

Faculté de médecine et médecine dentaire

Constitution de la cohorte contrôle de l'étude clinique PLACCSEPS

[Évaluation prospective de l'état de phosphorylation de l'acétyl-CoA Carboxylase plaquettaire au cours du choc septique].

Auteur : Campion Alessandro
Promoteur·rices : Pr. C. Beauloye et Dr M. Dechamps
Lecteur·rices : Pr. P. Hantson, Pr. D.Z. Castanares
Année académique 2019 - 2020
3^{ème} Master en médecine.

J'adresse mes sincères remerciements à mes promoteurs, Dr Dechamps et Pr Beauloye, qui, par leur patience et détermination, ont permis que ce mémoire prenne forme et aboutisse selon les objectifs établis initialement. Tels de vrais guides, ils m'ont fait confiance et inculqué la rigueur que la science demande.

À la faculté de médecine qui m'a fait grandir tout au long de ce parcours, merci de proposer à ses apprentis ce défi qu'est la rédaction d'un mémoire de recherche clinique et scientifique.
Chers lecteurs, sans qui cela n'aurait pas de sens, j'espère vous apporter un manuscrit auquel vous y trouverez intérêt. Je vous souhaite bonne lecture.

En dernier, mais non des moindres ! Je remercie chaleureusement ma famille, Alice et mes amis, de leur présence et bienveillance.
J'en suis fier et j'espère qu'ils savent déjà l'estime que je leurs porte.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé – Abstract	3
I. Introduction	5
Partie 1. Sepsis et choc septique	6
I. Définitions et prise en charge	6
II. Épidémiologie du sepsis	9
Partie 2. Le thrombocyte au sein du choc septique	12
I. Inflammation et état pro-thrombotique lié à la physiopathologie du choc septique	12
II. Analyses biologiques de la coagulation sanguine	14
Partie 3. La voie métabolique AMPK - ACC dans le choc septique	16
I. L'Acétyl-Coenzyme A Carboxylase.....	16
II. Système de régulation (voies activatrices et inhibitrices)	17
Type 1. Régulation locale	17
Type 2. Régulation allostérique	17
Type 3. Régulation hormonale.....	18
Type 4. Contrôle adaptatif (génétique)	18
III. Hypothèse de travail.....	18
II. Objectifs	20
III. Matériel et méthodes	22
A. Type d'étude	23
B. Conception des bases de données et méthodes statistiques	23
C. Protocole de recrutement et recueil du consentement libre et éclairé.....	25
D. Types de prélèvements.....	26
E. Paramètres.....	27
IV. Résultats	29
IV.1. Analyse de la cohorte rétrospective Chocs Septiques.....	30
IV.2. Etablissement des caractéristiques de la cohorte contrôle	31
IV.3 Comparaison des caractéristiques des trois cohortes	32
IV.4 Etude de la variabilité des résultats biologiques (de la cohorte Contrôle).....	33
IV.5 Analyse de l'état de phosphorylation de l'ACC (de la cohorte Contrôle)	34
V. Discussion et perspective	36
VI. Bibliographie et références	45

RÉSUMÉ

AVANT PROPOS

Ce mémoire étudie la voie métabolique spécifique : AMP-activated protein kinase — Acétyl CoA Carboxylase (AMPK – ACC) de la plaquette sanguine, dans le contexte de choc septique. À savoir un état physiopathologique comprenant une hyperactivation du phénotype inflammatoire systémique, et une altération du système hémostatique. L'ACC un rôle primordial dans la lipogenèse, et ce tant de manière systémique qu'au sein du thrombocyte. En effet, la première étape qui engage la lipogenèse de manière irréversible est déterminée par celle-ci. La voie métabolique AMPK-ACC est une des voies de régulations, cette dernière serait modifiée dans des conditions de sepsis sévère.

L'ACC plaquettaire, participe de manière déterminante à l'activation plaquettaire, notamment par les voies LOX (précurseur de Prostaglandines) et COX (précurseur du Thromboxane A₂), *deux acides gras circulaires* d'une part ; et d'autre part par la formation directe de phospholipides membranaires.

OBJECTIFS

Le but précis de ce mémoire prospectif, relié à l'étude clinique PLACCSEPS, est de recruter et constituer une cohorte Contrôle définitive pour intégrer ladite étude. Une fois la cohorte contrôle clôturée, nous analyserons le taux de phosphorylation de l'ACC plaquettaire (pACC) vis-à-vis des principales comorbidités et caractéristiques démographiques composant la cohorte Contrôle.

MÉTHODES

La cohorte Contrôle comportera in fine 53 patients. Elle doit répondre à certains critères de fiabilités et d'intérêts d'analyses pour intégrer l'étude clinique. *Ceci est développé dans les sections adéquates.* Elle devra présenter les mêmes caractéristiques démographiques qu'une cohorte rétrospective de 150 patients ayant séjourné aux soins intensifs des CUSL pour choc septique. La cohorte Contrôle doit avoir des paramètres biologiques de base normaux ou correspondants à leurs comorbidités.

RÉSULTATS et CONCLUSIONS

La cohorte contrôle est pertinente, ce par les diverses caractéristiques que présentent les patients qui la compose. Cette cohorte intégrera l'étude clinique PLACCSEPS comme initialement prévu.

En ce qui concerne le taux de pACC au sein de la cohorte Contrôle, nous avons détecté au sein de la comorbidité : Pathologies cardio-vasculaires (cardiopathies +/- HTA, diabète) la moyenne du taux de pACC plaquettaire 1.34 AU [IC (95%) : 0.92 - 1.76] est significativement plus élevée par rapport au groupe sans aucune comorbidité 0.853 AU [IC (95%) : 0.41 - 1.29] ; et ce de manière statistiquement significative (p-value < 0.05).

Il n'y a pas différence statistiquement significative au sein des autres diverses caractéristiques démographiques étudiées (*exemple : IRC, BPCO, > 70 ans, patients oncologiques*). *Bien que certaines tendances aient été observées (voir manuscrit).*

Mots Clés / Key words :

Thrombocytes, inflammation systémique, adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), Acétyl-Coenzyme A Carboxylase (ACC), cyclooxygénase (COX), thromboxane A₂ (TXA₂).

ABSTRACT

PREFACE

This thesis studies the specific metabolic pathway: AMP-activated protein kinase - Acetyl CoA Carboxylase (AMPK - ACC) of the blood platelet, in the context of septic shock. Namely, a pathophysiological state including a hyperactivation of the systemic inflammatory phenotype, and an alteration of the hemostatic system. ACC plays a key role in lipogenesis, both systemically and within the thrombocyte. In fact, the first step which irreversibly engages lipogenesis is determined by ACC. The AMPK-ACC metabolic pathway is one of the regulatory pathways, which would be modified under conditions of severe sepsis.

On the one hand, platelet ACC plays a decisive role in platelet activation, in particular via the LOX (prostaglandin precursor) and COX (precursor of Thromboxane A2) pathways, *two circular fatty acids*, and on the other hand, by the direct formation of membrane phospholipids.

AIMS

The specific aim of this prospective dissertation, linked to the PLACCSEPS clinical study, is to recruit and constitute a definitive control cohort to integrate the said study. Once the control cohort is closed, we will analyze the platelet ACC phosphorylation rate (pACC) regarding the main comorbidities and demographic characteristics making up the Control cohort.

METHODS

The Control cohort must meet certain criteria of reliability and interest in analyzes to integrate the clinical study. It will have to present the same demographic characteristics regarding a retrospective database of 150 patients who have been in intensive care at the CUSL for septic shock. The Control cohort must have normal basic biological parameters *or corresponding to their comorbidities*.

RESULTS AND CONCLUSIONS

The control cohort is relevant because of the various characteristics presented by the patients who compose it. This cohort will join the PLACCSEPS clinical study as initially planned.

Regarding the pACC level. We have detected within the co-morbid : Cardiovascular pathologies (heart disease +/- HTA, diabetes) an average of the platelet pACC level 1.34 AU [CI (95%): 0.92 - 1.76] significantly higher compared to the group without any co-morbidity 0.853 AU [CI (95%): 0.41 - 1.29] ; and this in a statistically significant way (p-value <0.05).

There is no statistically significant difference within the other various demographic characteristics studied making up the control cohort (*example: CKD, COPD, > 75 years, oncological patient*), *although certain trends have been observed (see the manuscript)*.

I. INTRODUCTION

Partie 1 — Sepsis et choc septique

I. Définitions et prise en charge

La septicémie ⁽¹⁾ est définie comme la présence d'une bactériémie, abondante et répétée, avec des manifestations systémiques de l'infection, sans défaillance d'organe. La septicémie en tant que tel est un terme obsolète qui a été remplacé par « bactériémie (ou fongémie) associée à un sepsis ».

La bactériémie ⁽¹⁾ est le passage d'une bactérie dans le sang, diagnostiquée par des hémocultures (HC) positives, qu'elle soit asymptomatique ou avec répercussions cliniques. Dans la majorité des cas, le choc septique est provoqué par une bactérie, mais un choc septique d'origine fongique (à Candida, ...), virale ou parasitaire existe.

⁽²⁾ Dans le cadre du choc septique, le syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS) est intéressant à mentionner, de fait il permet, via les signes cliniques précoces, une prise en charge plus appropriée. Ce qui influence le pronostic du patient. On notera que **12.1%** des patients ne présenteront pas un SIRS avant le sepsis ⁽³⁾.

^(1, 3) Le choc septique est défini théoriquement comme une hypotension, induite par un sepsis sévère, persistante, malgré un remplissage adéquat (liquidien) massif en réanimation et nécessitant la mise en place d'un support (les aminés) vasopresseur ; ou une concentration sanguine en lactate de ≥ 2 mmol/L témoin de l'hypoxie tissulaire et l'hypoperfusion périphérique.

^(1, 3) Cliniquement, on le définit comme une pression artérielle systolique (PAS) < 90 mmHg ou pression artérielle moyenne (PAM) < 70 mmHg, avec un lactate ≥ 2 mmol/L (traduisant une hypoperfusion tissulaire) et/ou d'oligurie (avec souvent comme signe d'association : altération de l'état de conscience et/ou vasoconstriction cutanée).

⁽³⁾ [Table 1] Précision quant aux critères diagnostics et à la définition du choc septique :

Variables Générales / Systémiques

- Fièvre ($> 38^{\circ}\text{C}$) ou hypothermie ($< 36^{\circ}\text{C}$)
- Tachypnée et fréquence cardiaque $> 90/\text{min}$, ou plus de 2 SD au-dessus de la valeur normale (% âge). Ce critère peut être absent chez le patient hypothermique.
- Altération de l'état de conscience
- Œdème significatif ou un bilan hydrique positif ($> 20\text{mL/kg}$ en 24h)
- Hyperglycémie (plasma glucose $> 140\text{ mg/dL}$) en absence de diabète

Variables de l'inflammation - Leucocytose (comptage $> 12\,000\ \mu\text{L}^{-1}$ ou leucopénie ($< 4000\ \mu\text{L}^{-1}$) ou un comptage des blancs normal avec $> 10\%$ cellules immatures - Un taux plasmatique de la Protéine C-réactive > 2 SD par rapport à la valeur normale. - Un taux plasmatique de la Procalcitonine > 2 SD par rapport à la valeur normale.
Variable Hémodynamique et perfusion des tissus - Hypotension artérielle ($\text{PA}_s < 90\ \text{mmHg}$, PA moyenne $< 70\ \text{mmHg}$, ou une PA_s diminuée de $> 40\ \text{mmHg}$ chez les adultes ; moins de 2 SD par rapport à la PA normale (% âge) - Hyperlactatémie ($> 1\ \text{mmol/L}$) - Diminution de la charge capillaire ou marbrures visibles cliniquement
Variable traduisant une dysfonction d'organe - Hypoxémie à la gazométrie artérielle : ($\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2 < 300$) - Oligurie d'apparition récente (Débit urinaire $< 0.5\ \text{mL/kg/h}$ pendant au moins 2h de remplissage adéquat). - Majoration du taux de Créatinine $> 0.5\text{mg/dL}$ - Iléus - Troubles de la coagulation ($\text{INR} > 1.5$ ou $\text{TCA} > 60\ \text{sec}$). - Thrombocytopénie (Taux de plaquettes $< 100\,000\ \mu\text{L}^{-1}$) - Hyperbilirubinémie (taux plasmatique de bili. Tot $> 4\text{mg/dL}$)

⁽³⁾ Adapté de Singer, M., et al. (2016). The 3^d International Consensus Def. for Sepsis and Septic Shock. JAMA.

(2, 3, 4) Devant un tableau de choc septique, une fois le patient admis aux soins intensifs (USI), il faut évaluer la sévérité du choc. Afin de déterminer le pronostic et surtout pour une prise en charge adéquate. Notamment en utilisant l'APACHE II, le score SOFA, ainsi qu'en évaluant d'autres critères dont la thrombocytopénie liée au sepsis :

Définition du Choc Septique sévère = sepsis induisant une hypoperfusion ou une dysfonction d'au moins un organe (l'un des signes suivants est dû à l'infection) :
- Sepsis induit une hypotension - Taux de plaquettes $< 100\,000\ \mu\text{L}$ - Coagulopathie (international normalized ratio (INR) > 1.5) - Taux de lactate supérieur aux limites de laboratoire - Débit urinaire $< 0.5\ \text{mL/kg/h}$ pendant au moins 2h de remplissage adéquat - Lésion pulmonaire aigüe, avec une $\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2 < 250$ en absence de pneumonie comme source d'infection ; ou avec une $\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2 < 200$ en présence de pneumonie comme source d'infection. - Créatinine $> 2.0\ \text{mg/dL}$

⁽³⁾ Adapté de Singer, M., et al. (2016). The 3^d International Consensus Def. for Sepsis and Septic Shock. JAMA.

- ⁽⁵⁾ APACHE II (« Physiologie aiguë et évaluation de la santé chronique II ») est un système de classification de la gravité de la maladie. Il est calculé systématiquement d'emblée à l'admission en USI. Un score entier de 0 à 71 est calculé sur plusieurs mesures. Il est basé sur des mesures physiologiques, sur certains événements médicaux antérieurs ainsi que l'âge.
- ⁽³⁾ Le SOFA [**Table 1**] *page suivante* (Sepsis-related Organ Failure Assessment) est un score de gravité en USI, et à la base de la définition du sepsis et du choc septique, basé sur de nombreux éléments cliniques & paracliniques. Ce score s'appuie sur six sous-catégories, repris par les systèmes biologiques vitaux, à savoir : le système respiratoire, neurologique, cardiovasculaire, hépatique, rénal et la coagulation.

[Table 2] Le score SOFA :

System	Score				
	0	1	2	3	4
Respiration					
PaO ₂ /Fio ₂ , mm Hg (kPa)	≥400 (53.3)	<400 (53.3)	<300 (40)	<200 (26.7) with respiratory support	<100 (13.3) with respiratory support
Coagulation					
Platelets, ×10 ³ /μL	≥150	<150	<100	<50	<20
Liver					
Bilirubin, mg/dL (μmol/L)	<1.2 (20)	1.2-1.9 (20-32)	2.0-5.9 (33-101)	6.0-11.9 (102-204)	>12.0 (204)
Cardiovascular	MAP ≥70 mm Hg	MAP <70 mm Hg	Dopamine <5 or dobutamine (any dose) ^b	Dopamine 5.1-15 or epinephrine ≤0.1 or norepinephrine ≤0.1 ^b	Dopamine >15 or epinephrine >0.1 or norepinephrine >0.1 ^b
Central nervous system					
Glasgow Coma Scale score ^c	15	13-14	10-12	6-9	<6
Renal					
Creatinine, mg/dL (μmol/L)	<1.2 (110)	1.2-1.9 (110-170)	2.0-3.4 (171-299)	3.5-4.9 (300-440)	>5.0 (440)
Urine output, mL/d				<500	<200

Abbreviations: Fio₂, fraction of inspired oxygen; MAP, mean arterial pressure; PaO₂, partial pressure of oxygen.

^a Adapted from Vincent et al.²⁷

^b Catecholamine doses are given as μg/kg/min for at least 1 hour.

^c Glasgow Coma Scale scores range from 3-15; higher score indicates better neurological function.

⁽³⁾ M. S, et al. (2016). *The 3^d int. Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)*. JAMA.

⁽⁶⁾ Le Syndrome de Dysfonctionnement d'Organes Multiples (ou MODS) est une conséquence organique du choc septique. Développons ici sa terminologie et sa définition car cette dernière peut induire en erreur. Le MODS (à minima deux systèmes impactés) est présent chez des patients dont l'homéostasie ne peut être conservée sans support médical et/ou interventionnel immédiat *et continu*. Ces insuffisances d'organes sont la conséquence du décours physiopathologique de l'état septique, mais ils n'étaient pas impliqués dans l'étiologie de l'admission en USI. La récupération d'une fonction physiologique normale des systèmes est possible chez le survivant ; *D'où le terme MOF (Multiple Organ Failure) à éviter aujourd'hui*. Dans la définition du MODS, le terme « organe » doit être abordé de manière synthétique. C'est-à-dire que les systèmes immuns, hématologique et/ou endocrinien peuvent être atteints et ceux-ci sont considérés comme « organes » / entité propre.

La prise en charge du sepsis sévère du diagnostic au traitement sort du cadre du sujet de recherche.^(1, 2, 7, 8) Le diagnostic du choc septique est essentiellement clinique comme démontré dans les définitions ci-dessus. La prise en charge s'articule sur 2 axes essentiels : la correction hémodynamique et la stabilisation du patient d'une part ; et le traitement contre l'infection d'autre part. À ce jour, à part les traitements de supports, il n'y a pas de traitements spécifiques qui aient été intégrés dans les guidelines.

II. Épidémiologie du sepsis

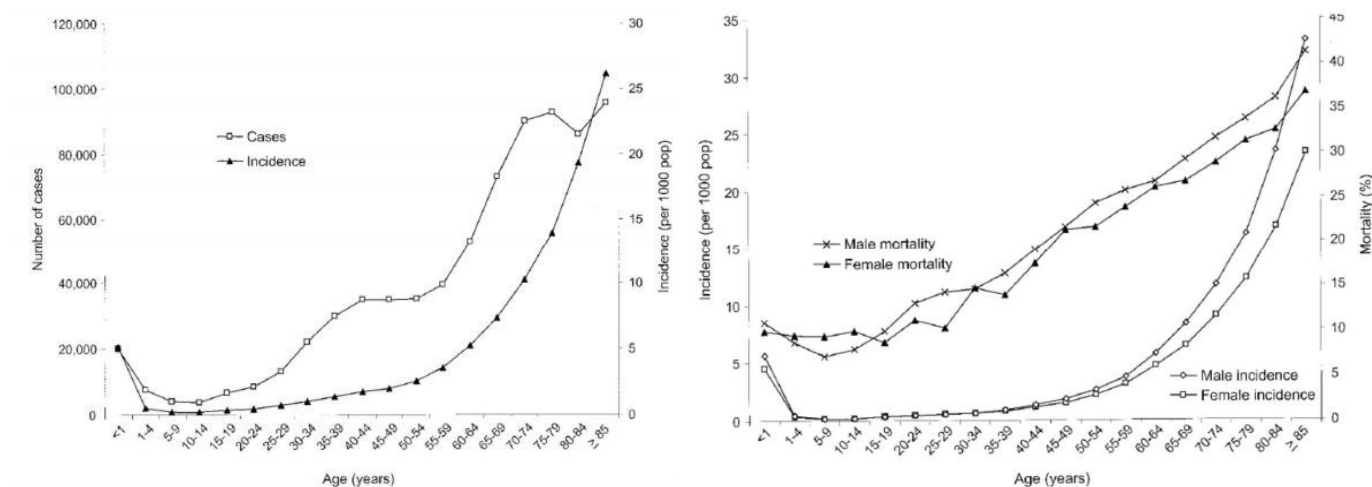
⁽¹⁾ Les auteurs des guidelines sur le sepsis et le choc septique sensibilisent au fait que lors du développement d'une infection, l'hôte (et sa réponse) à tout autant d'importance que l'agent infectieux lui-même. ⁽⁹⁾ L'environnement est également un facteur impactant. Le terme « environnement » est large et regroupe : Les caractéristiques du micro-organisme et le mode d'exposition (*type climat tropical, interactions sociétales, etc.*).

⁽¹⁰⁾ Un des facteurs de risque de sepsis sévère est la survenue antérieure d'une infection multi-bactérienne. On retrouve dans les facteurs de risques majeurs certains antécédents médicaux : comme l'immunodépression (diabète, cirrhose, IRC, neutropénie, asplénie, *etc.*), la notion d'usage de substances illicites, antibiothérapie récente instaurée (...).

Les maladies infectieuses ont toujours été un challenge majeur dans la survie et l'évolution de la race humaine. Les gènes impactés de l'immunité innée aux infections sont ceux ayant le plus grand polymorphisme, cela suivant la logique de la sélectivité darwinienne. Les résultats de cette ⁽¹¹⁾ étude sur le concept **PIRO** : « *Predisposing conditions response to the Insult (*infection*) nature and magnitude of the host Response degree of the concomitant Organ dysfunction* » concluent : Si un parent décède d'une maladie infectieuse, le risque pour la descendance de décès d'une maladie infectieuse est augmenté. Le lien génétique le plus important pour le décès prématuré étant l'infection (Odds Ratio = 5,81 ; IC 95% [2,47-13,7]). Les pathologies cancéreuses ou cardiaques présentent moins de corrélations que celles observées ici. Il semble fondamental que le praticien doit s'informer quant à la notion d'antécédents infectieux (personnels et familliaux) dans la démarche anamnétique.

L'étude épidémiologique de Gaiesky et Kallan ⁽¹²⁾ et d'autres ^(4, 13), rapportent que l'incidence du sepsis augmente, cela s'expliquerait par une population vieillissante et présentant de plus en plus de comorbidités. Cela s'explique aussi du fait que la connaissance générale et la détection de ces patients est meilleure qu'auparavant. L'incidence réelle est inconnue, cependant les études ^(11, 12) épidémiologiques confirment que le sepsis est un problème majeur en santé publique. C'est une des principales causes de mortalité ainsi qu'une des principales maladies graves dans le monde ⁽¹³⁾.

[Figure 1] Incidence du choc septique au sein de la population



(1) *Levi M.M. et al. (2004) Crit Care Med.*

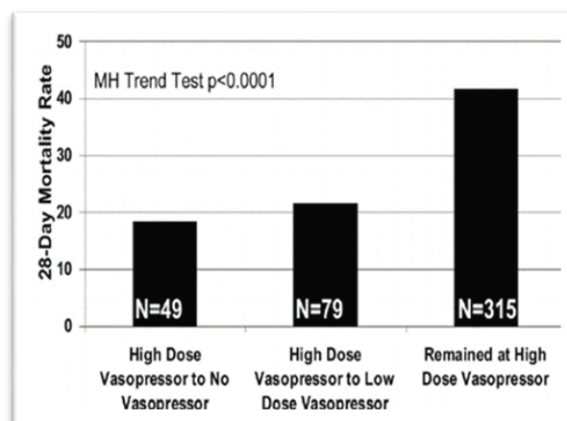
(14) Les analyses épidémiologiques [Figure 1] démontrent que l'incidence des populations atteintes est bimodale puisque deux pics d'âges ressortent : Soit des patients issus des services de néonatalogie (particulièrement les nouveau-nés, *moins de 3 mois*), soit, *et surtout*, les personnes âgées (aux profils gériatriques) avec une *légère* prédominance masculine. La prévalence de sepsis et du choc septique étant majorée vers 74 - 75 ans (*figure de gauche*). Au plus l'âge augmente, au plus il y a un risque de l'affection. Chez ces catégories de patients, en clinique, nous serons particulièrement attentifs aux signes cliniques précoces et donc au SIRS.

(10, 14) Les principales étiologies infectieuses ont pour foyers : le système cardiovasculaire, urinaire et digestif. Les foyers cutanés, dentaires, ORL et neurologiques sont moins fréquents. Lorsqu'on exclut les cas se développant après trauma et choc hémorragique, 20 % des cas demeurent idiopathiques.

(15) Les principales comorbidités associées mis en évidence comme haut risque de mortalité dans les 28 jours sont les suivantes :

- Les patients avec une pyélonéphrites aigüe et des associations de défaillance cardiaque [(Odds Ratio (OR.) 2.54], insuffisance rénale chronique (IRC) (OR. 1.71), AVC (OR. 2.97).
- Les patients hospitalisés pour pneumonie communautaire et des associations comme la maladie coronarienne (OR. 1.87), la démence (OR. 2.2).
- Les infections intra-abdominales avec pour associations à nouveau les mêmes que ci-dessus, reprenant par exemple l'IRC (OR. 2.67), démence (OR. 3.69). Il y a d'autre association forte comme le diabétique (type 2) (OR. 1.84) et le patient oncologique (OR. 3.03).

En termes pronostic, l'âge avancé intervient à nouveau, il est proportionnel à la mortalité. La défaillance d'organe (*MOF – multiple organs « failures »*) évalué avec un SOFA score élevé interviennent également proportionnellement à la mortalité. Un autre critère, [Figure 2], est le fait que le support vasopresseur devrait être diminué dans les premières 48 heures, au contraire si ce n'est pas le cas, c'est un signe de gravité.



[Figure 2] ⁽¹⁾ Levi M.M. et al. (2004) Crit Care Med.

^(10, 11) Issue de la maladie : Un patient en choc septique a une probabilité de décès entre 30 à 40% en USI (une des principales causes de décès de ces unités), ce qui montre nos lacunes dans la prise en charge de la pathologie et la nécessité d'étudier de nouvelles voies pour « optimiser » le pronostic des futur(e)s patient(e)s.

Outre le mauvais pronostic immédiat, le pronostic à long terme s'avère également réservé. Une étude ⁽¹⁶⁾ conclut que dans les populations âgées (Moyenne d'âge des cohortes = 76.9 ans), il y a de hauts taux de risques de perte de capacité décisionnelle et de perte d'autonomie. De fait, on dénote souvent chez les patients survivants un déclin cognitif, des handicaps physiques et psychologiques causant des implications importantes pour les soins de santé et la société, nécessitant notamment une prise en charge particulière en extrahospitalier.

Partie 2 — La plaquette au sein du choc septique

I. Inflammation et état pro-thrombotique lié à la physiopathologie du choc septique

^(17, 18) La réaction inflammatoire systémique est caractéristique du choc septique. De par les systèmes de défense immunitaires en réponse à l'infection. Cette réponse est disproportionnée en termes de quantification et de régulation. ⁽¹⁹⁾ Le plus petit élément figuré du sang (le thrombocyte, 2 à 5µm de diamètre) se retrouve dans ce magma inflammatoire favorisant un état pro-thrombotique.

^(20, 21) En situation de sepsis sévère, les voies métaboliques d'activation des « *Pattern Recognition Receptors* » (PRR) reconnaissent avec plus ou moins d'affinité les « *Pathogen-Associated Molecular Patterns* » (PAMP – modèle moléculaire associé à un agent pathogène). ^(21, 22) Les pathogènes activant ces PRR provoquent une cascade d'activation de plusieurs voies de signalisations. Le facteur de transcription *Nuclear Factor κ B* (NFκB), en est une majeure.

NFκB favorise à son tour l'activation de divers gènes de la réponse inflammatoire ; dont la sécrétion de chémokines et cytokines pro-inflammatoires de façon massive. ⁽²⁰⁾ Ce torrent cytokinique [dont principalement les interleukines (IL-1, IL-6) et les tumoral-necrosis-factor (TNFα et β)] a plusieurs conséquences comme l'activation de populations leucocytaires, une augmentation d'adhérence de cellules figurées du sang (tels que les granulocytes, les thrombocytes, ...) notamment par interaction avec l'endothélium.

^(20, 21, 23) Les études récentes montrent qu'il n'y a pas seulement les cellules du système immunitaire (inné et spécifique) qui expriment les PRR, par exemple, l'endothélium les expriment aussi ; Plus précisément les « *toll-like* » récepteurs (TLR), une sous-catégorie de PRR. ⁽²²⁾ Ces voies métaboliques et d'activations du facteur de transcription (NFκB) sont déclenchées non seulement au niveau endothélial mais aussi au niveau du thrombocyte.

⁽²⁴⁾ L'endothélium a un rôle central dans l'hémostase. À l'état basal, les cellules sanguines circulent sans y adhérer, on dit qu'il est thromborésistant. Physiologiquement, avec l'évolution, nous conservons une régulation négative de la coagulation, notamment via une synthèse de multitudes de composés anti-hémostatiques (*vasodilatateurs, antiadhérents, anti-agrégants, anticoagulants, fibrinolytiques, ...*) ⁽²⁵⁾.

⁽²³⁾ En situation de choc septique, les médiateurs pro-inflammatoires circulants activent l'endothélium. Il présente lui-même un phénotype inflammatoire, entraînant sa propagation d'activation locale, par excrétion autocrine et paracrine [*de molécules d'adhésion cellulaire (CAM) ; facteur d'activation plaquettaire (PAF), dérivés réactifs de l'oxygène (ROS)*], permettant d'activer davantage de tissu endothélial local par un système de boucles de rétroactions positives.

Dans l'étude de la cascade de la coagulation, deux théories se complètent. La théorie classique – phase de propagation (voie intrinsèque et extrinsèque) – permettant d'interpréter les tests de coagulation (in vitro) ; Et la théorie révisée – phase d'activation (voie unique) – reflète davantage le processus in vivo. Le modèle révisé de la coagulation stipule que : le TF sert d'ancre pour les facteurs de coagulation (VII + X) et régule ainsi l'engagement de la cascade enzymatique.

The diagram illustrates the blood coagulation cascade, divided into three main pathways: Contact activation (intrinsic), Tissue factor (extrinsic), and Common pathway.

- Contact activation (intrinsic) pathway:** Initiated by a **Damaged surface**, which activates **XII** to **XIIa**. **XIIa** activates **XI** to **XIa**, which then activates **IX** to **IXa**. **IXa** activates **X** to **Xa**. **Xa** activates **Prothrombin (II)** to **Thrombin (IIa)**. **Thrombin (IIa)** activates **V** to **Va**, which then activates **XI** to **XIa** (feedback loop). **Thrombin (IIa)** also activates **Protein S** to **Active Protein C** (in the presence of **Thrombomodulin**). **Active Protein C** inhibits **IXa** and **Va** (dotted red lines).
- Tissue factor (extrinsic) pathway:** Initiated by **Trauma**, which activates **VII** to **VIIa**. **VIIa** activates **X** to **Xa** in the presence of **Tissue factor**. **TFPI** (Tissue Factor Pathway Inhibitor) inhibits **VIIa** (dotted red line). **Antithrombin** inhibits **Xa** (dotted red line).
- Common pathway:** **Xa** and **Va** activate **Prothrombin (II)** to **Thrombin (IIa)**. **Thrombin (IIa)** activates **Fibrinogen (I)** to **Fibrin (Ia)**. **Fibrin (Ia)** is then cross-linked by **XIII** to **XIIIa** to form a **Cross-linked fibrin clot**. **Thrombin (IIa)** also activates **XIII** to **XIIIa**. **Antithrombin** also inhibits **Thrombin (IIa)** (dotted red line).

Regulation: **Active Protein C** (formed from **Protein S** and **Thrombomodulin**) inhibits **IXa** and **Va**. **TFPI** inhibits **VIIa**. **Antithrombin** inhibits **Xa** and **Thrombin (IIa)**.

Légende [Figure 3] : Étapes de la cascade :

- 13 -

(6, 9, 10) Notons dans le décours physiopathologique du sepsis, outre la réponse inflammatoire, une mineure réponse anti-inflammatoire paradoxale existe (via l'IL-10 et le récepteur au TNF α). Cette réponse peut donner lieu à un épisode induit d'immunodépression (ID) secondaire. C'est une balance entre hyperactivation inflammatoire, suivie d'hypo-activation immunitaire. Bien que l'effet primaire recherché était de compartimenter l'infection et de réduire ses effets systémiques, l'ID deviendra source d'infections secondaires, de réactivation virale et donc de mortalité.

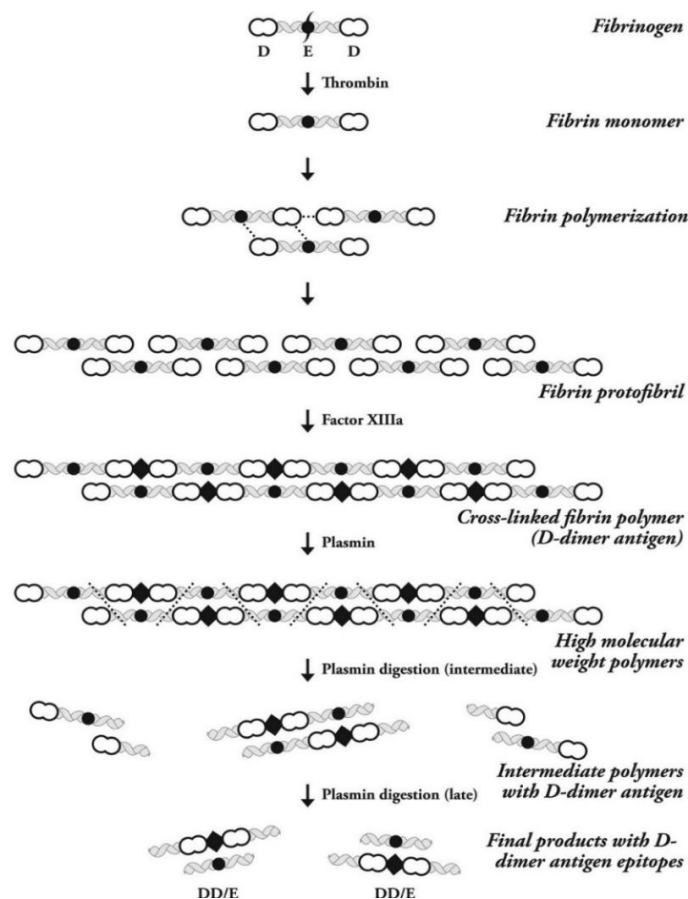
II. Analyses biologiques de la coagulation sanguine

- a) **t-T** (temps de Thrombine) : [range < 22sec] ⁽²⁷⁾ compare le taux de formation de caillots (conversion du fibrinogène *soluble* à la fibrine *insoluble*) à celui d'un échantillon de plasma normal. Pour ce faire on place le plasma du sujet étudié avec de la thrombine (origine externe) et on observe la concentration en fibrine, comparée ensuite avec un temps contrôle. Un temps de coagulation du plasma prolongé équivaut à un défaut quantitatif (déficience en fibrinogène) ou qualitatif (fibrinogène dysfonctionnel). L'intérêt est d'évaluer si la dernière étape de la cascade de coagulation se passe correctement.
- b) **t-PT** (temps de Prothrombine) ^(27, 28) : Le t-PT ou *temps de Quick* lorsque ce dernier est exprimé en %. Il analysera la voie extrinsèque et commune impliquant les facteurs de coagulation : I (fibrinogène), II, V, VII, X et XII. Il est principalement utilisé en clinique pour évaluer le facteur VII. Le t-PT est cependant dépendant du type de système analytique utilisé par le laboratoire. L'INR a été conçu pour standardiser les résultats.
- c) **INR** (International Normalized Ratio) : L'INR est le rapport entre le temps de prothrombine testé chez un patient et un échantillon normal (contrôle), augmenté à la puissance de la valeur ISI pour le système analytique utilisé. ISI (International Sensitivity Index) indique comment un type de facteur tissulaire particulier (TF) est comparé à un TF de référence international. En effet, il existe des variations entre les différents types de TF utilisés dans le réactif (provenant de divers fournisseurs) pour effectuer le test.
- d) **TCA** (temps de céphaline activée) ou « **APTT** (*activated partial thromboplastin time*) » ⁽²⁷⁾ : Ici il sera calculé en seconde, la norme : [25-35] sec. L'APTT, contrairement au t-PT, mesure l'activité des voies intrinsèques et communes de la coagulation.
- e) **Fibrinogène** ^(28, 30) : **[Figure 15], page suivante.** Le fibrinogène équivaut au facteur I, qui est le précurseur de la fibrine (facteur Ia), le facteur I est clivé grâce à la thrombine (IIa) (lors de la cascade de coagulation) pour produire des monomères de fibrine. Ces monomères s'associent au fibrinogène ou à la fibrine pour former les protofibrilles. Le facteur XIIIa (formé par la thrombine sur les polymères de fibrine) lie les différentes protofibrilles.

Une élévation plasmatique de fibrinogène traduit l'hypercoagulabilité du sang. Pour récapituler la séquence est : fibrinogène → monomère de fibrine (via la thrombine) → polymère de fibrine soluble [non réticulé] → polymère de fibrine réticulée (via le facteur XIIIa).

- f) **D-Dimères** ⁽³¹⁾ : Produit de dégradation du maillage de fibrine. Ce marqueur est aspécifique car il se positive dans de nombreux états physiopathologiques et variés (*tels que : hémorroïdes, varices, embolies, malformations vasculaires, etc.*). ^(64, 65) En effet, lorsque la fibrine réticulée est dégradée par la plasmine (fibrinolyse), cela génère une variété de produits de dégradation, dont les D-dimères (domaines périphériques D) et le fragment E (domaines centraux E). Le contact électrostatique entre ces domaines D (2 à 2) produit des liaisons covalentes entre les molécules de fibrines produites, via le facteur XIII. Il existe des déficits en facteur XIII mais ils sont exceptionnels (moins de 10 / 1.10⁶).

[Figure 4] : Fibrinogène et la fibrinolyse- Représentation schématique d'une (seule) protofibrille



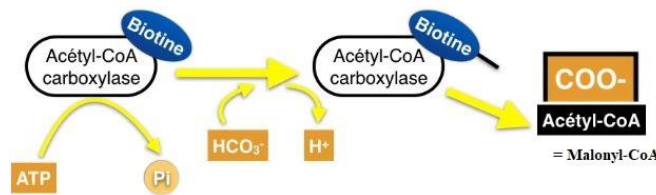
⁽³¹⁾ N.C. (2012). Caractéristiques immuno-analytiques des D-dimères. ImmAnalyse et BioSpé.

I. L'Acétyl-Coenzyme A Carboxylase

^(26, 32) Le rôle principal de l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) est son implication dans la synthèse des acides gras et de son rôle régulateur. ^(33, 34) Le foie est la principale source de la lipogenèse, et l'acétyl-coenzyme A (ou acétyl-CoA) est le principal précurseur de tous les acides gras. Il est obtenu par clivage de certains acides aminés ou via la glycolyse.

⁽³⁴⁾ Pour former les graisses, la première étape est une carboxylation, l'acétyl-CoA devient du malonyl-CoA. C'est une réaction catalysée et régulée par l'enzyme (ACC), elle est irréversible et correspond alors à une étape d'engagement dans la lipogenèse, tant au niveau de la plaquette sanguine (ACC plaquettaire) que dans l'hépatocyte (ACC) ⁽³⁵⁾.

[Figure 5] ACC et son état intermédiaire : la carboxybiotine.



Travail personnel à partir de (33, 34)

[Figure 5] Légende :

La réaction qui se produit correspond à la formation d'un intermédiaire appelé la carboxybiotine, cela est couplé à l'hydrolyse d'une molécule d'ATP, le groupe CO₂ est alors activé et forme un intermédiaire CO₂ – Biotine – Enzyme. La dernière étape consiste à transférer ce CO₂ à l'acétyl-CoA pour former ainsi le malonyl-CoA et récupérer le complexe (enzyme – biotine).

→ ACC est liée à un groupement prosthétique, c'est-à-dire qu'elle est fixée (de manière covalente) avec la biotine (qui correspond à la vitamine B8).

Au niveau du thrombocyte, le malonyl-CoA génère la sécrétion plasmatique principalement l'acide arachidonique (AA) et régule les phospholipides membranaires et donc l'activation plaquettaire. L'AA est un acteur clé à la fois pour l'activation plaquettaire et le processus inflammatoire ⁽³⁵⁾. À son tour, il se fera métaboliser par deux voies principales dans les plaquettes :

- 1) La voie de la cyclooxygénase (COX) générant du thromboxane A₂ (TXA₂), qui favorise l'activation plaquettaire et la vasoconstriction, notamment par la sécrétion de prostaglandines (acides gras cycliques). On reconnaît 3 cyclooxygénases (COX -1, -2 et -3). La voie COX-1 est de constitution ubiquitaire dans l'organisme. À l'inverse, la voie COX-2 est inducible essentiellement via des facteurs pro-inflammatoires, tels que les cytokines (IL-1, IL-7, ...).

- 2) La voie de la lipooxygénase (LOX) produit des leucotriènes (acides gras linéaires) pro-inflammatoires mais aussi des lipoxines (Lx), qui sont plutôt impliquées dans la résolution de l'inflammation et de l'activation plaquettaire.

II. Système de régulation (voies activatrices et inhibitrices)

Type 1.: Régulation locale :

⁽³⁶⁾ Lorsque l'ACC se fait phosphorylée, elle est inactivée, l'enzyme permettant cette conversion est l'AMP Kinase-dépendante (ou AMPK). Cette kinase est comme son nom l'indique dépendante de l'AMP qui l'active et ATP qui l'inhibe. Logiquement donc, lorsque la charge énergétique de la cellule est faible (peu d'ATP), les graisses ne sont pas synthétisées. ⁽³⁷⁾ La thrombine est reconnue comme un puissant activateur de la plaquette sanguine. De fait, elle active aussi la protéine kinase AMP (AMPK).

La signalisation AMPK-ACC dans les plaquettes est un mécanisme clé régissant la régulation de l'hémostase primaire et de la thrombose artérielle. ⁽³⁷⁾ Nos prédécesseurs (*Leprore, Onselaer et al. JTH.*) ont étudié sur des souris transgéniques l'enzyme ACC plaquettaire (*plus précisément l'isoforme ACC₁*) surexprimant une forme mutée non-phosphorylable lui conférant donc une forme constitutivement active, *qui n'est plus dépendante de l'AMPK.*

Cette investigation a permis de démontrer, en plus de la synthèse des phospholipides membranaires et de l'AA, que l'ACC₁ majore la sécrétion d'ADP induite par le collagène et la libération des granules denses, modulant la teneur en phospholipides des plaquettes. Autre fait intéressant, la population de plaquette exprimant le phénotype muté ACC a montré un taux majoré de sécrétion de facteurs de coagulation IV libérés par les granules α ⁽³⁷⁾.

Type 2.: Régulation allostérique :

⁽³⁶⁾ L'ACC est une enzyme allostérique, autrement dit, elle possède un domaine régulateur en plus de son domaine actif. Le citrate est le modulateur (ou effecteur) qui active l'ACC de manière allostérique, il agit sur la forme inactivée / phosphorylée. De base, lorsque cette enzyme est inactive, elle se trouve être structurellement sous forme de dimère isolé. Lorsque le citrate est présent, il favorise la polymérisation de dimères inactifs (**▲rouge**) en filaments actifs (structure oligomériques – **▲blancs**). Cela peut annihiler partiellement l'inhibition produite par la phosphorylation.



⁽³⁶⁾ Wei J., et al. (2016). *Cell Discovery* (2)1.

Type 3.: Régulation hormonale :

⁽³⁸⁾ L'ACC est régulé par différentes hormones, une nouvelle fois reflétant le statut énergétique global de l'organisme, il s'agit du glucagon, de l'adrénaline et de l'insuline. Nous le citons ici pour mémoire car il n'y a aucune implication au niveau thrombocytaire.

Type 4.: Contrôle adaptatif (génétique) :

⁽³⁸⁾ A nouveau ce point porte plus particulièrement aux tissus spécialisés dans la lipogenèse. C'est un contrôle sur le long terme, impliquant des changements au niveau génétique. Il a été démontré sur des souris que lorsqu'un organisme est mis à jeun puis nourrit avec un régime pauvre en lipides (et riche en glucides) qu'en quelques jours on observe un accroissement significatif de l'ACC et de (Fatty Acid Synthase) FAS. En somme, en ne consommant pas de graisse, la voie de synthèse des acides gras est fortement sollicitée grâce à l'augmentation de transcriptions des enzymes impliqués dans cette voie de biosynthèse. Cette régulation transcriptionnelle est assurée à la fois par l'insuline et le glucose.

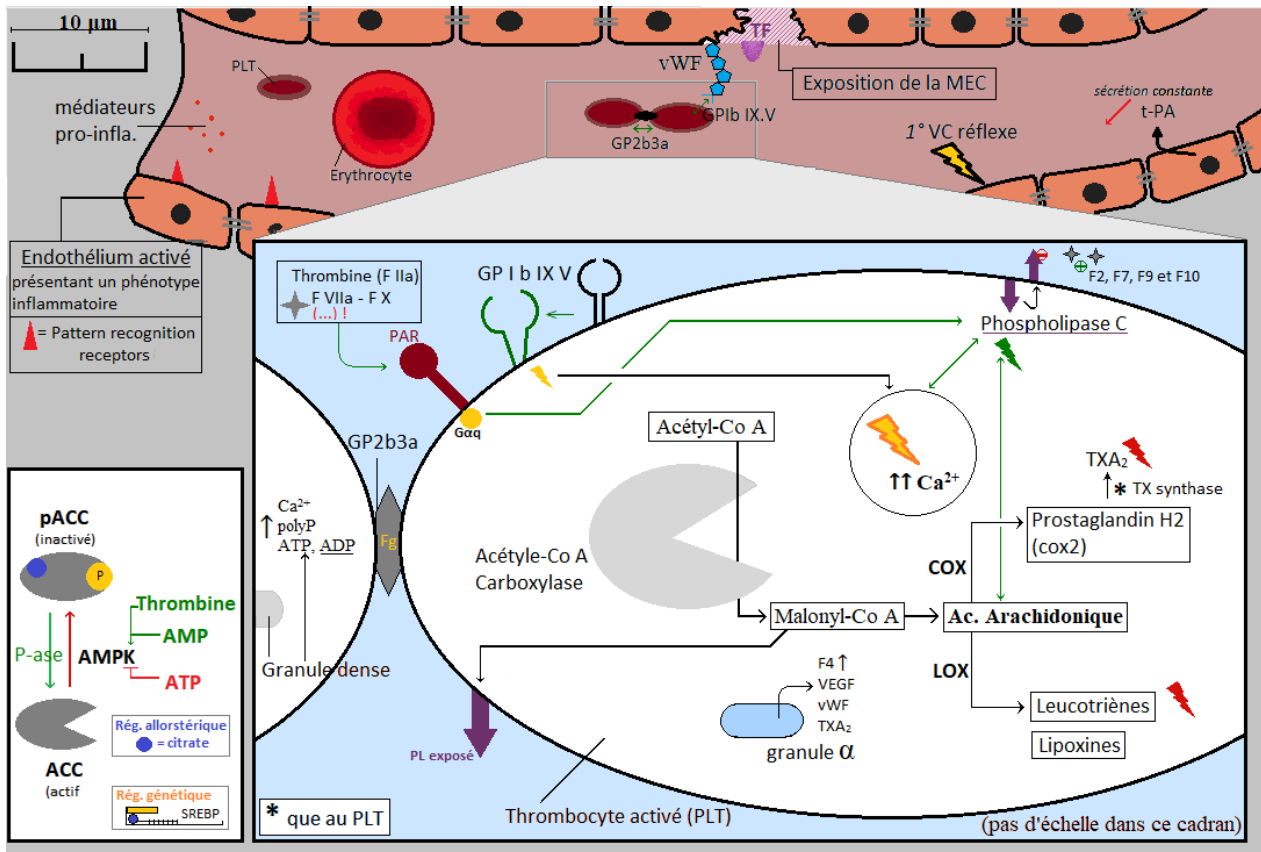
III. Hypothèse de travail

Sur base des théories mises en avant dans ce manuscrit, nous émettons l'hypothèse que l'Acétyl-CoA Carboxylase plaquettaire est inhibée dans l'état physiologique imposé par le choc septique, à savoir un état prothrombotique et une génération accrue de thrombine. La régulation de l'ACC plaquettaire dans le cadre du choc septique serait le plus potentiellement dû à une (phosphorylation) inhibition locale par l'AMP-activated protein kinase (AMPK) ; AMPK elle-même activée par la thrombine.

Cette voie métabolique AMPK-ACC pourrait influencer en partie le phénotype inflammatoire pendant le sepsis, en régulant la synthèse des médiateurs pro-inflammatoires issus principalement de l'acide arachidonique (COX) et de la suractivation plaquettaire dû aux phospholipides membranaires.

Plusieurs études sont parues sur l'administration d'aspirine (inhibiteur COX -1 et COX -2) chez des patients en choc septique montrant de meilleurs outcomes. Lors de ce mémoire, en 2017, nous avons déjà mis en évidence que les patients en choc septique (stade sévère) présentaient un taux de phosphorylation ACC plaquettaire significativement différent par rapport aux autres cas de sepsis de moindres grades.

Figure schématique synthétique :



Campion Alessandro, avril 2020.

Légende des différents cadres de la figure synthétique :

- En fond**, l'état systémique inflammatoire du choc septique et l'endothélium présentant un phénotype inflammatoire (état pro-thrombotique : PRR, exposition de TF, etc). L'adhésion plaquettaire via le récepteur glycoprotéine (GPIIb/IIIa) se liant au vWF ; suivi de l'agrégation plaquettaire (GPIIb-IIIa) et l'activation du thrombocyte.
 - Le cadre droit** détaille le schéma du thrombocyte activé : Via les GP, provoquant l'augmentation du de concentration intracytoplasmique de calcium (Ca^{2+}), signal électrochimique déclencheur de voies métaboliques : comme le relargage du contenu des granules alpha (α) et granules denses ; la modification structurale de la plaquette et l'exposition de phospholipides du côté extra-membranaire, favorisé par l'ACC sous forme activé.
 - Le cadre gauche** représente schématiquement les types de régulations de l'ACC. La régulation locale, via l'AMPK et les facteurs qui influencent son activité lorsqu'ils se trouvent en forte concentration : (ATP inhibe, Thrombine et AMP activent) ; La régulation allostérique via la haute concentration en citrate ; Enfin la régulation génétique à long terme, qui elle n'a pas été démontrée aux thrombocytes.
- ⁽⁴²⁾ **Détail sur le récepteur PAR** (récepteurs activés par une protéase). Les PAR sont un cas particulier des récepteurs couplés à la protéine G (RCPG). Pour activer ce dernier, la thrombine, et d'autres enzymes, exercent une activité protéolytique sur l'extrémité N-terminale de PAR, modifiant ainsi sa structure moléculaire, provoquant ainsi une cascade enzymatique intracytoplasmique. Il a été reconnu que PAR1 est impliqué dans la régulation de la phospholipase C et AMPK. Notamment via la voie Ca^{2+} /protéine kinase kinase β dépendante de la calmoduline (CaMKK β), non représentée.

II. OBJECTIFS

Ce mémoire de recherche clinique se raccroche à l'étude clinique PLACCSEPS : *Phosphorylation de l'acétyl-CoA-Carboxylase (ACC) plaquettaire (PL), au cours du choc septique (SEPS)*. Le but principal de l'étude PLACCSEPS est de mettre en évidence une phosphorylation (inactivation) de l'ACC plaquettaire, cible de l'AMPK activée par la thrombine, favorisé par l'état physiopathologique systémique induit par le choc septique.

Pour démontrer cette hypothèse, l'étude PLACCSEPS mettra en place deux cohortes prospectives : patients en choc septique et un groupe contrôle, matché pour les caractéristiques cliniques.

Le **rôle principal** attribué est de **créer la cohorte prospective de la population contrôle** pour l'étude clinique PLACCSEPS ; et dans un second temps analyser la phosphorylation de l'ACC plaquettaire de cette cohorte.

Les objectifs sont les suivants :

1.	Faire une analyse des caractéristiques cliniques et démographiques que composent la cohorte rétrospective des patients en Choc Septique (n = 150), sur laquelle les cohortes prospectives se baseront.
2.	La cohorte Contrôle prospective doit présenter les mêmes caractéristiques cliniques et démographiques que la cohorte rétrospective Chocs Septiques (n = 150).
3.	La cohorte contrôle doit présenter une variabilité de résultats biologiques semblables vis-à-vis des normes d'une population lambda ou, le cas échéant, d'une population correspondant à leurs comorbidités.
4.	Analyser les facteurs influençant le taux de phosphorylation de l'ACC plaquettaire (pACC) de la cohorte Contrôle.

III. MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. Type d'étude

Ce mémoire de recherche clinique est une étude prospective, monocentrique et observationnelle, aux Cliniques Universitaires Saint-Luc (CUSL). Les données seront collectées et vérifiées à partir du patient lui-même et à partir du fichier médical informatisé : MedicalExplorer, réseau informatique intranet de l'hôpital.

Le comité d'éthique de l'hôpital a approuvé l'étude le 18 février 2019 (2018 / 11DEC / 469), ayant été enregistrée sur ClinicalTrials.gov (NCT04107402). Aucun événement indésirable ni ajustement de protocole ne s'est produit depuis l'approbation. Le recrutement a débuté le 27 février 2019 – *en cours* : 53 chocs septiques, 53 volontaires sains avec des comorbidités appariées et 12 patients témoins en USI.

B. Conception des bases de données et méthode statistique

La cohorte contrôle comprendra 47/53 volontaires apparentés (pour l'âge et les comorbidités = caractéristiques démographiques) vis-à-vis d'une cohorte rétrospective Chocs Septiques comptabilisant 150 patients. Les critères d'inclusions seront définis par l'analyse de la cohorte rétrospective. Cette cohorte rétrospective est issue de patients en choc septique ayant séjourné aux soins intensifs des CUSL, dont l'étude de sa population se trouve dans la partie **Résultats**.

Par après, l'étude PLACCSEPS utilisera cette cohorte contrôle issue de ce mémoire pour la comparer à une cohorte prospective de chocs septiques, comprenant le même nombre d'engagés. En respectant ce nombre de participants, l'étude fournira une puissance de 80% avec un niveau de signification de 5% ($p\text{-value} \leq 0.05$) pour détecter une variation significative (0.15) du rapport du taux de (pACC).

Les critères d'exclusions à respecter pour intégrer l'étude PLACCSEPS :

- Les mineurs d'âges (< 18 ans).
- Les patients sous traitement anticoagulant (oral ou parentéral) pour quelques raisons que ce soit.
Y compris les héparines, le fondaparinux, l'antagoniste de la vitamine K, les nouveaux anticoagulants oraux.
- Chimiothérapie récente (moins de 1 mois).
- Néoplasie multi-métastatiques.
- Maladie inflammatoire active.
- Hémophilie et autres coagulopathies.
- Patients transplantés, patients sous traitements immunosuppresseurs.
- Hépatite B active, patients HVC ou VIH. Cirrhose (avec impact sur les tests de coagulation).
- Chirurgie récente majeure (< 48 heures).
- Arrêt cardiaque récent sans débit et / ou faible débit pendant plus de 5 minutes.

- **1^{er} test d'analyse statistique : Analyse Gaussienne**

Pour l'étude de la variabilité des résultats biologiques de la **cohorte contrôle**, nous avons relevé les moyennes de tous les items issus des analyses biologiques [calculées par loi de la normale Gaussienne, et leurs intervalles de confiance IC (95%) via une analyse descriptive]. Ceci a été comparée avec les références internationales scientifiques définissant la norme.

- **2^{èmes} tests d'analyses statistiques : Les tests ANOVA.**

Pour l'étude du taux de phosphorylation de l'ACC plaquettaire (pACC) au sein de la **Cohorte Contrôle** nous avons procédé aux analyses statistiques ANOVA. Le test Student (ou T-test) et le test de Fisher (F-Test) *étant les tests statistiques ANOVA* définissent s'il y a une différence significative entre le taux de pACC des sous-catégories composant la **Cohorte Contrôle**. Ces sous-catégories seront développées dans la partie résultat. Les tests ANOVA combinés à la p-value, ayant une valeur inférieure au niveau alpha 0.05, indiquant tous les résultats sont statistiquement significatifs.

Un F-test, contrairement au T-test, compare les variances entre les deux cohortes. Ce test statistique définit si au moins une des variances entre nos deux échantillons indépendants est statistiquement différente, (= affirmer l'hypothèse alternative).

- **Étude d'équivalence**

Une étude d'équivalence sera réalisée pour comparer de manière statistique les caractéristiques principales composant les deux cohortes : Cohorte rétrospective des chocs septiques et la cohorte contrôle.

Résultat et démarches disponibles dans [**Annexe 1**].

C. Protocole de recrutement et recueil du consentement libre et éclairé

*Le recrutement, pour la constitution de la database contrôle, a été réalisé en coopération avec la responsable du **centre de prélèvement de Saint-Luc** (-1 ; route 416), Dr D. Becheanu et son infirmière-chef, Mona, que je remercie encore chaleureusement. Et en coopération avec les consultations Epi (Evaluation Pré-Intervention) dépendant du **service d'anesthésiologie**.*

Voici le protocole de recrutement, développé étape par étape dès l'accueil du patient :

- Étape 1. Un local a été mis à disposition pour accueillir le patient, ce dernier est un patient « lambda » qui vient pour un prélèvement de sang prescrit par un médecin « X ».
- Étape 2. Les concepts de l'étude et la proposition d'en faire partie sont avancés. Si le patient y consent, il accepte le prélèvement d'échantillons de sang supplémentaires de ceux pour lequel il venait de base. Il consent également au prélèvement d'un échantillon d'urine si celui-ci n'était pas déjà prescrit. Avant de procéder aux prélèvements, plusieurs démarches médico-légales sont nécessaires...
- Étape 3. Le patient signe avant tout le dossier de consentement éclairé **[Annexe 3]**.
Une démarche a été établie pour instaurer une manière de pré-screening afin d'éviter le recrutement de patients possédant d'emblée des critères d'exclusions évidents. Au sujet des antécédents médicaux (et du dossier médical global), le taux d'erreur aurait été trop élevé si ces informations avaient été fournies uniquement via une *brève* anamnèse médicale. À la suite du protocole de recrutement, tous les dossiers médicaux (DM) des patients ont été analysés via l'outil MedicalExplorer (intranet de l'hôpital) et, le cas-échéant, par appel avec le médecin *traitant / en charge* du patient contrôle. L'analyse sur le réseau intranet a été faite par un processus en double aveugle, permettant ainsi une vue claire et sans omission du DM global des patients recrutés. À postériori, ce bilan a *malheureusement* mené au retrait de 6 patients *présentant des critères d'exclusions*.
- Étape 4. Le bon d'une prise de sang pour biologie générale (73V4) prescrit par un médecin « X » est réceptionné. Il doit être complété avec un nouveau bon au nom de l'étude ^{*}. si des analyses supplémentaires pour l'étude sont nécessaires. Il faut également remplir un bon pour la banque de sang (BDS) dans le cadre de l'analyse Multiplate ^{*}. *pour l'étude de la fonction plaquettaire*. La suite du processus de prélèvement (et de la consultation) pour le patient reste classique : C'est un professionnel de santé agréé (infirmier, médecin) qui effectue la prise de sang et d'urines.

^{*}. D'un **point de vue médico-légal**, l'introduction de nouveaux bons (biologie générale, etc.), et matériaux supplémentaires (tubes, échantillons, ...), se fait au nom de l'étude PLACCSEPS. Permettant, vis-à-vis du patient, de n'engendrer aucuns frais financiers ni « temporels » supplémentaires pour les démarches faites dans le cadre de l'étude clinique.

D. Types de prélèvements

[Table 3] Tableau synthétique des prélèvements effectués :

Type de tubes fournis	Type d'analyses effectuées	Destination
Tube Orange petit <i>Fourni par le 416*</i>	Analyse Multiplate® de la fonction plaquettaire	Banque de sang (BDS), CUSL.
Tube Vert petit <i>Fourni par le 416*</i>	Analyse de la coagulation (D-dimères, TCA, ...)	Laboratoires Saint-Luc
** (+/-) Tubes supplémentaires	Lorsque le bon de prélèvement d'une biologie générale est incomplet. <i>Exemple d'ajouts : D-dim, chol., glycémie, etc</i>	Laboratoires Saint-Luc
2 tubes CPDA₁ / 8.5 ml <i>Fourni par labo CARD</i>	Analyse de pACC et du GAPDH (contrôle). <i>Cette analyse est immédiate.</i>	Laboratoire CARD – PLT Tour Harvey
Tube sous vide Vacutest® : Urines sans additif <i>Fourni par le 416*</i>	Congélation : Analyse du complexe thrombine anti-thrombine	Laboratoire CARD – PLT Tour Harvey
* 416 signifie la route du centre de prélèvements, les facturations des tubes supplémentaires et des analyses laborantines sont aux frais de l'étude PLACCSEPS.		
** La raison de +/- tubes supplémentaires prélevées ont été expliquée dans le point précédent.		

Le laboratoire est situé sur le site des cliniques (tour Harvey). Il y a donc un accès direct entre les deux structures : *centre de prélèvement et laboratoire*. Systématiquement selon le protocole, une fois le prélèvement (tubes CPDA₁) effectué, il est apporté dans les conditions suivantes :

- 1) Sans délais, *analyse maximum dans les 15 minutes après prélèvement*.
- 2) À la verticale et sans être secouer pour ne pas hémolyser l'échantillon.
- 3) Dans un dispositif thermostatique (37°C) préchauffé.

Ces tubes ne doivent pas subir de mauvaises conditions de prélèvements ni d'analyses. Le protocole peut, s'il n'est pas respecté scrupuleusement présenter des infidélités dans les résultats. Chaque patient est ainsi traité 1 à 1, la manipulation nécessaire aux analyses dure ~ 40 à 60 minutes. Les autres prélèvements (autre que les CPDA₁) sont apportés au laboratoire via le système télétube.

E. Paramètres

Les trois principaux tests sanguins suivants seront effectués sur tous prélèvements faits aux *potentiels* patients constituant les bases de données prospectives :

Test 1. La biologie sanguine générale, comportant la **numération plaquettaire associée aux analyses de la coagulation** incluant : INR, t-T et t-PT, APTT (= TCA), fibrinogène et D-Dimères. Les 3 tests de bases de détection d'anomalies de la coagulation sont : t-PT, TCA et la numération plaquettaire. *Nb : Les notions théoriques des tests ci-dessus ont été repris dans la **partie 2** de ce manuscrit.*

Test 2. Analyse MULTIPLATE ® (fonction plaquette multiple) ⁽³⁹⁾ : Une absence de thrombopénie n'est pas un critère suffisant pour définir si ces dernières présentent un état fonctionnel correct.

Cet analyseur effectuera six tests d'agrégation plaquettaire :

- **ADPtest** et ADPtest HS : mesure de l'effet des antagonistes des récepteurs à l'ADP sur l'agrégation plaquettaire.
- **ASPItest** : mesure de l'effet des antagonistes de la cyclo-oxygénase (COX-1) sur l'agrégation plaquettaire.
- **TRAPtest** : mesure de l'effet des antagonistes du récepteur GP IIb-IIIa sur l'agrégation plaquettaire.
- COLtest : mesure de l'agrégation induite par le collagène.
- RISTOtest : mesure de l'agrégation dépendante du facteur von-Willebrand et de la glycoprotéine Ib.

Le Multiplate ® est un outil reconnu comme fiable pour tester la fonction plaquettaire par la technique d'agrégométrie. Il est largement utilisé dans la majorité des hôpitaux (dont les CUSL) et établissements scientifiques Belges. Pour l'étude clinique PLACCSEPS, nous nous intéresserons principalement aux trois premiers tests Multiplate (en gras) repris ci-dessus.

Actuellement, aux unités de soins intensifs, pour évaluer la fonction plaquettaire, les principaux tests sont les analyseurs de la réponse plaquettaire aux (*ant*-)agonistes : le Multiplate ® ainsi que le test permettant l'étude de la coagulation : Rotem ® ou *thromboélastographie (TEG)*. Ceux-ci étant deux tests ex-vivo, à partir de plaquettes sanguines isolées. Cette étude ⁽³⁹⁾ met en garde quant à la fiabilité accordée à 5 tests (*dont TEG et Multiplate®*) de la fonction plaquettaire chez les donneurs sains et donneurs avec thérapies antiplaquettaires quotidiennes (à savoir l'aspirine et le clopidogrel). Cette dernière conclut que l'agrégométrie d'impédance Multiplate ® est la seule méthode à démontrer un coefficient de fiabilité acceptable (R = 0.4) chez des volontaires sains et des donneurs sous aspirine et sous clopidogrel ⁽³⁹⁾.

Test 3. ⁽⁴⁰⁾ L'état de phosphorylation de l'ACC plaquettaire sera déterminé par Western Blot, de même que le Glycéraldéhyde-3-Phosphate-Déshydrogénase (GADPH) utilisé comme contrôle de chargement. Nous comparerons les taux de pACC / ACC totale exprimés dans les plaquettes.

Le principe de Western Blot est bien connu et fort exploité dans le domaine de la biologie moléculaire. Cette procédure analytique permet de mettre en évidence (identifier, quantifier) la protéine d'intérêt au sein d'un échantillon de cellules. Ce principe repose sur l'utilisation d'anticorps dirigés spécifiquement contre la protéine d'intérêt.

Lorsqu'on boucle l'analyse d'un Western Blot, on en retire 3 informations :

- i) Le nombre de bandes,
- ii) Le poids moléculaire de chaque bande (en kDa) en rapport avec le marqueur de masse,
- iii) L'intensité de chaque bande, proportionnelle à la quantité de protéine spécifique présente.

Test 4. Analyse d'urine : Le spécimen pour cet examen doit être prélevé, et congelé dans les 30 minutes suivant le prélèvement. Une analyse du complexe thrombine anti-thrombine sera effectuée dans un second temps.

Note : Nous ne ferons plus mention de cette analyse au sein de ce mémoire de recherche clinique.

IV. RÉSULTATS

I. Analyse de la cohorte rétrospective Chocs Septiques

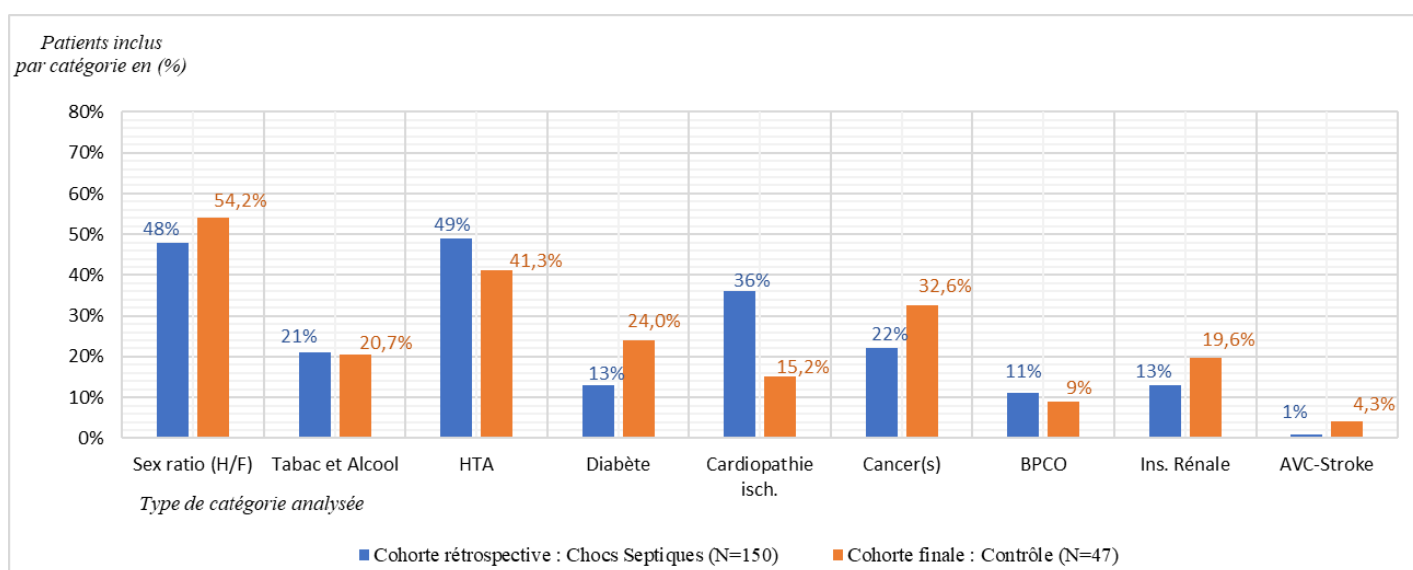
[Table 4] Mise en évidence des caractéristiques des patients composant la cohorte rétrospective :

	Cohorte rétrospective Chocs Septiques
Patients totaux	150
Âge moyen de la cohorte (années)	66 ans
Sexe	48 % hommes 52 % femmes
Hypertension artérielle (HTA)	49 %
Diabétiques (type I et II)	13 %
Fumeur (actif) et Ethylisme* * ≥ 2 unités / jour	21 %
Cardiomyopathie ischémique	36 %
Patients oncologiques	22 %
IRC Stade II : GFR < 90 mL/min/1.73m ²	13 %
BPCO	11 %
Sous immunosuppresseurs (Dont la cortisone et dérivés)	13 %
Antécédents d'AVC	1 %

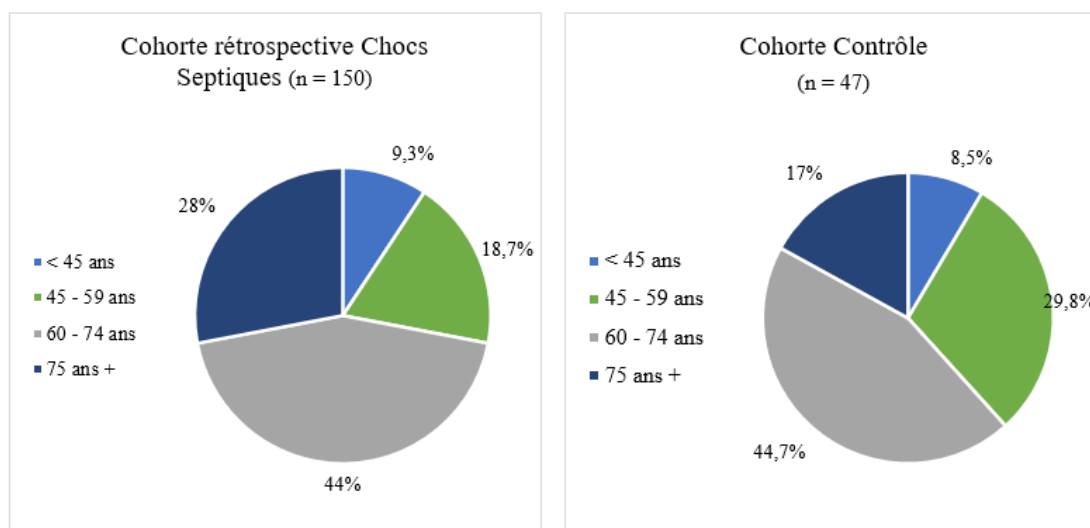
II. Établissement de la Cohorte Contrôle.

Le critère d'inclusion majeur pour constituer la database contrôle est de répondre aux caractéristiques démographiques préétablies sur base de la cohorte rétrospective Chocs Septiques (n = 150). C'est au centre de prélèvement (des CUSL) que les patients ont été recrutés en fonction du profil de patient requis au fur et à mesure que la cohorte Contrôle se formait. Six ont été exclus, à postériori, pour non-respect de critères d'exclusions de l'étude clinique PLACCSEPS. À ce jour (avril 2020), la cohorte Contrôle comptabilise 47 sur 53 patients.

[Figure 6] Études des caractéristiques démographiques (et profils cliniques) des cohortes : Contrôle et Chocs septiques — Bilan :



[Figure 7] Taux de patients par catégorie d'âge représentés dans les deux cohortes : L'âge moyen de la cohorte rétrospective Chocs Septique est de 67 ans ; et de 62 ans (et 2 mois) pour la cohorte Contrôle.

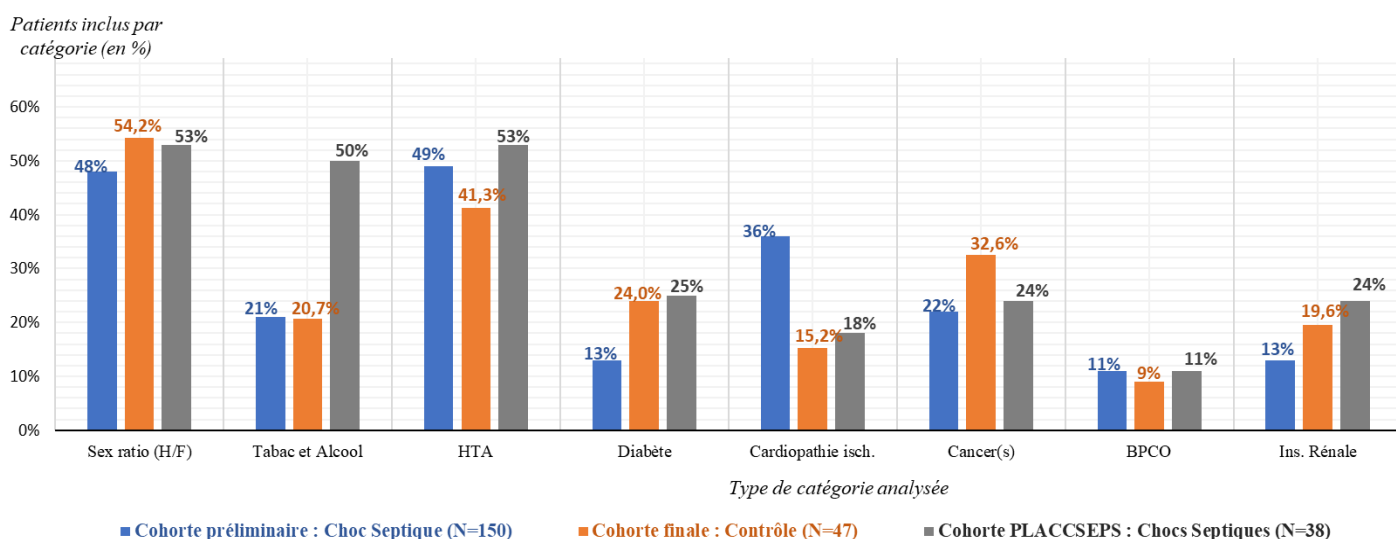


III. Introduction prospective de la cohorte PLACCSEPS : Chocs Septiques.

Ce graphique [figure 8] reprend les caractéristiques cliniques et comorbidités principales retenues des 2 cohortes étudiées ; Auxquelles on ajoute maintenant une 3^{ème} cohorte *en cours d'élaboration*. Cette dernière sera la nouvelle cohorte de 53 patients en chocs septiques qui s'inscrira dans l'étude clinique PLACCSEPS. Celle-ci se base également sur la cohorte rétrospective Chocs Septiques, en plus de la cohorte contrôle issu de ce mémoire. Voici le graphique ci-dessous qui met en lumière les diverses caractéristiques composant les cohortes.

À ce jour, la cohorte **PLACCSEPS Chocs Septiques** est constituée de 36 patients *sur les 53 requis*.

[Figure 8] Caractéristiques démographiques des cohortes étudiées.



IV. Études de variabilité des résultats biologiques de la cohorte contrôle

[Table 5] Bilan synthétique des résultats biologiques analysés au sein de la cohorte contrôle :

Type de catégorie	Moyenne de la catégorie	IC 95% de la moyenne calculée [inf. ; sup.]	Références internationales
Taux d'hémoglobine (g/dL)	13.2	[12.7 ; 13.6]	12.2 – 15.0 g/dL
HTGR (%)	38.5	[37 ; 40]	36 – 48 %
Globules blancs (x10 ³ /L)	7.01	[6.47 ; 7.55]	4.00 – 10.00 x10 ³ /L
Plaquettes (x10 ³ /L)	251	[226 ; 276]	150 – 450 x10 ³ /mL
CRP (mg/L)	5.3	[4.0 ; 6.7]	< 6 mg/L
TCA (APTT) (sec)	30.7	[29.9 ; 31.5]	25.1 – 36.5 sec
Temps de thrombine (t-T) (sec)	14.6	[14.3 ; 14.9]	12 – 18 sec
INR	0.995	[0.98 ; 1.01]	0.80 – 1.20
Fibrinogène (mg/L)	402	[338 ; 424]	180 – 410 mg/L
D-dimères (tous) (ng/mL)	714,3	[602 ; 826]	< 500 ng/mL Cancer(s) : n = 14
- Patients onco. exclus	599	[383 ; 815]	
- Patients onco. uniquement	960	[696 ; 1224]	
Ionogramme:			
Na ⁽⁺⁾ (mmol/L)	140.3	[139.7 ; 140.9]	[135-145] mmol/L
K ⁽⁺⁾ (mmol/L)	4.23	[4.09 ; 4.37]	[3.5-5] mmol/L
Cl ⁽⁻⁾ (mmol/L)	101.84	[98.3 ; 105.3]	[97-107] mmol/L
Bicarbonate (mmol/L)	25.8	[23.0 ; 28.6]	[22.0 – 29] mmol/L
Taux de créatinine (mg/dL)	1.2	[1.04 ; 1.4]	0.6 – 1.3 mg/dL
- IRC exclus	0.85	[0.8 ; 0.9]	
- IRC uniquement	2.8	[2.0 ; 3.7]	
Urée (mg/dL)	43.8	[32.8 ; 54.8]	15 – 50 mg/dL
Triglycérides (mg/dL)	146.9	[122 ; 172]	< 150 mg/dL
Cholestérol (mg/dL)	183.7	[172 ; 196]	< 190 mg/dL
HDL (mg/dL)	54.3	[50 ; 58.5]	> 60 mg/dL
LDL -calculé (mg/dL)	100	[89 ; 112]	< 115 mg/dL
Analyse Multiplate – ADP <i>Inhibiteur P2Y12</i>	664.3 /	[614 ; 714]	607 – 963 AU*min <i>Sous inh. P2Y12 (n = 1)</i>
Analyse Multiplate – ASPI	749.1	[672 ; 815]	505 – 1086 AU*min Asaflow + (n = 7)
- Patients sous Aspirine exclus	789.8		
- Sous Aspirine uniquement	484.25	[390 ; 578]	
Analyse Multiplate - TRAP	981	[904 ; 1057]	868 – 1473 AU*min

V. Analyse de l'état de phosphorylation de l'ACC au sein du groupe contrôle

Analyse du taux de pACC, au Western Blot, en fonction des diverses caractéristiques démographiques composant la **cohorte Contrôle** (n = 47). Existe-t-il une différence de pACC avec les comorbidités principales ?

NB : À ce jour (avril 2020), les analyses laboratoires de l'état de pACC en notre possession sont de 36 sur les 47 patients de la cohorte Contrôle.

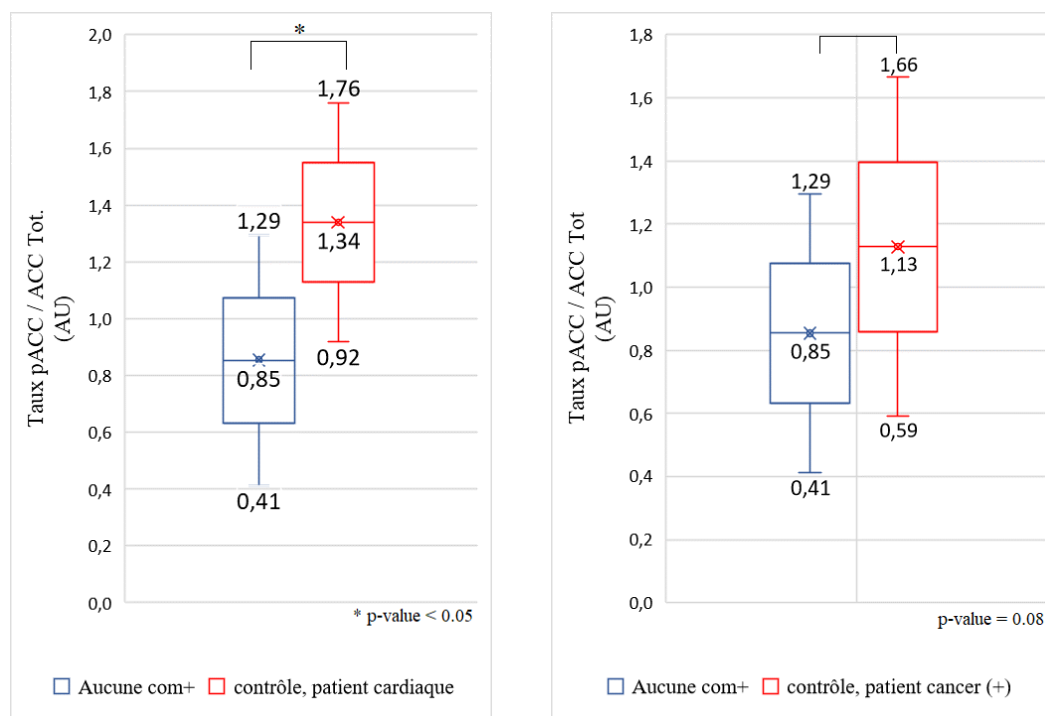
[Table 6a] Bilan :

Taille effectif	Catégorie étudiée : Cohorte Contrôle (36/47)	Moyenne pACC / ACC Tot (AU)	IC 95% [inf ; sup]	Différence statistiquement significative ? <i>pACC/ACC Tot des moyennes > 0.15</i>
n = 12	Patients sains (aucune comorbidité)	0.853	[0.41 ; 1.29]	Valeur contrôle (patients sains) C'est à cette catégorie que les autres sous-cohortes sont comparées.
n = 24	Tous patients présentant au moins 1 comorbidité	1.31	[0.8 ; 1.85]	⇒ Pas de différence significative Test ANOVA (Student et Fisher négatifs)
n = 13	Patients oncologiques <i>Cancer actif, et/ou antécédant (+)</i>	1.128	[0.59 ; 1.67]	p-value = 0,08 ⇒ Pas de différence significative (tendance) Test ANOVA (positif)
n = 14	Maladies cardiovasculaires <i>Cardiaques, ± hypertendu et/ou diabétique</i>	1.34	[0.92 ; 1.76]	p-value < 0.05 (0,041) ⇒ Différence significative Test ANOVA (positif)
n = 7	IRC	1.59	[0.59 ; 2.58]	Pas de différence significative <i>Non interprétable</i>

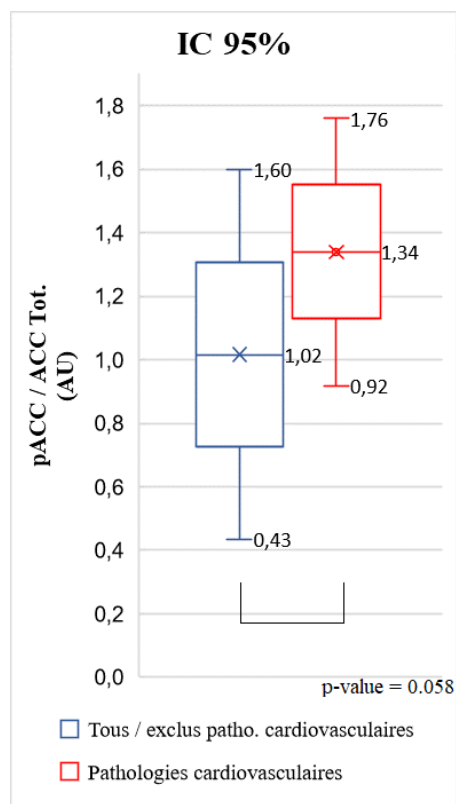
[Table 6b] Analyse du taux de pACC par rapport aux sexes (Cohorte Contrôle) :

n = 21	Sexe	H	1.14	[0.58 ; 1.71]	Pas de différence significative entre ces deux groupes
n = 15		F	1.25	[0.68 ; 1.83]	

[Figure 9] : Évaluation du taux de pACC au sein de la cohorte Contrôle en fonction des comorbidités, IC (95%).



[Figure 10] : Nouvelle comparaison du groupe « patients cardiovasculaires » :



Cette dernière [Figure 10] ci-contre compare :

- Tous les patients présentant une comorbidité cardio-vasculaire (m = 1.34, SD = 0,55 et n = 14).
- Tous les autres patients inclus, à l'exclusion des patients atteints de comorbidités cardio-vasculaires, (m = 1.02, SD = 0.58 et n = 22).

⇒ L'analyse statistique de Fisher est positive. On dénote une tendance de différence des deux cohortes, non stricto-sensu significative, étant donné une p-value = 0.058 ; probablement dû au manque de participants et également à la moyenne haute d'autres comorbidités, (tels que les patients oncologiques).

V. DISCUSSION ET PERSPECTIVE

Constitution de la cohorte Contrôle et intégration dans l'étude clinique PLACCSEPS

a. Équivalence des deux cohortes : Contrôle prospective et Chocs Septiques rétrospective

Les cohortes étudiées Contrôle prospective et Chocs Septiques rétrospectifs présentent des caractéristiques démographiques très intéressantes lorsqu'on le compare aux études épidémiologiques *reprises dans ce manuscrit*. En effet, on observe que la population a une moyenne d'âge (~ 63ans pour les contrôles et 67 ans pour les chocs septiques) se rapprochant du pic d'incidence de la population atteinte dans cette maladie (70-75 ans). Les comorbidités y sont également bien représentées, nous avons mis en évidence les hauts degrés d'associations lorsque le malade présente une ou plusieurs comorbidités tel que les patients cardiaques, oncologiques, IRC, immunodéprimés (dont les diabètes), ... avec le haut taux de mortalité ou les facteurs de risque de faire un choc septique.

Nous remarquons que la comorbidité « Cardiopathie ischémique » de la population contrôle compte moins de la moitié (15.2%) de participants par rapport à la cohorte préliminaire Chocs Septiques (36%). Ceci s'explique majoritairement du fait que pour une grande partie des patients cardiopathes recrutés étaient sous traitement anticoagulants. *Ce dernier étant un des critères d'exclusions*.

La cohorte contrôle ne compte pas encore le nombre total de participants (47/53), En effet, la cohorte Contrôle devra être ajustée à la cohorte PLACCSEPS prospective en fin de période de recrutement. Un des buts sera de recruter certains profils particuliers [dont surtout celui-ci : malades coronariens *et qui ne sont évidemment pas encore sous traitement anticoagulant*].

La cohorte contrôle présente un taux de patients oncologiques non négligeable (32.6%) et supérieur à la cohorte préliminaire (22%). Les patients cancéreux sont souvent amenés à devoir effectuer des contrôles sanguins plus régulier ; Tant pour le suivi de la maladie que pour le suivi des effets des traitements administrés.

b. Réalisation en milieu hospitalier, avantages et inconvénients

- En termes d'expertises vis-à-vis des analyses effectuées, les taux d'erreurs sont minimisés. Chaque patient a été traité individuellement, sans délais ; par des professionnels dans leurs domaines respectifs.
- En termes de commodités vis-à-vis du patient. Tout a eu lieu au même endroit et au même moment. Cela n'occasionne ni perte de temps, ni implication financière. De plus, il peut confier l'acte du prélèvement à un personnel médical aguerri. Il est évidemment couvert par l'assurance à charge de l'investigateur et assuré de la confidentialité de ses divulgations.
- En termes de brassage de la population (database contrôle). Il semble similaire à celui d'une population d'un cabinet de généraliste (MG), comme en atteste les résultats des analyses biologiques que nous détaillerons ci-bas. D'autant plus qu'une partie des patients contrôles se sont rendus au centre de prélèvements suite à la demande du MG. D'un autre côté, en milieu hospitalier, nous avons eu l'avantage de recruter plus facilement les profils de patients requis pour concorder avec les caractéristiques démographiques imposées, ce qui peut expliquer les différences de certains résultats biologiques hors des valeurs des références internationales.

c. Variations des résultats biologiques (détails et hypothèses)

Sur base de la [Table 5], nous concluons aux résultats des valeurs obtenues aux tests biologiques que la plupart des moyennes respectives à leur catégorie propre sont incluses dans les normes de références internationales.

Interprétations de certains résultats biologiques :

- La **CRP** montre une moyenne élevée (5.3 mg/L) et une limite supérieure de l'IC (95%) plus élevée que la référence (< 6.0 mg/L). Ceci peut s'expliquer du fait que le laboratoire ne détaille pas en décimale un taux de CRP < 1mg/L. Pour calculer la moyenne de la catégorie CRP, chaque échantillon présentant un taux < 1mg/L (n = 10) a été considéré comme 0.999 mg/L. Nous avons pris la valeur extrême haute pour minimiser le risque d'erreur.
- Les **D-dimères** sont supérieures (714,3 µg/L) par rapport à l'intervalle de référence (< 500 µg/L). Pour calculer la moyenne de la catégorie D-dimère, chaque échantillon présentant un taux < 250 µg/L (n=14) a été considéré comme 249,99 µg/L ; *pour les mêmes raisons que les analyses de la CRP*. De plus, notre cohorte présente un taux de patients cancéreux non négligeable (32.6%) pouvant expliquer ce résultat.

- Les **analyses lipidomiques** (Triglycérides, taux de cholestérol total, LDL- et HDL-cholestérol) dans les limites hautes avec souvent des IC 95% dont la limite haute dépasse les références. Ces résultats peuvent s'expliquer par plusieurs facteurs. Le fait que la cohorte comprend un taux de patients diabétiques (24 %), des facteurs de risques de comorbidités tels que le tabac et l'alcool (20.7%) non négligeables et enfin une moyenne d'âge de la population de > 62 ans.
- **Analyse Multiplate®** présente des valeurs incluses dans les normes de référence.
 - Le **test ASPI** est intéressant à interpréter lorsqu'on étudie les résultats avec / sans les données de patients sous Asaflow. On mesure de l'effet significatif de ce traitement sur les résultats de ce test, traduisant l'effet de l'Asaflow sur l'agrégation plaquettaire.
 - On ne peut pas tirer les mêmes conclusions sur le test ADP (Ticagrélor, Plavix, ...) parce que la cohorte ne présente pas assez / pas du tout de patients sous ce type de traitement.

Analyse de la phosphorylation ACC au sein de la cohorte contrôle

Cette analyse souffre malheureusement du petit nombre de patients inclus dans cette cohorte (n = 36) et donc un défaut de puissance. Pour rappel, c'est une cohorte prospective dont les analyses du pACC sont, à ce jour, en cours d'élaboration.

Nous pouvons cependant en tirer plusieurs conclusions :

- Chez les malades cardiovasculaires [patients cardiaques, ± hypertendus et/ou diabétiques] : on détecte un taux plus élevé (> 0.15 AU) du taux de phosphorylation de l'ACC, et ce de manière statistiquement significative, avec une moyenne de 1.34 [IC (95%) : 0.92 - 1.76], p-value < 0.05 (0,041) lorsqu'on compare le taux de pACC des patients du groupe contrôle sans aucune comorbidité : 0.853 [IC (95%) : 0.41 - 1.29]. Par cet élément, nous reproduisons les résultats connus de l'étude de S. Kautbally (2019) ⁽⁴¹⁾. En effet chez les patients coronariens, ils avaient objectivé également un taux plus élevé de l'état de phosphorylation ACC plaquettaire.
- On détecte une tendance du taux de pACC plus élevé au sein de la comorbidité : patients oncologiques. Ceci n'a pas encore fait mention dans aucune étude, seul l'étude PLACCSEPS pourrait confirmer cette tendance. En ce qui concerne le taux de pACC des IRC, il est ininterprétable parce qu'il y a trop peu de sujets (n = 7), (p-value > 5%), et l'IC (95%) large.

L'hypothèse issue de l'étude de S. Kautbally (2019) ⁽⁴¹⁾ est, aux vues des résultats, à nouveau évoquée ; Quant à l'évaluation du taux de pACC plaquettaire chez les patients atteints de maladies cardiovasculaire et d'événements thrombotique artériel (dont le syndrome coronarien aigu). L'analyse du taux de pACC pourrait en outre identifier les patients à risque de maladie coronarienne ou bien de constituer un critère biologique de gravité rapidement dosable en laboratoire.

Conclusion et perspectives

La cohorte Contrôle, aboutie, est comparable à la cohorte rétrospective Chocs Septiques. Vu l'objectif principal d'équivalence de la cohorte Contrôle avec la cohorte rétrospective, un certain taux de comorbidités au sein de la population contrôle s'est imposé justifiant que certains résultats biologiques liés aux comorbidités sont dans les limites / hors des valeurs des référentiels.

Enfin, nous avons détecté une différence du taux pACC significative au sein de la population présentant des maladies cardio-vasculaires de la cohorte contrôle, et ce vis-à-vis des patients sans aucune comorbidité *de cette même cohorte*. Nous ne pouvons pas tirer plus de conclusion statistique sur ce point pour le moment.

En conclusion, les infections (dont la réaction du choc septique) sont par essence même un des premiers challenges pour la survie des êtres vivants. Le choc septique est un des problèmes majeurs de la santé publique mondiale, dont à ce jour aucun traitement spécifique n'existe.

Tout cela nous encourage à progresser dans la recherche scientifique clinique pour intégrer ces connaissances pour la prise en charge médicale spécialisée (et globale) de la pathologie du choc septique. L'ACC phosphorylée pourrait à l'avenir devenir un biomarqueur utile pour estimer l'état de la réactivité plaquettaire ainsi que la coagulation sanguine d'une manière plus générale et peut être dans le futur pouvant être impliqué dans les thérapies spécifiques du choc septique.

ANNEXE 1

Étude d'équivalence entre les cohortes Rétrospective Chocs Septiques et Contrôle

Cette étude a pour objectif de prouver de manière statistique que la *cohorte Contrôle* recrutée soit comparable à la *cohorte rétrospective des Chocs Septiques* vis-à-vis des principales caractéristiques (profils cliniques et sexes) qui les composent. Autrement dit, l'intérêt de cette étude est focalisé sur le principe de procès d'équivalence. Ce point décrit les méthodes statistiques de ce type d'étude, dont ^(a, b) la déclaration CONSORT (Consolidated Standards of Reporting Trials) a standardisé son utilisation (méthodologie, analyse et interprétation) pour la communauté scientifique.

Nous allons comparer tous les représentants des caractéristiques principales ¹ (ainsi que leur sexe) dans les deux échantillons. Une moyenne pour chaque échantillon en est extraite, accompagnée de l'intervalle de confiance bilatérale respective, IC (95%). L'équivalence est établie si l'IC 95% de la cohorte contrôle est entièrement incluse entre les valeurs seuils (supérieure et inférieure) prédéterminées.

Vu que le Δ maximum accepté est de 8 %, on considérera que l'IC 95% de la *cohorte Contrôle* doit être comprise entre les bornes limites Δc de $\pm 4\%$ par rapport à la moyenne (26.6%) des comorbidités et caractéristiques principales représentatives de la *cohorte Chocs Septiques*. Les bornes d'équivalences Δc sur le schéma ci-dessous :

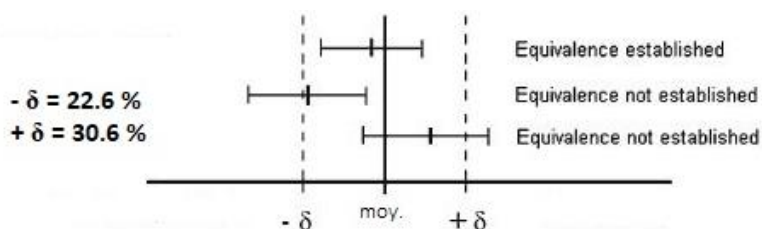


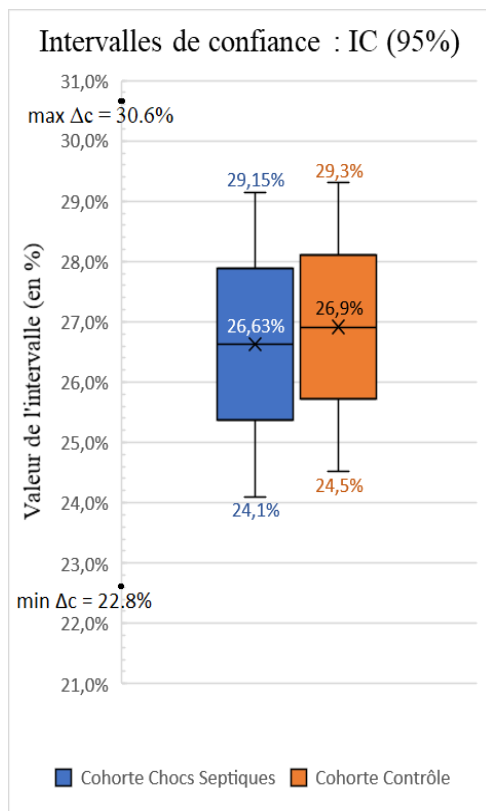
Figure adaptée de : ^(b) Walker E., et al. (2010) *Understanding Equivalence (...) Testing. J of Gen Internal Med.*

Pour considérer cet objectif pour acquis, nous définissons une différence maximale de 8 % ($\Delta \pm 4\%$) des caractéristiques étudiées au sein des deux cohortes. Pour ce faire l'étude doit fournir une puissance de 80% avec un niveau de signification de 5% ($p\text{-value} \leq 0.05$) et être constituée de minimum 94 patients, 47 dans chaque cohorte. Ceci a été calculé avec le logiciel : The **R** Project for Statistical Computing, téléchargeable via le SMCS (support en méthodologie et calcul statistiques) appartenant aux plateformes technologiques de UCLouvain ².

¹ Les comorbidités les plus représentatives sont : facteurs de risques (tabac et alcool), HTA, diabète, cardiopathies ischémiques, patients oncologiques, BPCO et enfin l'insuffisance rénale (stade II).

² La proportion d'abandons anticipés est nulle puisque toutes les données sont récoltées le jour-même, le patient Contrôle recruté ne sera plus sollicité pour le reste de l'étude.

[Figure i] : Résultat de l'étude d'équivalence des caractéristiques démographiques composant les cohortes : Contrôle (n = 47) et Chocs Septiques (n = 150).



- Les analyses statistiques T-test et F-test démontrent qu'il n'y a **pas de différence statistiquement significative** dans l'analyse **des caractéristiques démographiques constituant des deux cohortes**, avec une p-value < 0,05.
- La cohorte finale Contrôle présente une **moyenne (26.9%)**. Cette moyenne est comprise dans l'intervalle de confiance **[IC (95%) : 24.1% - 29.15%]** de la cohorte Chocs Septiques.

L'intervalle de confiance **[IC (95%) : 24.5% - 29.3%]** de la cohorte Contrôle est largement comprise dans les **bornes limites Δc** de ± 4% par rapport à la **moyenne (26.6%)** des comorbidités principales représentatives de la cohorte Chocs Septiques. Fort d'une puissance de 80% car l'effectif total est supérieur aux 94 patients (calculés).

➔ **Ceci atteste l'équivalence des deux cohortes.**

Références – ANNEXE 1

- Piaggio G., Elbourne D. R., CONSORT Group, et al. (2006). *Reporting of Non inferiority and Equivalence Randomized Trials.*, Journal of the American Medical Association 295(10), 1152.
- Walker E., et Nowacki A. S., (2010). *Understanding Equivalence and Noninferiority Testing.* Journal of General Internal Medicine, 26(2), 192–196.

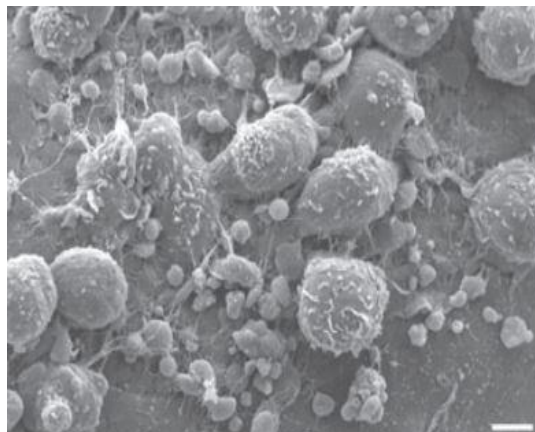
ANNEXE 2

Mécanisme du « Neutrophil Extracellular Traps » (NET)

(a, b) Les trois composants principaux du piège (NET) sont : neutrophile (PMN), bactérie et thrombocyte. Les composants de surface microbiens reconnaissent des *molécules adhésives de la matrice* (MSCRAM – « *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules* ») pour adhérer au tissu et infecter l'hôte. La glycoprotéine (GPIIb-IIIa) a une fonction dans l'adhésion : thrombocyte – bactérie. Le contact s'établit grâce aux MSCRAM qui se lient, soit indirectement via le fibrinogène ou la fibronectine, soit directement à la GP plaquettaire.

(c) L'inflammation stimule la cellule neutrophile à migrer vers le tissu infecté. Le neutrophile est connu pour deux procédés bactéricides : la phagocytose et la dégranulation (de produits cytotoxiques). Le piège extracellulaire neutrophilique (NET) est le troisième procédé de défense a été mis au jour^(c).

[Figure 2.1] « NETose » :



Microscope électronique, issu de ^(a) Schultz C., et al. (2013) JTH.

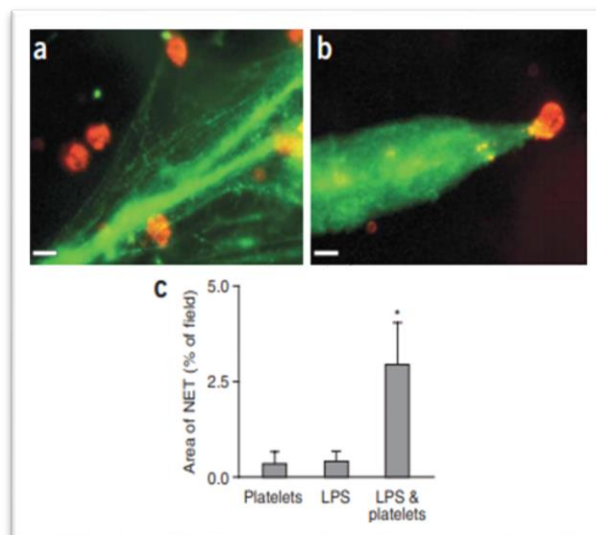
NETose est la formation d'une matrice de réseau de fibrines extracellulaires composé de peptides et enzymes endogranulaires ainsi que des éléments endonucléaire ; Dont la chromatine et les histones qui ont un rôle essentiel dans la structure. Ces éléments participent à la formation d'un piège à bactéricide de la microcirculation, suite à un processus actif (PMN activés).

(a, c, d) Par ce mécanisme NET, la plaquette sanguine exerce un rôle immunitaire *de type inné* non négligeable dans les situations de septicémies graves. Plus qu'un piège amorphe « comparable à un simple filet », le NET est plutôt une structure avec des propriétés bactéricides propres. *De fait, le neutrophile relargue des enzymes granulaires : tels que la myéloperoxydase, élastases et d'autres protéines bactéricides.*

(d) Pour exemple : Citons la *fibronectine binding protein* (FnbpA) en surface du Staphylocoque doré, ou bien l'antigène (SdrG) du *S. Epidermidis*, qui établissent un contact direct avec la GPIIbIIIa. Plusieurs espèces bactériennes peuvent se lier pareillement avec la GPIb α (et le vWF de manière indirecte).

^(d) Lorsque l'expérience suivante est réalisée dans les conditions *in vivo* (sepsis vasculaire), elle met en évidence une meilleure quantité et efficacité des réseaux NET, comparativement à un milieu non septicémique. Le taux de formation du réseau NET nécessite la participation de plaquettes activées [via le TLR4 par les lipopolysaccharides (LPS)] ; puisque, dans les études *in vitro* ^(c) sans thrombocytes, le même taux de LPS n'induit pas la formation du piège de fibrine. Si bien que, dans les études *in vivo*, il faut une activation thrombocytaire (via LPS) pour induire le NET ^(c, d).

[Figure 2.2] ^(c) : Formation des NET.



^(c) Brinkmann V., et al (2014) NET kill bacteria. *Science*.

Détails, à propos de la [Figure 2.2] : Échelle : 10 µm [équivalent la barre blanche (Fig.2.2a et b)].

- Dans la **figure 2.2(a et b)** nous observons les neutrophiles colorés grâce à un filtre orange au travers un faisceau lumineux blanc, sur fond noir. Le vert fluorescent (Sythox®) colore l'ADN extracellulaire qui formeront le piège extracellulaire neutrophilique (NET).
- La **figure 2.2(c)** : schématise la quantification de NET formé suite aux diverses conditions d'expérimentations ; respectivement : « platelets » Plaquettes inactives, « LPS » du LPS seul et enfin « LPS + plaquettes » (activées dès lors). Ce schéma met au jour une augmentation significative de l'aire NET formée (dans le dernier cas).

Références – ANNEXE 2

- C. Schulz, B. Engelmann, S. Massberg, et al. (2013). *Crossroads of coagulation and innate immunity: the case of deep vein thrombosis*, Journal of Thrombosis and Haemostasis, 11, 233-241
- Patti J. M., et Höök M. (1994). *Microbial adhesins recognizing extracellular matrix macromolecules*. Current Opinion in Cell Biology, 6(5), 752-758.
- Brinkmann V. (2014). *Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria*. Science, 303(5663), 1532-1535.
- D. G. Zakinthinos, A. Papanikolaou, M. Theodoridis, et al. (2004). *Sepsis severity is the major determinant of circulating thrombopoietin levels in septic patients*, Critical Care Medicine, 32(4), 1004-1010.

CONSENTEMENT ECLAIRE POUR LE PATIENT

Etiquette du patient

Je soussigné (e) Nom et Prénom :

Patient / Représentant légal / Médecin indépendant

accepte par la présente de participer à la recherche intitulée : Etude de la phosphorylation de l'acétyl-coA carboxylase (ACC) comme témoin d'activation des plaquettes au cours du sepsis, menée par le Professeur Ch. Beauloye.

J'ai lu ce jour la notice d'information, et j'ai bien pris connaissance de l'objectif de l'étude et des bénéfices attendus. Les conditions de sa réalisation m'ont été clairement indiquées par le médecin cité plus haut ou son représentant.

En retour de ma participation, j'ai été avisé que je ne recevrai aucune indemnité.

Je connais la possibilité qui m'est réservée de refuser mon consentement ou de le retirer à tout moment quelle qu'en soit la raison et sans avoir à le justifier. Mon consentement ne décharge pas les organisateurs de la recherche de leurs responsabilités. Je conserve tous mes droits garantis par la loi.

Les données de cette étude resteront strictement confidentielles. Je n'autorise leur consultation que par les personnes qui collaborent à la recherche, désignées par l'investigateur. J'accepte que les données enregistrées à l'occasion de cette étude puissent faire l'objet d'un traitement informatisé par le promoteur ou pour son compte. J'ai bien noté que le droit d'accès, que m'ouvrent les textes susvisés, pourront s'exercer à tout moment auprès des responsables de l'étude, et en ce qui concerne les données médicales que ce droit peut être exercé soit directement soit par l'intermédiaire du médecin de mon choix.

Les frais occasionnés par l'étude sont à la charge des Cliniques Universitaires Saint Luc de Bruxelles.

Je serai informé des résultats globaux de l'étude par l'investigateur. J'ai lu et reçu un exemplaire de ce formulaire et j'accepte de participer au présent protocole.

Fait à Bruxelles, le ... /... /.....

Signature du patient, de son représentant légal ou
Médecin indépendant

Signature de l'investigateur

Références - Bibliographie

1. Dellinger R.P., Carlet J.M., Levy M., *et al.* (2013) *Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock*. Critical Care Medicine, 2014, 32 pp. 580-613.
2. Kaukonen K-M., Bailey M., Pilcher D., *et al.* (2015) *Systemic Inflammatory Response Syndrome Criteria for Severe Sepsis*. New England Journal of Medicine. 2015; 372 :1629-38
3. Singer, M., Deutschman, C. S., Seymour, C.W., *et al.* (2016). *The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)*. Journal of the American Medical Association, 315(8), 801.
4. Marshall J.C., (2000) *SIRS and MODS: what is their relevance to the science and practice of intensive care?* Shock 2000 Dec ; 14(6) : 586-9.
5. Knaus W.A., Draper E.A., Wagner D.P. *et al.* (1985). *APACHE II: a severity of disease classification system*. Critical Care Medicine. 13(10), 818–29.
6. Calderari B. et Liaudet L. (2010). *Mécanismes physiopathologiques impliqués dans la dysfonction d'organes au cours du sepsis*, Revue Médicale Suisse ; 6 : 2406-9.
7. Télion C. et Carli P. (2001). *États de choc et remplissage*, Département d'anesthésie-réanimation, Samu de Paris, hôpital Necker-Enfants-Malades, 75743 Paris.
8. Leconte, P., Potel, G., Baron, D., *et al.* (2001). *Emergency antibiotic prescription in the emergency room*. Réanimation, 10(7), 673–678.
9. Casanova, J.-L., et Abel, L., (2004). *The human model: a genetic dissection of immunity to infection in natural conditions*. Nature Reviews Immunology, 4(1), 55–66.
10. Sørensen T.I., Andersen P.K., Nielsen G.G., *et al.* (1988) *Genetic and Environmental Influences on Premature Death in Adult Adoptees*, The New England Journal of Medicine; 318 :727-732.
11. Marshall J. C., (2013). *The PIRO (predisposition, insult, response, organ dysfunction) model. Toward a staging system for acute illness*. Virulence, 5(1), 27–35.
12. Gaieski D.F., Edwards J.M., Kallan M.J., *et al.* (2013) *Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States*. Critical Care Medicine. 2013 ;41(5) :1167-1174.
13. Torio C.M., et Andrews R.M., (2013). *National inpatient hospital costs: the most expensive conditions by payer, 2011. Statistical Brief #160*. Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP) Statistical Briefs. Updated in October 31, 2015.
14. Members of American College of Chest Physicians (1992). *Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis*. Conference of Society Consensus. Critical Care Medicine. 20: 864–74.
15. Sinapidis D., Vassileios K., Vassileios V., *et al.* (2018) *Progression into sepsis: an individualized process varying by the interaction of comorbidities with the underlying infection*. BMC Infectious Diseases (18): 242
16. Iwashyna T.J., Ely E.W., Smith D.M., *et al.* (2010) *Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis*. Journal of the American Medical Association. 2010 ;304(16) :1787-1794.
17. Reinhart, K., Bauer M., Riedemann, N. C., *et al* (2012). *New Approaches to Sepsis: Molecular Diagnostics and Biomarkers*. Clinical Microbiology Reviews, 25(4), 609–634.
18. Reinhart, K., Turnbull, I. R., Vincent, J.-L., *et al.* (2016). *Sepsis and septic shock*. Nature Reviews Disease Primers, 2, 16045.
19. Ghoshal K., et Bhattacharyya M. (2014). *Overview of Platelet Physiology: Its Hemostatic and Non-hemostatic Role in Disease Pathogenesis*. The Scientific World Journal, 1–16
20. Janeway C.A. et Murphy K., (2018) *Immunobiologie de Janeway*, 4^{ème} Édition de Boeck. 7, 45-53.
21. Van Hinsbergh V. W., (2011). *Endothelium - role in regulation of coagulation and inflammation*. Seminars in Immunopathology, 34(1), 93–106.

22. Damien, P., Payraastre, B., Spinelli, S. L., *et al.* (2017). *NF- κ B Links TLR2 and PAR1 to Soluble Immunomodulator Factor Secretion in Human Platelets*. *Frontiers in Immunology*, 8 : 85.
23. Aird W. C. (2003). *The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome*. *Blood*, 101(10), 3765–3777.
24. Gimbrone M. A. Jr., (1986). *Vascular endothelium in hemostasis and thrombosis*. Churchill Livingstone, 1–13.
25. Zheng, X. L. Majerus E.M., Sadler J.E., (2013). *Structure, function and regulation of ADAMTS-13 protease*. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 11, 11–23.
26. Levi M., de Jonge E., Meijers J., *et al.* (2002). *The diagnosis of disseminated intravascular coagulation*. *Blood Reviews*, 16(4), 217–223.
27. Marshall J. C., Vincent J.-L., Fink M. P., *et al.* (2003). *Measures, markers, and mediators: Toward a staging system for clinical sepsis. A Report of the Fifth Toronto Sepsis Roundtable*, *Critical Care Medicine*, 31(5), 1560–1567.
28. Levy M., (2011). *Biomarkers in the Critically Ill Patient*, *Critical Care Clinics*, Volume 27-2, 1st Edition.
29. Kelley-Hedgpeeth A., Matthews K.A., Colvin, A., *et al.* (2008). *Ethnic Differences in C-Reactive Protein Concentrations*. *Clinical Chemistry*, 54(6), 1027–1037.
30. Gaffney P. J., (1975). *Distinction between fibrinogen and fibrin degradation products in plasma*. *Clinica Chimica Acta*, 65(1), 109–115.
31. Nougier C. et Marijon A., (2012). *Caractéristiques immuno-analytiques des D-dimères*. *Immuno-Analyse & Biologie Spécialisée*, 27(2), 83–88.
32. Zani I., Stephen S., Mughal N., *et al* (2015). *Scavenger Receptor Structure and Function in Health and Disease*. *Cells*, 4(2), 178–201.
33. Ferré, P., et Foufelle, F. (2007). *SREBP-1c Transcription Factor and Lipid Homeostasis: Clinical Perspective*. *Hormone Research*, 68(2), 72–82.
34. Brownsey R. W., Boone A. N., Elliott J. E., *et al.* (2006). *Regulation of acetyl-CoA carboxylase*. *Biochemical Society Transactions*, 34(2), 223–227.
35. Lannan, K. L., Spinelli, S. L., Blumberg, N., *et al.* (2017). *Maresin-1 induces a novel pro-resolving phenotype in human platelets*. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 15(4), 802–813.
36. Wei J., Zhang Y., Rudolph M.J., *et al.* (2016). *A unified molecular mechanism for the regulation of acetyl-CoA carboxylase by phosphorylation*. *Cell Discovery*, 2(1604).
37. Lepropre S., Kautbally S., Onselaer M.-B., *et al.* (2018). *AMPK-ACC signaling modulates platelet phospholipids content and potentiates platelet function and thrombus formation*. *Blood*, 8(31), 503.
38. Wong R. H.F., et Sul H. S. (2010). *Insulin signaling in fatty acid and fat synthesis: a transcriptional perspective*. *Current Opinion in Pharmacology*, 10(6), 684–691.
39. Karon B. S., Tolan N. V., Wockenfus A.M., *et al.* (2014). *Precision and Reliability of 5 Platelet Function Tests in healthy volunteers and donors on daily antiplatelet agent therapy*. *Clinical Chemistry*, 60(12), 1524–1531.
40. Hnasko, T. S., et Hnasko, R. M. (2015). *The Western Blot*. *Methods in Molecular Biology*, 1318: 87–96.
41. Kautbally S., Lepropre S., Onselaer M.-B., *et al.* (2019) *Platelet Acetyl-CoA Carboxylase phosphorylation. A risk stratification marker that reveals platelet-lipid interplay in coronary artery disease patients*. *Journal of the American College of Cardiology*, 04; 005.
42. Stahmann N., Woods A., Carling D., *et al.* (2006). *Thrombin Activates AMPK in Endothelial Cells Involving Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Kinase β* . *Molecular and cellular Biology* 26(16): 5933–5945.

