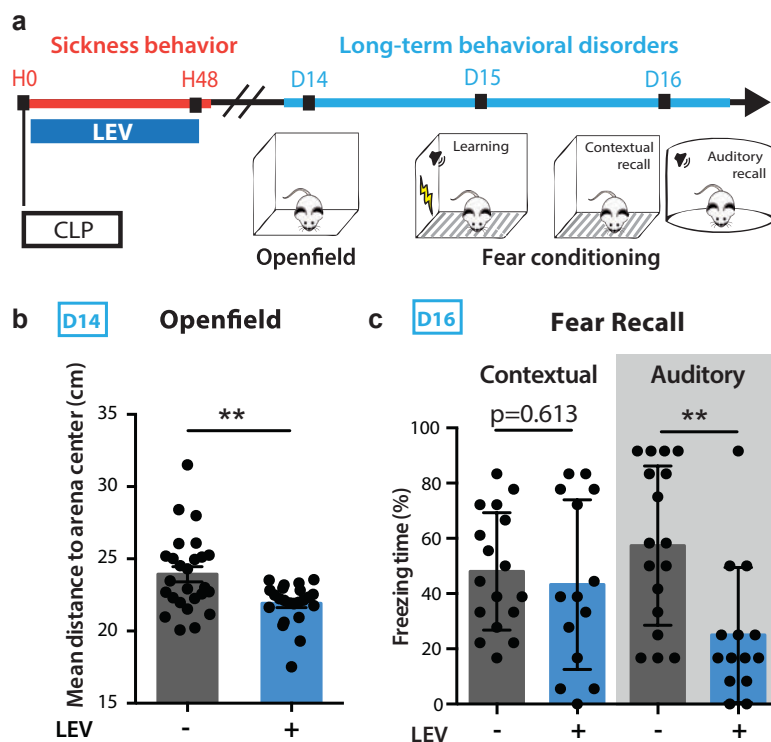
dependent effect of LEV in the amygdala circuits, we monitored the evoked population activity of vBNST neurons in response to optogenetic activation of CeA axonal terminals following LEV administration (Fig.5f). Light stimulation at different frequencies revealed that LEV significantly decreased the light-evoked response at high frequencies (25-50 Hz) but had no effect for lower frequencies (5-10 Hz; Fig.5g), indicating that LEV has an inhibitory impact preferentially on CeA-to-vBNST circuits exhibiting high frequency activity.



**Figure 5. LEV administration during sepsis suppressed the transient neuronal activation in vBNST-projecting CeA neurons.** **a.** LEV was administrated every 12 hours for 48 hours post-CLP. **b.** LEV treatment reduced the transient c-fos expression increase at H6 post-CLP only in the NTS and the CeA (CeA:  $n_{CLP}=9$ ,  $n_{CLP+LEV}=5$ ,  $*P=0.0347$ , vBNST:  $n_{CLP}=6$ ,  $n_{CLP+LEV}=5$ ; NTS:  $n_{CLP}=6$ ,  $n_{CLP+LEV}=5$ ,  $**P=0.0057$ ; AP:  $n_{CLP}=6$ ,  $n_{CLP+LEV}=3$ ; PBN:  $n_{CLP}=11$ ,  $n_{CLP+LEV}=5$ ; SO:  $n_{CLP}=10$ ,  $n_{CLP+LEV}=4$ ). **c.d.e.** *In vivo* calcium imaging of the vBNST-projecting CeA neurons. **(c)** Gcamp6f specific expression and *in vivo* recording in the vBNST-projecting CeA neurons before and hours after CLP, in absence or presence of LEV treatment. **(d)** LEV administration showed a direct inhibiting effect over the increased neuronal spontaneous activity observed *in vivo* post-CLP (group:  $F_{(1,616)}=141.7$ ,  $****P<0.0001$ ). **(e)** Between H4 and H6 post-CLP ( $n_{CLP}=12$ ,  $n_{CLP+LEV}=7$ ), LEV treatment induced a decreased frequency and an increased amplitude of the calcium events compared to non-treated animals (frequency:  $***P=0.0001$ , amplitude:  $*P=0.0265$ ). **f.g.** Optogenetic stimulation of axon terminals from ChRimson-expressing vBNST-projecting CeA neurons and recording of the light-evoked response in vBNST neurons (scale=200 µm). Following LEV ip injection (blue), the light-evoked response (normalized to the baseline light-evoked response before injection) was decreased compared to saline injection (grey) (n per group=10, interaction:  $F_{(6,54)}=5.472$ ; frequency:  $F_{(6,54)}=5.472$ ,  $***P=0.0002$ ; group:  $F_{(1,9)}=3.412$ ,  $P=0.0978$ ; Control-LEV: 25 Hz,  $***P=0.0009$ . CL=continuous light. LEV- data in panel b. are pooled with CLP data from Fig.2 and LEV- data in panels d.e. are pooled with CLP data from Fig.3. Statistics: **b.e.** Mann-Whitney test or unpaired t-test. **d.g.** Two-way ANOVA (repeated measure for g.) and Sidak's multiple comparison tests (gray bar when significant).  $****P<0.0001$ . Data shown as mean ± s.d. (except d. ± s.e.m.).

## Transient LEV treatment during sepsis acute phase dampens the post-CLP long-term behavioral impairments.

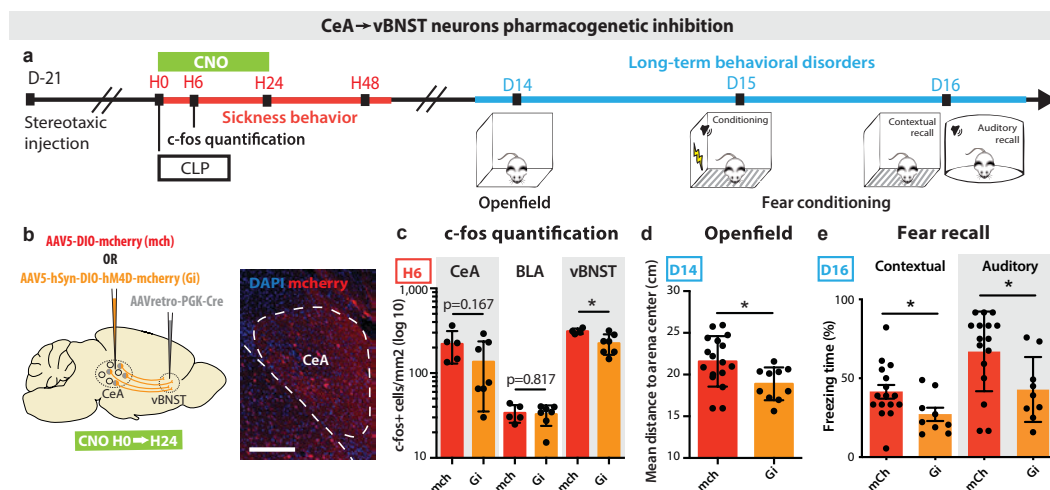
Given that LEV dampened sepsis-induced hyperactivation of the extended amygdala, we tested whether a transient administration of LEV, only during the acute phase of sepsis, could prevent onset of long-term behavioral changes seen 15 days post-CLP. Mice treated with LEV every 12h during 48h post-CLP showed at D15 a decreased anxiety level (Fig.6a-b). This treatment reduced the PTSD-like fear response 15 days post-CLP, with a strong beneficial effect over the auditory recall to FC but no effect on contextual fear recall (Fig.6c). Importantly, such 48h-long LEV administration had no effect on pain threshold, general locomotor activity, recognition memory and spatial contextual memory (SFig.4c-h), ruling out potential deleterious long-term side effects of the drug on behavior or cognition. Moreover, a 48h-long treatment with LEV showed no effect at D15 on the OF and FC long-term behavior in control mice (SFig4.c,e). Thus, we conclude that preventing early activation of fear- and anxiety-associated circuits during sepsis with the inhibitory agent LEV strongly improved the psychocognitive outcomes of CLP mice.



**Figure 6. Transient LEV treatment during sepsis acute phase dampened the post-CLP long-term behavioral impairments.** **a.** LEV was administrated every 12 hours during the first 48 hours following CLP. Long-term behavior was then tested 15 days post-CLP. **b.c.** Early LEV administration decreased the mean distance to the OF arena center (**b**) ( $n_{LEV-}=26$ ,  $n_{LEV+}=22$ ,  $**P=0.0055$ ) and the freezing behavior during FC recall in CLP surviving mice (**c**) ( $n_{LEV-}=17$ ,  $n_{LEV+}=14$ , Auditory:  $**P=0.0024$ ). LEV-data in panels b.c. are pooled with CLP data from Fig.1. Statistics: **b.c.** Mann-Whitney test or unpaired t-test. Data shown as mean  $\pm$  s.d.

## Transient pharmacogenetic silencing of vBNST-projecting CeA neurons prevents the development of anxiety and PTSD-like conditioned fear expression.

To further dissect the precise neuronal circuits involved in the generation of post-sepsis anxiety and PTSD-like fear expression, we performed a genetically encoded presynaptic transmitter release inhibition based on the conditional expression of the inhibitory Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs (DREADD) (60). We injected in the vBNST a retrograde Cre-expressing virus, and in the CeA a conditional Cre-dependent virus expressing the inhibitory hM4D(Gi) DREADD. This DREADD is only active when Clozapine N-oxide (CNO) is injected to the animal (Fig.7a-b). The CNO was intra-peritoneally injected at H0, H6, H12 and H24 post-surgery, to induce 24 h transient inhibition of the targeted amygdala circuit. The c-fos staining confirmed indeed that the pharmacogenetic silencing of synaptic transmission between CeA and vBNST prevented the CLP-induced neuronal activation at H6 in the post-synaptic region targeted by hM4D(Gi)-expressing CeA neurons, i.e. the vBNST (Fig.7c).



**Figure 7. Transient pharmacogenetic silencing of vBNST-projecting CeA neurons prevents the development of anxiety and PTSD-like conditioned fear expression.** **a.** Timeline of the experiment. Three weeks after stereotaxic injection of viral vectors, mice underwent a CLP and were injected with CNO during the 24 hours following surgery. Long-term behavior was then tested 15 days post-surgery. **b.** A retrograde Cre-expressing virus was injected in the vBNST and a Cre-dependent inhibitory DREADD (Gi) or mcherry control (mch) virus was injected in the CeA to allow the recombination and the expression of the Gi/mch viruses exclusively in the vBNST-projecting CeA neurons. **c.** H6 c-fos quantification showed an inhibiting effect of Gi over the post-CLP neuronal activation in the vBNST compared to mCherry controls, with no impact on other neighboring regions such as the BLA ( $n_{mch}=5$ ,  $n_{Gi}=7$ , vBNST: \* $P=0.0257$ ). **d.e.** CNO-induced Gi inhibition for 24 hours post-CLP is sufficient to abolish the long-term behavioral changes observed in the OF (**d**) ( $n_{mch}=17$ ,  $n_{Gi}=10$ , \* $P=0.0190$ ) and the FC recall (**e**) ( $n_{mch}=16$ ,  $n_{Gi}=9$ , Contextual: \* $P=0.0415$ ; Auditory: \* $P=0.0228$ ). CNO: Clozapine N-Oxide (scale=200  $\mu$ m). Statistics: Mann-Whitney test or unpaired t-test. Data shown as mean  $\pm$  s.d.

Specific DREADD inhibition of the vBNST-projecting CeA neurons only during the 24h post-CLP period prevented the development of anxiety and PTSD-like fear expression at D15 (Fig.7d-e). Such transient silencing alleviates both anxiety in the OF test, and auditory- and contextual-exaggerated fear responses during FC test. In sham animals, DREADD-driven inhibition produced no behavioral changes (SFig.5). These data confirmed that the sepsis-induced early activation of vBNST-projecting CeA neurons is necessary for the subsequent development of anxiety and PTSD-like fear expression.

## Discussion

In the present study, we have coupled circuit tracing techniques, *in vivo* imaging and targeted pharmacogenetic manipulation in mice to show that a transient pathological activation of a subpopulation of vBNST-projecting CeA neurons leads to the onset of long-term anxiety and PTSD-like fear expression. Dampening activity of this circuit prevents occurrence of these long-term post-sepsis adverse effects.

### CLP-induced sepsis as a new model of PTSD?

Despite the pathophysiological and clinical complexity of sepsis, several animal models have been developed in the field, ranging from administration of exogenous toxin (such as LPS) to pathogens inoculation, or direct alteration of animal mucosal barriers. In this last category, CLP is the most commonly used model. In mice, it leads to a syndrome strongly reminiscent of human sepsis. Indeed, contrary to LPS or pathogens injections, CLP induces a polymicrobial infection with a large spectrum of the host intestinal microbiota, which recreates the major features of human sepsis acute phase, notably the characteristic cytokines storm. In our study, we have shown a strong and quick increase of several peripheral pro- and anti-inflammatory cytokines (IL-1 $\alpha$ , IL-6, TNF, IL10). This both pro- and anti-inflammatory cytokines profile and the kinetic of cytokine release is very similar to sepsis patients (56, 57). In agreement with previous reports, we also observed a transient neuroinflammatory response with brain expression of inflammatory cytokines and chemokines (33, 63). Additionally, CLP mice showed brain dysfunctions that shared many characteristics with human SAE. As in SAE, CLP-induced sickness behavior was characterized by altered vigilance, impaired locomotor activity, sleep alteration as well as neuroendocrine and autonomic disturbances. In addition, we highlighted EEG abnormalities and rare epileptiform-like spikes in CLP mice, presenting features and proportions closed to SAE patients (SFig3.b-c). Lastly, as described in septic patients, CLP mice displayed long-term behavioral impairments. We decided to test behavior from 15 days post-CLP, since mice presented no remaining signs of peripheral inflammation or sickness behavior at this stage. We observed both associative and

non-associative features: CLP mice displayed an enhanced anxiety during spontaneous exploration and an enhanced fear response to conditioned cues. Moreover, CLP mice presented a fear generalization to a new auditory cue but not to a different context, a partial generalization feature that is also observed in PTSD rodent models (64) and in PTSD patients (65). However, we observed only a limited deficit of fear extinction based on short-term spontaneous recovery, although we did not explore alternative parameters such as length of the extinction-to-test interval or reinstatement (13, 66, 67). The *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, fifth edition (DSM-5) describes the key criteria to characterize PTSD in humans as the exposition to a threatening traumatic event and the persistent re-experience of this event, to which are added a range of symptoms such as avoidance, negative cognition or arousal. The sepsis-related PTSD-like syndrome described here recapitulates some key aspects of human PTSD pathology (68–70), attesting of a good construct and face validity. In the framework of rodent model of PTSD (71, 72), CLP-induced sepsis may not constitute the acute stressor but act rather as a pre-traumatic “sensitizing” event which promotes sustained anxiety and enhances PTSD susceptibility, the latter being assessed with a *de novo* fear conditioning at D15. In human studies, inflammation intensity is an important factor involved in PTSD susceptibility. Indeed, only 10 to 15% of people exposed to severe trauma will develop PTSD (73, 74). Both innate and environmental risk factors widely influence PTSD development susceptibility (72). Among them, inflammation prior to trauma has been associated with an increased PTSD risk. A study showed that American soldiers diagnosed post-deployment with PTSD presented two-fold higher levels of the inflammatory marker C-reactive protein (CRP) before their deployment in war zone (75).

Several pre-clinical studies have already investigated the impact of sepsis on long-term behavioral changes (29, 33, 76–83). Although most of them highlighted sustained anxiety, data differ mainly on aversive or non-aversive memory deficits. These divergences can be explained by a high diversity of variables including the type and the severity of sepsis induction (LPS injection or CLP), post-surgery treatments, animals’ species, genetic background, age and sex, and most importantly the fear learning protocol and timing of behavioral evaluation. For

instance, sepsis impaired novel object recognition at 10 days post-surgery but had no effect at 30 days (84). Because many of the actual stressors in human PTSD patients are very brief (66), we have favored a short aversive pairing (only two pairings) in our FC protocol rather than a long repetitive over-training procedure. We also avoided longer duration stressor to prevent other confounding phenomena such as depression-like behavior. Lastly, all the contextual or sensory cues used at D15 were unrelated to the environment where animals initially experienced sepsis (home cage), discarding any confounding re-exposure effects on behavioral measurements.

### **Extended amygdala circuits mediate post-sepsis anxiety and PTSD-like fear expression.**

Our results showed that the pharmacologic or the pharmacogenetic inhibition of the vBNST-projecting CeA neurons during the first hours following CLP suppressed long-term anxiety and PTSD-like fear expression. These data suggest that the transient activation of this circuit during acute inflammation leads to persistent modifications responsible for the long-term behavioral impairments. Those alterations may involve both cell-autonomous molecular changes —i.e. long-term reduction of extra-synaptic GABAergic receptors (21) — or long-term synaptic changes including afferent-specific synaptic remodeling of excitatory drive (85, 86). Cytokines recruited during sepsis (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF) have been shown to impact memory consolidation, through mechanisms ranging from long-term potentiation to synaptic scaling and neurogenesis (87). Focusing on sepsis studies, CLP mice displayed long-term reduction of spine density in the BLA and the HIP (70, 88). Interestingly, the reduction of spine density in these regions has also been revealed in animal models and human patients suffering from anxiety-related disorders (89, 90). In our study, we have demonstrated, at a circuit scale, a causal link between the sepsis-related recruitment of the extended amygdala and the long-term PTSD-like fear expression. Given that PTSD is generally associated with hippocampal dysfunction, the hippocampus might also be involved in the post-CLP symptoms. But, in the present study, the alterations observed on contextual/cue fear memories and not on spatial/novelty tasks may indicate a



preferential impact on ventral hippocampus/amygdala circuitry. Using rabies virus-based retrograde tracing, we observed that CLP induced a persistent decrease of direct inputs to vBNST-projecting CeA neurons from RRf and BNST. Interestingly, both RRf and BNST innervate the CeA and also receive inputs from CeA neurons, suggesting a preferred CLP-induced alterations in looped circuit elements involved in threat monitoring. The reduction of inputs onto vBNST-projecting CeA neurons suggests an unbalanced control over CeA neuronal activity, which may lead to PTSD-like exaggerated fear expression at D15 post-CLP.

This study raises the question of how peripheral infection and inflammation mediates sepsis brain activation and dysfunction. Innate immune response transduces inflammatory signals to the brain via two major pathways: the neural pathway and the humoral pathway (4). Both routes might be involved in our model since the NTS (recipient of the neural vagal inputs) and the AP (sensor of blood-borne signals) are highly activated at 6 hours post-sepsis. Local liberation of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and cytokines during abdominal infection induces AP activation as well as peripheral nerves activation, especially the vagus nerve that projects to the NTS. The NTS/AP complex controls body temperature, blood pressure, heart rate, arousal, gut motility, all parameters highly affected during sickness behavior in mice. NTS/AP complex relays the signal to other autonomic and neuroendocrine hypothalamic regions, and finally cognitive/behavioral centers (via the PBN) such as the amygdala (4, 91). This activation cascade during sepsis acute phase does not only explain the brain activation profile at H6, but also enlightens the physiological and behavioral disturbances observed in CLP mice sickness behavior.

### **A new proactive therapeutic approach with Levetiracetam prevents long-term psycho-cognitive impairments.**

The major breakthrough of this study concerns the preclinical validation of a therapeutical approach able to dampen post-infection anxiety-related syndrome using preventive administration of the neuromodulatory drug LEV only during the infection phase. Our results showed that acute LEV treatment only during the first

48 h following CLP is sufficient to alleviate long-term behavioral impairments, in mice. Given that LEV application on brain slices can directly reduce synaptic transmission induced by a neuronal hyperactivation while preserving baseline transmission (59) and considering that we did not observe any peripheral anti-inflammatory effects of LEV (SFig.4b), we believe that, in our model, the action site of LEV is primarily on central brain circuits. This drug presents all the favorable characteristics to be considered for human trials (well-tolerated, easy to administrate and monitor, inexpensive) (37). Likewise, various drugs proposed for PTSD are prescribed to sepsis survivors - including  $\beta$ -blockers,  $\alpha$ 2 adrenergic receptors agonists, corticosteroids or ketamine (92) - but the clinical benefit of these drugs for the prevention of post-sepsis PTSD remains very controversial (93). Surprisingly, the sepsis-induced EEG and neurophysiological changes had never been therapeutically targeted in either experimental studies or clinical trials until now, whereas a wide range of anti-epileptic drugs are available.

In addition to its effect on the limbic system, LEV also influences brainstem activity since we reported inhibiting effects of LEV administration over post-CLP *c-fos* gene expression in the NTS (see Fig.5). Therefore, we conclude that LEV could alleviate post-sepsis PTSD by a direct inhibiting action on CeA-vBNST synaptic transmission (revealed by optogenetic) and an indirect action mediated by NTS inhibition. Further investigation of LEV action over the brainstem and the vagus activity would be of great interest since these regions are involved in the neurovegetative response to sepsis and are therefore directly implicated in survival.

As in most animal studies, these experiments were performed on mice in a single facility and all with the same genetic background (C57BL/6JRJ). The impacts of microbiota, genetic background and facility-specific factors on our findings are presently unknown. Also, sepsis can have different expression, magnitude, origin and duration which may affect the interpretation of our results. Given the wide associations of sepsis with a variety of neurobiological processes, including neuroinflammation and cell metabolism, it is very likely that sepsis plays additional roles to those described in our studies. In particular, other subpopulations of neurons may be affected by sepsis, as noticed by our brain-

activity mapping. Additionally, the following questions remain opened: What other molecular, cellular and circuits effects are triggered by sepsis and how do these effects contribute to the long-term psycho-cognitive outcomes? What is the exact critical period of treatment for preventing these post-sepsis outcomes? Why some specific brain regions are more susceptible to sepsis than others? Despite those important fundamental questions, the present preclinical findings warranted to propose, with the support of the French Ministry of Health and the TRIGGERSEP network, a multicenter randomized clinical trial on LEV in patients with septic shock, with duration of encephalopathy and incidence of PTSD as primary and secondary outcomes (patent: US20200121644A1).

## **Acknowledgements & Funding**

We thank David Hardy, Patricia Reis, Flora Magno, Tarik Hissem, Carine Moigneu, Alice Dupin and Noémi Dominique for their technical support. We thank Mathilde Bigot for her input on behavioral experiments, and all the members of “Perception and Memory” and “Experimental Neuropathology” labs for their advice and comments during this work. We are grateful to Karl-Klaus Conzelmann (Max Von Pettenkofer Institute Virology and Gene Center, Medical Faculty, Ludwig-Maximilians-University Munich, 81377, Munich, Germany) for the generous gift of (EnvA)SAD-ΔG-mCherry rabies virus. We thank the fellowships of SRLF, DIM Malinf région Ile de France, the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) and the neurologic exploration group in intensive care GENER for founding this project. Perception and Memory laboratory receives financial support from life insurance company “AG2R-La-Mondiale”. Fabrice Chrétien’s lab received financial support from UCB. The authors wish to thank the Genetically Encoded Neuronal Indicator and Effector (GENIE) Project and the Janelia Farm Research Campus of the Howard Hughes Medical Institute for sharing GCaMP6f constructs.

## **Authors Contribution**

LB, AM, DR, FC, P-ML, TS and GL conceived and designed this work. LB, AM, LC, JL, DR, EH, IG and GL acquired and analyzed the data. FB provided the murine sepsis model. LB, AM, P-ML, TS and GL prepared the manuscript, with the help of the other authors.

## **Competing Interests**

The authors declare no competing financial interests.

## **Supplementary material**

Supplementary material is available at *Brain* online

## References

1. M. Singer, C. S. Deutschman, C. W. Seymour, M. Shankar-Hari, D. Annane, M. Bauer, R. Bellomo, G. R. Bernard, J.-D. Chiche, C. M. Coopersmith, R. S. Hotchkiss, M. M. Levy, J. C. Marshall, G. S. Martin, S. M. Opal, G. D. Rubenfeld, T. van der Poll, J.-L. Vincent, D. C. Angus, The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3), *JAMA* **315**, 801–810 (2016).
2. K. E. Rudd, S. C. Johnson, K. M. Agesa, K. A. Shackelford, D. Tsoi, D. R. Kievlan, D. V. Colombara, K. S. Ikuta, N. Kissoon, S. Finfer, C. Fleischmann-Struzek, F. R. Machado, K. K. Reinhart, K. Rowan, C. W. Seymour, R. S. Watson, T. E. West, F. Marinho, S. I. Hay, R. Lozano, A. D. Lopez, D. C. Angus, C. J. L. Murray, M. Naghavi, Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study, *The Lancet* **395**, 200–211 (2020).
3. K. Reinhart, R. Daniels, N. Kissoon, F. R. Machado, R. D. Schachter, S. Finfer, Recognizing Sepsis as a Global Health Priority - A WHO Resolution, *N. Engl. J. Med.* **377**, 414–417 (2017).
4. R. Dantzer, J. C. O'Connor, G. G. Freund, R. W. Johnson, K. W. Kelley, From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain, *Nat. Rev. Neurosci.* **9**, 46–56 (2008).
5. E. Azabou, E. Magalhaes, A. Braconnier, L. Yahiaoui, G. Moneger, N. Heming, D. Annane, J. Mantz, F. Chrétien, M.-C. Durand, F. Lofaso, R. Porcher, T. Sharshar, Groupe d'Explorations Neurologiques en Réanimation (GENER), Early Standard Electroencephalogram Abnormalities Predict Mortality in Septic Intensive Care Unit Patients, *PloS One* **10**, e0139969 (2015).
6. E. W. Ely, A. Shintani, B. Truman, T. Speroff, S. M. Gordon, F. E. J. Harrell, S. K. Inouye, G. R. Bernard, R. S. Dittus, Delirium as a predictor of mortality in mechanically ventilated patients in the intensive care unit., *JAMA* **291**, 1753–62 (2004).
7. T. J. Iwashyna, E. W. Ely, D. M. Smith, K. M. Langa, Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis., *JAMA* **304**, 1787–94 (2010).
8. D. Annane, T. Sharshar, Cognitive decline after sepsis., *Lancet Respir. Med.* **3**, 61–9 (2015).
9. K. Schmidt, S. Worrack, M. V. Korff, D. Davydow, F. Brunkhorst, U. Ehlert, C. Pausch, J. Mehlhorn, N. Schneider, A. Scherag, A. Freytag, K. Reinhart, M. Wensing, J. Gensichen, Effect of a Primary Care Management Intervention on Mental Health-Related Quality of Life Among Survivors of Sepsis: A Randomized Clinical Trial, *JAMA* **315**, 2703–2711 (2016).
10. H. P. Kapfhammer, H. B. Rothenhäusler, T. Krauseneck, C. Stoll, G. Schelling, Posttraumatic stress disorder and health-related quality of life in long-term survivors of acute respiratory distress syndrome, *Am. J. Psychiatry* **161**, 45–52 (2004).

11. K. R. Boer, C. W. Mahler, C. Unlu, B. Lamme, M. B. Vroom, M. A. Sprangers, D. J. Gouma, J. B. Reitsma, C. A. De Borgie, M. A. Boermeester, Long-term prevalence of post-traumatic stress disorder symptoms in patients after secondary peritonitis, *Crit. Care Lond. Engl.* **11**, R30 (2007).
12. K. R. Boer, O. van Ruler, A. A. P. van Emmerik, M. A. Sprangers, S. E. de Rooij, M. B. Vroom, C. A. J. M. de Borgie, M. A. Boermeester, J. B. Reitsma, Dutch Peritonitis Study Group, Factors associated with posttraumatic stress symptoms in a prospective cohort of patients after abdominal sepsis: a nomogram, *Intensive Care Med.* **34**, 664–674 (2008).
13. A. Shalev, I. Liberzon, C. Marmar, Post-Traumatic Stress Disorder <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra1612499> (2017), doi:10.1056/NEJMra1612499.
14. T. Sharshar, F. Gray, G. Lorin de la Grandmaison, N. S. Hopkinson, E. Ross, A. Dorandeu, D. Orlikowski, J.-C. Raphael, P. Gajdos, D. Annane, Apoptosis of neurons in cardiovascular autonomic centres triggered by inducible nitric oxide synthase after death from septic shock, *Lancet Lond. Engl.* **362**, 1799–1805 (2003).
15. P. Tovote, J. P. Fadok, A. Lüthi, Neuronal circuits for fear and anxiety, *Nat. Rev. Neurosci.* **16**, 317–331 (2015).
16. A. Adhikari, T. N. Lerner, J. Finkelstein, S. Pak, J. H. Jennings, T. J. Davidson, E. Ferenczi, L. A. Gunaydin, J. J. Mirzabekov, L. Ye, S.-Y. Kim, A. Lei, K. Deisseroth, Basomedial amygdala mediates top-down control of anxiety and fear, *Nature* **527**, 179–185 (2015).
17. J. P. Fadok, M. Markovic, P. Tovote, A. Lüthi, New perspectives on central amygdala function., *Curr. Opin. Neurobiol.* **49**, 141–147 (2018).
18. S. Han, M. T. Soleiman, M. E. Soden, L. S. Zweifel, R. D. Palmiter, Elucidating an Affective Pain Circuit that Creates a Threat Memory, *Cell* **162**, 363–374 (2015).
19. K. Yu, S. Ahrens, X. Zhang, H. Schiff, C. Ramakrishnan, L. Fenno, K. Deisseroth, F. Zhao, M.-H. Luo, L. Gong, M. He, P. Zhou, L. Paninski, B. Li, The central amygdala controls learning in the lateral amygdala, *Nat. Neurosci.* **20**, 1680–1685 (2017).
20. R. L. Ressler, S. Maren, Synaptic encoding of fear memories in the amygdala, *Curr. Opin. Neurobiol.* **54**, 54–59 (2019).
21. P. Botta, L. Demmou, Y. Kasugai, M. Markovic, C. Xu, J. P. Fadok, T. Lu, M. M. Poe, L. Xu, J. M. Cook, U. Rudolph, P. Sah, F. Ferraguti, A. Lüthi, Regulating anxiety with extrasynaptic inhibition, *Nat. Neurosci.* **18**, 1493–1500 (2015).
22. H. Cai, W. Haubensak, T. E. Anthony, D. J. Anderson, Central amygdala PKC- $\delta$ (+) neurons mediate the influence of multiple anorexigenic signals, *Nat. Neurosci.* **17**, 1240–1248 (2014).
23. P. Tovote, J. P. Fadok, A. Lüthi, Neuronal circuits for fear and anxiety, *Nat. Rev. Neurosci.* **16**, 317–331 (2015).
24. A. Adhikari, Distributed circuits underlying anxiety, *Front. Behav. Neurosci.* **8** (2014), doi:10.3389/fnbeh.2014.00112.
25. M. A. Lebow, A. Chen, Overshadowed by the amygdala: the bed nucleus of the

stria terminalis emerges as key to psychiatric disorders, *Mol. Psychiatry* **21**, 450–463 (2016).

26. D. Rittirsch, M. S. Huber-Lang, M. A. Flierl, P. A. Ward, Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture, *Nat. Protoc.* **4**, 31–36 (2009).

27. M. Pereira de Souza Goldim, A. Della Giustina, K. Mathias, A. de Oliveira Junior, M. E. Fileti, R. De Carli, G. Zarbato, L. Garbossa, N. da Rosa, J. Oliveira, A. Vieira, J. Generoso, B. H. Oliveira, N. Ferreira, J. Palandi, F. Bobinski, D. F. Martins, J. Fortunato, T. Barichello, J. Quevedo, F. Dal-Pizzol, F. Petronilho, Sickness Behavior Score Is Associated with Neuroinflammation and Late Behavioral Changes in Polymicrobial Sepsis Animal Model, *Inflammation* (2020), doi:10.1007/s10753-020-01187-z.

28. M. F. Osuchowski, A. Ayala, S. Bahrami, M. Bauer, M. Boros, J.-M. Cavillon, I. H. Chaudry, C. M. Coopersmith, C. S. Deutschman, S. Drechsler, P. Efron, C. Frostell, G. Fritsch, W. Gozdzik, J. Hellman, M. Huber-Lang, S. Inoue, S. Knapp, A. V. Kozlov, C. Libert, J. C. Marshall, L. L. Moldawer, P. Radermacher, H. Redl, D. G. Remick, M. Singer, C. Thiemermann, P. Wang, W. J. Wiersinga, X. Xiao, B. Zingarelli, Minimum Quality Threshold in Pre-Clinical Sepsis Studies (MQTiPSS): An International Expert Consensus Initiative for Improvement of Animal Modeling in Sepsis, *Shock Augusta Ga* **50**, 377–380 (2018).

29. A. C. Calsavara, D. H. Rodrigues, A. S. Miranda, P. A. Costa, C. X. Lima, M. C. Vilela, M. A. Rachid, A. L. Teixeira, Late anxiety-like behavior and neuroinflammation in mice subjected to sublethal polymicrobial sepsis, *Neurotox. Res.* **24**, 103–108 (2013).

30. R. Gao, G. Li, R. Yang, H. Yuan, S. Zhang, Hippocampal  $\beta$ 2-microglobulin mediates sepsis-induced cognitive impairment, *Mol. Med. Rep.* **17**, 7813–7820 (2018).

31. A. Y. O. Silva, É. A. Amorim, M. C. Barbosa-Silva, M. N. Lima, H. A. Oliveira, M. G. Granja, K. S. Oliveira, P. M. Fagundes, R. L. S. Neris, R. M. P. Campos, C. A. Moraes, A. L. Vallochi, P. R. M. Rocco, F. A. Bozza, H. C. Castro-Faria-Neto, T. Maron-Gutierrez, Mesenchymal Stromal Cells Protect the Blood-Brain Barrier, Reduce Astroglialosis, and Prevent Cognitive and Behavioral Alterations in Surviving Septic Mice, *Crit. Care Med.* **48**, e290–e298 (2020).

32. J. L. Spencer-Segal, B. H. Singer, K. Laborc, K. Somayaji, S. J. Watson, T. J. Standiford, H. Akil, Sepsis survivor mice exhibit a behavioral endocrine syndrome with ventral hippocampal dysfunction, *Psychoneuroendocrinology* **117**, 104679 (2020).

33. B. H. Singer, M. W. Newstead, X. Zeng, C. L. Cooke, R. C. Thompson, K. Singer, R. Ghantasala, J. M. Parent, G. G. Murphy, T. J. Iwashyna, T. J. Standiford, Cecal Ligation and Puncture Results in Long-Term Central Nervous System Myeloid Inflammation, *PLoS One* **11**, e0149136 (2016).

34. R. M. Nielsen, O. Urdanibia-Centelles, E. Vedel-Larsen, K. J. Thomsen, K. Møller, K. S. Olsen, A. Ø. Lauritsen, H. S. Eddelien, M. Lauritzen, K. Benedek, Continuous EEG Monitoring in a Consecutive Patient Cohort with Sepsis and Delirium, *Neurocrit. Care* **32**, 121–130 (2020).

35. A. Mazeraud, Q. Pascal, F. Verdonk, N. Heming, F. Chrétien, T. Sharshar, Neuroanatomy and Physiology of Brain Dysfunction in Sepsis, *Clin. Chest Med.* **37**, 333–345 (2016).
36. M. Sayyah, M. Javad-Pour, M. Ghazi-Khansari, The bacterial endotoxin lipopolysaccharide enhances seizure susceptibility in mice: involvement of proinflammatory factors: nitric oxide and prostaglandins, *Neuroscience* **122**, 1073–1080 (2003).
37. J. L. DeWolfe, J. P. Szaflarski, Levetiracetam Use in the Critical Care Setting, *Front. Neurol.* **4** (2013), doi:10.3389/fneur.2013.00121.
38. B. A. Lynch, N. Lambeng, K. Nocka, P. Kensel-Hammes, S. M. Bajjalieh, A. Matagne, B. Fuks, The synaptic vesicle protein SV2A is the binding site for the antiepileptic drug levetiracetam, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 9861–9866 (2004).
39. J. R. Cho, D. L. Koo, E. Y. Joo, S. M. Yoon, E. Ju, J. Lee, D. Y. Kim, S. B. Hong, Effect of levetiracetam monotherapy on background EEG activity and cognition in drug-naïve epilepsy patients, *Clin. Neurophysiol. Off. J. Int. Fed. Clin. Neurophysiol.* **123**, 883–891 (2012).
40. R. P. Haberman, A. Branch, M. Gallagher, Targeting Neural Hyperactivity as a Treatment to Stem Progression of Late-Onset Alzheimer’s Disease, *Neurotherapeutics* **14**, 662–676 (2017).
41. G. Favrais, M. Ursino, C. Mouchel, E. Boivin, V. Jullien, S. Zohar, E. Saliba, Levetiracetam optimal dose-finding as first-line treatment for neonatal seizures occurring in the context of hypoxic-ischaemic encephalopathy (LEVNEONAT-1): study protocol of a phase II trial, *BMJ Open* **9**, e022739 (2019).
42. C. J. Guenther, K. Miyamichi, H. H. Yang, H. C. Heller, L. Luo, Permanent genetic access to transiently active neurons via TRAP: targeted recombination in active populations, *Neuron* **78**, 773–784 (2013).
43. L. Vong, C. Ye, Z. Yang, B. Choi, S. Chua, B. B. Lowell, Leptin Action on GABAergic Neurons Prevents Obesity and Reduces Inhibitory Tone to POMC Neurons, *Neuron* **71**, 142–154 (2011).
44. G. Lepousez, M. Alonso, S. Wagner, B. W. Gallarda, P.-M. Lledo, Selective viral transduction of adult-born olfactory neurons for chronic in vivo optogenetic stimulation, *J. Vis. Exp. JoVE*, e3380 (2011).
45. G. Paxinos, K. B. J. Franklin, *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* (Academic Press, New York, 2001).
46. T. Illouz, R. Madar, Y. Louzon, K. J. Griffioen, E. Okun, Unraveling cognitive traits using the Morris water maze unbiased strategy classification (MUST-C) algorithm, *Brain. Behav. Immun.* **52**, 132–144 (2016).
47. L. A. Schwarz, K. Miyamichi, X. J. Gao, K. T. Beier, B. Weissbourd, K. E. DeLoach, J. Ren, S. Ibanes, R. C. Malenka, E. J. Kremer, L. Luo, Viral-genetic tracing of the input-output organization of a central noradrenaline circuit, *Nature* **524**, 88–92 (2015).



48. A. Semmler, S. Hermann, F. Mormann, M. Weberpals, S. A. Paxian, T. Okulla, M. Schäfers, M. P. Kummer, T. Klockgether, M. T. Heneka, Sepsis causes neuroinflammation and concomitant decrease of cerebral metabolism, *J. Neuroinflammation* **5**, 38 (2008).
49. R. G. Parsons, K. J. Ressler, Implications of memory modulation for post-traumatic stress and fear disorders, *Nat. Neurosci.* **16**, 146–153 (2013).
50. A. Lüthi, C. Lüscher, Pathological circuit function underlying addiction and anxiety disorders, *Nat. Neurosci.* **17**, 1635–1643 (2014).
51. C. Dejean, J. Courtin, R. R. Rozeske, M. C. Bonnet, V. Dousset, T. Michelet, C. Herry, Neuronal Circuits for Fear Expression and Recovery: Recent Advances and Potential Therapeutic Strategies, *Biol. Psychiatry* **78**, 298–306 (2015).
52. S.-C. Lin, M. A. L. Nicolelis, Neuronal Ensemble Bursting in the Basal Forebrain Encodes Salience Irrespective of Valence, *Neuron* **59**, 138–149 (2008).
53. I. Avila, S.-C. Lin, Motivational Salience Signal in the Basal Forebrain Is Coupled with Faster and More Precise Decision Speed, *PLOS Biol.* **12**, e1001811 (2014).
54. B. Hangya, S. P. Ranade, M. Lorenc, A. Kepecs, Central Cholinergic Neurons Are Rapidly Recruited by Reinforcement Feedback, *Cell* **162**, 1155–1168 (2015).
55. Y. Cui, G. Lv, S. Jin, J. Peng, J. Yuan, X. He, H. Gong, F. Xu, T. Xu, H. Li, A Central Amygdala-Substantia Innominata Neural Circuitry Encodes Aversive Reinforcement Signals, *Cell Rep.* **21**, 1770–1782 (2017).
56. S. N. Avery, J. A. Clauss, J. U. Blackford, The Human BNST: Functional Role in Anxiety and Addiction, *Neuropsychopharmacology* **41**, 126–141 (2016).
57. W. Haubensak, P. S. Kunwar, H. Cai, S. Ciochi, N. R. Wall, R. Ponnusamy, J. Biag, H.-W. Dong, K. Deisseroth, E. M. Callaway, M. S. Fanselow, A. Lüthi, D. J. Anderson, Genetic dissection of an amygdala microcircuit that gates conditioned fear, *Nature* **468**, 270–276 (2010).
58. K. Fukuyama, S. Tanahashi, M. Nakagawa, S. Yamamura, E. Motomura, T. Shiroyama, H. Tanii, M. Okada, Levetiracetam inhibits neurotransmitter release associated with CICR, *Neurosci. Lett.* **518**, 69–74 (2012).
59. A. L. Meehan, X. Yang, L.-L. Yuan, S. M. Rothman, Levetiracetam has an activity-dependent effect on inhibitory transmission, *Epilepsia* **53**, 469–476 (2012).
60. T. J. Stachniak, A. Ghosh, S. M. Sternson, Chemogenetic Synaptic Silencing of Neural Circuits Localizes a Hypothalamus→Midbrain Pathway for Feeding Behavior, *Neuron* **82**, 797–808 (2014).
61. L. Dejager, I. Pinheiro, E. Dejonckheere, C. Libert, Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis?, *Trends Microbiol.* **19**, 198–208 (2011).
62. D. G. Remick, D. E. Newcomb, G. L. Bolgos, D. R. Call, Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture, *Shock Augusta Ga* **13**, 110–116 (2000).
63. A. M. Chinnaiyan, M. Huber-Lang, C. Kumar-Sinha, T. R. Barrette, S. Shankar-

Sinha, V. J. Sarma, V. A. Padgaonkar, P. A. Ward, Molecular signatures of sepsis: multiorgan gene expression profiles of systemic inflammation, *Am. J. Pathol.* **159**, 1199–1209 (2001).

64. N. Kaouane, Y. Porte, M. Vallée, L. Brayda-Bruno, N. Mons, L. Calandreau, A. Marighetto, P. V. Piazza, A. Desmedt, Glucocorticoids Can Induce PTSD-Like Memory Impairments in Mice, *Science* **335**, 1510–1513 (2012).

65. B. M. Elzinga, J. D. Bremner, Are the neural substrates of memory the final common pathway in posttraumatic stress disorder (PTSD)?, *J. Affect. Disord.* **70**, 1–17 (2002).

66. R. J. Fenster, L. A. M. Lebois, K. J. Ressler, J. Suh, Brain circuit dysfunction in post-traumatic stress disorder: from mouse to man, *Nat. Rev. Neurosci.* **19**, 535–551 (2018).

67. S. Kida, Reconsolidation/destabilization, extinction and forgetting of fear memory as therapeutic targets for PTSD, *Psychopharmacology (Berl.)* **236**, 49–57 (2019).

68. S. Goswami, O. Rodríguez-Sierra, M. Cascardi, D. Pare, Animal models of post-traumatic stress disorder: face validity, *Front. Neurosci.* **7** (2013), doi:10.3389/fnins.2013.00089.

69. H. Hendriksen, B. Olivier, R. S. Oosting, From non-pharmacological treatments for post-traumatic stress disorder to novel therapeutic targets, *Eur. J. Pharmacol.* **732**, 139–158 (2014).

70. P. T. Huerta, S. Robbiati, T. S. Huerta, A. Sabharwal, R. Berlin, M. Frankfurt, B. T. Volpe, Preclinical Models of Overwhelming Sepsis Implicate the Neural System that Encodes Contextual Fear Memory, *Mol. Med.* **22**, 789 (2016).

71. J. Deslauriers, M. Toth, A. Der-Avakian, V. B. Risbrough, Current Status of Animal Models of Posttraumatic Stress Disorder: Behavioral and Biological Phenotypes, and Future Challenges in Improving Translation, *Biol. Psychiatry* **83**, 895–907 (2018).

72. T. C. M. Bienvenu, C. Dejean, D. Jercog, B. Aouizerate, M. Lemoine, C. Herry, The advent of fear conditioning as an animal model of post-traumatic stress disorder: Learning from the past to shape the future of PTSD research, *Neuron* **109**, 2380–2397 (2021).

73. R. C. Kessler, A. Sonnega, E. Bromet, M. Hughes, C. B. Nelson, Posttraumatic Stress Disorder in the National Comorbidity Survey, *Arch. Gen. Psychiatry* **52**, 1048–1060 (1995).

74. K. Rc, B. P, D. O, J. R, M. Kr, W. Ee, Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication *Arch. Gen. Psychiatry* **62** (2005), doi:10.1001/archpsyc.62.6.593.

75. E. Sa, N. Cm, M. Ax, B. Da, B. N, A. A, O. Dt, B. Dg, Assessment of plasma C-reactive protein as a biomarker of posttraumatic stress disorder risk *JAMA Psychiatry* **71** (2014), doi:10.1001/jamapsychiatry.2013.4374.

76. F. F. Savi, A. de Oliveira, G. F. de Medeiros, F. A. Bozza, M. Michels, T. Sharshar,

F. Dal-Pizzol, C. Ritter, What animal models can tell us about long-term cognitive dysfunction following sepsis: A systematic review, *Neurosci. Biobehav. Rev.* (2020), doi:10.1016/j.neubiorev.2020.12.005.

77. R. Gao, Y. Tang, J. Tong, J.-J. Yang, M. Ji, S. Zhu, Systemic Lipopolysaccharide Administration-Induced Cognitive Impairments are Reversed by Erythropoietin Treatment in Mice, *Inflammation* **38**, 1949–1958 (2015).

78. C. Yan, Z. Ma, H. Ma, Q. Li, Q. Zhai, T. Jiang, Z. Zhang, Q. Wang, Mitochondrial Transplantation Attenuates Brain Dysfunction in Sepsis by Driving Microglial M2 Polarization, *Mol. Neurobiol.* **57**, 3875–3890 (2020).

79. C. M. Comim, V. Freiburger, L. Ventura, F. Mina, G. K. Ferreira, M. Michels, J. S. Generoso, E. L. Streck, J. Quevedo, T. Barichello, F. Dal-Pizzol, Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase 1/2 prevented cognitive impairment and energetic metabolism changes in the hippocampus of adult rats subjected to polymicrobial sepsis, *J. Neuroimmunol.* **305**, 167–171 (2017).

80. J. Zhong, C. Guo, W. Hou, N. Shen, C. Miao, Effects of MFHAS1 on cognitive impairment and dendritic pathology in the hippocampus of septic rats, *Life Sci.* **235**, 116822 (2019).

81. Q. Fu, J. Wu, X.-Y. Zhou, M.-H. Ji, Q.-H. Mao, Q. Li, M.-M. Zong, Z.-Q. Zhou, J.-J. Yang, NLRP3/Caspase-1 Pathway-Induced Pyroptosis Mediated Cognitive Deficits in a Mouse Model of Sepsis-Associated Encephalopathy, *Inflammation* **42**, 306–318 (2019).

82. M.-H. Ji, L.-L. Qiu, H. Tang, L.-S. Ju, X.-R. Sun, H. Zhang, M. Jia, Z.-Y. Zuo, J.-C. Shen, J.-J. Yang, Sepsis-induced selective parvalbumin interneuron phenotype loss and cognitive impairments may be mediated by NADPH oxidase 2 activation in mice, *J. Neuroinflammation* **12**, 182 (2015).

83. R. Gao, M. Kan, S. Wang, R. Yang, S. Zhang, Disrupted Tryptophan Metabolism Induced Cognitive Impairment in a Mouse Model of Sepsis-associated Encephalopathy, *Inflammation* **39**, 550–560 (2016).

84. T. Barichello, P. Sayana, V. V. Giridharan, A. S. Arumanayagam, B. Narendran, A. Della Giustina, F. Petronilho, J. Quevedo, F. Dal-Pizzol, Long-Term Cognitive Outcomes After Sepsis: a Translational Systematic Review, *Mol. Neurobiol.* **56**, 186–251 (2019).

85. H. Li, M. A. Penzo, H. Taniguchi, C. D. Kopec, Z. J. Huang, B. Li, Experience-dependent modification of a central amygdala fear circuit, *Nat. Neurosci.* **16**, 332–339 (2013).

86. N. D. Hartley, A. D. Gaulden, R. Báldi, N. D. Winters, G. J. Salimando, L. E. Rosas-Vidal, A. Jameson, D. G. Winder, S. Patel, Dynamic remodeling of a basolateral-to-central amygdala glutamatergic circuit across fear states, *Nat. Neurosci.* **22**, 2000–2012 (2019).

87. J. McAfoose, B. T. Baune, Evidence for a cytokine model of cognitive function, *Neurosci. Biobehav. Rev.* **33**, 355–366 (2009).

88. S. S. Chavan, P. T. Huerta, S. Robbiati, S. I. Valdes-Ferrer, M. Ochani, M. Dancho, M. Frankfurt, B. T. Volpe, K. J. Tracey, B. Diamond, HMGB1 Mediates Cognitive

Impairment in Sepsis Survivors, *Mol. Med.* **18**, 930 (2012).

89. A. J. Koleske, Molecular mechanisms of dendrite stability, *Nat. Rev. Neurosci.* **14**, 536–550 (2013).

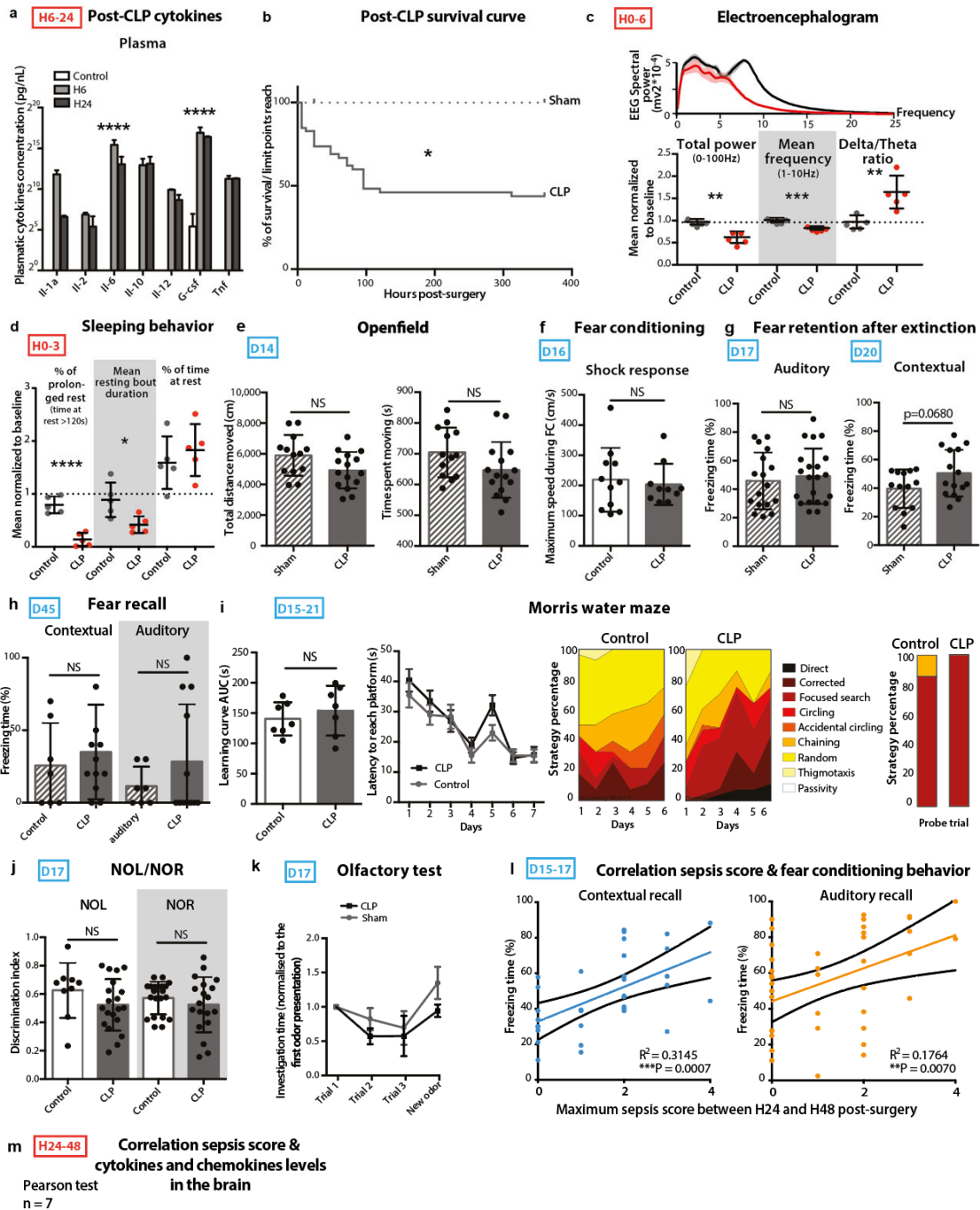
90. V. A. Kulkarni, B. L. Firestein, The dendritic tree and brain disorders, *Mol. Cell. Neurosci.* **50**, 10–20 (2012).

91. R. A. Travagli, L. Anselmi, Vagal neurocircuitry and its influence on gastric motility, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **13**, 389–401 (2016).

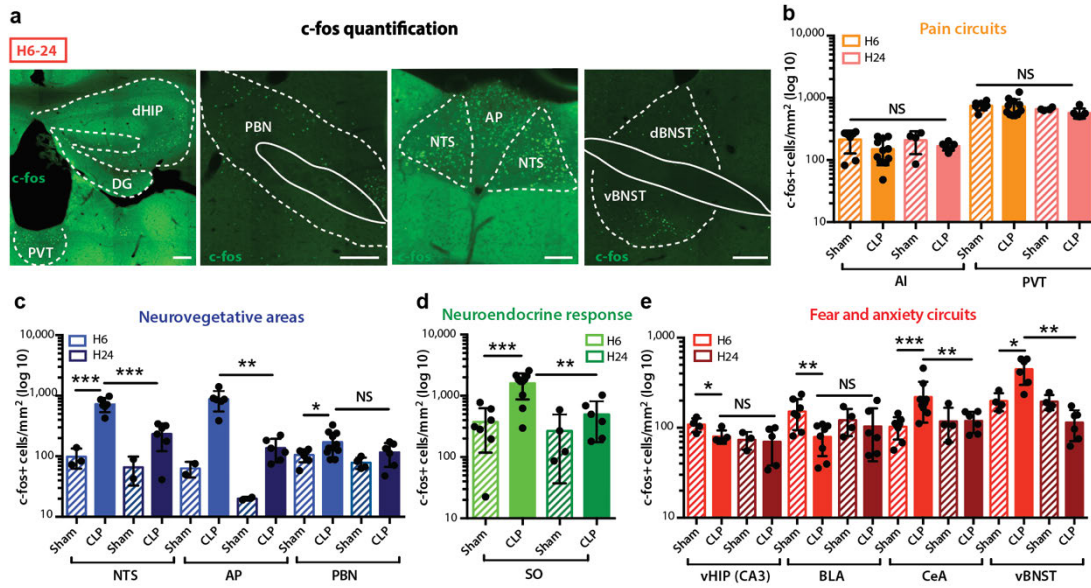
92. T. Amos, D. J. Stein, J. C. Ipser, Pharmacological interventions for preventing post-traumatic stress disorder (PTSD), *Cochrane Database Syst. Rev.* , CD006239 (2014).

93. B. B, M. Nc, D. Ll, An Evidence-Based Review of Early Intervention and Prevention of Posttraumatic Stress Disorder *Community Ment. Health J.* **53** (2017), doi:10.1007/s10597-016-0047-x.

# Supplementary figures

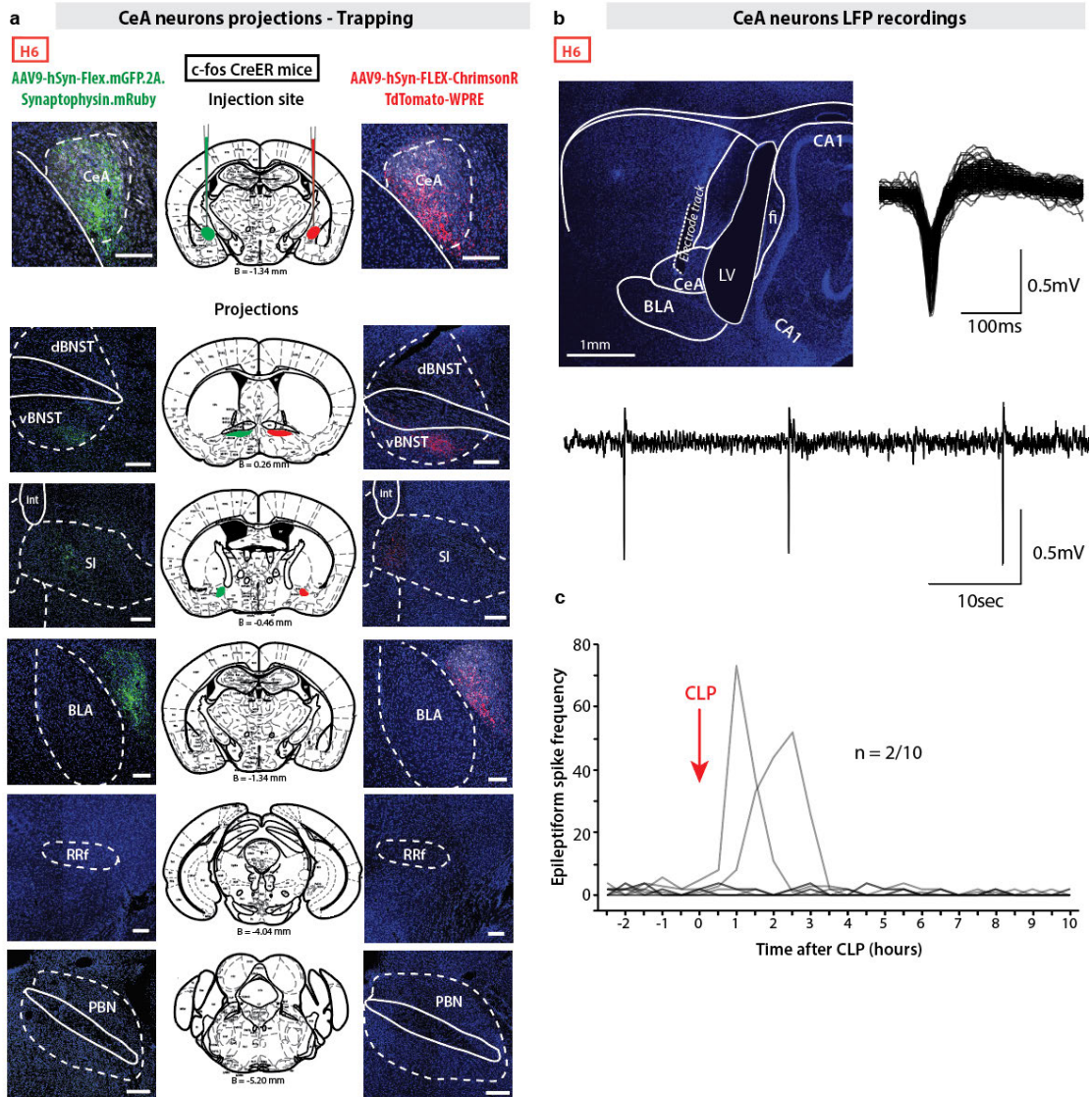


**Supplementary Figure 1. Molecular, electrophysiological and behavioral characterization of the acute and long-term effects of CLP.** **a.** Plasmatic cytokines levels were significantly increased during sepsis acute phase (Two-way ANOVA,  $n_{\text{control}}=8$ ,  $n_{\text{H6}}=4$ ,  $n_{\text{H24}}=2$ , time:  $F_{(2,74)}=26.11$ , \*\*\*\* $P<0.0001$ , multiple comparison, IL6: control-H6 \*\*\*\* $P<0.0001$ , G-CSF: control-H6 \*\*\*\* $P<0.0001$ ; Control condition for IL-1a, IL-2, IL-6, IL-10, IL-12 and TNF: below detection threshold. **b.** Survival after 400 hours post-CLP was approximately 50% (log-rank test, \* $P=0.0208$ ). **c.** CLP is followed by EEG abnormalities (Paired t-test:  $n=5$ , Total power: \*\* $P=0.0011$ ; Mean Frequency: \*\*\* $P=0.0008$ ; Delta/Theta ratio: \*\* $P=0.0060$ ). **d.** CLP mice showed an altered sleeping behavior compared to control animal ( $n=5$ , Unpaired t-tests, % of prolonged rest (time at rest $>120s$ ) \*\*\*\* $P<0.0001$ ; Mean resting bout duration: \* $P=0.0194$ ; % of time at rest ( $>20s$ ):  $P=0.4662$ ). **e.** In the OF ( $n_{\text{Sham}}=13$ ,  $n_{\text{CLP}}=15$ ), CLP showed no significant effect on the Total distance moved (Unpaired t-test:  $P=0.0518$ ) or the Time spent moving (Unpaired t-test,  $P=0.0938$ ). **f.g.h.** CLP caused no significant effect on pain threshold during FC (**f**) (Mann-Whitney test,  $n_{\text{Control}}=11$ ,  $n_{\text{CLP}}=10$ ,  $P=0.8444$ ), or on fear retention after several extinction sessions (**g**) (Unpaired t-test: Auditory:  $n=9$ ,  $P=0.6101$ ; Contextual:  $n_{\text{Sham}}=13$ ,  $n_{\text{CLP}}=15$ ,  $P=0.0680$ ), or on freezing behavior during FC recall at 45 days post-CLP (**h**) ( $n_{\text{control}}=7$ ,  $n_{\text{CLP}}=12$ , Contextual: Unpaired t-test,  $P=0.5436$ , Auditory: Mann-Whitney test,  $P=0.9399$ ). **i.j.k.** CLP does not impact long-term behavior in the Morris water maze (**i**) (Learning curve AUC: Unpaired t-test,  $n_{\text{control}}=7$ ,  $n_{\text{CLP}}=6$ ,  $P=0.4778$ ; Latency to reach platform: Two-way ANOVA,  $n=28$ , group:  $F_{(1,54)}=2.438$ ,  $P=0.1243$ ), in the NOL/NOR test (**j**) (Unpaired t-test: NOL:  $n_{\text{control}}=9$ ,  $n_{\text{CLP}}=24$ ,  $P=0.1797$ ; NOR:  $n_{\text{control}}=17$ ,  $n_{\text{CLP}}=20$ ,  $P=0.3583$ ), or in the Olfactory test (**k**) (Two-way ANOVA,  $n_{\text{sham}}=5$ ,  $n_{\text{CLP}}=10$ , \* $P=0.0148$ , group:  $F_{(1,13)}=1.393$ ,  $P=0.2591$ ). **l.m.** Higher sepsis score between H24 and H48 post-surgery correlates with later increased freezing behavior in both contextual and auditory FC recall (**l**) ( $n_{\text{Contextual}}=33$ ,  $n_{\text{Auditory}}=40$ , Pearson test) and higher cytokines levels in the brain during the acute phase of sepsis (**m**) ( $n=7$ , Pearson test). Data shown as mean  $\pm$  s.d. (except **a.i.k.**  $\pm$  s.e.m. and **l.**  $\pm$  95% confidence interval)



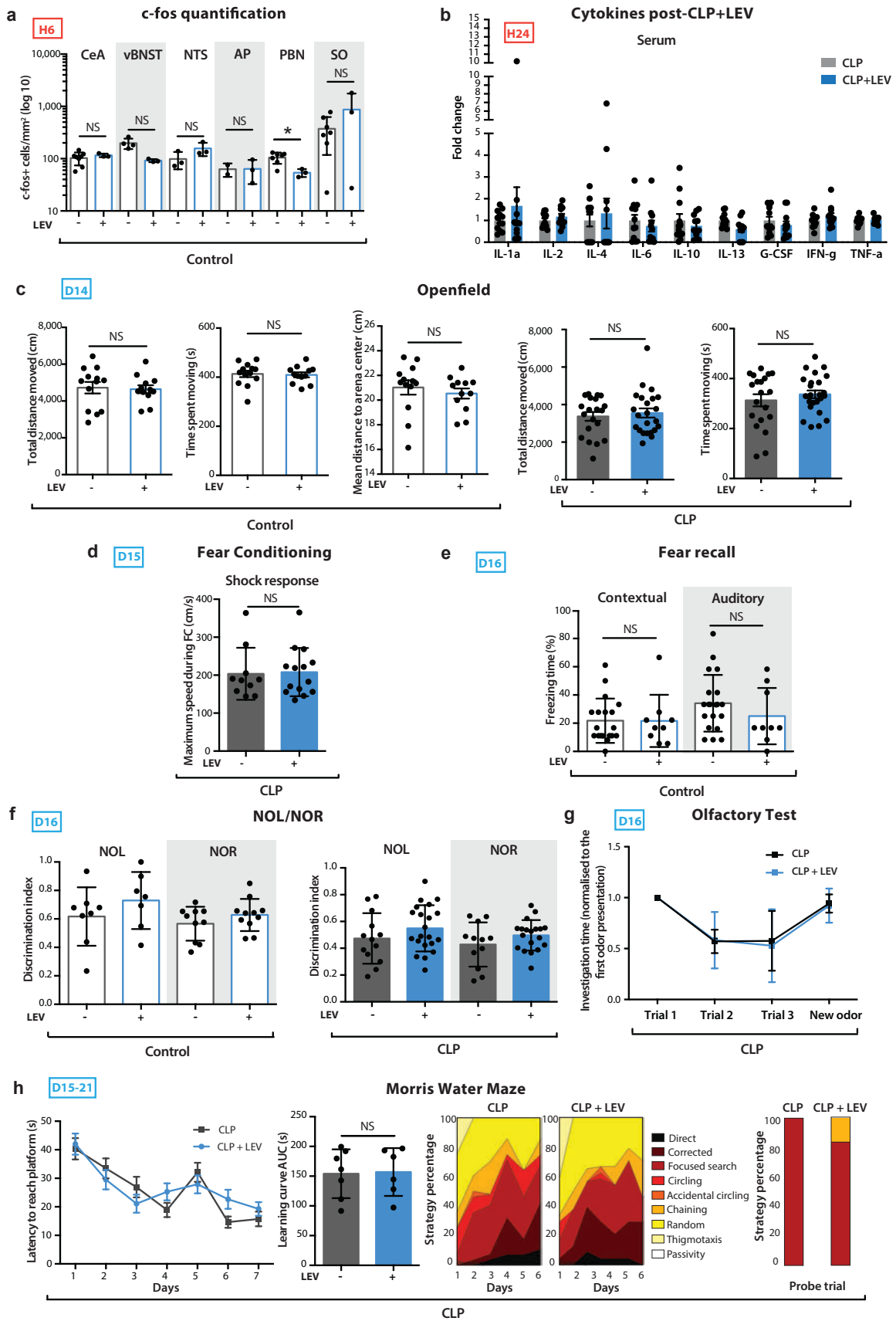
**Supplementary Figure 2. CLP-induced transient brain activation at H6 and H24 post-CLP.** **a.** Images of c-fos staining in different brain areas at H6 and H24 post-CLP. **b.c.d.e.** H6 transient c-fos expression variations were returned to baseline at H24 ( $n_{\text{shamH24}}=4$ ,  $n_{\text{CLPH24}}=6$  (except NTS and AP:  $n_{\text{shamH24}}=2$  and vHIP CA3:  $n_{\text{shamH24}}=3$ ,  $n_{\text{CLPH24}}=5$ ), CLP<sub>H6</sub>-CLP<sub>H24</sub>: Unpaired t-test: NTS: \*\*\* $P=0.0003$ ; AP: \*\* $P=0.0023$ ; PBN:  $P=0.1376$ ; SO: \*\* $P=0.0036$ ; vHIP CA3:  $P=0.5294$ ; BLA:  $P=0.3391$ ; vBNST: \*\* $P=0.0019$ ; Mann-Whitney test: CeA: \*\* $P=0.0072$ ) Scale=200  $\mu\text{m}$ . Data shown as mean  $\pm$  s.d.





**Supplementary Figure 3. Projection pattern of genetically labeled CeA neurons activated by sepsis and occurrence of epileptiform-like events in the amygdala following sepsis. a.** Representative pictures showing the soma (top) and the axonal projections (bottom) of neurons tagged using c-fos-CreER transgenic mice and two different Cre-dependant viruses injected in the CeA. In the literature, CeA PKC $\delta$ <sup>+</sup> neurons are known to project to the vBNST, the SI, the BLA, the Retrorubral field (RRf) and the PBN. Sepsis-activated CeA neurons only projected to the vBNST and the SI. **b.c.** LFP recording in the CeA during sepsis. **(b)** top left, sagittal brain section showing electrodes positioning in the CeA (dapi counterstaining). Bottom, example LFP trace one hour after CLP showing the presence of some spontaneous large recurrent stereotyped epileptiform-like spikes. Higher magnification of the waveform of sorted epileptiform-like spikes **(c)** Quantification of the presence of epileptiform-like spikes before and after CLP. Two mice over 10 presented epileptiform-like spikes in the first hours following CLP.

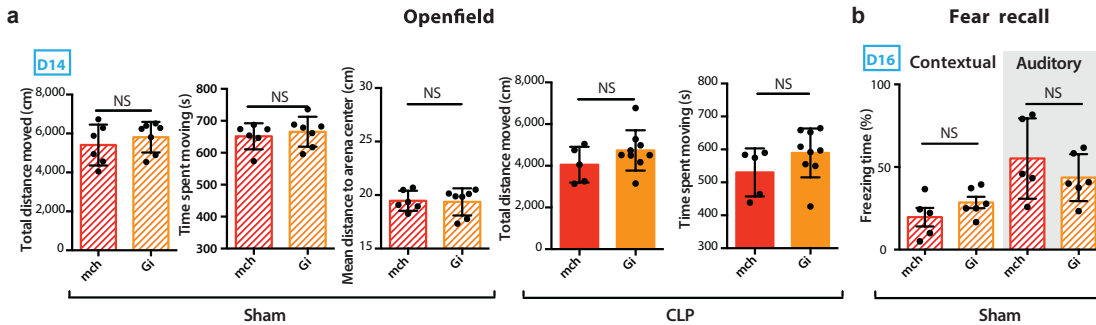




**Supplementary Figure 4. Control experiments related to the effects of LEV administration during sepsis on neuronal activation and anxiety-related behaviors.**

**a.** LEV administration in sham animals caused no significant effect on c-fos quantification at H6, except in the PBN (Mann-Whitney test: vBNST:  $n_{\text{Control}}=3$ ,  $n_{\text{Control+LEV}}=4$ ,  $P=0.0571$ , NTS:  $n_{\text{Control}}=3$ ,  $n_{\text{Control+LEV}}=3$ ,  $P=0.2000$ ; Unpaired t-test: CeA:  $n_{\text{Control}}=9$ ,  $n_{\text{Control+LEV}}=3$ ,  $P=0.7127$ , PBN:  $n_{\text{Control}}=7$ ,  $n_{\text{Control+LEV}}=3$ ,  $**P=0.0061$ ). **b.** Multiplex dosage of cytokines in serum from CLP mice treated or not with Lev. Data are presented as fold increase in Lev treated CLP compared to placebo treated CLP mice and show no significant effect of LEV on cytokines levels post-CLP ( $n_{\text{CLP}}=12$ ,  $n_{\text{CLP+LEV}}=11$ , Repeated measures ANOVA summary, LEV effect  $F_{(1,21)}=0.01092$ ,  $P=0.9178$ ). **c.** In control ( $n_{\text{control}}=13$ ,  $n_{\text{Control+LEV}}=12$ ) or CLP ( $n_{\text{CLP}}=20$ ,  $n_{\text{CLP+LEV}}=24$ ) mice, early LEV administration did not impact the OF Total distance moved (Unpaired t-test, Control:  $P=0.8339$ , CLP:  $P=0.5968$ ), or the Time spent moving (Mann-Whitney test, Control:  $P=0.8225$ , CLP:  $P=0.4021$ ), or the Mean distance to arena center in control mice (Mann-Whitney test, Control:  $P=0.5034$ ). **d.** Nociception during FC was similar in CLP mice with or without previous LEV treatment (Mann-Whitney test:  $n_{\text{CLP}}=10$ ,  $n_{\text{CLP+LEV}}=14$ ,  $P=0.8210$ ). **e.** Previous LEV administration did not affect the Fear recall response in control mice ( $n_{\text{Control}}=17$ ,  $n_{\text{Control+LEV}}=14$ , Contextual: Mann-Whitney test,  $P=0.8739$ ; Auditory: Unpaired t-test,  $P=0.2670$ ). **f.g.h.** 48-hour LEV treatment induced no effect on the NOL/NOR task (**f**) (Unpaired t-test: Control:  $n_{\text{Control}}=8$ ,  $n_{\text{Control+LEV}}=7$ , NOL:  $P=0.3034$ , NOR:  $P=0.2382$ ; CLP:  $n_{\text{CLP}}=13$ ,  $n_{\text{CLP+LEV}}=21$ , NOL:  $P=0.2418$ , NOR:  $P=0.1783$ ), the Olfactory test (**g**) (Two-way ANOVA,  $n_{\text{CLP}}=10$ ,  $n_{\text{CLP+LEV}}=8$ , group:  $F_{(1,16)}=0.0050$ ,  $P=0.9443$ ) and the Morris Water Maze (**h**) (Latency to reach platform: Two-way ANOVA:  $n=28$ , group:  $F_{(1,54)}=0.1561$ ,  $P=0.6943$ ; AUC: Unpaired t-test:  $n_{\text{CLP}}=7$ ,  $n_{\text{CLP+LEV}}=6$ ,  $P=0.8991$ ). Control LEV- or CLP LEV- data are the same that Control or CLP data in SFig.1 and 2. Data shown as mean  $\pm$  s.d. (except **g.h.**  $\pm$  s.e.m.).

CeA | AAV5-DIO-mCherry (mch) or  
AAV5-hSyn-DIO-hM4D-mCherry (Gi)  
BNST | AAVretro-PGK-Cre



**Supplementary Figure 5. Control experiments related to the pharmacogenetic silencing of vBNST-projecting CeA neurons.** **a.** In the OF, DREADD inhibition of the vBNST-projecting CeA neurons during 24 hours did not impact the Total distance moved (Unpaired t-test: Sham:  $n_{mch}=6$ ,  $n_{Gi}=7$ ,  $P=0.4481$ , CLP:  $n_{mch}=5$ ,  $n_{Gi}=9$ ,  $P=0.2128$ ), or the Time spent moving in CLP or Sham mice (Unpaired t-test: Sham:  $n_{mch}=6$ ,  $n_{Gi}=7$ :  $P=0.5750$ , CLP:  $n=10$ ,  $P=0.1758$ ), or the Mean distance to arena center in Sham mice (Unpaired t-test,  $n_{mch}=6$ ,  $n_{Gi}=7$ ,  $P=0.8774$ ). **b.** DREADD inhibition in Sham mice showed no effect on the FC recall response (Unpaired t-test:  $n_{mch}=5$ ,  $n_{Gi}=6$ , Contextual:  $P=0.1964$ ; Auditory:  $P=0.3503$ ). Data shown as mean  $\pm$  s.d.

RESULTATS

-

ARTICLE #2

## ARTICLE #2

### **Implication du nerf vague dans le recrutement induit par le sepsis des circuits de l'amygdale étendue et la survenue des séquelles anxio-dépressives.**

Travail en cours

#### ***Résumé***

Le sepsis se définit comme une dysfonction d'organe mettant en jeu le pronostic vital et causée par une réponse immunitaire dérégulée de l'hôte face à une infection grave. Les séquelles du sepsis comprennent des troubles psychiatriques à long terme tels que l'anxiété ou la dépression. Le nerf vague est un relai majeur des signaux inflammatoires périphériques vers le cerveau. Dans un modèle murin de sepsis par ligature et ponction cæcale (CLP), nous avons montré que le comportement anxio-dépressif observé à long terme après le sepsis était réduit chez les souris préalablement vagotomisées. De plus, la vagotomie sous-diaphragmatique limitait l'activation neuronale pathologique induite par le sepsis, spécifiquement dans le complexe vagal et certaines sous-régions de l'amygdale étendue. Ces données suggèrent que le nerf vague contribue à l'activation d'un circuit cérébral spécifique pendant le sepsis, qui pourrait être responsable des troubles comportementaux ultérieurs.

# Impact of the vagus nerve on extended amygdala recruitment and long-term anxiodepressive behavior following sepsis

Lena Bourhy<sup>1,2,3,4†</sup>, Estéban Hecquet<sup>2,3</sup>, Jarod Levy<sup>2,3</sup>, Pierre-Marie Lledo<sup>2,3‡\*</sup>,  
Tarek Sharshar<sup>1,4,5‡</sup>, Gabriel Lepousez<sup>2,3‡\*</sup>.

## Author affiliations

<sup>1</sup> Laboratory for Experimental Neuropathology, Institut Pasteur, Paris, France

<sup>2</sup> Laboratory for Perception and Memory, Institut Pasteur, Paris, France

<sup>3</sup> CNRS UMR 3571, Paris, France

<sup>4</sup> Université de Paris, Paris, France

<sup>5</sup> GHU Paris Psychiatrie Neurosciences, Service hospitalo-universitaire de Neuro-anesthésie réanimation, Paris, France

‡ These authors jointly supervised this work

\* Correspondence to Gabriel Lepousez & Pierre-Marie Lledo, Laboratory for Perception and Memory, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France. Email : [gabriel.lepousez@pasteur.fr](mailto:gabriel.lepousez@pasteur.fr), [pierre-marie.lledo@pasteur.fr](mailto:pierre-marie.lledo@pasteur.fr)

## Abstract

Sepsis is a life-threatening disease induced by a deregulated host response to severe infection. Post-sepsis syndrome includes long-term psychiatric disorders, such as persistent anxiety and depressive-like behavior. The vagus nerve is a major relay of peripheral inflammatory signals to the brain. Combining subdiaphragmatic vagotomy (VAG) with the reference model of sepsis induced by intra-abdominal cecal ligation and puncture (CLP), we showed that long-term anxiodepressive behavior observed post-sepsis was reduced in mice previously vagotomized. Moreover, VAG limited the sepsis-induced pathological neuronal activation specifically in the vagal complex and some subregions of the extended amygdala. These data suggest that the vagus nerve contributes to the activation of a specific brain circuit during sepsis which may be responsible for the later behavioral impairments.

## Introduction

Sepsis is a life-threatening disease that is characterized by a systemic inflammatory response to bacterial infection, which can end-up in multiple organ failures. It is a medical emergency that, despite adequate early treatment, remains associated with a high mortality and increased long-term morbidities impacting the quality of life of survivors. It affects 50 million patients per year worldwide, with a growing incidence and is consequently an increasing burden in public health. In 2017, considering its importance and complexity, the World Health Organization declared sepsis a global health priority, by adopting a resolution to improve the prevention, detection and the clinical management of sepsis (1).

The acute effect of sepsis on the brain ranges from sickness behavior to encephalopathy. Sickness behavior is considered as an adaptative response to systemic inflammatory response, notably triggered by bacterial infection. It is characterized by behavioral (social withdrawal), and cognitive dysfunction (attention impairment), sleepiness and psychological changes along with activation of the neuroendocrine (i.e. vasopressin and adrenal axes) and autonomic systems (2). In addition to sickness behavior, a sepsis-associated encephalopathy (SAE) is observed in 50 to 70% of cases. The SAE is characterized by consciousness impairments - ranging from delirium to coma - and by pathological electroencephalographic changes (3). It is also associated with increased mortality and long-term morbidity. Indeed, patients who survive SAE and do not present any sign of lasting infection develop later on long-term cognitive impairments, characterized by durable alterations of memory, attention and executive functions as well as psychiatric disorders that can include depression, anxiety and post-traumatic stress disorder which may ultimately lead to suicide (4-6).

So far, the cellular and molecular mechanisms occurring during the acute phase of sepsis, and responsible for the secondary chronic psycho-cognitive disorders are poorly understood. Three non-exclusive processes are currently considered, including ischemia, neuroinflammation and cellular metabolic stress. During sepsis acute phase, all these processes can directly or indirectly alter the neuronal circuit structures and functions, especially in the specific brain regions involved

in the sickness behavior and the “response to stress”. The neuropathological study of brains of patients who died from sepsis constantly evidenced an enhanced neuronal apoptosis and microglial activation in key areas involved in the neurovegetative (nucleus of the tractus solitarii (NTS), parabrachial nucleus (PBN)), neuroendocrine (paraventricular nucleus (PVN) and supra-optic nucleus (SO) of the hypothalamus) and behavioral functions (amygdala and hippocampus (HIP)) (7). In rodent models, these structures also display strong neuronal activation during sepsis, especially in the extended amygdala, which includes the central amygdala (CeA) and the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) (8). The extended amygdala plays a predominant role in the physiopathology of anxiety and mood disorders and its transient activation during sepsis has been interestingly demonstrated as necessary for the occurrence of long-term anxiety and fear behavior (9).

It must be noted that neither sickness behavior nor SAE are related to direct brain infection. Sepsis induces an inflammatory message that signals from the periphery to the brain via the humoral and the neural pathways. The humoral pathway includes 1) direct passage of inflammatory mediators into the cerebral parenchyma through the fenestrated capillaries of the circumventricular organs (such as in the area postrema (AP)) and 2) the blood vessels indirect relay via chemokines secretions in response to circulating inflammatory mediators. The neural pathway involves the peripheral nerves that locally sense inflammatory mediators and transfer the information to the brain. Among the peripheral nerves, the vagus nerve is very important in relaying visceral and cardio-thoracic inflammatory messages to the vagal complex in the brainstem, constituted of the NTS and the AP (10). The vagal complex participates in the control of autonomic and peripheral processes such as temperature regulation, blood pressure (via vasomotor tone), heart rate, respiration rate, gastro-intestinal motility, anti-inflammatory response as well as some key pharyngeal reflexes such as vomiting. Interestingly, administration of the bacterial endotoxin lipopolysaccharide (LPS), cytokines, or pathogens has been shown to stimulate vagus nerve signalling in rodents, illustrated by the increased expression of the neuronal activation marker cFos in the NTS (11). In addition, VAG (i.e. bilateral section of the abdominal branches of the vagus nerve) blocks the development of the sickness behavior



induced by intraperitoneal injection of LPS (12, 13). However, the role of the vagus nerve in the long-term behavioral disorders observed post-sepsis is still unknown.

Interestingly, it is possible to experimentally reproduce in mice the sepsis-induced brain responses observed in SAE patients, with the common model of caecal ligation and puncture (CLP), which corresponds to a polymicrobial intra-abdominal infection. Data obtained in our unit as well as in other laboratories showed that CLP mimics the major clinical features and pathophysiological processes of human sepsis-induced brain response. It also leads to long-term anxiodepressive-like behavior in mice. Given the key role of vagal inputs in relaying inflammatory signals, we combined in this study VAG and CLP models to evaluate to what extent the vagus nerve is involved in the sepsis-induced pathological brain activation and the long-term behavior impairments observed in CLP mice.

## Methods

**Animals.** Adult (2-5 months old) wild-type male C57Bl/6JRj mice (Janvier labs, Le Genest-Saint-Isle, France) were housed under a 12-h light/dark cycle, with dry food and water available ad libitum. All procedures were consistent with the European Union guidelines (EU Directive 2010/63/EU) for animal experiments and were reviewed and approved by the Animal Welfare Committee of the Institut Pasteur (Projects numbers: 2015-004, 2013-0086, dap180018 and dap200025).

**Subdiaphragmatic vagotomy (VAG).** Mice were treated for analgesia and rehydration 30 minutes before surgery with subcutaneous (SC) injection of buprenorphine (0.1mg/Kg, Buprecare, Axience, Pantin, France) and saline (NaCl 0.9%). The VAG surgery was achieved under general anesthesia (Isoflurane, 4% for induction in inhalation chamber, then maintained during the surgery at 1.5% with 98.5% oxygen). Mice were placed on a heating pad to maintain body temperature at 37°C during the procedure. Absence of reaction to leg and tail pinch was checked before incision of the abdominal wall previously shaved and cleaned with betadine (soap and solution). The abdomen cavity was maintained opened, and the stomach was isolated from the liver and the gut using surgical tensioners and humidified compresses. Under binocular loop, the gastric anterior branch of the vagus nerve was identified at the junction between the esophagus and the stomach, grasped with a surgical clip and cut on a segment of 2 to 3 mm with surgical scissors. The same protocol was achieved for the gastric posterior branch of the vagus nerve. Compresses and tensors were then removed, and the abdominal muscles and peritoneum were sutured in two separate plans. Buprenorphine and saline SC injections were performed every 12 hours until complete recovery. VAG- animals underwent the same anesthetic, analgesic, and surgical protocol that VAG+ mice except for the grasp and the section of the vagus nerve branches.

**Cholecystokinin (CCK) test.** Two weeks after VAG, mice were isolated and left 24 hours in their new cage for habituation. At the end of the habituation period, they were fasted for another 24 hours and then injected with CCK-8 (40ug/kg ip diluted in NH<sub>4</sub>OH 0.05 M) and immediately offered a new pellet for 1 hour. A group

of naïve mice following the same protocol but injected with PBS was added as a control condition of basal food intake after 24-hour fasting. The pellet weight was measured before and one hour after injection. The difference of the pellet weight was normalized to the mouse weight.

**Cecal ligation and puncture (CLP) surgery.** Mice were treated for analgesia and rehydration 30 minutes before surgery with SC injection of buprenorphine (0.1mg/Kg, Buprecare, Axience, Pantin, France) and saline (NaCl 0.9%). The CLP surgery (~10 min) was achieved under general anesthesia (Isoflurane, 4% for induction in inhalation chamber, then maintained during the surgery at 1.5% with 98.5% oxygen). Mice were placed on a heating pad to maintain body temperature at 37°C during the procedure. Absence of reaction to leg and tail pinch was checked before incision of the abdominal wall previously cleaned with ethanol 70%, and then incision of the peritoneum. Caecum was exposed and a loose ligation was achieved at its external third with Mersilk 4.0 (Ethicon, Cincinnati, USA). Two transfixing punctures were performed avoiding blood vessels with a 21G needle. Feces were expressed and spread on caecum before suturing abdominal muscles and peritoneum in two separate plans. Buprenorphine and saline SC injections were then performed every 12 hours until complete recovery. We evaluated sepsis severity every 12 hours for 72 hours using the sepsis score, which evaluates the clinical signs of local (abdominal spasm) and systemic reaction to sepsis (rectal temperature, fur erection, abnormal breathing), the behavioral changes (feces cleaning, presence of periocular dried eye drop, incomplete palpebral opening, spontaneous activity in the cage, the escape attempt after tail grabbing) and muscular weakness (ability to grip to forceps, body tone, difficulty to walk). Each item of the scale was scored 0 or 1, with a total score ranging from 0 (normal) to 12 (highly severe). For ethical reason, mice with a sepsis score  $\geq 6$  and a temperature  $\leq 35.3^\circ\text{C}$  were euthanized. CLP mice were compared to Sham animals that only underwent a laparotomy procedure with the same anesthetic and analgesic protocol than CLP mice. CLP and sham surgery were performed in the morning (Zeitgeber time 3-5).

**Behavioral experiments.** Behavioral assays started 15 days after CLP. For each experiment, mice were transported in their home cage to the experiment

room 45 min prior experiments. A 100-lux light was used, and mice were tracked with a JVC lowlux camera (Yokohama, Japan) fixed to the ceiling above the arenas.

**Openfield.** Open field arenas were composed of four opaque 50x50x50 cm squared cages without bedding, disposed in a 2x2 rectangle. Spatial cues consisted in three vertical lines or a triangle of green labeling tape onto opposing north and south walls. Mice were released in the center facing a given wall and were allowed to freely move and explore the cage for 15 min. Total distance moved (cm), mean distance to center (cm) and time spent moving (s) were computed from tracked videos with ethovision XT software.

**Tail suspension test.** A tape was stuck at the end of the tail of the animal, and then attached to a hook, constraining the mouse to be suspended by the tail for 6 minutes. While suspended, tested mice were separated from each other by an opaque plastic wall that prevented them from seeing each other. The total time spent immobile during the test was timed on live. A blind second evaluation of the time spent immobile was achieved based on the videos recorded during the sessions.

**Immunohistochemistry.** Mice were euthanized by an intra-cardiac infusion of 0.9% NaCl and 4% Formol under deep anesthesia (xylazine 20 mg/kg, ketamine 100 mg/kg). Brains were extracted with forceps after incision of the skin and medial section of the skull with fine scissors. Brains were post-fixed with Formol 4% for 2 hours, then rinsed with phosphate buffered saline (PBS) before being stored in PBS with 30% sucrose. Brains were then coronally cut into 60 µm thick sections with a freezing microtome (Leica). The sections of interest were stored in PBS with 0.01% Azide. The immuno-labelling protocol begun with a permeabilization step using PBS with 0.2% Triton X-100 (PBST 0.2%) and 10% Normal Donkey Serum (NDS, Abcam, Ab7475) blocking agent for 2 hours under constant agitation. Primary antibodies diluted according to the supplier's recommendations were then incubated with PBST 0.2%, NDS 10% and azide 0.01%, at 4°C with constant agitation for 2 days. Primary antibody used was cFos (1:1000, Rabbit, Santa Cruz, Sc-52/Ch; 1:1000, Rabbit, Abcam, Ab190289). After three 5-minute washes with PBS, sections were incubated with either Alexa Fluor

488, 568 or 647-conjugated secondary antibodies (Invitrogen, ThermoFisher) with PBST 0.2%, NDS 2% and DAPI (0.01%) at room temperature with constant agitation for 2 hours. After three 5-minute washes with PBS, slices were mounted on slides with a mounting medium (FluoroMount-G, Interchim). Image acquisition was carried out with a digital slide scanner (Axio Scan, ZEISS). cFos quantification was achieved using the “spot detection” function of ICY software (Institut Pasteur, France Bioimaging), allowing to count the number of cFos+ cells in brain areas previously drawn on the slides’ images via the ROI (Region of interest) function of the same software. The brain areas were identified according to the reference *Allen brain atlas (14)*.

**Statistical analysis.** All experiments and data analyses were achieved blinded, unless otherwise stated. In the figures are indicated the number of subjects used in each experimental condition and the data are expressed as mean  $\pm$ SD. Two-sided statistical analyses were performed with GraphPad Prism 6.0. No statistical methods were used to pre-determine sample size, or to randomize. Samples’ normality was previously tested using D’Agostino & Pearson omnibus normality test. For analysis of variance tests, we used ANOVA tests with multiple comparisons. In behavioral experiments, outliers were identified using Grubbs’ Method ( $\alpha=0.05$ ) and then removed. For survival analysis, we use Log-rank tests. Statistical significance was set at \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001.

**Data availability.** The datasets generated during the current study is available from the corresponding authors upon reasonable request.

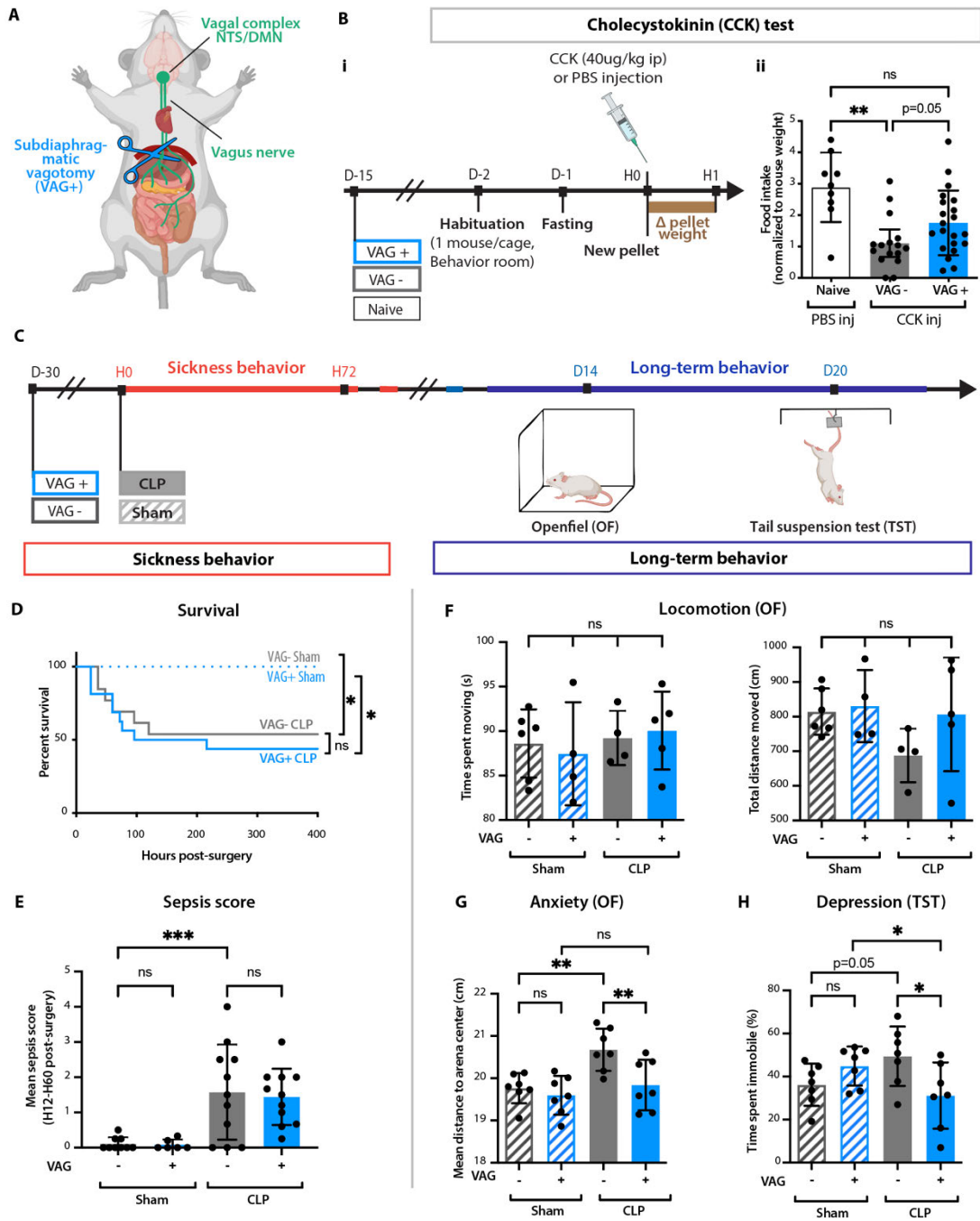
## Results

### **Validation of VAG model.**

To assess the role during sepsis of the vagus nerve in the induction of long-term anxiodepressive behavior, we used the model of subdiaphragmatic sections of the abdominal branches of the vagus nerve (VAG) to suppress vagal communication at the abdominal level, leaving intact thoracic and cardiac vagal innervation (Fig.1A). Vagotomized mice (VAG+) were compared to non-vagotomized animals (VAG-) that underwent the same anesthetic and surgical procedure that VAG+ animals except for the vagus nerve sections. VAG was validated with a cholecystokinin (CCK) test two weeks after surgery (Fig. 1B). The results showed that VAG- mice injected with CCK ate significantly less than naïve mice injected with PBS, confirming CCK effect over satiety. On the contrary, CCK injection showed no effect in VAG+ mice, validating the suppression of abdominal vagal relays (Fig. 1B).

### **VAG has no effect on sepsis-induced sickness behavior.**

To study the role of the vagus nerve in the development of post-sepsis behavioral alterations, CLP surgery was achieved 4 weeks after VAG (Fig.1C). CLP mice were compared to sham animals that only underwent a laparotomy procedure with the same anesthetic and analgesic protocol as CLP mice. CLP mortality was approximately 50%, similarly in VAG+ and VAG- animals (Fig.1D). A sepsis score using clinical and behavioral criteria was set to regularly evaluate over time the symptoms developed post-surgery. VAG- and VAG+ mice exhibited the same increase of the sepsis score between 12 hours (H12) and 60 hours (H60) post-CLP, compared to sham animals (Fig. 1E). Likewise, mortality and sepsis score were similar in Sham animals, independently of previous VAG surgery. Taken together, these results highlighted that VAG had no effect on mortality or sickness behavior during sepsis.



**Figure 1. VAG suppresses long-term anxiodepressive-like behavior in CLP mice.** **A.** Schematic of VAG surgery. **B.** Validation of the VAG model using CCK test **i.** Timeline of experiment. **ii.** Compared to naïve mice injected with PBS, food intake after 24-hour fasting was significantly decreased in VAG- mice but not in VAG+ mice (Kruskal Wallis test:  $n_{\text{naive}}=9$ ,  $n_{\text{VAG-}}=16$ ,  $n_{\text{VAG+}}=21$ ,  $**P=0.0018$ , *m.c.* naïve vs VAG-:  $**P=0.012$ , naïve vs VAG+:  $P=0.0515$ , VAG- vs VAG+  $P=0.0567$ ). **C.** 30 days after VAG, mice underwent either Sham or CLP surgery and their behavior was tested 15 days after in the OF and the TST. **D.** CLP mortality was approximately 50% in VAG-CLP and VAG+CLP mice (Log-rand test:  $n_{\text{VAG-Sham}}=8$ ,  $n_{\text{VAG+Sham}}=7$ ,  $n_{\text{VAG-CLP}}=13$ ,  $n_{\text{VAG+CLP}}=16$ , VAG-Sham vs VAG-CLP:  $*P=0.0389$ ; VAG+Sham vs VAG+CLP:  $*P=0.0185$ ; VAG-CLP vs VAG+CLP:  $P=0.5966$ ). **E.** Mean sepsis score between H12 and H60 was significantly increased in CLP compared to Sham animals, with no influence of VAG ( $n_{\text{VAG-Sham}}=9$ ,  $n_{\text{VAG+Sham}}=6$ ,  $n_{\text{VAG-CLP}}=n_{\text{VAG+CLP}}=10$ ; group(Sham vs CLP)  $****P<0.0001$ ; *m.c.* VAG-Sham vs VAG+Sham:  $P=0.9616$ ; VAG-Sham vs VAG-CLP:  $***P=0.0007$ ; VAG-CLP vs VAG+CLP:  $P=0.7186$ ). **F.** At D15, all mice ( $n_{\text{VAG-Sham}}=6$ ,  $n_{\text{VAG+Sham}}=4$ ,  $n_{\text{VAG-CLP}}=4$ ,  $n_{\text{VAG+CLP}}=5$ ) showed the same time spent moving (group(Sham vs CLP)  $P=0.4338$ , group(VAG- vs VAG+)  $P=0.9374$ ; *m.c.* VAG-Sham vs VAG+Sham:  $P=0.6842$ ; VAG-Sham vs VAG-CLP:  $P=0.8267$ ; VAG-CLP vs VAG+CLP:  $P=0.7771$ ) and total distance moved in the OF (group(Sham vs CLP)  $P=0.1603$ , group(VAG- vs VAG+)  $P=0.2062$ ; *m.c.* VAG-Sham vs VAG+Sham:  $P=0.8217$ ; VAG-Sham vs VAG-CLP:  $P=0.0939$ ; VAG-CLP vs VAG+CLP:  $P=0.1276$ ). **G.** The CLP-induced increase of the mean distance to the arena center in the OF is normalized in VAG+CLP mice ( $n=7$ , group(Sham vs CLP)  $**P=0.0046$ , group(VAG- vs VAG+)  $*P=0.0120$ , interaction  $P=0.0825$ ; *m.c.* VAG-Sham vs VAG+Sham:  $P=0.5271$ ; VAG-Sham vs VAG-CLP:  $**P=0.0019$ ; VAG-CLP vs VAG+CLP:  $**P=0.0038$ , VAG+Sham vs VAG+CLP:  $P=0.3614$ ). **H.** At D20, VAG-CLP mice displayed an increased time spent immobile in the TST, illustrative of a depressive-like behavior, which is canceled in VAG+CLP. ( $n=7$ , interaction  $**P=0.0078$ ; *m.c.* VAG-Sham vs VAG+Sham:  $P=0.1988$ ; VAG-Sham vs VAG-CLP:  $P=0.0549$ ; VAG-CLP vs VAG+CLP:  $*P=0.0103$ , VAG+Sham vs VAG+CLP:  $*P=0.0476$ ). Statistics: **E-F.** Two-way ANOVA and multiple comparison (*m.c.*) tests. Data shown as mean  $\pm$  s.d. H: hours post-surgery, D: days post-surgery.

## **VAG suppresses long-term anxiodepressive behavior in septic mice.**

Long-term behavior was then assessed with the openfield test (OF) at fifteen days post-CLP (D15) and the tail suspension test (TST) at D20, when mice had fully recovered from sepsis. Importantly VAG showed no effect on Sham mice in the OF and the TST tests (Fig.1F-H). Besides, Sham and CLP animals exhibited similar time spent moving and total distance moved in the OF independently of VAG, underscoring no effect of CLP or VAG on locomotion at D15 (Fig.1F). On the contrary, VAG-CLP mice showed an increased mean distance to the arena center in the OF compared to VAG-Sham mice, illustrating a post-CLP anxiety-like behavior in VAG- animals at D15 (Fig.1G). Interestingly, this increased mean distance to the arena center in the OF was normalized to Sham levels in VAG+CLP mice (Fig.1G). Depressive-like behavior was then assessed using the TST at D20, which highlighted a tendency of an increased time spent immobile in VAG-CLP mice compared to VAG-Sham mice (Fig.H). However, mice immobility in the TST was significantly decreased in VAG+CLP mice compared to VAG-CLP mice (Fig.H). These results indicate that VAG may have a protective effect over the outcome of long-term anxiodepressive-like behaviors developed post-sepsis.

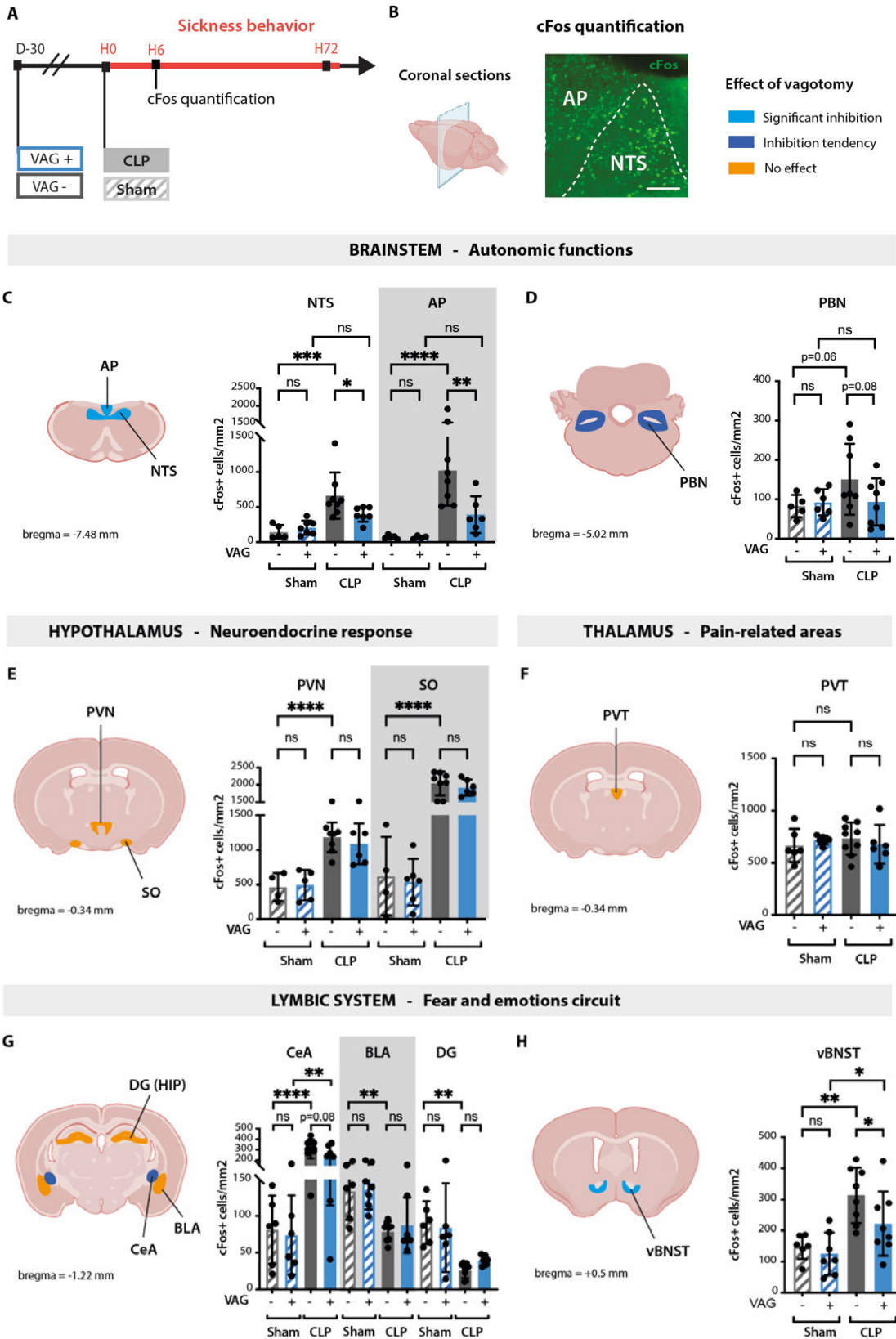
## **Vagus nerve drives the specific neuronal activation of the vagal complex and the extended amygdala during sepsis.**

To decipher how VAG may influence post-sepsis long-term behavior, we decided to characterize the brain activity changes during the acute phase of sepsis. The expression level of the neuronal activation marker gene cFos was measured at H6 post-CLP (Fig.2A-B). We focused on the regions previously reported to be activated in the H6 post-CLP (9). In these brain areas, VAG had no effect on cFos expression in Sham animals (Fig.2C-H). In contrast, cFos expression was increased after CLP in VAG- mice, in brainstem nuclei coordinating the neurovegetative system (NTS, AP and PBN) and in the hypothalamus centers controlling neuroendocrine responses (PVN and SO) (Fig.2C-E). Strong variations of cFos expression were also observed in VAG-CLP mice in brain regions classically



involved in anxiety and emotions regulation, with a transient activation in the CeA and the ventral BNST (vBNST), and decreased activity in the dentate gyrus of the dorsal hippocampus (dDG) and the basolateral amygdala (BLA) (Fig.2G-H). Importantly, cFos levels in areas involved in pain perception (paraventricular nucleus of the thalamus (PVT)) were similar independently of VAG or CLP surgeries, ruling out any contribution of nociception to the sepsis-induced cFos variations observed (Fig.2F). Post-CLP activation of the neuroendocrine areas was similar in VAG- and VAG+ animals. However, the increased cFos expression observed at H6 specifically in the vagal complex and in the vBNST in VAG-CLP mice was significantly reduced in VAG+CLP mice (NTS: -40.0%, AP: -61.6%; Fig.2C-D; vBNST: -29.0%, Fig.2G-H), but remained much higher compared to VAG-Sham. Although not significant, post-CLP cFos levels also exhibited a tendency of decrease in the CeA and the PBN in VAG+ mice compared to VAG- mice (CeA: -25.4%, PBN: -37.9%). These data suggest that the abdominal branches of the vagus nerve have a mild but significant contribution in the activation of the vagal complex and the extended amygdala during the acute phase of sepsis.

**Figure 2 (on the right). VAG decreases the CLP-induced acute brain activation specifically in the brainstem and the extended amygdala. A.B.** cFos gene expression was quantified at H6 (scale=50um). **C.D.** In the brainstem areas involved in the neurovegetative response to inflammation, cFos expression was increased post-CLP in VAG- mice but not in VAG+mice (NTS: interaction \*P=0.0496; *m.c.* VAG-Sham vs VAG+Sham: P=0.6134; VAG-Sham vs VAG-CLP: \*\*\*P=0.0002; VAG-CLP vs VAG+CLP: \*P=0.0179; VAG+Sham vs VAG+CLP: P=0.0907; AP: interaction \*P=0.0422, *m.c.* VAG-Sham vs VAG+Sham: P=0.9826; VAG-CLP vs VAG+CLP: \*\*P=0.0024; VAG+Sham vs VAG+CLP: P=0.1493; PBN: interaction P=0.1893, *m.c.* VAG-Sham vs VAG+Sham: P=0.8050; VAG-Sham vs VAG-CLP: P=0.0699; VAG-CLP vs VAG+CLP: P=0.0815; VAG+Sham vs VAG+CLP: P=0.9684). **E.** cFos expression is highly increased post-CLP in neuroendocrine regions of the hypothalamus, with no effect of VAG (PVN: group(Sham vs CLP) \*\*\*\*P<0.0001; *m.c.* VAG-Sham vs VAG+Sham: P=0.8662; VAG-CLP vs VAG+CLP: P=0.4712; SO: group(Sham vs CLP) \*\*\*\*P<0.0001; *m.c.* VAG-Sham vs VAG+Sham: P=0.7067; VAG-CLP vs VAG+CLP: P=0.5589). **F.** In the PVT, implicated in pain perception, cFos quantification was similar independently of CLP/Sham or VAG+/VAG- surgeries (group(Sham vs CLP) P=0.8379, group(VAG+ vs VAG-) P=9880; *m.c.* VAG-Sham vs VAG+Sham: P=0.5453; VAG-Sham vs VAG-CLP: P=0.4111 VAG-CLP vs VAG+CLP: P=0.4940). **G.H.** CLP induced variations of cFos expression in brain areas involved in anxiety and emotions regulation in VAG- mice, illustrated by an activation of the CeA and the vBNST and an inhibition of the BLA and the dDG. CLP-induced activation in the CeA and the vBNST was suppressed in VAG+ mice. (CeA: group(Sham vs CLP) \*\*\*\*P<0.0001; *m.c.* VAG-Sham vs VAG+Sham: P=0.8804; VAG-CLP vs VAG+CLP: P=0.0847; VAG+Sham vs VAG+CLP: \*\*P=0.0029; BLA: group(Sham vs CLP) \*\*\*P=0.0001; *m.c.* VAG-Sham vs VAG+Sham: P=0.5466; VAG-Sham vs VAG-CLP: \*\*P=0.0047; VAG-CLP vs VAG+CLP: P=0.6240; dDG: group(Sham vs CLP) \*\*\*P=0.0002; *m.c.* VAG-Sham vs VAG+Sham: P=0.7000; VAG-Sham vs VAG-CLP: \*\*P=0.0010; VAG-CLP vs VAG+CLP: P=0.4199; vBNST : group(Sham vs CLP) \*\*\*P=0.0002; *m.c.* VAG-Sham vs VAG+Sham: P=0.6069; VAG-Sham vs VAG-CLP: \*\*P=0.0010; VAG-CLP vs VAG+CLP: \*P=0.0353; VAG+Sham vs VAG+CLP: \*P=0.0299). Statistics: Two-way ANOVA and multiple comparison (*m.c.*) tests. Data shown as mean  $\pm$  s.d. \*\*\*\*P<0.0001. H: hours post-surgery.



## Discussion

Taken together, these results highlight that vagus nerve integrity during sepsis has a significant contribution to the subsequent development of long-term anxiety and depressive-like behaviors. Besides, vagus nerve plays a role in the neuronal activation observed at H6 post-CLP specifically in the vagal complex and the extended amygdala.

Interestingly, we showed in this study that VAG had no effect on mortality, sickness behavior and hypothalamus activation during the hours following CLP induction, suggesting that the acute response to sepsis is similar in VAG- or VAG+ animals. On the contrary, several studies have highlighted that VAG modified the acute response to LPS injection, with a positive effect over the immune response, sickness behavior and hypothalamus activation (13, 15). This mismatch between our results may be explained by the difference in the models used. Indeed, CLP is a much more severe inflammatory model than LPS injection. Contrary to LPS, it induces a polymicrobial infection with a large spectrum of the host intestinal microbiota, which recreates the characteristic cytokines storm observed in septic patients (16). It is likely that other pathways than the vagus nerve are recruited during CLP-induced sepsis, such as the humoral pathway, which leads to an equal physiological and behavioral response post-CLP, independently of the vagus nerve integrity (17).

Although VAG did not seem to influence the acute phase of the disease, VAG showed a beneficial effect over long-term anxiety and depressive-like behavior post-CLP. We only used two different tests - i.e., the OF and the TST - to evaluate long-term behavioral changes. In a previous study, we have characterized in a much more complete manner the post-sepsis behavioral impairments, identifying an additional PTSD-like phenotype to the anxio-depressive sequels observed at 15 days post-CLP(9). Further experiments (including evaluation of fear responses) would be needed to assess the long-term impact of VAG over the full spectrum of post-CLP behavioral alterations.

VAG also reduced the transient activation of the NTS, AP and vBNST during sepsis acute phase. The reduced activation of the vagal complex in VAG+ mice proves that

the vagus nerve is highly activated during the acute phase of sepsis and leads to the neuronal activation of its major output regions, namely the NTS and the AP. In a previous study published in 2021 (9), we showed that the pharmacogenetic inhibition of the CeA neurons projecting to the vBNST during the first hours following CLP is sufficient to counteract the long-term anxiety behavior. Using retrograde virus labelling, we also demonstrated that one of the major inputs of those CeA-to-vBNST neurons activated during sepsis is the PBN, which itself is known to receive major inputs from the vagal system (9, 18). However, PBN activation is not significantly impacted by VAG at H6 post-CLP. Nevertheless, it includes multiple sub-populations with different connectivity. PBN neurons projecting to the CeA and the BNST constitute an already well-characterized PBN subpopulation, that expresses the calcitonin gene related peptide (CGRP) and mediates appetite, fear and aversion behaviors. cFos quantification among the CGRP-positive neurons of the PBN would allow a much more specific evaluation of the VAG impact over the post-CLP PBN-to-CEA/BNST pathway activation. Considering these data, we hypothesized that vagus nerve activation during sepsis acute phase leads to the sequential recruitment of a specific circuit NTS/AP->PBN->CeA/vBNST which results in the transient activation of the extended amygdala responsible for the long-term behavioral impairment. However, this study does not present any proof of this possible causality.

To be able to test this hypothesis, we would need to develop another method to manipulate more selectively and reversibly the vagus nerve activity. Indeed, VAG lacks specificity, as the section of the nerve cuts off both ascendant and descendant vagal fibers (19). Thus, VAG does not only modify the sensory functions, but also the motor responses mediated by the vagus nerve. Moreover, subdiaphragmatic vagotomy preserves the pharyngeal, thoracic, and cardiac branches, which may detect and relay the systemic inflammation spreading from peritoneal initial origin. One possible method to avoid these disadvantages would be to inject in the nodose ganglia a virus expressing the inhibitory Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs (DREADD). Thus, only the sensitive neurons of the vagus nerve would express the DREADD. DREADD is only active when Clozapine N-oxide (CNO) is injected to the animal. We could then inject CNO intra-peritoneally at H0, H6, H12 and H24 post-CLP to allow the transient and specific

inhibition of the ascendant fibers of the vagus nerve during the first 24 hours following sepsis and evaluate its impact on long-term behavior.

Several studies assessing the role of the vagus nerve after LPS injection have shown a beneficial effect of vagotomy over cognitive and behavioral functions in the hours following the inflammatory challenge (13, 15). However, our study is the first to demonstrate that vagotomy also reduces the behavioral alterations occurring weeks after the immune challenge, when mice no longer show any signs of residual inflammation. These preclinical data open new perspectives on the potential manipulation/stimulation of the vagus nerve in septic patient to improve short and long-term outcomes.

## Bibliography

1. K. Reinhart, R. Daniels, N. Kissoon, F. R. Machado, R. D. Schachter, S. Finfer, Recognizing Sepsis as a Global Health Priority - A WHO Resolution, *N. Engl. J. Med.* **377**, 414–417 (2017).
2. R. Dantzer, J. C. O'Connor, G. G. Freund, R. W. Johnson, K. W. Kelley, From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain, *Nat. Rev. Neurosci.* **9**, 46–56 (2008).
3. E. Azabou, E. Magalhaes, A. Braconnier, L. Yahiaoui, G. Moneger, N. Heming, D. Annane, J. Mantz, F. Chrétien, M.-C. Durand, F. Lofaso, R. Porcher, T. Sharshar, Groupe d'Explorations Neurologiques en Réanimation (GENER), Early Standard Electroencephalogram Abnormalities Predict Mortality in Septic Intensive Care Unit Patients, *PloS One* **10**, e0139969 (2015).
4. E. W. Ely, A. Shintani, B. Truman, T. Speroff, S. M. Gordon, F. E. J. Harrell, S. K. Inouye, G. R. Bernard, R. S. Dittus, Delirium as a predictor of mortality in mechanically ventilated patients in the intensive care unit., *JAMA* **291**, 1753–62 (2004).
5. T. J. Iwashyna, E. W. Ely, D. M. Smith, K. M. Langa, Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis., *JAMA* **304**, 1787–94 (2010).
6. D. Annane, T. Sharshar, Cognitive decline after sepsis., *Lancet Respir. Med.* **3**, 61–9 (2015).
7. T. Sharshar, F. Gray, G. Lorin de la Grandmaison, N. S. Hopkinson, E. Ross, A. Dorandeu, D. Orlikowski, J.-C. Raphael, P. Gajdos, D. Annane, Apoptosis of neurons in cardiovascular autonomic centres triggered by inducible nitric oxide synthase after death from septic shock, *Lancet Lond. Engl.* **362**, 1799–1805 (2003).
8. M. A. Lebow, A. Chen, Overshadowed by the amygdala : the bed nucleus of the stria terminalis emerges as key to psychiatric disorders, *Mol. Psychiatry* **21**, 450–463 (2016).
9. L. Bourhy, A. Mazeraud, L. Costa, J. Levy, D. Rei, E. Hecquet, I. Gabanyi, F. A. Bozza, F. Chrétien, P.-M. Lledo, T. Sharshar, G. Lepousez, Silencing of amygdala circuits during sepsis prevents the development of anxiety-related behaviors, *Brain Final Rev.* (2021).
10. A. Mazeraud, C. Righy, E. Bouchereau, S. Benghanem, F. A. Bozza, T. Sharshar, Septic-Associated Encephalopathy: a Comprehensive Review, *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* (2020), doi:10.1007/s13311-020-00862-1.
11. V. A. Pavlov, S. S. Chavan, K. J. Tracey, Molecular and Functional Neuroscience in Immunity, *Annu. Rev. Immunol.* **36**, 783–812 (2018).
12. R. M. Bluthé, B. Michaud, K. W. Kelley, R. Dantzer, Vagotomy blocks behavioural effects of interleukin-1 injected via the intraperitoneal route but not via other systemic routes, *Neuroreport* **7**, 2823–2827 (1996).
13. J. P. Konsman, G. N. Luheshi, R. M. Bluthé, R. Dantzer, The vagus nerve mediates

behavioural depression, but not fever, in response to peripheral immune signals; a functional anatomical analysis, *Eur. J. Neurosci.* **12**, 4434–4446 (2000).

14. Atlas Thumbnails :: Allen Brain Atlas : Mouse Brain (available at [https://mouse.brain-map.org/experiment/thumbnails/100048576?image\\_type=atlas](https://mouse.brain-map.org/experiment/thumbnails/100048576?image_type=atlas)).

15. J. Zhang, L. Ma, L. Chang, Y. Pu, Y. Qu, K. Hashimoto, A key role of the subdiaphragmatic vagus nerve in the depression-like phenotype and abnormal composition of gut microbiota in mice after lipopolysaccharide administration, *Transl. Psychiatry* **10**, 186 (2020).

16. F. F. Savi, A. de Oliveira, G. F. de Medeiros, F. A. Bozza, M. Michels, T. Sharshar, F. Dal-Pizzol, C. Ritter, What animal models can tell us about long-term cognitive dysfunction following sepsis: A systematic review, *Neurosci. Biobehav. Rev.* (2020), doi:10.1016/j.neubiorev.2020.12.005.

17. C. D’Mello, M. G. Swain, Immune-to-Brain Communication Pathways in Inflammation-Associated Sickness and Depression, *Curr. Top. Behav. Neurosci.* **31**, 73–94 (2017).

18. M. C. Chiang, A. Bowen, L. A. Schier, D. Tupone, O. Uddin, M. M. Heinricher, Parabrachial Complex: A Hub for Pain and Aversion, *J. Neurosci.* **39**, 8225–8230 (2019).

19. V. A. Pavlov, S. S. Chavan, K. J. Tracey, Molecular and Functional Neuroscience in Immunity, *Annu. Rev. Immunol.* **36**, 783–812 (2018).

# DISCUSSION GENERALE

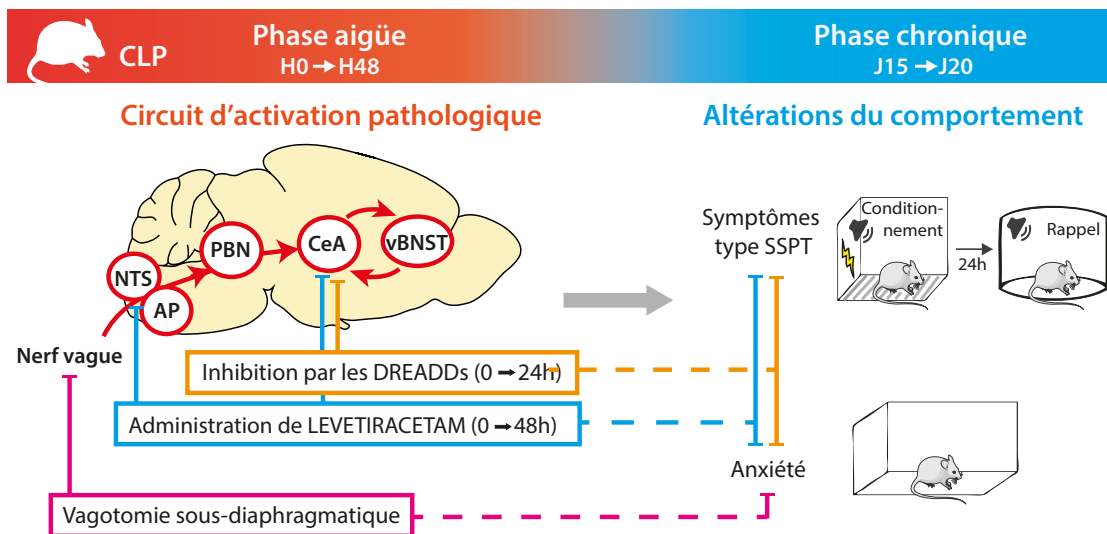


# DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons confirmé chez la souris que le modèle de CLP induit des altérations comportementales à long terme qui rappellent fortement les séquelles psychiatriques développées chez l'Homme après le sepsis, à savoir une triade de syndromes de type anxiété, dépression et SSPT.

→ Nous commencerons donc par discuter de la validité du modèle CLP comme nouveau modèle d'induction de SSPT.

La quantification du marqueur d'activation neuronale cFos nous a permis de mettre en évidence l'activation intense et transitoire 6 heures après la CLP de plusieurs régions du cerveau parmi lesquelles le complexe vagal, ainsi qu'une sous-population de neurones PKC $\delta$  de la CeA projetant vers le vBNST. L'inhibition pharmacogénétique de cette sous-population amygdalienne pendant la phase aiguë du sepsis entraîne une réduction significative de l'anxiété et de la peur à long terme chez les souris 15 jours après le sepsis. De même, l'administration transitoire et précoce du composé neuro-modulateur et antiépileptique LEV, tout comme la vagotomie sous-diaphragmatique préalable au sepsis, annule le pic d'activation neuronale au niveau du tronc cérébral et de l'amygdale, et prévient les modifications à long terme du comportement.



**FIGURE 23 - BILAN DES RESULTATS DE L'ETUDE**

NTS : noyau du tractus solitaire, AP : area prostroma, PBN : noyau parabrachial, CeA : amygdale centrale, vBNST : partie ventrale du noyau du lit de la strie terminale

Ces résultats démontrent pour la première fois que l'activation pathologique transitoire — potentiellement médiée par le nerf vague — d'une sous-population de la CeA projetant vers le vBNST pendant la phase aiguë du sepsis est responsable des modifications à long terme du comportement.

→ Dans un second temps, nous analyserons le circuit neuronal recruté lors du sepsis et son implication spécifique dans l'établissement des séquelles comportementales.

Ces données suggèrent que l'activation transitoire de ce circuit lors de l'inflammation aiguë entraîne des modifications neuronales persistantes, responsables des troubles comportementaux à long terme.

→ Nous discuterons dans une troisième partie des potentiels mécanismes à l'origine des modifications durables des comportements de peur et d'anxiété.

Enfin, ce travail ouvre des perspectives thérapeutiques quant à la prévention des séquelles psychiatriques chez les survivants au sepsis.

→ Pour finir, nous nous interrogerons sur la considération du nerf vague comme potentielle cible thérapeutique dans la prévention et le traitement des séquelles développées après le sepsis.

# 1. LA CLP : UN NOUVEAU MODELE DE TROUBLES PSYCHIATRIQUES ?

- LA CLP COMME MODELE DE SEPSIS

Malgré la complexité physiopathologique et clinique du sepsis, de nombreux modèles animaux ont été développés, comme détaillé dans l'introduction. Nous avons décidé d'utiliser le modèle de la CLP, car à l'inverse du LPS ou autres agents pathogènes, il induit une infection polymicrobienne avec un large spectre (ici en l'occurrence celui du microbiote intestinal de l'hôte) et se rapproche ainsi le plus possible d'un type d'étiologie connu chez l'Homme.

La CLP recrée les principales caractéristiques du sepsis humain lors de la phase aiguë, mais également lors de la phase chronique de la maladie, qui s'avère tout aussi essentielle à notre étude. Dans les heures suivant la CLP, nous avons montré une augmentation forte et rapide au niveau périphérique comme au niveau cérébral des concentrations en cytokines pro- et anti-inflammatoires, dont le profil et la cinétique s'avéraient très similaires à ceux observés chez les patients atteints de sepsis (*Dejager et al. 2011 ; Remick et al. 2000*). De plus, les individus CLP présentaient des dysfonctionnements cérébraux qui partagent de nombreuses caractéristiques avec l'ELS humain, comme un comportement de maladie caractérisé par une vigilance altérée, une activité locomotrice réduite, une altération du sommeil ainsi que des perturbations neuroendocriniennes et autonomes. Nous avons également mis en évidence des anomalies de l'électroencéphalogramme et de rares pointes épileptiformes chez les souris CLP, présentant des caractéristiques et des proportions proches de celles des patients atteints d'ELS.

Au-delà des similitudes observées lors de la phase aiguë du sepsis, nous avons mis en évidence chez les souris CLP des séquelles comportementales de type anxiété et SSPT, qui rappellent fortement les troubles développés par les patients ayant survécu au sepsis. De manière intéressante, ces modifications du comportement persistent plusieurs semaines après l'induction du sepsis et peuvent donc être considérées comme durables à l'échelle de la souris, comme c'est le cas chez les patients humains. Sur ce point, la CLP s'oppose à d'autres modèles de sepsis

comme l'injection de LPS qui induit chez la souris adulte des troubles comportementaux durant généralement quelques jours (*Savi et al. 2020*).

- **LA CLP COMME MODELE DE SSPT**

Il existe d'ores et déjà une multitude de modèles de SSPT. Ces modèles, parfois relativement anciens, continuent d'être discutés perpétuellement selon leurs critères de validité. On juge classiquement de la validité d'un modèle animal en fonction de trois critères (*Nestler et Hyman 2010 ; Bienvenu et al. 2021*) :

- La validité apparente : la ressemblance du modèle avec les symptômes observables du trouble.
- La validité de construction : la conformité du modèle au mécanisme hypothétique à l'origine du trouble.
- La validité prédictive : la façon dont les modèles réagissent de manière similaire aux patients à divers défis (par exemple, pharmacologiques).

Le modèle de conditionnement aversif consécutif à l'exposition à un choc électrique présente comme principale limitation qu'il génère chez la souris un comportement de type SSPT de durée très courte (quelques jours) alors qu'il s'agit d'un syndrome chronique chez l'Homme.

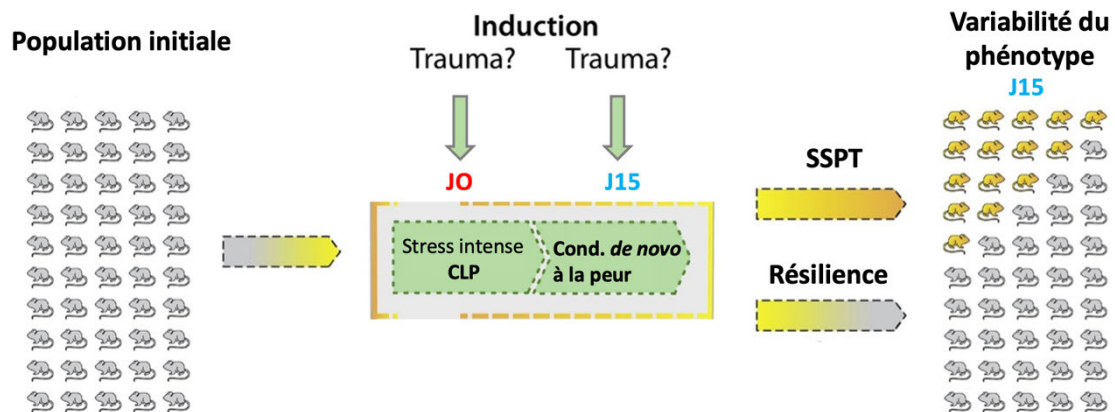
Dans notre modèle, nous avons justement décidé d'étudier les manifestations chroniques du comportement de type SSPT, en testant nos individus à partir de 15 jours après la CLP, lorsqu'ils ne présentaient plus de signes résiduels d'inflammation périphérique ou de comportement de maladie.

Les modifications comportementales développées 15 jours après la CLP récapitulent certains aspects clés de la symptomatologie du SSPT humain (*Goswami et al. 2013 ; Hendriksen, Olivier, et Oosting 2014 ; Huerta et al. 2016*). Le DSM-5 décrit les critères pour caractériser le SSPT chez l'Homme comme l'exposition à un événement traumatique menaçant et la ré-expérience persistante de cet événement. Ce syndrome entraîne une altération de la réponse à la peur, de l'extinction de la peur ainsi qu'une tendance à la généralisation auxquelles s'ajoute une série de symptômes tels que l'évitement, une cognition altérée ou une hypervigilance. Les individus testés dans notre projet ont montré une anxiété

augmentée lors des tests d'exploration spontanée et une réponse de peur accrue aux signaux conditionnés 15 jours après la CLP. Bien que peu approfondi dans notre étude, nous avons également mis en évidence chez les souris CLP un comportement de type dépression dans le TST à J15, en cohérence avec la forte prévalence de comorbidités psychiatriques observée chez les patients atteints de SSPT. Ces mêmes individus présentaient également une forme de généralisation de la peur spécifiquement à un son différent, mais s'apparentant au son de conditionnement (mais non à un contexte différent), une caractéristique de généralisation partielle auditive qui est également caractéristique des patients souffrant de SSPT (*Elzinga et Bremner 2002*). Nous n'avons cependant observé qu'un déficit limité de l'extinction de la peur lors d'un rappel à court terme, bien que nous n'ayons toutefois pas exploré d'autres paramètres tels que la longueur de l'intervalle entre extinction et rappel ou même la réinstauration de la peur (*Fenster et al. 2018; Kida 2019*). L'ensemble des caractéristiques du comportement à long terme de peur chez ces souris atteste de la validité apparente de la CLP comme modèle d'induction de SSPT.

Concernant la validité de construction de notre modèle, il est toutefois difficile dans le cadre de notre expérience de déterminer si la CLP constitue le facteur de stress aigu à l'origine du SSPT ou s'il agit plutôt comme un événement pré-traumatique « sensibilisant » qui favorise une anxiété durable et augmente la susceptibilité à développer par la suite un SSPT induit par un test de conditionnement à la peur. En effet, dans notre modèle, nous devons utiliser un test de conditionnement à la peur à J15 pour pouvoir mettre en évidence de potentielles modifications de l'expression de la peur chez la souris. Par conséquent, nous ne pouvons uniquement déduire de notre étude que la CLP augmente la susceptibilité à développer un comportement de type SSPT, sans pouvoir statuer sur le rôle de la CLP comme traumatisme initiateur du syndrome.

En reprenant la théorie proposée par *Bienvenu et al. 2021*, notre modèle expérimental comprend la combinaison successive d'un stress prolongé et intense que représente la CLP à J0 et d'un conditionnement à la peur renouvelé à J15 (dit *de novo*).



**FIGURE 24 - LA CLP COMME MODELE DE SSPT**

Adapté de Bienvenu et al. Neuron, 2021

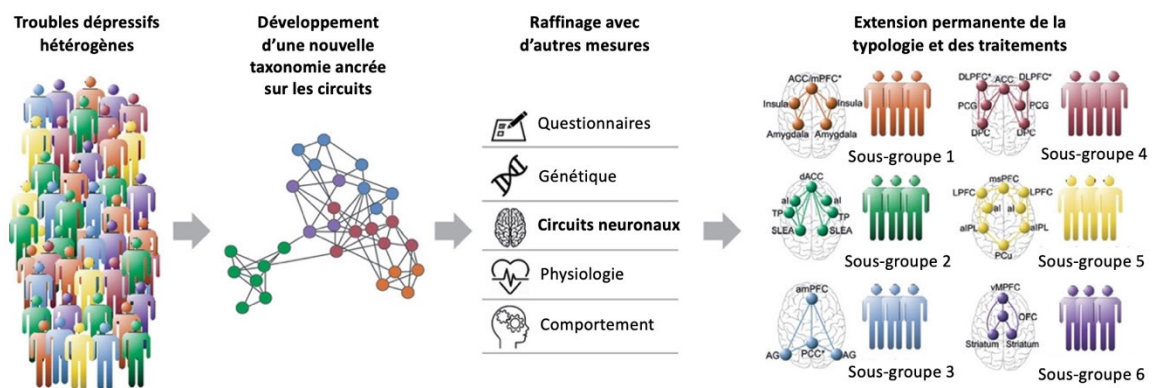
En considérant cette théorie, la CLP présenterait donc un nouveau type d'induction de stress à l'origine d'un SSPT. De manière très intéressante, comme il a été montré que l'intensité du stress aigu traumatisant est corrélée à la sévérité du SSPT développé, nous avons mis en évidence que l'intensité de la réponse inflammatoire aiguë à la CLP était positivement corrélée avec l'amplitude des comportements de type SSPT développés chez ces mêmes souris à J15 (voir Article#1, SFig1.l-m). Enfin, ce modèle est d'autant plus intéressant qu'il correspond à une réalité clinique et épidémiologique chez l'Homme. Au-delà du sepsis, des études réalisées chez l'Homme ont montré de manière plus générale que l'intensité de l'inflammation était un facteur important impliqué dans la susceptibilité au SSPT. En effet, seuls 10 à 15 % des personnes exposées à un traumatisme grave développeront un SSPT (*Kessler et al. 1995; Rc et al. 2005*). Comme détaillé dans l'introduction, les facteurs de risque innés et environnementaux influencent largement la susceptibilité à développer un SSPT. Parmi eux, l'inflammation antérieure au traumatisme a été associée à un risque accru de SSPT. Une étude a montré que les soldats américains diagnostiqués comme souffrant de SSPT après leur déploiement présentaient des niveaux deux fois plus élevés de CRP avant leur déploiement en zone de guerre (*Eraly et al. 2014*).

Nous ne pouvons que peu statuer sur la validité prédictive de notre modèle, car nous n'avons pas testé l'effet de médicaments ou de thérapies anti-SSPT lors du conditionnement à la peur *de novo*. Toutefois, nos résultats ont montré que l'inhibition pharmacogénétique ou pharmacologique de l'activation pathologique

de l'amygdale étendue lors du sepsis supprime la survenue du comportement de type SSPT à J15. Ainsi, si comme suggéré par *Bienvenu et al. 2021* nous considérons le sepsis comme le stress à l'origine du traumatisme initial, ces expériences pourraient attester d'une forte validité prédictive.

Au-delà de sa validité, notre modèle répond à une véritable nécessité actuelle de tendre vers l'étude de la variabilité individuelle accrue des patients atteints des troubles psychiatriques. En effet, le regroupement des patients sous l'appellation de grandes catégories de maladies psychiatriques englobe de multiples susceptibilités individuelles et mécanismes physiopathologiques différents, ainsi que des symptomatologies variées. Ce type de classification s'avère aujourd'hui délétère aux thérapeutiques. La recherche en psychiatrie tend aujourd'hui à identifier des sous-groupes de patients sur la base de mesures objectives, unifiées par des étiologies et des altérations physiopathologiques cérébrales communes (*Bzdok et Meyer-Lindenberg 2018; Williams 2017*). Bien que ce type d'études intégratives ait été initié dans les troubles dépressifs, bipolaires, ou encore schizophréniques, elles restent mineures dans l'étude des troubles anxieux et de SSPT.

Notre modèle pourrait ainsi s'avérer être un outil qui répond à ces nouvelles problématiques en ciblant l'étude du sous-groupe des troubles comportementaux de peur et d'anxiété durables consécutifs à des épisodes infectieux ou inflammatoire aigus divers (correspondant à une réalité d'importance médicale et sociale majeure) et le circuit neuronal spécifiquement impliqué.



**FIGURE 25 - PRINCIPE DE L'ETUDE DE SOUS-TYPES DE PATIENTS EN PSYCHIATRIE, MODELE DES TROUBLES DEPRESSIFS**

Adaptée de Williams et al. 2017 American Journal of Psychiatry

Au-delà des circuits neuronaux, il convient également de s'interroger sur l'existence de biomarqueurs spécifiques d'un épisode inflammatoire aigu antérieur chez ce sous-type de patients atteints de maladies psychiatriques. L'un des exemples d'actualité s'avère être les symptômes chroniques développés après un COVID-19, désignés par le terme « COVID long ». Le COVID long présente diverses manifestations : systémiques, gastro-intestinales, locomotrices, cardio-pulmonaires, mais aussi neurologiques et psychiatriques. Les symptômes psychiatriques du COVID long sont très communs tant chez les patients ayant été hospitalisés que ceux ne l'ayant pas été, et se manifestent par des troubles anxieux (18,7 %), dépressifs (8.0 %), du SSPT (9.1 %) et plus généralement une baisse de la qualité de vie rapportée chez près de 36.7 % des patients ayant survécu à la COVID-19 (*Michelen et al. 2021*). Il a également été démontré que les individus souffrant de COVID long présentaient des concentrations sanguines anormalement et durablement élevées des marqueurs inflammatoires D-dimères et de CRP, respectivement dans 30,1 % et 9,5 % des cas (*Mandal et al. 2021*). Ces résultats, bien qu'encore préliminaires et peu nombreux dans le domaine, illustrent l'intérêt de l'identification de biomarqueurs spécifiques des troubles psychiatriques résultant d'une réaction inflammatoire antérieure.



## 2. L'ACTIVATION PATHOLOGIQUE D'UN CIRCUIT NEURONAL SPECIFIQUE LORS DU SEPSIS A L'ORIGINE DES SEQUELLES COMPORTEMENTALES

- UN CIRCUIT CENTRE SUR L'AMYGDALE ETENDUE

Nos résultats ont montré que la CLP entraîne une forte activation neuronale caractérisée par une augmentation de l'expression du marqueur d'activité neuronale cFos dans de nombreuses régions du cerveau, parmi lesquelles les régions du tronc cérébral (NTS, AP et PBN) et de l'hypothalamus (SO et PVN) qui coordonnent respectivement la réponse neurovégétative et neuroendocrine au sepsis. De manière très intéressante, la CLP provoque également des variations transitoires (<24h) de l'expression de cFos dans certaines régions du système limbique qui contrôlent les circuits neuronaux liés à la peur et à l'anxiété, notamment un pic d'activation dans les régions de l'amygdale étendue (CeA et BNST).

Pour la première fois, nous avons montré que l'inhibition pharmacologique ou pharmacogénétique pendant les premières heures suivant la CLP des neurones de la CeA projetant vers le vBNST était suffisante à supprimer l'altération à long terme des comportements de peur et d'anxiété développés chez les souris 15 jours après la CLP. Ces données suggèrent que l'activation transitoire de cette sous-population de neurones pendant l'inflammation aiguë entraîne des modifications neuronales persistantes responsables des troubles comportementaux à long terme.

Une technique de traçage rétrograde fondée sur l'utilisation d'un virus rabique modifié nous a permis de décrire l'ensemble des afférences des neurones de la CeA projetant vers le vBNST 15 jours après la CLP. La comparaison avec des souris témoins a permis de mettre en évidence l'influence durable de la CLP sur la connectivité de cette sous-population neuronale. En effet, la CLP entraîne une modification significative et persistante de certaines afférences, illustrée par une diminution des connexions provenant de la région dopaminergique *retrosubstantia nigra* (*RRf*) du mésencéphale - un centre clé pour le traitement des signaux aversifs (*Moaddab et McDannald 2021*) - et du BNST. À noter que le *RRf* et le BNST à la fois

projetent et reçoivent des afférences de la CeA, ce qui suggère que la CLP induit des altérations durables d'un circuit en boucle (notamment entre la CeA et le BNST) responsable du comportement de type SSPT présenté par les souris 15 jours après la CLP.

- **UNE ACTIVATION MEDIÉE PAR LE NERF VAGUE**

Ces données soulèvent la question des étapes et des intermédiaires qui mènent à l'activation spécifique de ce circuit amygdalien à partir de l'inflammation périphérique liée au sepsis.

Comme détaillé dans l'introduction, la réponse immunitaire innée transmet des signaux inflammatoires au cerveau par deux voies principales : la voie neuronale et la voie humorale (*Dantzer et al. 2008*). Parmi les nerfs périphériques impliqués dans la voie neuronale, le nerf vague constitue un relai majeur des messages inflammatoires périphériques vers le cerveau via le complexe vagal du tronc cérébral (NTS et AP).

Sans influencer la phase aiguë de la maladie, notre étude a montré que la vagotomie sous-diaphragmatique (VAG) préalable à la CLP présentait un effet bénéfique sur les comportements de type anxio-dépressifs à long-terme. Elle diminuait également significativement l'activation transitoire du complexe vagal pendant le sepsis. Ces résultats démontrent que le nerf vague est fortement activé lors de la CLP et qu'il est au moins en partie responsable de l'activation pathologique de ses principales aires de projection cérébrale, à savoir le NTS et l'AP. Les voies d'entrées complémentaires pouvant être considérées sont les voies vagales thoraciques et l'activation de l'AP par la détection des cytokines circulantes.

De manière intéressante, la vagotomie supprime également le pic d'activation neuronale induit par la CLP spécifiquement dans le vBNST, provoque une tendance vers la diminution dans le PBN et la CeA, mais ne s'accompagne au contraire d'aucun effet sur l'expression de cFos dans d'autres régions classiquement activées pendant le sepsis comme l'hypothalamus. Le PBN est largement décrit dans la littérature comme une des projections majeures du

complexe vagal (*Chiang et al. 2019*). De plus, nos expériences de traçage viral rétrograde médié par le virus rabique ont mis en évidence que le PBN constituait l'une des principales afférences des neurones de la CeA projetant vers le vBNST. Il est également établi dans la littérature que certains neurones du PBN projettent directement vers le BNST et que cette connectivité est impliquée dans l'acquisition de la mémoire aversive (*Chiang et al. 2020*).

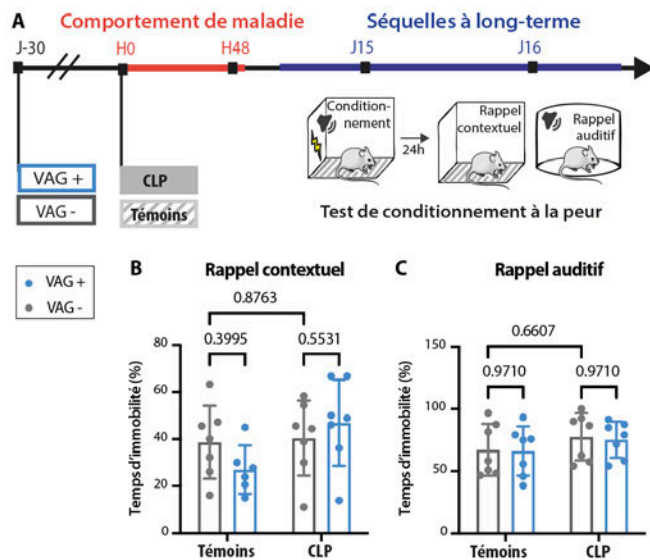
Ces données suggèrent que l'activation du nerf vague pendant la phase aiguë du sepsis conduit au recrutement séquentiel d'un circuit spécifique NTS/AP->PBN->CeA/vBNST qui aboutit à l'activation pathologique de l'amygdale étendue responsable des altérations comportementales à long terme.

Cette hypothèse est toutefois remise en question par l'absence d'impact de la VAG sur l'activation du PBN post-CLP. Cette absence d'effet significatif pourrait s'expliquer par la diversité des sous-populations neuronales du PBN, qui ont des propriétés moléculaires et des connectivités distinctes. Les neurones du PBN projetant vers la CeA et le BNST sont majoritairement des neurones de la partie latérale du PBN (IPBN) exprimant la CGRP (*Campos et al. 2018 ; Chiang et al. 2020*). Une quantification des neurones cFos-positifs parmi les différentes sous-populations permettrait d'évaluer de manière beaucoup plus spécifique l'influence de la VAG sur le pic d'activation observé dans le PBN pendant le sepsis.

- **LA VAGOTOMIE SANS EFFET SUR LE COMPORTEMENT DE TYPE SSPT ?**

En observant le bilan des résultats de cette thèse, il est légitime de s'interroger pourquoi l'article #2 se focalise uniquement sur l'impact de la vagotomie sur les comportements d'anxiété et de dépression à long terme post-sepsis et n'inclut pas l'étude des séquelles de type SSPT objectivées dans l'article #1 par un test de conditionnement à la peur.

En effet, nos résultats montrent que la VAG préalable à la CLP présente un effet anxiolytique et antidépresseur à long terme. Bien que non inclus dans l'article #2, nous avons également réalisé un test de conditionnement à la peur 15 jours après la CLP et nous n'avons pas été en mesure de mettre en évidence un quelconque effet de la VAG sur le comportement de type SSPT.



**Figure supp - Implication du relai vagal lors du sepsis dans les séquelles de type SSPT objectivées à long-terme. A.** 30 jours après le protocole de vagotomie sous-diaphragmatique (VAG+) ou témoin (VAG-), les souris subissaient une chirurgie CLP ou témoin puis étaient évaluées durant un test de conditionnement à la peur à 15 jours. **B. C.** Les souris présentaient le même temps d'immobilisation lors des rappels contextuel ou auditif, indépendamment des chirurgies VAG+/VAG- ou Témoin/CLP (n=7, Two way ANOVA, Rappel contextuel, effet groupe (Témoin versus CLP) P=0.0831 ; Rappel auditif, effet groupe (Témoin versus CLP) P=0.1776).

**FIGURE 26 - IMPACT DE LA VAGOTOMIE SUR LES SEQUELLES DE PEUR POST-SEPSIS**

Cette absence de différence entre les souris VAG-CLP et VAG+CLP pourrait s'expliquer par le fait que la VAG diminue significativement le pic d'activation neuronal post-CLP dans le complexe vagal sans toutefois le rétrograder au niveau d'activation de base des souris témoins (dites « Sham » dans les articles ; cf Article #2, Fig.2). Cette observation suggère que l'activation cérébrale lors de la CLP et les séquelles comportementales qui en découlent sont le résultat de la somme de processus physiopathologiques — parmi lesquels l'activation de l'amygdale étendue médiée par le nerf vague décrite dans notre étude — sans pouvoir exclure l'implication additive d'autres voies (par exemple humorale), d'autres circuits (hypothalamus, hippocampe) ou d'autres types cellulaires (cellules endothéliales, microglie).

Toutefois, bien que cette absence d'effet de la VAG soit un résultat d'intérêt en lui-même, nous avons décidé de ne pas l'inclure dans l'article #2 car nous ne sommes pas parvenus à mettre clairement en évidence la différence initiale des comportements de réponse à la peur entre les souris VAG-témoins et VAG-CLP, qui s'avère indispensable à toute interprétation. Les souris CLP de l'article #2 présentaient un niveau d'immobilité en réponse à la peur approximativement équivalent aux valeurs recueillies chez les souris CLP de l'article #1. Au contraire, les souris témoins avaient un comportement de peur anormalement accru. Ce comportement de type SSPT observé même chez les individus témoins pourrait être consécutif à la chirurgie VAG. En effet, au cours du protocole VAG+ comme

VAG-, les souris subissent une première laparotomie — afin de mettre en évidence les branches abdominales du nerf vague — qui est renouvelée quatre semaines plus tard avec les chirurgies d'induction de sepsis CLP ou témoins. Bien que les meilleures précautions d'asepsie aient été appliquées pour la réalisation de la chirurgie VAG+ ou VAG-, nous ne pouvons exclure que l'inflammation liée à l'exploration abdominale et à la possible contamination locale soit à l'origine d'une réponse immunitaire équivalente à un premier sepsis très léger, qui pourrait rendre compte que le comportement de peur ait été amplifié également chez les individus n'ayant pas subi de CLP.

Cette constatation illustre en partie les limitations du modèle chirurgical de la VAG, auquel s'ajoute le manque de spécificité de la procédure. En effet, la section du nerf vague rompt à la fois les fibres vagales ascendantes et descendantes (*Pavlov, Chavan, et Tracey 2018*), et ne modifie ainsi pas seulement les fonctions sensibles, mais aussi les réponses motrices médiées par le nerf vague. Par ailleurs, même si dans le modèle CLP, le sepsis est primairement induit par une péritonite, le relai vagal n'est pas complètement entravé par la VAG, surtout lorsque l'infection et l'inflammation se généralisent. .

---

#### PERSPECTIVES

---

Le caractère invasif, peu spécifique et non réversible du modèle VAG justifie de s'interroger sur les autres méthodes disponibles de manipulation de l'activité vagale, afin de répliquer nos observations avec d'autres outils.

Plusieurs modèles existent. La vagotomie cervicale permet de couper la quasi-totalité des afférences du nerf vague (abdominales comme thoraciques). Elle entraîne toutefois la rupture non spécifique des voies ascendantes et descendantes du nerf vague et ne peut être réalisée qu'unilatéralement pour permettre la survie de l'animal.

Des modèles de déplétion pourraient également s'appliquer. Un croisement entre des souris Rosa-DTR (exprimant le récepteur à la toxine diphtérique (DTR) de manière Cre-dépendante) et des souris Nav1.8 Cre (exprimant la Cre-recombinase dans les neurones Nav1.8 soit 80 % des neurones sensitifs du nerf

vague (*Stirling et al. 2005*) permettrait d'exprimer le récepteur à la toxine diphtérique dans les neurones Nav1.8 du nerf vague. L'injection de DT induirait donc chez ces souris une déplétion de la majorité des neurones sensitifs du nerf vague, déplétion spécifique, mais malheureusement définitive.

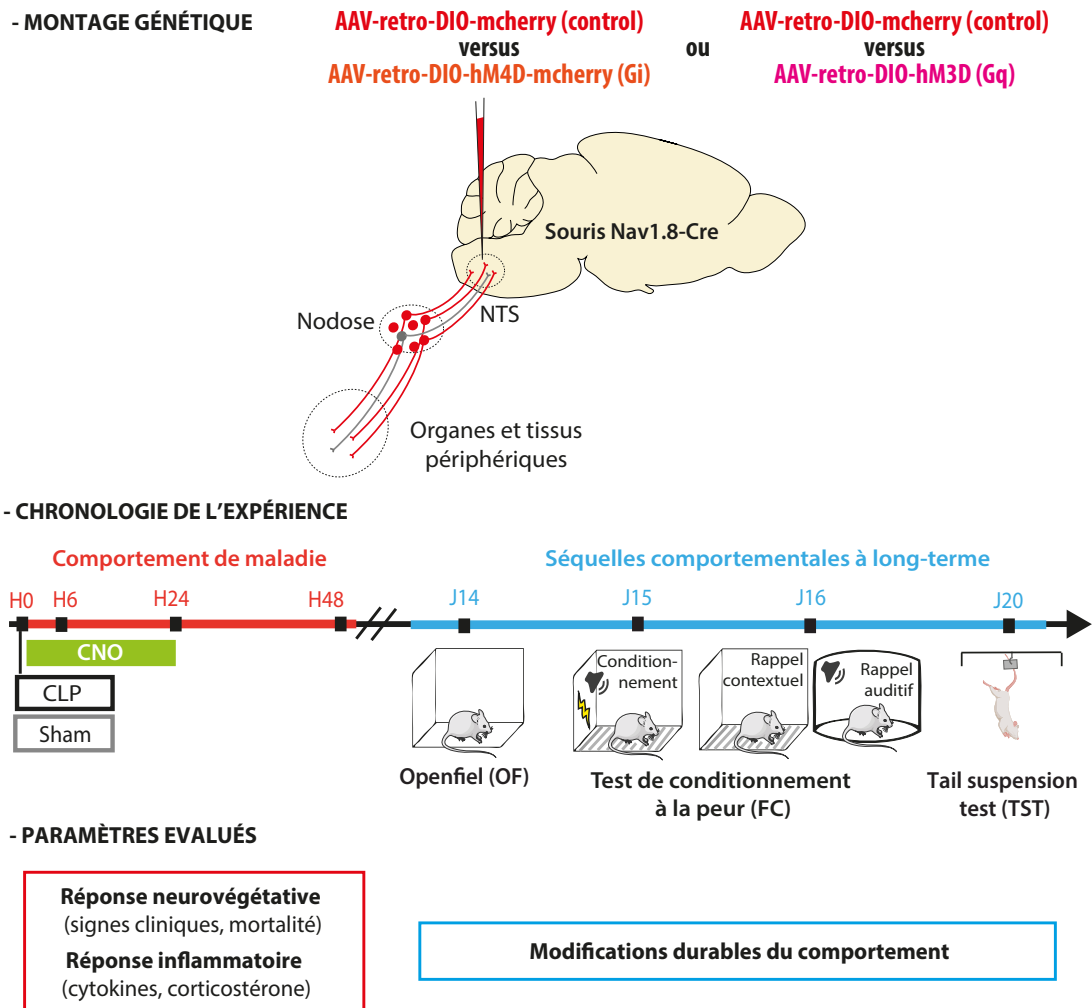
Enfin, des techniques d'injection de virus inhibiteurs inductibles DREADDs directement dans les ganglions du nodose ont également été décrites (*Calik, Radulovacki, et Carley 2014*). Bien que spécifique des fibres ascendantes et réversible, l'injection bilatérale entraîne une surmortalité.

Afin de combiner l'objectif d'une inhibition vagale peu invasive, réversible, spécifique et bien tolérée par l'animal, nous proposons un modèle expérimental qui permette une manipulation pharmacogénétique des branches sensibles du nerf vague. Pour ce faire, nous pourrions injecter chez des souris Nav1.8 Cre un virus rétrograde exprimant la protéine inhibitrice hM4D(Gi) inductible par le CNO suivant la technique des DREADDs. Nous serions alors à même d'inhiber de manière spécifique et transitoire les neurones sensoriels du nerf vague pendant les premières 24 heures suivant la CLP, sans intervenir sur les fonctions motrices de ce dernier. Nous évaluerions ainsi l'impact de l'inhibition de la branche ascendante du nerf vague lors de la phase aiguë du sepsis en caractérisant 1) la réponse neurovégétative (signes cliniques, mortalité) 2) la réponse inflammatoire systémique (dosages de cytokines et de la corticostérone), et 3) le comportement de peur et d'anxiété à long terme.

Dans un second temps, nous pourrions réaliser la même expérience en remplaçant le DREADD inhibiteur par un DREADD exprimant la protéine excitatrice hM3D (Gq) et évaluerions une potentielle aggravation des paramètres monitorés pendant le sepsis. Enfin, sur des souris naïves injectées selon le même protocole, nous pourrions évaluer si la seule activation transitoire des branches ascendantes du nerf vague suffit à induire les symptômes aigus caractéristiques du comportement de maladie (réponses neurovégétative et inflammatoire) et les modifications comportementales chroniques qui lui sont associées.

Cette technique, qui permet la manipulation spécifique du circuit neuronal activé par la stimulation du nerf vague liée au sepsis, pourrait nous permettre d'évaluer

la contribution exacte du relai vagal dans l'établissement des séquelles comportementales post-sepsis.



**FIGURE 27 - PERSPECTIVES : MANIPULATION PHARMACOGÉNÉTIQUE DES BRANCHES SENSITIVES DU NERF VAGUE**

Il faut garder à l'esprit qu'aucun modèle ne permet une manipulation 100 % spécifique et réversible du nerf vague. Toutefois, la redondance des résultats obtenus avec différentes méthodes nous permettra d'appréhender le plus précisément possible les véritables implications du nerf vague au cours du sepsis.

- QU'EN EST-IL DE L'ABSENCE DE DÉFICIT DANS LES TÂCHES COGNITIVES DÉPENDANTES DE L'HIPPOCAMPE ?

Étant donné que le SSPT est généralement associé à un dysfonctionnement de l'hippocampe, il peut paraître étonnant que cette structure n'appartienne pas au circuit d'activation pathologique décrit ci-dessus. Nous observons dans notre

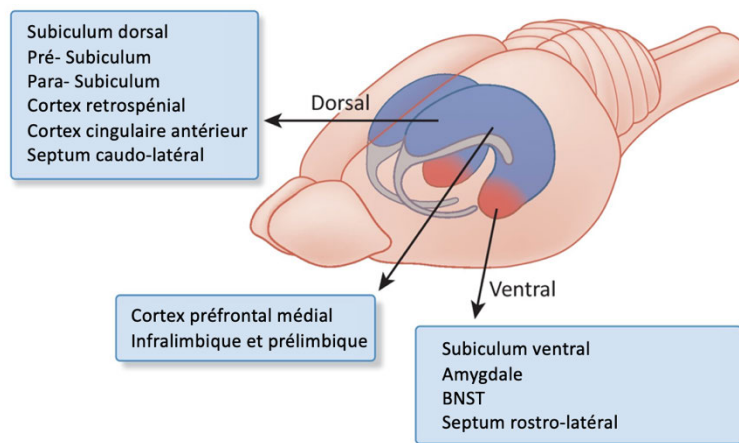
étude une altération de la mémoire de la peur aux rappels à la fois contextuel et auditif, mais non sur les tâches spatiales/de nouveauté. Cette absence de déficit dans les tâches dépendantes de l'hippocampe dorsal (à savoir NOL/NOR et *Morris water maze*) est une spécificité de notre modèle par rapport à autres modèles murins de SSPT (*Deslauriers et al. 2018*). Néanmoins, nos résultats n'excluent pas une contribution de l'hippocampe ventral dans la manifestation des symptômes de type SSPT. En effet, nous avons observé une altération claire de la mémoire liée à la peur contextuelle, une tâche de mémoire impliquant l'intégrité à la fois de l'hippocampe ventral et de l'amygdale (*Kaouane et al. 2012*).

De manière intéressante, les modèles murins de SSPT induit par un stress unique prolongé suggèrent que les altérations de la mémoire hippocampique nécessitent l'action d'hormones résultant de la libération médiée par le stress de corticolibérine (CRH) et de corticostérone (*Matosin et Cruceanu 2017*) ou de l'injection directe de corticostérone dans l'hippocampe (*Kaouane et al. 2012*). Bien que le sepsis entraîne également la libération de corticostérone pour contrer l'inflammation, il est possible que la réponse hormonale déclenchée soit différente de celle induite par les facteurs de stress classiques tels que les odeurs de prédateur, l'immobilisation/la contention ou le choc électrique inéluctable. L'intervalle entre le sepsis et l'exécution de la tâche de mémoire est un autre paramètre important. Des études antérieures ont montré des déficits de la mémoire hippocampique lorsque la mémoire est évaluée plus tôt après le sepsis : par exemple, la CLP altère le test de reconnaissance de nouveaux objets à 10 jours, mais n'a eu aucun effet à 30 jours (*Barichello et al. 2019*).

Une autre explication possible serait que le sepsis affecte davantage l'hippocampe ventral que dorsal. En effet, lors de la phase aiguë du sepsis, nous avons observé une inhibition neuronale significative uniquement dans l'hippocampe ventral (cf Article #1, Fig 2). Étant donné la différence fonctionnelle claire entre l'hippocampe dorsal et l'hippocampe ventral (*Jimenez et al. 2018*), l'altération post-sepsis de l'expression de la peur contextuelle ou auditive, mais non de la mémoire spatiale/de nouveauté suggère une action préférentielle de la CLP sur les circuits hippocampe ventral/amygdale. Si l'hippocampe dorsal n'est pas directement impliqué dans les circuits émotionnels, son rôle central dans



l'acquisition et la consolidation de la mémoire contextuelle s'avère toutefois primordial lors de tâches de discrimination telles que le test de généralisation de la peur (Fanselow et Dong 2010). Or nous avons montré que la CLP ne présentait aucun effet sur la généralisation contextuelle, ce qui appuie d'autant plus notre hypothèse selon laquelle le sepsis affecte davantage l'hippocampe ventral que dorsal.



**FIGURE 28 -  
CONNECTIVITE DES  
DIFFERENTES SOUS-  
REGIONS DE  
L'HIPPOCAMPE**

Buzsáki et al. 2018,  
Trends in cognitive sciences

### 3. MECANISMES A L'ORIGINE DES MODIFICATIONS DURABLES DU COMPORTEMENT

- IMPACT DU SEPSIS SUR LES PROPRIETES DES NEURONES ET DES CIRCUITS

Nos données suggèrent que l'activation transitoire liée au sepsis du circuit décrit ci-dessus entraîne des modifications neuronales persistantes responsables des troubles comportementaux à long terme. Ces altérations peuvent impliquer à la fois des changements moléculaires au niveau cellulaire — c'est-à-dire une réduction à long terme des récepteurs GABAergiques extra-synaptiques (*Botta et al. 2015*) - ou des modifications synaptiques à long terme, y compris un remodelage synaptique des voies excitatrices afférentes (*Li et al. 2013 ; Hartley et al. 2019*). Il a été démontré que les cytokines libérées pendant le sepsis (IL-1, IL-6, TNF) ont un impact sur la consolidation de la mémoire, par le biais de mécanismes allant de la potentialisation à long terme au remodelage synaptique en passant par la neurogenèse (*McAfoose et Baune 2009*). Des études ont montré que les souris CLP présentaient une réduction à long terme de la densité des épines dendritiques dans la BLA et l'HIP (*Huerta et al. 2016 ; Chavan et al. 2012*). De manière intéressante, la réduction de la densité des épines dans ces régions a également été observée dans des modèles animaux et chez des patients humains souffrant de troubles liés à l'anxiété (*Koleske 2013 ; Kulkarni et Firestein 2012*).

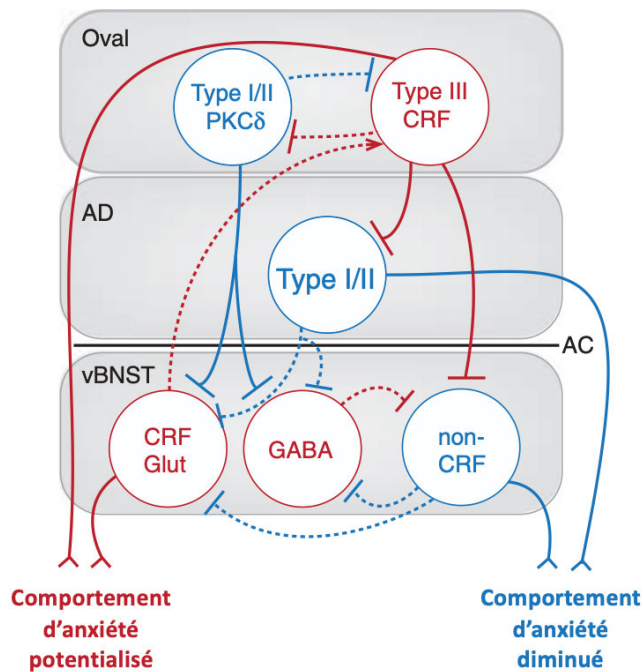
Dans notre étude, nous avons réalisé un enregistrement photométrique *in vivo* des neurones de la CeA projetant vers le vBNST 15 jours après la CLP, afin de caractériser leur activité fonctionnelle pendant le conditionnement *de novo* à la peur et la comparer avec celle observée chez des souris témoins. Pendant la phase d'apprentissage, les neurones de la CeA enregistrés n'ont pas montré de réponse particulière au stimulus auditif, mais présentaient une forte réponse excitatrice lors du choc électrique, sans aucune différence entre les animaux témoins et CLP. Vingt-quatre heures plus tard, pendant le rappel auditif, nous avons observé que le CS induisait une réponse inhibitrice significative de la CeA chez les souris CLP comparativement aux souris témoins. Cette même réponse inhibitrice en réponse au CS est classiquement observée dans les neurones PKC $\delta$ <sup>+</sup> de la CeA (*Haubensak et al. 2010*). Ces résultats objectivent une altération durable de la réponse

fonctionnelle amygdalienne à des stimuli aversifs, qui pourrait expliquer les modifications comportementales observées post-sepsis.

En complément de cette analyse fonctionnelle des circuits amygdaliens, en utilisant le traçage rétrograde basé sur l'utilisation du virus rabique, nous avons pu révéler une modification durable du schéma de connectivité 15 jours après la CLP par rapport à des souris témoins. Nous avons observé une diminution significative des entrées synaptiques sur les neurones de la CeA projetant vers le vBNST à 15 jours après la CLP, provenant spécifiquement du RRf et du BNST. De manière intéressante, le RRf et le BNST innervent et reçoivent à la fois des projections de la CeA (*Cui et al. 2017*).

Ces résultats démontrent une altération durable après la CLP des circuits organisés en boucle, notamment entre la CeA et le BNST. Ce résultat appelle à mieux caractériser à la fois l'identité des neurones du BNST qui innervent les neurones de la CeA mais aussi l'identité des neurones du vBNST qui sont sous contrôle de la CeA. En effet, le BNST est constitué de plusieurs noyaux (parmi lesquels le noyau ovale) qui eux-mêmes comprennent de multiples sous-populations neuronales, incluant des interneurons locaux inhibiteurs et des neurones de projection à la fois GABAergiques et glutamatergiques (*Daniel et Rainnie 2016; Ch'ng et al. 2018*). Le vBNST se compose d'une forte proportion de neurones de projection (*Dong et al. 2001*), et possède notamment des neurones qui projettent vers l'hypothalamus latéral (LHA) pour contrôler la prise alimentaire (*Y. Wang et al. 2019*), mais aussi des neurones GABAergiques et glutamatergiques qui projettent vers la VTA (*Jennings et al. 2013*).

Une caractérisation des différentes sous-populations neuronales du BNST recrutées dans notre modèle serait indispensable pour que nous puissions émettre des hypothèses quant à l'organisation et la nature de cette boucle de régulation entre la CeA et le BNST, en particulier pour vérifier si ce circuit fonctionne comme une boucle de rétrocontrôle négatif via un retour GABAergique du BNST.



**FIGURE 29 - CIRCUITS OPPOSES DE REGULATION DE L'ANXIÉTÉ DANS LE BNST**

Adapté de Daniel et al. 2015, Neuropsychopharmacology

CRF : corticolibérine, GABA : acide gamma-aminobutyrique, AD : partie antérodorsale du BNST, PKCδ : protéine kinase C delta, AC : commissure antérieure

Toutefois, la projection BNST-CeA n'est pas la seule connexion altérée par le sepsis. En effet, les projections du RRf vers la CeA observent également une diminution significative 15 jours après la CLP. Tout comme le BNST, le RRf reçoit également des projections de la CeA (Tsumori et al. 2010), objectivant une deuxième boucle de régulation modifiée par le sepsis. De manière intéressante, le RRf et le BNST ont pour afférence commune le PBN. Plus spécifiquement, la population du PBN exprimant le neuropeptide CGRP projette vers la CeA et le BNST (Campos et al. 2018; Chiang et al. 2020), tandis que la population du PBN exprimant le neuropeptide Pdyn projette vers le PVN et le RRf (Huang et al. 2021). Ces deux sous-populations neuronales, aux fonctions distinctes, sont probablement recrutées en parallèle lors du sepsis — comme cela a pu être démontré dans le cas du LPS (Campos et al. 2018) - et leur connectivité consécutivement durablement altérée. Une étude du laboratoire à laquelle j'ai participé (voir Annexe #2), montre justement que les neurones du PBN projetant vers le PVN — et non ceux projetant vers la CeA — contrôlent la réponse de type corticostérone en réponse à la détection d'IL-1 $\beta$  par le complexe vagal. En considérant ces éléments, le PBN serait susceptible de jouer un rôle central dans la modulation induite par le sepsis des différentes boucles décrites ci-dessus et pourrait être considéré comme une région d'intérêt majeur pour la suite de notre étude.

Malgré ces résultats préliminaires intéressants, les mécanismes moléculaires et cellulaires qui sous-tendent les modifications fonctionnelles et anatomiques de l'amygdale étendue post-sepsis restent à identifier.

#### PERSPECTIVES

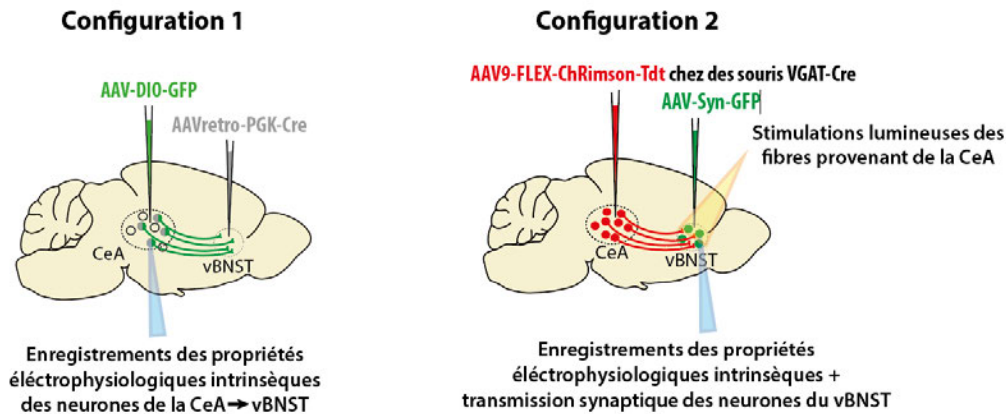
---

Pour répondre à cette question, nous proposons deux perspectives d'expérimentation.

Pour commencer, l'utilisation de techniques d'électrophysiologie (ou *patch clamp*) nous permettrait d'étudier les courants ioniques transmembranaires des neurones de la CeA et du vBNST et de mettre en évidence un potentiel impact durable du sepsis sur les propriétés intrinsèques et de transmission synaptique de ces neurones.

Dans une première configuration, nous pourrions injecter un virus rétrograde exprimant la Cre-recombinase dans le vBNST et un virus Cre-dépendant exprimant la GFP dans la CeA, afin de marquer spécifiquement avec la protéine fluorescente GFP les neurones de la CeA projetant vers le vBNST. Nous aurions ainsi la possibilité d'enregistrer les propriétés intrinsèques de ces neurones 15 jours après la CLP en les comparant à des individus témoins, le marqueur GFP permettant ici uniquement de repérer les neurones d'intérêt dans la CeA.

Dans une seconde configuration, nous pourrions utiliser des souris génétiquement modifiées VGAT-Cre exprimant spécifiquement la Cre-recombinase dans les neurones inhibiteurs, auxquelles nous injecterions un virus Cre-dépendant codant pour la protéine canal sensible à la lumière channelrhodopsine (ChR2) dans la CeA et enfin un virus codant pour la protéine fluorescente GFP dans le vBNST. 15 jours après la CLP, nous aurions la possibilité d'enregistrer les propriétés intrinsèques de ces neurones du vBNST (marqués par la GFP), mais également les réponses de ces neurones induites par des stimulations optogénétiques des fibres exprimant la channelrhodopsine provenant de la CeA. Cette dernière configuration nous permettrait ainsi de caractériser de potentielles modifications de la transmission synaptique entre le CeA et le vBNST post-sepsis.

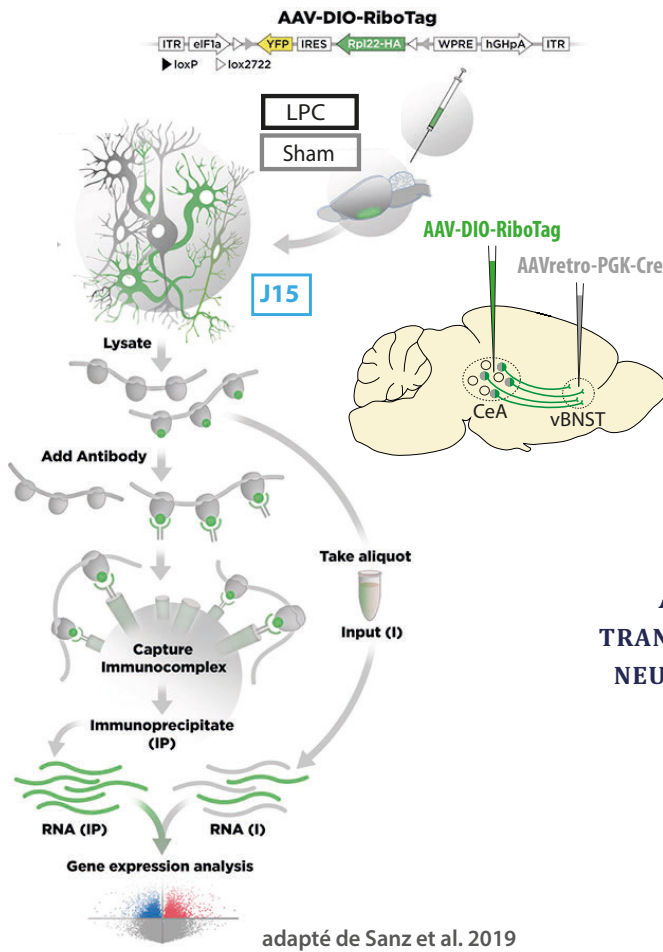


**FIGURE 30 - PERSPECTIVE**

**ÉVALUATION DES MODIFICATIONS INDUITES PAR LE SEPSIS DES PROPRIETES ELECTROPHYSILOGIQUES DES NEURONES DE L'AMYGDALÉ ETENDUE**

Comme deuxième axe de perspective, le séquençage de l'ARN messager des neurones de la CeA projetant vers le vBNST pourrait mettre en évidence des modifications persistantes du transcriptome de ces neurones après la CLP. Pour réaliser cette étude transcriptomique, nous pourrions utiliser la technique de marquage des ribosomes ou *Ribotag*. Cette approche *in vivo* est très utile pour analyser l'expression des gènes et la traduction de l'ARNm chez certains types cellulaires spécifiques difficiles à isoler par des méthodes conventionnelles. Cette approche est basée sur l'expression sélective d'une protéine ribosomique marquée à l'hémagglutinine A (HA) dans le type cellulaire cible, puis sur l'utilisation d'anticorps contre la HA pour purifier les polysomes et les ARNm associés des cellules cibles.

Ici, nous pourrions injecter un virus rétrograde exprimant la Cre-recombinase dans le vBNST et un virus Cre-dépendant exprimant la protéine ribosomique marquée à la HA dans la CeA. Ainsi, 15 jours après la CLP, nous pourrions isoler les neurones de la CeA projetant vers le vBNST grâce à l'expression de HA puis analyser leur transcriptome et le comparer à celui d'individus témoins.



**FIGURE 31 - PERSPECTIVE**  
**ANALYSE DES MODIFICATIONS**  
**TRANSCRIPTOMIQUES POST-SEPSIS DES**  
**NEURONES DE L'AMYGDALE ETENDUE**

- **QUEL ROLE DE LA MICROGLIE ?**

Au-delà des processus purement neuronaux, d'autres types cellulaires peuvent être impliqués dans les modifications fonctionnelles et anatomiques observées post-sepsis dans l'amygdale étendue.

Comme décrit dans l'introduction, le sepsis induit une neuro-inflammation intense se manifestant notamment par une modification morphologique et immunologique de la microglie. En effet, de nombreuses études réalisées chez l'animal comme chez l'Homme ont mis en évidence une forte activation microgliale lors de la phase aiguë du sepsis (*Hoogland et al. 2015; Westhoff et al. 2019*). De manière intéressante, cette activation n'était pas généralisée à l'ensemble du cerveau, mais était spécifique à certaines régions comme l'hypothalamus, l'hippocampe ou l'amygdale (*Westhoff et al. 2019; McIlwrath et al. 2021*).

Ces dernières années, tout un ensemble de travaux a montré que la microglie est capable d'interagir dynamiquement avec les neurones. La communication entre la microglie et les neurones peut prendre place à différents niveaux, de l'interaction indirecte par des messagers solubles au contact direct inter-membranaire. L'un des sites d'interaction directe les plus étudiés est l'interaction au niveau des synapses. On estime que 9 % des synapses glutamatergiques et 11 % des synapses GABAergiques sont apposées à des bras microgliaux en condition physiologique (*Cserép et al. 2020*). La formation de ces contacts a été démontrée comme étant dépendante de l'activité neuronale et indispensable à l'existence et la maturation des synapses (*Akiyoshi et al. 2018*).

Au-delà de la synapse, la microglie peut aussi interagir physiquement avec les segments axonaux des neurones responsables de l'initiation et de la propagation du potentiel d'action. Des modifications de ce contact microglie-axone ont été justement décrites dans des états pathologiques tels que la sclérose en plaques et les lésions cérébrales traumatiques (*Benusa et Lafrenaye 2020*).

Globalement, les études s'accordent à dire que le dialogue homéostatique entre microglie et neurones limite l'hyperactivité neuronale et l'excitotoxicité. L'activité mitochondriale du neurone est notamment influencée par la formation de contacts avec la microglie. En effet, l'ATP libéré par les neurones est un composé chimio-attractif majeur pour les bras microgliaux par l'intermédiaire du récepteur purinergique P2Y<sub>12</sub>, qui entraîne une cascade de réactions aboutissant au rétrocontrôle négatif de l'activité neuronale (*Badimon et al. 2020; Cserép et al. 2020*). L'expression du récepteur P2Y<sub>12</sub> est justement significativement diminuée quand la microglie est activée par des conditions pro-inflammatoires, que ce soit dans les modèles animaux d'injection de LPS (*Haynes et al. 2006*) ou dans des pathologies inflammatoires humaines telles que la sclérose en plaques (*Mildner et al. 2017*).

Les cellules microgliales elles-mêmes peuvent présenter un dysfonctionnement mitochondrial au cours du processus neuro-inflammatoire *via* l'activation de l'inflammasome NLRP3. Un tel mécanisme a été mis en évidence dans certaines maladies neurodégénératives (*Galindo et al. 2010; Turner et Schapira 2010*).



La physiopathologie de l'ELS associe neuroinflammation, excitotoxicité, et dysfonction mitochondriale, autant de phénomènes décrits comme influencés par un rétrocontrôle microglial.

Dans une première étude de notre équipe (non publiée), nous avons utilisé un algorithme d'analyse morphométrique pour évaluer précisément l'activation des cellules microgliales à la lumière de leurs changements morphologiques. L'analyse de l'activation de la microglie dans l'amygdale a mis en évidence un changement significatif de la morphologie de la microglie 6 heures après la CLP, avec une réduction de l'arborisation et de la ramification spécifiquement dans la CeA. De manière très intéressante, cette déramification de la microglie induite par le sepsis était supprimée après un traitement par le LEV, suggérant un effet neuroprotecteur du LEV dépendant de la microglie.

Dans un second travail auquel j'ai participé (voir Annexe #1), nous avons justement montré que le LEV avait un effet métabolique bénéfique indépendant de SV2A sur la microglie activée lors du sepsis, en prévenant l'expression de médiateurs potentiellement neurotoxiques comme le NO ou le PGE2 dans des zones cruciales du cerveau telles que le complexe vagal, l'amygdale, l'hippocampe et le cortex frontal. Ces processus à spécificité loco-régionale sont probablement responsables de la réduction de la mortalité et du comportement de maladie post-CLP observé après traitement par le LEV. Ces résultats ont été confirmés *in vitro* sur des lignées cellulaires microgliales stimulées par du LPS, dans lesquelles nous avons constaté que le LEV entraînait 1) une diminution de l'expression de gènes liés à l'hypoxie, aux cytokines et aux réponses au stress et 2) une amélioration du dysfonctionnement mitochondrial et une production accrue d'ATP.

À la lumière de ces données, nous émettons l'hypothèse que la microglie pourrait être impliquée dans l'hyperactivation neuronale observée pendant le sepsis et serait potentiellement un acteur majeur des modifications des circuits et des propriétés neuronales à l'origine des altérations à long terme du comportement. Au-delà du dysfonctionnement mitochondrial neuronal, une défaillance précoce des mitochondries de la microglie pourrait être à l'origine d'une altération de leurs fonctions de migration et de ramification, et ainsi aggraver le processus

neurotoxique lié au sepsis par diminution du rétro-contrôle négatif microglial sur l'activité neuronale.

#### PERSPECTIVES

---

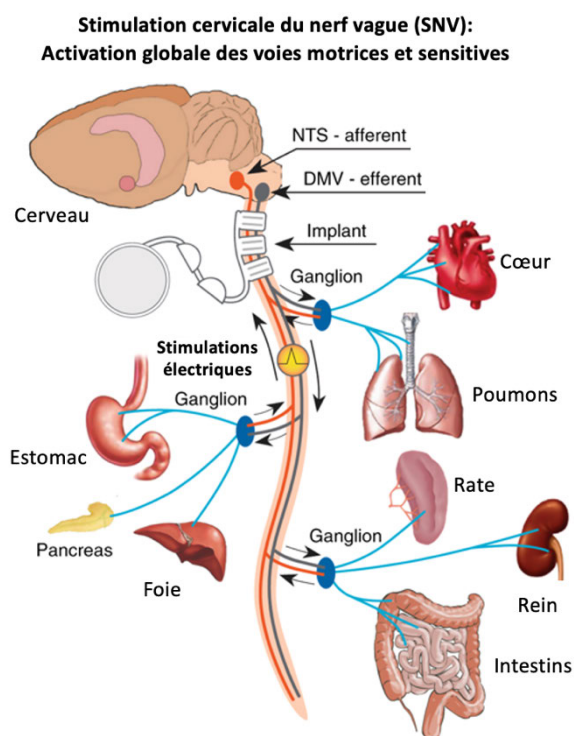
Pour tester expérimentalement la contribution des cellules microgliales dans l'activation neuronale pathologique, nous pourrions commencer par tester l'effet du sepsis sur des souris traitées avec l'antagoniste PLX3397 (Plexxicon) du récepteur au facteur CSF1, qui conduit à une déplétion quasi complète des cellules microgliales en deux à trois semaines (*Elmore et al. 2014*) tandis que le nombre de macrophages périphériques, d'autres cellules immunitaires et la morphologie globale du cerveau restent inchangés (*Dagher et al. 2015; Elmore et al. 2015; 2014*). À noter que cette déplétion est réversible, puisque l'arrêt du traitement par l'antagoniste du récepteur CSF1 entraîne une repopulation presque complète de la microglie en sept jours (*Elmore et al. 2014*). Grâce à cet outil, nous évaluerons la contribution de la microglie 1) dans le pic d'activation neuronal post-CLP, 2) dans les modifications fonctionnelles et morphologiques durables de l'amygdale étendue post-sepsis, 3) dans la survenue des altérations des comportements de peur et d'anxiété à long terme. Enfin, nous pourrions évaluer les conséquences de la déplétion de la microglie sur les différents effets positifs du LEV post-sepsis.

## 4. LE NERF VAGUE : UNE CIBLE THERAPEUTIQUE CONTRE LES SEQUELLES DU SEPSIS ?

- MODULATION DE L'ACTIVITE VAGALE PAR STIMULATIONS MECANIQUES

Dans notre étude, nous avons montré que la vagotomie préalable au sepsis diminuait à la fois l'activation neuronale pathologique de l'amygdale étendue lors du sepsis et les séquelles anxio-dépressives qui s'en suivent. Bien que la technique de VAG manque de spécificité anatomique et temporelle, ces résultats suggèrent l'implication importante du relai vagal dans la physiopathologie de l'ELS et poussent à considérer le nerf vague comme une potentielle cible thérapeutique pour traiter le sepsis et ses séquelles.

De nouveaux dispositifs médicaux ont été développés afin de moduler les signaux transmis par les nerfs périphériques. Ces stratégies de stimulations nerveuses appliquées au nerf vague (SNV) utilisent des électrodes en acier inoxydable implantées par voie chirurgicale directement sur la région cervicale du nerf.



**FIGURE 32 - STIMULATION DU NERF VAGUE PAR IMPLANT**

Adapté de Cotero et al. 2019,  
Nature Comm

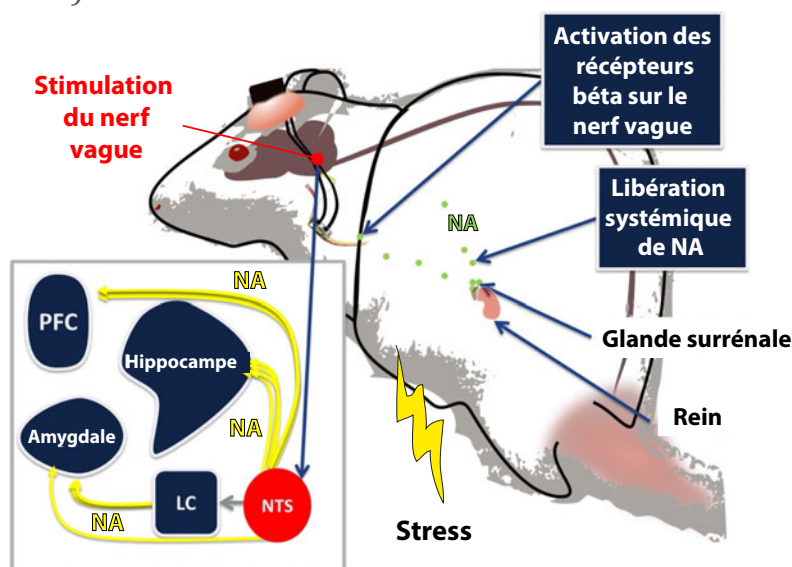
Ce mode d'implantation permanente a été testé pour de multiples pathologies. À l'origine, la SNV a été développée pour traiter les épilepsies réfractaires (*Adair et al. 2020*). Le protocole de SNV appliqué chez ces patients induisait une réponse

neuronale dans le locus coeruleus (LC), une aire cérébrale modulant les oscillations thalamo-corticales et qui reçoit des projections directes du NTS (*Hulseley et al. 2017*).

Une autre série d'études a montré que la SNV s'avérait également très efficace dans le traitement de syndromes dépressifs pharmaco-résistants (*Adair et al. 2020*). Un des mécanismes d'action proposés pour ces améliorations de l'humeur provient des projections du nerf vague vers le cortex préfrontal et le système limbique (*Chae et al. 2003*). En effet, des études d'imagerie menées chez des patients souffrant de dépression pharmaco-résistante ont révélé une augmentation du débit sanguin cérébral régional dans le cortex préfrontal dorso-latéral et une diminution de l'activation des structures limbiques après un traitement par SNV (*Henry et al. 1998*).

La SNV s'avère également bénéfique sur certaines fonctions cognitives. Des études réalisées chez l'animal comme chez l'Homme ont montré qu'un protocole de SNV appliqué immédiatement après l'apprentissage favorisait la mémoire (*Clark et al. 1998; Adair et al. 2020*). La SNV s'est même révélée utile pour améliorer les fonctions d'apprentissage et de mémoire chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (*Adair et al. 2020; Sjogren et al. 2002*).

Enfin, la SNV semble favoriser les phénomènes de plasticité neuronale. Une SNV induit une augmentation de la libération de NA dans le BLA, à des concentrations capables de moduler la mémoire émotionnelle (*Hassert, Miyashita, et Williams 2004*).



**FIGURE 33- MODELE DE MODULATION DE LA REPONSE EMOTIONNELLE MEDIEE PAR SNV**

Adapté de Peña et al. 2013, Biological psychiatry

NA : noradrénaline, LC : locus coeruleus, NTS : noyau du tractus solitaire, PFC : cortex pré-frontal

Elle favorise également la neurogenèse dans l'hippocampe (*Revesz et al. 2008*), dont la déficience est un modèle animal de dépression. Ce protocole réduit également les comportements de peur par le biais de la modulation des connexions entre le PFC et l'amygdale (*David Frausto Peña et al. 2014; Noble et al. 2017*), et facilite l'extinction de la peur dans les modèles animaux de conditionnement aversif (*Souza et al. 2019; David F. Peña, Engineer, et McIntyre 2013*), suggérant un potentiel intérêt dans le traitement du SSPT et de l'anxiété (*Marin et al. 2014*). Enfin, la SNV favorise la plasticité dans le cortex frontal chez les animaux et les patients victimes d'accidents cérébraux vasculaires, et accélère la récupération motrice lorsqu'elle est associée à une rééducation (*Childs et al. 2017; Dawson et al. 2016*).

La technique de SNV présente toutefois des limitations évidentes en raison de son caractère invasif : le risque associé aux procédures d'implantation chirurgicale, le coût de l'entretien du dispositif et des soins post-opératoires et l'accessibilité de la procédure à un plus large éventail de maladies et de patients. De plus, cette technique dépendante d'implants cervicaux active à la fois les voies nerveuses efférentes et afférentes, rendant difficile l'identification des mécanismes responsables des améliorations médicales observées post-SNV.

Ces dernières années, des modèles de stimulation du nerf vague moins invasifs et plus spécifiques ont été développés. Parmi eux, des stimulations transcutanées du nerf vague (tcSNV) visent les afférences auriculaires du nerf vague, en plaçant des électrodes au niveau de l'oreille. La tcSNV présente des effets similaires à la SNV classique sur la régulation de l'humeur et, grâce à sa facilité d'application, peut être proposée à des patients souffrant de formes moins sévères de dépression. Elle présente également des effets modulateurs sur la cognition, avec une amélioration de la mémoire associative observée chez les personnes âgées au bout d'une seule séance de tcSNV (*Jacobs et al. 2015*).

Certains groupes de recherche favorisent l'utilisation d'outils émettant des ultrasons pour stimuler directement, spécifiquement et de manière non invasive les nerfs périphériques. Bien que cette technique présente des résultats contradictoires quand elle est concentrée sur la manipulation de nerfs de gros diamètres à l'extérieur des organes, son application focalisée au niveau de sous-

régions d'organes a montré des résultats très prometteurs. Ainsi la stimulation hépatique par ultrason supprime l'hyperglycémie induite par une injection de LPS avec un effet neuro-modulateur direct observé au niveau de l'hypothalamus (Cotero et al. 2019).

Le même type de stimulation localisée par ultrason a été testée au niveau du ganglion inférieur du nerf vague (ou nodose). Cette stimulation locale induisait une réduction de la libération de TNF et de l'hyperglycémie consécutives à l'injection de LPS avec une intensité deux à trois fois supérieure à la stimulation splénique (Cotero et al. 2020).

Ces nouvelles techniques, bien qu'en cours de perfectionnement, ouvrent des perspectives quant à l'optimisation des interventions visant à moduler un circuit cérébral spécifique. Elle laisse également entrevoir à moyen terme l'opportunité de prévenir les séquelles du sepsis en manipulant l'activité vagale responsable de l'activation pathologique du circuit de l'amygdale étendue.

Bien que l'objectif premier de notre étude soit de se concentrer sur la manipulation des afférences du nerf vague, les réponses afférentes et efférentes lors de la SNV sont intrinsèquement liées et peuvent être exploitées pour une utilisation encore plus efficace de la stimulation du nerf vague. En effet, les modèles inflammatoires ont principalement étudié les bénéfices des réponses descendantes induites par SNV. En cas d'injection de LPS, la SNV prévient l'hypotension et la libération systémique de cytokines pro-inflammatoires (Borovikova et al. 2000). Elle atténue également les altérations de la coagulation liée au sepsis dans un modèle murin (Van Westerloo et al. 2006). Certaines études expérimentales ont même montré que la SNV présentait un effet bénéfique sur la mortalité liée à la CLP (Boland et al. 2011; J.M. Huston et al. 2007). Ces conclusions sont toutefois discutées, car la SNV nécessite la mise en place d'une anesthésie et d'une antibiothérapie, qui sont autant d'agents confondants du véritable impact de la stimulation vagale sur la réponse au sepsis (Kanashiro et al. 2017).

- **MANIPULATION PHARMACOLOGIQUE DU NERF VAGUE**

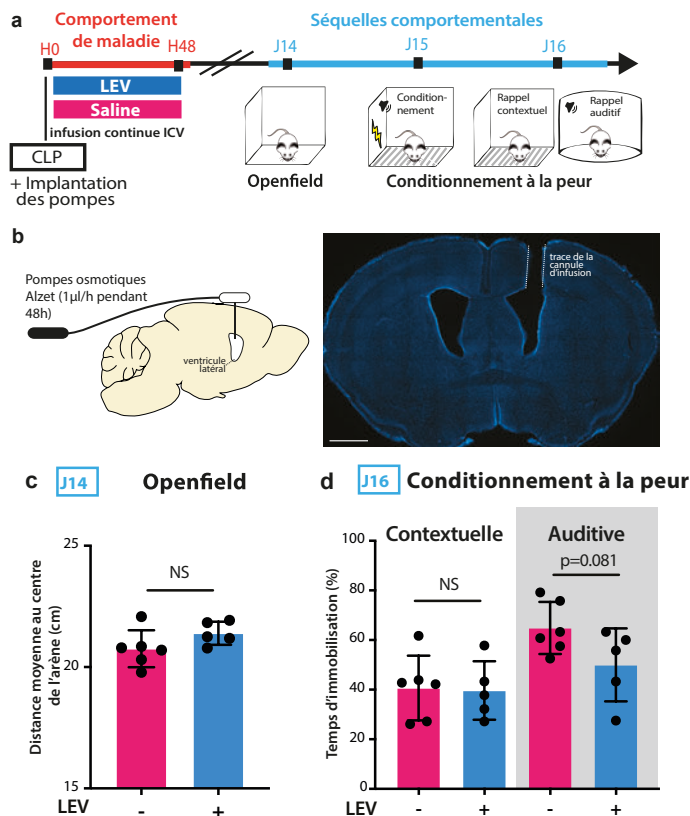
La complexité d'appliquer la SNV chez des individus conscients pendant des périodes longues a suscité l'exploration d'approches alternatives utilisant des

outils pharmacologiques. La majorité des études à ce sujet a ciblé l'utilisation de molécules imitant la signalisation anti-inflammatoire vagale. Par exemple, l'administration d'agonistes nicotiques et adrénérgiques s'est avérée efficace pour prévenir les réponses inflammatoires et, par conséquent, réduire les lésions organiques et la mortalité liées au sepsis (*H. Wang et al. 2004; Vida et al. 2011*). Bien que ces médicaments ciblent des mécanismes moléculaires définis, ils manquent souvent de spécificité anatomique et cellulaire, et entraînent inévitablement une toxicité due à des effets hors cible. De plus, ces molécules sont de manipulation difficile, de sorte que le sous-dosage et le surdosage sont courants, entraînant l'échec du traitement ou des effets secondaires indésirables (*Olofsson et Tracey 2017*).

Dans notre étude, nous avons remarqué que le LEV administré par voie intra-péritonéale présentait un effet bénéfique à la fois sur l'activation cérébrale aiguë, la mortalité et les séquelles comportementales liées au sepsis. De manière intéressante, l'administration de LEV ne modifiait pas les concentrations en cytokines circulantes lors du sepsis, excluant un effet anti-inflammatoire systémique du LEV (voir Article #1, SFig. 4b).

Pour mieux comprendre le site d'action de la molécule, nous avons testé l'impact de l'administration cérébrale de LEV sur les séquelles comportementales observées après le sepsis (Figure 34 ci-dessous — données non publiées). Grâce à l'implantation d'une pompe osmotique couplée à un kit d'infusion cérébrale, une injection intra-cérébroventriculaire (ICV) continue de LEV a été réalisée pendant les 48 premières heures suivant la CLP. Les séquelles comportementales ont ensuite été évaluées 15 jours après la CLP. Dans le test de conditionnement à la peur, nous n'avons observé qu'une diminution limitée du comportement de peur lors du rappel auditif après le traitement ICV de LEV (diminution de -23 %,  $p=0.081$ ), sans aucun effet sur rappel contextuel, ou le comportement d'anxiété dans l'openfield.

L'administration centrale de LEV ne reproduit donc pas les résultats obtenus après l'administration systémique intra-péritonéale (diminution de -61 %, Article #1 Fig.6).



**Figure supp - Impact de l'infusion intracérébroventriculaire (ICV) continue de LEV pendant 48h au cours de la phase aiguë du sepsis sur les séquelles comportementales analysées à J15 post-sepsis.** a. Chronologie de l'expérience. b. Image représentative de l'implantation cérébrale de la canule de perfusion dans le ventricule latéral. c-d. L'administration ICV de LEV provoque une diminution limitée mais non significative de la réponse de peur auditive (diminution de -23%,  $p=0,081$ ) sans aucun effet sur le rappel de la mémoire de peur contextuelle, ni sur l'évitement spontané dans l'openfield ( $n=5$  avec LEV,  $n=6$  avec une solution saline).

**FIGURE 34 - IMPACT DE L'ADMINISTRATION ICV DE LEV SUR LES SEQUELLES COMPORTEMENTALES DU SEPSIS**

En considérant que 1) les études de patch-clamp ont montré que l'application directe de LEV sur des tranches de cerveau affecte la transmission synaptique (Meehan et al. 2012; Wakita et al. 2014; García-Pérez et al. 2015) et 2) les données pharmacocinétiques indiquent que le LEV est peu métabolisé et que son mode d'action ne passe pas par la génération de métabolites bioactifs secondaires produits en périphérie (Benedetti et al. 2004), ces observations suggèrent un potentiel effet du LEV sur le système nerveux périphérique, notamment le nerf vague.

Cette hypothèse est d'autant plus plausible que l'administration intra-péritonéale de LEV entraîne une forte diminution de l'activation neuronale observée post-CLP dans le NTS, ainsi qu'une réduction significative de la mortalité. De plus, tout comme la vagotomie, l'administration intra-péritonéale de LEV ne s'accompagne que d'un effet relatif sur le comportement de peur.

Le LEV pourrait donc présenter des propriétés neuromodulatrices sur l'activité vagale.



Comme le LEV agit préférentiellement sur les synapses, l'utilisation de techniques d'électrophysiologie nous permettrait d'étudier l'effet du LEV sur la transmission synaptique entre les neurones sensitifs du nerf vague et le NTS.

Nous pourrions utiliser des souris génétiquement modifiées Nav1.8-Cre exprimant spécifiquement la Cre-recombinase dans la majorité des neurones sensitifs du nerf vague, auxquelles nous injecterions un virus rétrograde Cre-dépendant codant pour la channelrhodopsine dans le NTS et enfin un virus codant pour la protéine fluorescente GFP dans le NTS. En ajoutant du LEV dans la chambre de *patch clamp*, nous aurions ainsi la possibilité d'enregistrer et d'identifier un potentiel effet du LEV sur les réponses des neurones du NTS (marqués avec la GFP) induites par des stimulations optogénétiques des fibres exprimant la channelrhodopsine provenant du nerf vague. Cette stimulation optogénétique pourrait également être remplacée par une électrode de stimulation directement appliquée dans le faisceau d'axones du nerf vague (*Ragozzino et al. 2020*).

Dans un autre modèle expérimental, nous pourrions injecter un virus rétrograde exprimant de manière Cre-dépendante le marqueur calcique GCaMP dans le NTS chez des souris Nav1.8-Cre. Nous pourrions ensuite prélever les cellules du nodose, qui exprimeront donc le GCaMP et les mettre en culture (*Talbot et al. 2015*). Nous enregistrerions ainsi par imagerie calcique l'activité des neurones du nodose lors d'une stimulation par du LPS, avec ou sans application du LEV. Afin de confirmer l'effet spécifique du LEV sur le nerf vague, nous pourrions comparer les réponses calciques avec celles de neurones de culture du ganglion spinal.

L'ensemble des études présentées dans cette thèse a justifié la proposition, avec le soutien du ministère français de la santé et du réseau TRIGGERSEP, d'un essai clinique randomisé multicentrique sur le LEV chez les patients présentant un choc septique, avec comme résultats primaires et secondaires la durée de l'encéphalopathie et l'incidence du SSPT (brevet : US20200121644A1). Cet essai thérapeutique nous offrira l'opportunité de mieux caractériser les conséquences

à long-terme de l'encéphalopathie sur le comportement et de valider les effets neuroprotecteurs du LEV chez l'Homme.

# BIBLIOGRAPHIE

# BIBLIOGRAPHIE

Adair, Devin, Dennis Truong, Zeinab Esmaeilpour, Nigel Gebodh, Helen Borges, Libby Ho, J. Douglas Bremner, et al. 2020. « Electrical Stimulation of Cranial Nerves in Cognition and Disease ». *Brain Stimulation* 13 (3): 717-50. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2020.02.019>.

Adhikari, Avishek. 2014. « Distributed Circuits Underlying Anxiety ». *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 8. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00112>.

Akiyoshi, Ryohei, Hiroaki Wake, Daisuke Kato, Hiroshi Horiuchi, Riho Ono, Ako Ikegami, Koichiro Haruwaka, et al. 2018. « Microglia Enhance Synapse Activity to Promote Local Network Synchronization ». *ENeuro* 5 (5): ENEURO.0088-18.2018. <https://doi.org/10.1523/ENeuro.0088-18.2018>.

Angus, Derek C., et Tom van der Poll. 2013. « Severe Sepsis and Septic Shock ». *The New England Journal of Medicine* 369 (9): 840-51. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1208623>.

Annane, D., F. Trabold, T. Sharshar, I. Jarrin, A. S. Blanc, J. C. Raphael, et P. Gajdos. 1999. « Inappropriate Sympathetic Activation at Onset of Septic Shock: A Spectral Analysis Approach ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 160 (2): 458-65. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.160.2.9810073>.

Apeldoorn, Franske J. van, Marieke E. Timmerman, Peter Paul A. Mersch, Wiljo J. P. J. van Hout, Sako Visser, Richard van Dyck, et Johan A. den Boer. 2010. « A Randomized Trial of Cognitive-Behavioral Therapy or Selective Serotonin Reuptake Inhibitor or Both Combined for Panic Disorder with or without Agoraphobia: Treatment Results through 1-Year Follow-Up ». *The Journal of Clinical Psychiatry* 71 (5): 574-86. <https://doi.org/10.4088/JCP.08m04681blu>.

Armour, Cherie, Jana Müllerová, et Jon D. Elhai. 2016. « A Systematic Literature Review of PTSD's Latent Structure in the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-IV to DSM-5 ». *Clinical Psychology Review* 44 (mars): 60-74. <https://doi.org/10.1016/j.cpr.2015.12.003>.

Asok, Arun, Eric R. Kandel, et Joseph B. Rayman. 2019. « The Neurobiology of Fear Generalization ». *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 12: 329. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00329>.

Azabou, Eric, Eric Magalhaes, Antoine Braconnier, Lyria Yahiaoui, Guy Moneger, Nicholas Heming, Djillali Annane, et al. 2015. « Early Standard Electroencephalogram Abnormalities Predict Mortality in Septic Intensive Care Unit Patients ». *PLOS ONE* 10 (10): e0139969. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139969>.

Badimon, Ana, Hayley J. Strasburger, Pinar Ayata, Xinhong Chen, Aditya Nair, Ako Ikegami, Philip Hwang, et al. 2020. « Negative Feedback Control of Neuronal Activity by Microglia ». *Nature* 586 (7829): 417-23. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2777-8>.

Barichello, Tatiana, Pavani Sayana, Vijayasree V. Giridharan, Anithachristy S.

- Arumanayagam, Boomadevi Narendran, Amanda Della Giustina, Fabricia Petronilho, João Quevedo, et Felipe Dal-Pizzol. 2019. « Long-Term Cognitive Outcomes After Sepsis: A Translational Systematic Review ». *Molecular Neurobiology* 56 (1): 186-251. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1048-2>.
- Baxter, A. J., K. M. Scott, T. Vos, et H. A. Whiteford. 2013. « Global Prevalence of Anxiety Disorders: A Systematic Review and Meta-Regression ». *Psychological Medicine* 43 (5): 897-910. <https://doi.org/10.1017/S003329171200147X>.
- Baxter, A. J., T. Vos, K. M. Scott, A. J. Ferrari, et H. A. Whiteford. 2014. « The Global Burden of Anxiety Disorders in 2010 ». *Psychological Medicine* 44 (11): 2363-74. <https://doi.org/10.1017/S0033291713003243>.
- Benedetti, M. Strolin, R. Coupez, R. Whomsley, J. M. Nicolas, P. Collart, et E. Baltes. 2004. « Comparative Pharmacokinetics and Metabolism of Levetiracetam, a New Anti-Epileptic Agent, in Mouse, Rat, Rabbit and Dog ». *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems* 34 (3): 281-300. <https://doi.org/10.1080/0049825042000196749>.
- Benusa, Savannah D., et Audrey D. Lafrenaye. 2020. « Microglial process convergence on axonal segments in health and disease ». *Neuroimmunology and neuroinflammation* 7 (23): 23-39. <https://doi.org/10.20517/2347-8659.2019.28>.
- 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. [https://doi.org/10.1016/S1566-0702\(00\)00215-0](https://doi.org/10.1016/S1566-0702(00)00215-0).
- Bertone-Johnson, Elizabeth R., Brian W. Whitcomb, Stacey A. Missmer, Elizabeth W. Karlson, et Janet W. Rich-Edwards. 2012. « Inflammation and Early-Life Abuse in Women ». *American Journal of Preventive Medicine* 43 (6): 611-20. <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2012.08.014>.
- Bienkowski, M. S., et L. Rinaman. 2008. « Noradrenergic Inputs to the Paraventricular Hypothalamus Contribute to Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and Central Fos Activation in Rats after Acute Systemic Endotoxin Exposure ». *Neuroscience* 156 (4): 1093-1102. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.08.011>.
- Bienvenu, Thomas C. M., Cyril Dejean, Daniel Jercog, Bruno Aouizerate, Maël Lemoine, et Cyril Herry. 2021. « The Advent of Fear Conditioning as an Animal Model of Post-Traumatic Stress Disorder: Learning from the Past to Shape the Future of PTSD Research ». *Neuron* 109 (15): 2380-97. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.05.017>.
- Bisson, Jonathan I., Sarah Cosgrove, Catrin Lewis, et Neil P. Robert. 2015. « Post-Traumatic Stress Disorder ». *BMJ (Clinical Research Ed.)* 351 (novembre): h6161.
- Bisson, Jonathan I., Neil P. Roberts, Martin Andrew, Rosalind Cooper, et Catrin Lewis. 2013. « Psychological Therapies for Chronic Post-Traumatic Stress Disorder (PTSD) in Adults ». *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, n° 12 (décembre): CD003388. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003388.pub4>.
- Blanchard, Robert J., Guy Griebel, et David Nutt. 2011. *Handbook of Anxiety and Fear*. Elsevier.

- Bluthé, R. M., B. Michaud, K. W. Kelley, et R. Dantzer. 1996. « Vagotomy Blocks Behavioural Effects of Interleukin-1 Injected via the Intraperitoneal Route but Not via Other Systemic Routes ». *Neuroreport* 7 (15-17): 2823-27. <https://doi.org/10.1097/00001756-199611040-00083>.
- Boland, Claire, Valérie Collet, Emmanuelle Laterre, Corinne Lecuivre, Xavier Wittebole, et Pierre-François Laterre. 2011. « Electrical Vagus Nerve Stimulation and Nicotine Effects in Peritonitis-Induced Acute Lung Injury in Rats ». *Inflammation* 34 (1): 29-35. <https://doi.org/10.1007/s10753-010-9204-5>.
- Borovikova, Lyudmila V., Svetlana Ivanova, Minghuang Zhang, Huan Yang, Galina I. Botchkina, Linda R. Watkins, Haichao Wang, Najj Abumrad, John W. Eaton, et Kevin J. Tracey. 2000. « Vagus Nerve Stimulation Attenuates the Systemic Inflammatory Response to Endotoxin ». *Nature* 405 (6785): 458-62. <https://doi.org/10.1038/35013070>.
- Botta, Paolo, Lynda Demmou, Yu Kasugai, Milica Markovic, Chun Xu, Jonathan P. Fadok, Tingjia Lu, et al. 2015. « Regulating Anxiety with Extrasynaptic Inhibition ». *Nature Neuroscience* 18 (10): 1493-1500. <https://doi.org/10.1038/nn.4102>.
- Boyd, John H., James A. Russell, et Chris D. Fjell. 2014. « The Meta-Genome of Sepsis: Host Genetics, Pathogens and the Acute Immune Response ». *Journal of Innate Immunity* 6 (3): 272-83. <https://doi.org/10.1159/000358835>.
- Breen, M. S., A. X. Maihofer, S. J. Glatt, D. S. Tylee, S. D. Chandler, M. T. Tsuang, V. B. Risbrough, et al. 2015. « Gene Networks Specific for Innate Immunity Define Post-Traumatic Stress Disorder ». *Molecular Psychiatry* 20 (12): 1538-45. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.9>.
- Bzdok, Danilo, et Andreas Meyer-Lindenberg. 2018. « Machine Learning for Precision Psychiatry: Opportunities and Challenges ». *Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging* 3 (3): 223-30. <https://doi.org/10.1016/j.bpsc.2017.11.007>.
- C, Kaur, et Ling Ea. 2017. « The Circumventricular Organs ». *Histology and Histopathology* 32 (9). <https://doi.org/10.14670/HH-11-881>.
- Cai, Haijiang, Wulf Haubensak, Todd E. Anthony, et David J. Anderson. 2014. « Central Amygdala PKC- $\delta$ (+) Neurons Mediate the Influence of Multiple Anorexigenic Signals ». *Nature Neuroscience* 17 (9): 1240-48. <https://doi.org/10.1038/nn.3767>.
- Calancie, Olivia G., Sarosh Khalid-Khan, Linda Booij, et Douglas P. Munoz. 2018. « Eye Movement Desensitization and Reprocessing as a Treatment for PTSD: Current Neurobiological Theories and a New Hypothesis ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1426 (1): 127-45. <https://doi.org/10.1111/nyas.13882>.
- Calhoon, Gwendolyn G., et Kay M. Tye. 2015. « Resolving the Neural Circuits of Anxiety ». *Nature Neuroscience* 18 (10): 1394-1404. <https://doi.org/10.1038/nn.4101>.
- Calik, Michael W., Miodrag Radulovacki, et David W. Carley. 2014. « A Method of Nodose Ganglia Injection in Sprague-Dawley Rat ». *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, n° 93 (novembre): e52233. <https://doi.org/10.3791/52233>.

Campos, Carlos A., Anna J. Bowen, Carolyn W. Roman, et Richard D. Palmiter. 2018. « Encoding of Danger by Parabrachial CGRP Neurons ». *Nature* 555 (7698): 617-22. <https://doi.org/10.1038/nature25511>.

Catalão, Carlos Henrique Rocha, Nilton Nascimento Santos-Junior, Luís Henrique Angenendt da Costa, Anderson Oliveira Souza, Evelin Capellari Cárnio, Adriano Sebollela, Luciane Carla Alberici, et Maria José Alves Rocha. 2020. « Simvastatin Prevents Long-Term Cognitive Deficits in Sepsis Survivor Rats by Reducing Neuroinflammation and Neurodegeneration ». *Neurotoxicity Research* 38 (4): 871-86. <https://doi.org/10.1007/s12640-020-00222-z>.

Cavaillon, Jean-Marc. 2017. « La fièvre puerpérale : de Lucrece Borgia à Louis Pasteur ». Association des anciens élèves de l'Institut Pasteur.

Chae, Jeong-Ho, Ziad Nahas, Mikhail Lomarev, Stewart Denslow, Jeffrey P Lorberbaum, Daryl E Bohning, et Mark S George. 2003. « A Review of Functional Neuroimaging Studies of Vagus Nerve Stimulation (VNS) ». *Journal of Psychiatric Research* 37 (6): 443-55. [https://doi.org/10.1016/S0022-3956\(03\)00074-8](https://doi.org/10.1016/S0022-3956(03)00074-8).

Chavan, Sangeeta S., Patricio T. Huerta, Sergio Robbiati, S. I. Valdes-Ferrer, Mahendar Ochani, Meghan Dancho, Maya Frankfurt, Bruce T. Volpe, Kevin J. Tracey, et Betty Diamond. 2012. « HMGB1 Mediates Cognitive Impairment in Sepsis Survivors ». *Molecular Medicine* 18 (1): 930. <https://doi.org/10.2119/molmed.2012.00195>.

Chiang, Michael C., Anna Bowen, Lindsey A. Schier, Domenico Tupone, Olivia Uddin, et Mary M. Heinricher. 2019. « Parabrachial Complex: A Hub for Pain and Aversion ». *Journal of Neuroscience* 39 (42): 8225-30. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1162-19.2019>.

Chiang, Michael C., Eileen K. Nguyen, Martha Canto-Bustos, Andrew E. Papale, Anne-Marie M. Oswald, et Sarah E. Ross. 2020. « Divergent Neural Pathways Emanating from the Lateral Parabrachial Nucleus Mediate Distinct Components of the Pain Response ». *Neuron* 106 (6): 927-939.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.03.014>.

Childs, Jessica E., Jaime DeLeon, Emily Nickel, et Sven Kroener. 2017. « Vagus Nerve Stimulation Reduces Cocaine Seeking and Alters Plasticity in the Extinction Network ». *Learning & Memory* 24 (1): 35-42. <https://doi.org/10.1101/lm.043539.116>.

Chiu, Isaac M., Balthasar A. Heesters, Nader Ghasemlou, Christian A. Von Hehn, Fan Zhao, Johnathan Tran, Brian Wainger, et al. 2013. « Bacteria Activate Sensory Neurons That Modulate Pain and Inflammation ». *Nature* 501 (7465): 52-57. <https://doi.org/10.1038/nature12479>.

Ch'ng, Sarah, Jingjing Fu, Robyn M. Brown, Stuart J. McDougall, et Andrew J. Lawrence. 2018. « The Intersection of Stress and Reward: BNST Modulation of Aversive and Appetitive States ». *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, New directions in addiction, 87 (décembre): 108-25. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.01.005>.

Clark, K. B., D. C. Smith, D. L. Hassert, R. A. Browning, D. K. Naritoku, et R. A. Jensen. 1998. « Posttraining Electrical Stimulation of Vagal Afferents with Concomitant

Vagal Efferent Inactivation Enhances Memory Storage Processes in the Rat ». *Neurobiology of Learning and Memory* 70 (3): 364-73. <https://doi.org/10.1006/nlme.1998.3863>.

Cotero, Victoria, Ying Fan, Tea Tsaava, Adam M. Kressel, Ileana Hancu, Paul Fitzgerald, Kirk Wallace, et al. 2019. « Noninvasive Sub-Organ Ultrasound Stimulation for Targeted Neuromodulation ». *Nature Communications* 10 (1): 952. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08750-9>.

Cotero, Victoria, Hiromi Miwa, John Graf, Jeffrey Ashe, Evelina Loghin, Dino Di Carlo, et Chris Puleo. 2020. « Peripheral Focused Ultrasound Neuromodulation (PFUS) ». *Journal of Neuroscience Methods* 341 (juillet): 108721. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2020.108721>.

Craske, Michelle G., Scott L. Rauch, Robert Ursano, Jason Prenoveau, Daniel S. Pine, et Richard E. Zinbarg. 2009. « What Is an Anxiety Disorder? » *Depression and Anxiety* 26 (12): 1066-85. <https://doi.org/10.1002/da.20633>.

Craske, Michelle G, et Murray B Stein. 2016. « Anxiety ». *The Lancet* 388 (10063): 3048-59. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30381-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30381-6).

Crippa, Iliaria Alice, Carles Subirà, Jean-Louis Vincent, Rafael Fernandez Fernandez, Silvia Cano Hernandez, Federica Zama Cavicchi, Jacques Creteur, et Fabio Silvio Taccone. 2018. « Impaired Cerebral Autoregulation Is Associated with Brain Dysfunction in Patients with Sepsis ». *Critical Care (London, England)* 22 (1): 327. <https://doi.org/10.1186/s13054-018-2258-8>.

Croese, Tommaso, Giulia Castellani, et Michal Schwartz. 2021. « Immune Cell Compartmentalization for Brain Surveillance and Protection ». *Nature Immunology* 22 (9): 1083-92. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-00994-2>.

Cryan, John F., et Andrew Holmes. 2005. « The Ascent of Mouse: Advances in Modelling Human Depression and Anxiety ». *Nature Reviews. Drug Discovery* 4 (9): 775-90. <https://doi.org/10.1038/nrd1825>.

Cserép, Csaba, Balázs Pósfai, et Ádám Dénes. 2021. « Shaping Neuronal Fate: Functional Heterogeneity of Direct Microglia-Neuron Interactions ». *Neuron* 109 (2): 222-40. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.11.007>.

Cserép, Csaba, Balázs Pósfai, Nikolett Lénárt, Rebeka Fekete, Zsófia I. László, Zolt Lele, Barbara Orsolits, et al. 2020. « Microglia monitor and protect neuronal function through specialized somatic purinergic junctions ». *Science* 367 (6477): 528-37. <https://doi.org/10.1126/science.aax6752>.

Cui, Yuting, Guanghui Lv, Sen Jin, Jie Peng, Jing Yuan, Xiaobin He, Hui Gong, Fuqiang Xu, Tonghui Xu, et Haohong Li. 2017. « A Central Amygdala-Substantia Innominata Neural Circuitry Encodes Aversive Reinforcement Signals ». *Cell Reports* 21 (7): 1770-82. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.062>.

Cunningham, Colm, David C. Wilcockson, Suzanne Champion, Katie Lunnon, et V. Hugh Perry. 2005. « Central and Systemic Endotoxin Challenges Exacerbate the Local Inflammatory Response and Increase Neuronal Death during Chronic Neurodegeneration ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25 (40): 9275-84.



<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2614-05.2005>.

Dagher, Nabil N., Allison R. Najafi, Kara M. Neely Kayala, Monica R. P. Elmore, Terra E. White, Rodrigo Medeiros, Brian L. West, et Kim N. Green. 2015. « Colony-Stimulating Factor 1 Receptor Inhibition Prevents Microglial Plaque Association and Improves Cognition in 3xTg-AD Mice ». *Journal of Neuroinflammation* 12 (août): 139. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0366-9>.

Daniel, Sarah E., et Donald G. Rainnie. 2016. « Stress Modulation of Opposing Circuits in the Bed Nucleus of the Stria Terminalis ». *Neuropsychopharmacology* 41 (1): 103-25. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.178>.

Dantzer, Robert. 2018. « Neuroimmune Interactions: From the Brain to the Immune System and Vice Versa ». *Physiological Reviews* 98 (1): 477-504. <https://doi.org/10.1152/physrev.00039.2016>.

Dantzer, Robert, Jason C. O'Connor, Gregory G. Freund, Rodney W. Johnson, et Keith W. Kelley. 2008. « From Inflammation to Sickness and Depression: When the Immune System Subjugates the Brain ». *Nature Reviews. Neuroscience* 9 (1): 46-56. <https://doi.org/10.1038/nrn2297>.

Davis, Michael, David L. Walker, Leigh Miles, et Christian Grillon. 2010. « Phasic vs Sustained Fear in Rats and Humans: Role of the Extended Amygdala in Fear vs Anxiety ». *Neuropsychopharmacology* 35 (1): 105-35. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.109>.

Davydow, Ds, Hough Cl, Langa Km, et Iwashyna Tj. 2012. « Depressive Symptoms in Spouses of Older Patients with Severe Sepsis ». *Critical Care Medicine* 40 (8). <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3182536a81>.

Dawson, Jesse, David Pierce, Anand Dixit, Teresa J. Kimberley, Michele Robertson, Brent Tarver, Omar Hilmi, et al. 2016. « Safety, Feasibility, and Efficacy of Vagus Nerve Stimulation Paired With Upper-Limb Rehabilitation After Ischemic Stroke ». *Stroke* 47 (1): 143-50. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.115.010477>.

Degroot, Aldemar, et George G. Nomikos. 2004. « Genetic Deletion and Pharmacological Blockade of CB1 Receptors Modulates Anxiety in the Shock-Probe Burying Test ». *The European Journal of Neuroscience* 20 (4): 1059-64. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03556.x>.

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. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.01.001>.

Deslauriers, Jessica, Mate Toth, Andre Der-Avakian, et Victoria B. Risbrough. 2018. « Current Status of Animal Models of Posttraumatic Stress Disorder: Behavioral and Biological Phenotypes, and Future Challenges in Improving Translation ». *Biological Psychiatry*, Molecular Signatures of Stress and Posttraumatic Stress Disorder, 83 (10): 895-907. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.11.019>.

D'Mello, Charlotte, Tai Le, et Mark G. Swain. 2009. « Cerebral Microglia Recruit Monocytes into the Brain in Response to Tumor Necrosis Factor $\alpha$  Signaling during Peripheral Organ Inflammation ». *The Journal of Neuroscience* 29 (7): 2089-2102.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3567-08.2009>.

D'Mello, Charlotte, Kiarash Riazi, Tai Le, Katarzyna M. Stevens, Arthur Wang, Derek M. McKay, Quentin J. Pittman, et Mark G. Swain. 2013. « P-Selectin-Mediated Monocyte–Cerebral Endothelium Adhesive Interactions Link Peripheral Organ Inflammation To Sickness Behaviors ». *Journal of Neuroscience* 33 (37): 14878-88. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1329-13.2013>.

D'Mello, Charlotte, et Mark G. Swain. 2017. « Immune-to-Brain Communication Pathways in Inflammation-Associated Sickness and Depression ». *Current Topics in Behavioral Neurosciences* 31: 73-94. [https://doi.org/10.1007/7854\\_2016\\_37](https://doi.org/10.1007/7854_2016_37).

Dong, H. W., G. D. Petrovich, A. G. Watts, et L. W. Swanson. 2001. « Basic Organization of Projections from the Oval and Fusiform Nuclei of the Bed Nuclei of the Stria Terminalis in Adult Rat Brain ». *The Journal of Comparative Neurology* 436 (4): 430-55. <https://doi.org/10.1002/cne.1079>.

Duvarci, Sevil, et Denis Pare. 2014. « Amygdala Microcircuits Controlling Learned Fear ». *Neuron* 82 (5): 966-80. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.04.042>.

Eidelman, L. A., D. Putterman, C. Putterman, et C. L. Sprung. 1996. « The Spectrum of Septic Encephalopathy. Definitions, Etiologies, and Mortalities ». *JAMA* 275 (6): 470-73.

Eijk, Maarten M. J. van, Kit C. B. Roes, Marina L. H. Honing, Michael A. Kuiper, Attila Karakus, Mathieu van der Jagt, Peter E. Spronk, et al. 2010. « Effect of Rivastigmine as an Adjunct to Usual Care with Haloperidol on Duration of Delirium and Mortality in Critically Ill Patients: A Multicentre, Double-Blind, Placebo-Controlled Randomised Trial ». *Lancet (London, England)* 376 (9755): 1829-37. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61855-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61855-7).

Ek, M., M. Kurosawa, T. Lundeberg, et A. Ericsson. 1998. « Activation of Vagal Afferents after Intravenous Injection of Interleukin-1beta: Role of Endogenous Prostaglandins ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 18 (22): 9471-79.

Ekdahl, Christine T., Jan-Hendrik Claasen, Sara Bonde, Zaal Kokaia, et Olle Lindvall. 2003. « Inflammation Is Detrimental for Neurogenesis in Adult Brain ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (23): 13632-37. <https://doi.org/10.1073/pnas.2234031100>.

Elmore, Monica R. P., Rafael J. Lee, Brian L. West, et Kim N. Green. 2015. « Characterizing Newly Repopulated Microglia in the Adult Mouse: Impacts on Animal Behavior, Cell Morphology, and Neuroinflammation ». *PloS One* 10 (4): e0122912. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122912>.

Elmore, Monica R. P., Allison R. Najafi, Maya A. Koike, Nabil N. Dagher, Elizabeth E. Spangenberg, Rachel A. Rice, Masashi Kitazawa, et al. 2014. « Colony-Stimulating Factor 1 Receptor Signaling Is Necessary for Microglia Viability, Unmasking a Microglia Progenitor Cell in the Adult Brain ». *Neuron* 82 (2): 380-97. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.040>.

Elzinga, B. M, et J. D. Bremner. 2002. « Are the Neural Substrates of Memory the Final Common Pathway in Posttraumatic Stress Disorder (PTSD)? » *Journal of*

*Affective Disorders* 70 (1): 1-17. [https://doi.org/10.1016/S0165-0327\(01\)00351-2](https://doi.org/10.1016/S0165-0327(01)00351-2).

Eraly, Satish A., Caroline M. Nievergelt, Adam X. Maihofer, Donald A. Barkauskas, Nilima Biswas, Agorastos Agorastos, Daniel T. O'Connor, Dewleen G. Baker, et Marine Resiliency Study Team. 2014. « Assessment of Plasma C-Reactive Protein as a Biomarker of Posttraumatic Stress Disorder Risk ». *JAMA Psychiatry* 71 (4): 423-31. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2013.4374>.

Fabene, Paolo F., Graciela Navarro Mora, Marianna Martinello, Barbara Rossi, Flavia Merigo, Linda Ottoboni, Simona Bach, et al. 2008. « A Role for Leukocyte-Endothelial Adhesion Mechanisms in Epilepsy ». *Nature Medicine* 14 (12): 1377-83. <https://doi.org/10.1038/nm.1878>.

Fanselow, Michael S., et Hong-Wei Dong. 2010. « Are The Dorsal and Ventral Hippocampus functionally distinct structures? » *Neuron* 65 (1): 7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.11.031>.

Fenster, Robert J., Lauren A. M. Lebois, Kerry J. Ressler, et Junghyup Suh. 2018. « Brain Circuit Dysfunction in Post-Traumatic Stress Disorder: From Mouse to Man ». *Nature Reviews Neuroscience* 19 (9): 535-51. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0039-7>.

Fink, Mitchell P., et H. Shaw Warren. 2014. « Strategies to Improve Drug Development for Sepsis ». *Nature Reviews Drug Discovery* 13 (10): 741-58. <https://doi.org/10.1038/nrd4368>.

Fisher, C. J., J. M. Agosti, S. M. Opal, S. F. Lowry, R. A. Balk, J. C. Sadoff, E. Abraham, R. M. Schein, et E. Benjamin. 1996. « Treatment of Septic Shock with the Tumor Necrosis Factor Receptor:Fc Fusion Protein. The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group ». *The New England Journal of Medicine* 334 (26): 1697-1702. <https://doi.org/10.1056/NEJM199606273342603>.

Fleischmann, Carolin, André Scherag, Neill K. J. Adhikari, Christiane S. Hartog, Thomas Tsaganos, Peter Schlattmann, Derek C. Angus, Konrad Reinhart, et International Forum of Acute Care Trialists. 2016. « Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-Treated Sepsis. Current Estimates and Limitations ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 193 (3): 259-72. <https://doi.org/10.1164/rccm.201504-0781OC>.

Galindo, María F., Ichiro Ikuta, Xiongwei Zhu, Gemma Casadesus, et Joaquín Jordán. 2010. « Mitochondrial Biology in Alzheimer's Disease Pathogenesis ». *Journal of Neurochemistry* 114 (4): 933-45. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06814.x>.

García-Pérez, Elizabeth, Kashif Mahfooz, João Covita, Aitor Zanduetta, et John F. Wesseling. 2015. « Levetiracetam Accelerates the Onset of Supply Rate Depression in Synaptic Vesicle Trafficking ». *Epilepsia* 56 (4): 535-45. <https://doi.org/10.1111/epi.12930>.

Ginsburg, Golda S., Emily M. Becker, Courtney P. Keeton, Dara Sakolsky, John Piacentini, Anne Marie Albano, Scott N. Compton, et al. 2014. « Naturalistic Follow-up of Youths Treated for Pediatric Anxiety Disorders ». *JAMA Psychiatry* 71 (3): 310-18. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2013.4186>.

Goehler, L. E., R. P. Gaykema, S. E. Hammack, S. F. Maier, et L. R. Watkins. 1998. « Interleukin-1 Induces c-Fos Immunoreactivity in Primary Afferent Neurons of the Vagus Nerve ». *Brain Research* 804 (2): 306-10. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(98\)00685-4](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(98)00685-4).

Goehler, Lisa E., Ronald P. A. Gaykema, Noel Opitz, Rebecca Reddaway, Nadia Badr, et Mark Lyte. 2005. « Activation in Vagal Afferents and Central Autonomic Pathways: Early Responses to Intestinal Infection with *Campylobacter Jejuni* ». *Brain, Behavior, and Immunity* 19 (4): 334-44. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2004.09.002>.

Gofton, Teneille E., et G. Bryan Young. 2012. « Sepsis-Associated Encephalopathy ». *Nature Reviews. Neurology* 8 (10): 557-66. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.183>.

Goswami, Sonal, Olga Rodríguez-Sierra, Michele Cascardi, et Denis Pare. 2013. « Animal Models of Post-Traumatic Stress Disorder: Face Validity ». *Frontiers in Neuroscience* 7. <https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00089>.

Gotts, Jeffrey E., et Michael A. Matthay. 2016. « Sepsis: Pathophysiology and Clinical Management ». *BMJ (Clinical Research Ed.)* 353 (mai): i1585. <https://doi.org/10.1136/bmj.i1585>.

Groenewegen, H. J., C. I. Wright, et H. B. Uylings. 1997. « The Anatomical Relationships of the Prefrontal Cortex with Limbic Structures and the Basal Ganglia ». *Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)* 11 (2): 99-106. <https://doi.org/10.1177/026988119701100202>.

Gruart, Agnès, María Dolores Muñoz, et José M. Delgado-García. 2006. « Involvement of the CA3-CA1 Synapse in the Acquisition of Associative Learning in Behaving Mice ». *Journal of Neuroscience* 26 (4): 1077-87. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2834-05.2006>.

Guardado, Pedro, Anlys Olivera, Heather L. Rusch, Michael Roy, Christiana Martin, Natasha Lejbman, Hwyunhwa Lee, et Jessica M. Gill. 2016. « Altered Gene Expression of the Innate Immune, Neuroendocrine, and Nuclear Factor-Kappa B (NF-KB) Systems Is Associated with Posttraumatic Stress Disorder in Military Personnel ». *Journal of Anxiety Disorders* 38 (mars): 9-20. <https://doi.org/10.1016/j.janxdis.2015.12.004>.

Guffanti, Guia, Sandro Galea, Lulu Yan, Andrea L. Roberts, Nadia Solovieff, Allison E. Aiello, Jordan W. Smoller, et al. 2013. « Genome-Wide Association Study Implicates a Novel RNA Gene, the lincRNA AC068718.1, as a Risk Factor for Post-Traumatic Stress Disorder in Women ». *Psychoneuroendocrinology* 38 (12): 3029-38. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.08.014>.

*Guidelines for the Management of Conditions Specifically Related to Stress*. 2013. WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee. Geneva: World Health Organization. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK159725/>.

Guo, Min, Tao Liu, Jun-Cheng Guo, Xiang-Ling Jiang, Feng Chen, et Yun-Suo Gao. 2012. « Study on Serum Cytokine Levels in Posttraumatic Stress Disorder Patients ». *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 5 (4): 323-25. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(12\)60048-0](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(12)60048-0).

- Han, Sung, Matthew T. Soleiman, Marta E. Soden, Larry S. Zweifel, et Richard D. Palmiter. 2015. « Elucidating an Affective Pain Circuit That Creates a Threat Memory ». *Cell* 162 (2): 363-74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.057>.
- Hartley, Nolan D., Andrew D. Gaulden, Rita Báldi, Nathan D. Winters, Gregory J. Salimando, Luis Eduardo Rosas-Vidal, Alexis Jameson, Danny G. Winder, et Sachin Patel. 2019. « Dynamic Remodeling of a Basolateral-to-Central Amygdala Glutamatergic Circuit across Fear States ». *Nature Neuroscience* 22 (12): 2000-2012. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0528-7>.
- Hassert, D. L., T. Miyashita, et C. L. Williams. 2004. « The Effects of Peripheral Vagal Nerve Stimulation at a Memory-Modulating Intensity on Norepinephrine Output in the Basolateral Amygdala ». *Behavioral Neuroscience* 118 (1): 79-88. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.118.1.79>.
- Haubensak, Wulf, Prabhat S. Kunwar, Haijiang Cai, Stephane Cioocchi, Nicholas R. Wall, Ravikumar Ponnusamy, Jonathan Biag, et al. 2010. « Genetic Dissection of an Amygdala Microcircuit That Gates Conditioned Fear ». *Nature* 468 (7321): 270-76. <https://doi.org/10.1038/nature09553>.
- Haynes, Sharon E., Gunther Hollopeter, Guang Yang, Dana Kurpius, Michael E. Dailey, Wen-Biao Gan, et David Julius. 2006. « The P2Y12 Receptor Regulates Microglial Activation by Extracellular Nucleotides ». *Nature Neuroscience* 9 (12): 1512-19. <https://doi.org/10.1038/nn1805>.
- Heinzelmann, Morgan, et Jessica Gill. 2013. « Epigenetic Mechanisms Shape the Biological Response to Trauma and Risk for PTSD: A Critical Review ». *Nursing Research and Practice* 2013: 417010. <https://doi.org/10.1155/2013/417010>.
- Heming, Nicholas, Aurelien Mazeraud, Franck Verdonk, Fernando A. Bozza, Fabrice Chrétien, et Tarek Sharshar. 2017. « Neuroanatomy of Sepsis-Associated Encephalopathy ». *Critical Care (London, England)* 21 (1): 65. <https://doi.org/10.1186/s13054-017-1643-z>.
- Hendriksen, Hendrikus, Berend Olivier, et Ronald S. Oosting. 2014. « From non-pharmacological treatments for post-traumatic stress disorder to novel therapeutic targets ». *European Journal of Pharmacology* 732 (juin): 139-58. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.03.031>.
- Henry, Thomas R., Roy A. E. Bakay, John R. Votaw, Page B. Pennell, Charles M. Epstein, Tracy L. Faber, Scott T Grafton, et John M. Hoffman. 1998. « Brain Blood Flow Alterations Induced by Therapeutic Vagus Nerve Stimulation in Partial Epilepsy: I. Acute Effects at High and Low Levels of Stimulation ». *Epilepsia* 39 (9): 983-90. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1998.tb01448.x>.
- Hensley, Matthew K., John P. Donnelly, Erin F. Carlton, et Hallie C. Prescott. 2019. « Epidemiology and Outcomes of Cancer-Related Versus Non-Cancer-Related Sepsis Hospitalizations ». *Critical Care Medicine* 47 (10): 1310-16. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000003896>.
- Herz, Jasmin, et Jonathan Kipnis. 2016. « Bugs and Brain: How Infection Makes You Feel Blue ». *Immunity* 44 (4): 718-20. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.03.010>.

Hetteema, J. M., S. H. Aggen, T. S. Kubarych, M. C. Neale, et K. S. Kendler. 2015. « Identification and Validation of Mixed Anxiety-Depression ». *Psychological Medicine* 45 (14): 3075-84. <https://doi.org/10.1017/S0033291715001038>.

Hoogland, Inge C.M., Carin Houbolt, David J. van Westerloo, Willem A. van Gool, et Diederik van de Beek. 2015. « Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments ». *Journal of Neuroinflammation* 12 (1): 114. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0332-6>.

Hori, Hiroaki, et Yoshiharu Kim. 2019. « Inflammation and Post-Traumatic Stress Disorder ». *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 73 (4): 143-53. <https://doi.org/10.1111/pcn.12820>.

Hoskins, Mathew, Jennifer Pearce, Andrew Bethell, Liliya Dankova, Corrado Barbui, Wietse A. Tol, Mark van Ommeren, et al. 2015. « Pharmacotherapy for Post-Traumatic Stress Disorder: Systematic Review and Meta-Analysis ». *The British Journal of Psychiatry* 206 (2): 93-100. <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.114.148551>.

Hosoi, Toru, Yasunobu Okuma, Tadashi Matsuda, et Yasuyuki Nomura. 2005. « Novel Pathway for LPS-Induced Afferent Vagus Nerve Activation: Possible Role of Nodose Ganglion ». *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical* 120 (1-2): 104-7. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2004.11.012>.

Hotchkiss, Richard S., Guillaume Monneret, et Didier Payen. 2013. « Sepsis-Induced Immunosuppression: From Cellular Dysfunctions to Immunotherapy ». *Nature Reviews. Immunology* 13 (12): 862-74. <https://doi.org/10.1038/nri3552>.

Howren, M. Bryant, Donald M. Lamkin, et Jerry Suls. 2009. « Associations of Depression with C-Reactive Protein, IL-1, and IL-6: A Meta-Analysis ». *Psychosomatic Medicine* 71 (2): 171-86. <https://doi.org/10.1097/PSY.0b013e3181907c1b>.

Hristovska, Ines, Franck Verdonk, Jean-Christophe Comte, Eileen S. Tsai, Virginie Desestret, Jérôme Honnorat, Fabrice Chrétien, et Olivier Pascual. 2020. « Ketamine/Xylazine and Barbiturates Modulate Microglial Morphology and Motility Differently in a Mouse Model ». *PLoS One* 15 (8): e0236594. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236594>.

Huang, Dake, Fillan S. Grady, Lila Peltekian, et Joel C. Geerling. 2021. « Efferent Projections of Vglut2, Foxp2, and Pdyn Parabrachial Neurons in Mice ». *Journal of Comparative Neurology* 529 (4): 657-93. <https://doi.org/10.1002/cne.24975>.

Huerta, Patricio T., Sergio Robbiati, Tomás S. Huerta, Anchal Sabharwal, Roseann Berlin, Maya Frankfurt, et Bruce T. Volpe. 2016. « Preclinical Models of Overwhelming Sepsis Implicate the Neural System That Encodes Contextual Fear Memory ». *Molecular Medicine* 22: 789. <https://doi.org/10.2119/molmed.2015.00201>.

Hulsey, Daniel R., Jonathan R. Riley, Kristofer W. Loerwald, Robert L. Rennaker, Michael P. Kilgard, et Seth A. Hays. 2017. « Parametric Characterization of Neural Activity in the Locus Coeruleus in Response to Vagus Nerve Stimulation ». *Experimental Neurology* 289 (mars): 21-30. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.12.005>.

Huston, Jared M., Mahendar Ochani, Mauricio Rosas-Ballina, Hong Liao, Kanta Ochani, Valentin A. Pavlov, Margot Gallowitsch-Puerta, et al. 2006. « Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis ». *Journal of Experimental Medicine* 203 (7): 1623-28. <https://doi.org/10.1084/jem.20052362>.

Huston, J.M., M. Gallowitsch-Puerta, M. Ochani, K. Ochani, R. Yuan, M. Rosas-Ballina, M. Ashok, et al. 2007. « Transcutaneous Vagus Nerve Stimulation Reduces Serum High Mobility Group Box 1 Levels and Improves Survival in Murine Sepsis ». *Critical Care Medicine* 35 (12): 2762-68. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000288102.15975.BA>.

Iwashyna, Theodore J., E. Wesley Ely, Dylan M. Smith, et Kenneth M. Langa. 2010. « Long-Term Cognitive Impairment and Functional Disability among Survivors of Severe Sepsis ». *JAMA* 304 (16): 1787-94. <https://doi.org/10.1001/jama.2010.1553>.

Izquierdo, Ivan, Cristiane R. G. Furini, et Jociane C. Myskiw. 2016. « Fear Memory ». *Physiological Reviews* 96 (2): 695-750. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2015>.

Jacobs, Heidi I. L., Joost M. Riphagen, Chantalle M. Razat, Svenja Wiese, et Alexander T. Sack. 2015. « Transcutaneous Vagus Nerve Stimulation Boosts Associative Memory in Older Individuals ». *Neurobiology of Aging* 36 (5): 1860-67. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.02.023>.

Janak, Patricia H., et Kay M. Tye. 2015. « From Circuits to Behaviour in the Amygdala ». *Nature* 517 (7534): 284-92. <https://doi.org/10.1038/nature14188>.

Javed, Kinaan, Vamsi Reddy, et Forshing Lui. 2021. *Neuroanatomy, Choroid Plexus. StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing.* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538156/>.

Jennings, Joshua H., Dennis R. Sparta, Alice M. Stamatakis, Randall L. Ung, Kristen E. Pleil, Thomas L. Kash, et Garret D. Stuber. 2013. « Distinct Extended Amygdala Circuits for Divergent Motivational States ». *Nature* 496 (7444): 224-28. <https://doi.org/10.1038/nature12041>.

Jimenez, Jessica C., Katy Su, Alexander R. Goldberg, Victor M. Luna, Jeremy S. Biane, Gokhan Ordek, Pengcheng Zhou, et al. 2018. « Anxiety Cells in a Hippocampal-Hypothalamic Circuit ». *Neuron* 97 (3): 670-683.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.01.016>.

Kaczurkin, Antonia N., et Edna B. Foa. 2015. « Cognitive-behavioral therapy for anxiety disorders: an update on the empirical evidence ». *Dialogues in Clinical Neuroscience* 17 (3): 337-46.

Kanashiro, Alexandre, Fabiane Sônego, Raphael G. Ferreira, Fernanda V. S. Castanheira, Caio A. Leite, Vanessa F. Borges, Daniele C. Nascimento, et al. 2017. « Therapeutic Potential and Limitations of Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway in Sepsis ». *Pharmacological Research* 117 (mars): 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.12.014>.

Känel, Roland von, Urs Hepp, Bernd Kraemer, Rafael Traber, Marius Keel, Ladislav

Mica, et Ulrich Schnyder. 2007. « Evidence for Low-Grade Systemic Proinflammatory Activity in Patients with Posttraumatic Stress Disorder ». *Journal of Psychiatric Research* 41 (9): 744-52. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2006.06.009>.

Kaouane, Nadia, Yves Porte, Monique Vallée, Laurent Brayda-Bruno, Nicole Mons, Ludovic Calandrea, Aline Marighetto, Pier Vincenzo Piazza, et Aline Desmedt. 2012. « Glucocorticoids Can Induce PTSD-Like Memory Impairments in Mice ». *Science* 335 (6075): 1510-13. <https://doi.org/10.1126/science.1207615>.

Karlsson, Sari, Marjut Varpula, Esko Ruokonen, Ville Pettilä, Ilkka Parviainen, Tero I. Ala-Kokko, Elina Kolho, et Esa M. Rintala. 2007. « Incidence, Treatment, and Outcome of Severe Sepsis in ICU-Treated Adults in Finland: The Finnsepsis Study ». *Intensive Care Medicine* 33 (3): 435-43. <https://doi.org/10.1007/s00134-006-0504-z>.

Kaur, Charanjit, Gurugirijha Rathnasamy, et Eng-Ang Ling. 2016. « The Choroid Plexus in Healthy and Diseased Brain ». *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 75 (3): 198-213. <https://doi.org/10.1093/jnen/nlv030>.

Kawazoe, Yu, Kyohei Miyamoto, Takeshi Morimoto, Tomonori Yamamoto, Akihiro Fuke, Atsunori Hashimoto, Hiroyuki Koami, et al. 2017. « Effect of Dexmedetomidine on Mortality and Ventilator-Free Days in Patients Requiring Mechanical Ventilation With Sepsis: A Randomized Clinical Trial ». *JAMA* 317 (13): 1321-28. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.2088>.

Keh, Didier, Evelyn Trips, Gernot Marx, Stefan P. Wirtz, Emad Abduljawwad, Sven Bercker, Holger Bogatsch, et al. 2016. « Effect of Hydrocortisone on Development of Shock Among Patients With Severe Sepsis: The HYPRESS Randomized Clinical Trial ». *JAMA* 316 (17): 1775-85. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.14799>.

Kerrigan, Steve W., et Ignacio Martin-Loeches. 2018. « Public Awareness of Sepsis Is Still Poor: We Need to Do More ». *Intensive Care Medicine* 44 (10): 1771-73. <https://doi.org/10.1007/s00134-018-5307-5>.

Kessler, Ronald C., Ayelet Meron Ruscio, Katherine Shear, et Hans-Ulrich Wittchen. 2010. « Epidemiology of Anxiety Disorders ». *Current Topics in Behavioral Neurosciences* 2: 21-35.

Kessler, Ronald C., Amanda Sonnega, Evelyn Bromet, Michael Hughes, et Christopher B. Nelson. 1995. « Posttraumatic Stress Disorder in the National Comorbidity Survey ». *Archives of General Psychiatry* 52 (12): 1048-60. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1995.03950240066012>.

Kida, Satoshi. 2019. « Reconsolidation/destabilization, extinction and forgetting of fear memory as therapeutic targets for PTSD ». *Psychopharmacology* 236 (1): 49-57. <https://doi.org/10.1007/s00213-018-5086-2>.

Kim, Sung-Yon, Avishek Adhikari, Soo Yeun Lee, James H. Marshel, Christina K. Kim, Caitlin S. Mallory, Maisie Lo, et al. 2013. « Diverging Neural Pathways Assemble a Behavioural State from Separable Features in Anxiety ». *Nature* 496 (7444): 219-23. <https://doi.org/10.1038/nature12018>.

Kobayashi, Yoshiro. 2010. « The Regulatory Role of Nitric Oxide in



Proinflammatory Cytokine Expression during the Induction and Resolution of Inflammation ». *Journal of Leukocyte Biology* 88 (6): 1157-62. <https://doi.org/10.1189/jlb.0310149>.

Koleske, Anthony J. 2013. « Molecular Mechanisms of Dendrite Stability ». *Nature Reviews Neuroscience* 14 (8): 536-50. <https://doi.org/10.1038/nrn3486>.

Kulkarni, Vaishali A., et Bonnie L. Firestein. 2012. « The Dendritic Tree and Brain Disorders ». *Molecular and Cellular Neuroscience* 50 (1): 10-20. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2012.03.005>.

Kumar, Anand, Daniel Roberts, Kenneth E. Wood, Bruce Light, Joseph E. Parrillo, Satendra Sharma, Robert Suppes, et al. 2006. « Duration of Hypotension before Initiation of Effective Antimicrobial Therapy Is the Critical Determinant of Survival in Human Septic Shock ». *Critical Care Medicine* 34 (6): 1589-96. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000217961.75225.E9>.

Lebow, M. A., et A. Chen. 2016. « Overshadowed by the Amygdala: The Bed Nucleus of the Stria Terminalis Emerges as Key to Psychiatric Disorders ». *Molecular Psychiatry* 21 (4): 450-63. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.1>.

LeDoux, Joseph E. 2000. « Emotion Circuits in the Brain ». *Annual Review of Neuroscience* 23 (1): 155-84. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.23.1.155>.

———. 2014. « Coming to Terms with Fear ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (8): 2871-78. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400335111>.

Li, Haohong, Mario A. Penzo, Hiroki Taniguchi, Charles D. Kopec, Z. Josh Huang, et Bo Li. 2013. « Experience-Dependent Modification of a Central Amygdala Fear Circuit ». *Nature Neuroscience* 16 (3): 332-39. <https://doi.org/10.1038/nn.3322>.

Li, Hui, Liang Liu, Dingyu Zhang, Jiuyang Xu, Huaping Dai, Nan Tang, Xiao Su, et Bin Cao. 2020. « SARS-CoV-2 and Viral Sepsis: Observations and Hypotheses ». *Lancet (London, England)* 395 (10235): 1517-20. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30920-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30920-X).

Lilley, Elliot, Rachel Armstrong, Nicole Clark, Peter Gray, Penny Hawkins, Karen Mason, Noelia López-Salesansky, et al. 2015. « Refinement of Animal Models of Sepsis and Septic Shock ». *Shock* 43 (4): 304-16. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000318>.

Lin, Joy E., Thomas C. Neylan, Elissa Epel, et Aoife O'Donovan. 2016. « Associations of Childhood Adversity and Adulthood Trauma with C-Reactive Protein: A Cross-Sectional Population-Based Study ». *Brain, Behavior, and Immunity* 53 (mars): 105-12. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.11.015>.

Liu, Vincent, Gabriel J. Escobar, John D. Greene, Jay Soule, Alan Whippy, Derek C. Angus, et Theodore J. Iwashyna. 2014. « Hospital Deaths in Patients With Sepsis From 2 Independent Cohorts ». *JAMA* 312 (1): 90-92. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.5804>.

Lun, Melody P., Edwin S. Monuki, et Maria K. Lehtinen. 2015. « Development and Functions of the Choroid Plexus-Cerebrospinal Fluid System ». *Nature Reviews Neuroscience* 16 (8): 445-57. <https://doi.org/10.1038/nrn3921>.

Lund-Sørensen, Helene, Michael E. Benros, Trine Madsen, Holger J. Sørensen, William W. Eaton, Teodor T. Postolache, Merete Nordentoft, et Annette Erlangsen. 2016. « A Nationwide Cohort Study of the Association Between Hospitalization With Infection and Risk of Death by Suicide ». *JAMA Psychiatry* 73 (9): 912-19. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2016.1594>.

Man, M., S. L. Close, A. D. Shaw, G. R. Bernard, I. S. Douglas, R. J. Kaner, D. Payen, et al. 2013. « Beyond Single-Marker Analyses: Mining Whole Genome Scans for Insights into Treatment Responses in Severe Sepsis ». *The Pharmacogenomics Journal* 13 (3): 218-26. <https://doi.org/10.1038/tpj.2012.1>.

Mandal, Swapna, Joseph Barnett, Simon E. Brill, Jeremy S. Brown, Emma K. Denny, Samanjit S. Hare, Melissa Heightman, et al. 2021. « 'Long-COVID': A Cross-Sectional Study of Persisting Symptoms, Biomarker and Imaging Abnormalities Following Hospitalisation for COVID-19 ». *Thorax* 76 (4): 396-98. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2020-215818>.

Marin, Marie-France, Joan A. Camprodon, Darin D. Dougherty, et Mohammed R. Milad. 2014. « Device-Based Brain Stimulation to Augment Fear Extinction: Implications for Ptsd Treatment and Beyond ». *Depression and Anxiety* 31 (4): 269-78. <https://doi.org/10.1002/da.22252>.

Marvel, Françoise A., Chiao-Chi Chen, Nadia Badr, Ron P. A. Gaykema, et Lisa E. Goehler. 2004. « Reversible Inactivation of the Dorsal Vagal Complex Blocks Lipopolysaccharide-Induced Social Withdrawal and c-Fos Expression in Central Autonomic Nuclei ». *Brain, Behavior, and Immunity* 18 (2): 123-34. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2003.09.004>.

Masuda, Takahiro, Roman Sankowski, Ori Staszewski, et Marco Prinz. 2020. « Microglia Heterogeneity in the Single-Cell Era ». *Cell Reports* 30 (5): 1271-81. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.010>.

Matosin, Natalie, et Cristiana Cruceanu. 2017. « Stress-Related Memory Impairments Are Modulated by the Synergistic Action of Stress Hormones: Implications for PTSD ». *Journal of Neuroscience* 37 (16): 4225-27. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3980-16.2017>.

Matthews, Karen A., Yue-Fang Chang, Rebecca C. Thurston, et Joyce T. Bromberger. 2014. « Child Abuse Is Related to Inflammation in Mid-Life Women: Role of Obesity ». *Brain, Behavior, and Immunity* 36 (février): 29-34. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.09.013>.

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. <https://doi.org/10.1001/jama.2010.851>.

Mazeraud, Aurelien, Quentin Pascal, Franck Verdonk, Nicholas Heming, Fabrice Chrétien, et Tarek Sharshar. 2016. « Neuroanatomy and Physiology of Brain Dysfunction in Sepsis ». *Clinics in Chest Medicine* 37 (2): 333-45. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2016.01.013>.

Mazeraud, Aurélien, Andrea Polito, Sivanthiny Sivanandamoorthy, Raphaël Porcher, Nicholas Heming, Annabelle Stoclin, Tarik Hissem, et al. 2020.

« Association Between Anxiety and New Organ Failure, Independently of Critical Illness Severity and Respiratory Status: A Prospective Multicentric Cohort Study ». *Critical Care Medicine* 48 (10): 1471-79. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000004495>.

Mazeraud, Aurélien, Cássia Righy, Eleonore Bouchereau, Sarah Benghanem, Fernando Augusto Bozza, et Tarek Sharshar. 2020. « Septic-Associated Encephalopathy: A Comprehensive Review ». *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, mai. <https://doi.org/10.1007/s13311-020-00862-1>.

Mazzone, Stuart B., et Bradley J. Undem. 2016. « Vagal Afferent Innervation of the Airways in Health and Disease ». *Physiological Reviews* 96 (3): 975-1024. <https://doi.org/10.1152/physrev.00039.2015>.

McAfoose, J., et B. T. Baune. 2009. « Evidence for a Cytokine Model of Cognitive Function ». *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 33 (3): 355-66. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.10.005>.

McCanlies, Erin C., Sewit Kesete Araia, Parveen Nedra Joseph, Anna Mnatsakanova, Michael E. Andrew, Cecil M. Burchfiel, et John M. Violanti. 2011. « C-Reactive Protein, Interleukin-6, and Posttraumatic Stress Disorder Symptomology in Urban Police Officers ». *Cytokine* 55 (1): 74-78. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2011.03.025>.

McDonald, Alexander J. 1998. « Cortical Pathways to the Mammalian Amygdala ». *Progress in Neurobiology* 55 (3): 257-332. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(98\)00003-3](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(98)00003-3).

McIlwrath, Sabrina L., Marlene E. Starr, Abigail E. High, Hiroshi Saito, et Karin N. Westlund. 2021. « Effect of Acetyl-L-Carnitine on Hypersensitivity in Acute Recurrent Caerulein-Induced Pancreatitis and Microglial Activation along the Brain's Pain Circuitry ». *World Journal of Gastroenterology* 27 (9): 794-814. <https://doi.org/10.3748/wjg.v27.i9.794>.

McManus, Sally, Howard Meltzer, Traolach Brugha, Paul Bebbington, et Rachel Jenkins. 2009. *Adult psychiatric morbidity in England, 2007: Results of a household survey*. <https://doi.org/10.13140/2.1.1563.5205>.

Meehan, Anna L., Xiaofeng Yang, Li-Lian Yuan, et Steven M. Rothman. 2012. « Levetiracetam Has an Activity-Dependent Effect on Inhibitory Transmission ». *Epilepsia* 53 (3): 469-76. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03392.x>.

Merali, Zul, Carla Levac, et Hymie Anisman. 2003. « Validation of a Simple, Ethologically Relevant Paradigm for Assessing Anxiety in Mice ». *Biological Psychiatry* 54 (5): 552-65. [https://doi.org/10.1016/s0006-3223\(02\)01827-9](https://doi.org/10.1016/s0006-3223(02)01827-9).

Michelen, Melina, Lakshmi Manoharan, Natalie Elkheir, Vincent Cheng, Andrew Dagens, Claire Hastie, Margaret O'Hara, et al. 2021. « Characterising Long COVID: A Living Systematic Review ». *BMJ Global Health* 6 (9): e005427. <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2021-005427>.

Michopoulos, Vasiliki, Abigail Powers, Charles F. Gillespie, Kerry J. Ressler, et Tanja Jovanovic. 2017. « Inflammation in Fear- and Anxiety-Based Disorders: PTSD, GAD,

and Beyond ». *Neuropsychopharmacology* 42 (1): 254-70. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.146>.

Mildner, Alexander, Hao Huang, Josefine Radke, Werner Stenzel, et Josef Priller. 2017. « P2Y12 Receptor Is Expressed on Human Microglia under Physiological Conditions throughout Development and Is Sensitive to Neuroinflammatory Diseases ». *Glia* 65 (2): 375-87. <https://doi.org/10.1002/glia.23097>.

Miles, Olivia W., et Stephen Maren. 2019. « Role of the Bed Nucleus of the Stria Terminalis in PTSD: Insights From Preclinical Models ». *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 13 (avril): 68. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00068>.

Moaddab, Mahsa, et Michael A. McDannald. 2021. « Retrorubral Field Is a Hub for Diverse Threat and Aversive Outcome Signals ». *Current Biology: CB* 31 (10): 2099-2110.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.02.055>.

Moraes, Carolina A, Gabriel Santos, Tania Cristina Leite de Sampaio e Spohr, Joana C D'Avila, Flávia Regina Souza Lima, Claudia Farias Benjamim, Fernando A Bozza, et Flávia Carvalho Alcantara Gomes. 2015. « Activated Microglia-Induced Deficits in Excitatory Synapses Through IL-1 $\beta$ : Implications for Cognitive Impairment in Sepsis ». *Molecular Neurobiology* 52 (1): 653-63. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8868-5>.

Myers, K. M., et M. Davis. 2007. « Mechanisms of Fear Extinction ». *Molecular Psychiatry* 12 (2): 120-50. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001939>.

Namburi, Praneeth, Anna Beyeler, Suzuko Yorozu, Gwendolyn G. Calhoon, Sarah A. Halbert, Romy Wichmann, Stephanie S. Holden, et al. 2015. « A Circuit Mechanism for Differentiating Positive and Negative Associations ». *Nature* 520 (7549): 675-78. <https://doi.org/10.1038/nature14366>.

Needham, Dale M., Elizabeth Colantuoni, Victor D. Dinglas, Catherine L. Hough, Amy W. Wozniak, James C. Jackson, Peter E. Morris, Pedro A. Mendez-Tellez, E. Wesley Ely, et Ramona O. Hopkins. 2016. « Rosuvastatin versus Placebo for Delirium in Intensive Care and Subsequent Cognitive Impairment in Patients with Sepsis-Associated Acute Respiratory Distress Syndrome: An Ancillary Study to a Randomised Controlled Trial ». *The Lancet. Respiratory Medicine* 4 (3): 203-12. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(16\)00005-9](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(16)00005-9).

Nestler, Eric J., et Steven E. Hyman. 2010. « Animal Models of Neuropsychiatric Disorders ». *Nature Neuroscience* 13 (10): 1161-69. <https://doi.org/10.1038/nn.2647>.

Nijjima, A. 1996. « The Afferent Discharges from Sensors for Interleukin 1 Beta in the Hepatoportal System in the Anesthetized Rat ». *Journal of the Autonomic Nervous System* 61 (3): 287-91. [https://doi.org/10.1016/s0165-1838\(96\)00098-7](https://doi.org/10.1016/s0165-1838(96)00098-7).

Njung'e, K., et S. L. Handley. 1991. « Evaluation of Marble-Burying Behavior as a Model of Anxiety ». *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 38 (1): 63-67. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(91\)90590-x](https://doi.org/10.1016/0091-3057(91)90590-x).

Noble, L. J., I. J. Gonzalez, V. B. Meruva, K. A. Callahan, B. D. Belfort, K. R. Ramanathan, E. Meyers, M. P. Kilgard, R. L. Rennaker, et C. K. McIntyre. 2017.

« Effects of Vagus Nerve Stimulation on Extinction of Conditioned Fear and Post-Traumatic Stress Disorder Symptoms in Rats ». *Translational Psychiatry* 7 (8): e1217-e1217. <https://doi.org/10.1038/tp.2017.191>.

Olofsson, P. S., et K. J. Tracey. 2017. « Bioelectronic medicine: technology targeting molecular mechanisms for therapy ». *Journal of internal medicine* 282 (1): 3-4. <https://doi.org/10.1111/joim.12624>.

Orsini, Caitlin A., et Stephen Maren. 2012. « Neural and Cellular Mechanisms of Fear and Extinction Memory Formation ». *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 36 (7): 1773-1802. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.12.014>.

Paré, Denis, Sébastien Royer, Yoland Smith, et Eric J. Lang. 2003. « Contextual Inhibitory Gating of Impulse Traffic in the Intra-Amygdaloid Network ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 985 (avril): 78-91.

Park, Chul-Kyu, Zhen-Zhong Xu, Temugin Berta, Qingjian Han, Gang Chen, Xing-Jun Liu, et Ru-Rong Ji. 2014. « Extracellular MicroRNAs Activate Nociceptor Neurons to Elicit Pain via TLR7 and TRPA1 ». *Neuron* 82 (1): 47-54. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.011>.

Passos, Ives Cavalcante, Mirela Paiva Vasconcelos-Moreno, Leonardo Gazzi Costa, Maurício Kunz, Elisa Brietzke, João Quevedo, Giovanni Salum, Pedro V. Magalhães, Flávio Kapczinski, et Márcia Kauer-Sant'Anna. 2015. « Inflammatory Markers in Post-Traumatic Stress Disorder: A Systematic Review, Meta-Analysis, and Meta-Regression ». *The Lancet. Psychiatry* 2 (11): 1002-12. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(15\)00309-0](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(15)00309-0).

Pavlov, Valentin A., Sangeeta S. Chavan, et Kevin J. Tracey. 2018. « Molecular and Functional Neuroscience in Immunity ». *Annual Review of Immunology* 36 (1): 783-812. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053158>.

Pavlov, Valentin A., et Kevin J. Tracey. 2015. « Neural Circuitry and Immunity ». *Immunologic Research* 63 (1): 38-57. <https://doi.org/10.1007/s12026-015-8718-1>.

———. 2017. « Neural Regulation of Immunity: Molecular Mechanisms and Clinical Translation ». *Nature Neuroscience* 20 (2): 156-66. <https://doi.org/10.1038/nn.4477>.

Peña, David F., Navzer D. Engineer, et Christa K. McIntyre. 2013. « Rapid Remission of Conditioned Fear Expression with Extinction Training Paired with Vagus Nerve Stimulation ». *Biological Psychiatry, Extinction and the Treatment of Anxiety Disorders*, 73 (11): 1071-77. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.10.021>.

Peña, David Frausto, Jessica E. Childs, Shawn Willett, Analicia Vital, Christa K. McIntyre, et Sven Kroener. 2014. « Vagus nerve stimulation enhances extinction of conditioned fear and modulates plasticity in the pathway from the ventromedial prefrontal cortex to the amygdala ». *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 8: 327. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00327>.

Pervanidou, Panagiota, Gerasimos Kolaitis, Stella Charitaki, Alexandra Margeli, Spyros Ferentinos, Chrysa Bakoula, Christina Lazaropoulou, Ioannis Papassotiropoulos, John Tsiantis, et George P. Chrousos. 2007. « Elevated Morning Serum Interleukin

(IL)-6 or Evening Salivary Cortisol Concentrations Predict Posttraumatic Stress Disorder in Children and Adolescents Six Months after a Motor Vehicle Accident ». *Psychoneuroendocrinology* 32 (8-10): 991-99. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2007.07.001>.

Plummer, Mark P., et Adam M. Deane. 2016. « Dysglycemia and Glucose Control During Sepsis ». *Clinics in Chest Medicine* 37 (2): 309-19. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2016.01.010>.

Poulos, Andrew M., Ravikumar Ponnusamy, Hong-Wei Dong, et Michael S. Fanselow. 2010. « Compensation in the Neural Circuitry of Fear Conditioning Awakens Learning Circuits in the Bed Nuclei of the Stria Terminalis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (33): 14881-86. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005754107>.

Prescott, Hallie C., et Derek C. Angus. 2018. « Enhancing Recovery From Sepsis: A Review ». *JAMA* 319 (1): 62-75. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.17687>.

Ragozzino, Forrest J., Rachel A. Arnold, Cody W. Kowalski, Marina I. Savenkova, Iliia N. Karatsoreos, et James H. Peters. 2020. « Corticosterone Inhibits Vagal Afferent Glutamate Release in the Nucleus of the Solitary Tract via Retrograde Endocannabinoid Signaling ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 319 (6): C1097-1106. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00190.2020>.

Rahmel, T, Schmitz S, Nowak H, Schepanek K, Bergmann L, Halberstadt P, Hörter S, Peters J, et Adamzik M. 2020. « Long-Term Mortality and Outcome in Hospital Survivors of Septic Shock, Sepsis, and Severe Infections: The Importance of Aftercare ». *PloS One* 15 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228952>.

Rc, Kessler, Berglund P, Demler O, Jin R, Merikangas Kr, et Walters Ee. 2005. « Lifetime Prevalence and Age-of-Onset Distributions of DSM-IV Disorders in the National Comorbidity Survey Replication ». *Archives of General Psychiatry. Arch Gen Psychiatry*. juin 2005. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.62.6.593>.

Reinhart, Konrad, Ron Daniels, Niranjana Kissoon, Flavia R. Machado, Raymond D. Schachter, et Simon Finfer. 2017. « Recognizing Sepsis as a Global Health Priority - A WHO Resolution ». *The New England Journal of Medicine* 377 (5): 414-17. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1707170>.

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. <https://doi.org/10.1097/00024382-200013020-00004>.

Revesz, David, Mikael Tjernstrom, Elinor Ben-Menachem, et Thorleif Thorlin. 2008. « Effects of Vagus Nerve Stimulation on Rat Hippocampal Progenitor Proliferation ». *Experimental Neurology* 214 (2): 259-65. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2008.08.012>.

Richter-Levin, Gal, Oliver Stork, et Mathias V. Schmidt. 2019. « Animal Models of PTSD: A Challenge to Be Met ». *Molecular Psychiatry* 24 (8): 1135-56. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0272-5>.

Rivest, S., S. Lacroix, L. Vallières, S. Nadeau, J. Zhang, et N. Laflamme. 2000. « How

the Blood Talks to the Brain Parenchyma and the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus during Systemic Inflammatory and Infectious Stimuli ». *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 223 (1): 22-38. <https://doi.org/10.1046/j.1525-1373.2000.22304.x>.

Rohaut, Benjamin, Raphael Porcher, Tarik Hissem, Nicholas Heming, Patrick Chillet, Kamel Djedaini, Guy Moneger, et al. 2017. « Brainstem Response Patterns in Deeply-Sedated Critically-Ill Patients Predict 28-Day Mortality ». *PloS One* 12 (4): e0176012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176012>.

Rosas-Ballina, Mauricio, Peder S. Olofsson, Mahendar Ochani, Sergio I. Valdés-Ferrer, Yaakov A. Levine, Colin Reardon, Michael W. Tusche, et al. 2011. « Acetylcholine-Synthesizing T Cells Relay Neural Signals in a Vagus Nerve Circuit ». *Science (New York, N.Y.)* 334 (6052): 98-101. <https://doi.org/10.1126/science.1209985>.

Rudd, Kristina E., Sarah Charlotte Johnson, Kareha M. Agesa, Katya Anne Shackelford, Derrick Tsoi, Daniel Rhodes Kievlan, Danny V. Colombara, et al. 2020. « Global, Regional, and National Sepsis Incidence and Mortality, 1990–2017: Analysis for the Global Burden of Disease Study ». *The Lancet* 395 (10219): 200-211. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32989-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32989-7).

Salim, Samina, Gaurav Chugh, et Mohammad Asghar. 2012. « Chapter One - Inflammation in Anxiety ». In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, édité par Rossen Donev, 88:1-25. Inflammation in Neuropsychiatric Disorders. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398314-5.00001-5>.

Sánchez, Connie. 2003. « Stress-Induced Vocalisation in Adult Animals. A Valid Model of Anxiety? ». *European Journal of Pharmacology* 463 (1-3): 133-43. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(03\)01277-9](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(03)01277-9).

Sareen, Jitender, Brian J. Cox, Murray B. Stein, Tracie O. Afifi, Claire Fleet, et Gordon J. G. Asmundson. 2007. « Physical and Mental Comorbidity, Disability, and Suicidal Behavior Associated With Posttraumatic Stress Disorder in a Large Community Sample ». *Psychosomatic Medicine* 69 (3): 242-48. <https://doi.org/10.1097/PSY.0b013e31803146d8>.

Savi, Felipe Figueredo, Alexandre de Oliveira, Gabriela Ferreira de Medeiros, Fernando Augusto Bozza, Monique Michels, Tarek Sharshar, Felipe Dal-Pizzol, et Cristiane Ritter. 2020. « What Animal Models Can Tell Us about Long-Term Cognitive Dysfunction Following Sepsis: A Systematic Review ». *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, décembre. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.12.005>.

Schulz, Martina, et Britta Engelhardt. 2005. « The Circumventricular Organs Participate in the Immunopathogenesis of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis ». *Cerebrospinal Fluid Research* 2 (septembre): 8. <https://doi.org/10.1186/1743-8454-2-8>.

Schumer, W. 1976. « Steroids in the Treatment of Clinical Septic Shock ». *Annals of Surgery* 184 (3): 333-41. <https://doi.org/10.1097/00000658-197609000-00011>.

Schweickert, William D, Mark C Pohlman, Anne S Pohlman, Celerina Nigos, Amy J

Pawlik, Cheryl L Esbrook, Linda Spears, et al. 2009. « Early Physical and Occupational Therapy in Mechanically Ventilated, Critically Ill Patients: A Randomised Controlled Trial ». *The Lancet* 373 (9678): 1874-82. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60658-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60658-9).

Semmler, Alexander, Catherine Nichols Widmann, Thorsten Okulla, Horst Urbach, Markus Kaiser, Guido Widman, Florian Mormann, et al. 2013. « Persistent Cognitive Impairment, Hippocampal Atrophy and EEG Changes in Sepsis Survivors ». *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 84 (1): 62-69. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2012-302883>.

Seymour, Christopher W., Foster Gesten, Hallie C. Prescott, Marcus E. Friedrich, Theodore J. Iwashyna, Gary S. Phillips, Stanley Lemeshow, Tiffany Osborn, Kathleen M. Terry, et Mitchell M. Levy. 2017. « Time to Treatment and Mortality during Mandated Emergency Care for Sepsis ». *The New England Journal of Medicine* 376 (23): 2235-44. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1703058>.

Seymour, Christopher W., Thomas D. Rea, Jeremy M. Kahn, Allan J. Walkey, Donald M. Yealy, et Derek C. Angus. 2012. « Severe Sepsis in Pre-Hospital Emergency Care: Analysis of Incidence, Care, and Outcome ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 186 (12): 1264-71. <https://doi.org/10.1164/rccm.201204-0713OC>.

Shalev, Arieh, Israel Liberzon, et Charles Marmar. 2017. « Post-Traumatic Stress Disorder ». Review-article. [Http://Dx.Doi.Org/10.1056/NEJMra1612499](http://Dx.Doi.Org/10.1056/NEJMra1612499). Massachusetts Medical Society. World. 21 juin 2017. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1612499>.

Shankar-Hari, Manu, Gary S. Phillips, Mitchell L. Levy, Christopher W. Seymour, Vincent X. Liu, Clifford S. Deutschman, Derek C. Angus, Gordon D. Rubenfeld, Mervyn Singer, et Sepsis Definitions Task Force. 2016. « 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* 315 (8): 775-87. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0289>.

Sharshar, Tarek, Djillali Annane, Geoffroy Lorin de la Grandmaison, Jean Philippe Brouland, Nicholas S. Hopkinson, et Gray Françoise. 2004. « The Neuropathology of Septic Shock ». *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)* 14 (1): 21-33. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2004.tb00494.x>.

Sharshar, Tarek, Françoise Gray, Geoffroy Lorin de la Grandmaison, Nicholas S. Hopkinson, Ewen Ross, Anne Dorandeu, David Orlikowski, Jean-Claude Raphael, Philippe Gajdos, et Djillali Annane. 2003. « Apoptosis of Neurons in Cardiovascular Autonomic Centres Triggered by Inducible Nitric Oxide Synthase after Death from Septic Shock ». *Lancet (London, England)* 362 (9398): 1799-1805.

Sharshar, Tarek, Françoise Gray, Frédéric Poron, Jean Claude Raphael, Philippe Gajdos, et Djillali Annane. 2002. « Multifocal Necrotizing Leukoencephalopathy in Septic Shock ». *Critical Care Medicine* 30 (10): 2371-75. <https://doi.org/10.1097/00003246-200210000-00031>.

Silverman, Marni N., et Esther M. Sternberg. 2012. « Glucocorticoid Regulation of Inflammation and Its Functional Correlates: From HPA Axis to Glucocorticoid



Receptor Dysfunction ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1261 (1): 55-63. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06633.x>.

Singer, Mervyn, Clifford S. Deutschman, Christopher Warren Seymour, Manu Shankar-Hari, Djillali Annane, Michael Bauer, Rinaldo Bellomo, et al. 2016. « The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3) ». *JAMA* 315 (8): 801-10. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287>.

Sjogren, Magnus J. C., Per T. O. Hellstrom, Michael A. G. Jonsson, Magnus Runnerstam, et Elinor Ben-Menachem J. C. Sjögren Per T. O. Hellström Michael A. G. Jonsson Magnus Runnerstam Hans C.-son Silander Elinor Ben-Menachem. 2002. « Cognition-Enhancing Effect of Vagus Nerve Stimulation in Patients With Alzheimer's Disease: A Pilot Study ». *The Journal of Clinical Psychiatry* 63 (11): 0-0.

Souza, Rimenez R., Nicole M. Robertson, David T. Pruitt, Phillip A. Gonzales, Seth A. Hays, Robert L. Rennaker, Michael P. Kilgard, et Christa K. McIntyre. 2019. « Vagus nerve stimulation reverses the extinction impairments in a model of PTSD with prolonged and repeated trauma ». *Stress* 22 (4): 509-20. <https://doi.org/10.1080/10253890.2019.1602604>.

Sprung, C. L., P. N. Peduzzi, C. H. Shatney, R. M. Schein, M. F. Wilson, J. N. Sheagren, et L. B. Hinshaw. 1990. « Impact of Encephalopathy on Mortality in the Sepsis Syndrome. The Veterans Administration Systemic Sepsis Cooperative Study Group ». *Critical Care Medicine* 18 (8): 801-6. <https://doi.org/10.1097/00003246-199008000-00001>.

Stamatakis, Alice M., Dennis R. Sparta, Joshua H. Jennings, Zoe A. McElligott, Heather Decot, et Garret D. Stuber. 2014. « Amygdala and Bed Nucleus of the Stria Terminalis Circuitry: Implications for Addiction-Related Behaviors ». *Neuropharmacology*, NIDA 40th Anniversary Issue, 76 (janvier): 320-28. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.05.046>.

Steinberg, Benjamin E., Harold A. Silverman, Sergio Robbiati, Manoj K. Gunasekaran, Téa Tsaava, Emily Battinelli, Andrew Stiegler, et al. 2016. « Cytokine-Specific Neurograms in the Sensory Vagus Nerve ». *Bioelectronic Medicine* 3: 7-17.

Stirling, L. Caroline, Greta Forlani, Mark D. Baker, John N. Wood, Elizabeth A. Matthews, Anthony H. Dickenson, et Mohammed A. Nassar. 2005. « Nociceptor-Specific Gene Deletion Using Heterozygous NaV1.8-Cre Recombinase Mice ». *Pain* 113 (1-2): 27-36. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2004.08.015>.

Straub, Rainer H. 2004. « Complexity of the Bi-Directional Neuroimmune Junction in the Spleen ». *Trends in Pharmacological Sciences* 25 (12): 640-46. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.10.007>.

Taccone, Fabio Silvio, Diego Castanares-Zapatero, Daliana Peres-Bota, Jean-Louis Vincent, Jacques Berre', et Christian Melot. 2010. « Cerebral Autoregulation Is Influenced by Carbon Dioxide Levels in Patients with Septic Shock ». *Neurocritical Care* 12 (1): 35-42. <https://doi.org/10.1007/s12028-009-9289-6>.

Talbot, Sébastien, Raja-Elie E. Abdunour, Patrick R. Burkett, Seungkyu Lee, Shane J. F. Cronin, Maud A. Pascal, Cedric Laedermann, et al. 2015. « Silencing Nociceptor Neurons Reduces Allergic Airway Inflammation ». *Neuron* 87 (2): 341-54.

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.06.007>.

Tietjen, Gretchen E., Jagdish Khubchandani, Nabeel A. Herial, et Kavita Shah. 2012. « Adverse Childhood Experiences Are Associated with Migraine and Vascular Biomarkers ». *Headache* 52 (6): 920-29. <https://doi.org/10.1111/j.1526-4610.2012.02165.x>.

Toth, M., J. E. Gresack, R. L. Hauger, A. L. Halberstadt, et V. B. Risbrough. 2013. « The Role of PKC Signaling in CRF-Induced Modulation of Startle ». *Psychopharmacology* 229 (4): 579-89. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3114-9>.

Tovote, Philip, Jonathan Paul Fadok, et Andreas Lüthi. 2015. « Neuronal Circuits for Fear and Anxiety ». *Nature Reviews. Neuroscience* 16 (6): 317-31. <https://doi.org/10.1038/nrn3945>.

Tracey, Kevin J. 2002. « The Inflammatory Reflex ». *Nature* 420 (6917): 853-59. <https://doi.org/10.1038/nature01321>.

———. 2009. « Reflex Control of Immunity ». *Nature Reviews. Immunology* 9 (6): 418-28. <https://doi.org/10.1038/nri2566>.

« Troubles anxieux · Inserm, La science pour la santé ». s. d. Inserm. Consulté le 7 septembre 2021. <https://www.inserm.fr/dossier/troubles-anxieux/>.

« Troubles du stress post-traumatique · Inserm, La science pour la santé ». s. d. Inserm. Consulté le 7 septembre 2021. <https://www.inserm.fr/dossier/troubles-stress-post-traumatique/>.

Tsumori, Toshiko, Yi Qin, Shigefumi Yokota, Jian-Guo Niu, et Yukihiko Yasui. 2010. « Central Amygdaloid Axon Terminals Are in Contact with Retrorubral Field Neurons That Project to the Parvicellular Reticular Formation of the Medulla Oblongata in the Rat ». *Brain Research* 1306 (janvier): 18-28. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.09.118>.

Turner, C., et A. H. V. Schapira. 2010. « Mitochondrial Matters of the Brain: The Role in Huntington's Disease ». *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 42 (3): 193-98. <https://doi.org/10.1007/s10863-010-9290-y>.

Tursich, M., R. W. J. Neufeld, P. A. Frewen, S. Harricharan, J. L. Kibler, S. G. Rhind, et R. A. Lanius. 2014. « Association of Trauma Exposure with Proinflammatory Activity: A Transdiagnostic Meta-Analysis ». *Translational Psychiatry* 4 (juillet): e413. <https://doi.org/10.1038/tp.2014.56>.

Tye, Kay M., et Karl Deisseroth. 2012. « Optogenetic Investigation of Neural Circuits Underlying Brain Disease in Animal Models ». *Nature Reviews Neuroscience* 13 (4): 251-66. <https://doi.org/10.1038/nrn3171>.

Vallières, L., et S. Rivest. 1997. « Regulation of the Genes Encoding Interleukin-6, Its Receptor, and Gp130 in the Rat Brain in Response to the Immune Activator Lipopolysaccharide and the Proinflammatory Cytokine Interleukin-1beta ». *Journal of Neurochemistry* 69 (4): 1668-83. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69041668.x>.

Van Westerloo, D. J., I. a. J. Giebelen, J. C. M. Meijers, J. Daalhuisen, A. F. De Vos, M.

Levi, et T. Van Der Poll. 2006. « Vagus Nerve Stimulation Inhibits Activation of Coagulation and Fibrinolysis during Endotoxemia in Rats ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 4 (9): 1997-2002. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.02112.x>.

Vida, Gergely, Geber Peña, Alexandre Kanashiro, Maria del Rocio Thompson-Bonilla, David Palange, Edwin A. Deitch, et Luis Ulloa. 2011. « B2-Adrenoreceptors of Regulatory Lymphocytes Are Essential for Vagal Neuromodulation of the Innate Immune System ». *The FASEB Journal* 25 (12): 4476-85. <https://doi.org/10.1096/fj.11-191007>.

Vincent, Jean-Louis, Jordi Rello, John Marshall, Eliezer Silva, Antonio Anzueto, Claude D. Martin, Rui Moreno, et al. 2009. « International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units ». *JAMA* 302 (21): 2323-29. <https://doi.org/10.1001/jama.2009.1754>.

Vincent, Jean-Louis, Yasser Sakr, Charles L. Sprung, V. Marco Ranieri, Konrad Reinhart, Herwig Gerlach, Rui Moreno, et al. 2006. « Sepsis in European Intensive Care Units: Results of the SOAP Study ». *Critical Care Medicine* 34 (2): 344-53.

Wakita, Masahito, Naoki Kotani, Kyuya Kogure, et Norio Akaike. 2014. « Inhibition of Excitatory Synaptic Transmission in Hippocampal Neurons by Levetiracetam Involves Zn<sup>2+</sup>-Dependent GABA Type A Receptor-Mediated Presynaptic Modulation ». *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 348 (2): 246-59. <https://doi.org/10.1124/jpet.113.208751>.

Wan, W., L. Janz, C. Y. Vriend, C. M. Sorensen, A. H. Greenberg, et D. M. Nance. 1993. « Differential Induction of C-Fos Immunoreactivity in Hypothalamus and Brain Stem Nuclei Following Central and Peripheral Administration of Endotoxin ». *Brain Research Bulletin* 32 (6): 581-87. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(93\)90158-8](https://doi.org/10.1016/0361-9230(93)90158-8).

Wang, H., H. Liao, M. Ochani, M. Justiniani, X. Lin, L. Yang, Y. Al-Abed, et al. 2004. « Cholinergic Agonists Inhibit HMGB1 Release and Improve Survival in Experimental Sepsis ». *Nature Medicine* 10 (11): 1216-21. <https://doi.org/10.1038/nm1124>.

Wang, Yong, JungMin Kim, Matthew B. Schmit, Tiffany S. Cho, Caohui Fang, et Haijiang Cai. 2019. « A Bed Nucleus of Stria Terminalis Microcircuit Regulating Inflammation-Associated Modulation of Feeding ». *Nature Communications* 10 (1): 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10715-x>.

Waraczynski, Meg. 2016. « Toward a Systems-Oriented Approach to the Role of the Extended Amygdala in Adaptive Responding ». *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 68: 177-94. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.05.015>.

Westhoff, D., J. Y. Engelen-Lee, I. C. M. Hoogland, E. M. A. Aronica, D. J. van Westerloo, D. van de Beek, et W. A. van Gool. 2019. « Systemic infection and microglia activation: a prospective postmortem study in sepsis patients ». *Immunity & Ageing* 16 (1): 18. <https://doi.org/10.1186/s12979-019-0158-7>.

Williams, Leanne M. 2017. « Getting Personalized: Brain Scan Biomarkers for Guiding Depression Interventions ». *American Journal of Psychiatry* 174 (6): 503-5.

<https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2017.17030314>.

Winstler, BD, Eberlein M, Leung J, Needham Dm, Pronovost Pj, et Sevransky Je. 2010. « Long-Term Mortality and Quality of Life in Sepsis: A Systematic Review ». *Critical Care Medicine* 38 (5). <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181d8cc1d>.

Witter, Menno P., Cathrin B. Canto, Jonathan J. Couey, Noriko Koganezawa, et Kally C. O'Reilly. 2014. « Architecture of spatial circuits in the hippocampal region ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 369 (1635): 20120515. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0515>.

Wolf, Susanne A., H.W.G.M. Boddeke, et Helmut Kettenmann. 2017. « Microglia in Physiology and Disease ». *Annual Review of Physiology* 79 (1): 619-43. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034406>.

Xu, Zhen-Zhong, Yong Ho Kim, Sangsu Bang, Yi Zhang, Temugin Berta, Fan Wang, Seog Bae Oh, et Ru-Rong Ji. 2015. « Inhibition of Mechanical Allodynia in Neuropathic Pain by TLR5-Mediated A-Fiber Blockade ». *Nature Medicine* 21 (11): 1326-31. <https://doi.org/10.1038/nm.3978>.

Yende, Sachin, Shamly Austin, Andrew Rhodes, Simon Finfer, Steven Opal, Taylor Thompson, Fernando A. Bozza, Steven P. LaRosa, V. Marco Ranieri, et Derek C. Angus. 2016. « Long-Term Quality of Life Among Survivors of Severe Sepsis: Analyses of Two International Trials ». *Critical Care Medicine* 44 (8): 1461-67. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000001658>.

Young, G. B., C. F. Bolton, Y. M. Archibald, T. W. Austin, et G. A. Wells. 1992. « The Electroencephalogram in Sepsis-Associated Encephalopathy ». *Journal of Clinical Neurophysiology: Official Publication of the American Electroencephalographic Society* 9 (1): 145-52. <https://doi.org/10.1097/00004691-199201000-00016>.

Yu, Kai, Sandra Ahrens, Xian Zhang, Hillary Schiff, Charu Ramakrishnan, Lief Fenno, Karl Deisseroth, et al. 2017. « The Central Amygdala Controls Learning in the Lateral Amygdala ». *Nature Neuroscience* 20 (12): 1680-85. <https://doi.org/10.1038/s41593-017-0009-9>.

Zhang, J., et S. Rivest. 1999. « Distribution, Regulation and Colocalization of the Genes Encoding the EP2- and EP4-PGE2 Receptors in the Rat Brain and Neuronal Responses to Systemic Inflammation ». *The European Journal of Neuroscience* 11 (8): 2651-68. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00682.x>.

# ANNEXES

# ANNEXES

## ANNEXE 1

**Levetiracetam protects mice against sepsis-associated mortality and improves microglial bioenergetics**

## ANNEXE 2

**Anti-microbial cytokines elicit a corticosterone feedback response via brainstem sensing and parabrachial activation of hypothalamus**

1 **Levetiracetam protects mice against sepsis-associated mortality and improves microglial**  
2 **bioenergetics**

3

4 Renaud Fleurance<sup>1,2,3</sup>; Juliette Van Steenwinckel<sup>4</sup>; Aurélien Mazeraud<sup>2,3,5</sup>; Lena Bourhy<sup>2,3,6,7</sup>;  
5 Sarah Benghanem<sup>2,3,8</sup>; Fabrice Chrétien<sup>2,3,9</sup>; Fernando Augusto Bozza<sup>10,11</sup>; Pierre Gressens<sup>4</sup>;  
6 Jean-Pierre Valentin<sup>1</sup>; Tarek Sharshar<sup>2,3,5</sup>

7 1 - UCB Biopharma SRL, Braine L'Alleud, Belgique

8 2 - Institut Pasteur, Experimental Neuropathology, Paris, France

9 3 - Université de Paris Sciences et Lettres, Paris, France

10 4 - Université de Paris, NeuroDiderot, Inserm, Paris, France

11 5 - Neurointensive care Medicine and Neuroanesthesia, Sainte-Anne Hospital, Paris, France

12 6 - Laboratory for Perception and Memory, Institut Pasteur, Paris, France

13 7 - CNRS UMR 3571, Paris, France

14 8 - Médecine Intensive et Réanimation - Centre Hospitalier Universitaire Cochin, Paris, France

15 9 - Laboratoire de Neuropathologie, Centre Hospitalier Sainte Anne, Paris, France

16 10 - Laboratório de Medicina Intensiva, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas  
17 (INI), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil

18 11 - Instituto D'Or de Pesquisa e Ensino, Rio de Janeiro, Brazil

19

20 **Corresponding author:** Tarek Sharshar, Service de Neuro-Anesthésie-Réanimation ; Ghu-  
21 paris Psychiatrie neurosciences hôpital Sainte Anne 1, rue Cabanis 75014 paris,  
22 +33(0)145658902, [tarek.sharshar@gmail.com](mailto:tarek.sharshar@gmail.com)

23

24 **Authorship note:** JVS, LB and AM equally contributed

25

26 **Conflict of interest:** This work was funded by UCB Biopharma SRL, Braine L'Alleud,  
27 Belgium, and Institut Pasteur, Paris, France. RF and JPV are employees and shareholders of  
28 UCB Biopharma SRL. The other authors have declared that no conflict of interest exists.

29

30 **ORCID**

31 Renaud Fleurance: [0000-0003-2274-3393](https://orcid.org/0000-0003-2274-3393)

32 Pierre Gressens: [0000-0002-0909-4221](https://orcid.org/0000-0002-0909-4221)

33



34 **Abstract**

35 Sepsis results from a dysregulated host response to infection. Sepsis-associated encephalopathy  
36 (SAE) is characterized by disorders of consciousness, epileptic electroencephalographic  
37 abnormalities, and increased mortality and psycho-cognitive disorders. It is mainly related to a  
38 neuro-inflammatory process involving microglial activation and ending-up in neurons'  
39 dysfunction and death. LEV is an approved anti-epileptic drug with reported anti-inflammatory  
40 properties on cultured astrocytes and to improve mitochondrial bioenergetics. Thus, we  
41 hypothesized that Levetiracetam (LEV) could mitigate the sepsis-related microglial  
42 dysfunction and associated mortality and clinical features. We show that LEV reduced  
43 mortality and sickness behavior in a mouse model of bacterial peritonitis. LEV normalized  
44 microglial expression of Iba1, NOS2, HIF1a, and COX2 in the autonomic centers, amygdala,  
45 hippocampus, and frontal cortex, accounting for its effects on SAE severity and mortality.  
46 In an *in vitro* microglial cell line stimulated with LPS, we found that LEV 1) down-regulated  
47 gene expression related to hypoxia, cytokines, and stress responses. 2) reduced *Nos2* and *Ptgs2*  
48 (coding for COX2) gene expression; 3) Attenuated NO, and PGE2 production, two potentially  
49 neurotoxic mediators; and 4) dampened the glycolytic switch and improved the mitochondrial  
50 dysfunction, leading to enhanced ATP production. In conclusion, our results indicate that LEV  
51 induces beneficial SV2A-independent metabolic effects on activated microglial cells,  
52 preventing dysfunction in crucial brain areas and resulting in lower mortality and improved  
53 clinical features, opening new therapeutic perspectives.

## 54 **Introduction**

55 Sepsis represents a major worldwide public health issue associated with increased short- and  
56 long-term morbidity and mortality ranging from 21% to 60% according to its severity(1–3).  
57 Sepsis is defined as life-threatening organ dysfunction caused by a dysregulated host response  
58 to infection(4). Among organ failure, brain dysfunction occurs in up to 80 % of cases(5). This  
59 so-called SAE is not related to direct infection of the central nervous system. The  
60 pathophysiology of SAE is complex and multifactorial. Ischemia, neuroinflammation, and  
61 metabolic insult are considered the main mechanisms(6–9). The ischemic process results from  
62 sepsis-induced macro and micro-circulatory dysfunction. Endothelial activation culminates in  
63 damaged blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. The leaky barriers allow the  
64 release or passage of neurotoxic and inflammatory mediators, activating neuroglia cells,  
65 including astrocytes(10), perivascular macrophages, and microglial cells(6, 11). Microglial  
66 cells are the parenchymal tissue macrophages and account for 10% of brain cells(12).  
67 Microglial cells are involved in immune monitoring and homeostasis of the healthy brain(13,  
68 14). When activated, microglial cells acquire particular morphological phenotypes, depending  
69 on their level of ramification(15, 16) and particular phenotypes reflecting their various  
70 functions, from pro-inflammation to promoting tissue repair, regeneration and plasticity, and  
71 growth stimulation(17–19). Thus, activated microglial cells can be neurotoxic by releasing  
72 nitric oxide (NO) or glutamate, or neuroprotective by producing anti-inflammatory cytokines,  
73 phagocytizing cellular debris, and promoting neurogenesis and myelination through IGF-1  
74 production(20, 21). Microglial cells are involved in synapse pruning and regulate synaptic  
75 plasticity and function(22).

76 At the metabolic level, sepsis induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress that  
77 compromised brain cell functions and viability(6, 7); with, for instance, apoptosis, neuronal  
78 hyperexcitability, and impaired neurotransmission(23, 24). The neuro-inflammatory and

79 metabolic processes predominantly affect the autonomic and limbic systems and frontal cortex,  
80 accounting for the SAE clinical features and outcomes. Indeed, autonomic centers from septic  
81 patients are mostly affected by ischemia(25), neuronal vacuolization and apoptosis(26, 27),  
82 glial apoptosis(26), and microglial activation(27). Similarly, the limbic system, especially the  
83 hippocampus and amygdala, also presented increased neuronal and glial apoptosis(26), and  
84 microglial activation(28).

85 SAE is characterized by alteration of consciousness ranging from delirium to coma(29) and  
86 changes in EEG activity, including predominant theta, delta, triphasic waves, or suppression  
87 but also epileptic activities(30). Seizures of any type can occur in 10% to 15% of septic patients,  
88 and their prevalence increases with SAE severity(30–33). Furthermore, SAE is associated with  
89 an increased risk of mortality, of which predictors are mainly the depth of consciousness  
90 disorder and severity of EEG abnormalities(32). Dysfunction of the brainstem autonomic  
91 centers accounts for SAE-associated mortality(34). SAE is also complicated by long-term  
92 cognitive impairment and psychological disorders, resulting from limbic, hippocampal, and  
93 frontal insults(35–38). Sepsis also increases the risk of long-term epilepsy(39), meaning that  
94 the epileptic process is both a marker and a contributor to the sepsis-induced brain insult. This  
95 association suggests that an anti-epileptic drug may be beneficial in SAE.

96 Beyond its anti-epileptic properties, Levetiracetam (LEV; (S)- $\alpha$ -ethyl-2-oxo-pyrrolidine  
97 acetamide) has been shown to reduce IL-1 $\beta$  release in LPS-stimulated astrocytes(40, 41) and  
98 improve neurite outgrowth, neuronal ATP production, and mitochondrial dynamics(42).  
99 Because of these relevant anti-neuroinflammatory and metabolic properties, we hypothesized  
100 that LEV has beneficial effects on microglial cells, preventing their dysfunction in critical brain  
101 areas involved in the pathophysiology of SAE and eventually protecting against sepsis-induced  
102 mortality and sickness behavior.

103 We conducted a set of in vivo and in vitro experiments to test this hypothesis. We assessed the  
104 effects of LEV on the clinical severity of SAE and associated mortality and characterized the  
105 microglial modulation by evaluating their morphological, immunological, and metabolic  
106 phenotypes.

107 For the first time, we showed that LEV improved survival in a murine cecal ligature and  
108 puncture (CLP) sepsis model by normalizing NOS2, HIF1a, and cyclooxygenase 2 (COX2) in  
109 brain areas involved in SAE pathophysiology, especially those controlling the autonomic  
110 nervous system. Furthermore, using murine microglial cells, we demonstrated that LEV  
111 significantly altered the microglial transcriptomic signature by down-regulating genes related  
112 to the HIF-1 signaling pathway and Responses to hypoxia, cytokines, and stress, independently  
113 of Synaptic vesicle glycoprotein 2A (SV2A). Although LEV did not alleviate the production  
114 of major inflammatory cytokines, it down-regulated Nos2 and Ptgs2 mRNA, leading to  
115 decreased NO and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), respectively. We found that LEV prevented  
116 mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) repression and dampened glycolytic  
117 commitment, ultimately improving mitochondrial dysfunction and ATP production.

118 In conclusion, we characterized the beneficial metabolic effects of LEV on activated microglial  
119 cells in the context of sepsis, translating into protective effects on SAE-related mortality and  
120 clinical features. These results open new therapeutic perspectives for patients suffering from  
121 sepsis and SAE, a high unmet medical need disease.

122 **Results**

123 *Levetiracetam improves survival and sepsis score in the murine CLP sepsis model.* No  
124 mortality was observed in the SHAM group (Figure 1A). CLP resulted in high mortality in the  
125 Sepsis group (45% at 96h post CLP;  $P < 0.0001$  versus SHAM). When compared to the Sepsis  
126 group (Figure 1A), the cumulative mortality rate was significantly reduced in the Sepsis + LEV  
127 group (83.3%, at 96h post CLP;  $P < 0.0001$  versus Sepsis). Sepsis was associated with a  
128 worsening of the clinical sepsis score over time (Figure 1B) that was prevented by LEV ( $P =$   
129  $0.0005$  and  $P < 0.0001$  for treatment and time effects, respectively), with a statistically  
130 significant effect detectable from 48h post-CLP (Figure 1B).  
131 LEV did not statistically modify plasma levels of the main pro and anti-inflammatory cytokines  
132 (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10, IL-13, and IFN- $\gamma$ ; Supplemental Figure 1A) at 24 hours  
133 of CLP, arguing against a systemic effect of LEV on the immune response.

134

135 *LEV normalizes NOS2, HIF1a and COX2 expression in the autonomic and limbic systems and*  
136 *the frontal cortex.* The hippocampus, frontal cortex, amygdala, and the autonomic nervous  
137 system (ANS) are activated early during sepsis(43) (Figure 1C) . Their dysfunctions are  
138 critically involved in sepsis-induced sickness behavior(44) and mortality(34) and considered  
139 to result from microglial-mediated neurotoxicity(45).  
140 Using ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1) IHC and quantitative analysis, we  
141 assessed the microglial morphology in the hippocampus, BLA, and CeA (Figure 1D and  
142 Supplemental Figure 1B). We found that microglial cells from the Sepsis group had a  
143 significantly lower AUC (-44.3%, -12.7%, and -21.5% in the hippocampus, BLA and CeA,  
144 respectively;  $P < 0.0001$ ) and shorter processes (MaxSholl) (-35.9%, -15.5%, and -21.0%,  
145 respectively;  $P < 0.0001$ ) compared to SHAM. A lower complexity index was observed in the  
146 hippocampus and CeA (-32.2%;  $P < 0.001$ , and -15.4%;  $P < 0.05$ , respectively). Lastly, the

147 number of roots and the longest path in skeletonized microglia (Maximum length) were  
148 reduced in the hippocampus (-18.8%;  $P < 0.001$  and -22.8%;  $P < 0.0001$ , respectively) (Figure  
149 1D, and Supplemental Figure 1B).

150 In comparison to the Sepsis group, LEV did not significantly reverse the sepsis-induced  
151 microglial morphological changes in the three assessed brain regions (Figure 1D, and  
152 Supplemental Figure 1B). However, LEV decreased the expression of the microglial marker  
153 Iba1, in the hippocampus ( $P < 0.01$ ), frontal cortex ( $P < 0.0001$ ), BLA and CeA ( $P < 0.001$  and  
154  $P < 0.0001$ , respectively), but also the parabrachial nucleus (PBN;  $P < 0.001$ ). Even if not  
155 statistically significant, Iba1 immunostaining in the area postrema (AP) and the nucleus of the  
156 solitary tract (NTS) was also reduced to the SHAM level (Figure 1, E-F, and Supplemental  
157 Figure 2).

158 Then, we assessed whether LEV modulated expression of pro-inflammatory markers, NOS2,  
159 COX2, HIF1a, and CD-44. The microglial NOS2 expression in the Sepsis + LEV group was  
160 significantly reduced in hippocampus ( $P < 0.0001$ ), frontal cortex ( $P < 0.0001$ ), BLA and CeA  
161 ( $P < 0.0001$  for both regions), PBN ( $P < 0.0001$ ), NTS ( $P < 0.001$ ), and AP ( $P < 0.0001$ )  
162 compared to Sepsis group (Figure 1F, and Supplemental Figure 2). Similarly, the significant  
163 LPS-related increase in HIF1a immunostaining, indicating HIF1a stabilization and activation,  
164 was normalized by LEV in all regions (Figure 1F, and Supplemental Figure 2). Eventually,  
165 even if no statistical significance was reached in any brain regions, the COX2 mean intensity  
166 in the Sepsis + LEV group was constantly lower than in the Sepsis group in all examined brain  
167 regions and became compared to the SHAM group (Figure 1F, and Supplemental figure 2).  
168 CD-44 remained unchanged.

169

170 *LEV increases proliferation in murine microglial BV2 cell lines.* To confirm the *in vivo* LEV  
171 microglial effects, we then assessed its *in vitro* effects on microglial cells challenged by LPS.

172 We used murine BV2 microglial cells, an established model of microglial cells(46, 47), which  
173 molecular and transcriptomic profiles are similar to primary microglial cells after LPS  
174 stimulation(48). In preliminary work, we exposed BV2 cells to increasing LEV concentration  
175 and observed no cytotoxic effects (data not shown) up to the highest tested concentrations  
176 (1000µg/mL). In patients receiving LEV, plasma and brain concentrations of LEV are very  
177 close(49), and since LEV is not bound to plasma proteins(50, 51), we opted for an *in vitro* LEV  
178 concentration of 100µg/mL to approximately match the plasma Cmax achieved in patients  
179 given the maximum daily recommended dose of 3000mg(50, 51).

180 Four conditions were tested: 1) BV2 without LEV or LPS (Vehicle group); 2) BV2 cells  
181 incubated with LEV at 100µg/mL without LPS (LEV group), ; 3) BV2 challenged with LPS at  
182 1µg/mL in the absence of LEV (LPS group) and 4) BV2 challenged with LPS in the presence  
183 of LEV at 100µg/mL (LPS + LEV group).

184 The proliferation of BV2 cells was significantly hampered in the LPS group. When co-  
185 incubated with LEV (LPS + LEV group), proliferation returned to the vehicle and LEV groups  
186 level (Figure 2A). While LEV had no statistical effect on apoptotic death (data not shown),  
187 LEV reduced the proportion of dead cells in both LEV and LPS + LEV groups (Figure 2B).

188

189 *LEV dysregulates key inflammatory response-related genes in microglial cells.* To gain a  
190 comprehensive understanding of the mechanisms involved in the LEV-induced microglial  
191 modulation, RNA-seq experiments were performed. Since gene-induced patterns in both  
192 primary and BV2 microglial cells be maximal 4 hours after LPS(48), BV2 cells were activated  
193 with LPS in the presence or absence of LEV for 4 hours, compared to unstimulated conditions  
194 (Vehicle or LEV). A heatmap of the significant differentially expressed (DE) genes (adjusted  
195 p-value<0.05; Supplemental Tables 1 and 2) was generated. Hierarchical clustering was

196 realized using one minus Pearson correlation and revealed different transcriptional regulation  
197 patterns in LEV, LPS, and LPS+LEV than Vehicle (Figure 2C).

198 LEV induced a specific signature in non-LPS challenged BV2 cells highlighted by the 1371  
199 genes significantly regulated by LEV compare Vehicle (Figure 2D, and Supplemental Table  
200 1). Functional enrichment analysis using DAVID 6.8 revealed that up-regulated genes  
201 demonstrated significant enrichment of Gene Ontology (GO) terms related to DNA  
202 methylation and epigenetic while down-regulated genes demonstrated enrichment of GO terms  
203 related to mRNA processing, splicing, and transport (Figure 2D, and Supplemental Table 3).

204 As expected, LPS induced a substantial modification of BV2 transcriptome with 3791  
205 significantly DE genes regulated when compared to Vehicle (Figure 2D, and Supplemental  
206 Tables 1 and 2). Up- and down-regulated genes under LPS stimulation demonstrated,  
207 respectively, a significant enrichment of GO terms related to immune response and  
208 inflammation and GO terms related to cell cycle, cell division, DNA damage, and repair (Figure  
209 2D, and Supplemental Table 3).

210 When comparing LPS + LEV to LPS, LEV down-regulated 78 out of the 89 DE genes  
211 (Supplemental Table 1), which are significantly enriched in genes related to response to  
212 hypoxia (GO) and HIF-1 signaling pathway (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes;  
213 KEGG) (Figure 2D, and Supplemental Table 3). These 78 down-regulated genes were mapped  
214 to the Search Tool for Retrieval of INteracting Genes (STRING) to create a protein-protein  
215 interaction (PPI) network (Figure 2E). PPI enrichment p-value was highly significant ( $p= 1.19 \times 10^{-10}$ ),  
216 suggesting that the proteins are at least partially biologically connected as a group.

217 Functional enrichments analysis of this network using STRING revealed many significantly  
218 enriched terms (Supplemental Table 4.). Similarly, GO term Response to hypoxia (green  
219 nodes) and the KEEG term HIF-1 signaling pathway (yellow nodes) were found. Genes  
220 encoding for key enzymes involved in glycolysis, which HIF1a(52) regulates, especially



221 hexokinase 2 (Hk2), phosphofructokinases (Pfk1 and Pfkp), pyruvate dehydrogenase kinase  
222 (Pdk1), and solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1 (Slc2a1), were  
223 significantly enriched. Additional relevant enrichment of GO term was identified: Response to  
224 cytokines (bleu nodes) and stress (red nodes) (Figure 2E, and Supplemental Table 4). These  
225 data suggested that LEV regulated LPS-activated BV2 by acting on a group of connected  
226 proteins involved in biological processes related to hypoxia, cytokines, and stress.

227 Interestingly, the *in-silico* analysis identified the P53 pathway, which has been shown to  
228 interact with COX2(53). Similarly, COX2 is connected to NOS2(54–57). LEV increased Trp53  
229 mRNA expression in both LEV and LPS + LEV groups (Figure 2F).

230 LEV significantly reduced Ptgs2 and Nos2 mRNA expression (Figure 2F), further confirmed  
231 by qRT-PCR analysis (Figure 2G). We confirmed here that overexpression of Trp53 mRNA  
232 could drive the decrease of the LPS-induced Ptgs2 mRNA expressions (Figure 2F) by direct  
233 interaction of P53 with COX2 as previously described(53). Finally, the LEV-related down-  
234 regulation of Ptgs2 and Nos2 translated into a decrease ( $P < 0.0001$ ; LPS + LEV *versus* LPS)  
235 of their end-products, NO and PGE<sub>2</sub>, respectively (Figure 2H).

236 Therefore, the LEV-related NOS2, COX2, and HIF1a normalization observed in the *in vivo*  
237 Sepsis + LEV group correlated with the *in vitro* down-regulation of Ptgs2, Nos2, and HIF1a-  
238 related genes.

239

240 *LEV treatment normalized LPS-induced mitochondrial dysfunction.*

241 Given that LPS-induced changes in microglial phenotypes depend on mitochondrial functions  
242 and the relationships between cellular metabolism with HIF1a, NO, and PGE<sub>2</sub>(58–62), we  
243 assessed whether LEV alters cellular oxygen consumption rate (OCR), glycolysis and energy  
244 production.

245 When compared to the Vehicle group, LPS decreased the basal OCR ( $P < 0.05$ ), proton leak-  
246 driven OCR ( $P < 0.01$ ), maximal respiration ( $P < 0.001$ ), and spare capacity ( $P < 0.001$ ) (Figure  
247 3, A-B). LPS also markedly increased the basal and compensatory glycolysis (+270%;  $P <$   
248 0.0001, and +63%;  $P < 0.0001$ , respectively; Figure 3, C-D). These results illustrate the  
249 OXPHOS repression and major glycolytic switch expected by a LPS challenge(63, 64). When  
250 compared to the LPS group (Figure 3, A-B), LPS + LEV groups revealed a restoration of the  
251 basal OCR (+15%;  $P < 0.01$ ), ATP-linked OCR (+10%;  $P < 0.05$ ), proton leak-driven OCR  
252 (+32%;  $P < 0.001$ ), FCCP-maximal respiration (+36%;  $P < 0.0001$ ) and spare capacity (51%;  
253  $P < 0.0001$ ). Similarly, LEV attenuated the glycolytic switch (Figure 3, C-D), evidenced by the  
254 lower basal glycolysis and compensatory glycolysis (-29%;  $P < 0.001$ , and -14%; not  
255 statistically significant, respectively). Eventually, incubation with LEV over 6h increased  
256 significantly intracellular ATP level in LEV and LPS + Lev groups (Figure 3E).

257 Altogether, LEV improved BV2 mitochondrial functions, including cellular respiration and  
258 OXPHOS impaired by LPS, with a final improvement of cellular energy, as previously reported  
259 in neurons(42).

260

261 *LEV does not modify LPS-related microglial immunophenotype.* Since one of the major  
262 microglial effects of LPS is to induce a pro-inflammatory response, we assessed whether LEV  
263 modulates LPS-induced BV2 immunophenotype by evaluating the expression of mRNA  
264 coding for NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 (NLRP3, i.e., inflammasome  
265 activator), pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) and anti-inflammatory cytokines  
266 (Arginase 1, IL-4 and IL-10)(65, 66). Compared to LPS, LEV showed no significant impact  
267 on these markers (Supplemental Figure 3A), except a slight but significant decrease in IL-1 $\beta$   
268 mRNA. These findings suggest that BV2 metabolic recovery did not translate into changes in  
269 their immunophenotypic profile.

270

271 *LEV does not alter the microglial phagocytic capacities.* Since phagocytosis involves  
272 OXPPOS in macrophages and is stimulated by LPS, we assessed whether LEV modulates this  
273 property. We measured the uptake of pHrodo®-Red *S. aureus* beads in BV2 cells previously  
274 challenged with 24h LPS. LEV did not influence the LPS-related increase of phagocytosis  
275 (Supplemental Figure 3B).

276

277 *LEV does not influence the major actors of the defense against oxidative stress.* Since LPS  
278 induced oxidative stress is counteracted by cellular defense(58), we assessed whether LEV  
279 modulates the activities of the main antioxidant enzymes in BV2 cells challenged by LPS for  
280 24 hours. Using colorimetric and spectrophotometric assays (Supplemental Figure 4), we found  
281 that LEV had no statistical effect on the activities of any antioxidant enzymes tested, especially  
282 catalase (CAT), glutathione reductase, and gamma-glutamyl cysteine synthase, of which LPS  
283 increased the activity (Supplemental Figure 4). These results indicate that microglial effects of  
284 LEV do not involve anti-oxidative defense.

285

286 *The modulation of the neuroinflammation by LEV in BV2 microglial cells is SV2A-independent.*  
287 SV2A is the neuronal target of LEV. Therefore, we assessed SV2A expression by microglial  
288 cells. We showed no evidence of SV2A protein or Sv2a mRNA in both LPS and non-LPS  
289 challenged BV2 cells using IHC, western-blot, RNA-Seq, and RT-qPCR techniques  
290 (Supplemental Figure 5). These results indicate that LEV modulates microglial cells through  
291 SV2A independent mechanisms, which remained to be elucidated.

292 **Discussion**

293 Our work reports the effects of LEV on microglia using established *in vitro* and *in vivo* murine  
294 models of sepsis, i.e., LPS-activated BV2 microglial cells(46, 47) and bacterial peritonitis  
295 (CLP)-derived sepsis(67, 68), respectively. Our *in vivo* murine models revealed that LEV  
296 normalized the increased expression of Iba1, NOS2, HIF1a, and COX2 in the autonomic  
297 centers, amygdala, hippocampus, and frontal cortex in septic mice, with the major benefit to  
298 reducing both mortality and severity of sickness behavior. Coherently with these *in vivo* results,  
299 our *in vitro* experiments confirmed that LEV counteracts LPS effects by downregulating the  
300 HIF1a-dependent genes involved in the glycolysis and early genes controlling the response to  
301 hypoxia, cytokines, and stress, especially Nos2 and Ptg2. These effects translated into a lower  
302 NO and PGE<sub>2</sub> production, respectively. At a metabolic level, LEV restored the microglial  
303 mitochondrial OXPHOS and bioenergetics (ATP production) impaired by LPS.

304

305 We reproduced the well-established effects of LPS and CLP on microglial cells, thus validating  
306 our cellular and animal experiments. LPS challenge induces pro-inflammatory changes in  
307 microglial phenotypes associated with morphological changes(69), cytokines production,  
308 chemokines, enhanced phagocytic capacity, and ROS(70, 71). This activation is accompanied  
309 by a complex immunometabolic reshuffle privileging glycolysis and impairing mitochondrial  
310 function(59, 60, 72, 73) (especially OXPHOS(63)) critical for supporting many aspects of their  
311 polarization(64, 73–77). At the tissue level, CLP or other sepsis animal models are associated  
312 with early activation of microglial cells, which become less or non-ramified(16); acquire a pro-  
313 inflammatory profile, and overexpressed key mediators, HIF1a, NOS2, and COX2, associated  
314 with mitochondrial dysfunction(75). Following microglial activation, the stabilization of  
315 HIF1a, NOS2-induced production of NO, COX2-related production of PGE<sub>2</sub> orchestrate this  
316 metabolic shift(52, 75) and ensuing mitochondrial dysfunction(8, 70, 78). Recent works report

317 a positive feedback loop between these mediators. NO can induce COX2, and PGE<sub>2</sub> can induce  
318 NOS2(56, 57). Similarly, HIF1a directly promotes COX2 and NOS2 up-regulation while PGE<sub>2</sub>  
319 and NO enhances HIF1 transcriptional activity and stabilization, respectively(79–81).  
320 Consequently, activation of this loop results in HIF1-related glycolytic commitment, NO- and  
321 PGE<sub>2</sub>-mediated repression of the mitochondrial OXPHOS(75, 82) and neurotoxicity(83–85).

322

323 The metabolic effects of LEV fit with the interactions between NO, PGE<sub>2</sub>, HIF1a,  
324 mitochondria-dependent bioenergetics, and metabolism. The improvement of microglial  
325 proliferation and reduction of their death reflect their metabolic restoration. Conversely, the  
326 current results indicate that metabolism changes do not consistently result in changes in  
327 immune phenotypes. In particular, LEV does not modify the LPS-induced microglial pro-  
328 inflammatory profile and phagocytic capacity, even if a marginal statistically significant  
329 reduction of IL-1 $\beta$  was observed. This decoupling is consistent with the conclusions from  
330 Palmieri et al.(8) in murine macrophages and Ferger et al.(86) on microglia, which propose  
331 that OXPHOS loss and glycolytic switch are instead consequences than causes of macrophagic  
332 inflammatory polarization.

333

334 If the LEV metabolic effects on microglial cells are thus coherent with the current knowledge  
335 of the relationship of NO, PGE<sub>2</sub>, HIF1a, mitochondria-dependent bioenergetics, and  
336 metabolism, its cellular target remains unknown. SV2A, the LEV neuronal target, has been  
337 reported in isolated mitochondria from brain homogenates(42). However, we failed to evidence  
338 *Sv2a* mRNA or protein in microglial cells. If we have not been able to identify the microglial  
339 target, our results enable us to propose some potential mechanisms. RNA-seq identified that  
340 LEV upregulated genes involved in DNA methylation and epigenetic while down-regulated  
341 genes related to mRNA processing, splicing, and transport in non-stimulated BV2 cells.

342 Interestingly, DNA methylation and histone acetylation has been shown to modulate genes  
343 related to inflammatory response in BV2 cells(87–90). MAPK and AP-1, NF-κB, or IRFs  
344 transcription factors are central regulators of microglial activation(91). Blocking these  
345 pathways suppresses LPS-induced mediators such as NOS2, COX2, and pro-inflammatory  
346 cytokines(92–94). In the absence of significant effects on cytokine production, LEV may target  
347 the final steps of these canonical pathways through epigenetic regulations.

348

349 The anti-neuroinflammatory effects of LEV observed in the autonomic and limbic systems  
350 contribute to decreasing mortality and sickness behavior severity. Given its role in controlling  
351 vital function, arousal, emotional behavior, and immune response, autonomic dysfunction  
352 plays a central role in sepsis-related mortality and organ failure (34, 95–97). Autonomic  
353 impairment is a component of sepsis-associated brainstem dysfunction resulting from a neuro-  
354 inflammatory process originating from the area postrema. Area postrema is deprived of the  
355 blood-brain barrier, enriched in microglial cells, and connected to autonomic centers. It detects  
356 and processes the systemic inflammatory signals and modulates the autonomic output, notably  
357 the cholinergic reflex involving the vagal nerve. Therefore, it is noteworthy that LEV decreased  
358 microglial dysfunction in the area postrema. Interestingly, LEV might also reduce long-term  
359 post-sepsis psychological disorders and cognitive impairment as it decreased microglial  
360 dysfunction in the amygdala and hippocampus.

361 The decreased microglial release of NO and PGE<sub>2</sub> likely reduces neurotoxicity, despite the  
362 absence of changes in microglial morphology or cytokine production. Considering the  
363 criticality of the reciprocal interactions between microglia, neurons, and astrocytes(98, 99), and  
364 the previously reported LEV effects this later population astrocytes(40, 41), our results warrant  
365 clarifying the ultimate neuronal beneficial effects following the LEV microglial modulation  
366 during sepsis.

367 In conclusion, the current *in-vivo* and *in-vitro* study identified new property and therapeutic  
368 perspective for LEV, which is prescribed as an anti-epileptic drug. Indeed, we found that LEV  
369 reduces microglial metabolic impairment, evidenced in the LPS-challenged microglial cell line  
370 and septic animals, by a non-SV2a mechanism. LEV reduces the mortality and severity of  
371 sickness behavior by reducing the microglial dysfunction at the autonomic and limbic centers  
372 level. These results warrant evaluating LEV as a treatment for SAE.

373

374 **Methods**

375 *Chemicals*

376 LEV was provided by UCB BioPharma SRL (Belgium). LPS (E. coli 0111:B4) was purchased  
377 from Sigma-Aldrich.

378

379 *Mice*

380 Adult (2-5 months old) wild-type male C57Bl/6JRj mice (Janvier labs, Le Genest-Saint-Isle,  
381 France) were housed under a 12-h light/dark cycle, with dry food and water available ad  
382 libitum. All procedures were consistent with the European Communities Council Directive of  
383 24 November 1986 (86/609/EEC) and the European Union guidelines and were reviewed and  
384 approved by the Animal Welfare Committee of the Institut Pasteur (Projects number:  
385 dap180018).

386

387 *CLP surgery and treatment paradigm*

388 Mice were treated for analgesia and rehydration 30 minutes before surgery with s.c. injection  
389 of buprenorphine (0.1mg/Kg, Buprecare, Axience, Pantin, France) and saline (NaCl 0.9%).  
390 The CLP surgery (~10min) was achieved under general anesthesia (Isoflurane) on a heating  
391 pad to maintain the body temperature at 37°C during the procedure. Absence of reaction to leg  
392 and tail pinch was checked before incision of the abdominal wall and peritoneum. Caecum was  
393 exposed with a wet cotton swab and a loose ligation was achieved at its external third with  
394 Mersilk 4.0 (Ethicon, Cincinatti, USA). Two transfixing punctures were performed avoiding  
395 blood vessels with a 21G needle. Feces were expressed and spread on caecum before suturing  
396 abdominal muscles and peritoneum in two separate plans. Buprenorphine and saline SC  
397 injections were then performed every 12h until complete recovery. Sepsis severity was  
398 evaluated every 12h for 96h using the sepsis score, which evaluates the clinical signs of local



399 (abdominal spasm) and systemic reaction to sepsis (rectal temperature, fur erection, abnormal  
400 breathing), the behavioral changes (feces cleaning, presence of peri-ocular dried eye drop,  
401 incomplete palpebral opening, spontaneous activity in the cage, the escape attempt after tail  
402 grabbing) and muscular weakness (ability to grip to forceps, body tone, difficulty to walk).  
403 Each item was scored 0 or 1, with a total score range from 0 (normal) to 12 (highly severe).  
404 For ethical reason, mice with a sepsis score  $\geq 6$  and a temperature  $\leq 35.3^{\circ}\text{C}$  were euthanized.  
405 CLP mice were compared to Sham animals that only underwent a laparotomy procedure with  
406 the same anesthetic and analgesic protocol than CLP mice. CLP, and Sham surgery were  
407 performed in the morning (Zeitgeber time 3-5). LEV (300mg/kg, resuspended in 0.9% NaCl  
408 saline) was injected i.p. at h0, h12 and h24 post-CLP.

409

#### 410 *Immunohistochemistry*

411 Six Mice per condition (Sham, CLP, CLP+LEV) were euthanized by an intra-cardiac infusion  
412 of 0.9% NaCl and 4% formalin under deep anesthesia (xylazine 20mg/kg, ketamine 100mg/kg).  
413 Brains were collected and post-fixed with 4% formalin over night at  $4^{\circ}\text{C}$ , then kept in PBS  
414 with 30% sucrose.  $60\mu\text{m}$  thick coronal sections (freezing microtome; Leica) were  
415 permeabilized using PBS with 0.2% Triton X-100 and 10% Normal Donkey Serum (NDS,  
416 Abcam, Ab7475) blocking agent for 2h under constant agitation. Primary antibodies were then  
417 incubated with PBS with 0.2% triton, NDS 5% and azide 0.01% (PBST), at  $4^{\circ}\text{C}$  with constant  
418 agitation overnight. Primary antibodies used were: Iba1 (1:500, Guinea pig, Synaptic systems,  
419 234004), HIF1a (1:200, Mouse, Biotechne, NB100-105), COX2 (1:200, Goat, Abcam,  
420 ab23672), CD-44 (1:200, Rabbit, Abcam, ab157107) and NOS2 (1:200, Mouse, Santa Cruz  
421 Biotechnology, SC-7271). After three 5-minute washes with PBS, sections were incubated with  
422 either Alexa Fluor 488, 568 or 647-conjugated secondary antibodies (1:1000, Invitrogen,  
423 ThermoFisher) with PBST 0.2%, NDS 2% and DAPI 0.001% at room temperature with

424 constant agitation for 2h. After three 5-minute washes with PBS, slices were mounted on slides  
425 with a mounting medium (FluoroMount-G, Interchim). Image acquisition was carried out with  
426 a digital slide scanner (Axio Scan, ZEISS). Specific brain areas were consistently delineated  
427 on digital slides using Zen 2.6 (Zeiss) and mean absolute pixel fluorescence intensity for the  
428 different channels were normalized to fields lacking immunoreactive profiles (background) and  
429 analyzed. In each individual, for structures which could be identified on multiple brain sections,  
430 the mean fluorescence intensity for the different markers was averaged.

431

#### 432 *Microglial cell analysis.*

433 Brain slices immunostained with Iba1 only (as previously described) were imaged using a  
434 spinning disk confocal microscope (CellVoyager CV1000; Yokogawa) with a 60x oil  
435 immersion objective. 2 mosaics of 5x5 fields (325x325 $\mu$ m) with a 50% overlap over a 30 $\mu$ m  
436 thickness for 3 different brain regions: hippocampus, CeA and BLA. Tiles were stitched  
437 together using the Grid/Collection stitching plugin from ImageJ. Tridimensional morphometric  
438 analysis of microglial cells was done using the mcib3d plugin from ImageJ. Microglial  
439 ramification analysis was adapted from Sholl(100). Microglial cell and nuclei were segmented  
440 with automatic local contrast thresholding using Phanshalkar algorithm with a radius of 250  
441 pixels. Nuclei were considered to belong to microglial cell if it was completely surrounded by  
442 Iba1 staining. Briefly, a tridimensionnal distance map was computed around the nuclei using  
443 successive concentric circles shaping the outline of the nucleus with an 1 $\mu$ m incrementation in  
444 order to assess the number of intersections between these circles and the microglial branches  
445 (“skeletonized microglia”). The distance between the nucleus and the intersections was thus  
446 determined. The number of intersections was then represented as a curve as a function of the  
447 nuclear envelope's distance (Sholl curve). We selected several parameters describing  
448 microglial cells: 1) AUC of the Sholl graph, 2) Number of roots (calculated as the number of

449 main processes in the first 3 micrometers, 3) Complexity Index (ratio between the number of  
450 roots and the AUC) 4) “MaxSholl” (distance from the last detected process to the nucleus), 5)  
451 “Maximum length” (longest path in a skeletonized microglia). A minimum of 40 microglial  
452 cells were evaluated per region of interest on 6 mice per condition.

453

#### 454 *Serum cytokine measurement.*

455 The level of IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL9, IL10, IL12 p40, IL12 p70, IL13, IL17,  
456 Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN $\gamma$ , KC, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, TNF $\alpha$ , FGF $\beta$ , and  
457 MIG in diluted serum (in Calibrator Diluent RD6-52) were measured using a Magnetic  
458 Luminex<sup>®</sup> Screening Assay (LXSAM SM-13; R&D Systems) according to the manufacturer’s  
459 instructions using Luminex 200 instrument. Concentrations were determined by parallel  
460 standard curves for each parameter.

461

#### 462 *Cell culture and treatment paradigm.*

463 The BV2 murine microglia cell line (Banca Biologica e Cell Factory, ICLC) was grown in  
464 high-glucose DMEM (DMEM GlutaMAX; ThermoFisher) supplemented with 10% heat-  
465 inactivated FBS (ThermoFisher) and 1% penicillin/streptomycin (Gibco). The cells were  
466 maintained in a humidified incubator with 95% air and a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C. Medium  
467 containing the appropriate agents was replaced every other day. BV2 cells, systematically used  
468 between Passage 7 and 13, were activated with LPS (1 $\mu$ g/ml) with (LPS + LEV group) or  
469 without 100 $\mu$ g/mL LEV (LPS group), compared to unstimulated conditions (Vehicle and LEV  
470 groups).

471

#### 472 *Cell growth, Cell death and apoptosis.*

473 BV2 cells following incubation of LPS (1 $\mu$ g/mL) and/or LEV (100 $\mu$ g/mL) were analyzed  
474 using Incucyte<sup>®</sup> Cytotox Green Dye and Caspase-3/7 Red Dye for Apoptosis, according to the  
475 manufacturer's instructions. Real time imaging was performed with an IncuCyte<sup>®</sup> S3 Live-  
476 Cell Analysis System and images (4 per well, phase, green, and red) were capture at 20x every  
477 3h for 2 days. Images were analyzed using the IncuCyte<sup>®</sup> Live-Cell Analysis System software  
478 (Basic Analyzer; Analysis Version 1.0). Results from the 4 images par well per timepoint were  
479 averaged. Cell growth (cell count over time) and cell confluence (%) were normalized to the  
480 first scan. Cell death and apoptotic cells were normalized to the cell count for each timepoint.

481 *In Vitro Phagocytosis Assays.* BV2 cells were treated for 24h according to the treatment  
482 paradigm. Then, a 6-hour incubation with pHrodo<sup>®</sup>-Red S. aureus BioParticles Conjugate  
483 (1 $\mu$ g/well) was done in an IncuCyte<sup>®</sup> S3 Live-Cell Analysis System. Images were acquired  
484 every 15 minutes for 6h. Results from 4 images par well per timepoint were averaged. The  
485 phagocytic activity was measured as the red fluorescent area (particles) normalized to the cell  
486 surface area (determined by phase contrast).

487

488 *ATP production measurement.*

489 Intracellular ATP was measured using the Cell Titer Glo Luminescent Cell Viability assay kit  
490 (Promega), according to the manufacturer's instructions. Following a 6-hour incubation  
491 according to the treatment paradigm, an equal volume of CellTiter-Glo <sup>®</sup>Reagent was added  
492 to match the volume of media in each well. The luminescence signal was read with a plate  
493 reader (Victor<sup>®</sup> Nivo) and normalized to the cell count.

494

495 *Intracellular Nitric oxide measurement.*

496 Intracellular NO from BV2 cells, incubated in the defined conditions for 24 hours, was  
497 evaluated using the OxiSelect Intracellular Nitric Oxide Assay Kit (Cell Biolabs) according to

498 the manufacturer's instructions. Phase and green fluorescence images were acquired for 30  
499 minutes after adding the Nitric Oxide Fluorometric Probe using an IncuCyte using a 20x  
500 objectives (4 images per well; image acquisition every 10 minutes). After 30 minutes, cells  
501 were lysed using the Cell Lysis Buffer and fluorescence was read with a plate reader at  
502 480nm/530nm normalized to the cell count.

503

504 *PGE<sub>2</sub> assay.*

505 PGE<sub>2</sub> was measured in the supernatant from BV2 cells, cultured according to the treatment  
506 paradigm, using a commercially available ELISA kit (Parameter Prostaglandin E2 assay; R&D  
507 System) according to the manufacturer's instructions, including PGE2 control (Immunoassay  
508 Control Set; R&D System). Optical density was read using a microplate reader at  
509 450nm/570nm and normalized to the cell count.

510

511 *RNA extraction from BV2 cells.* Total RNA was isolated using RNeasy® Mini kit (Qiagen)  
512 according to the manufacturer's instructions. RNA was eluted in 30µL of RNase-free water.  
513 For all samples, RNA was quantitated using a Nano Drop 1000 (Thermo Fisher Scientific).  
514 The RNA integrity number (RIN) was measured using an Agilent TapeStation. Only samples  
515 with RIN values between 9.7 and 10.0 were subjected to RNA-seq.

516

517 *RNA sequencing and data analysis.*

518 The RNA library preparation was done using TruSeq® Stranded mRNA Sample preparation  
519 kit (Illumina). The starting material (500 ng) of total RNA was mRNA enriched using the  
520 oligodT bead system. The isolated mRNA was subsequently fragmented using enzymatic  
521 fragmentation. Then first strand synthesis and second strand synthesis were performed, and the  
522 double stranded cDNA was purified (AMPure XP, Beckman Coulter). The cDNA was end

523 repaired, 3' adenylated and Illumina sequencing adaptors ligated onto the fragments ends, and  
524 the library was purified (AMPure XP). The mRNA stranded libraries were pre-amplified with  
525 PCR and purified (AMPure XP). The libraries size distribution was validated, and quality  
526 inspected on a Bioanalyzer 2100 or BioAnalyzer 4200 tapeStation (Agilent Technologies).  
527 High quality libraries are pooled based in equimolar concentrations based on the Bioanalyzer  
528 Smear Analysis tool (Agilent Technologies). The library pool(s) were quantified using qPCR  
529 and optimal concentration of the library pool used to generate the clusters on the surface of a  
530 flowcell before sequencing on a NextSeq500 instrument (75 cycles) according to the  
531 manufacturer instructions (Illumina Inc.).

532 Significant differentially expressed (DE) genes in 4 comparisons (LPS vs Vehicle, LEV vs  
533 Vehicle, LPS+LEV vs Vehicle, LPS+LEV vs LPS) were identified with FDR value <0.05.  
534 Heatmap and hierarchical clustering (one minus Pearson correlation) was generated using  
535 Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>) from normalized expression of DE  
536 genes. The minimum and maximum values in each row are convert to colors. Functional  
537 analyzes were done using DAVID 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov>) using BV2 transcriptome as  
538 background. Gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEEG)  
539 terms are significant when Benjamini-Hochberg adjustment p value <0.05. The Search Tool  
540 for Retrieval of INteracting Genes (STRING) (<https://string-db.org>) database, which integrates  
541 both known and predicted protein-protein interaction (PPI) was used to predict functional  
542 interactions of a set of DE genes. Active interaction sources used are text mining, experiments,  
543 databases and co-expression. Interaction score >0.4 were applied to construct the PPI  
544 networks. Four thickness of lines were used to evaluated confidence of interaction between  
545 nodes: low (0.150), medium (0.400) high (0.700), and highest (0.900). Functional enrichments  
546 of the network analysis were realized using GO and KEEG pathway integrated to STRING  
547 tool.

548

549 *Quantitative real-time RT-PCR.*

550 The reverse transcription of 2 $\mu$ g of total RNA was performed using the QuantiTect Reverse  
551 Transcription (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Quantitative real-time  
552 RT-PCR (qRT-PCR) was performed using QuantiTect SYBR®Green PCR (Qiagen) and a  
553 ViiA7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) according to the manufacturers'  
554 instructions. GAPDH was used as an internal control. Triplicate measurements were performed  
555 for all reactions. The results were analyzed using  $\Delta$ Ct and  $\Delta\Delta$ Ct methods in Applied  
556 Biosystems QuantStudio Real-Time PCR System (Version 1.3). Primers from Qiagen  
557 (QuantiTect Primer Assay; Qiagen) were used (Supplemental Table 5).

558

559 *BioSeahorse XFe96 assay.*

560 OCR and extracellular acidification rates (ECAR) were measured using a XFe96 Seahorse  
561 extracellular flux analyzer (Agilent) according to the manufacturer's instructions. BV2 cells  
562 exposed to the defined conditions for 6h were plated into XFe96 cell culture plates. Media was  
563 then replaced by XF base media, supplemented with 1mM pyruvate, 2mM glutamine, and  
564 10mM glucose. OCR and ECAR were measured under basal conditions, and after the  
565 successive addition of the following mito-stessors: oligomycin (2 $\mu$ M), FCCP (2 $\mu$ M) and  
566 Rotenone/antimycin A (0.5 $\mu$ M). OCR and ECAR were normalized to cell counts. Results were  
567 collected with Wave software version 2.2 (Agilent). Basal OCR; ATP-linked OCR, Proton-  
568 leak driven OCR, FCCP-induced maximal respiration and spare respiratory capacity were  
569 determined as described(101).

570

571 ECAR and OCR following mitochondrial/glycolysis inhibition were also performed using the  
572 Agilent Seahorse XF Glycolytic Rate Assay according to the manufacturer's instructions. BV2

573 exposed to the defined conditions for 6h were plated into XFe96 cell culture plates. Then, the  
574 media were changed twice at 1h interval with XF base media supplemented with 1mM  
575 pyruvate, 2mM glutamine, 10mM glucose and 5.0mM HEPES. OCR and ECAR were  
576 measured under basal conditions, and after the successive addition of the following stressors:  
577 Rotenone/antimycin A (0.5 $\mu$ M) and 2-deoxy-D-glucose (2-DG, 50mM). OCR and ECAR were  
578 normalized to cell counts. Basal glycolysis and compensatory glycolysis were determined  
579 using the Agilent Seahorse XF Glycolytic Rate Assay Report Generator, according to the  
580 manufacturer instructions (Agilent).

581

#### 582 *Western blot analysis.*

583 BV2 were washed with ice-cold PBS and lysed in RIPA buffer (Sigma-Aldrich) containing  
584 protease and phosphatase inhibitors (Roche). Cell lysates were centrifuged at 10,000g for  
585 20min at 4°C and supernatants used for BCA measurements (Pierce BCA Protein Assay Kit)  
586 of protein concentration. Equal amounts of protein in Laemmli sample buffer (Biorad) were  
587 separated by gel electrophoresis using 4–12% Bis-Tris polyacrylamide gels (Invitrogen) and  
588 transferred to PVDF membranes (Merck Millipore). Nonspecific binding was blocked by  
589 incubating membranes for 1h in TBS blocking buffer (Odyssey, Licor) followed by overnight  
590 incubation at 4°C with the following primary antibodies: rabbit anti-anti-SV2A (Abcam,  
591 ab32942) and anti-GAPDH (Bioworld, AP0063). Blots were washed 3 times in 1X TBS with  
592 0.1% Tween-20 (TBS-T) followed by incubation for 1 h with fluorescent secondary antibodies  
593 (Licor) at room temperature. After 3 additional washes in TBS-T, blots were imaged using the  
594 Odyssey CLx Imaging system (Licor).

595

#### 596 *Oxidative stress.*



597 BV2 cells were seeded in F25 Flasks according to the treatment paradigm. After 24 hours, the  
598 supernatants were removed, and the cells were rinsed 3 times with cold PBS (without Mg/Ca).  
599 After, 5mL of cold PBS was added to each flask and cells were scrapped, collected in a 15mL-  
600 tube and centrifuged. The cell pellets were snap frozen at -80°C and sonicated, in a dedicated  
601 buffer. Enzymatic activities and substrate concentration measurements were done on the  
602 cellular homogenate. Citrate Synthase (CS), SOD1 (Cu/ZnSOD), mitochondrial SOD2  
603 (MnSOD), Glutathione Peroxidase (GPX), Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD),  
604 Glutathione Reductase (GSR), Glutathione Synthetase (GSS) and catalase (CAT) were  
605 evaluated using colorimetric assays (Cobas modular analyzer series, Roche Diagnostics), as  
606 previously described(102–106). Malondialdehyde (MDA), GSH and GSSG were assessed by  
607 spectrofluorometry (SAFAS Xenius) as previously described(107, 108). Data were normalized  
608 to protein content.

609

#### 610 *Statistics.*

611 For RNA-Seq experiments, significant differentially expressed genes in the four comparisons  
612 (LPS vs Vehicle, LEV vs Vehicle, LPS+ LEV vs Vehicle, LPS+ LEV vs LPS) were identified  
613 with FDR value <0.05. GO and KEEG terms were significant when Benjamini-Hochberg  
614 adjustment p value <0.05. To judge significance in other experiments, Student's t test, 1-way  
615 ANOVA, 2-way ANOVA analyses were performed using GraphPad Prism 8.1.1. In  
616 combination with ANOVA, the Tuckey Post hoc test or Dunnett was used for the hypothesis-  
617 driven calculation of multiple-comparison corrected P values. In in vivo experiments, survival  
618 was analyzed using Log-rank (Mantel-Cox) and Gehan-Breslow-Wilcoxon tests. All data are  
619 reported with error bars representing the standard error of the mean. All P values less than 0.05  
620 were considered significant and indicated with 1–4 asterisks: \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P <  
621 0.001, and \*\*\*\*P < 0.0001.



623 **Author contributions**

624 RF, JPV and TS conceived the study, designed experiments, interpreted data, and wrote the  
625 first draft of the manuscript. RF carried out the *in vitro* experiments. SB contributed to the *in*  
626 *vitro* work. RF carried out a first analysis of the RNA-seq results, which were reanalyzed by  
627 JVS, who carried out further bioinformatics analysis and comparisons with published data sets.  
628 PG contributed to the interpretation of the mitochondrial evaluation and RNA-seq results. LB  
629 and AM performed the *in vivo* experiments (CLP surgery, LEV injection, clinical score,  
630 sacrifice and necropsy of animals). AM did the cytokines evaluation. LB and AM performed  
631 the brain microdissection and IHC. Analysis of the microglial morphometry was performed by  
632 AM and RF. LB did the digitalization of the brain IHC slides. RF selected the regions of interest  
633 and analyzed images. RF performed the qPCR. RF ran the statistical analysis for most  
634 experiments, with help from AM. Both RF and TS significantly contributed to the preparation  
635 of the manuscript. FC, FAB, PG, JPV and TS assisted with data interpretation, provided  
636 reagents, and critically reviewed the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

637

638 **Acknowledgments**

639 The authors gratefully acknowledge Reiner Class and Leandro Royer, from UCB Biopharma  
640 SRL, Braine L'Alleud, Belgium, Fariba Poosti, Modis Life Science, Belgium, Cédric  
641 Thepenier and Patricia Flamand, Institut Pasteur, Paris, France, for their technical help and  
642 scientific advice.

643 This work was funded by UCB Biopharma SRL and Institut Pasteur.

644 **References**

- 645 1. ProCESS Investigators et al. A randomized trial of protocol-based care for early septic shock.. *N.*  
646 *Engl. J. Med.* 2014;370(18):1683–93.
- 647 2. Vincent JL, Jones G, David S, Olariu E, Cadwell KK. Frequency and mortality of septic shock in  
648 Europe and North America: A systematic review and meta-analysis. *Crit. Care* 2019;23(1):1–11.
- 649 3. Rudd KE et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis  
650 for the Global Burden of Disease Study. *The Lancet* 2020;395(10219):200–211.
- 651 4. Singer M et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-  
652 3).. *JAMA* 2016;315(8):801–10.
- 653 5. Hosokawa K et al. Clinical neurophysiological assessment of sepsis-associated brain dysfunction: A  
654 systematic review. *Crit. Care* 2014;18(1). doi:10.1186/s13054-014-0674-y
- 655 6. Annane D, Sharshar T. Cognitive decline after sepsis. *Lancet Respir. Med.* 2015;3(1):61–69.
- 656 7. Mazeraud A et al. Neuroanatomy and Physiology of Brain Dysfunction in Sepsis. *Clin. Chest Med.*  
657 2016;37(2):333–345.
- 658 8. Palmieri EM et al. Nitric oxide orchestrates metabolic rewiring in M1 macrophages by targeting  
659 aconitase 2 and pyruvate dehydrogenase. *Nat. Commun.* 2020;11(1):698.
- 660 9. Bozza FA et al. Bioenergetics, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in the  
661 pathophysiology of septic encephalopathy. *Shock Augusta Ga* 2013;39 Suppl 1:10–16.
- 662 10. Shulyatnikova T, Verkhatsky A. Astroglia in Sepsis Associated Encephalopathy. *Neurochem. Res.*  
663 2020;45(1):83–99.
- 664 11. Sonnevile R et al. Understanding brain dysfunction in sepsis.. *Ann. Intensive Care* 2013;3(1):15.
- 665 12. Kettenmann H et al. Physiology of microglia.. *Physiol. Rev.* 2011;91(2):461–553.
- 666 13. Ueno M et al. Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal  
667 development.. *Nat. Neurosci.* 2013;16(5):543–51.
- 668 14. Tremblay M-È, Lowery RL, Majewska AK. Microglial interactions with synapses are modulated by  
669 visual experience.. *PLoS Biol.* 2010;8(11):e1000527.
- 670 15. Hoogland ICM, Houbolt C, van Westerloo DJ, van Gool WA, van de Beek D. Systemic  
671 inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments.. *J.*  
672 *Neuroinflammation* 2015;12:114.
- 673 16. Verdonk F et al. Phenotypic clustering: a novel method for microglial morphology analysis  
674 [Internet]. *J. Neuroinflammation* 2016;13(1). doi:10.1186/s12974-016-0614-7
- 675 17. Chhor V et al. Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised  
676 primary microglia in vitro. *Brain. Behav. Immun.* 2013;32:70–85.
- 677 18. Liu C-Y, Wang X, Liu C, Zhang H-L. Pharmacological Targeting of Microglial Activation: New  
678 Therapeutic Approach [Internet]. *Front. Cell. Neurosci.* 2019;13. doi:10.3389/fncel.2019.00514

- 679 19. Michels M, Sonai B, Dal-Pizzol F. Polarization of microglia and its role in bacterial sepsis. *J.*  
680 *Neuroimmunol.* 2017;303:90–98.
- 681 20. Yuan H et al. The Regulatory Mechanism of Neurogenesis by IGF-1 in Adult Mice. *Mol. Neurobiol.*  
682 2015;51(2):512–522.
- 683 21. Nieto-Estévez V, Defterali Ç, Vicario-Abejón C. IGF-I: A Key Growth Factor that Regulates  
684 Neurogenesis and Synaptogenesis from Embryonic to Adult Stages of the Brain [Internet]. *Front.*  
685 *Neurosci.* 2016;10. doi:10.3389/fnins.2016.00052
- 686 22. Hong S, Dissing-Olesen L, Stevens B. New insights on the role of microglia in synaptic pruning in  
687 health and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2016;36:128–134.
- 688 23. Ren C, Yao R, Zhang H, Feng Y, Yao Y. Sepsis-associated encephalopathy: a vicious cycle of  
689 immunosuppression [Internet]. *J. Neuroinflammation* 2020;17. doi:10.1186/s12974-020-1701-3
- 690 24. Tsuruta R, Oda Y. A clinical perspective of sepsis-associated delirium. *J. Intensive Care*  
691 2016;4(1):18.
- 692 25. Sharshar T et al. The neuropathology of septic shock. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 2004;14(1):21–  
693 33.
- 694 26. Sharshar T et al. Apoptosis of neurons in cardiovascular autonomic centres triggered by inducible  
695 nitric oxide synthase after death from septic shock. *Lancet Lond. Engl.* 2003;362(9398):1799–1805.
- 696 27. Sharshar T et al. Multifocal necrotizing leukoencephalopathy in septic shock. *Crit. Care Med.*  
697 2002;30(10):2371–2375.
- 698 28. Westhoff D et al. Systemic infection and microglia activation: a prospective postmortem study in  
699 sepsis patients [Internet]. *Immun. Ageing A* 2019;16. doi:10.1186/s12979-019-0158-7
- 700 29. Gofton TE, Young GB. Sepsis-associated encephalopathy.. *Nat. Rev. Neurol.* 2012;8(10):557–66.
- 701 30. Young GB, Bolton CF, Archibald YM, Austin TW, Wells GA. The electroencephalogram in sepsis-  
702 associated encephalopathy. *J. Clin. Neurophysiol. Off. Publ. Am. Electroencephalogr. Soc.*  
703 1992;9(1):145–152.
- 704 31. Oddo M, Carrera E, Claassen J, Mayer SA, Hirsch LJ. Continuous electroencephalography in the  
705 medical intensive care unit\*. *Crit. Care Med.* 2009;37(6):2051–2056.
- 706 32. Azabou E et al. Early Standard Electroencephalogram Abnormalities Predict Mortality in Septic  
707 Intensive Care Unit Patients. *PloS One* 2015;10(10):e0139969.
- 708 33. Hosokawa K et al. Clinical neurophysiological assessment of sepsis-associated brain dysfunction:  
709 a systematic review. *Crit. Care Lond. Engl.* 2014;18(6):674.
- 710 34. Benganem S et al. Brainstem dysfunction in critically ill patients. *Crit. Care* 2020;24(1):5.
- 711 35. Pandharipande PP, Girard TD, Ely EW. Long-term cognitive impairment after critical illness.. *N.*  
712 *Engl. J. Med.* 2014;370(2):185–6.
- 713 36. Iwashyna TJ et al. Long-term Cognitive Impairment and Functional Disability Among Survivors of  
714 Severe Sepsis. *JAMA* 2010;304(16):1787.

- 715 37. Heming N et al. Neuroanatomy of sepsis-associated encephalopathy. *Crit. Care* 2017;21(1):65.
- 716 38. Prescott HC, Angus DC. Enhancing recovery from sepsis: A review. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.*  
717 2018;319(1):62–75.
- 718 39. Reznik ME et al. Long-term risk of seizures in adult survivors of sepsis. *Neurology*  
719 2017;89(14):1476–1482.
- 720 40. Haghikia A et al. Implications of antiinflammatory properties of the anticonvulsant drug  
721 levetiracetam in astrocytes. *J. Neurosci. Res.* 2008;86(8):1781–1788.
- 722 41. Cardile V et al. Expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and inducible nitric oxide  
723 synthase (iNOS) in rat astrocyte cultures treated with Levetiracetam. *Brain Res.* 2003;976(2):227–  
724 233.
- 725 42. Stockburger C et al. A Mitochondrial Role of SV2a Protein in Aging and Alzheimer’s Disease:  
726 Studies with Levetiracetam. *J. Alzheimers Dis.* 2015;50(1):201–215.
- 727 43. Carlson DE, Chiu WC, Fiedler SM, Hoffman GE. Central neural distribution of immunoreactive Fos  
728 and CRH in relation to plasma ACTH and corticosterone during sepsis in the rat. *Exp. Neurol.*  
729 2007;205(2):485–500.
- 730 44. Sonnevile R et al. Understanding brain dysfunction in sepsis. *Ann. Intensive Care* 2013;3(1):15.
- 731 45. Michels M et al. Modulation of microglial phenotypes improves sepsis-induced hippocampus-  
732 dependent cognitive impairments and decreases brain inflammation in an animal model of sepsis.  
733 *Clin. Sci.* 2020;134(7):765–776.
- 734 46. Henn A et al. The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia  
735 cultures or for animal experiments examining brain inflammation. *ALTEX* 2009;26(2):83–94.
- 736 47. Horvath RJ, Nutile-McMenemy N, Alkaitis MS, Deleo JA. Differential migration, LPS-induced  
737 cytokine, chemokine, and NO expression in immortalized BV-2 and HAPI cell lines and primary  
738 microglial cultures. *J. Neurochem.* 2008;107(2):557–569.
- 739 48. Das A et al. Transcriptome sequencing reveals that LPS-triggered transcriptional responses in  
740 established microglia BV2 cell lines are poorly representative of primary microglia [Internet]. *J.*  
741 *Neuroinflammation* 2016;13(1). doi:10.1186/s12974-016-0644-1
- 742 49. Rambeck B et al. Comparison of brain extracellular fluid, brain tissue, cerebrospinal fluid, and  
743 serum concentrations of antiepileptic drugs measured intraoperatively in patients with intractable  
744 epilepsy. *Epilepsia* 2006;47(4):681–694.
- 745 50. Patsalos PN. Clinical Pharmacokinetics of Levetiracetam:. *Clin. Pharmacokinet.* 2004;43(11):707–  
746 724.
- 747 51. Patsalos PN. Pharmacokinetic profile of levetiracetam: toward ideal characteristics. *Pharmacol.*  
748 *Ther.* 2000;85(2):77–85.
- 749 52. O’Neill LAJ, Kishton RJ, Rathmell J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat. Rev.*  
750 *Immunol.* 2016;16(9):553–565.

- 751 53. Subbaramaiah K et al. Inhibition of Cyclooxygenase-2 Gene Expression by p53. *J. Biol. Chem.*  
752 1999;274(16):10911–10915.
- 753 54. Obermajer N et al. PGE(2)-driven induction and maintenance of cancer-associated myeloid-  
754 derived suppressor cells. *Immunol. Invest.* 2012;41(6–7):635–657.
- 755 55. Ruffell B, Affara NI, Coussens LM. Differential macrophage programming in the tumor  
756 microenvironment. *Trends Immunol.* 2012;33(3):119–126.
- 757 56. Basudhar D et al. Coexpression of NOS2 and COX2 accelerates tumor growth and reduces  
758 survival in estrogen receptor-negative breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2017;114(49):13030–  
759 13035.
- 760 57. Basudhar D et al. Understanding the tumour micro-environment communication network from  
761 an NOS2/COX2 perspective. *Br. J. Pharmacol.* 2019;176(2):155–176.
- 762 58. Park J et al. Mitochondrial ROS govern the LPS-induced pro-inflammatory response in microglia  
763 cells by regulating MAPK and NF-κB pathways. *Neurosci. Lett.* 2015;584:191–196.
- 764 59. Orihuela R, McPherson CA, Harry GJ. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states:  
765 Microglia bioenergetics with acute polarization. *Br. J. Pharmacol.* 2016;173(4):649–665.
- 766 60. Hunter R, Ojha U, Bhurtel S, Bing G, Choi D-Y. Lipopolysaccharide-induced functional and  
767 structural injury of the mitochondria in the nigrostriatal pathway. *Neurosci. Res.* 2017;114:62–69.
- 768 61. Stadler J et al. Effect of exogenous and endogenous nitric oxide on mitochondrial respiration of  
769 rat hepatocytes. *Am. J. Physiol.* 1991;260(5 Pt 1):C910-916.
- 770 62. Beltran B, Mathur A, Duchen MR, Erusalimsky JD, Moncada S. The effect of nitric oxide on cell  
771 respiration: A key to understanding its role in cell survival or death. *Proc. Natl. Acad. Sci.*  
772 2000;97(26):14602–14607.
- 773 63. Nair S et al. Lipopolysaccharide-induced alteration of mitochondrial morphology induces a  
774 metabolic shift in microglia modulating the inflammatory response in vitro and in vivo. *Glia*  
775 2019;67(6):1047–1061.
- 776 64. Banati RB et al. Mitochondria in activated microglia in vitro. *J. Neurocytol.* 2004;33(5):535–541.
- 777 65. Lamkanfi M, Dixit VM. Inflammasomes and their roles in health and disease. *Annu. Rev. Cell Dev.*  
778 *Biol.* 2012;28:137–161.
- 779 66. Voet S, Srinivasan S, Lamkanfi M, van Loo G. Inflammasomes in neuroinflammatory and  
780 neurodegenerative diseases. *EMBO Mol. Med.* 2019;11(6):e10248.
- 781 67. Cuenca AG, Delano MJ, Kelly-Scumpia KM, Moldawer LL, Efron PA. Cecal Ligation and Puncture  
782 [Internet]. In: Coligan JE, Bierer BE, Margulies DH, Shevach EM, Strober W eds. *Current Protocols in*  
783 *Immunology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2010:
- 784 68. Savi FF et al. What animal models can tell us about long-term cognitive dysfunction following  
785 sepsis: A systematic review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2020;S0149763420306783.
- 786 69. Laurenzi MA, Arcuri C, Rossi R, Marconi P, Bocchini V. Effects of Microenvironment on  
787 Morphology and Function of the Microglial Cell Line BV-2. *Neurochem. Res.* 2001;26(11):1209–1216.



788 70. Moss DW, Bates TE. Activation of murine microglial cell lines by lipopolysaccharide and  
789 interferon-gamma causes NO-mediated decreases in mitochondrial and cellular function. *Eur. J.*  
790 *Neurosci.* 2001;13(3):529–538.

791 71. Sierra A, Abiega O, Shahrzad A, Neumann H. Janus-faced microglia: beneficial and detrimental  
792 consequences of microglial phagocytosis. *Front. Cell. Neurosci.* 2013;7:6.

793 72. Park LC et al. Metabolic impairment induces oxidative stress, compromises inflammatory  
794 responses, and inactivates a key mitochondrial enzyme in microglia. *J. Neurochem.* 1999;72(5):1948–  
795 1958.

796 73. Park J et al. Mitochondrial dynamics modulate the expression of pro-inflammatory mediators in  
797 microglial cells. *J. Neurochem.* 2013;127(2):221–232.

798 74. Miyake T, Shirakawa H, Nakagawa T, Kaneko S. Activation of mitochondrial transient receptor  
799 potential vanilloid 1 channel contributes to microglial migration: Mitochondrial TRPV1 in Microglial  
800 Migration. *Glia* 2015;63(10):1870–1882.

801 75. Culmsee C et al. Mitochondria, Microglia, and the Immune System—How Are They Linked in  
802 Affective Disorders? [Internet]. *Front. Psychiatry* 2019;9. doi:10.3389/fpsy.2018.00739

803 76. Katoh M et al. Polymorphic regulation of mitochondrial fission and fusion modifies phenotypes  
804 of microglia in neuroinflammation [Internet]. *Sci. Rep.* 2017;7(1). doi:10.1038/s41598-017-05232-0

805 77. Ye J et al. The role of autophagy in pro-inflammatory responses of microglia activation via  
806 mitochondrial reactive oxygen species *in vitro*. *J. Neurochem.* 2017;142(2):215–230.

807 78. Baseler WA et al. Autocrine IL-10 functions as a rheostat for M1 macrophage glycolytic  
808 commitment by tuning nitric oxide production. *Redox Biol.* 2016;10:12–23.

809 79. Jung F, Palmer LA, Zhou N, Johns RA. Hypoxic regulation of inducible nitric oxide synthase via  
810 hypoxia inducible factor-1 in cardiac myocytes. *Circ. Res.* 2000;86(3):319–325.

811 80. Kaidi A, Qualtrough D, Williams AC, Paraskeva C. Direct transcriptional up-regulation of  
812 cyclooxygenase-2 by hypoxia-inducible factor (HIF)-1 promotes colorectal tumor cell survival and  
813 enhances HIF-1 transcriptional activity during hypoxia. *Cancer Res.* 2006;66(13):6683–6691.

814 81. Poyton R, Hendrickson M. Crosstalk between nitric oxide and hypoxia-inducible factor signaling  
815 pathways: an update. *Res. Rep. Biochem.* 2015;147.

816 82. Sanin DE et al. Mitochondrial Membrane Potential Regulates Nuclear Gene Expression in  
817 Macrophages Exposed to Prostaglandin E2. *Immunity* 2018;49(6):1021-1033.e6.

818 83. Dawson VL, Dawson TM. Nitric oxide neurotoxicity. *J. Chem. Neuroanat.* 1996;10(3–4):179–190.

819 84. Kawano T et al. Prostaglandin E2 EP1 receptors: downstream effectors of COX-2 neurotoxicity.  
820 *Nat. Med.* 2006;12(2):225–229.

821 85. Favrais G, Schwendimann L, Gressens P, Lelièvre V. Cyclooxygenase-2 mediates the sensitizing  
822 effects of systemic IL-1-beta on excitotoxic brain lesions in newborn mice. *Neurobiol. Dis.*  
823 2007;25(3):496–505.

- 824 86. Ferger AI et al. Effects of mitochondrial dysfunction on the immunological properties of  
825 microglia. *J. Neuroinflammation* 2010;7(1):45.
- 826 87. Byun CJ et al. DNA methylation of the 5'-untranslated region at +298 and +351 represses BACE1  
827 expression in mouse BV-2 microglial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012;417(1):387–392.
- 828 88. Lin H-C, Hsieh H-M, Chen Y-H, Hu M-L. S-Adenosylhomocysteine increases beta-amyloid  
829 formation in BV-2 microglial cells by increased expressions of beta-amyloid precursor protein and  
830 presenilin 1 and by hypomethylation of these gene promoters. *Neurotoxicology* 2009;30(4):622–627.
- 831 89. Ito K et al. A molecular mechanism of action of theophylline: Induction of histone deacetylase  
832 activity to decrease inflammatory gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002;99(13):8921–  
833 8926.
- 834 90. Blanchard F et al. FR901228, an inhibitor of histone deacetylases, increases the cellular  
835 responsiveness to IL-6 type cytokines by enhancing the expression of receptor proteins. *Oncogene*  
836 2002;21(41):6264–6277.
- 837 91. Kaminska B, Mota M, Pizzi M. Signal transduction and epigenetic mechanisms in the control of  
838 microglia activation during neuroinflammation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.*  
839 2016;1862(3):339–351.
- 840 92. Lin C-Y et al. Lipopolysaccharide-Induced Nitric Oxide, Prostaglandin E2, and Cytokine Production  
841 of Mouse and Human Macrophages Are Suppressed by Pheophytin-b [Internet]. *Int. J. Mol. Sci.*  
842 2017;18(12). doi:10.3390/ijms18122637
- 843 93. Kim SH, Smith CJ, Van Eldik LJ. Importance of MAPK pathways for microglial pro-inflammatory  
844 cytokine IL-1 beta production. *Neurobiol. Aging* 2004;25(4):431–439.
- 845 94. Bachstetter AD et al. Microglial p38 $\alpha$  MAPK is a key regulator of proinflammatory cytokine up-  
846 regulation induced by toll-like receptor (TLR) ligands or beta-amyloid (A $\beta$ ). *J. Neuroinflammation*  
847 2011;8(1):79.
- 848 95. Schmidt H et al. Autonomic dysfunction predicts mortality in patients with multiple organ  
849 dysfunction syndrome of different age groups. *Crit. Care Med.* 2005;33(9):1994–2002.
- 850 96. Schmidt H et al. Autonomic dysfunction predicts both 1- and 2-month mortality in middle-aged  
851 patients with multiple organ dysfunction syndrome. *Crit. Care Med.* 2008;36(3):967–970.
- 852 97. Schmidt H et al. The alteration of autonomic function in multiple organ dysfunction syndrome.  
853 *Crit. Care Clin.* 2008;24(1):149–163, ix.
- 854 98. Pósfai B, Cserép C, Orsolits B, Dénes Á. New Insights into Microglia–Neuron Interactions: A  
855 Neuron's Perspective. *Neuroscience* 2019;405:103–117.
- 856 99. Matejuk A, Ransohoff RM. Crosstalk Between Astrocytes and Microglia: An Overview [Internet].  
857 *Front. Immunol.* 2020;11. doi:10.3389/fimmu.2020.01416
- 858 100. Sholl DA. Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J.*  
859 *Anat.* 1953;87(Pt 4):387-406.1.

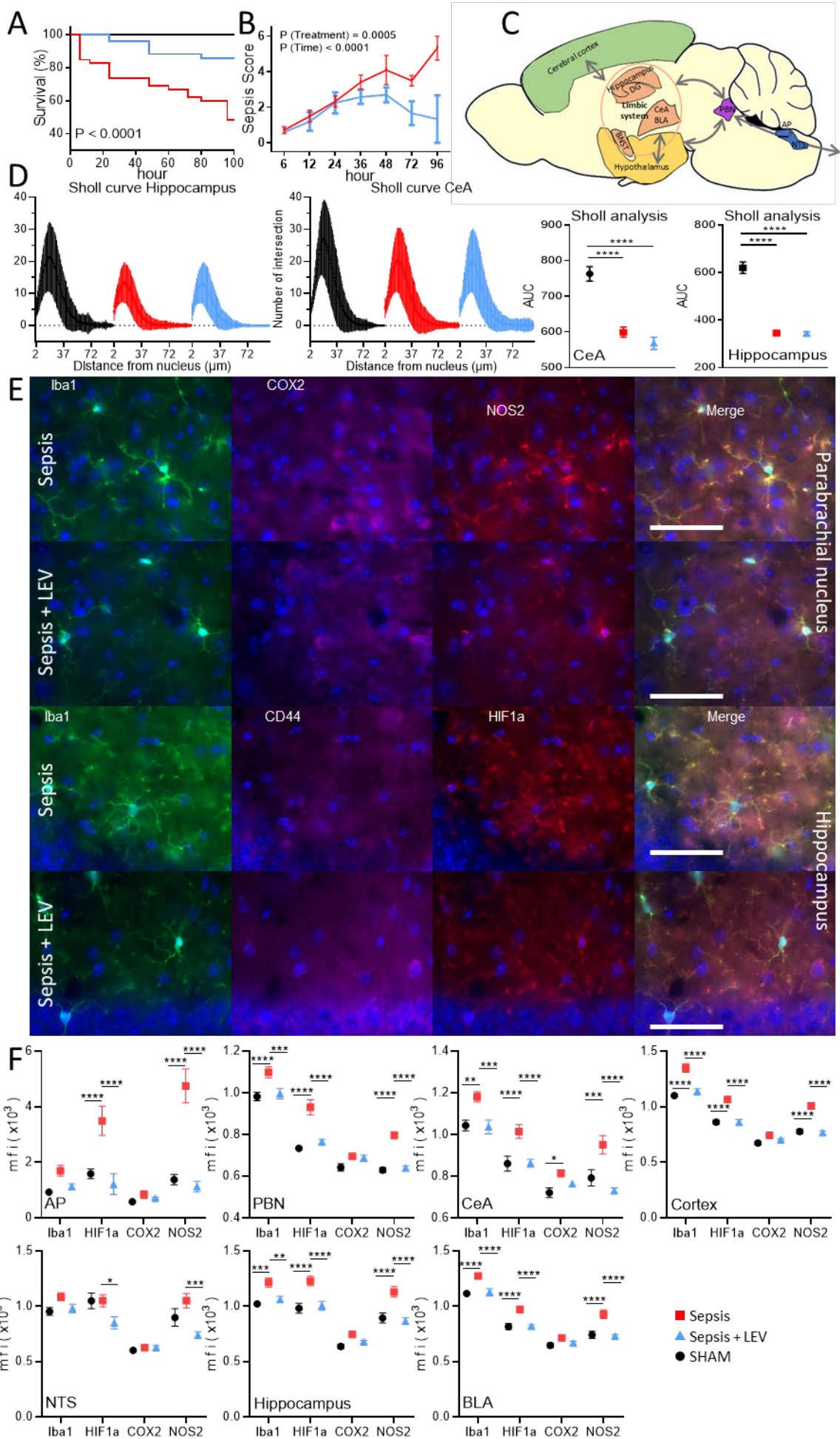
- 860 101. Divakaruni AS, Paradyse A, Ferrick DA, Murphy AN, Jastroch M. Analysis and Interpretation of  
861 Microplate-Based Oxygen Consumption and pH Data [Internet]. In: *Methods in Enzymology*. Elsevier;  
862 2014:309–354
- 863 102. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte  
864 (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 1969;244(22):6049–6055.
- 865 103. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of  
866 erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 1967;70(1):158–169.
- 867 104. Johansson LH, Borg LA. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in  
868 small tissue samples. *Anal. Biochem.* 1988;174(1):331–336.
- 869 105. Beutler AS. *Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods. 3rd Edition [Internet]*.  
870 1985:
- 871 106. Akerboom TPM, Sies H. [48] Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed  
872 disulfides in biological samples [Internet]. In: *Methods in Enzymology*. Academic Press; 1981:373–  
873 382
- 874 107. Conti M, Morand PC, Levillain P, Lemonnier A. Improved fluorometric determination of  
875 malonaldehyde. *Clin. Chem.* 1991;37(7):1273–1275.
- 876 108. Muscari C et al. Simultaneous detection of reduced and oxidized glutathione in tissues and  
877 mitochondria by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* 1998;707(1):301–307.
- 878

879 **Figure legends**

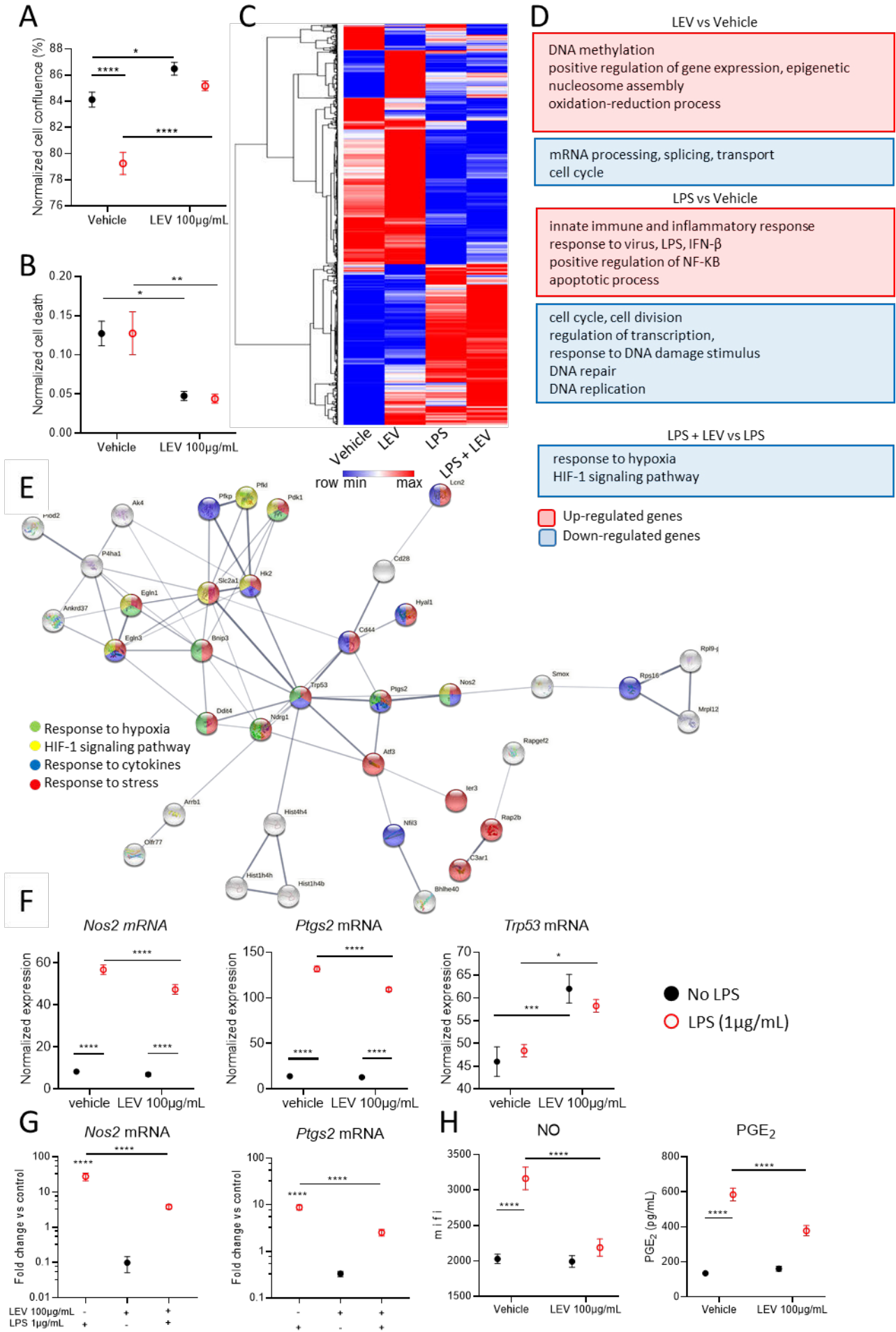
880

881 **Figure 1. LEV improves survival and clinical score in a murine model of sepsis. (A)**  
882 Kaplan-Meier survival curve. **(B)** Time course evaluation of the sepsis score (cumulative  
883 clinical endpoints). **(C)** Scheme of evaluated brain areas implicated in the physiopathology of  
884 SAE. **(D)** Tridimensional morphometric analysis of Iba1-stained microglial cells: Sholl curve  
885 and corresponding AUC in the central amygdala (CeA) and hippocampus from SHAM, Sepsis  
886 and Sepsis + LEV groups (n=6 per condition). **(E)** Representative immunofluorescence  
887 staining of acute brain slices from Sepsis and Sepsis + LEV groups. Top panel: Parabrachial  
888 nucleus (Green: Iba1, Purple: COX2, and red: NOS2; Scale bar: 50µm). Bottom panel:  
889 Hippocampus (Green: Iba1, purple: CD-44 and red: HIF1a; Scale bar: 50µm. **(F)**: Mean  
890 Fluorescence intensity of Iba1, HIF1a, COX2 and NOS2 proteins in the area postrema (AP),  
891 nuucleus of the solitary tract (NTS), parabrachial nucleus (PBN), hippocampus, CeA,  
892 basolateral amygdala (BLA), and cortex from SHAM, Sepsis and Sepsis + LEV groups 24  
893 hours post surgery (n=6 per condition). \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001, and \*\*\*\* P <  
894 0.0001; Log-rank (Mantel-Cox) and Gehan-Breslow-Wilcoxon tests **(A)** and One or Two-way  
895 ANOVA **(B, D, and F)**.

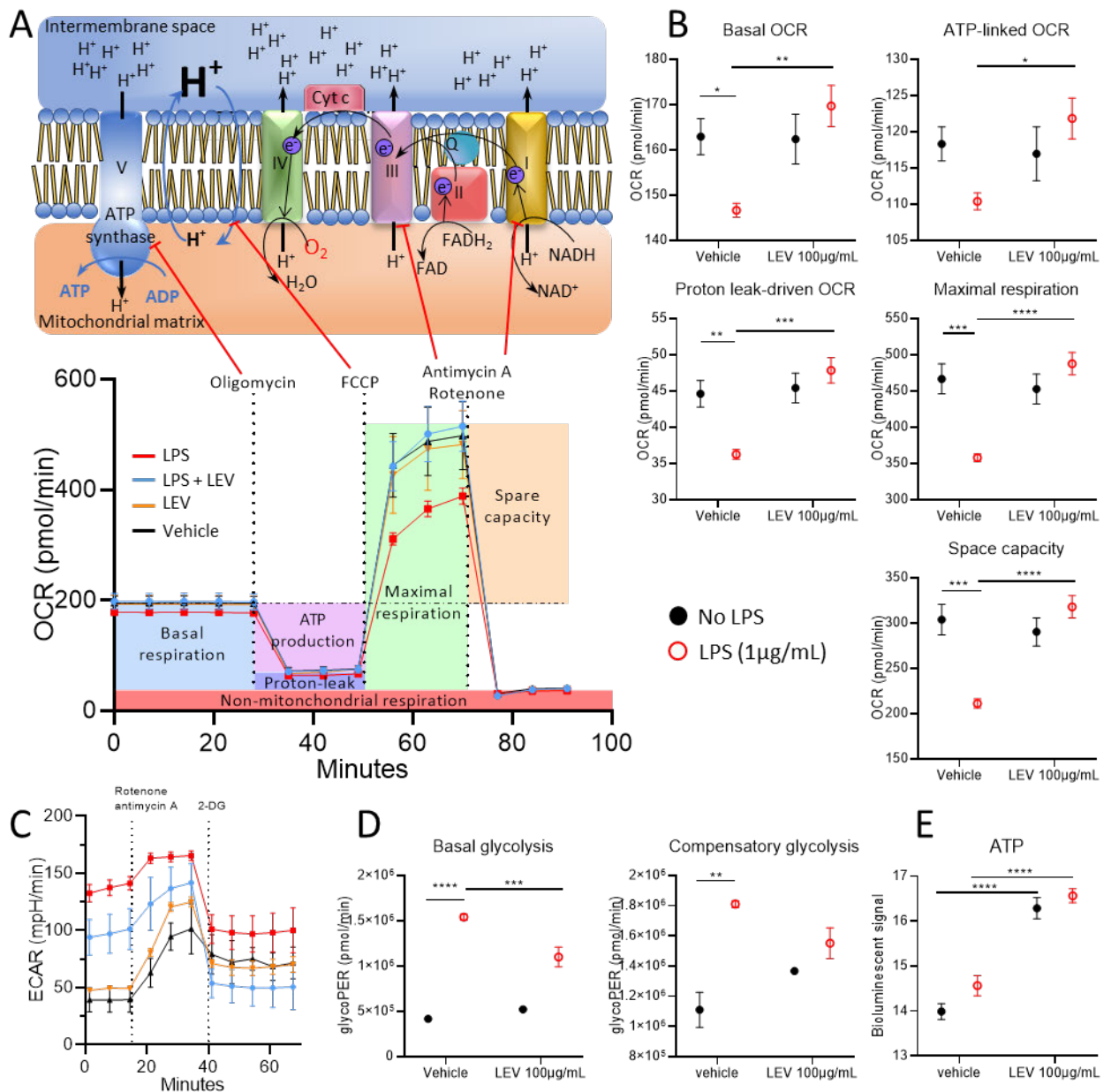
896



898 **Figure 2. LEV increases proliferation of microglial cells and dysregulates key**  
899 **inflammatory response-related genes.** (A) Cell growth (cell confluence) and (B) cytotoxicity  
900 (cell death) of BV2 microglial cells challenged with LPS (1µg/ml) with or without LEV  
901 (100µg/mL), compared to unstimulated conditions (Vehicle and LEV) and incubated 48h under  
902 culture conditions. Cell growth was normalized to the cell number at the first scan. Cytotoxicity  
903 was normalized to the cell count for each timepoint. (C, D, E and F) RNA-seq analysis of BV2  
904 cells challenged 4 hours with LPS (1µg/ml) with or without LEV (100µg/mL), compared to  
905 unstimulated conditions (Vehicle and LEV), (C) Heatmap of differentially expressed (DE)  
906 genes for at least one comparison (LPS vs Vehicle, LEV vs Vehicle, LPS + LEV vs Vehicle,  
907 LPS + LEV vs LPS). Hierarchical clustering using one minus Pearson correlation. (D)  
908 Functional enrichments analysis of DE genes using DAVID 6.8. (E) Protein–protein  
909 interaction network of DE genes between LPS + LEV and LPS conditions. (F) Expression of  
910 *Nos2*, *Ptgs2*, and *Trp53* mRNA. (G) Validation of *Nos2* and *Ptgs2* mRNA expression by RT-  
911 qPCR (H), intracytoplasmic NO and extracellular PGE2 levels in BV2 cells challenged with  
912 LPS (1µg/ml) with or without LEV (100µg/mL), compared to unstimulated conditions  
913 (Vehicle and LEV) and incubated 24h (NO and PGE2) under culture conditions. 6 biological  
914 replicates (8 replicates for PGE2) per condition; m i f i: mean integrated fluorescence intensity.  
915 \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001, and \*\*\*\* P < 0.0001. Two-way ANOVA.







917  
 918 **Figure 3. LEV improves mitochondrial functions in BV2 microglia.** (A) Time course of  
 919 oxygen consumption rate (OCR) from BV2 cells challenged with LPS with or without LEV,  
 920 compared to unstimulated conditions (Vehicle and LEV) for 6 hours. The scheme above the  
 921 OCR graph illustrates the inhibitory mechanisms of the mito-stressors on the electron transport  
 922 chain. (B) Basal OCR, ATP-linked OCR, Proton leak-driven OCR, FCCP-induced maximal  
 923 OCR, spare respiratory capacity, as depicted on the OCR graph. (C) extracellular acidification  
 924 rate (ECAR) following rotenone/antimycin A mitochondrial inhibition and 2-DG inhibition of  
 925 the glycolysis (D) Basal glycolysis, and compensatory glycolysis. (E) Intracellular ATP  
 926 measurement in LPS-challenged BV2 cells with or without LEV, compared to unstimulated  
 927 conditions (Vehicle and LEV) and incubated 6h under culture conditions. 9 biological  
 928 replicates (6 for ATP) per condition. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001, and \*\*\*\* P <  
 929 0.0001. Two-way ANOVA.



# Anti-microbial cytokines elicit a cortisosterone feedback response via brainstem sensing and parabrachial activation of hypothalamus

Ferdinand Jagot<sup>1,2,3</sup>, Gabriel Lepousez<sup>2</sup>, Romane Gaston Breton<sup>1</sup>, Lena Bourhy<sup>2</sup>, Maud Pascal<sup>1,2</sup>, Karl-Klaus Conzelmann<sup>4</sup>, Pierre-Marie Lledo<sup>2‡</sup> and Gérard Eberl<sup>1,5,\*‡</sup>

<sup>1</sup> Microenvironment and Immunity Unit, Institut Pasteur, INSERM U1224, Paris, France

<sup>2</sup> Perception and Memory Unit, Institut Pasteur, CNRS UMR3571, Paris, France

<sup>3</sup> PhD program, Ecole Doctorale Bio Sorbonne Paris Cité (BioSpC), Diderot University, Paris, France

<sup>4</sup> Max von Pettenkofer Institute and Gene Center, Ludwig-Maximilians University, Munich, Germany

<sup>5</sup> Lead contact

\*Correspondence to [gerard.eberl@pasteur.fr](mailto:gerard.eberl@pasteur.fr) and [pierre-marie.lledo@pasteur.fr](mailto:pierre-marie.lledo@pasteur.fr)

‡ Contributed equally

## HIGHLIGHTS

- Anti-microbial type-3 cytokines, but not type-1 and 2, trigger corticosterone release
- IL-1 $\beta$  activates a parabrachial nucleus to hypothalamus paraventricular cell circuit
- IL-1 $\beta$  sensing in the vagal complex recruits parabrachial circuits
- Re-activation of IL-1 $\beta$ -activated parabrachial neurons induces immunosuppression

## IN BRIEF

Jagot et al. identify a brainstem to hypothalamus neuronal circuit by which the anti-microbial cytokine IL-1 $\beta$  induces the corticosterone response and mediates immunosuppression.

## **SUMMARY (133 words)**

The central nervous system regulates systemic immune responses by integrating the physiological and behavioral constraints faced by the individual. Corticosterone (CS), the release of which is controlled in the hypothalamus by the paraventricular nucleus (PVN), is a potent negative regulator of immune responses. We report that the parabrachial nucleus (PB), an important hub linking interoceptive afferent information to autonomic and behavioral responses, also efficiently associates systemic anti-microbial cytokines with the CS response. A subpopulation of PB neurons, directly projecting to the PVN, activates the CS response upon sensing of the cytokine IL-1 $\beta$  in the vagal complex. Pharmacogenetic re-activation of these IL-1 $\beta$ -activated PB neurons is sufficient to induce CS-mediated systemic immunosuppression. Our findings demonstrate an efficient brainstem-encoded modality for the central sensing of anti-microbial cytokines and the regulation of systemic immune responses.

## INTRODUCTION

In the 1920s, Metalnikov observed that conditioned neural reflexes modulate immune responses to antigens (**Metalnikov, 1928**). Decades later, it was found that bacterial compounds, such as lipopolysaccharides (LPS) and the pro-inflammatory cytokine responses they elicit, such as interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and TNF- $\alpha$ , induce a vigorous and complex response coordinated by the brain (**Dantzer, 2017**). Referred to as “sickness behavior”, this response promotes behavioral changes (e.g. reduced locomotion and food intake, social avoidance) and metabolic adjustments (e.g. fever, glycemia) in ways that increase individual and social resistance to infection, and at the same time, regulate immune responses to prevent runaway responses and shock.

The brain regulates immune responses mainly through the autonomic and the neuroendocrine systems. Autonomic responses, conveyed by the sympathetic and the parasympathetic nervous systems, are initiated by preganglionic brain neurons, and induce the release by terminal neurons of neurotransmitters, neuropeptides and hormones that modulate immunity. Cortisol (or corticosterone, CS, in mice) is released into the bloodstream and efficiently suppresses immune responses to limit immunopathology and mobilize energy for other activities (**Cain and Cidlowski, 2017**). The primary inducer of the CS response is the paraventricular nucleus (PVN) of the hypothalamus. In the PVN, neurons expressing corticotropin-releasing hormone (CRH) and vasopressin (VP) initiate the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) cascade, leading to CS production by the adrenal gland (**Beurel and Nemeroff, 2014**). Importantly, the firing activity of PVN neurons, and hence the kinetics and amplitude of the CS response, depends on the integration of signals received from other brain regions, as well as from circumventricular organs that monitor the blood, such as the area postrema (AP) (**Ziegler and Herman, 2002a**).

The CS response is strongly induced by psychological, sensory (pain) and immune “stress” signals. In the context of exposure to the microbial compound LPS or the anti-microbial cytokine IL-1 $\beta$ , a direct excitatory input from catecholaminergic neurons in the

nucleus of the solitary tract (NTS) and the rostroventral medulla (RVM) of the brainstem has been shown to provide one pathway initiating the CS response (**Turnbull and Rivier, 1999**). However, additional excitatory neurons project to the PVN from forebrain regions such as the lateral septum, the bed nucleus of the stria terminalis (BST) and the central amygdala (CeA), and brainstem regions such as the parabrachial nucleus (PB) (**Larsen and Mikkelsen, 1995; Silverman et al., 1981**). The PB is a major hub connecting interoceptive afferent information from spinal neurons (**Chiang et al., 2019**) and the vagal complex (VC) (**Roman et al., 2016**) to various autonomic outputs and aversive behaviors through the CeA-BST network, and nocifensive behaviors through various projections to the reticular formation, the ventromedial hypothalamus (VMH) and the intralaminar thalamic nuclei (**Barik et al., 2018; Chiang et al., 2020; Deng et al., 2020**). Nevertheless, we still have limited information about the nature of the peripheral immune signals perceived by the brain, the site of sensing of immune signals and the neuronal circuit leading the CS response and regulation of immune responses.

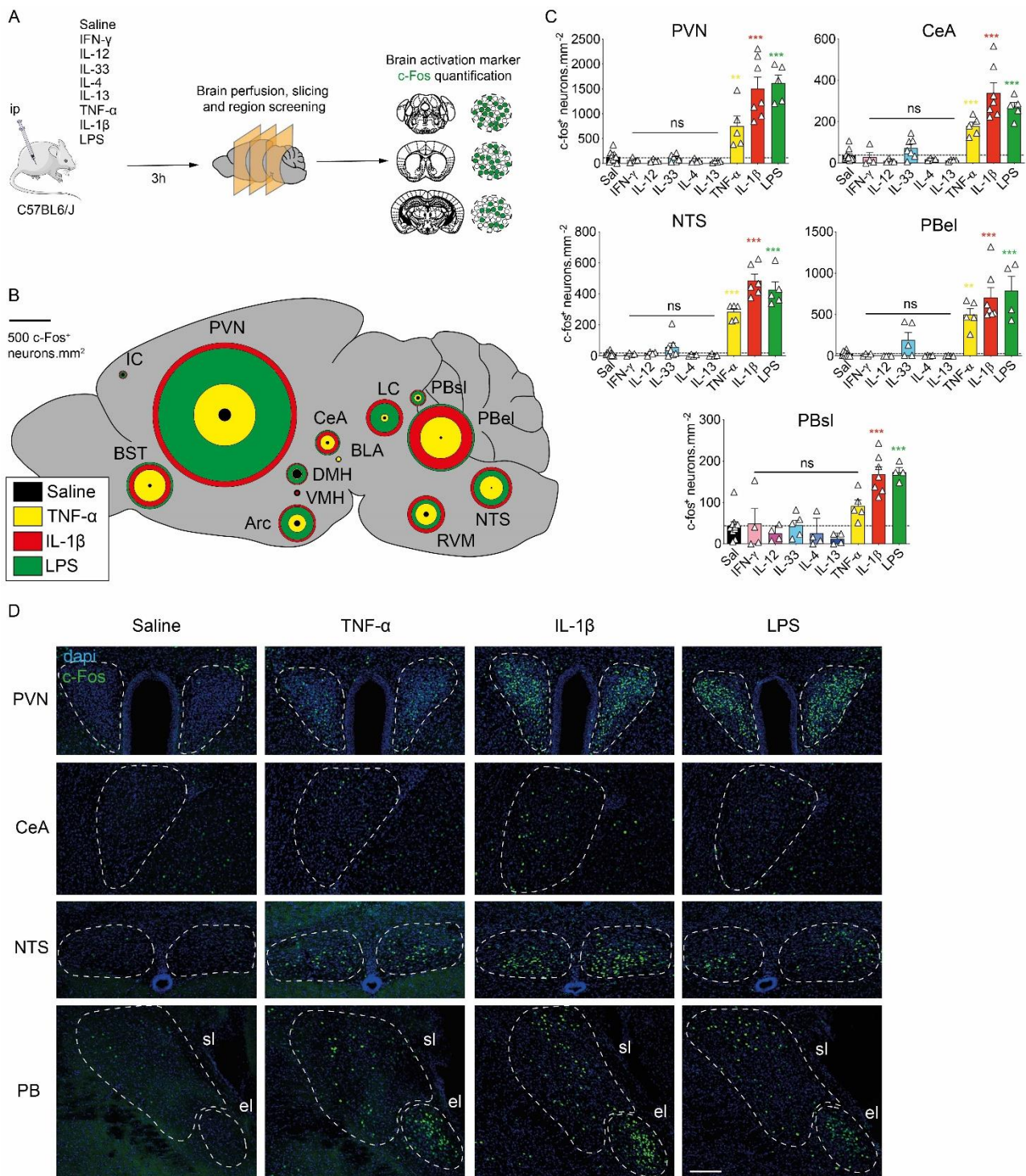
To unravel the brain regions, and their underlying circuits, which relay the sensing of pro-inflammatory cytokines to the PVN and induce the CS response, we administered different types of cytokines and mapped the activated brain areas at cellular resolution using *c-Fos* staining. The strongest brain responses were observed in response to the anti-microbial cytokines IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , and were accompanied by a vigorous CS response. Using cutting-edge genetic tagging methods combined with viral tracing, we found the PB to be a major hub linking the sensing of IL-1 $\beta$  with the activation of the CS response in the PVN. Furthermore, we demonstrated that activation of PB neurons was sufficient to trigger a vigorous CS response via efferents to the PVN, ultimately leading to immunosuppression. This PB-integration circuit was likely to be dependent on direct sensing of IL-1 $\beta$  in the area postrema (AP) of the VC rather than on input from the vagus nerve, and involved propagation of the signal through prostaglandins and projection of VC neurons to the PB. Our data delineate a novel and potent brain circuit that provides negative regulation of systemic inflammation via the HPA axis.

## RESULTS

### Anti-microbial cytokines activate brain nuclei associated with peripheral sensing, sickness behavior and corticosterone response

To obtain a whole-brain map of neurons and regions responsive to different immune signals that encompass the three major types of effector immunity, we injected mice into the peritoneum with cytokines mediating anti-viral type-1 responses (IFN- $\gamma$  and IL-12), anti-helminth and pro-repair type-2 responses (IL-33, IL-4 and IL-13) or anti-microbial (bacteria and fungi) type-3 responses (TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ), as well as with LPS, a bacteria-derived and strong inducer of type-3 responses (**Figure 1A**). After 3 hours, brains were prepared for c-Fos staining, an early marker of neuronal activation (**Kawashima et al., 2014**), and imaged in serial sections.

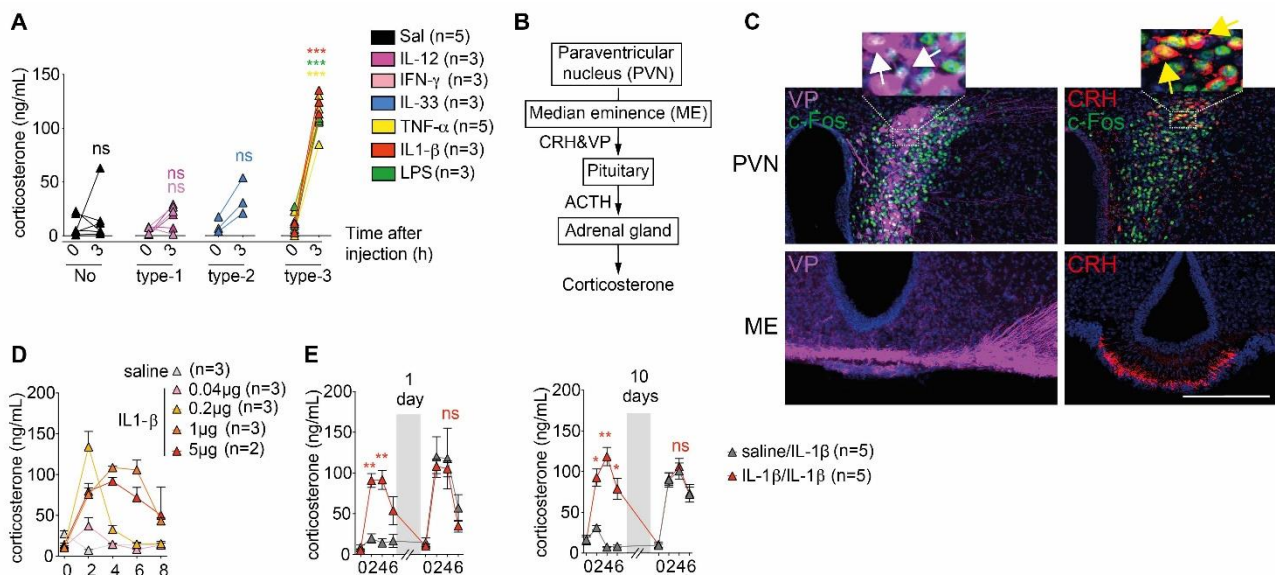
Our screen revealed major differences in the activation pattern of neurons by the different types of cytokines. While type-1 and type-2 cytokines induced only modest c-Fos expression, type-3 cytokines and LPS markedly induced expression of c-Fos in numerous brain regions (**Figure 1B, 1C, 1D and S1**). In particular, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and LPS induced activation of neurons in brainstem areas integrating visceral sensory inputs, such as the NTS and PB, regions involved in sickness and defensive behavior such as the CeA and BST, as well as hypothalamic regions involved in metabolic homeostasis and food intake such as the arcuate nucleus and the dorsomedial hypothalamus (DMH) (**Figure 1B and S1**) (Konsman et al., 2002). In contrast, other brain regions such as the basolateral amygdala (BLA) were not recruited by type-3 cytokines or LPS (**Figure S1A and S1B**). In some activated regions, type-3 cytokines and LPS induced the activation of specific neuronal subpopulations, such as catecholaminergic neurons in the locus coeruleus (LC) and RVM, calcitonin G-related peptide (CGRP)<sup>+</sup> neurons in the PB, as well as PKC- $\delta$ <sup>+</sup> neurons in the CeA and the BST (**Figure S2**). These brain regions are involved in attention, food intake, defensive behaviors and autonomic responses such as the CS response (**Schwarz and Luo, 2015; Weidenfeld et al., 1989; Palmiter, 2018; Ye and Veinante, 2019; Wang et al., 2018**).



**FIGURE 1. Type-3 anti-microbial cytokines activate a complex neuronal circuit.** (A) C57BL6/J mice were injected into the peritoneum with cytokines or LPS, and assessed for c-Fos expression in brain sections. (B) Quantitative mapping of c-Fos expression following treatment. The diameter of circles is proportional to the density of c-Fos<sup>+</sup> neurons. Arc: arcuate nucleus. BLA: basolateral amygdala. BST: bed nucleus of the stria terminalis. CeA: central amygdala. DMH: dorsomedial hypothalamus IC: insular cortex. LC: locus coeruleus. NTS: nucleus of the tractus solitarius. PBsl: parabrachial nucleus, latero-superior zone. PBel: parabrachial nucleus, latero-external zone. PVN: paraventricular nucleus. RVM: rostro-ventral medulla. VMH: ventromedial hypothalamus. (C) Density of c-Fos<sup>+</sup> neurons in individual brain regions. Dotted lines indicate the mean obtained in the saline-injected group (Sal). One-way ANOVA (p-values compared to saline; one dot per mouse, mean of counts in both brain hemispheres). (D) Representative images of c-Fos expression by immunofluorescence. Scale bar is 200  $\mu$ m.



The highest density of neurons activated by type-3 cytokines and LPS was observed in the PVN (**Figure 1B and 1D**). As the PVN triggers the HPA axis for the release of CS into the bloodstream, we measured the CS response triggered by all types of cytokines. In agreement with their respective c-Fos activation profiles, type-3 cytokines and LPS effectively induced a CS response, whereas type-1 and type-2 cytokines did not (**Figure 2A**). Furthermore, IL-1 $\beta$ , a prototypical type-3 cytokine, activated vasopressin (VP)- and CRH-expressing neurons in the PVN, which synergize to activate the HPA cascade and the CS response (**Figure 2B and 2C**) (Beurel and Nemeroff, 2014). Interestingly, increasing doses of IL-1 $\beta$  did not increase the levels of CS in the blood, but rather prolonged the duration of the CS response (**Figure 2D**). Finally, as inflammation-dependent changes in reactivity of the HPA axis were reported at the neurohormonal level (Schmidt et al., 1995), we assessed whether repeated injections of IL-1 $\beta$  would alter the profile of the CS response, and found that re-injection of IL-1 $\beta$  did not alter the kinetic and amplitude of the CS response (**Figure 2E**).



**FIGURE 2. The type-3 anti-microbial cytokine IL-1 $\beta$  efficiently induces the corticosterone response.** (A) Blood corticosterone (CS) levels immediately before (0h) or 3h after cytokine or LPS injection into the peritoneum. Two-way ANOVA (p-values compared to saline). (B) Brain regions and mediators of the Hypothalamo-Pituitary Axis (HPA) leading to CS release into the bloodstream. CRH: corticotropin-releasing hormone. VP: vasopressin. (C) Representative images of c-Fos colocalisation with VP<sup>+</sup> and CRH<sup>+</sup> neurons within the PVN (upper images), and projection of VP and CRH fibers into the ME (lower images), 3h after IL-1 $\beta$  injection. White and yellow arrows show c-Fos<sup>+</sup>VP<sup>+</sup> and c-Fos<sup>+</sup>CRH<sup>+</sup> neurons, respectively. Scale bar is 200  $\mu$ m. (D) Dose-dependent effect of IL-1 $\beta$  injection on the blood CS response (one of two independent experiments). (E) CS response after re-injection of IL-1 $\beta$  1-day (left) or 10-day (right) after initial injection. Two-way ANOVA (p-values compared to saline/IL-1 $\beta$  condition; one of two independent experiments).

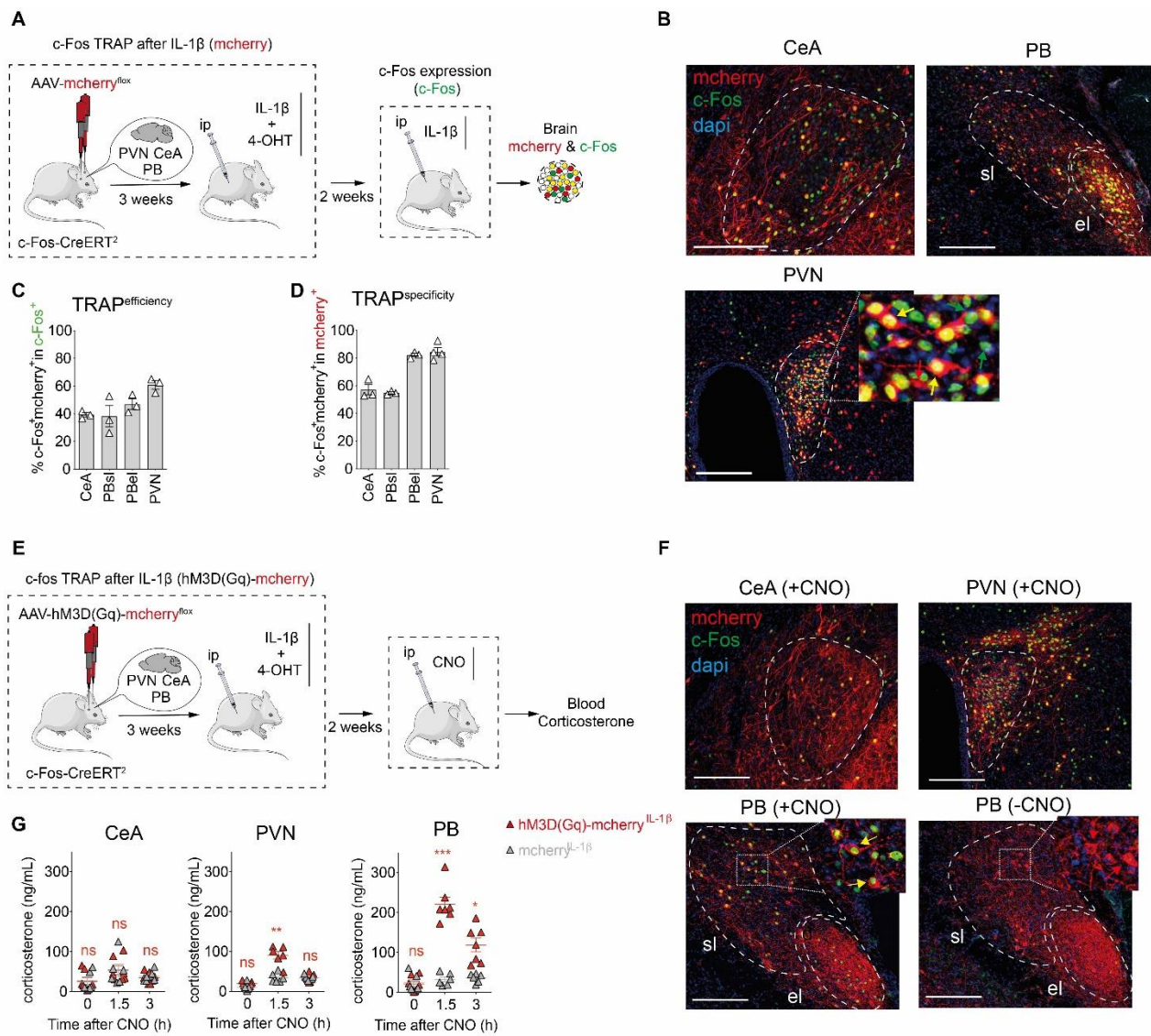


Altogether, these results demonstrate that type-3 immune responses induced by LPS and mediated by IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$ , but not type-1 or type-2 immune responses, are potent activators of brain circuits involved in the management of defensive and sickness behavior, and promptly activate the CS response.

### **The PB neurons activated by IL-1 $\beta$ are sufficient to induce the CS response**

To genetically access the neuronal circuits mediating the cytokine-induced CS response, we used local injection of conditional adeno-associated virus (AAV) into the c-Fos-CreERT<sup>2</sup> mouse line for targeted activity-dependent expression of a reporter protein (**Figure 3A and 3E**). In this line, neuronal activation results in the expression of CreERT, which enters the nucleus in response to 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) injection and causes recombination and permanent labeling (or “TRAP”) of activated neurons (**Allen et al., 2017**). Time-controlled gating of the system, based on the administration of 4-hydroxytamoxifen (4-OHT), was used to open a time window of Cre recombination in response to IL-1 $\beta$  injection.

In preliminary experiments, targeting the CeA and basolateral amygdala (BLA) as positive and negative controls for reactivity to IL-1 $\beta$ , respectively (**Figure S3A**), we determined that administration of 4-OHT 1 hour after IL-1 $\beta$  injection was the optimal time setting to obtain significant labeling of neurons in the CeA and not in the BLA (**Figure S3B-D**). We then performed activity-dependent genetic labeling of neurons in the CeA and PB, as both regions were significantly activated by IL-1 $\beta$  (**Figure 1**), as previously reported (**Konsman et al., 2002**). We also labeled neurons in the PVN as a positive control for activation of the CS response.



**FIGURE 3. IL-1 $\beta$ -TRAPed neurons in the PB efficiently drive the corticosterone response.** (A) Procedure for labeling neurons activated by IL-1 $\beta$  (TRAP) in the PVN, CeA and PB. Transgenic c-Fos-CreERT<sup>2</sup> mice are stereotaxically injected with a Cre-dependent mcherry virus. After 3 weeks, neurons are activated by injection of IL-1 $\beta$  and labeled with 4-OHT injection 1h later. After 2 weeks, mice are challenged with IL-1 $\beta$ , and IL-1 $\beta$ -induced c-Fos and TRAPed mcherry<sup>+</sup> neurons are analyzed by immunofluorescence. (B) Representative images of IL-1 $\beta$ -TRAPed mcherry<sup>+</sup> and IL-1 $\beta$ -activated c-Fos<sup>+</sup> neurons. Arrows show single positive neurons (green c-Fos<sup>+</sup> or red mcherry<sup>+</sup>) and c-Fos<sup>+</sup>mcherry<sup>+</sup> (yellow) neurons. Scale bar is 200  $\mu$ m. (C and D) Ratios of double-positive mcherry<sup>+</sup> c-Fos<sup>+</sup> neurons among c-Fos neurons, representing TRAP efficiency (C), and among mcherry neurons, representing TRAP specificity (D) (one dot per mouse, mean of counts in both brain hemispheres). (E) Same procedure as in (A) using AAV-hM3D(Gq)-mcherry virus. Following TRAP, hM3D(Gq)-bearing neurons or mcherry control neurons were reactivated by clozapine N-oxide (CNO) injection, and corticosterone (CS) levels were determined. (F) Representative images in relevant brain regions of IL-1 $\beta$ -TRAPed mcherry<sup>+</sup> neurons in hM3D(Gq) individuals treated or not with CNO. Arrows show CNO-induced c-Fos expression in mcherry<sup>+</sup> neurons (yellow) or absence of c-Fos expression in control mice (red). Scale bar is 200 $\mu$ m. (G) CS blood levels following CNO treatment of IL-1 $\beta$ -TRAPed mice. All groups were treated with CNO. Two-way ANOVA (p-values compared to mcherry<sup>IL-1 $\beta$</sup>  group; n=6-7 mice per group for the 3 respective brain regions).

First, in order to assess the efficiency and specificity of IL-1 $\beta$ -mediated labeling, IL-1 $\beta$  was reinjected 2 weeks after initial genetic labeling of neurons with IL-1 $\beta$  (**Figure 3A and 3B**), and the neurons expressing both the reporter (mcherry) and/or the protein c-Fos were quantified. As a measure of genetic labeling efficiency, 40-60% of c-Fos<sup>+</sup> neurons in CeA, PB and PVN also expressed the mcherry reporter (**Figure 3C**). Additionally, as a measure of genetic labelling specificity, 60-80% of genetically labeled neurons re-expressed the protein c-Fos (**Figure 3D**), similarly to previously reported data (**Allen et al., 2017**). Altogether, our results confirmed that this genetic model efficiently and specifically labeled neurons that exhibited high c-Fos induction upon IL-1 $\beta$  administration.

We thus used this TRAP approach to selectively manipulate the brain circuits recruited by IL-1 $\beta$  and test their contribution to the activation of the CS response. Using the G-protein-coupled hM3D(Gq) receptor, a Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drug (DREADDs) activated by the ligand clozapine N-oxide (CNO), we assessed whether the re-activation of neurons activated by IL-1 $\beta$  (“IL-1 $\beta$ -TRAPed neurons”) in the CeA, PB or PVN was sufficient to trigger the CS response (**Figure 3E**). Indeed, we show that the reactivation by CNO of IL-1 $\beta$ -TRAPed neurons in the PVN promptly induced the CS response (**Figure 3G**). Remarkably, significantly higher levels of CS were also induced by reactivation of IL-1 $\beta$ -TRAPed neurons in the PB, but not by reactivation of neurons in the CeA (**Figure 3G and 3F**).

Taken together, these results show that a neuronal pathway emanating from the PB is sufficient to induce a vigorous CS response in response to the anti-microbial cytokine IL-1 $\beta$ .

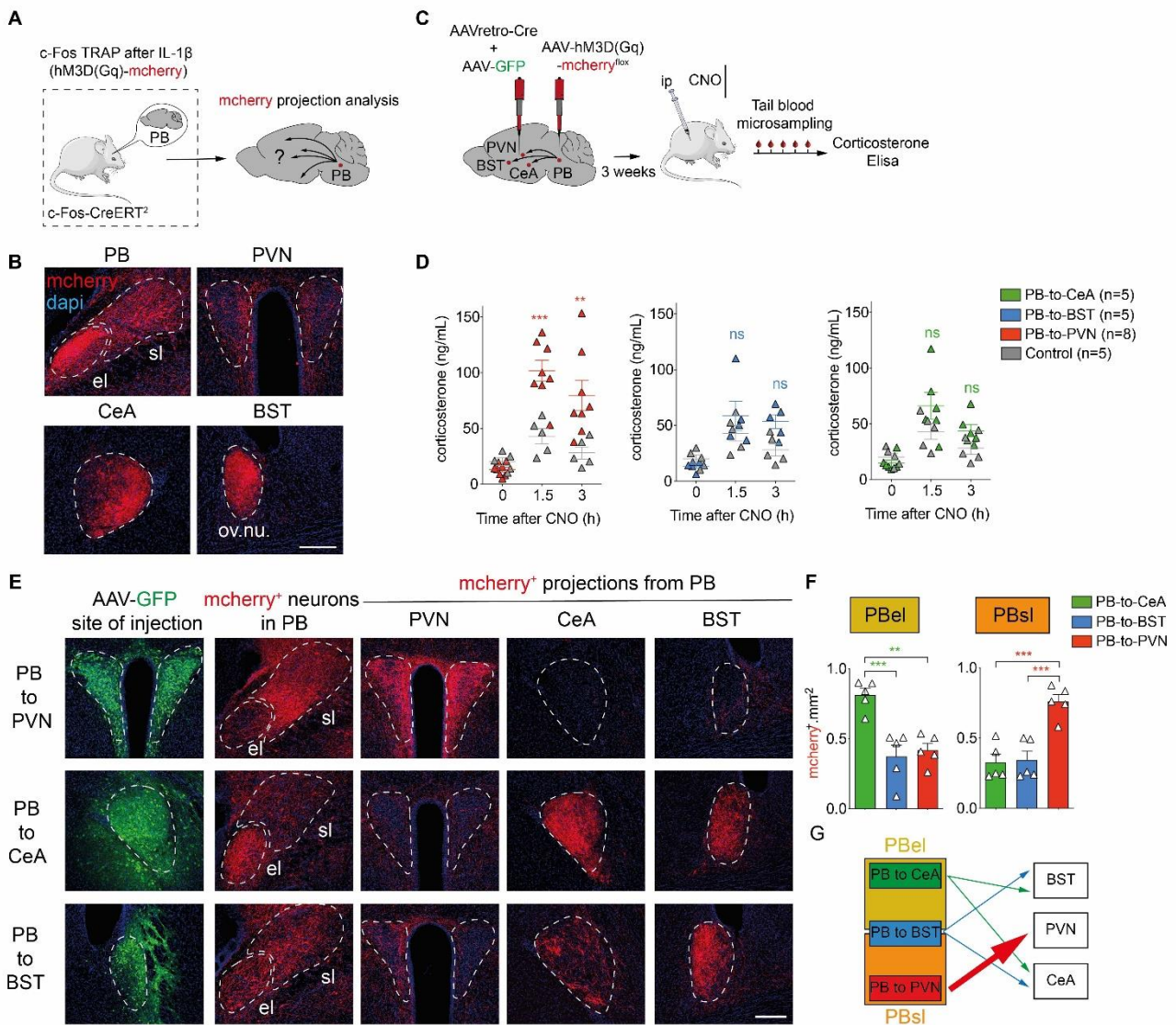
## A subpopulation of PB neurons directly controls the CS response

Different types of PB neurons have been identified that exhibit specific functions in triggering adaptive behavioral responses. For instance, CGRP<sup>+</sup> neurons in the external part of the lateral PB (PBel) project to the BST and CeA, and initiate fear and satiety behaviors (**Campos et al., 2018**). Tachykinin 1 (Tac1)<sup>+</sup> neurons are juxtaposed to CGRP<sup>+</sup> neurons in the superior part of the lateral PB (PBsl), and project to the reticular formation in the medulla to trigger escape behaviors (**Barik et al., 2018**).

We characterized the “projection profiles” of IL-1 $\beta$ -TRAPed neurons in the PB (**Figure 4A**), neurons that are present in both the PBel and PBsl, and detected their projections in the BST, CeA and PVN (**Figure 4B**). To identify which projections induced the CS response, we used dual stereotaxic injections of Cre-expressing retrograde AAVs combined with Cre-dependent DREADD-expressing AAVs to manipulate PB neurons that projected either to BST (PB-to-BST neurons), CeA (PB-to-CeA neurons) or PVN (PB-to-PVN neurons) (**Figure 4C**). We found that only PB-to-PVN neurons triggered the CS response (**Figure 4D**). PB-to-PVN neurons were present mostly within the PBsl, in contrast to PB-to-CeA and PB-to-BST neurons that were found also within the PBel (**Figure 4E and 4F**). In accordance with the reported projection profile of CGRP<sup>+</sup> neurons from the PBel (**Campos et al., 2018**), PB-to-CeA and PB-to-BST neurons, but not PB-to-PVN neurons, projected to both BST and CeA (**Figure 4E and 4G**). Taken together, these results demonstrate that a subpopulation of neurons in the PBsl has the unique ability to send axonal projections to the PVN and induce the CS response when activated by CNO.

We next performed *in vivo* recording of the activity of PB-to-PVN neurons in response to peripheral injection of IL-1 $\beta$ , using fiber photometry. To this end, the calcium-sensitive fluorescent reporter GCaMP7f was conditionally expressed in PB-to-PVN neurons and the volume fluorescence of the targeted neuronal population was collected in freely-moving animals using an optic fiber implanted above the PBsl (**Figure 5A and 5B**).



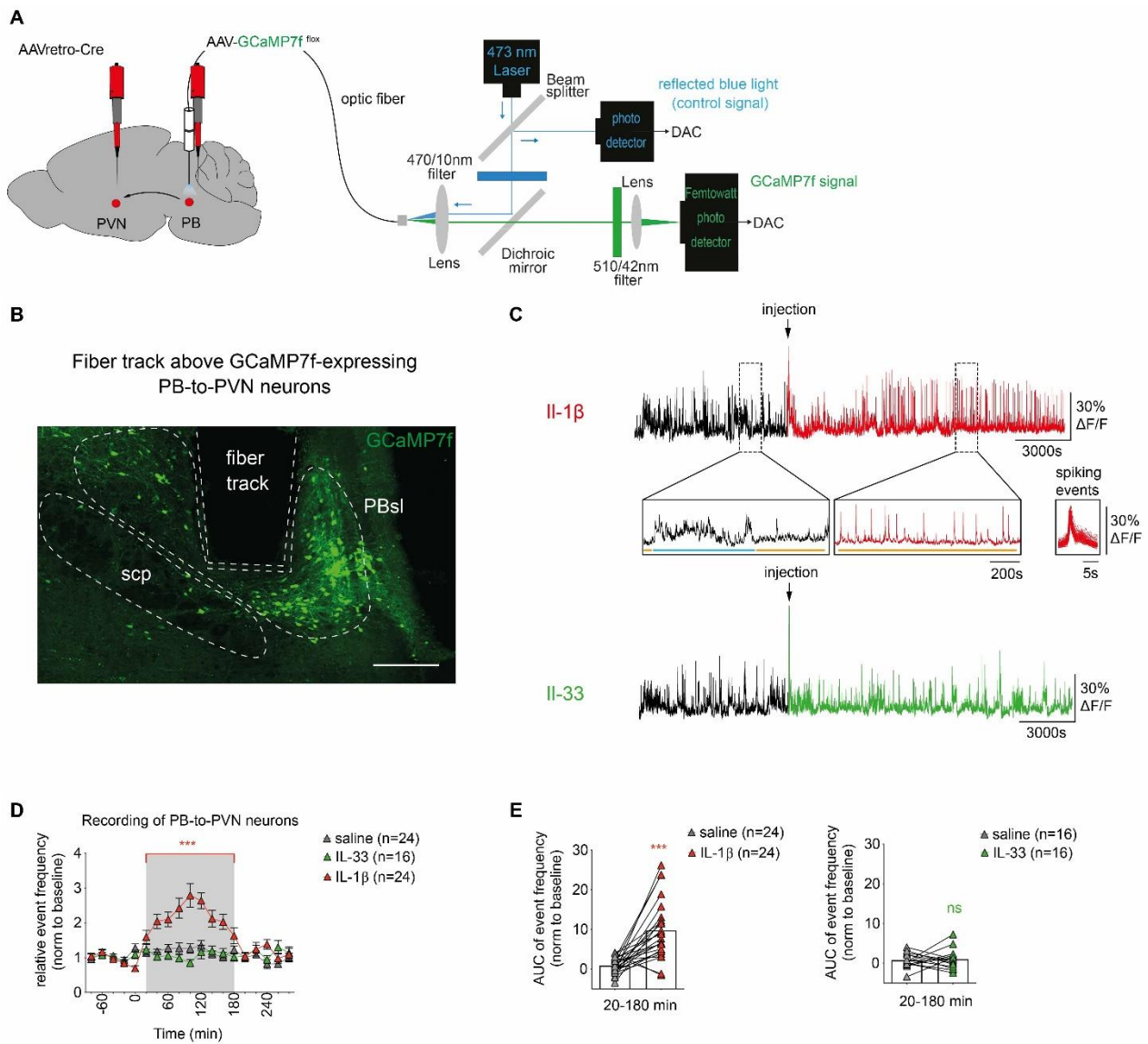


**FIGURE 4. PB neurons directly induce the corticosterone response by projecting to the PVN.** (A) Analysis of the axonal projections of IL-1 $\beta$ -TRAPed neurons in the PB. (B) Representative images of IL-1 $\beta$ -TRAPed mcherry<sup>+</sup> neurons in the PB, and projections to the PVN, CeA and BST. Ov.nu.: oval nucleus of the BST. Scale bar is 200 $\mu$ m. (C) Procedure for selective labeling and subsequent restimulation of PB neurons projecting to the PVN, BST or CeA. (D) Blood levels of CS after activation of PB-to-CeA, PB-to-BST or PB-to-PVN neurons. Control individuals were injected with AAVretro-Cre into the PVN and mcherry<sup>lox</sup> control virus into the PB. Two-way ANOVA (p-values compared to control group). (E) Representative images of the site of Cre virus injection (AAV-GFP), and of mcherry<sup>+</sup> neuron projections to the PVN, BST and CeA. Scale bar is 200  $\mu$ m. (F) Quantification of mcherry<sup>+</sup> fiber density in the PBEI and PBsl. One-way ANOVA (one dot is one mouse, mean of counts in both brain hemispheres). (G) Scheme summarizing the main axonal projections from PB lateral parts to the BST, PVN and CeA.

At baseline, PB-to-PVN neurons exhibited spontaneous population calcium transients, with bouts of increased fluorescence associated with high frequency of calcium transients during alert exploration and bouts of low fluorescence during immobility/sleep period (**Figure 5C**). PB-to-PVN neurons also exhibited reliable time-locked calcium responses to stressful events such as hand restrain and mild foot shock (**Figure S4A**). Upon IL-1 $\beta$  administration, we measured an initial reduction of activity, which was followed by the emergence of large high-amplitude, regular and stereotyped calcium transients as early as 20min post-injection, reaching a peak of activity at 100min, and lasting for 180 to 200 minutes (**Figure 5C, 5D, 5E and S4E**). Importantly, this time period of enhanced neuronal activity in the PB-to-PVN neuronal population matched the kinetic of the CS response induced by IL-1 $\beta$  (**Figure 2D**). In contrast to the strong response induced by the type-3 cytokine IL-1 $\beta$ , we observed that PB-to-PVN neurons did not exhibit any change in activity in response to the type-2 cytokine IL-33 (**Figure 5C, 5D and 5E**), in accordance with our c-Fos quantification (**Figure 1**). Similarly, fasting-induced refeeding or administration of the gastric malaise-inducing agent lithium chloride had no significant effect on PB-to-PVN neuronal activity (**Figure S4B, S4C and S4D**).

### **The PB-to-PVN neuronal circuit is recruited by the vagal complex**

We have established that PB-to-PVN neurons are activated by IL-1 $\beta$  and induce the CS response. Previous work shows that the PB receives exteroceptive sensory inputs from the periphery via spinal neurons of the spinoparabrachial tract, as well as interoceptive vagal inputs via the NTS and the AP (**Chiang et al., 2019**), both regions belonging to the vagal complex (VC). We therefore investigated the source of the input that activated PB-to-PVN neurons and, consequently, induced the CS response in response to IL-1 $\beta$ .

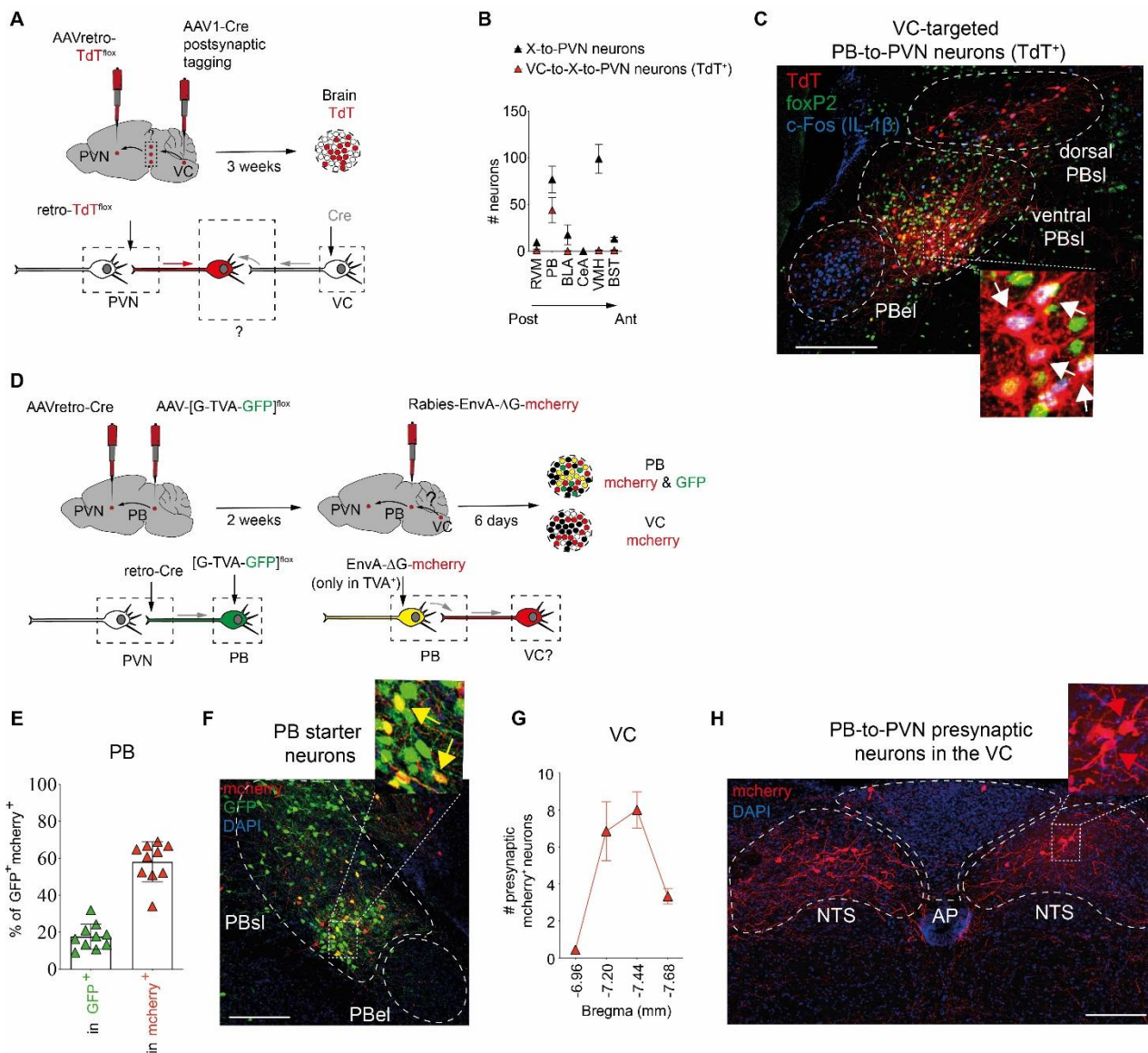


**FIGURE 5. IL-1 $\beta$  activates PB-to-PVN neurons.** (A) PB-to-PVN neurons were conditionally labeled with a Gcamp7f calcium reporter using a dual viral strategy, and recorded through an optical device (400  $\mu$ m fiber) implanted above the PBsl. (B) Representative image of the fiber track recording GCaMP7f-expressing PB-to-PVN neurons. Scale bar is 200 $\mu$ m. (C) Representative fluorescence signals of PB-to-PVN neurons before and after the injection of IL-1 $\beta$  (type-3) or IL-33 (type-2) into the peritoneum. Note the acute increase of activity following hand restraint for ip injections. Higher magnifications of the fluorescence signal before and after IL-1 $\beta$  show the baseline changes in activity pattern with behavioral state (active exploration, blue versus immobility, orange) and the IL-1 $\beta$ -induced emergence of regular, stereotyped, large-amplitude calcium transients during the sickness phase. Overdrawn sorted calcium events observed following IL-1 $\beta$  injection (right). (D) Event frequency in PB-to-PVN population activity after saline, IL-1 $\beta$  or IL-33 injection. Two-way ANOVA (p-values compared to saline injection). (n=16-24 represents brain hemispheres, 8-12 mice per group). (E) Area Under the Curve (AUC) of integrated event frequency of PB-to-PVN spiking activity from 20min to 180min post-injection of IL-1 $\beta$  (left) or IL-33 (right). T-tests (p-values compared to saline injection; n=8-12 mice per group).

First, we activated the spinoparabrachial pathway by the subcutaneous injection of capsaicin, a ligand of heat-sensing TRPV1 channels in sensory nociceptive neurons, and assessed its impact on the activation of PB neurons (**Figure S5A and S5B**). Capsaicin efficiently activated PB and PVN neurons (**Figure S5C**), as previously reported (**Sinniger et al., 2004**), and induced an early CS response (**Figure S5D**), while only poorly activating NTS and regions associated with sickness behavior, such as the BST and CeA (**Figure S5C**). However, despite strong c-Fos induction in the PBsl, which receives spinal inputs (**Figure S5C**), capsaicin did not induce any changes in calcium activity of PB-to-PVN neurons recorded with the GCAMP7f probe (**Figure S5E and S5F**), nor did it induce significant c-Fos expression in PB-to-PVN neurons (**Figure S5G, S5H and S5I**). These results indicate that the spinoparabrachial tract does not participate in the activation of PB-to-PVN neurons involved in the CS response.

We next assessed whether PB-to-PVN neurons are directly activated by the VC. In order to visualize PVN-projecting neurons that receive direct inputs from the VC, we injected a transsynaptic anterograde AAV1-Cre virus into the VC (**Zingg et al., 2017**) and a Cre-dependent retrograde AAV expressing mcherry into the PVN (**Figure 6A**). Using classical retrograde tracing, we found PVN-projecting neurons in the RVM, PB, VMH, BLA and BST (**Figure 6B**, X-to-PVN neurons). Among these regions, only the PB carried a significant number of neurons with both presynaptic contacts with VC neurons and projections to the PVN (**Figure 6C**, VC-to-PB-to-PVN neurons). These VC-targeted PB-to-PVN neurons (**Figure S6A**) were distributed along the PBsl, between caudal (Bregma -5,3mm) and more rostral parts of the PB (Bregma -4,9mm), and represented up to 50% of all PB-to-PVN neurons (**Figure S6B, S6C and S6D**). Also, VC-targeted PB-to-PVN neurons were present within the ventral part of the PBsl where they expressed the foxP2 marker (**Figure 6C, S6B, S6C and S6E**).

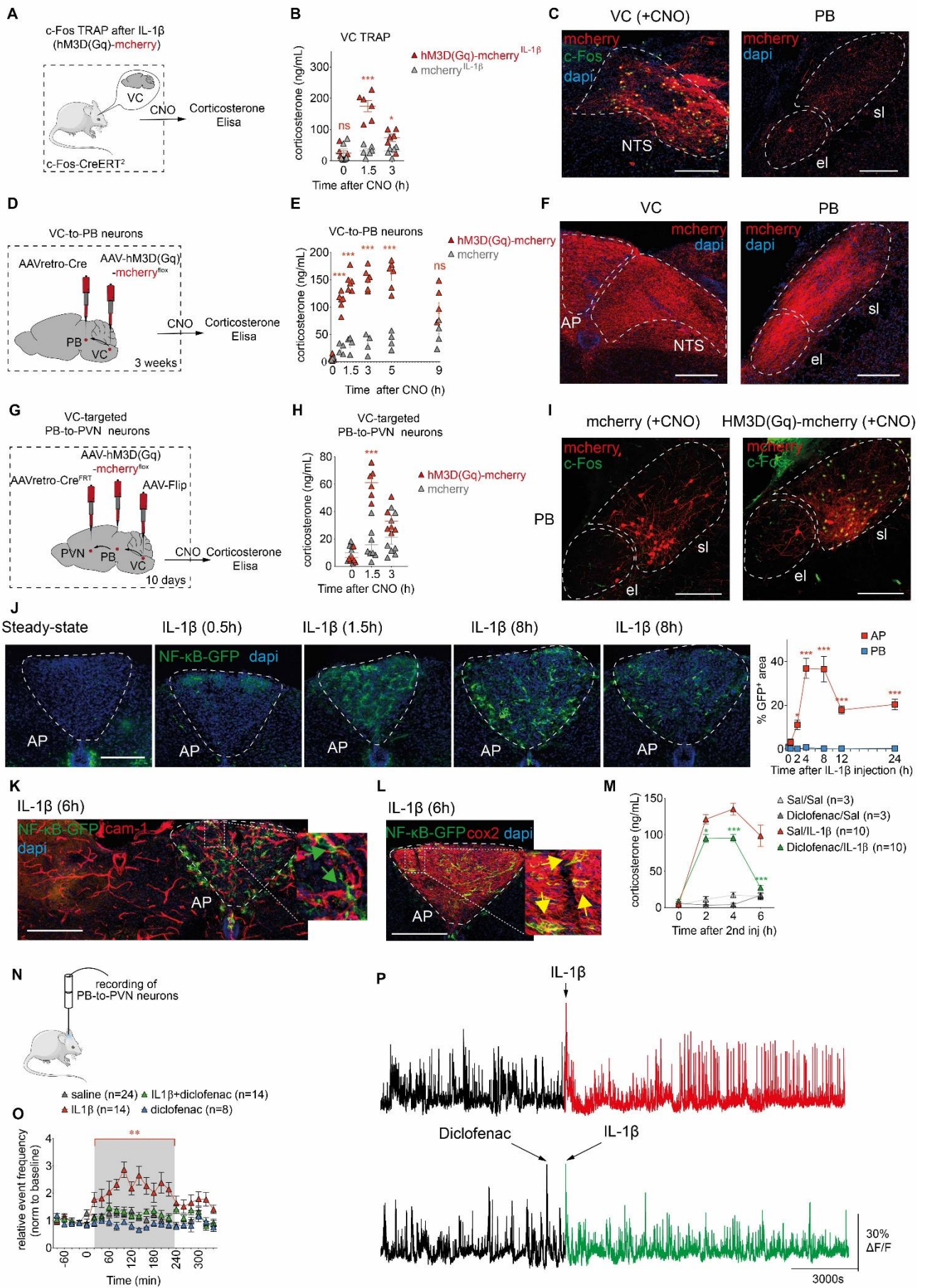




**FIGURE 6.** Neurons in the PB relay type-3 immune signals from the VC to the PVN. (A) Strategy for identifying the neuronal relay between the vagal complex (VC) and PVN neurons. AAV1-Cre virus with transynaptic ability induces expression of Cre in post-synaptic neurons. (B) Quantification of neurons in brain regions directly projecting to the PVN (X-to-PVN neurons, AAVretro-mcherry into the PVN as in Figure S4,  $n=7$  mice, mean of counts in both brain hemispheres) or VC-targeted neurons projecting to the PVN (VC-to-X-to-PVN neurons, red curve,  $n=3$  mice, mean of counts in both brain hemispheres). One of two-independent experiments. (C) Representative images of neurons in the PB (Bregma -5.1mm) that synapse with VC neurons and project to the PVN (VC-targeted PB-to-PVN neurons). White arrows show foxP2<sup>+</sup> VC-targeted PB-to-PVN neurons that are activated by IL-1 $\beta$  (c-Fos<sup>+</sup>). Scale bar is 200  $\mu$ m. (D) Strategy to detect PB-to-PVN presynaptic neurons in the VC. Rabies-EnvA- $\Delta$ G-mcherry viruses infect and replicate only in PB-to-PVN neurons expressing G and TVA proteins («starter neurons»), and retrogradely label presynaptic neurons. (E-F) Proportion of «starter neurons» (GFP<sup>+</sup>mcherry<sup>+</sup>) within PB-to-PVN neurons (GFP<sup>+</sup>) or Rabies-infected neurons (mcherry<sup>+</sup>) ( $n=5$  mice, dots represent injected brain hemispheres) (E), and a representative image of «starter neurons» (yellow) in the PB (F). Scale bar is 200  $\mu$ m. (G-H) Number of PB-to-PVN presynaptic neurons along the rostrocaudal axis of the VC (the obex is at Bregma -7.2mm) (G), and a representative image of presynaptic neurons in the VC (Bregma -7.44mm) indicated by red arrows (H). Scale bar is 200  $\mu$ m.

To further characterize the VC neurons synapsing onto PB-to-PVN neurons, the TVA receptor for the Rabies envelope protein EnvA and the Rabies G protein were conditionally expressed in PB-to-PVN neurons (**Figure 6D**). In this experiment, PB-to-PVN neurons were “starter neurons” for the replication of a modified pseudotyped Rabies virus (**Figure 6E and 6F**), which then infected pre-synaptic neurons and expressed the mcherry reporter. We found mcherry<sup>+</sup> neurons in the VC, establishing synapses with PB-to-PVN neurons, mostly in the NTS, while some neurons were also found in the AP (**Figure 6G and 6H**). VC neurons did not express tyrosine hydroxylase (TH; **Figure S6F**), thus confirming that PB-to-PVN presynaptic neurons in the NTS were distinct from catecholaminergic neurons that project directly to the PVN (**Hollis et al., 2005**).

We next assessed whether the VC-to-PB circuit was sufficient to induce the CS response. First, we established that IL-1 $\beta$ -TRAPed neurons in the VC induced the CS response when reactivated by CNO injection (**Figure 7A and 7B**). In accordance with our previous findings (**Figure 6H**), most IL-1 $\beta$ -TRAPed neurons were located in the NTS and projected to the PBsl, as well as to the PBel (**Figure 7C**). Therefore, we evaluated the effect of reactivating specifically VC-to-PB neurons on the CS response, using dual stereotaxic injections of retrograde AAVs into the PB and conditional hM3D(Gq)-expressing AAVs into the VC (**Figure 7D**). Strikingly, we observed a vigorous and prolonged CS response induced by the activation of VC-to-PB neurons only (**Figure 7E**). The VC-to-PB neurons were found both in the NTS and AP, and massively projected to the PBsl as well as to PBel (**Figure 7F**). Finally, to determine whether this VC-to-PB-to-PVN circuit induced the CS response, we used an intersectional strategy based on Cre and Flippase-dependent expression to specifically express the hM3D(Gq) receptor in VC-targeted PB-to-PVN neurons (**Figure 7G**). Upon CNO injection, VC-targeted PB-to-PVN neurons expressed c-Fos and induced the CS response (**Figure 7H and 7I**). Altogether, our data demonstrate that the VC-to-PB-to-PVN circuit is sufficient to trigger the CS response.





## The VC-to-PB-to-PVN neuronal circuit is activated by direct sensing of IL-1 $\beta$ in the VC

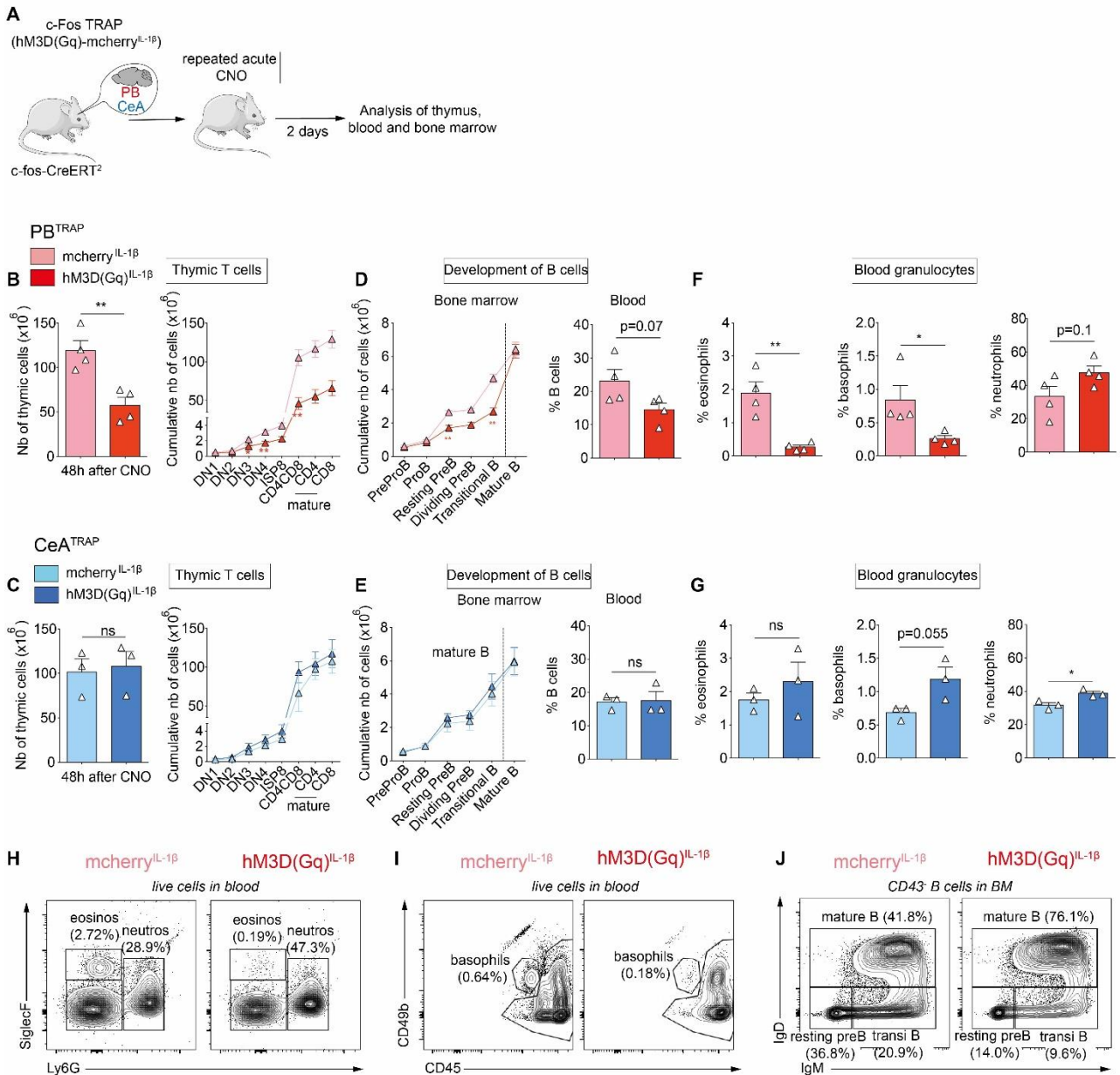
Most VC neurons that synapse with PB-to-PVN neurons were found in the NTS. As NTS neurons receive afferent inputs from vagus sensory neurons of the nodose ganglia, we assessed whether the nodose neurons of the vagus nerve activated the VC-PB-PVN pathway in response to IL-1 $\beta$ . First, we tested the effect of IL-1 receptor (IL1R1) depletion in vagus sensory neurons by the injection of a retrograde Cre-expressing AAV into the VC of IL1R<sup>fllox/fllox</sup> mice (**Figure S7A and S7B**). Strikingly, IL-1R depletion in vagus sensory neurons did not affect the IL-1 $\beta$ -induced CS response (**Figure S7C**), nor did it change c-Fos staining in the NTS, PB or PVN (**Figure S7D and S7E**). Similarly, full sections of the subdiaphragmatic vagus nerve (**Figure S7F and S7G**) did not prevent the CS response and c-Fos staining in the NTS in response to IL-1 $\beta$  (**Figure S7H, S7I and S7J**).

**FIGURE 7. The VC to PB circuit controls the corticosterone response via prostaglandins.** (A-C) IL1 $\beta$ -TRAP of VC neurons using a DREADD (hM3D(Gq)-mcherry) virus (A), and CS response induced by intraperitoneal CNO injection (B). Two-way ANOVA (p-values compared to mcherry<sup>IL-1 $\beta$</sup>  group). Representative images of IL-1 $\beta$ -TRAPed mcherry<sup>+</sup> neurons in hM3D(Gq) individuals restimulated with CNO in the VC (left), and mcherry<sup>+</sup> fibers projecting into the PB (right) (C). Scale bar is 200  $\mu$ m. (D-F) Selective labeling of VC-to-PB neurons with a DREADD (hM3D(Gq)-mcherry) virus (D), and CS response induced by intraperitoneal CNO injection (E). Two-way ANOVA (p-values compared to mcherry group). Representative images of VC-to-PB neurons in the VC (left), and mcherry<sup>+</sup> fibers projecting to the PB (right) (F). Scale bar is 200  $\mu$ m. (G-I) Selective labeling of VC-targeted PB-to-PVN neurons with a DREADD (hM3D(Gq)-mcherry) virus (G), and CS response induced by intraperitoneal CNO injection (H). Two-way ANOVA (p-values compared to mcherry group). Representative images of VC-targeted PB-to-PVN neurons and CNO-induced c-Fos in hM3D(Gq)-mcherry or mcherry controls (I). Scale bar is 200  $\mu$ m. (J) NF- $\kappa$ B pathway activation after intraperitoneal IL-1 $\beta$  injection in the AP, reported by GFP expression using NF- $\kappa$ Bs-GFP mice. Scale bar is 200  $\mu$ m. (K-L) Expression of endothelial Icam-1 (K) and Cox2 (L) together with GFP induced by NF- $\kappa$ B pathway activation in AP after IL-1 $\beta$  injection. Green arrows show GFP<sup>+</sup> perivascular cells. Yellow arrows show cox2 expression in GFP<sup>+</sup> cells. Scale bar is 200  $\mu$ m. (M) Blood CS levels following intraperitoneal treatment with Cox1/2 inhibitor Diclofenac, or saline (Sal), 20 min prior to IL-1 $\beta$  or Sal intraperitoneal injection. Two-way ANOVA (p-values comparing Sal/IL-1 $\beta$  and Diclofenac/IL-1 $\beta$  groups). (N-P) Calcium imaging of GCaMP7f-expressing PB-to-PVN neurons (N) following treatments with IL-1 $\beta$  and Diclofenac (O). Representative fluorescence signals before and after IL-1 $\beta$  or IL-1 $\beta$ +Diclofenac injections (P). Two-way Anova (p-values compared to saline group; n=14-24 represents brain hemispheres, 4-12 mice per group).

We next assessed whether the AP, a circumventricular area of the VC that is in contact with the blood circulation, is sensing IL-1 $\beta$  and activates the VC-to-PB-to-PVN circuit. In circumventricular organs, endothelial cells can respond to IL-1 $\beta$  and relay the activation signal to neurons via the production of prostaglandin PGE2 (Blatteis and Li, 2000). Using a GFP-expressing mouse line reporting the activation of the NF- $\kappa$ B pathway engaged by the IL-1R, we found IL-1 $\beta$ -induced GFP expression in the AP, and not in the NTS, as early as 3h after injection (Figure 7J). GFP<sup>+</sup> cells were located close to blood vessels and expressed Cox2, an enzyme required for the production of prostaglandins (Figure 7K and 7L). To test the contribution of the prostaglandin pathway to the CS response, we blocked Cox2 by intraperitoneal administration of the Cox inhibitor Diclofenac, and found a significant reduction in the CS response induced by IL-1 $\beta$  (Figure 7M). At the neuronal level, the IL-1 $\beta$ -evoked increase in calcium activity of the PB-to-PVN neuronal population was strongly reduced following Diclofenac administration (Figure 7N, 7O and 7P). Taken together, these data suggest that IL-1 $\beta$ -induced activation of perivascular cells in the AP triggers the release of prostaglandins to activate the VC-to-PB-to-PVN circuit and the CS response.

### **The PB-to-PVN circuit mediates an immunosuppressive feedback to the development of immune cells**

CS is the quintessential immunosuppressive hormone, produced to regulate the development of immune cells and the level of inflammatory responses, and is widely used as a drug to mitigate pathological inflammation. However, multiple checkpoints control the systemic activity of CS (Cain and Cidlowski, 2017), which might be engaged by the PB-to-PVN circuit. Thus, we assessed the impact of the CS response induced by the PB-to-PVN circuit on three well-described CS-sensitive developmental processes, the maturation of T cell precursors in the thymus (Tarcic et al., 1998), the maturation of B cell precursors in the bone marrow (Laakko and Fraker, 2002), and the production of granulocytes into the blood (Trottier et al., 2008).



**FIGURE 8. Activation of IL-1 $\beta$ -TRAPed neurons in the PB induces systemic immunosuppression.** (A) Procedure for labeling neurons activated by IL-1 $\beta$  in the PB (PB<sup>TRAP</sup>) or CeA (CeA<sup>TRAP</sup>), and restimulation of the neurons for 2 days with CNO. Thymic, blood and bone marrow (BM) cells were harvested, processed and analyzed by flow cytometry. (B,C) Total thymocyte numbers (left) and cumulative numbers of immature to mature thymocytes (right) in PB<sup>TRAP</sup> (B) or CeA<sup>TRAP</sup> (C) mice. DN: CD4CD8<sup>-</sup> double negative cells. ISP8: immature single-positive CD8 T cells. (D,E) Cumulative numbers of immature and mature B cells in the bone marrow (left), and frequency of B cells in the blood (right) of PB<sup>TRAP</sup> (D) or CeA<sup>TRAP</sup> (E) mice. (F,G) Frequency of eosinophils, basophils and neutrophils in the blood of PB<sup>TRAP</sup> (F) or CeA<sup>TRAP</sup> (G) mice. (H,I,J) Representative flow cytometry plots of immune cell populations in IL-1 $\beta$ -TRAPed expressing hM3D(Gq) or mcherry controls. For all experiments, one-way ANOVA was used (p-values as compared to mcherry<sup>IL-1 $\beta$</sup>  group). Results are representative of one of two independent experiments.

To this end, we activated IL-1 $\beta$ -TRAPed PB neurons for 2 days using DREADD stimulation of hMD3(Gq)-expressing neurons, before flow cytometry analysis of immune cells (**Figure 8A and Figure S8**). We observed significant thymus shrinking (**Figure 8B**), mostly due to the decrease in numbers of immature CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells. Bone marrow B cell precursors, in particular resting pre-B and transitional B cells, were reduced (**Figure 8D and 8J**), leading to a decrease in circulating B cells. Finally, the frequencies of eosinophils and basophils were significantly decreased in the blood (**Dunsky et al., 1979**), while neutrophil numbers compensated with a slight increase (**Figure 8F, 8H and 8I**). As a control, reactivation of IL-1 $\beta$ -TRAPed neurons in the CeA, which did not induce the CS response (**Figure 3G**), did not affect thymocyte, bone marrow or blood granulocyte cell numbers (**Figure 8C, 8E and 8G**).

Taken together, these results show that activation of the PB is sufficient in inducing CS-mediated systemic immunosuppression.

## DISCUSSION

We show here that the pro-inflammatory cytokine IL-1 $\beta$  induces a vigorous CS response via a novel neuronal circuit centered on the parabrachial nucleus (PB) of the brainstem. Perivascular cells in the area postrema (AP) of the vagal complex (VC) react directly to IL-1 $\beta$  from the periphery and release prostaglandins. In turn, prostaglandins initiate the activation of the circuit in the VC, which lead to the activation of PB neurons projecting to the paraventricular nucleus (PVN) of the hypothalamus to trigger the CS response. Remarkably, DREADD-mediated activation of PB neurons is sufficient to induce a vigorous CS response and, as a consequence, regulate the development of immune cells in the bone marrow and the thymus.

The PB integrates multiple sensory information from the periphery via the vagus nerve and the spinoparabrachial pathway, and coordinates diverse autonomic functions, such as fever, glycemia, pleasure and arousal, as well as behaviors associated with perceived danger (Barik et al., 2018; Campos et al., 2018; Chiang et al., 2019; Deng et al., 2020; Geerling et al., 2016). We show that the PB also integrates information on blood levels of pro-inflammatory cytokines in order to induce the CS response. Given the diversity of sensory inputs reaching the PB, the PB may not only induce the CS response according to the input from cytokines, but also regulates this response according to other types of inputs. Here, we did not detect a significant impact of neural pathways, namely the vagal and spinoparabrachial pathways, on the PB-mediated CS response, but it remains a possibility that neural pathways act in synergy to trigger a response by the PB. Furthermore, the PB activity may also be under the control of top-down cognitive inputs as well as neuromodulatory inputs, such as the locus coeruleus (Yang et al., 2021). Recent work has started to unravel the input-output diagram of the PB subcircuits, illustrating how PB subpopulations are wired from specific routed sensory inputs to specific brain outputs. For instance, SatB2<sup>+</sup> PB neurons were shown to relay gustatory inputs to the gustatory thalamus (Jarvie et al., 2021b), CGRP<sup>+</sup> PB neurons to integrate nociceptive, noxious and feeding inputs to induce aversive responses



(Campos et al., 2018; Palmiter, 2018), and Pdyn<sup>+</sup> and FoxP2<sup>+</sup> PB neurons to integrate noxious signals from the spinoparabrachial pathway to induce pain and nocifensive responses (Chiang et al., 2020; Geerling et al., 2016; Miller et al., 2012).

Here, we add another node of integration with a subpopulation of neurons in the PB integrating inflammatory signals to induce the CS response. To determine the extent of the functional overlap between these distinct PB subpopulations will require further mapping of PB neuronal subtypes. In the present study, we found that PB-to-PVN neurons do not overlap with CGRP<sup>+</sup> neurons. However, some PB-to-PVN neurons in the rostro-ventral part of the PB, receiving inputs from NTS neurons, expressed Foxp2 (Figure S5), even though they did not respond to noxious signals from the spinoparabrachial pathway (Figure S4). We also found a distinct and separate population of PB-to-PVN neurons, receiving inputs from the NTS, which did not express FoxP2 (Figure S5), indicating that there might be subsets of neurons with other brain targets in addition to the PVN, or even with different neuronal targets within the PVN, i.e. parvocellular and magnetocellular cells (Jhamandas et al., 1992).

Our finding of the PB as a relay of NTS signals to the PVN is surprising. It has been shown previously that catecholaminergic neurons of the medulla are necessary for the CS response to IL-1 $\beta$  and LPS (Bienkowski and Rinaman, 2008a; Chuluyan et al., 1992; Weidenfeld et al., 1989). Tyrosine hydroxylase (TH)-expressing neurons are found both in the rostroventral medulla (RVM) and the NTS (Bienkowski and Rinaman, 2008b; Ericsson et al., 1994; Hollis et al., 2005), and project directly to the PVN and to CGRP<sup>+</sup> neurons in the PBel (Hermes et al., 2006). Although we showed that, in our conditions, TH<sup>+</sup> NTS cells are poorly recruited by IL-1 $\beta$  (Figure S2A), our study does not allow to address the relative impact of the direct catecholaminergic NTS/RVM-to-PVN pathway compared to the NTS-to-PB-to-PVN pathway. In the future, it will be important to determine in which contexts these two distinct pathways are engaged to activate the CS response, their relative contribution in the amplitude and kinetic of the CS response, as well as their possible mutual regulation in neuronal output to the PVN.

Previous studies have shown that the NTS is a critical brain portal for inflammatory signals to induce the CS response (Marvel et al., 2004). As vagus afferents to the NTS are involved in cytokine-induced fever (Hansen et al., 2001), it has been suggested that the vagus nerve is similarly involved in the cytokine-induced CS response. Furthermore, it has also been proposed that high levels of cytokines in the blood and cerebrospinal fluid are directly sensed by circumventricular and perivascular organs, such as the PVN and the AP (Ericsson et al., 1994). In that context, endothelial cells expressing cytokine receptors respond by the activation of the NF- $\kappa$ B pathway and the production of PGE2 (Liu et al., 2019). In accordance with this view, activation of PVN neurons (Schiltz and Sawchenko, 2002; Zhang et al., 2003) and of the CS response (Elander et al., 2009; Parsadaniantz et al., 2000) by high doses of IL-1 $\beta$  or LPS injected into the peritoneum is affected by the inhibition of prostaglandin production, and is associated with increased expression of Cox2 and NF- $\kappa$ B transcripts in the AP (Gosselin and Rivest, 2008; Schiltz and Sawchenko, 2002). This view is supported by our data showing that (i) IL-1 $\beta$  activates the NF- $\kappa$ B pathway in perivascular cells of the AP, (ii) Cox2 is highly expressed in the AP, and (iii) IL-1 $\beta$ -induced activation of PB-to-PVN neurons is dependent on Cox activity. An appropriate loss-of-function approach would complement our study in order to determine the relative contribution of AP subpopulations in the activation of the CS response by IL-1 $\beta$  (Ericsson et al., 1997; Lee et al., 1998). In this regard, a recent functional genetic mapping of AP cell types revealed the key role of specific neuronal subpopulations in inducing nausea-like behaviors in response to visceral poisons (Zhang et al., 2020).

We show that the PB-centered pathway inducing the CS response is efficiently triggered by IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$ , as well as by the bacterial compound LPS that induces the production of these (type-3) cytokines by myeloid cells. In contrast, the CS response is poorly induced by (type-1) cytokines produced in response to viral and intracellular infections, such as IL-12 and IFN $\gamma$ , or in response to (type-2) cytokines produced in response to helminths or allergens, such as IL-33, IL-4 and IL-13. Of note, the vagus sensory neurons express cytokine receptors and amplifies pro-allergic responses in the lung through local release of neuropeptides (Chiu et

al., 2012). However, it is not known whether, in addition to these local neuro-immune interactions, information related to lung allergy is transmitted by the vagus to the NTS and subsequent brain circuits. Furthermore, the type I interferons IFN $\alpha$  and IFN $\beta$ , induced early in the response to cellular infections, do induce central responses, such as fever, but at a relatively low level as compared to IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  (Taves and Ashwell, 2020). This suggests that anti-microbial (type-3) responses are efficiently sensed by the brain, because they reflect a systemic danger to the individual to which the brain has to respond by concerted actions including fever, sickness behavior and the CS response. As an example of the lethality of uncontrolled type-3 immune responses, a septic shock mediated by LPS and the induction of IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  rapidly leads to multi-organ failure if not controlled by prompt anti-inflammatory measures (Kumar, 2018). IL-1 $\beta$  is processed from pro-IL-1 $\beta$  by the inflammasome, which is activated in the cytoplasm by the loss of cellular integrity (Martinon et al., 2009). It may therefore be proposed that cellular death and the dissemination of microbes or microbial compounds pose a considerable danger to the organism, to which the organism best responds by a systemic effort coordinated by the brain to orchestrate immune, metabolic and behavioral responses, in contrast to more local viral and parasitic infections.

In conclusion, we have discovered a novel pathway by which pro-inflammatory and anti-microbial cytokines induce the CS response. In this pathway, the PB plays a key role in the integration of pro-inflammatory signals and the activation of the PVN. As the PB is a key hub for interoceptive and exteroceptive sensory inputs to diverse autonomic outputs and behavioral responses, it is tempting to speculate that the PB integrates various pro-inflammatory and sensory inputs to regulate the CS response. In addition, pro-inflammatory input to the PB may intersect information from other brain regions, associated with environmental sensing and experience, in order to integrate multiple dimensions and optimize the amplitude and duration of the CS response. Thus, new approaches to regulate peripheral inflammation may be proposed that target the activity of the PB via the vagal complex to ultimately regulate the CS response.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We would like to thank Robert Dantzer (MD Anderson center) for sharing precious resources and advice, and his dedicated mentorship of F.J., Françoise Guinet (Institut Pasteur) for support on flow cytometry and analysis of immune cell populations, Lucie Peduto (Institut Pasteur) and Adam Benabid (Institut Pasteur), for Apotome microscopy.

This work was funded by the french Ministry of Higher Education and Research. Lledo's lab is supported by the Life Insurance Company AG2R-La Mondiale. Eberl's lab is supported by Inserm and Institut Pasteur.

## **AUTHOR CONTRIBUTION**

F.J., G.L., P-M.L and G.E. conceived the projects and designed the experiments. F.J. conceived and performed most of the experiments. G.L. performed calcium-recording experiments. M.P. and F.J. performed vagus nerve studies. K-K.C. provided the Rabies virus and helped with the virus tracing experiments. F.J analyzed the data. F.J., G.E. and G.L. wrote the paper.

## **DECLARATION OF INTERESTS**

The authors declare no competing interests

## STAR METHODS

### KEY RESOURCES TABLE

IHC Antibodies		
Mouse $\alpha$ -calcitonin gene-related peptide (CGRP)	Abcam	Ab81887
Mouse $\alpha$ -tyrosine hydroxylase (TH)	Immunostar	22941
Mouse $\alpha$ -protein kinase C-delta (PKC- $\delta$ )	BD Biosciences	610398
Rabbit $\alpha$ -c-Fos	Abcam	190289
Rabbit $\alpha$ -c-Fos	Millipore	ABE457
Rabbit $\alpha$ -corticotropin-releasing hormone (CRH)	Abcam	Ab185924
Rabbit $\alpha$ -GFP	Mol. Probes	A11122
Guinea Pig $\alpha$ -c-Fos	Synaptic Sys.	226004
Guinea Pig $\alpha$ -c-vasopressin (VP)	Peninsula Lab	T4037
Goat $\alpha$ -mcherry	Sicgen	AB0081
Goat $\alpha$ -Cox2	Abcam	Ab23672
Chicken $\alpha$ -GFP	Millipore	06896
Icam-1-PE	BD Biosciences	553253
Donkey anti-mouse AF647	Jackson IR	715-606-151
Donley anti-rabbit AF488	Jackson IR	711-546-152
Donkey anti-rabbit AF647	Jackson IR	711-605-152
Donkey anti-guinea pig AF488	Jackson IR	706-545-148
Donkey anti-goat AF568	Abcam	175704

Donkey anti-chicken AF488	Jackson IR	703-545-155
<b>Flow cytometry Antibodies</b>		
CD3-BV711	Biolegend	100349
B220-PeCy7	eBiosciences	25-0452-82
CD4-BV605	Biolegend	100548
CD8-BV786	SONY	1103650
CD25-APC	eBiosciences	17-0251-82
CD44-PE	eBiosciences	12-0441-83
SiglecF-PE	BD Biosciences	552126
Ly6G-PerCPCy5.5	BD Biosciences	560602
CD49b-FITC	eBiosciences	12-5971-82
CD45-PECF594	BD Biosciences	562420
Ly6C-BV605	BD Biosciences	563011
ckit-APC	eBiosciences	17-1172-81
CD16/32-PerCPCy5.5	SONY	1106620
CD115-PE	eBiosciences	12-1152-82
CD19-APCCy7	SONY	1177650
CD43-BV605	BD Biosciences	747726
CD24-FITC	BD Biosciences	553261
BP1-biotin	BD Biosciences	553159
IgD-BV421	SONY	2688625
IgM-PE	BD Biosciences	553409
CD16/CD32 monoclonal blocking antibody	Invitrogen	14-0161-82
DAPI	Invitrogen	D1306

<b>Bacterial and Virus Strains</b>		
AAV5-hSyn-DIO-mCherry (AAV-mcherry <sup>fllox</sup> )	Addgene	50449-AAV5
AAV5-hSyn-DIO-hM3D(Gq)-mCherry (AAV-hM3D(Gq)-mcherry <sup>fllox</sup> )	Addgene	44361-AAV5
AAV-pgk-Cre (AAVretro-Cre)	Addgene	24593-AAVretro
AAV-CMV-GFP (AAV-GFP)	Addgene	67634-AAV2
AAV-Ef1a-mcherry-IRES-Cre (AAVretro-mcherry or AAVretro-mcherry-IRES-Cre)	Addgene	55632-AAVretro
AAV-syn-FLEX-jGCaMP7f-WPRE (AAV-GCaMP7 <sup>fllox</sup> )	Addgene	104492-AAV9
AAV-hSyn-Cre-WPRE (AAV-Cre)	Addgene	105553-AAV1
AAV-FLEX-tdTomato (AAVretro-TdT <sup>fllox</sup> )	Addgene	28306-AAVretro
AAV-synP-FLEX-splitTVA-B19G (AAV-[G-TVA-GFP] <sup>fllox</sup> )	Addgene	52473-AAV1
SAD ΔG-mcherry (envA) (Rabies-EnvA- ΔG-mcherry)	Conzelmann's lab	N/A
AAV pEF1a-DIO-FLPo-WPRE-hGHpA (AAVretro-Cre <sup>FRT</sup> )	Addgene	87306-AAVretro
AAV1-EF1a-Flpo (AAV-Flip)	Addgene	55637-AAV1
<b>Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins</b>		
Mouse recombinant IL-1β	Biolegend	575102
Mouse recombinant TNF-α	Biolegend	575204
Mouse recombinant IL-33	Biolegend	580502

Mouse recombinant IL-4	Biologend	574302
Leaf anti-mouse IL-4	Biologend	504107
Mouse recombinant IL-13	Biologend	575902
Mouse recombinant IFN- $\gamma$	Biologend	575704
Mouse recombinant IL-12	Biologend	577004
E.coli-derived Lipopolysaccharide (LPS)	Sigma	L2654
4-hydroxytamoxifen (4-OHT)	Sigma	H6278
Clozapine N-oxide (CNO)	Sigma	C0832
Capsaicin	Sigma	M2028
Castor oil	Sigma	259853
Sunflower oil	Sigma	S5007
Shandon Tissue-marking dye	Thermofisher	10830020
Diclofenac sodium salt	Sigma	D6899
Normal donkey serum	Abcam	7475
Lithium chloride	Sigma	203637
<b>Critical Commercial Assays</b>		
Mouse corticosterone competitive elisa	ThermoFischer	EIACORT
<b>Experimental Models: Strains</b>		
C57BL6/J	Charles River	N/A
c-Fos-CreERT <sup>2</sup> or Fos <sup>tm2.1(cre/ERT2)Luo/J</sup>	Jackson Lab	030323
IL1R <sup>loxP</sup> or B6.129(Cg)-il1r1 <sup>tm1.1Rbl/J</sup>	Jackson Lab	028398
NF- $\kappa$ Bbs-GFP or FVB.Cg-Tg(HIV-EGFP,luc)8Tsb/J	Jackson Lab	027529



Vagotomized mice (VGX)	This paper	N/A
<b>Software and Algorithms</b>		
Adobe Illustrator 2015	Adobe	N/A
ImageJ 2018	Free (NIH)	N/A
ICY software	Free (Pasteur)	N/A
FlowJo V10	BD Biosciences	N/A
PRISM 6 and 8	GraphPad	N/A
Spike2 9	CED, UK	N/A

## **CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING**

For any request regarding reagents or resources, please contact [gerard.eberl@pasteur.fr](mailto:gerard.eberl@pasteur.fr)

## **EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS**

Experimental procedures were conducted under the strict regulatory compliance of protocols approved by the Committee for Ethics in Animal Experimentation (CETEA) [DAP180080 and DAP200025]. Eight to twelve weeks old wild-type C57BL6/J mice were purchased from Charles River and let to accommodate in our conventional mouse facility for 1-2 weeks before experiments. Both males and females were used in our experiments but most of corticosterone responses were measured in females for more clarity in the amplitude of the response and to avoid dominance effects on the stress response. The transgenic c-Fos-CreERT2 mice (030323) were purchased from Jackson Laboratories and backcrossed twice to C57BL6/J animals in our animal facility. Only c-Fos-CreERT2 heterozygous mice were used in our experiments. IL1RloxP (028398) and NF- $\kappa$ B-GFP (027529) transgenic mice were used as homozygous and kept under the same genetic background. Before all experiments, mice were habituated to handling and to sham intraperitoneal injections.

## METHOD DETAILS

### Cytokine and neuromodulator preparation

For all experiments, when not mentioned otherwise, IL-1 $\beta$  was injected intraperitoneally at 0.5 or 1 $\mu$ g/mouse, depending on the batch of cytokine, which we titrated by measuring the corticosterone response they induced. For other cytokines or endotoxins, the following doses were used: TNF- $\alpha$ , 2 $\mu$ g/mouse; IL-33, 5 $\mu$ g/mouse; IL-13, 5 $\mu$ g/mouse; IFN- $\gamma$ , 5 $\mu$ g/mouse; IL-12, 5 $\mu$ g/mouse; LPS, 10 $\mu$ g/mouse. To be active, IL-4 (2 $\mu$ g) was premixed to anti-IL-4 (10 $\mu$ g) 1min before dilution with saline (Finkelman et al., 1993). All cytokines were diluted in a sterile saline solution.

Capsaicin (Sigma, M2028) was resuspended in 100% DMSO at 10mg/mL and 10 $\mu$ g in 30 $\mu$ L saline were injected subcutaneously into the ear pinnae or skin of the back (final 3% DMSO).

### Drug preparation

Clozapine N-oxide (Sigma, C0832) was dissolved in DMSO at 50mg/mL and stored at -20°C until use. The day of the experiment, CNO was diluted into saline and injected intraperitoneally at 1mg/kg (2% DMSO final).

4-hydroxytamoxifen (Sigma, H6278) was dissolved in ethanol at 10mg/mL by shaking at 37°C for 30 min and stored at -20°C until use. The day of the experiment, aliquots were shaken at 37°C for 30 min to resuspend 4-OHT precipitates. The 4-OHT was added to the same volume of a 1:4 mixture of castor oil (Sigma, 259853):sunflower oil (Sigma, S5007) and vigorously shaken for 5 minutes. The ethanol was then evaporated by vacuum centrifugation for 2-3 hours. The final 10mg/mL was further diluted in oil to obtain a 2mg/mL solution, injected intraperitoneally at 20mg/kg.

Diclofenac (Sigma, D6899) was dissolved in water at 15mg/mL by shaking for 15min at RT, prior to each experiment. The following stock was further diluted in saline for injection intraperitoneally at 5mg/kg.

Lithium chloride (Sigma, 203637) was dissolved in water (0.3M) and injected intraperitoneally

at 120mg/kg.

### **Blood sampling and corticosterone measurements**

For blood analyses, the extreme tip of the mouse's tail was cut and the blood was collected 2-3 times until 10 $\mu$ L of blood were obtained. Importantly for corticosterone measurements, random sampling rotations within the cage were performed to avoid time-dependent biases in corticosterone levels. Throughout the course of the experiment, mice were always kept in their homecage in the same room, and stressful cues such as noise were reduced to the minimum. Corticosterone was measured in 5 $\mu$ L plasma, following the manufacturer's instructions (ThermoFisher, EIACORT). Of note, corticosterone is unbound from its carrier proteins using a 1:1 premix with a dissociation reagent. For this reason, we decided to express the concentration of corticosterone in the dissociative mix (2-fold dilution compared to the plasma concentration).

### **Subdiaphragmatic vagotomy**

Mice were anesthetized by intraperitoneal administration of 150mg/kg ketamine and 5mg/kg xylazine. A 10mm skin incision was made left to the linea alba below the diaphragm. The liver and stomach were pulled aside to expose the two vagus nerve trunks, lining along the esophagus. After carefully detaching the vagus nerve from its connective tissue, a small section (~5mm) was excised from both branches. Muscle and skin layers were sutured and post-operative analgesia was maintained for 5 days using 0.1mg/kg buprenorphine.

### **Stereotaxic injections of viral vectors**

Mice were anesthetized by intraperitoneal administration of 150mg/kg ketamine and 5mg/kg xylazine. Post-operative analgesia was maintained for 5 days using 0.1mg/kg buprenorphine. Mice were placed onto the stereotaxic apparatus and the glass pipet was calibrated based on the lambda/bregma coordinates following Franklin and Paxinos' guidelines (The mouse brain in stereotaxic, 5<sup>th</sup> edition, 2019). A volume of 150nL was bilaterally infused (2nL.s<sup>-1</sup>) at the

sites of craniotomy and using the following coordinates (in mm):

CeA AP -1.3, ML  $\pm$  2.7, DV(Bregma) -4,8; NTS AP -7,5, ML  $\pm$  0.4, DV(Dura) -3.5; PVN AP -0.7, ML 0.2, DV(Bregma) -4.8; PB AP -4,9 ML  $\pm$  1.5 DV(Bregma) -3.7 ;BST AP +0.15 ML  $\pm$ 1.1 DV(Bregma) -4.2. Here are listed viral vectors (source): AAV5-hSyn-DIO-mCherry (Addgene), AAV5-hSyn-DIO-hM3D(Gq)-mCherry (Addgene), AAV-pgk-Cre (Addgene), AAV-CMV-GFP (Addgene), AAV-Ef1a-mcherry-IRES-Cre (Addgene).

### **In vivo calcium recording with fiber photometry**

Consecutive to injection of conditional GCaMP7f-expressing AAV vectors into the PB, optic fibers (multimode,  $\emptyset$  430  $\mu$ m, NA 0.5, LC zirconia ferrule) were bilaterally implanted at the site of virus injection and fixed to the skull with a liquid bonding resin (Superbond, Sun Medical) and dental acrylic (Unifast). Two weeks later, GCaMP7f-expressing neurons were chronically excited with a 473nm solid-state laser (Crystal Lasers) via a 430 $\mu$ m multimode optical fiber (output intensity < 0.1mW) and GFP signal was collected by the same fiber, filtered through a dichroic mirror and filter (MDF-GFP, Thorlabs), and then focused on a NewFocus 2151 Femtowatt photodetector (Newport). Blue light reflected in the light path was also filtered and measured with a second amplifying photodetector (PDA36A; Thorlabs). The signals from the two photodetectors were digitized by a digital-to-analog converter (Micro3 1401, CED, UK) at 5000 Hz and then ~~the~~ recorded using Spike2 9 software (CED, UK).

A typical recording session included 4h of baseline measurements, followed by 6h post-saline injections and another 6h post-IL-1 $\beta$ . Recordings with low fluorescence signals (mean fluorescence < 0.15mV and/or spontaneous events in  $\Delta F/F < 1\%$ ) or displaying movement/laser artefacts (visible in the reflected blue light channel) were discarded from the analysis. For analysis of fluorescence signals, the raw GCaMP7f signal traces from each detector was first smoothed (smoothing window = 1s) and then used to calculate a continuous  $\Delta F/F$ , defined as  $[F(t) - F_0(t)]/F_0(t)$ , where  $F(t)$  is the raw smoothed GCaMP7f signal trace and  $F_0(t)$  is the mean fluorescence intensity within sliding window (20s) centered on time  $t$ .

To extract spontaneous calcium transient with the same threshold in all individuals

independently of their  $\Delta F/F$  amplitude, we calculated a z-score-normalized fluorescence  $F'$ , defined as  $[F(t)-F_0(t)]/\sigma(t)$ , where  $\sigma(t)$  is the standard deviation of the  $\Delta F/F$  signal in a sliding window (100s) centered on time  $t$ . From this z-score-normalized fluorescence  $F'$ , all the events above 3SD were automatically extracted with custom scripts (Spike2, CED, UK; minimum time interval, 10s) and the peak amplitude of each event was then extracted from the  $\Delta F/F$  signal. The frequency of the sorted spontaneous events was then reported as the number of events per unit of time (20 min) and normalized to the 2-hour baseline activity before treatment (baseline set to 1). For the mean fluorescence analysis, the row GCaMP7f signal traces were downsampled (0.5Hz), smoothed (100s), averaged every 20 minutes and normalized to the 2-hour baseline mean fluorescence before treatment.

## **Histology and immunostaining**

Mice were perfused transcardially with phosphate buffered saline (PBS), 2 min, followed by 4% paraformaldehyde (PFA), 7-10 min. Dissected brains were post-fixed for 2 hours in PFA, rinsed twice in PBS for 6h and placed in PBS containing 30% sucrose for at least 24h. 60 $\mu$ m-floating sections were obtained using a freezing microtome (Leica). For brain hemisphere identification, a black tissue marking dye (Thermofisher, 10830020) was used to detect the right hemisphere on brain sections. The sections of interest were stored in PBS with 0.01% azide until use.

For immunostaining, brain sections were first permeabilized/blocked with a 0.2% Triton X-100 (PBS-Triton)/10% Normal Donkey Serum (NDS, Abcam, Ab7475) solution for 2h at room temperature. Primary antibodies were diluted in PBS-Triton containing 3% NDS and 1% bovine serum albumin (BSA) and incubated with brain sections for 48-72h at 4°C. The following dilutions of antibodies were used:  $\alpha$ -CGRP (1:500),  $\alpha$ -TH (1:4000),  $\alpha$ - PKC- $\delta$  (1:1000),  $\alpha$ -c-Fos (1:2000),  $\alpha$ -CRH (1:500),  $\alpha$ -VP (1:2000),  $\alpha$ -mcherry (1:2000),  $\alpha$ -GFP (1:2000),  $\alpha$ -cox2 (1:100),  $\alpha$ -icam-PE (1:500).

Brain sections were rinsed twice with PBS and further stained with Alexa-conjugated  $\alpha$ -mouse,  $\alpha$ -rabbit,  $\alpha$ -guinea pig,  $\alpha$ -goat,  $\alpha$ -chicken secondary antibodies (1:1000) in PBS-Triton 2% NDS

for 2h at room temperature. DAPI stain (1:10000, Thermofisher, D1306) was used in the first of three PBS washes before sections were mounted on slides with FluoroMount-G (Interchim). All steps were carried under constant agitation.

### **Image processing and analysis**

Images of immunostained brain sections were acquired with an apotome microscope (Zeiss) using the 10 or 20X objectives. Z-stack of 10-steps and 30 $\mu$ m-thick were performed and projected as the maximum fluorescence intensity onto a XY plan to obtain the final images. The same parameters of gain and time exposure were used within one experiment. Quantification analyses were automatized using the “spot detector” function of ICY software. For co-expression analyses, c-Fos was detected by ICY while markers such as CGRP, PKC- $\delta$ , TH, mcherry or GFP were manually counted because of distinct subcellular localization. Quantification analyses were performed blind.

### **Flow cytometry**

Organs were harvested and maintained in DMEM medium (Gibco, 31966) on ice until processing. Single-cell suspensions were obtained by grinding the thymus or by flushing out the bone marrow content with a 1mL syringe, and passing the cells through a 70 $\mu$ m filter. Red blood cells were lysed for 1min (bone marrow and thymus) or 5min (blood) with ACK lysis buffer (Gibco, A1049201), followed by blocking unspecific Fc $\gamma$ R binding with anti-CD16/32 for 10 min (Invitrogen, 14-0161-82, not used for bone marrow myeloid cells). Next, cell surface markers were stained for 30min on ice using specific antibody cocktails at the following dilutions:

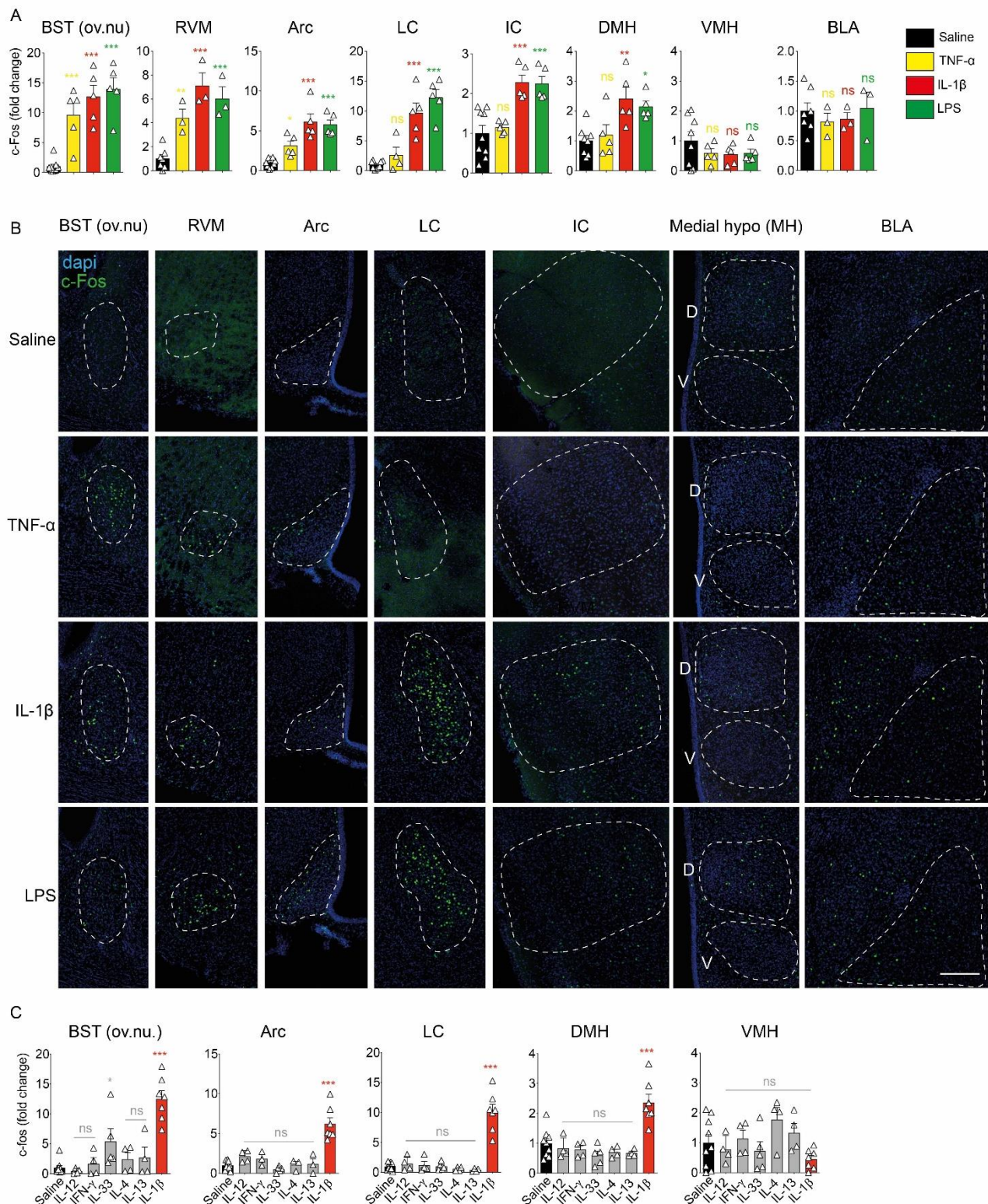
CD3-BV11 (1:100), B220-PeCy7 (1:200), CD4-BV605 (1:200), CD8-BV786 (1:200), CD25-APC (1:200), CD44-PE (1:200), SiglecF-PE (1:200), Ly6G-PerCPCy5.5 (1:200), CD49b-FITC (1:200), CD45-PECF594 (1:400), Ly6C-BV605 (1:200), ckit-APC (1:200), CD16/32-PerCPCy5.5 (1:200), CD115-PE (1:200), CD19-APCCy7 (1:200), CD43-BV605 (1:50), CD24-FITC (1:200), BP1-biotin (1:100), IgD-BV421 (1:200), IgM-PE (1:200). Dead cells were stained

with DAPI (1:10000, Invitrogen, D1306) before acquisition on a BD LSRFortessa. Data analysis was performed on FlowJo V10.

### **Quantification and statistical analysis**

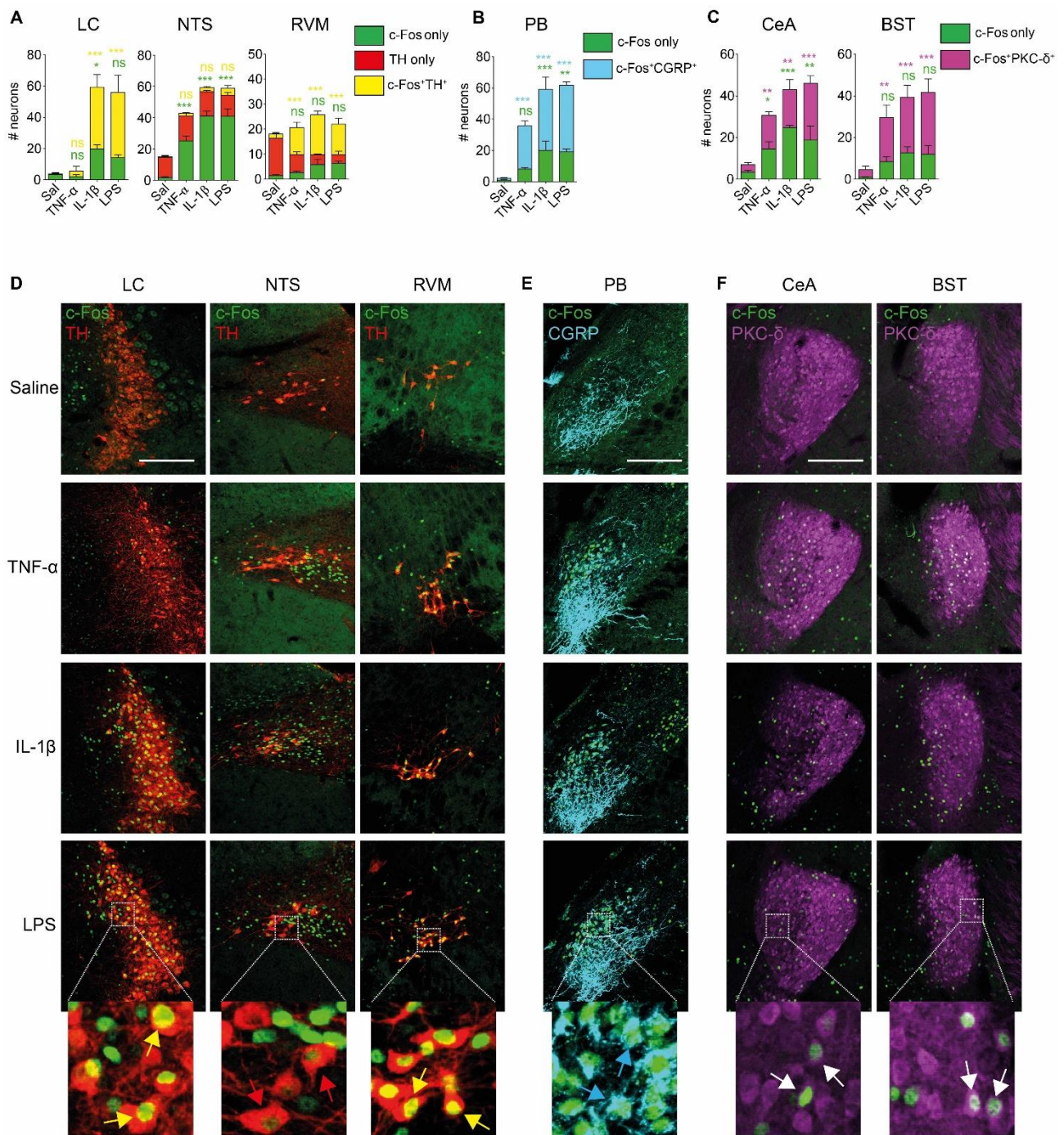
All experimental data were analyzed with the Prism v8 software. Sample normality was tested using the non-parametric Kolmogorov-Smirnov or Shapiro-Wilk statistical tests before analyzing each dataset. The adapted two-sided tests that were used are mentioned within each Figure. All data are expressed as mean  $\pm$ SEM and statistical significance is represented by p-values as follow: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ .



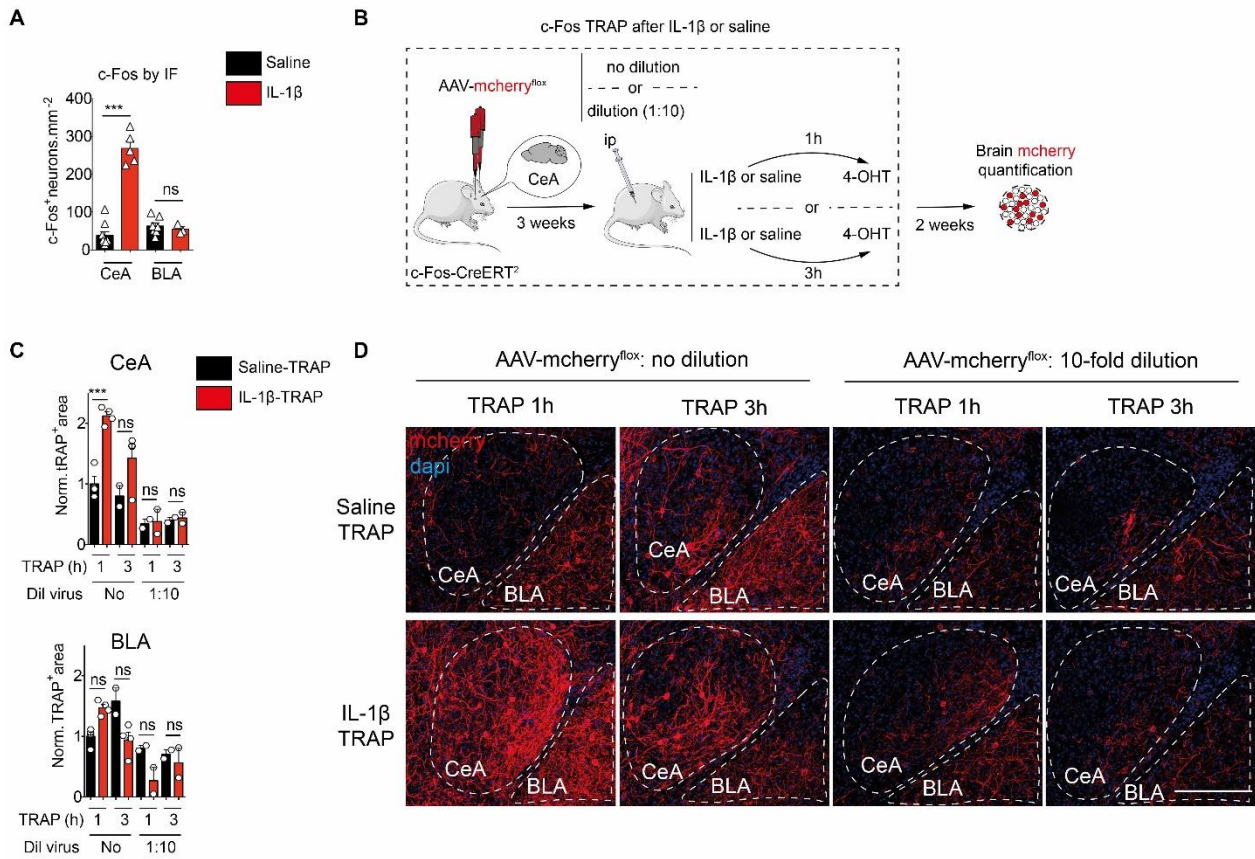


**FIGURE S1. Secondary brain regions activated by type-3 but not type-1 and 2 cytokines.** (A) Density of c-Fos<sup>+</sup> neurons after injection of type-3 cytokines or LPS, and expressed as a fold change relative to the saline injected control condition. Arc: arcuate nucleus. BLA: basolateral amygdala. BST: bed nucleus of the stria terminalis (ov.nu: oval nucleus). DMH: dorsomedial hypothalamus IC: insular cortex. LC: locus coeruleus. RVM: rostro-ventral medulla. VMH: ventromedial hypothalamus. One-way ANOVA (p-values compared to saline; each dot represents one mouse, mean of counts in both brain hemispheres). (B) Representative images of c-Fos expression by immunofluorescence. Scale bar is 200  $\mu$ m. (C) Density of c-Fos<sup>+</sup> neurons after injection of type-1 and 2 cytokines, and expressed as a fold change relative to the saline injected control condition. The IL-1 $\beta$  condition is re-used as a positive control.



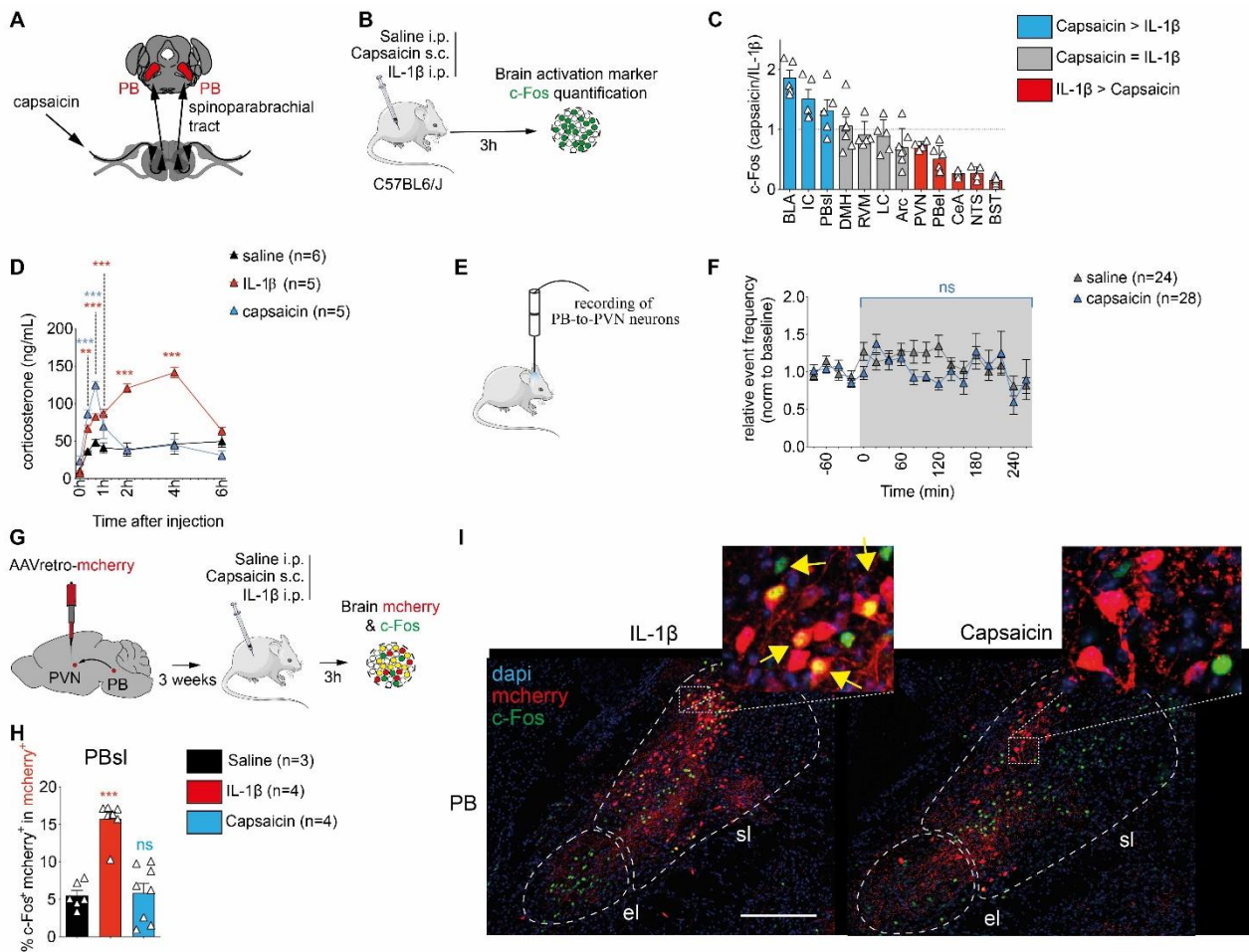


**FIGURE S2. Type-3 cytokines activate neuronal subpopulations driving sickness behaviors.** (A and D) Activation of noradrenergic TH<sup>+</sup> neurons in the LC, NTS and RVM after type-3 cytokines or LPS injection. Number of c-Fos<sup>+</sup>, TH<sup>+</sup> or c-Fos<sup>+</sup>TH<sup>+</sup> neurons (n=3 mice per group, mean of counts in both brain hemispheres) (A). Total TH<sup>+</sup> neurons in LC are too abundant and were not counted. Representative images showing TH<sup>+</sup> (red) and TH<sup>+</sup>c-Fos<sup>+</sup> (yellow) neurons (D). (B and E) Activation of CGRP<sup>+</sup> neurons in the PB after type-3 cytokines or LPS injection. Number of c-Fos<sup>+</sup>, CGRP<sup>+</sup> or c-Fos<sup>+</sup>CGRP<sup>+</sup> neurons (n=3 mice per group, mean of counts in both brain hemispheres) (B). Total CGRP<sup>+</sup> neurons in PB are too abundant and were not counted. Representative images showing CGRP<sup>+</sup>c-Fos<sup>+</sup> (blue) neurons (E). (C and F) Activation of PKC- $\delta$ <sup>+</sup> neurons in the CeA and BST after type-3 cytokines or LPS injection. Number of c-Fos<sup>+</sup>, PKC- $\delta$ <sup>+</sup> or c-Fos<sup>+</sup>PKC- $\delta$ <sup>+</sup> neurons (n=3 mice per group, mean of counts in both brain hemispheres) (C). Total PKC- $\delta$ <sup>+</sup> neurons in CeA and BST are too abundant and were not counted. Representative images showing PKC- $\delta$ <sup>+</sup>c-Fos<sup>+</sup> (white) neurons (F). Scale bar is 200  $\mu$ m for all pictures. For all statistical tests, two-way ANOVA was used (p-values compared to saline).

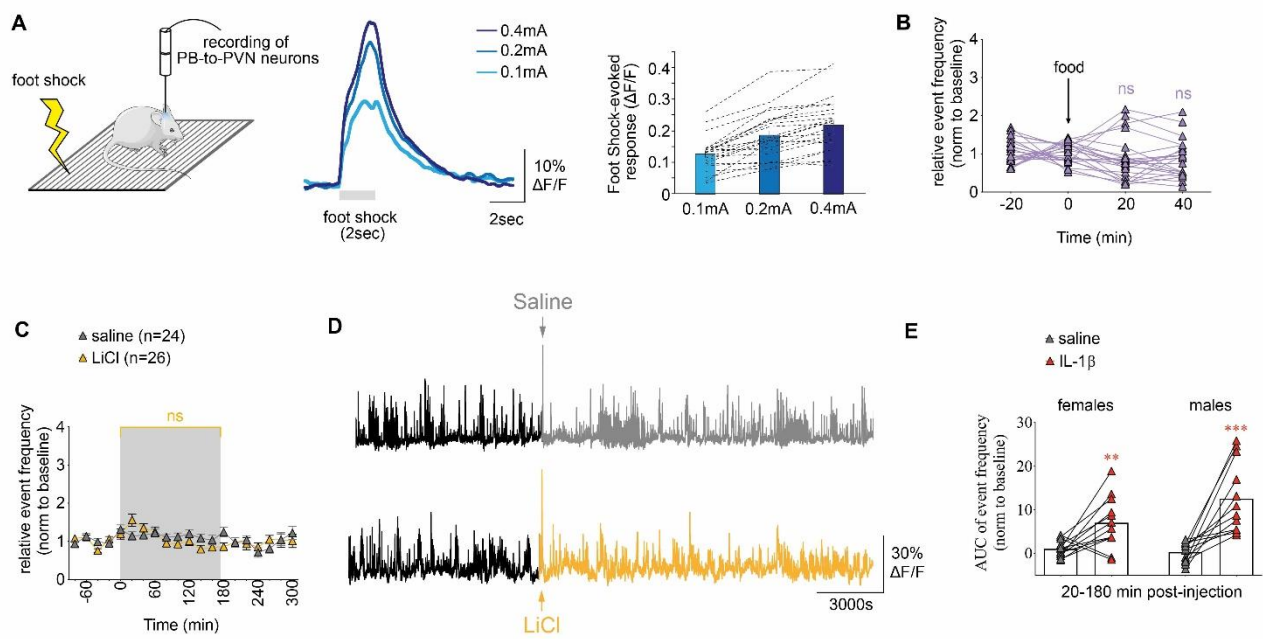


**FIGURE S3. Calibration of the neuronal TRAP induced by type-3 immune signals.** (A) Density of c-Fos<sup>+</sup> neurons in the CeA and BLA, 3h following IL-1 $\beta$  injection (adapted from Figure 1). One-way ANOVA (p-values as compared to saline). (B) Procedure for testing the effect of injection into the CeA of AAV-hM3D(Gq)-mcherry virus at  $7 \times 10^{12}$  VG/mL (no dilution) or  $7 \times 10^{11}$  VG/mL (10-fold dilution) and labeling of neurons with 4-hydroxytamoxifen (4-OHT), either 1h or 3h after saline or IL-1 $\beta$  injection. (C) Quantification of the IL-1 $\beta$ -TRAPed mcherry<sup>+</sup> area. The area is normalized by the « saline-TRAP, no dilution, 1h » condition. One-way ANOVA (p-values compared to the saline-TRAP of the same condition; one dot is one injected brain hemisphere, mean of counts of two images). (D) Representative images of saline (upper part) or IL-1 $\beta$ -TRAP (lower part) mcherry<sup>+</sup> neurons in the amygdala. Scale bar is 200 $\mu$ m.

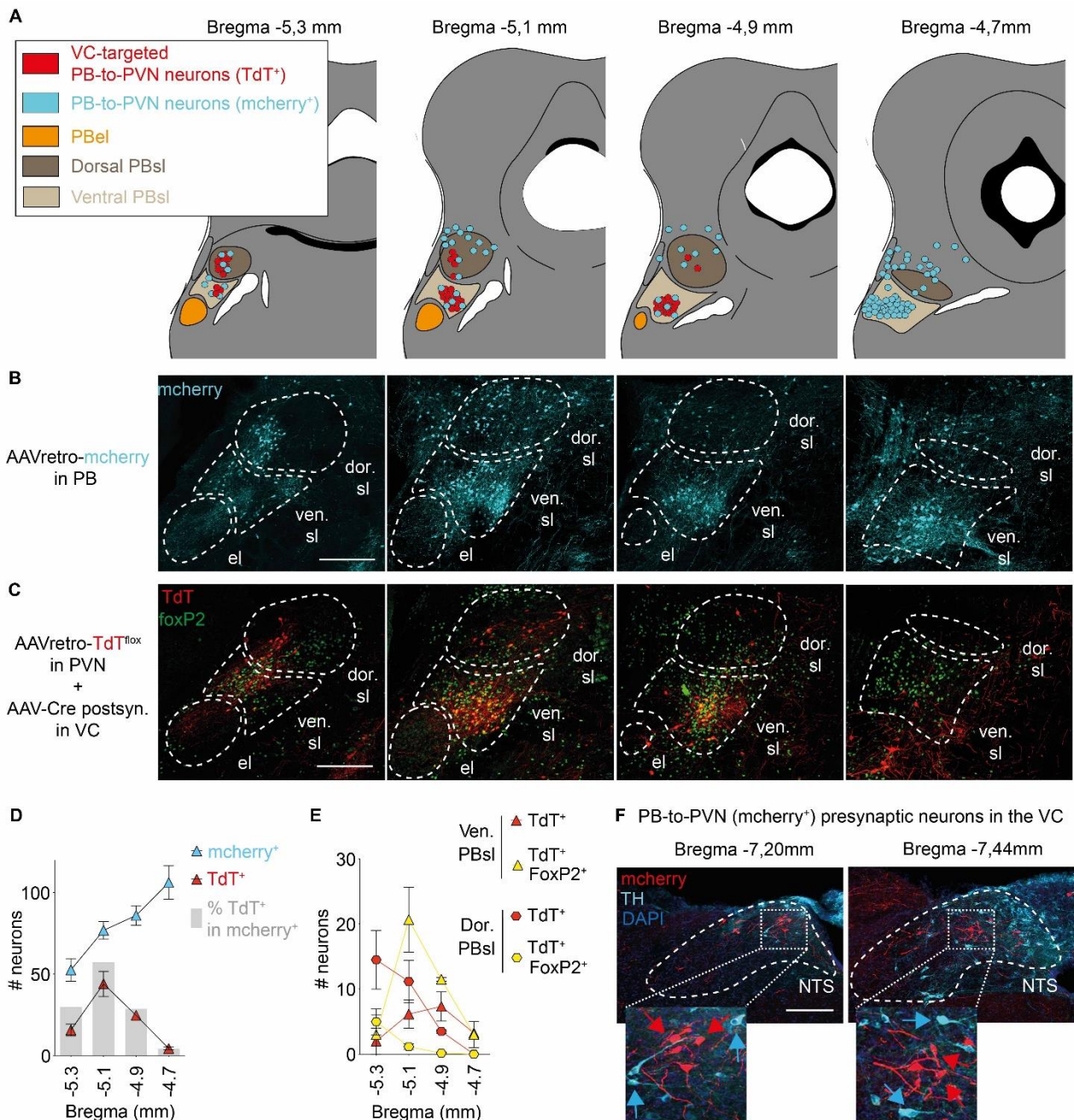




**FIGURE S4. Calcium responses of PB-to-PVN neuronal population to additional chemical stimuli.** (A-B) Calcium recording of GCaMP7f-expressing PB-to-PVN neurons (left), and their representative calcium transients following foot shocks of increasing intensities (0.1mA, 0.2mA and 0.4mA) (right). (B) Calcium event frequency of PB-to-PVN neurons induced by exposing mice to a food pellet, 12h after food deprivation (n=24 single-recorded brain hemispheres). (C) Calcium event frequency of PB-to-PVN neurons induced by intraperitoneal injection of lithium chloride (LiCl). Two-way ANOVA (p-values compared to saline injection; n represent single-recorded brain hemispheres). (D) Representative spiking activity of PB-to-PVN neurons after LiCl or saline injections. (E) Area Under the Curve (AUC) of integrated event frequency of PB-to-PVN spiking activity from 20min to 180min post-injection of IL-1 $\beta$  in males and females. T-tests (p-values compared to saline injection).

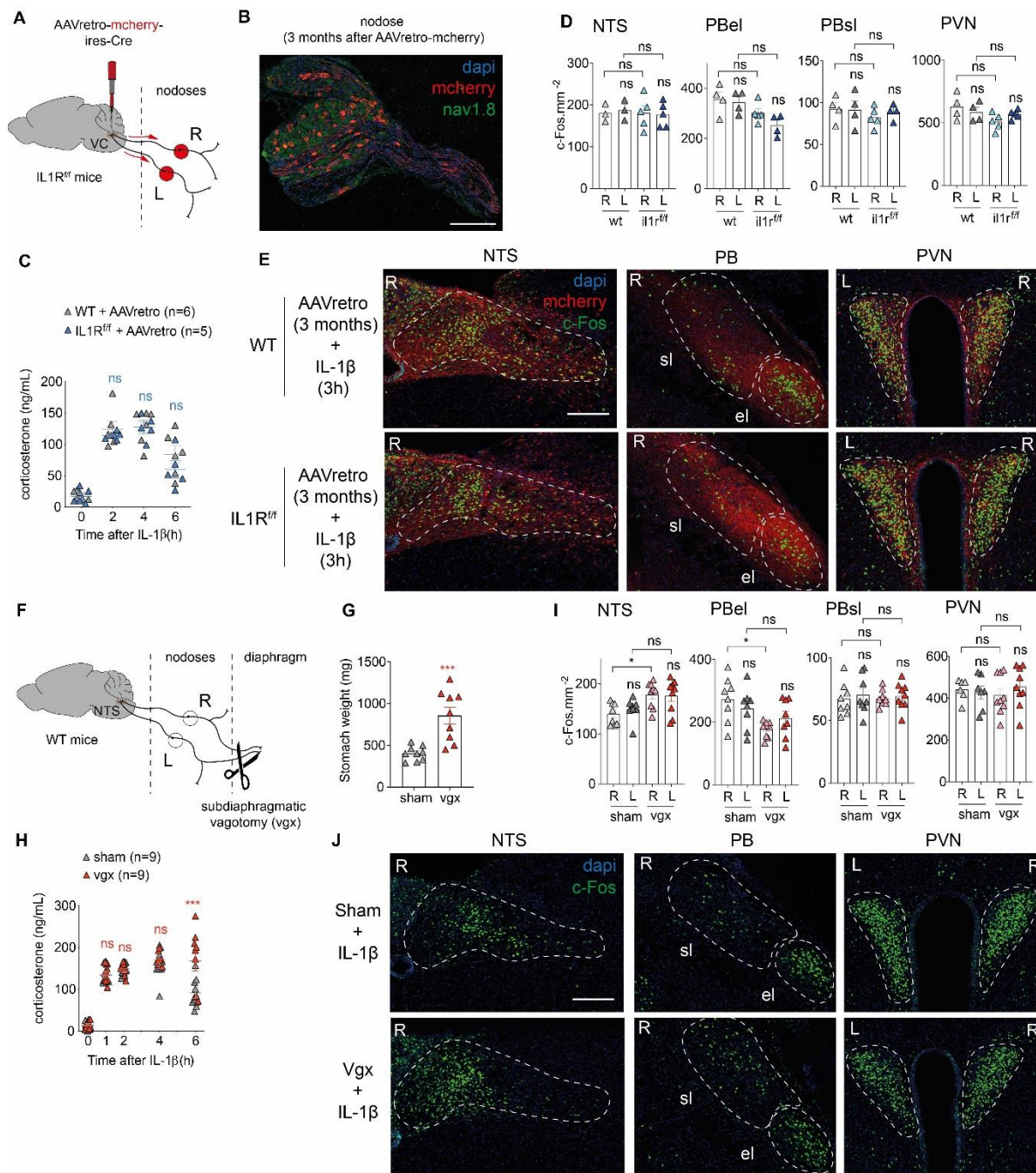


**FIGURE S5. IL-1 $\beta$ -induced activation of PB-to-PVN neurons poorly relies on the spinoparabrachial pathway.** (A) Pathway of the spinoparabrachial, which conveys pain after a subcutaneous capsaicin challenge. (B) Assessment of c-Fos neuronal expression following injection with saline or IL-1 $\beta$  in the peritoneum, or with capsaicin subcutaneously, as a positive control for spinoparabrachial recruitment. (C) Relative expression of c-Fos in capsaicin versus IL-1 $\beta$ -injected mice. Blue and red bars show brain regions that are respectively best activated by capsaicin or IL-1 $\beta$  (n=5 mice per group, mean of counts in both brain hemispheres). (D) Blood corticosterone levels following injection of saline, IL-1 $\beta$  or capsaicin. Two-way ANOVA (p-values compared to saline). (E-F) Calcium recording of GCaMP7f-expressing PB-to-PVN neurons (E) following treatment with subcutaneous injection of capsaicin or saline control. Two-way ANOVA (p-values compared to saline; n represent single-recorded brain hemispheres). (G) Assessing c-Fos activation of PB-to-PVN neurons by saline, IL-1 $\beta$  or capsaicin. (H) Frequency of saline, IL-1 $\beta$  or capsaicin-induced c-Fos in PB-to-PVN mcherry<sup>+</sup> neurons. One-way ANOVA (p-values compared to saline; one dot is one virus-injected brain hemisphere). (I) Representative images of PB-to-PVN mcherry<sup>+</sup> neurons and c-Fos expression induced by IL-1 $\beta$  and capsaicin. Yellow arrows show mcherry<sup>+</sup>c-Fos<sup>+</sup> neurons. Scale bar is 200  $\mu$ m.

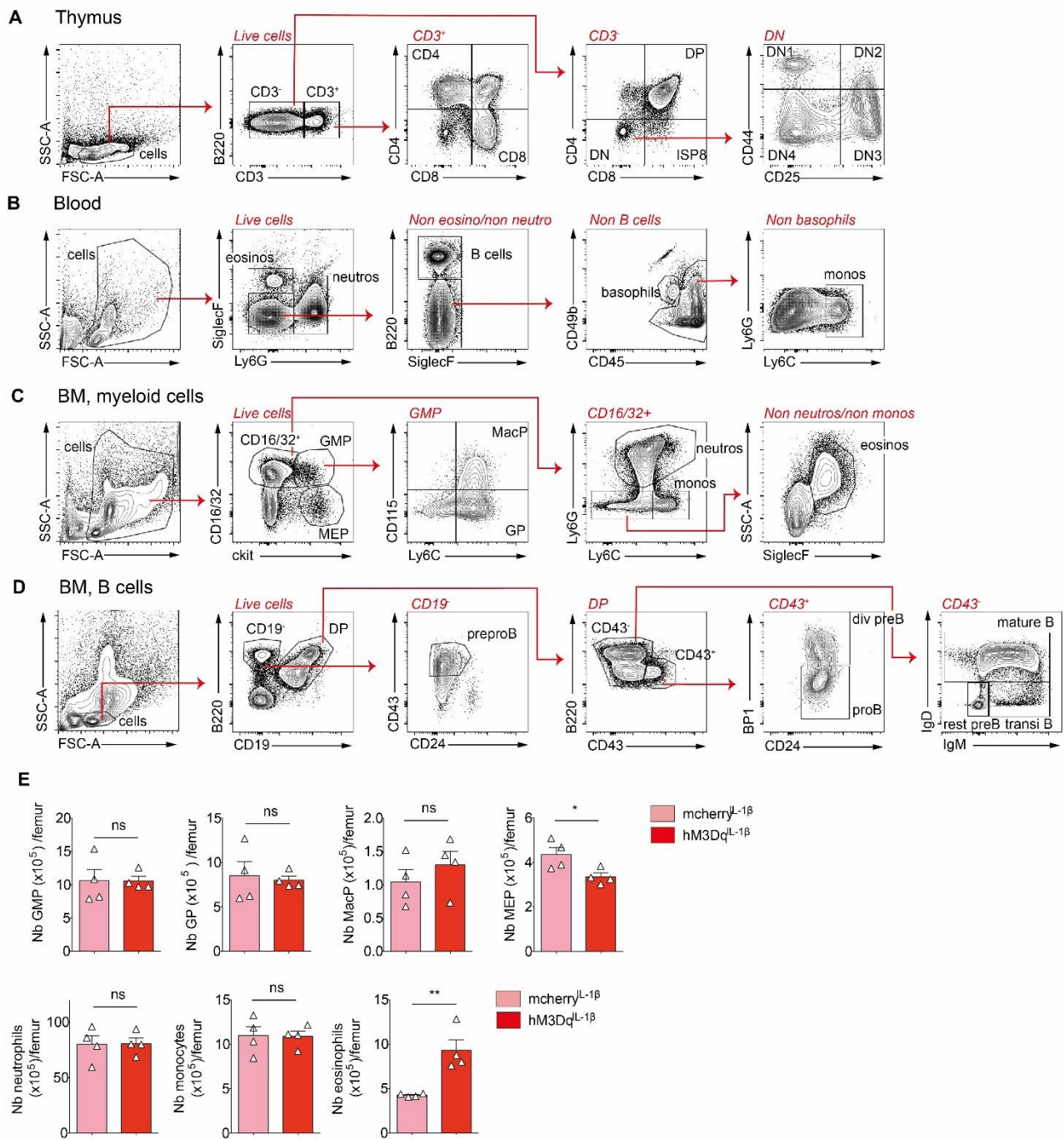


**Figure S6. Spatial distribution of PB neurons relaying signals from the VC to the PVN.** (A) Representative drawing of the PB along the rostrocaudal axis (from Bregma -5,3mm to Bregma -4,7mm), with the distribution of PB-to-PVN neurons (mcherry<sup>+</sup>) or, within this population, neurons that are necessarily postsynaptic to VC neurons (TdT<sup>+</sup>, VC-targeted PB-to-PVN neurons). Drawing and coordinates are adapted from Paxinos atlas. (B and C) Representative images of PB-to-PVN mcherry<sup>+</sup> (B) or TdT<sup>+</sup> VC-targeted PB-to-PVN neurons (C) in the ventral and dorsal parts of the PBsl, and along the rostrocaudal axis. Scale bar is 200  $\mu$ m. (D) Number of PB-to-PVN (mcherry<sup>+</sup>) or VC-targeted PB-to-PVN neurons (TdT<sup>+</sup>) along the rostrocaudal axis of the PB. The proportion of TdT<sup>+</sup> within mcherry<sup>+</sup> is represented (grey bars) (mcherry<sup>+</sup> n=7 mice, TdT<sup>+</sup> n=3 mice, mean of counts in both brain hemispheres). (E) Number of foxP2<sup>+</sup> VC-targeted PB-to-PVN neurons (yellow) in the ventral or dorsal parts of the PBsl (n=3 mice, mean of counts in both brain hemispheres). (F) Rabies-EnvA- $\Delta$ G-mcherry viruses infect only PB-to-PVN neurons expressing G and TVA proteins («starter neurons») and retrogradely label mcherry<sup>+</sup> presynaptic neurons in the NTS, which are distinct from tyrosine hydroxylase (TH)<sup>+</sup> catecholaminergic neurons. Red and cyan arrows depict the mcherry<sup>+</sup> and TH<sup>+</sup> neurons respectively. Scale bar is 200  $\mu$ m.





**Figure S7. The VC to PB-to-PVN circuit is not dependent on the vagus nerve.** (A) Strategy to flox out the IL1R1 receptor in vagus sensory neurons located within the nodose ganglia. (B) Representative image of a nodose 3 months after AAVretro-mcherry injection into the NTS. Neurons lacking IL1R1 are mcherry<sup>+</sup> and coexpress the sensory neuron marker nav1.8. Scale bar is 200  $\mu$ m. (C) Corticosterone (CS) blood levels in response to IL-1 $\beta$  in mice lacking the IL1R1 in vagus sensory neurons (IL1Rf/f +AAVretro) or controls (WT +AAVretro). Two-way ANOVA (p-values compared to WT). (D) Density of c-Fos<sup>+</sup> neurons in the NTS, PB and PVN after IL-1 $\beta$  injection in WT or IL1Rf/f mice. R: right brain hemisphere; L: left brain hemisphere. One-way ANOVA (p-values compared to right hemisphere if not specified; one dot is one mouse). (E) Representative images of IL-1 $\beta$ -induced c-Fos and mcherry expression in the NTS, PB and PVN. Scale bar is 200  $\mu$ m. (F, G and H) Subdiaphragmatic vagotomy (VGX) (F) was performed 2 months before measuring stomach weight (G) and determining blood CS levels in response to IL-1 $\beta$  (H). Two-way ANOVA (p-values compared to sham). (I) Density of c-Fos<sup>+</sup> neurons in the NTS, PB and PVN after IL-1 $\beta$  injection in sham and VGX mice. R: right brain hemisphere; L: left brain hemisphere. One-way ANOVA (p-values compared to right hemisphere if not specified; one dot is one mouse). (J) Representative images of IL-1 $\beta$ -induced c-Fos in the NTS, PB and PVN. Scale bar is 200  $\mu$ m.



**FIGURE S8: Minor effects of corticosterone on myeloid lineages.** (A, B, C and D) Gating strategy for immune cell populations within the thymus (A), blood (B) and bone marrow (BM) (C,D). Two panels were used to detect myeloid cells (C) and B cells (D) in the BM. DN: double negative; eosinos: eosinophils; neutros: neutrophils; monos: monocytes; GMP: granulocyte-macrophage progenitor; MEP: megakaryocyte-erythroid progenitor; GP: granulocyte progenitor; MacP: macrophage progenitor. DP: CD19<sup>+</sup>B220<sup>+</sup> B cells; div: dividing; rest: resting. Transi: transitional. (E) Number of precursors (upper part) and mature immune cells (lower part) per femur of IL-1 $\beta$ -TRAPed mice, which were treated with CNO for 2 days. One-way ANOVA (p-values as compared to mcherry<sup>IL-1 $\beta$</sup>  group).

# RESUMÉ

Le sepsis se définit comme une réponse immunitaire dérégulée de l'hôte face à une infection, qui entraîne une dysfonction d'organe mettant en jeu le pronostic vital. Dans 70% des cas, les patients développent une encéphalopathie qui augmente significativement la létalité et se caractérise par des lésions cérébrales essentiellement localisées dans le tronc cérébral et l'amygdale, régions contrôlant respectivement les réponses neurovégétative et comportementale à l'inflammation. Parmi les patients survivant au sepsis, près de la moitié développe dans les mois à années suivant leur hospitalisation de graves séquelles psychiatriques telles que des troubles de l'anxiété, de dépression et des syndromes de stress post-traumatique (SSPT). Bien que les récents progrès de diagnostic et de réanimation aient permis une diminution de la mortalité, l'incidence du sepsis ne cesse d'augmenter et rend d'autant plus importante la recherche de stratégies préventives pour lutter contre les séquelles qu'il engendre.

Au cours de mon travail de thèse, j'ai cherché à établir un lien de causalité entre les phénomènes neuronaux ayant lieu lors de l'encéphalopathie liée au sepsis et les modifications pathologiques du comportement à long-terme. Pour répondre à cet enjeu, j'ai utilisé un modèle murin de sepsis par ligature et ponction caecale (CLP).

Dans une première étude, nous avons montré que le sepsis induit une activation transitoire d'une sous-population neuronale du noyau central de l'amygdale (CeA) qui projette vers la partie ventrale du noyau du lit de la strie terminale (vBNST). En combinant des techniques de traçage viral à de l'imagerie calcique *in vivo*, nous avons observé que le sepsis provoque des changements persistants de la connectivité et de la réponse fonctionnelle des neurones de la CeA projetant vers le vBNST. L'inhibition transitoire et ciblée de cette sous-population uniquement pendant la phase aiguë du sepsis avec le médicament antiépileptique Levetiracetam, ou avec une approche pharmacogénétique, prévient le développement ultérieur des comportements de type anxiété ou SSPT.

Dans une seconde étude, nous avons souhaité évaluer la contribution du nerf vague pendant le sepsis dans le recrutement du circuit responsable des séquelles comportementales. La réalisation préalable d'une chirurgie de vagotomie sous-diaphragmatique limite l'activation pathologique transitoire du complexe vagal et du BNST dans les heures suivant la CLP et réduit les séquelles anxiodépressives à long-terme.

L'ensemble de ces résultats démontrent que l'activation pathologique transitoire de certains circuits amygdaliens induite par le sepsis – et probablement médiée par le nerf vague – entraîne des altérations durables des propriétés anatomiques et fonctionnelles de ces neurones, responsables des modifications comportementales observées post-sepsis.