

Purification sanguine au cours du choc septique

Thomas Rimmelé

▶ **To cite this version:**

Thomas Rimmelé. Purification sanguine au cours du choc septique. Médecine humaine et pathologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2010. Français. NNT : 2010LYO10093 . tel-00809032

HAL Id: tel-00809032
https://theses.hal.science/tel-00809032

Submitted on 8 Apr 2013

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.

N° d'ordre : 93 Année 2010

THÈSE

présentée devant

l'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD – LYON I

pour l'obtention du

DIPLÔME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

Présentée et soutenue publiquement le 23 Juin 2010

par le

Docteur Thomas RIMMELÉ

Purification sanguine au cours du choc septique

Ecole doctorale : EDISS (Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé)

Directeur de thèse : M. le Pr Bernard ALLAOUCHICHE

Jury : M. le Pr Samir JABER, président
M. le Pr Jérôme ÉTIENNE, examinateur
M. le Pr Claude GUÉRIN, examinateur
Me. le Pr Carole ICHAI, rapporteur
M. le Pr Didier JOURNOIS, rapporteur

REMERCIEMENTS

À Monsieur le Professeur Bernard ALLAOUCHICHE

C'est toi qui m'as amené jusqu'ici ! Sois assuré de mon éternelle reconnaissance. Travailler à tes côtés me fera toujours progresser et j'aimerais progresser pendant encore de nombreuses années…

À Monsieur le Professeur Samir JABER

Vous présidez ce jury et c'est un immense honneur pour moi. L'axe Montpellier-Lyon créé il y a quelques années est une bénédiction pour nous. Je souhaite exprimer ici toute ma gratitude ainsi que le profond respect que j'ai pour vous.

À Madame le Professeur Carole ICHAI

Vous avez accepté d'être l'un des rapporteurs de cette thèse et je vous en remercie très sincèrement. C'est toujours un très grand plaisir de vous rencontrer et de vous écouter en congrès.

À Monsieur le Professeur Didier JOURNOIS

Vous avez également accepté d'être l'un des rapporteurs de cette thèse et j'en suis très touché. Vous êtes tout simplement ma référence dans ce domaine de l'épuration extracorporelle.

À Monsieur le Professeur Jérôme ÉTIENNE

Merci de siéger dans ce jury. Merci également pour toute l'aide que vous nous apportez dans la réalisation de nos travaux chez les animaux septiques.

À Monsieur le Professeur Claude GUÉRIN

Vous me faites l'honneur d'être présent aujourd'hui et de juger ce travail. Recevez mes plus chaleureux remerciements. J'espère vraiment que nous collaborerons dans le futur.

Merci également :

- À ma famille
- À Stéphanie
- Au Professeur Dominique CHASSARD qui a co-dirigé cette thèse
- Au Professeur John KELLUM et mes nouveaux collègues et amis « Pittsburgers »
- Au Docteur Charles BER
- Aux Docteurs Mathieu PAGE, Davy HAYI-SLAYMAN, Emanuele MANCONI, Nasser ASSADI, Farida BENATIR, Pierre-François WEY, Nicolas BERNARD, Mathilde CATTENOZ, Olivier DESEBBE, Catherine KAMINSKI
- Au Professeur Joëlle GOUDABLE
- Au Professeur Jeanne-Marie BONNET, Christian PAQUET et Jean-Yves AYOUB
- À Florence ARNAL, Thibault et Sylvianne
- Au Docteur Olivier DAUWALDER, Annie MARTRA et Martine ROUGIER
- Aux équipes d'anesthésie-réanimation des pavillons C, P et G de l'hôpital Édouard Herriot
- Aux membres des laboratoires GAMBRO-HOSPAL, FRESENIUS et BELLCO (Nicolas SEMENZATO, Hiram RADA, Bernard PUIGBLANQUE, Michel THOMAS, Corine LAMBERT, Henri FOURNIER, Céline PIEKARSKI) pour leur confiance à l'origine de partenariats extrêmement productifs
- Aux Docteurs Monique BRET, Jean-Jacques BAILLON et Françoise CHRISTIN
- Aux Docteurs Marie-Paule BENOIT, Nathalie DIOT et Emmanuelle VIEILLE
- Aux Docteurs Lionel BOUVET et Emmanuel BOSELLI
- Au Docteur Fabrice BRUNEEL
- À Ludo BENARD
- À tous ceux présents aujourd'hui

Ce travail leur est dédié pour leur aide, leur soutien, leur compréhension et leur patience

Résumé en français

Le choc septique est la première cause de mortalité en réanimation. Des techniques extracorporelles de purification sanguine sont aujourd'hui proposées pour améliorer le pronostic de cette pathologie. Leur mode d'action est basé sur l'immunomodulation de la réponse inflammatoire systémique de l'hôte, obtenue principalement par épuration non sélective des médiateurs de l'inflammation. Nous rapportons les résultats de différentes études *in vitro*, animales et cliniques ayant évalué les techniques de purification sanguine suivantes : hémofiltration à haut débit, hémofiltration en cascade, hémofiltration hautement adsorbante, filtration et adsorption couplée, hémoadsorption, et hémodialyse à haute perméabilité.

Ce travail de recherche translationnelle montre que les techniques de purification sanguine sont non seulement capables d'épurer les médiateurs de l'inflammation mais aussi l'endotoxine pour l'hémofiltration hautement adsorbante et l'hémoadsorption. Nous démontrons par ailleurs la faisabilité technique, la sécurité d'application et les intérêts de l'hémofiltration en cascade et de l'hémodialyse continue à haute perméabilité. Les effets hémodynamiques bénéfiques des techniques de purification sanguine sont également retrouvés.

Pour les années à venir, il conviendra d'optimiser les techniques les plus performantes en tenant compte de leurs avantages et inconvénients respectifs. Sur le plan physiopathologique, l'effet plus direct de ces thérapies sur les leucocytes sera à approfondir. Il semble maintenant admis que convection, diffusion et adsorption ne doivent plus être opposés mais plutôt être considérés comme des mécanismes complémentaires.

Résumé en anglais

Septic shock is the main cause of death in the intensive care unit. Extracorporeal blood purification therapies are now being proposed in order to improve septic shock outcomes. These therapies work based on immunomodulation of the host inflammatory response, obtained by non selectively removing inflammatory mediators. We report data from several different studies performed *in vitro*, in animals and in human beings, assessing various blood purification therapies which include high-volume hemofiltration, cascade hemofiltration, high-adsorption hemofiltration, coupled plasma filtration adsorption, hemoadsorption and high-permeability hemodialysis.

This translational research work shows that blood purification therapies are capable of removing not only the inflammatory mediators but also the endotoxins as far as high-adsorption hemofiltration and hemoadsorption are concerned. We demonstrate technical feasibility, safety and advantages of cascade hemofiltration and continuous high-permeability hemodialysis. The beneficial hemodynamic effects related to these blood purification techniques are also highlighted.

For future research, optimization of the most efficient techniques is warranted, taking into account of their respective advantages and drawbacks. Regarding pathophysiology, the direct effect of these therapies on leukocyte function is subject to further investigation. To date, convection, diffusion and adsorption should not be viewed in opposition but rather, seen as complementary mechanisms.

Titre de la thèse en anglais

Blood purification for septic shock

Mots clés en français

- Purification sanguine
- Choc septique
- Hémofiltration à haut débit
- Hémofiltration en cascade
- Hémoadsorption
- Membranes à haute perméabilité
- Filtration et adsorption couplée

Mots clés en anglais

- Blood purification
- Septic shock
- High volume hemofiltration
- Cascade hemofiltration
- Hemoadsorption
- High permeability membranes
- Coupled Plasma Filtration Adsorption

Intitulé et adresse du laboratoire de rattachement

INSERM ERI 22 : Agressions vasculaires - réponses tissulaires (Giampiero Bricca)

Université Claude Bernard Lyon 1, 8 Avenue Rockefeller, 69373 Lyon cedex 08, 69372 Lyon

TABLE DES MATIÈRES

Introduction **9**

I - Concept de purification sanguine au cours du choc septique **11**

II – L'hémofiltration à haut débit **16**

1) **Définition** **16**
2) **Haut débit et suppléance rénale ?** **17**
3) **Haut débit et purification sanguine : études animales** **20**
4) **Haut débit et purification sanguine : études humaines** **22**
5) **Utilisation pratique** **24**

III – L'hémofiltration en cascade **26**

1) **Description de l'hémofiltration en cascade** **26**
2) **Notre modèle porcin de choc septique** **29**
3) **Etude animale évaluant le système cascade** **38**

IV - Hémofiltration à haut débit avec une membrane ayant des propriétés d'adsorption renforcées **47**

V - Autres techniques de purification sanguine **62**

1) **La filtration et adsorption couplée** **62**
2) **L'hémoadsorption** **71**
3) **L'hémodialyse à haute perméabilité** **96**

Conclusions et perspectives **113**

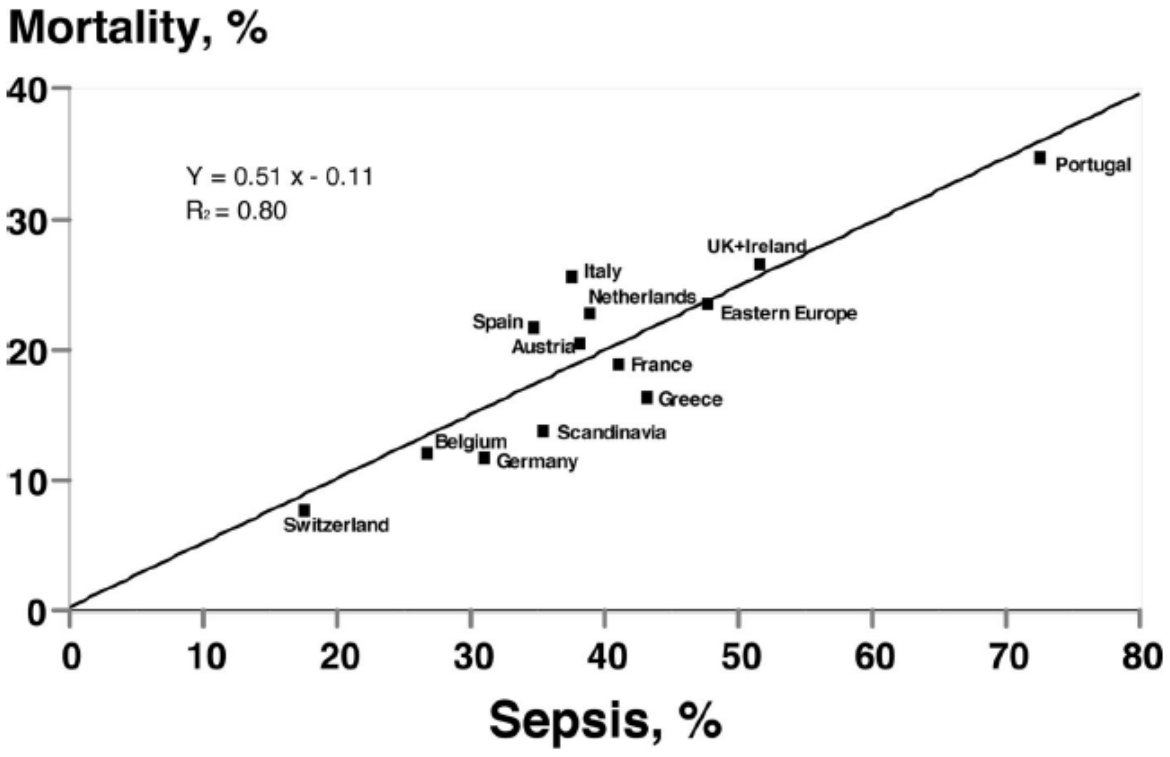
Références **115**

Annexes (format pdf des publications) **129**

Introduction

Le choc septique représente la première cause de mortalité en réanimation avec près de 250 000 décès chaque année aux Etats-Unis (1). Dans les réanimations européennes, plus de 35 % des patients développent un épisode septique durant leur séjour en réanimation (2). Le taux de mortalité de ces patients septiques est alors de 27 %, atteignant 54 % s'il s'agit d'un choc septique (2). La relation existant entre présence d'un sepsis et mortalité hospitalière est aujourd'hui une évidence. Alberti et al. ont rapporté en 2002 chez 15 000 malades européens et canadiens un taux de mortalité hospitalière de 17 % chez les patients non infectés contre plus de 53 % chez les patients développant plusieurs épisodes infectieux lors de leur séjour en réanimation (3). Plus récemment, l'étude européenne SOAP (Sepsis Occurrence in Acutely ill Patients) a montré une corrélation entre le taux de mortalité en réanimation et le taux de sepsis dans différentes réanimations européennes (Figure 1) (2). Enfin, d'après les données fournies par Martin et al. (4), l'incidence du sepsis semble s'accroître au cours du temps et si taux de mortalité du choc septique a très légèrement diminué au cours de ces 20 dernières années grâce aux progrès de la réanimation, il reste toujours > à 50 % mais avec un potentiel de réduction important en cas de découverte de nouvelles thérapies (5).

FIGURE 1. Relation existant entre taux de mortalité en réanimation (tous les patients) et fréquence des sepsis en réanimation dans différents pays européens (d'après (2)).



Depuis plus de 20 ans, les techniques extracorporelles de purification sanguine (« blood purification ») sont proposées comme traitement adjuvant du choc septique avec l'espoir que cette stratégie thérapeutique consistant à immunomoduler la réponse inflammatoire de l'hôte de façon non sélective ait un impact bénéfique sur le devenir de ces patients. D'innombrables études ont été réalisées d'autant plus que les progrès technologiques récents ont permis de diversifier très largement le panel de techniques permettant de faire de la purification sanguine (hémofiltration à haut débit, hémofiltration en cascade, hémofiltration hautement adsorbante, hémoadsoprtion, filtration et adsorption couplée, hémodialyse à haute perméabilité).

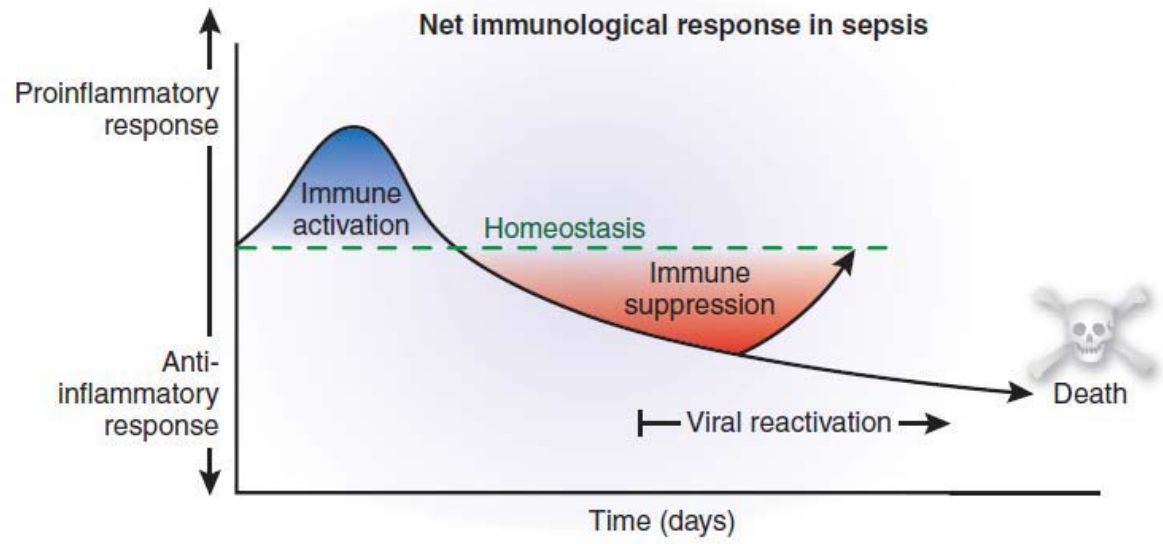
Notre équipe de recherche travaille sur ce domaine de la réanimation depuis quelques années et nous avons expérimenté de nombreuses thérapies, que ce soit au cours d'études *in vitro, ex vivo,* chez l'animal mais également en clinique humaine. L'objectif de ce manuscrit est de présenter ces différents travaux tout en les intégrant au sein de la littérature médicale correspondante.

I – Concept de purification sanguine au cours du choc septique

Au cours d'un choc septique, le système immunitaire est sollicité et de nombreux médiateurs pro- et anti-inflammatoires sont libérés dans l'organisme (6). En effet, une fois dans la circulation sanguine après bactériolyse et compte tenu de leurs propriétés antigéniques, le lipopolysaccharide (composant essentiel de la paroi des bactéries à gram négatif) ou l'acide lipoteichoïque (composant essentiel de la paroi des bactéries à gram positif), activent le système immunitaire afin d'engendrer une réponse immune spécifique. Cette réponse inflammatoire systémique est nécessaire et bénéfique pour l'organisme puisqu'elle est la base des mécanismes endogènes de lutte contre l'agression infectieuse. Cependant, lorsqu'elle est excessive, non contrôlée ou trop déséquilibrée sur le versant pro- ou anti-inflammatoire, elle devient délétère, favorisant le développement de défaillance(s) d'organe avec possible évolution vers un syndrome de défaillance multi-viscérale souvent fatal. Au moins deux mécanismes sont identifiés pour expliquer les effets potentiellement nuisibles de la réaction inflammatoire systémique de l'hôte :

- D'abord, les cytokines inflammatoires ont la capacité d'altérer les cellules voire de les détruire. Ces effets délétères directs sur les différents tissus de l'organisme sont appelés effets cytotoxiques (7). Les effets cytotoxiques des cytokines sont impliqués dans l'apparition des différentes défaillances d'organes au cours du choc septique.
- Ensuite, la libération massive et prolongée dans le temps de médiateurs anti-inflammatoires (IL-10, IL-4, IL-1 receptor antagonist), souvent interprétée comme un mécanisme protecteur pour contrebalancer une phase proinflammatoire plus précoce excessive, conduit en fait à une dysfonction sévère de l'immunité (8), jouant un rôle important sur le plan de la mortalité des patients (9,10). En effet, cet état d'immunosuppression avancé fait le lit d'infections secondaires, nosocomiales, au pronostic sombre en raison de l'impossibilité pour l'organisme de répondre de manière appropriée (état d'immunoparalysie) (Figure 2). Ces infections secondaires peuvent être bactériennes mais également être liées à la réactivation de certains virus dormant tels que le cytomégalovirus (CMV) ou l'herpès simplex virus (HSV) (11,12).

FIGURE 2. Réponse immune observée lors d'un choc septique (d'après (8)).



Le concept de purification sanguine, appelé « blood purification » par les anglons-saxons consiste à essayer de tempérer, d'atténuer cette libération massive de médiateurs pro- et anti-inflammatoires libérés à la phase précoce du choc septique. La restauration d'une « homéostasie inflammatoire » doit alors pouvoir améliorer le devenir et la survie des patients. De très nombreux médiateurs sont impliqués dans cette réponse inflammatoire tels que les cytokines, les chémokines, les différentes fractions du complément, le facteur d'activation des plaquettes, les leucotriènes, les thromboxanes et les kinines (13). Chaque tentative de modulation de cette réponse inflammatoire avec des agents dirigés contre un seul de ces médiateurs s'est soldée par un échec (14). L'injection d'anticorps dirigés contre certaines cytokines s'est même montrée dangereuse (15). C'est pourquoi le concept de purification sanguine a évolué vers une épuration non sélective d'un large spectre de médiateurs inflammatoires à l'aide de techniques extracorporelles.

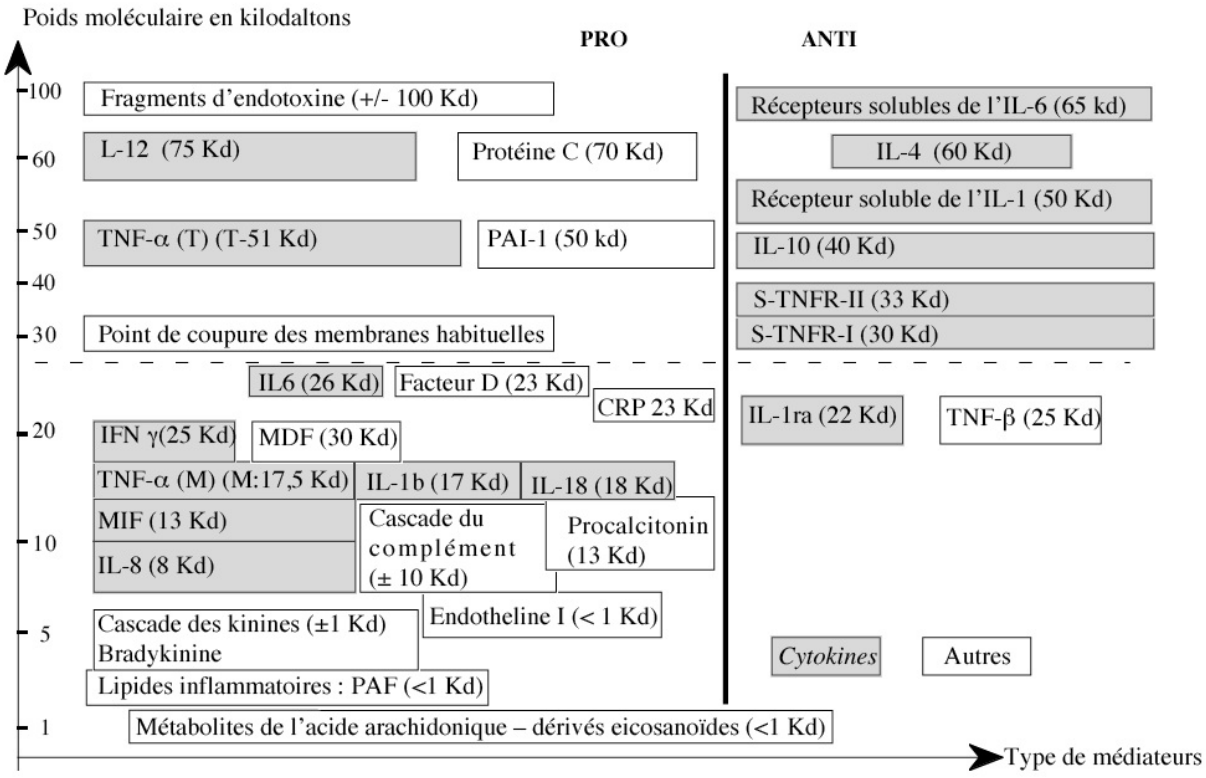
Diverses théories physiopathologiques sont avancées pour supporter le concept de purification sanguine. D'abord, Ronco et Bellomo ont émis l'hypothèse qu'écrêter les pics de concentration des cytokines en les épurant du compartiment sanguin à la phase précoce du choc septique pourrait stopper la cascade inflammatoire et donc limiter les dégâts occasionnés par les cytokines sur les organes. Ainsi, le risque d'évolution du patient vers un syndrome de défaillance multiviscérale serait diminué. Cette hypothèse est

appelée l'hypothèse des pics de concentration ou « the peak concentration hypothesis » et a été proposée en 2003 (16-18). Plus récemment, Honoré proposa l'hypothèse du seuil d'immunomodulation (« the threshold immunomodulation hypothesis »), qui a une vue plus dynamique, postulant que l'épuration des cytokines à partir de compartiment sanguin conduit à l'épuration des cytokines situées au niveau tissulaire en raison d'un équilibre entre ces 2 compartiments (19,20). Cette théorie est intéressante car elle affecte les cytokines situées au niveau tissulaire, c'est à dire là où elles sont nuisibles. Elle est également séduisante car elle apporte une réponse à la question de savoir pourquoi de nombreuses études ayant évalué les techniques de purification sanguine ont retrouvé une amélioration clinique des patients mais sans modification des concentrations sanguines en cytokines. Les cytokines tissulaires remplacent en permanence celles qui sont épurées au niveau sanguin (21,22). Di Carlo et Alexander ont aussi proposé l'hypothèse de la distribution des médiateurs (« the mediator delivery hypothesis ») dans laquelle l'hémofiltration à haut débit est responsable d'une augmentation du débit lymphatique d'un facteur 20 à 40 en raison des volumes élevés de cristalloïdes utilisés pour le liquide de substitution (23-26). Cela entraine un déplacement significatif de médiateurs inflammatoires vers le compartiment sanguin, les rendant libres pour l'épuration. Dans cette théorie, l'hémofiltration à haut débit est non seulement efficace pour épurer les cytokines du sang, mais elle assure aussi le transport lymphatique depuis les tissus et l'interstitium vers le compartiment sanguin. Enfin, des données récentes ont abouti à d'autres hypothèses et théories où il est suggéré que certaines techniques de purification sanguine auraient la possibilité d'agir directement au niveau de la cellule inflammatoire, restaurant la fonction immune par action directe sur les monocytes et les polynucléaires neutrophiles (27-29). En effet, l'hémoadsorption à la polymyxine B serait capable de modifier l'expression de certains marqueurs de surface des leucocytes tels que HLA-DR et CD-16 (30). L'expression d'HLA-DR est diminuée au cours du choc septique notamment lors de la phase d'immunoparalysie, cette baisse d'expression du marqueur étant d'ailleurs fortement associée aux infections secondaires nosocomiales et à la mortalité des patients septiques de réanimation (27,31). L'hémoadsorption agirait donc ici comme un « reprogrammateur » de leucocytes en les rendant à nouveau capables de répondre à une nouvelle agression infectieuse. Reste donc à savoir par quel mécanisme précis l'expression d'HLA-DR est stimulée par l'hémoadsorption. Est-ce une action directe de la polymyxine B sur la cellule inflammatoire ou bien cela intervient-il suite à l'épuration d'IL-10 ? A noter que ces notions de restauration de la réponse leucocytaire avaient déjà été évoquées par Claudio Ronco en 2002 lors de la publication de son étude pilote concernant des patients en choc septique ayant

bénéficié d'une technique de purification sanguine type coupled-plasma filtration adsorption (28). Si ces données sont confirmées, les notions d'indications temporelles des techniques de purification sanguine seraient à rediscuter complètement puisque le timing optimal pour instaurer de telles thérapies ne serait plus uniquement la phase très précoce du choc septique.

Sur le plan physiopathologique, l'exemple de l'hémofiltration à haut débit apparait comme séduisant pour atteindre un niveau important d'épuration de molécules inflammatoires pour diverses raisons. D'abord, ces molécules circulantes sont hydrosolubles et le phénomène de convection assure un transport d'eau plasmatique et de solutés au travers de la membrane semi-perméable selon un gradient de pression hydrostatique. C'est la pression transmembranaire qui existe entre un côté de l'hémofiltre et l'autre qui permet le passage du solvant (eau plasmatique), emportant avec lui selon un flux passif les médiateurs inflammatoires qu'il contient. Ensuite, la plupart des médiateurs inflammatoires sont des molécules dites de poids moléculaire moyen, avec une fourchette de poids moléculaire large (5 à 60 kDa) (Figure 3). Or, la convection est plus efficace que la diffusion pour épurer les moyennes molécules (32). Par ailleurs, selon leur composition, les membranes d'hémofiltration ont aussi des propriétés d'adsorption. Ce phénomène correspond à la fixation saturable des molécules directement sur la membrane selon un gradient d'affinité dépendant d'interactions ioniques, hydrophobiques et de forces de van der Waals. L'ultrafiltrat contient les molécules du plasma qui sont capables de traverser la membrane (poids moléculaire situé au-dessous du point de coupure de la membrane) et le phénomène d'adsorption permet l'épuration des molécules ayant un poids moléculaire supérieur au point de coupure de la membrane. Une très large fourchette de médiateurs est donc théoriquement « épurable » par hémofiltration. Enfin, l'utilisation de hauts débits d'ultrafiltration est important car il a été montré que l'hémofiltration conventionnelle utilisant des débits d'ultrafiltration inférieurs n'était pas efficace pour la purification sanguine (33,34). De plus, élever les débits d'ultrafiltration augmente les propriétés d'adsorption de l'hémofiltre en raison de l'effet sur la pression transmembranaire (recrutement de sites membranaires) et amène à utiliser une large membrane ce qui augmente également la surface d'adsorption (35). De nombreuses études sont venues confirmer que les hémofiltres utilisés en hémofiltration étaient capables d'épurer un très grand nombre de molécules inflammatoires impliquées dans le syndrome septique telles que le TNF-α, l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8, l'IL-1 ra, le platelet activating factor (PAF), le nitric oxide (NO), les leucotriènes et prostaglandines, les thromboxanes et facteurs du complément (36-39).

FIGURE 3. Principaux médiateurs inflammatoires libérés au cours du choc septique. Les poids moléculaires sont indiqués de même que le point de coupure des membranes d'hémofiltration habituellement utilisées en réanimation (d'après Honoré et al., MAPAR 2002)).



II – L'hémofiltration à haut débit

1) Définition

L'hémofiltration à haut débit n'est pas bien définie dans la littérature médicale. Les termes « haut volume », « haute intensité » ou « haut débit » sont employés pour une très large fourchette de débits d'ultrafiltration y compris pour des débits qui n'apparaissent pas comme très élevés. Cette confusion provient en partie du fait qu'un même débit d'ultrafiltration peut être évalué à la fois dans le bras « haut débit » d'une étude et dans le bras « bas débit » d'une autre étude. Par exemple, dans l'étude américaine « Acute Renal Failure Trial Network » (ATN), 35 mL/kg/h est le débit d'ultrafiltration du groupe recevant la stratégie dite intensive alors que dans l'étude de Boussekey et al., ce débit d'ultrafiltration correspond au groupe « bas débit » (40,41).

Récemment, Patrick Honoré ainsi que d'autres experts se sont réunis pour tenter de clarifier la définition de l'hémofiltration à haut débit (42). Ils ont convenu que l'hémofiltration à haut débit englobait l'hémofiltration utilisant des débits d'ultrafiltration de 50-70 mL/kg/h en continu pendant 24 h ainsi que l'hémofiltration utilisant de très hauts débits d'ultrafiltration de l'ordre de 100-120 mL/kg/h pendant une courte période de l'ordre de 4 à 8 h, suivie d'une hémofiltration continue conventionnelle utilisant des débits d'ultrafiltration plus modérés (43). Cette dernière stratégie est aussi appelée hémofiltration à haut débit pulsée (pulse high-volume hémofiltration) et a été initiée par l'équipe de Claudio Ronco (16).

Cette définition reprend en partie les décisions prises au congrès de Melbourne de 2001 ou l'hémofiltration à haut débit avait déjà été définie pour des débits supérieurs à 50 mL/kg/h. L'hémofiltration à très haut débit était proposée pour des débits supérieurs à 100 mL/kg/h. C'est aussi à ce moment qu'il fut décidé d'utiliser le mL/kg/h comme unité de quantification du débit d'ultrafiltration.

2) Haut débit et suppléance rénale ?

Si l'on analyse la littérature concernant l'hémofiltration à haut débit, on s'aperçoit que cette thérapie est utilisée chez 2 catégories de malades bien différentes. Dans un cas, la technique est évaluée clairement sur le versant « purification sanguine » et nous reviendrons plus tard sur cette situation. Dans l'autre, la technique est souvent comparée à des débits plus faibles chez des malades de réanimation présentant un « Acute Kidney Injury » (AKI) et nécessitant une épuration extra-rénale. Cette distinction est fondamentale et permet de mieux préciser la problématique. La deuxième situation correspond en fait à la question de savoir quelle dose de dialyse faut-il apporter à un patient nécessitant une épuration extra-rénale pour AKI. Cette question a donné lieu à de nombreuses études et débats au cours de ces 10 dernières années. Cette problématique se situe bien sûr au-delà du sujet de cette thèse mais il apparait néanmoins important de montrer brièvement que de nombreuses études célèbres associées au terme « haut débit » concernent la question de la suppléance rénale et n'ont en fait rien à voir avec la purification sanguine. Cette franche distinction constitue une nouvelle approche du haut débit puisque les différentes revues de la littérature ne font pas clairement la différence entre les 2 indications, ce qui a pour effet d'entretenir certainement la confusion autour de cette technique.

Au cours de leur séjour en réanimation, 6 % des malades ont recours à une technique d'EER afin de suppléer la fonction rénale suite à un AKI sévère (44,45). Bien que le taux de mortalité de ces patients soit très élevé (50-60 %) (44), la prescription optimale de l'EER n'est toujours pas bien définie. Les questions de modalité, d'initiation, de durée, de stratégie d'anticoagulation, d'adaptation médicamenteuse et de dose de dialyse sont toujours relativement controversées. De ce fait, le traitement des patients ayant une dysfonction rénale aiguë est très praticien dépendant et donc extrêmement hétérogène, tant sur le plan national qu'international (46-48). Néanmoins, on peut avancer que l'hémofiltration continue s'est imposée en tant que thérapie de choix en raison de sa relative bonne tolérance hémodynamique. En effet, l'étude observationnelle, prospective, multicentrique DO-RE-MI a rapporté que parmi tous les patients traités par une seule et unique modalité (technique continue seulement ou bien technique intermittente seulement), 82 % d'entre-eux recevaient une technique continue (49). Cependant, la dose à appliquer à cette technique reste à préciser.

La publication de l'étude de Ronco et al. en 2000 a remis à l'ordre du jour la question de la dose de dialyse pour AKI (50). Dans cette étude italienne monocentrique, un débit d'ultrafiltration de 35 mL/kg/h améliora la survie de patients atteints d'un AKI recevant une hémofiltration continue (post-dilution), comparé à 20 mL/kg/h. Au même moment, Schiffl et al. rapportèrent qu'une hémodialyse intermittente administrée de façon dite « intensive » (journalière) réduisait la mortalité des patients avec AKI, en comparaison à une hémodialyse intermittente plus conventionnelle (1 jour sur 2) (51). Par conséquent, à cette époque, une relation entre dose de dialyse et devenir des patients était hautement suspectée.

Mais les études randomisées contrôlées qui suivirent n'ont pas confirmé ces résultats. Bouman et al. rapportèrent que la survie des patients ainsi que la récupération de leur fonction rénale n'étaient pas différentes chez 106 patients randomisés en 3 différentes stratégies d'EER : hémofiltration à haut débit précoce, hémofiltration à bas débit précoce et hémofiltration à bas débit tardive (52). De la même façon, Tolwani et al. ne retrouvèrent aucune différence en termes de survie et de récupération de la fonction rénale chez 200 patients avec AKI hémodiafiltrés en continu à 35 mL/kg/h versus 20 mL/kg/h en mode prédilution (53). En revanche, Saudan et al. publièrent en 2006 des données intéressantes suggérant que l'augmentation de la dose de dialyse en ajoutant une part de diffusion à une hémofiltration continue améliorait la survie des patients avec AKI. En effet, dans cette étude ayant randomisé 206 patients, la survie à 28 j était significativement augmentée de 39 % (groupe HVVC) à 59 % (groupe HDFVVC) (p = 0,03) et la différence entre les survies à 90 jours était encore plus prononcée (34 versus 59 %, p=0,0005) (54).

Pourquoi toutes ces études randomisées contrôlées n'ont pas obtenu les mêmes résultats ? D'abord, ce sont toutes des études monocentriques (2 centres pour l'étude de Bouman et al.) et donc leurs résultats ont une validité externe limitée. Il est bien établi qu'une intervention testée dans un environnement clinique monocentrique n'est pas forcement généralisable à une large population, particulièrement dans le domaine de la réanimation (55). Ensuite, elles ont toutes été conduites par des experts de l'EER avec une absence d'aveugle, accroissant de façon importante la possibilité d'un effet Hawthorne (des patients appartenant au groupe interventionnel sont consciemment ou inconsciemment mieux pris en charge afin d'obtenir l'effet désiré) (55,56). Par ailleurs, les patients atteints d'AKI dans ces études étaient drastiquement différents. Par exemple, le pourcentage de patients septiques dans l'étude de Ronco et al. était inférieur à 15 % alors qu'il était de 60 % dans l'étude de Saudan. Les taux

de mortalité dans ces études étaient aussi très différents, confirmant l'hétérogénéité des patients en termes de sévérité et la difficulté de les analyser collectivement. Dans l'étude de Bouman et al., la survie à 28 j était inhabituelle, atteignant 70 %. Enfin, la prescription de l'EER était également très différente entre ces études. Le liquide de substitution était parfois administré en post-dilution (études de Bouman et Ronco) et parfois en pré-dilution (études de Saudan et Tolwani), modifiant alors la dose réellement délivrée au patient par rapport à la dose prescrite. Le pourcentage de patients atteignant une dose délivrée supérieure à 80 % de la dose prescrite n'était d'ailleurs pas toujours fourni. Si tous les patients atteignaient des valeurs d'au moins 85 % de la dose prescrite dans l'étude de Ronco, Tolwani et al. reconnaissaient que seulement 77 % de leurs patients atteignaient plus de 80 % de la dose prescrite.

Récemment, les 2 plus larges études multicentriques, prospectives et randomisées jamais réalisées ont été publiées, rapportant des résultats similaires et donc éclaircissant un peu la situation. L'étude ATN, réalisée par « the Veterans Affairs/National Institutes of Health Acute Renal Failure Trial Network », a évalué 1124 patients avec AKI à partir de 27 hôpitaux aux Etats-Unis (41). Les patients étaient randomisés pour soit une stratégie d'EER dite intensive, soit une stratégie appelée conventionnelle. Les patients appartenant à la stratégie dite intensive recevaient une hémodialyse intermittente ou une SLED (sustained low-efficiency dialysis) six fois par semaine et une hémodiafiltration continue à 35 mL/kg/h. Pour les patients du groupe « stratégie moins intensive », l'hémodialyse intermittente et la SLED étaient réalisées 3 fois par semaine et l'HDFVVC était prescrite pour fournir un débit total effluent de 20 mL/kg/h. Aucune différence statistique n'a été observée entre les 2 groupes en termes de mortalité à 60 j, de durée d'EER, de récupération de l'AKI et de récupération d'autres défaillances d'organe. L'étude RENAL a étudié 1500 patients à partir de 30 réanimations australiennes et néo-zélandaises. Les patients avec AKI étaient randomisés pour recevoir une technique d'EER continue à 40 mL/kg/h ou une dose de 25 mL/kg/h (57). Un débit d'ultrafiltration de 25 mL/kg/h représente la pratique clinique quotidienne moyenne en Océanie mais cela est également vrai en Europe et aux Etats-Unis (46,49,58). Les résultats de l'étude RENAL étaient similaires à ceux de l'étude ATN, avec un odds-ratio de 1.0 pour la mortalité à 90 jours. Compte tenu que ces 2 études multicentriques sont de haute qualité méthodologique, elles doivent très probablement être prises en considération pour notre pratique clinique quotidienne.

En conclusion, si l'objectif du réanimateur est de simplement suppléer la fonction rénale d'un patient avec AKI nécessitant une EER, il existe maintenant des données dans la littérature suffisamment convaincantes pour suggérer que l'hémofiltration continue avec des débits d'ultrafiltration de 25 à 35 mL/kg/h est appropriée et suffisante. L'hémofiltration à haut débit ne semble donc pas avoir de place dans cette indication de suppléance rénale pour AKI.

3) Haut débit et purification sanguine : études animales

De nombreuses études animales ont été réalisées afin d'évaluer l'hémofiltration à haut débit, en particulier dans les années 1990, lorsque l'hémofiltration à haut débit n'était pas très sure chez l'homme. Grootendorst et al. ont été des précurseurs dans ce domaine. En 1992, ils ont rapporté une amélioration de la fonction ventriculaire droite et de la performance cardiaque chez 18 porcs en choc septique endotoxinique lorsqu'une hémofiltration à haut débit sans perte de poids était appliquée (débit d'ultrafiltration = 6000 mL/h). Ils ont émis alors l'hypothèse que des médiateurs vasoactifs, responsables de la dépression myocardique, étaient épurés avec l'hémofiltration à haut débit (59). Deux années plus tard, le même auteur démontra dans un modèle porcin d'ischémie-reperfusion digestive que l'hémofiltration à haut débit n'améliorait pas seulement l'hémodynamique à court terme, mais réduisait aussi les lésions macroscopiques du tube digestif retrouvées à l'autopsie tout en améliorant la survie a 24 h (60).

Dans les modèles animaux de pancréatite aiguë, l'hémofiltration à haut débit améliore l'hémodynamique, réverse l'immunoparalysie induite par le sepsis et améliore la survie à 60 h (29,61). De plus, chez des porcs atteints de pancréatite aiguë, Yekebas et al. ont montré l'intérêt sur le plan de la survie de pratiquer de l'hémofiltration à très haut débit (100 mL/kg/h) plutôt que de l'hémofiltration à bas débit (20 mL/kg/h) et de changer les hémofiltres fréquemment (toutes les 12 h) plutôt que pas de changement (29).

Chez des chiens septiques, Bellomo et al. ont rapporté que l'hémofiltration à 80 mL/kg/h améliorait les paramètres hémodynamiques en comparaison à un circuit témoin sans hémofitre. Cette étude montra aussi les effets bénéfiques des propriétés adsorbantes de la membrane d'hémofiltration en polyacrylonitrile utilisée dans cette étude (62). Rogiers et al.

ont confirmé ces résultats chez des chiens en choc septique endotoxinique en montrant une amélioration de la performance cardiaque lorsque l'hémofiltration à haut débit était pratiquée avec une membrane en polyacrilonitrile plutôt qu'une membrane en polysulphone. Cependant, ces effets supposés être en relation avec les propriétés adsorbantes de la membrane étaient temporaires en raison du phénomène de saturation de la membrane (63). Par ailleurs, d'autres résultats intéressants étaient également rapportés dans cette étude tels que la prévention de l'hypertension artérielle pulmonaire dans le groupe hémofiltré comparé au groupe endotoxine sans hémofiltration (63).

D'autres études animales ont évalué l'hémofiltration à haut débit en utilisant de l'ultrafiltrat obtenu à partir d'animaux « donneurs » sains et d'animaux donneurs septiques, perfusé à un animal « receveur » sain. La capacité de l'hémofiltration à haut débit pour épurer les médiateurs toxiques est suggérée par le fait que l'ultrafiltrat obtenu a partir des animaux septiques entrainait des perturbations hémodynamiques voire même la mort des animaux receveurs (64-66). Dans une étude prospective randomisée contrôlée incluant 65 porcs, Lee et al. ont rapporté une augmentation du temps de survie des animaux hémofiltrés comparés aux animaux correspondants non hémofiltrés. Cette augmentation du temps de survie était même directement corrélée à l'augmentation de la fraction de filtration. De plus, l'ultrafiltrat obtenu à partir des porcs septiques hémofiltrés entrainait la mort après perfusion chez des animaux sains alors que la perfusion d'un ultrafiltrat « propre » n'entraînait aucune modification, supportant l'hypothèse que l'hémofiltration à haut débit était capable d'épurer des médiateurs délétères (65).

Bien que la plupart des études animales bien conduites aient montré des résultats tels qu'une amélioration hémodynamique, respiratoire et de la survie, elles doivent cependant être interprétées avec prudence. Il est en effet très difficile d'extrapoler à l'homme des résultats observés avec ces modèles d'animaux septiques. Par exemple, la plupart d'entre eux n'incluent pas d'antibiothérapie et la technique de purification sanguine est habituellement débutée très tôt, à la phase très précoce du choc septique, très peu de temps après l'agression bactérienne, ce qui est très différent de ce qui se passe en clinique.

4) Haut débit et purification sanguine : études humaines

Comme chez les animaux, de nombreuses études humaines ont montré des effets bénéfiques de l'hémofiltration à haut débit sur le plan hémodynamique. Journois et al. ont été parmi les premiers à étudier chez l'homme l'hémofiltration à haut débit en tant que technique de purification sanguine. Leur modèle inflammatoire était des enfants bénéficiant d'une chirurgie cardiaque avec circuit extracorporel cardio-pulmonaire (67,68). Chez 20 enfants, l'hémofiltration à haut débit (100 mL/kg/h) appliquée en per opératoire a montré une réduction des pertes sanguines en post opératoire ainsi qu'une durée d'intubation raccourcie et une diminution des concentrations plasmatiques en cytokines (67). En 2001, Cole et al. ont étudié l'impact hémodynamique de l'hémofiltration à haut débit dans une petite étude clinique randomisée en cross over. Chez 11 patients en choc septique avec défaillance multi-viscérale, une session de 8 h d'hémofiltration à haut débit (6 l/h) était associée à une forte diminution des besoins en amines par rapport à une session similaire d'hémofiltration standard (1 l/h) (35). Cette réduction des besoins en amines avec l'hémofiltration à haut débit a également été rapportée récemment par Boussekey et al. dans une autre étude pilote randomisée ayant comparé 65 mL/kg/h versus 35 mL/kg/h chez 20 patients en choc septique avec AKI (40).

Si l'on souhaite étudier l'effet sur la mortalité, les larges études contrôlées randomisées multicentriques sont de réalisation très difficile (voire presque impossible) car elles nécessitent un collectif de plusieurs centaines de patients en choc septique par groupe. Ces études n'ont donc pas encore été réalisées ; une est néanmoins actuellement en cours en Europe comparant 70 mL/kg/h versus 35 mL/kg/h (étude IVOIRE) chez des patients en choc septique (43). Par conséquent, les seuls travaux à notre disposition en ce qui concerne le critère « mortalité » sont des études qui ont comparé la mortalité observée par rapport à la mortalité attendue étant donné les scores de gravité des patients à l'admission. Le principal inconvénient de ces études est bien sur l'absence de groupe contrôle. Ceci étant dit, au moins 6 études ont été conduites selon ce schéma et toutes ont montré le même résultat à savoir une réduction significative (parfois spectaculaire) du taux de mortalité avec l'hémofiltration à haut débit (69-74). En 2000, Honore et al. rapportèrent une réduction du taux de mortalité de 79 % (mortalité attendue d'après les scores APACHE II et SAPS II) à 55 % (70). Plusieurs années après, Joannes-Boyau et al. ont obtenu des résultats identiques avec une mortalité prédite à 28

j de 70 % et une mortalité finalement observée de 46 % dans une étude évaluant les effets de 40-60 mL/kg/h maintenus pendant 96 h chez des patients en choc septique avec syndrome de défaillance multiviscérale (71). De la même façon, Ratanarat et al. rapportèrent une réduction de la mortalité à 28 j de 70 % (prédite) à 47 % (observée) lorsque des patients en choc septique étaient placés sous hémofiltration à haut débit pulsée (74).

Chez des patients dits « inflammatoires » mais sans sepsis, les effets de l'hémofiltration à haut débit sur la mortalité ont été évalués dans 2 études randomisées contrôlées. La plus grosse étude concernant mortalité et hémofiltration à haut débit chez des patients randomisés a été réalisée chez 61 patients ayant récupéré d'un arrêt cardiaque (75). Ce modèle d'ischémie-reperfusion systémique représente un syndrome « sepsis like » intéressant (76). Après ajustement des caractéristiques de base des arrêts cardiaques, l'hémofiltration à très haut débit (200 mL/kg/h pendant 8 h) était associée à une augmentation de la survie à 6 mois (odds ratio après régression logistique = 4,4 ; intervalle de confiance à 95 % = 1,1 à 16,6) et une diminution du risque de décès par choc réfractaire précoce et incoercible (75). De manière similaire, chez 37 patients atteints de pancréatite aiguë sévère, l'hémodynamique et la survie à court terme étaient significativement meilleurs avec de l'hémofiltration à 70 mL/kg/h plutôt que de l'hémofiltration à bas débit (18 mL/kg/h) (77).

D'autres auteurs ont publié des données intéressantes relatant ce qu'il advient lorsqu'on souhaite faire de la purification sanguine chez des patients en choc septique avec de l'hémofiltration continue à bas débit. En 2002, Cole et al. ont étudié les effets d'une hémofiltration continue précoce (2 l/h d'ultrafiltration) sur les concentrations plasmatiques de différents médiateurs inflammatoires et sur les dysfonctions d'organes chez 24 patients septiques. Dans cette étude randomisée contrôlée, l'hémofiltration continue n'était pas associée à une réduction des concentrations plasmatiques en cytokines et ne diminuait pas les défaillances d'organes par rapport à l'absence d'hémofiltration (33). Récemment, Payen et al. ont même observé des effets délétères sur le devenir des patients en choc septique chez qui était appliquée une hémofiltration continue à 25 mL/kg/h pendant 96 h durant la phase très précoce du sepsis, par rapport aux autres patients traités conventionnellement. Cette dernière étude confirme que l'hémofiltration conventionnelle à bas débit n'est pas une technique adaptée pour la purification sanguine. Cependant, comme les auteurs le rappellent dans leur conclusion, cette étude n'est pas en contradiction avec les études relatant les effets bénéfiques du haut débit (34).

5) Utilisation pratique

Bien que les nouvelles machines d'EER soient de plus en plus fiables, avec notamment une information précise fournie sur les différentes pressions du circuit extracorporel ainsi que les volumes et débits utilisés, l'utilisation de l'hémofiltration à haut débit implique néanmoins la prise en compte de plusieurs aspects techniques. D'abord, en vue de garder une fraction de filtration raisonnable (inférieure à 25 %), le débit sanguin doit être élevé. Ceci nécessite la présence de cathéters de dialyse de gros calibre (13,5-15 Fr) insérés en position adéquate, la veine jugulaire interne droite semblant être la localisation optimale (78). Ensuite, le ratio pré/post dilution proposé comme optimal par certains experts est 1/3 – 2/3 (43). En effet, un bon compromis entre la perte d'efficacité due à la prédilution et son bénéfice en termes de conditions de rhéologie est souhaitable. Les données de la littérature sur ce point précis sont néanmoins rares (79). D'autre part, il n'existe toujours pas de recommandation en ce qui concerne l'anticoagulation du circuit en raison de l'absence d'évidence d'une quelconque supériorité d'une stratégie sur les autres. Cependant, le citrate est de plus en plus utilisé de par ses effets sur la durée de vie des hémofiltres et sur la coagulation. Egalement, une membrane synthétique hautement biocompatible avec une large surface d'échange d'au moins 2 m^2 est recommandée (43). En outre, le monitorage de la température doit être effectué correctement en raison de la perte de chaleur importante observée avec les hauts volumes d'échange et le risque d'hypothermie qui en découle. Enfin, l'hémofitration à haut débit peut théoriquement être responsable d'une perte importante de petites molécules dans l'ultrafiltrat (80,81). Par conséquent, l'adaptation de la prescription des médicaments doit être prise en considération et des dosages de molécules (notamment les antibiotiques) doivent être effectués quand ils sont proposés par les laboratoires afin d'en vérifier les concentrations sanguines. Pour les mêmes raisons, le contrôle stricte du sodium, du potassium, du phosphore, du glucose et de l'état acido-basique est obligatoire (43).

En ce qui concerne la sécurité d'utilisation, il est important de rappeler que l'hémofiltration à haut débit est habituellement pratiquée chez des patients en défaillance multi-viscérale et que les effets indésirables de la thérapie sont donc potentialisés par la sévérité des patients. L'hémofiltration à haut débit présente les mêmes risques qu'une autre technique d'épuration extra-corporelle tels que le risque hémorragique lié à l'anticoagulation,

le risque infectieux, le risque d'embolie gazeuse et de mauvaise tolérance hémodynamique, mais l'utilisation de hauts volumes d'échanges multiplie le risque de conséquences métaboliques en cas d'erreur dans la composition du liquide de substitution. En d'autres termes, les praticiens doivent avoir en mémoire qu'une petite erreur dans la prescription peut rapidement avoir des conséquences délétères majeures. Enfin, la différence entre la dose prescrite et la dose délivrée peut rapidement devenir importante avec le haut débit si la thérapie est interrompue (soins de nursing, problèmes de coagulation, transferts au bloc opératoire ou en radiologie).

III - L'hémofiltration en cascade

1) Description de l'hémofiltration en cascade

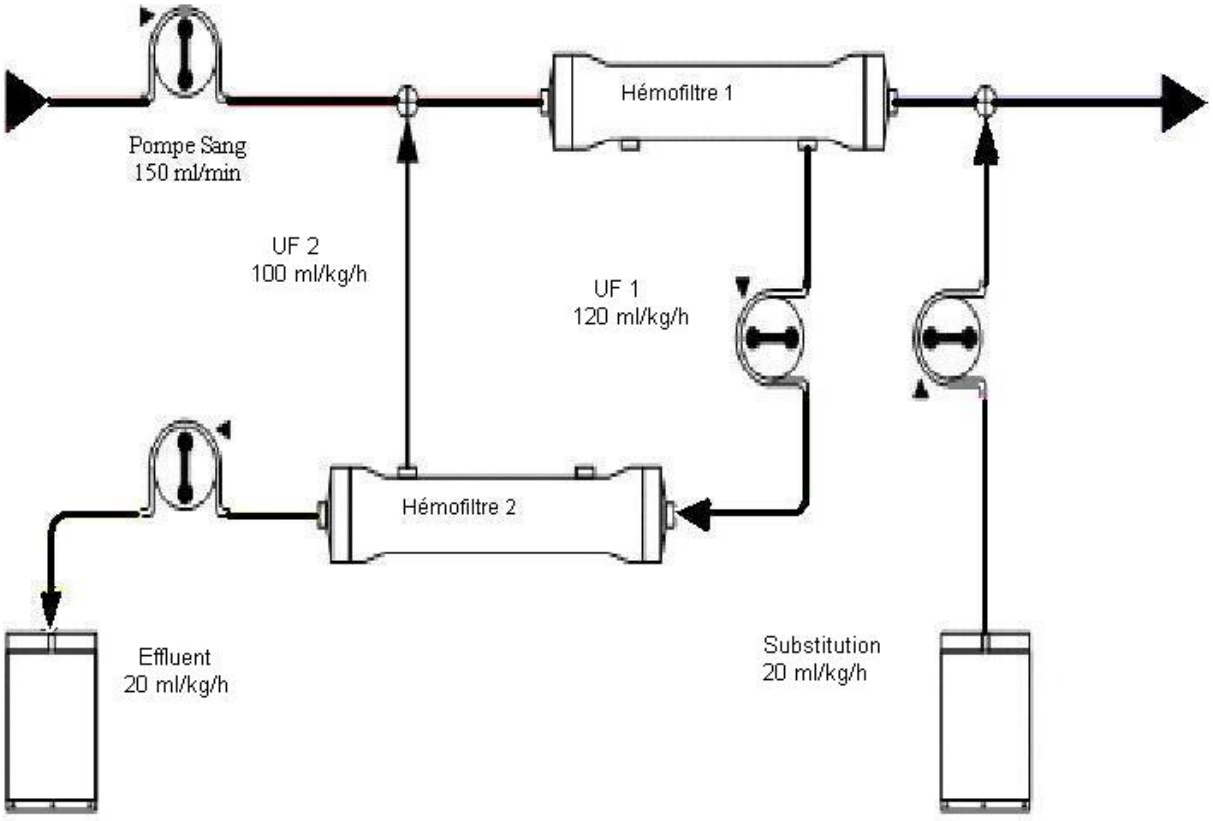
Compte tenu des débits d'ultrafiltration élevés, l'hémofiltration à haut débit présente plusieurs inconvénients majeurs. En effet, les molécules de taille moyenne comme les cytokines inflammatoires sont certes éliminées en partie dans l'ultrafiltrat, mais il en est de même pour les molécules de petit poids moléculaire (acides aminés, vitamines, oligoéléments, médicaments tels que les antibiotiques), souvent nécessaires à l'organisme et au traitement adéquat du choc septique (80,81). De plus, les hauts volumes d'échange convectif représentent un coût important, notamment en raison de la quantité de liquide de substitution nécessaire (82). Même si cela n'a pas été vraiment étudié dans la littérature, il semble évident que la charge de travail en soins infirmiers soit considérablement majorée avec cette technique, compte tenu des très fréquents changements de sacs effluent et liquide de substitution. Enfin, le stockage et la manutention de tous ces solutés posent également des problèmes logistiques. Ces éléments représentent des facteurs limitant potentiels à une application clinique optimale de l'hémofiltration à haut débit.

Nous avons donc mis au point une technique d'épuration extra-rénale visant à garder les avantages de l'hémofiltration à haut débit tout en s'affranchissant de ses inconvénients (83,84). Il s'agit de l'hémofiltration dite « en cascade » (Gambro-Hospal®), technique inspirée du circuit en cascade proposé par Agishi et al. en 1980 pour la réalisation de certains échanges plasmatiques (85,86). L'hémofiltration en cascade est une hémofiltration à haut débit, sélective sur les molécules de taille moyenne. Le sang est une première fois filtré au travers d'une première membrane d'hémofiltration standard laissant passer les petites et les moyennes molécules dans l'ultrafiltrat. Ce premier ultrafiltrat (UF1) est ensuite refiltré au travers d'une seconde membrane dont le point de coupure est nettement plus bas que celui de la première membrane afin de laisser passer uniquement les molécules de petite taille dans le second ultrafiltrat (UF2). Ainsi, les molécules de taille moyenne comme les médiateurs inflammatoires se concentrent dans l'effluent et les petites molécules présentes dans UF2 sont réinjectées dans la circulation en prédilution (Figure 4). Les débits d'ultrafiltration restent modulables à volonté mais un débit d'ultrafiltration très élevé peut être utilisé pour la

première membrane. Le second débit UF2 est à discuter en fonction du débit d'effluent souhaité (nécessité ou non d'une suppléance rénale pour un AKI par exemple), en sachant que le débit d'effluent sera égal au débit d'UF1 moins le débit d'UF2. Une substitution sera effectuée en postdilution et son débit sera réglé en fonction de la perte de poids souhaitée. S'il n'est pas souhaité de perte de poids, le débit du liquide de substitution sera égal au débit d'effluent.

En résumé, l'hémofiltration en cascade permet de faire de l'hémofiltration à haut débit, voire très haut débit, de façon sélective sur les moyennes molécules tout en assurant un débit d'effluent (et donc de liquide de substitution) modéré. Cela est rendu possible par la présence d'un circuit particulier combinant deux membranes d'hémofiltration aux points de coupure différents.

FIGURE 4. Schéma représentant un circuit d'hémofiltration en cascade (d'après (83)).



2) Modèle porcin de choc septique

Le modèle animal que nous avons choisi pour tester le système cascade est un modèle porcin bactériémique. Nous avons au préalable réalisé une étude en dehors de toute intervention de type purification sanguine afin de simplement valider et publier ce modèle animal. Nous avons insisté sur les similitudes observées entre ce modèle animal et le choc septique chez l'homme, notamment sur le plan du profil des réponses inflammatoires et hémodynamiques (87).

Rationnel de l'étude :

Le modèle porcin de choc septique bactériémique à *Pseudomonas aeruginosa* est largement utilisé dans le monde (88). Sa validité est néanmoins controversée en raison de la rapide apparition d'une hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) aiguë lors de la perfusion bactérienne. Cette HTAP est liée à une vasoconstriction importante de l'artère pulmonaire en rapport avec la libération de certains médiateurs inflammatoires comme le TNF-α et l'endothéline-1 (89). Une insuffisance cardiaque droite majeure avec chute du débit cardiaque est alors observée, ce qui ne reflète donc pas l'état hyperdynamique du choc septique humain (90).

L'objectif de cette étude était donc de standardiser un modèle porcin de choc septique où le contrôle de l'HTAP durant la perfusion de *Pseudomonas aeruginosa* allait permettre d'obtenir un état hyperdynamique sans insuffisance cardiaque droite sévère. Par ailleurs, nous avons étudié le profil pharmacocinétique de différentes cytokines inflammatoires au cours de ce modèle afin de le comparer à ce qui est observé en clinique humaine.

Matériels et méthodes :

Il s'agissait d'une étude descriptive où 18 porcs de race Landras Piétrain, âgés de 3 mois et pesant 35 kg, ont été étudiés. Les animaux étaient préanesthésiés avec 10 mg/kg de kétamine en intramusculaire (Laboratoires Panpharma, Fougères, France) avant de bénéficier d'une anesthésie générale avec 3 mg/kg de propofol en intraveineux sur 1 min (Laboratoires

AstraZeneca, Rueil-Malmaison, France). Les porcs étaient ensuite trachéotomisés et intubés avec une sonde endotrachéale de taille 6.5 Fr afin d'être ventilés mécaniquement avec un mélange gazeux contenant 50 % d'oxygène. Le volume courant était de 15 mL/kg et la fréquence respiratoire était ajustée afin d'obtenir une $PaCO_2$ de 40 mmHg pendant l'expérience. Le maintien de l'anesthésie générale était assuré par du sévoflurane (Laboratoires Abbott, Rungis, France) avec une concentration alvéolaire minimale de 1 et du sufentanyl à la seringue électrique 10 µg/h (Laboratoires Janssen-Cilag, Issy-les-Moulineaux, France) (91,92). Une couverture chauffante était positionnée afin de maintenir la température des porcs à 37 ± 0,5 °C.

Un cathéter artériel était introduit dans une artère carotide interne afin de monitorer la pression artérielle, obtenir des gazométries artérielles régulièrement et prélever du sang pour différents dosages. Un cathéter artériel pulmonaire était positionné dans une veine jugulaire externe afin de mesurer la pression artérielle pulmonaire (PAP), la pression artérielle pulmonaire d'occlusion (PAPO), la pression veineuse centrale (PVC) et le débit cardiaque (DC) obtenu par thermodilution. Une voie veineuse centrale était aussi placée dans l'autre veine jugulaire externe afin de perfuser les porcs.

Le sepsis était obtenu par la perfusion intraveineuse d'une suspension bactérienne de *Pseudomonas aeruginosa* (5.10^8 CFU/mL à la vitesse de 0,3 mL/20 kg/min) (89,91,92). La souche de *Pseudomonas aeruginosa* utilisée dans cette étude (numéro HH02332100) avait été obtenue sur un patient à l'hôpital. Elle était conservée en bouillon cœur cervelle glycérolé (Laboratoires AES. Combourg, France) dans des cryotubes à -80 ºC au laboratoire de microbiologie. Tous les porcs ont été perfusés avec des bactéries provenant de cette même souche bactérienne afin d'éviter des variations de virulence. 24 h avant la manipulation, la suspension de *Pseudomoas aeruginosa* était décongelée et repiquée en bouillon cœur cervelle et cultivée à 37°C pendant 6 h. Ensuite, le bouillon était repiqué sur une gélose au sang (Laboratoires Biomerieux, Marcy L'Etoile, France) et cultivé à 37 °C durant 18 h. 40 mL de la suspension bactérienne était ensuite préparés le jour de la manipulation. L'antibiogramme de la souche révélait que celle-ci était sensible à tous les antibiotiques « anti-pseudomonas » excepté aztreonam, ticarcilline/acide clavulanique et fosfomycine.

Pendant la perfusion de la bactérie, la pression artérielle pulmonaire systolique (PAPS) était monitorée. Quand elle atteignait 45 mmHg, la perfusion de *Pseudomonas*

aeruginosa était arrêtée afin de limiter l'augmentation de la post charge droite. Une pression artérielle moyenne (PAM) de 65 mmHg et une pression artérielle pulmonaire d'occlusion (PAPO) de 10 mmHg étaient maintenues à l'aide d'une perfusion continue d'adrénaline et d'une expansion volémique afin d'obtenir un choc septique normotensif. Le remplissage vasculaire était composé de sérum salé isotonique et d'hydroxyethylamidons. Les hydroxyethylamidons étaient ajoutés dès qu'une hypovolémie relative majeure était observée. Lorsque l'expansion volémique était insuffisante pour maintenir la PAM, l'adrénaline était administrée. La fréquence cardiaque (FC), la PAM, les données fournies par le cathétérisme droit telles que la PAPO, les variations de la courbe de la pression artérielle sanglante et l'auscultation pulmonaire étaient utilisés pour estimer la volémie et optimiser la prise en charge hémodynamique.

Les paramètres hémodynamiques tels que la FC, la PAM, la PVC, la PAPS, la pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPM), la PAPO, le débit cardiaque (DC) et l'index cardiaque (IC) étaient relevés à intervalles réguliers pendant 6 h. L'index des résistances vasculaires systémiques (IRVS) et l'index des résistances vasculaires pulmonaires (IRVP) étaient calculés à partir des formules standards SVRI = (PAM – PVC) × 80 / IC PVRI = (PAPM – PAPO) × 80 / IC (93). L'index cardiaque était obtenu en divisant le débit cardiaque par la surface corporelle. La surface corporelle était calculée de la façon suivante : Surface Corporelle SC = 0,087 × (poids du porc)$^{2/3}$ (93). Les besoins en adrénaline et en expansion volémique étaient également relevés toutes les heures après la perfusion de *Pseudomoas aeruginosa* sur une période de 6 h. Le début et la fin de la perfusion bactérienne étaient respectivement appelés T0 et Tep et chaque heure après le début de la perfusion bactérienne étaient appelés T1 à T6. Des prélèvements pour gazométrie artérielle et lactatémie étaient effectués en périphérie sur le cathéter artériel toutes les heures. Enfin, d'autres prélèvements sanguins étaient effectués toutes les heures pour obtenir la concentration en différentes cytokines telles que TNF-α, interleukin-1 ß (IL-1 ß), IL-6, IL-1 ra. A la fin de la manipulation, à T6, les animaux étaient sacrifiés à l'aide d'une injection de 2 g de potassium en intraveineux direct.

Les résultats sont exprimés avec les moyennes ± déviations standards. L'analyse statistique a été effectuée à l'aide d une analyse de variance à mesures répétées. Le logiciel utilisé était Statview^{TM} 5.0 (SAS inst, Cary, Etats-Unis). Un $p<0,05$ était considéré comme statistiquement significatif.

Résultats :

Le volume perfusé de *Pseudomonas aeruginosa* était de 19 ± 7 mL et la durée de la perfusion était de 40 ± 8 min. Aucun porc n'est mort prématurément avant la fin de l'expérience. Les paramètres hémodynamiques, la lactatémie, les besoins en expansion volémique et en adrénaline pendant l'expérience sont rapportés dans le tableau 1 ci-après. Le débit cardiaque s'est accru de 2,4 ± 1,2 à 5,7 ± 2,1 l/min alors que l'index des résistances vasculaires systémiques diminuait de 1957 ± 744 à 709 ± 221 dynes/s/cm^5/m^2. Le volume moyen de cristalloïdes nécessaire était de 5306 ± 1429 mL et le volume moyen d'hydroxyethylamidons était de 1625 ± 437 mL. Les besoins moyens en adrénaline étaient de 1,9 ± 1,7 mg. Les paramètres immunologiques tels que les concentrations en cytokines inflammatoires sont dans le tableau 2.

TABLEAU 1. Paramètres hémodynamiques et biochimiques (d'après (87)).

Table 1 Haemodynamic and biochemical parameters

	T0	Tep	T1	T2	T3	T4	T5	T6	*p*
HR (bpm)	96 ± 13	116 ± 15	123 ± 20	131 ± 20	135 ± 17	138 ± 16	141 ± 16	144 ± 14	0.0001
MAP (mm Hg)	63 ± 10	68 ± 11	67 ± 9	65 ± 6	61 ± 6	58 ± 9	59 ± 8	60 ± 8	0.0012
CVP (mm Hg)	9 ± 3	12 ± 3	10 ± 3	9 ± 3	10 ± 4	10 ± 4	11 ± 3	11 ± 3	0.07
SPAP (mm Hg)	23 ± 4	42 ± 8	29 ± 5	30 ± 7	31 ± 7	31 ± 7	33 ± 10	35 ± 9	0.0001
MPAP (mm Hg)	19 ± 4	37 ± 7	26 ± 5	26 ± 6	26 ± 7	26 ± 8	28 ± 10	30 ± 9	0.0001
PCWP (mm Hg)	11 ± 2	12 ± 2	12 ± 2	10 ± 2	10 ± 2	11 ± 3	12 ± 2	13 ± 4	0.0017
CO (L/min)	2.4 ± 1.2	3.0 ± 1.1	4.0 ± 1.5	4.7 ± 2.1	5.4 ± 2.7	5.5 ± 2.5	5.6 ± 2.2	5.7 ± 2.1	0.0001
CI (L/min/m^2)	2.6 ± 1.3	3.3 ± 1.2	4.4 ± 1.6	5.1 ± 2.3	5.9 ± 2.9	5.9 ± 2.7	6.1 ± 2.4	6.2 ± 2.2	0.0001
SVRI (dyn/s/cm^5/m^2)	1957 ± 744	1569 ± 638	1196 ± 477	1050 ± 471	882 ± 448	766 ± 335	722 ± 263	709 ± 221	0.0001
PVRI (dyn/s/cm^5/m^2)	279 ± 138	722 ± 390	293 ± 95	311 ± 189	313 ± 228	232 ± 115	232 ± 102	232 ± 215	0.0001
Crystalloids (mL)	327 ± 189	483 ± 291	664 ± 324	605 ± 348	664 ± 420	689 ± 299	611 ± 345	609 ± 318	0.0358
HEA (mL)	54 ± 72	257 ± 184	109 ± 139	227 ± 212	228 ± 170	142 ± 130	339 ± 185	172 ± 169	0.0001
Epinephrine (mg)	0 ± 0	0.1 ± 0.3	0.1 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.7 ± 0.4	0.0001
pH	7.45 ± 0.05	7.42 ± 0.02	7.39 ± 0.05	7.34 ± 0.03	7.30 ± 0.07	7.24 ± 0.05	7.20 ± 0.04	7.17 ± 0.10	0.0001
Lactate (mmol/L)	2.5 ± 1.6	2.7 ± 1.2	3.2 ± 1.6	5.3 ± 1.9	7.2 ± 3.7	8.4 ± 2.9	9.2 ± 3.1	10.4 ± 4.1	0.0001

Data are mean ± SD. HR = heart rate, MAP = mean arterial pressure, CVP = central venous pressure, SPAP = systolic pulmonary arterial pressure, MPAP = mean pulmonary arterial pressure, PCWP = pulmonary capillary wedge pressure, CO = cardiac output, CI = cardiac index, SVRI = systemic vascular resistance index, PVRI = pulmonary vascular resistance index, Tep = time of the end of the *P. aeruginosa* infusion, T0, 1, 2, 3, 4, 5,6 = time 0, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 h after the end of the *P. aeruginosa* infusion, HEA = hydroxyethylstarch. The column *p* refers to a repeated measures analysis of variance. Crystalloids, HEA and epinephrine requirements are expressed with the hourly amounts.

TABLEAU 2. Paramètres immunologiques (d'après (87)).

Table 2 Immunological parameters

	T0	Tep	T1	T2	T3	T4	T5	T6	*p*
IL-1β (pg/mL)	0	9 ± 37	148 ± 132	215 ± 167	246 ± 175	220 ± 159	216 ± 140	202 ± 131	0.0001
IL-6 (pg/mL)	0	113 ± 296	873 ± 667	1216 ± 2410	522 ± 670	325 ± 428	243 ± 318	189 ± 189	0.002
TNF-α (pg/mL)	0	2876 ± 2726	6295 ± 3924	1977 ± 958	635 ± 200	448 ± 220	331 ± 163	264 ± 130	0.0001
IL-1ra (pg/mL)	0	132 ± 348	1519 ± 489	1825 ± 401	1751 ± 436	1569 ± 408	1334 ± 321	1207 ± 387	0.0001

Data are mean ± SD. IL = interleukin, TNF = tumor necrosis factor. The column *p* refers to a repeated measures analysis of variance.

Discussion :

De nombreux modèles animaux de sepsis sont décrits mais aucun n'a jamais été rapporté comme étant supérieur aux autres (94)**.** Les petits mammifères comme les rongeurs sont souvent préférés car ils sont peu onéreux, génétiquement identiques et sans pathologie (94). Les gros animaux sont cependant également largement utilisés, particulièrement pour les études où un monitorage invasif est requis. Dans ce cas, le porc est souvent préféré compte tenu du fait que l'anatomie et la physiologie cardiovasculaire, rénale et gastro-intestinale sont très similaires à ce qui est observé chez l'homme (94).

Le sepsis peut être induit par une perfusion d'endotoxines ou de bactéries vivantes ou bien avoir comme point de départ un foyer infectieux (88,95). Les modèles qui utilisent le foyer infectieux initial sont réputés pour être très proches de la réalité clinique (94). Par exemple, la cavité péritonéale peut être contaminée par un inoculum bactérien ou bien le tube digestif peut être perforé chirurgicalement causant une contamination bactérienne par des bactéries endogènes (94,96). De façon alternative, les tissus sous-cutanés et les poumons peuvent être infectés pour induire le sepsis (95). Si ces modèles sont réputés pour bien mimer les conditions cliniques et reproduire la physiopathologie de la réponse inflammatoire, ils sont néanmoins difficiles à manipuler et souvent peu reproductibles. Au contraire, les modèles endotoxémiques et bactériémiques sont des modèles à dose infectieuse initiale basse où les bactéries rencontrent l'organisme de manière parentérale. L'avantage est que le contrôle du sepsis est souvent plus aisé et plus standardisé. Cependant, ils ne reproduisent pas ce qui se passe en réalité avec le foyer infectieux initial (88).

Bien que les modèles animaux soient essentiels pour la recherche scientifique, ils sont néanmoins pourvus de nombreux inconvénients. La difficulté d'extrapoler à l'homme des résultats obtenus à partir de données animales peut être liée à des différences d'âge, à d'éventuelles concentrations médicamenteuses différentes, à l'existence de co-morbidités chez les patients, à l'absence de réanimation chez les animaux, aux états souvent hyper-inflammatoires chez les animaux et hypo-inflammatoires chez les patients au moment du traitement liés à des prises en charge temporelles souvent différentes (97). Par conséquent, chaque modèle animal doit être un bon compromis entre 5 paramètres conflictuels : réalité

clinique, simplification expérimentale, faisabilité technique, moyens humains et aspects financiers.

La perfusion de bactéries vivantes représente un des modèles les plus simples de sepsis. Les animaux sont habituellement infectés par administration intravasculaire d'*Escherichia coli* ou, moins fréquemment, de *Pseudomonas aeruginosa* ou *Staphylococcus aureus.* Ce modèle est intéressant en raison de sa simplicité, son prix, son caractère standard et reproductible. Cependant, malgré tous ces points positifs, ce modèle est controversé en raison de son manque de réalisme lié à son caractère hypodynamique (88). En effet, chez l'homme, la phase précoce de choc septique est caractérisée par un état hyperdynamique avec décroissance des résistances artérielles systémiques, augmentation du débit cardiaque et augmentation modeste des résistances artérielles pulmonaires. Ce profil hémodynamique est aussi rapporté par des études expérimentales réalisées chez l'homme où l'administration d'endotoxines et de *Pseudomoas aeruginosa* a conduit à des manifestations cardiocirculatoires hyperkinétiques (94). Par opposition, le choc septique induit chez le porc est caractérisé par une hypertension artérielle pulmonaire sévère avec réduction du débit cardiaque. L'augmentation de la post charge droite liée à l'augmentation de la pression artérielle pulmonaire apparait dans les premières minutes suivant le début de la perfusion bactérienne ou d'endotoxines (93). Ce phénomène est bien décrit dans la littérature et est attribué à la libération de molécules pro-inflammatoires telles que le TNF-α et l'endothéline-1 qui sont de puissants vasoconstricteurs sur les vaisseaux pulmonaires (89,90). Cet état cardiovasculaire hypodynamique obervé chez de nombreux modèles animaux septiques est extrêmement significatif quand la durée de la perfusion bactérienne est très courte. Chez le lapin, Wyler et al. ont rapporté qu'un bolus d'une forte dose d'endotoxines entraine un collapsus majeur et la mort des animaux de façon très précoce (98). La stratégie alternative est donc d'administrer une dose plus faible sur une période plus prolongée.

Au cours de notre étude, le choc septique a été rapidement obtenu. La concentration en lactate augmentait relativement rapidement pour atteindre 10,4 ± 4,1 mmol/l à T6. De plus, une expansion volémique et une perfusion d'adrénaline étaient aussi très rapidement nécessaires afin de maintenir les objectifs tensionnels fixés. 5306 ± 1428 mL de cristalloïdes, 1625 ± 437 mL d'hydroxyethylamidons et 1,9 ± 1,7 mg d'adrénaline étaient administrés à la fin de la manipulation. Très peu de données sont accessibles dans la littérature en ce qui concerne les besoins en expansion volémique et en amines au cours de tels modèles de sepsis.

Par ailleurs, il est de toute façon très difficile de comparer les données provenant de différents modèles où les conditions expérimentales sont tellement différentes. En ce qui concerne le profil hémodynamique du choc septique obtenu avec notre modèle, celui-ci était clairement hyperdynamique. En effet, l'index des résistances artérielles systémiques a diminué rapidement de 1957 ± 744 à 709 ± 221 dyn/s/cm^5/m^2 (p<0,05) et le débit cardiaque a augmenté doucement, de 2,4 ± 1,2 a 5,7 ± 2,1 l/min (p<0,05). Ce profil cardiovasculaire était attribué à l'administration lente du *Pseudomonas aeruginosa* (0,3 mL/20 kg/min) avec contrôle de l'hypertension artérielle pulmonaire durant la perfusion bactérienne. La perfusion était arrêtée quand la pression artérielle pulmonaire systolique atteignait 45 mmHg. Le contrôle de cette hypertension artérielle pulmonaire est la principale différence entre notre modèle et la majorité des autres modèles animaux septiques.

Ce modèle porcin est un modèle de choc septique à court terme puisque les porcs sont sacrifiés six heures après le début de l'injection bactérienne. Par ailleurs, des modèles chroniques existent également (99-102). Träger et al. rapporta il y a quelques années un modèle à long terme, cliniquement valide, au cours duquel la pression artérielle pulmonaire était contrôlée et continuellement ajustée afin d'obtenir une hypertension artérielle pulmonaire modérée avec une PAPM variant entre 35 et 40 mmHg (101,102).

Sur le plan immunologique, nous avons observé une augmentation du TNF-α dans les minutes qui suivirent l'injection de *Pseudomonas aeruginosa* avec un pic à 60 min. La concentration en IL-1 ß s'est accrue après le TNF-α avec un maximum à 3 h. Le pic d'IL-6 est apparu dans les premières heures du choc septique (Tableau 2). Bien que les concentrations en TNF-α soient supérieures à ce qui est observé chez l'homme (103,104), probablement en raison de la différence d'espèce, ces résultats sont en accord avec des données antérieures observées au cours d'études expérimentales et humaines réalisées chez le volontaire sain (105). En ce qui concerne les cytokines anti-inflammatoires, de petites quantités d'endotoxines aboutissent à l'apparition d'IL-1 ra dans une période de 210-280 min après l'injection (105). Dans les études humaines, le pic sérique d'IL-1 ra est 100 fois plus important que le pic d'IL-1 ß (105). Nos résultats retrouvent une augmentation précoce de IL-1 ra mais le ratio IL-1 ra / IL-1 ß était de l'ordre de 10. Par conséquent, nous pouvons conclure que le profil inflammatoire des cytokines est relativement proche de celui observé lors d'études cliniques bien que le rapport cytokines anti-inflammatoires / cytokines pro-inflammatoires soit plus faible dans notre modèle que dans les études humaines.

En conclusion, ce modèle porcin de choc septique a *pseudomonas aeruginosa* est caractérisé par la présence d'un état hyperdynamique en raison du contrôle de la post charge droite *via* la limitation de l'augmentation de la pression artérielle pulmonaire durant la perfusion bactérienne. Cela donne à ce modèle une certaine relevance clinique d'autant plus que la pharmacocinétique des cytokines inflammatoires est également relativement proche de ce qui est observé chez l'homme.

3) Etude animale évaluant le système cascade

Le principal objectif de cette étude a été d'évaluer la faisabilité technique de l'hémofiltration en cascade chez l'animal. L'objectif secondaire était de comparer les répercussions hémodynamiques et biologiques de l'hémofiltration en cascade par rapport à l'hémofiltration standard à haut débit en utilisant notre modèle porcin de choc septique.

Matériels et méthodes :

Après accord du comité d'éthique local, 20 porcs de race Landras Pietrain, âgés de 3 mois et de poids 35 kg, ont été utilisés. L'étude a été réalisée dans un laboratoire agréé, à l'institut Claude Bourgelat de l'école nationale vétérinaire de Marcy L'Etoile. Les manipulations ont été effectuées dans une salle d'opération de confinement type A2. La prise en charge des animaux était celle de notre modèle porcin de choc septique. En plus du cathéter artériel et du cathéter pulmonaire droit, un cathéter de dialyse triple lumière de taille 12 Fr était introduit dans la veine jugulaire externe gauche afin de pouvoir réaliser l'épuration extracorporelle. Le sepsis était cette fois induit avec une suspension bactérienne de *Pseudomonas aeruginosa* American Type Culture Collection 15442. Le début de la perfusion bactérienne était appelé Tb et la fin Tb'. La séance d'hémofiltration démarrait 2 h après Tb et était appelée T0. Chaque heure qui suivait était appelée T1 à T6.

Les porcs étaient randomisés en 2 groupes de 10. Un groupe était hémofiltré en hémofiltration à haut débit standard selon les modalités suivantes : membrane d'hémofiltration = AN69 M100® (Gambro Industries, Meyzieu, France), débit sang = 150 mL/min, débit d'ultrafiltration = 50 mL/kg/h, débit substitution = 50 mL/kg/h. Le deuxième groupe était alloué à une session d'hémofiltration en cascade avec : membrane d'hémofiltration n°1 = AN69 M100®, membrane d'hémofiltration n°2 = GFS plus 20® (Gambro Industries, Meyzieu, France), débit sang = 150 mL/min, débit d'ultrafiltration 1 = 120 mL/kg/h, débit d'ultrafiltration 2 = 100 mL/kg/h, débit d'effluent = 20 mL/kg/h, débit substitution = 20 mL/kg/h. Le tableau 3 fournit des informations supplémentaires sur les 2 membranes utilisées dans cette étude.

TABLEAU 3. Caractéristiques des membranes utilisées (d'après (84)).

	AN69 M100	GFS Plus 20
Surface (m^2)	1,00	1,80
Coefficient de partage		
- Urée (60 Da)	1,00	1,00
- Créatinine (113 Da)	1,00	0,99
- Vitamine B12 (1,3 kDa)	0,95	0,96
- Inuline (5,2 kDa)	0,95	0,74
- Cytochrome C (14 kDa)	Non réalisé	0,02
- Myoglobine (16,7 kDa)	0,55	0,01
- Albumine (68 kDa)	<0,01	0,00

La durée de l'hémofiltration pour les 2 groupes était de six heures, sans perte de poids. Le liquide de substitution était administré en post dilution (Hemosol B0®, Gambro Industries, Meyzieu, France) au débit de 50 mL/kg/h pour l'hémofiltration à haut débit standard et 20 mL/kg/h pour le groupe cascade. Du KCl était ajouté à l'Hemosol B0® afin d'obtenir une concentration en KCl dans le liquide de substitution de 4 mmol/L. Dans les 2 groupes, l'anticoagulation était réalisée avec 2500 UI d'héparine en intraveineux direct juste avant le début de l'hémofiltration. Pendant l'hémofiltration, des bolus de 2500 UI d'héparine étaient administrés quand le TCA mesuré était inférieur à 1,3 fois le TCA initial.

Les paramètres hémodynamiques étaient relevés à intervalles réguliers pendant les 8 h séparant le début de la perfusion bactérienne et la fin de la session d'hémofiltration. Les besoins en adrénaline et en liquide de substitution étaient également relevés. Enfin, des gazométries artérielles et une mesure de la concentration en lactate étaient réalisées régulièrement.

L'analyse statistique a consisté en une analyse de variance à 2 voies à mesures répétées avec le programme StatView® 5.0 software (SAS Inst., Cary, NC, USA). Un test de Bonferroni était effectué pour l'analyse *post hoc*. Une valeur de $p<0,05$ était considérée comme statistiquement significative. Les résultats sont exprimés selon les moyennes ± déviations standards.

Résultats :

Une quantité similaire de *Pseudomonas aeruginosa* a été administrée aux porcs des 2 groupes (13 ± 2 mL pour les porcs du groupe hémofiltration à haut débit standard *vs* 14 ± 3 mL pour les porcs du groupe cascade). Les besoins en héparine ont également été identiques (10 000 ± 250 UI dans le groupe hémofiltration à haut débit standard *vs* 9100 ± 300 UI dans le groupe cascade).

Aucun porc n'est décédé avant la fin de l'expérience. Aucun traitement n'a été arrêté prématurément pour des raisons de problèmes techniques. Il n'y a eu aucun épisode de coagulation du circuit extracorporel ou d'un hémofiltre. Aucun incident lié à des pressions élevées au sein du circuit ou des problèmes de débits n'a été observé.

Sur le plan hémodynamique, le profil évolutif était similaire entre les 2 groupes avec apparition d'un état de choc (tachycardie, besoins en adrénaline et en expansion volémique pour maintenir la PAM et la PAPO). Un profil hyperkinétique de choc septique a été observé dans les 2 groupes avec augmentation de l'IC et décroissance de l'IRVS. Tous les porcs ont été réanimés de façon similaire puisque la PAM et la PAPO étaient respectivement maintenues à 65 mmHg et 10 mmHg pendant toute l'expérience. A T6, les besoins en colloides (989 ± 355 mL *vs* 1913 ± 538 mL, $P = 0{,}006$), les besoins en adrénaline (0,82 ± 0,42 mg *vs* 3,27 ± 3,02 mg, $p<0{,}001$), l'acidose lactique (pH = 7,33 ± 0,08 *vs* 7,10 ± 0,07, $p<0{,}001$), l'hypertension artérielle pulmonaire moyenne (21 ± 5 mmHg *vs* 34 ± 8 mmHg, $p = 0{,}002$) et l'IC (3,88 ± 0,62 L/min/m^2 *vs* 7,45 ± 5,18 L/min/m^2, $P = 0{,}01$) étaient moins prononcés dans le groupe cascade par rapport au groupe hémofiltration à haut débit standard. Les paramètres hémodynamiques et biochimiques sont présentés dans les tableaux 4 et 5 et sur la figure 5.

TABLEAU 4. Résultats hémodynamiques (d'après (84)).

	groupe	Tb	Tb'	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	*P* (inter groupe)
FC, bpm	**Standard**	95 (16)	116 (15)	127 (24)	136 (25)	137 (16)	131 (23)	143 (11)	141 (12)	138 (21)	0,26
	Cascade	96 (14)	114 (19)	112 (15)	116 (19)	125 (19)	129 (17)	140 (18)	137 (11)	135 (14)	
PAM, mmHg	**Standard**	66 (11)	71 (13)	72 (12)	74 (10)	68 (15)	61 (7)	63 (8)	66 (7)	64 (6)	0,50
	Cascade	66 (13)	71 (13)	72 (8)	68 (13)	69 (10)	63 (6)	61 (5)	60 (6)	59 (5)	
PAPM, mmHg	**Standard**	19 (4)	38 (10)	29 (6)	31 (7)	31 (7)	29 (7)	32 (8)	32 (7)	34 (8)	0,002
	Cascade	17 (4)	34 (6)	27 (6)	25 (7)	24 (6)	24 (5)	23 (4)	22 (5)	21 (5)	
PAPO, mmHg	**Standard**	11 (3)	12 (3)	12 (2)	10 (2)	9 (3)	10 (2)	12 (3)	14 (3)	12 (3)	0,19
	Cascade	9 (4)	9 (5)	10 (3)	9 (4)	8 (4)	9 (5)	9 (4)	10 (5)	10 (5)	
IC, L/min/m²	**Standard**	2,65 (1,26)	3,22 (1,38)	3,28 (0,92)	4,88 (2,05)	5,56 (3,06)	5,76 (1,90)	6,88 (2,81)	7,15 (3,70)	7,45 (5,18)	0,01
	Cascade	1,93 (0,38)	2,41 (0,48)	2,91 (0,51)	2,93 (1,11)	2,93 (0,79)	3,09 (0,62)	3,63 (1,01)	3,92 (0,68)	3,88 (0,62)	
IRVS, dyn /s/ cm^{-5}/m^2	**Standard**	2050 (859)	1698 (702)	1687 (701)	1201 (517)	1000 (406)	808 (316)	665 (205)	686 (211)	672 (205)	0,004
	Cascade	2558 (613)	2252 (936)	1859 (380)	1919 (623)	1828 (586)	1609 (489)	1279 (362)	1129 (207)	1123 (205)	
IRVP, dyn/s/ cm^{-5}/m^2	**Standard**	267 (119)	821 (463)	474 (224)	421 (295)	423 (322)	310 (182)	287 (141)	289 (180)	325 (187)	0,58
	Cascade	342 (126)	872 (194)	497 (118)	448 (188)	515 (212)	424 (158)	361 (178)	285 (136)	244 (130)	

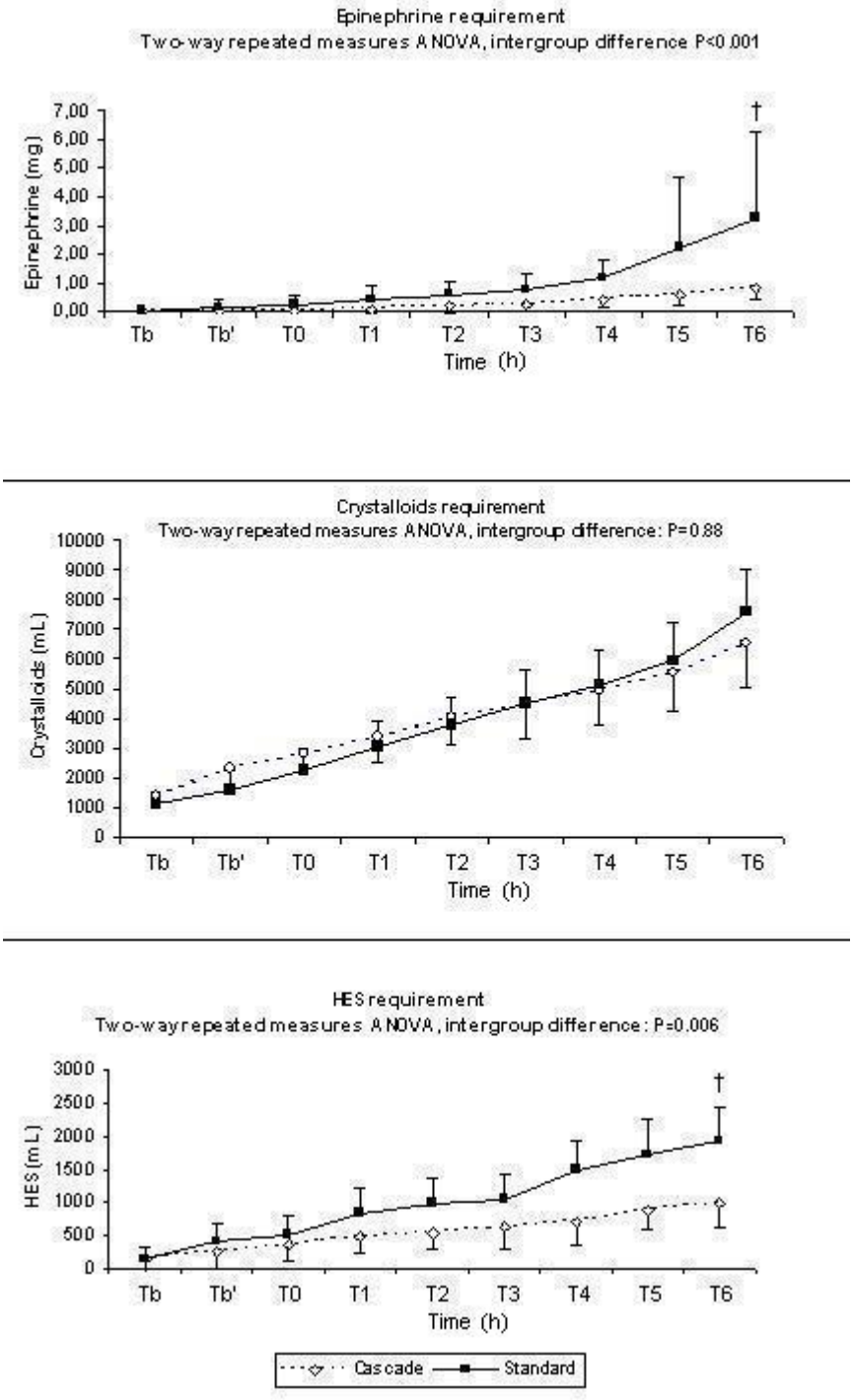
Les résultats sont exprimés avec les moyennes (DS). *P* fait référence à l'ANOVA à 2 voies à mesures répétées (différence intergroupe). † : < 0,0002 entre les 2 groupes après analyse *post hoc* de Bonferroni.

TABLEAU 5. Résultats biochimiques (d'après (84)).

	group	Tb	T0	T3	T6	*P* (inter groupe)
pH	Standard	7,44 (0,04)	7,38 (0,05)	7,28 (0,06)	7,10 (0,07)	<0,001
	Cascade	7,49 (0,07)	7,43 (0,06)	7,39 (0,06) †	7,33 (0,08) †	
Lactate, mmol/L	Standard	2,1 (0,9)	3,8 (1,5)	8,1 (4,0)	14,1 (3,3)	0,006
	Cascade	2,9 (2,2)	2,4 (1,1)	4,4 (2,2) †	7,6 (2,6) †	
Bicarbonates, mmol/L	Standard	24,8 (2,1)	24,5 (1,9)	21,3 (4,9)	16,6 (3,2)	0,002
	Cascade	27,8 (2,6)	27,1 (2,4)	26,7 (2,6) †	22,2 (2,6) †	

Les résultats sont exprimés avec les moyennes (DS). *P* fait référence à l'ANOVA à 2 voies à mesures répétées (différence intergroupe). † : < 0,0002 entre les 2 groupes après analyse *post hoc* de Bonferroni.

FIGURE 5. Besoins en adrénaline, cristalloïdes et colloïdes (d'après (84)).



† = $p < 0{,}0002$ entre les 2 groupes après analyse *post hoc* de Bonferroni. Les cristalloïdes, colloïdes et l'adrénaline sont exprimés avec les doses cumulées.

Discussion :

Il s'agit de la première étude ayant testé ce prototype *in vivo*. Il s'agissait d'une étude de faisabilité visant à évaluer tout d'abord la fiabilité et la sécurité du prototype. La faisabilité de la technique a été satisfaisante puisque chacun des 10 porcs du groupe cascade a été traité avec succès pendant six heures, malgré les hauts débits d'ultrafiltration utilisés. Aucune séance n'a donc été prématurément arrêtée en raison de problèmes techniques : il n'y a eu aucun cas de coagulation du circuit ou de l'hémofiltre, aucun problème d'élévation des pressions dans le circuit ou d'administration des débits demandés, ni ruptures de circuit. La sécurité du système a également été correcte puisqu'aucun effet indésirable n'a été observé sur les porcs. Aucun porc n'est décédé prématurément pendant la séance d'hémofiltration.

Des inconvénients liés à l'utilisation de débits d'ultrafiltration élevés au cours de l'hémofiltration à haut débit conventionnelle ont été identifiés. Les molécules de taille moyenne, telles que les cytokines inflammatoires, sont certes éliminées en partie dans l'ultrafiltrat, mais il en est de même pour de nombreuses petites molécules qui ne sont pas remplacées avec le liquide de substitution et dont la plupart sont nécessaires à l'organisme et/ou au traitement adéquat du choc septique (certains ions, nutriments, acides aminés, vitamines, oligoéléments, médicaments tels qu'antibiotiques) (80,81). De plus, les hauts volumes d'échange convectif représentent un coût important, compte tenu de la quantité de liquide de substitution nécessaire (82). La charge de travail en soins infirmiers est également théoriquement majorée avec cette technique, étant donné les très fréquents changements de sacs effluent et liquide de substitution. Enfin, le stockage et la manutention de toutes ces poches de solutés posent aussi des problèmes logistiques. Le système cascade semble intéressant en vue de limiter ces inconvénients. Puisque le premier filtre possède un point de coupure normal et le second un point de coupure bien plus faible, l'addition du second filtre permet la régénération de la majeure portion de l'ultrafiltrat numéro 1 contenant les petites molécules tout en maintenant simultanément une épuration importante des molécules moyennes, ces dernières se concentrant dans l'effluent.

Une amélioration hémodynamique avec diminution de la sévérité clinico-biologique du choc septique a été observé avec le système cascade par rapport au groupe contrôle. Les besoins en adrénaline et en colloïdes, l'acidose lactique, l'hypertension artérielle pulmonaire et l'index cardiaque étaient moins importants chez les porcs du groupe cascade. Néanmoins, compte tenu de la différence des débits d'ultrafiltration entre les 2 groupes (120 vs 50 mL/kg/h), il n'est pas possible de dire si cette amélioration hémodynamique est à rattacher à l'épargne et la recirculation des petites molécules ou bien aux plus grands débits d'ultrafiltration du groupe cascade permettant une élimination des moyennes molécules plus importante. Dans la littérature médicale, une telle amélioration hémodynamique lors de l'utilisation de hauts débits d'ultrafiltration est retrouvée dans de nombreuses études mais les explications physiopathologiques restent obscures. Certains auteurs spéculent sur différentes hypothèses : l'élimination des cytokines inflammatoires de la circulation sanguine pourrait atténuer l'inflammation, stabilisant ainsi la pression artérielle et la perfusion des organes (106). L'élimination accrue du complément (C3a et C5a) de même que l'élimination d'autres molécules vasodilatatrices ayant des effets immunologiques et cardiovasculaires sont aussi mentionnées (35,106).

En hémofiltration standard, tout l'ultrafiltrat est rejeté en tant qu'effluent (50 mL/kg/h dans cette étude). Avec le système cascade, le débit d'effluent était ici de 20 mL/kg/h (UF1 – UF2) donc le volume rejeté est beaucoup moins important que le volume d'ultrafiltrat produit après le passage au travers du 1er hémofiltre. Les besoins en liquide de substitution deviennent donc beaucoup moins importants alors que les débits d'ultrafiltration restent très élevés. Par exemple, un patient de 70 kg, hémofiltré en hémofiltration standard à haut débit à 50 mL/kg/h, a besoin de 3,5 L de liquide de substitution par heure (84 L par jour). Avec le système cascade, le même patient a seulement besoin de 1,4 L de liquide de substitution par heure (33,6 L par jour) malgré un débit d'ultrafiltration de 120 mL/kg/h. A noter que l'hémofiltration à très haut débit standard (débit d'ultrafiltration de 120 mL/kg/h) demanderait 8,4 L/h de liquide de substitution (201,6 L/j !).

Le système cascade semble donc intéressant et facile d'utilisation. Cependant, différentes limites peuvent être dégagées de cette étude. D'abord, la période d'observation de 6 h apparait comme insuffisante puisque ce genre de thérapie est prévu pour être mis en place en continu sur 24 h. Ensuite, nous n'avons pas mesuré les concentrations en médiateurs inflammatoires. Bien que cela soit sujet à controverses, il aurait été intéressant d'observer la

concentration des molécules moyennes dans l'ultrafiltrat. Pour les études à venir avec ce système, il est prévu d'ajouter des dosages de molécules moyennes et de petites molécules à différents endroits du circuit extracorporel. Ainsi, nous pourrons quantifier exactement l'épargne des petites molécules et l'élimination des moyennes molécules. Enfin, des études animales et humaines sont bien sûr nécessaires pour confirmer et compléter les résultats hémodynamiques (en unifiant les débits d'ultrafiltration entre les groupes, soit 120 mL/kg/h dans le groupe standard). De réelles études de coût seraient aussi bienvenues pour évaluer et quantifier précisément la réduction du coût engendrée par cette technique. Le coût lié à l'addition de la seconde membrane vient légèrement pondérer l'économie réalisée avec la réduction drastique des besoins en poches de liquide de substitution.

L'hémofiltration en cascade est une nouvelle technique de purification sanguine, dérivée de l'hémofiltration à haut débit, techniquement faisable et sécurisée. Elle permet d'augmenter les débits d'ultrafiltration de façon majeure et ciblée sur les molécules moyennes tout en gardant des besoins en liquide de substitution raisonnables, diminuant ainsi le coût financier de la technique et la charge de travail en soins infirmiers.

IV - Hémofiltration à haut débit avec une membrane ayant des propriétés d'adsorption renforcées

Une des stratégies adoptées dernièrement pour optimiser les techniques de purification sanguine consiste à associer les phénomènes de convection et d'adsorption au sein d'une même thérapie. Une membrane d'hémofiltration dite « à adsorption renforcée » a été développée par le laboratoire Gambro-Hospal et nous avons testé cette membrane avec notre modèle porcin de choc septique. Aujourd'hui, cette membrane est commercialisée à grande échelle (Oxiris®, Gambro-Hospal, Meyzieu, France).

Rationnel de l'étude

Les nombreuses études animales et humaines citées précédemment concernant l'hémofiltration à haut débit montrent l'intérêt des hauts échanges convectifs par rapport à l'hémofiltration à bas débit en termes de purification sanguine. Nous avons également déjà expliqué que les membranes d'hémofiltration avaient des propriétés d'adsorption qui dépendent notamment de leur composition. Ceci permet d'accroître la quantité de molécules épurées mais également d'épurer des molécules dont la masse se situe au-dessus du point de coupure de la membrane, élargissant ainsi le spectre des molécules affectées par le traitement. L'optimisation de ces propriétés d'adsorption des membranes est ainsi apparue comme une voie de recherche intéressante dans le domaine de la purification sanguine. L'objectif de cette étude était donc d'analyser les effets de cette nouvelle membrane à la phase aiguë d'un modèle porcin de choc septique. Cette membrane d'hémofiltration a bénéficié d'un traitement de surface lui permettant d'adsorber de façon importante les endotoxines et les cytokines. Cette membrane et une membrane d'hémofiltration standard de référence (AN69) ont été comparées *in vitro* et *in vivo* chez le porc septique, sur le plan hémodynamique et immunologique.

Matériels et méthodes

Etude in vitro

Une étude *in vitro* des capacités d'adsorption de la membrane a été menée avant de la tester *in vivo*. 500 mL de serum bovin contenant 40 EU/mL d'endotoxines *E. coli* O55:B5 Biowhittaker® circulaient en circuit fermé, au contact de la membrane étudiée, pendant 60 min avec un débit de 250 mL/min. Des prélèvements étaient effectués à T0, T10, T30 et T60 min dans le but d'établir la cinétique d'adsorption des endotoxines. L'expérience était répétée 5 fois pour chaque membrane (membrane AN69 M100 et membrane Oxiris).

Une autre série de tests consistait à faire circuler en circuit fermé au contact de la membrane étudiée 500 mL de serum humain contenant des cytokines aux concentrations suivantes (TNF-α = 400 pg/mL, IL-1β = 200 pg/mL, IL-1ra = 2000 pg/mL, IL-10 = 3000 pg/mL) pendant 3 h avec un débit de 150 mL/min. Chaque expérience était réalisée avec une seule cytokine et 3 fois pour chaque membrane (membrane PSHF Gold Baxter®, membrane AN69 M100 et membrane Oxiris). Des prélèvements étaient effectués à T0, T120 et T180 min dans le but d'établir la cinétique d'adsorption des différentes cytokines.

Modèle porcin de choc septique

Le modèle porcin de choc septique expérimental utilisé pour cette étude était le même que celui décrit précédemment (87). Le choc septique était induit chez 20 porcs par la perfusion intraveineuse de la souche bactérienne *Pseudomonas aeruginosa* American Type Culture Collection (ATCC) 15442 à la concentration de 5×10^8 Colony Forming Units/mL et à la vitesse de 10 mL/h. Tous les porcs ont reçu une solution bactérienne provenant de cette même souche afin d'éviter toute variation de virulence. Le début et la fin de la perfusion de *Pseudomonas aeruginosa* étaient respectivement appelés Tb et Tb'. Le début de l'hémofiltration était programmé pour 2 h après Tb. Le début de l'hémofiltration était appelé T0 et chaque heure suivante portait un numéro de 1 à 6.

Groupes traités

Juste avant le début de l'hémofiltration, les porcs septiques étaient randomisés en 2 groupes de 10. Le premier groupe était hémofiltré avec la nouvelle membrane aux propriétés d'adsorption renforcées (Oxiris) et le second groupe était hémofiltré avec la membrane standard AN69 M100 (Laboratoires Gambro-Hospal, Meyzieu, France).

La membrane Oxiris est une membrane en polyacrylonitrile qui a bénéficié d'un traitement de surface modifiant sa polarité de surface et lui conférant ainsi la possibilité d'adsorber les endotoxines et les cytokines. La modification de la polarité de surface est effectuée à l'aide de l'adjonction d'un polycation à la surface de la membrane. Ce polycation est une charge positive permettant de capter par adsorption de surface les endotoxines qui sont considérées comme étant chargées négativement. La surface de la membrane était de 0.9 m^2 et le point de coupure de 40 kDa pour les 2 membranes. Les capacités convectives des 2 membranes étaient donc identiques. Les coefficients de partage étaient également les mêmes pour les 2 membranes (Tableau 6).

Dans les 2 groupes, le débit sanguin était fixé à 150 mL/min et le débit d'ultrafiltration à 50 mL/kg/h. La durée des sessions d'hémofiltration à haut débit était de 6 h et après 3 h de traitement, la membrane était remplacée par une nouvelle afin de préserver et d'optimiser les propriétés d'adsorption et d'éviter les phénomènes de saturation. Aucune perte de poids n'était programmée et le liquide de substitution était administré à 100 % en post dilution (Hemosol B0®, Laboratoires Gambro-Hospal, Meyzieu, France). Du chlorure de potassium était ajouté à l'Hémosol B0® pour obtenir une concentration en KCl de 4 mmol/l. Dans les 2 groupes, l'anticoagulation était réalisée avec 2500 UI d'héparine administrée en intraveineux direct 5 min avant le début de l'hémofiltration. Le maintien de l'anticoagulation pendant les 6 h des sessions d'hémofiltration à haut débit était réalisé avec une perfusion continue d'héparine 500 UI/h.

TABLEAU 6. Coefficients de partage des membranes AN69 M100 et Oxiris (d'après (107)).

Urée	Créatinine	Vitamine B12	Inuline	Myoglobine	Albumine
1	1	0,95	0,95	0,55	<0,01

Ces données ont été obtenues dans les conditions suivantes : plasma bovin, concentration en protéines = 60 g/l, température = 37 °C, débit sang = 100 mL/min et débit d'ultrafiltration = 20 mL/min.

Pendant toute la durée de l'expérience, une PAM de 65 mmHg et une PAPO de 10 mmHg étaient maintenues à l'aide d'une perfusion continue d'adrénaline et d'une expansion volémique (serum salé isotonique et hydroxyéthylamidons) dans le but d'obtenir un choc septique normotensif. La FC, la PAM, la PAPO, la courbe de pression artérielle sanglante et l'auscultation pulmonaire étaient utilisées pour l'estimation de la volémie et l'évaluation hémodynamique.

Paramètres mesurés

Les paramètres hémodynamiques tels que FC, PAM, PVC, PAPS, PAPM, PAPO et DC étaient relevés toutes les heures pendant 8 h, depuis Tb jusqu'à T6. Les résistances vasculaires systémiques (RVS) et les résistances vasculaires pulmonaires (RVP) étaient calculées à partir des formules standards (93). Les besoins en adrénaline et en expansion volémique étaient aussi relevés toutes les heures. Des gazométries artérielles et des lactatémies étaient effectuées régulièrement. Enfin, la concentration sanguine en endotoxines était mesurée à T0, T1 et T6 et la concentration sanguine en cytokines (TNF-α, IL-1β, IL-1ra et IL-6) était mesurée à T0 et T6 (Quantikine® colorimetric ELISA kits, R&D Systems, Lille, France).

Analyse statistique

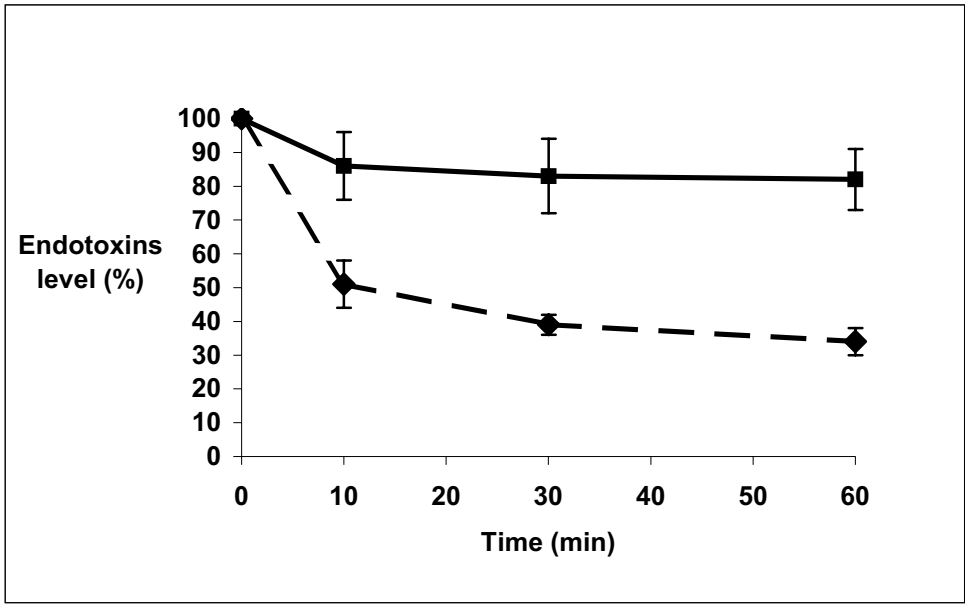
Les variables continues sont exprimées sous forme de moyennes ± DS ou médianes (interquartiles). Les paramètres hémodynamiques et les valeurs biochimiques ont été analysés

avec un test *t* de Student après vérification de la normalité de la distribution des données par un test de Kolmogorov Smirnov. Le taux d'endotoxines a été analysé avec une ANOVA à mesures répétées suivie d'un post test de Duncan. Les concentrations en cytokines ont été analysées avec un test *U* de Mann-Whitney. Une valeur de $p<0,05$ était considérée comme statistiquement significative (Statistica 7.0, Statsoft Inc., Tulka, OK, Etats-Unis)

Résultats

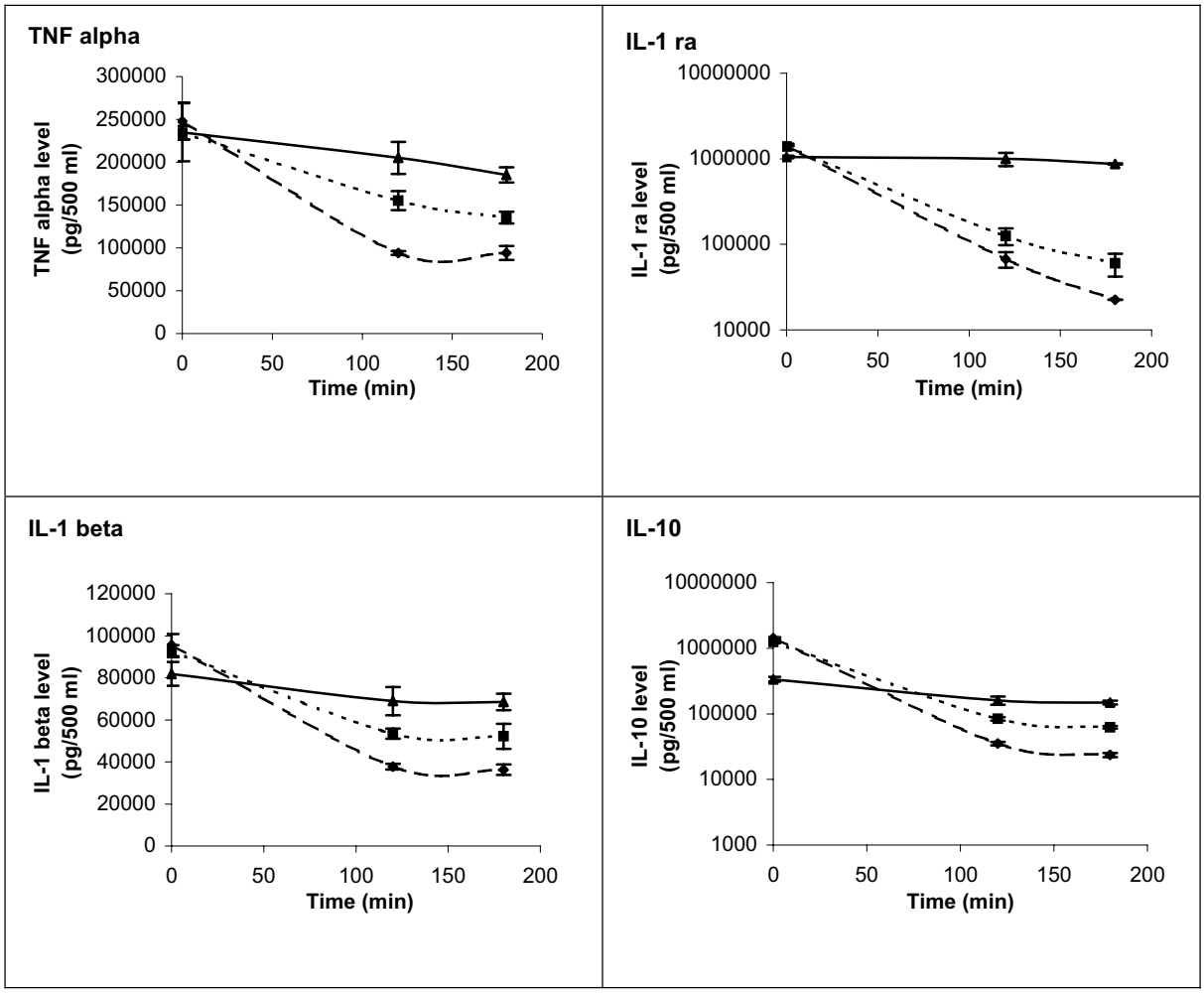
Concernant les résultats *in vitro*, l'adsorption des endotoxines et des cytokines était clairement plus importante avec la membrane Oxiris. En effet, 66 % des endotoxines étaient adsorbées après 60 min dans les conditions *in vitro* décrites ci-dessus (Figure 6). L'adsorption des cytokines était aussi plus importante avec la membrane Oxiris et ce pour toutes les cytokines étudiées, c'est-à-dire TNF-α, IL-1β, IL-10 et IL-1ra (Figure 7).

FIGURE 6. Cinétique d'adsorption *in vitro* des endotoxines *E. coli* O55:B5 (d'après (107)).



Membrane AN69 M100 = courbe continue, membrane Oxiris = courbe en pointillés. Concentration initiale en endotoxines à T0 = 40 EU/mL.

FIGURE 7. Cinétique d'adsorption *in vitro* des cytokines (d'après (107)).



Membrane PSHF Gold Baxter® = courbe continue, membrane AN69 M100 = courbe en pointillés courts, membrane Oxiris = courbe en pointillés longs.

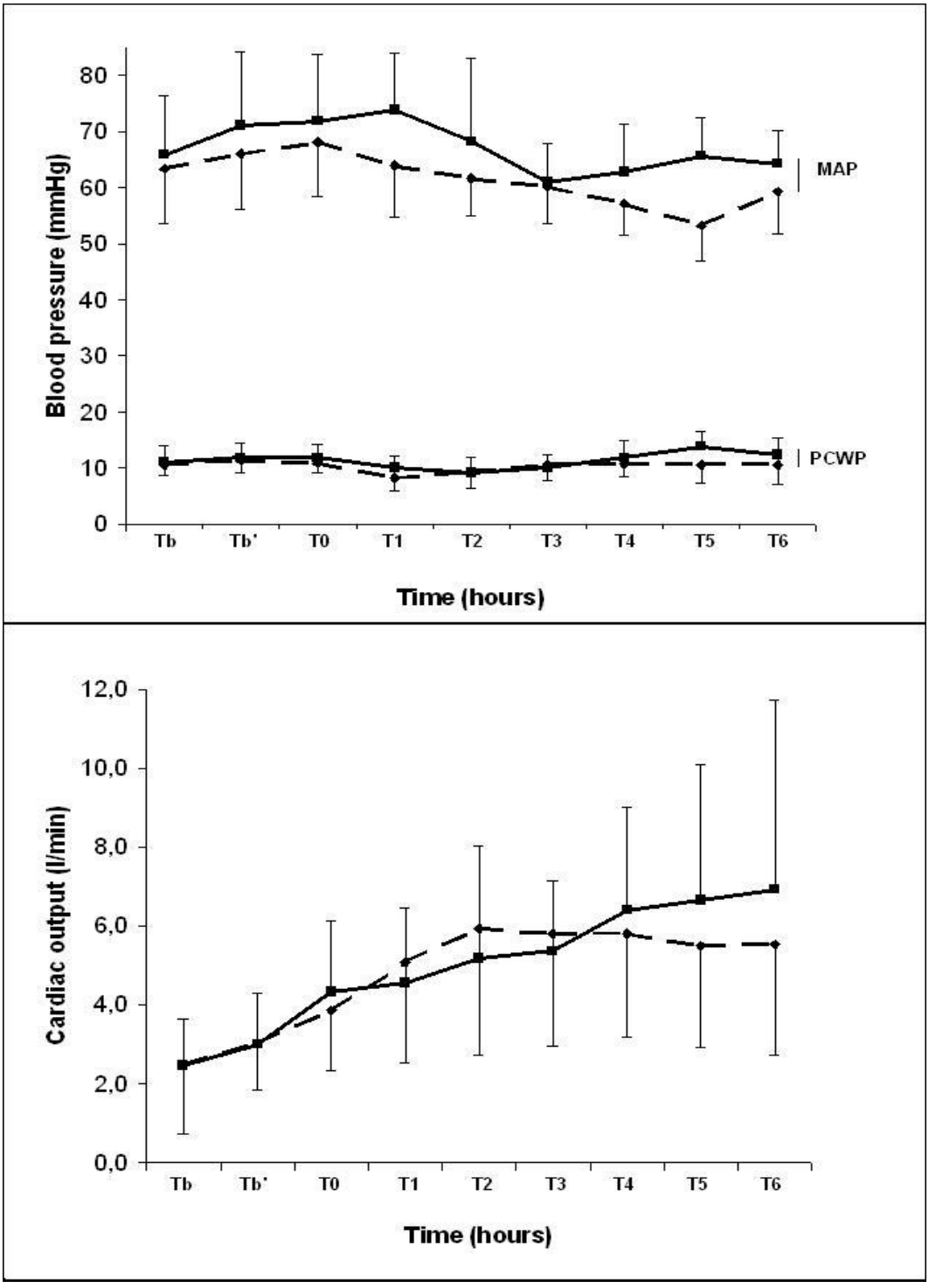
Concernant les résultats *in vivo*, la quantité de bactéries injectée et la durée de la perfusion de *Pseudomonas aeruginosa* étaient similaires entre les 2 groupes (11 ± 2 mL dans le groupe AN69 versus 12 ± 2 mL dans le groupe Oxiris et 66 ± 12 min dans le groupe AN69 versus 72 ± 12 min dans le groupe Oxiris). Aucun porc n'est mort prématurément. Pour les 2 groupes, aucun traitement n'a été arrêté prématurément en raison de problèmes techniques.

L'hémodynamique des porcs s'est rapidement détériorée avec apparition d'une tachycardie, de besoins en adrénaline et en expansion volémique pour maintenir la PAM et la PAPO. Un choc septique hyperkinétique s'est bien installé dans les 2 groupes avec accroissement du débit cardiaque et diminution des RAS. La FC a augmenté de 98 ± 15 battements/min à Tb à 148 ± 16 battements/min à T6 (groupe Oxiris) et de 95 ± 16 battements/min à Tb à 138 ± 20 battements/min à T6 (groupe AN69). Le DC s'est accru de 2,5 ± 1,8 l/min à Tb à 5,5 ± 2,8 L/min à T6 (groupe Oxiris) et de 2,5 ± 1,2 L/min à Tb à 6,9 ± 4,8 L/min à T6 (groupe AN69). Les RAS ont diminué de 2092 ± 920 dyn/s/cm^5 à Tb à 797 ± 346 dyn/s/cm^5 à T6 (groupe Oxiris) et de 2050 ± 859 dyn/s/cm^5 à Tb à 672 ± 205 dyn/s/cm^5 à T6 (groupe AN69). Tous les porcs ont été réanimés de manière similaire puisque la PAM et la PAPO sont restées constantes pendant la durée de l'expérience, conformément à nos objectifs hémodynamiques (Figure 8).

A la fin de l'expérience, à T6, les besoins en cristalloïdes (5937 ± 1588 vs. 7587 ± 1456 mL, P = 0,026), les besoins en colloïdes (1437 ± 320 vs. 1912 ± 538 mL, P = 0,027), l'acidose lactique (pH = 7,20 ± 0,11 vs. 7,10 ± 0,07, P = 0,026) et l'hypertension artérielle pulmonaire (PAPS = 30 ± 8 vs. 39 ± 9 mmHg, P = 0,029 et PAPM = 24 ± 7 vs. 34 ± 8 mmHg, P = 0,008) étaient moins prononcés de façon statistiquement significative pour les porcs du groupe Oxiris. Il n'existait pas de différence significative entre les 2 groupes pour les besoins en adrénaline à T0 et T6. Les résultats hémodynamiques et les valeurs biochimiques sont rapportés dans les tableaux 7 et 8.

Enfin, les concentrations sanguines en endotoxines étaient plus basses dans le groupe Oxiris après 1 h d'hémofiltration à haut débit (1,91 ± 1,19 vs. 11,07 ± 10,64 EU/mL, P = 0,035) (Tableau 9). Les concentrations sanguines en cytokines n'étaient pas différentes entre les 2 groupes, sauf pour IL-1β où la concentration était légèrement plus basse dans le groupe Oxiris à T6 (98 (49-205) vs. 230 (126-350) pg/mL, P = 0,04) (Tableau 10).

FIGURE 8. Evolution de la pression artérielle moyenne (PAM), de la pression artérielle pulmonaire d'occlusion (PAPO) et du débit cardiaque (CO) (d'après (107)).



Membrane AN69 M100 = courbe continue, membrane Oxiris = courbe en pointillés.

TABLEAU 7. Moy ± DS des paramètres hémodynamiques et biochimiques juste avant le début de l'hémofiltration, à T0 (d'après (107)).

	AN69 (n=10)	Oxiris (n=10)	*P*
FC (batts/min)	126 ± 24	121 ± 22	0,63
PAM (mmHg)	72 ± 12	68 ± 10	0,43
PAPS (mmHg)	33 ± 7	29 ± 6	0,19
PAPM (mmHg)	29 ± 6	25 ± 6	0,15
PAPO (mmHg)	12 ± 2	11 ± 2	0,28
DC (L/min)	4,3 ± 1,8	3,8 ± 1,5	0,54
RAS (dyn/s/cm^5)	1210 ± 534	1242 ± 353	0,88
RAP (dyn/s/cm^5)	356 ± 236	295 ± 124	0,48
Adrénaline (mg)	0,21 ± 0,32	0,29 ± 0,47	0,66
Crystalloïdes (mL)	2250 ± 719	2125 ± 646	0,69
Hydroxyethylamidons (mL)	513 ± 300	419 ± 245	0,45
PH	7,37 ± 0,05	7,39 ± 0,06	0,43
Lactate (mmol/L)	3,80 ± 1,54	2,95 ± 1,47	0,22

TABLEAU 8. Moy ± DS des paramètres hémodynamiques et biochimiques après 6 h d'hémofiltration, à T6 (d'après (107)).

	AN69 (n=10)	Oxiris (n=10)	*P*
FC (batts/min)	138 ± 20	148 ± 16	0,23
PAM (mmHg)	64 ± 6	59 ± 8	0,13
PAPS (mmHg)	39 ± 9	30 ± 8	0,029
PAPM (mmHg)	34 ± 8	24 ± 7	0,008
PAPO (mmHg)	12 ± 3	11 ± 4	0,53
DC (L/min)	6,9 ± 4,8	5,5 ± 2,8	0,44
RAS (dyn/s/cm^5)	672 ± 205	797 ± 346	0,34
RAP (dyn/s/cm^5)	325 ± 186	234 ± 148	0,24
Adrénaline (mg)	3,27 ± 3,02	2,11 ± 1,05	0,27
Crystalloïdes (mL)	7587 ± 1456	5937 ± 1588	0,026
Hydroxyethylamidons (mL)	1912 ± 538	1437 ± 320	0,027
PH	7,10 ± 0,07	7,20 ± 0,11	0,026
Lactate (mmol/L)	14,11 ± 3,36	9,61 ± 4,47	0,02

FC fréquence cardiaque, PAM pression artérielle moyenne, PAPS pression artérielle pulmonaire systolique, PAPM pression artérielle pulmonaire moyenne, PAPO pression artérielle pulmonaire d'occlusion, DC débit cardiaque, RAS résistances artérielles systémiques, RAP résistances artérielles pulmonaires. Statistiques: test *t* de Student.

TABLEAU 9. Moyennes ± DS des concentrations sériques en endotoxines (EU/mL) (d'après (107)).

	AN69 (n=10)	Oxiris (n=10)	
T0	3,98 ± 3,31	4,26 ± 7,68	
T1	11,07 ± 10,64	1,91 ± 1,19	†
T6	2,96 ± 2,75	2,26 ± 2,39	

T0 = début de l'hémofiltration, T1 = temps après une heure d'hémofiltration, T6 = temps après six heures d'hémofiltration.
Statistiques : ANOVA à mesures répétées suivie d'un post test de Duncan. P = 0,014 pour le facteur temps, P = 0,064 pour le type de membrane. Avec le post test de Duncan, nous avons observé une différence significative à T1 entre les groupes (P=0,035) (†)

TABLEAU 10. Concentrations sanguines en cytokines (pg/mL) à T0 et T6. Les valeurs sont exprimées sous la forme de médianes (interquartiles) (d'après (107)).

	Cytokines	AN69 (n=10)	Oxiris (n=10)	*P*
T0	IL-1β	0 (0-0)	0 (0-0)	0,30
	IL-1ra	0 (0-0)	0 (0-0)	0,30
	TNF-α	192 (67-826)	1247 (235-1846)	0,08
	IL-6	0 (0-0)	0 (0-0)	0,30
T6	IL-1β	230 (126-350)	98 (49-205)	0,04
	IL-1ra	1434 (1053-1662)	1254 (803-1490)	0,50
	TNF-α	280 (174-409)	227 (139-302)	0,60
	IL-6	104 (77-412)	66 (60-244)	0,20

Statistiques : test U de Mann-Whitney.

Discussion

Cette étude animale démontre l'intérêt que peut avoir une membrane d'hémofiltration dont on a modifié les propriétés d'adsorption en termes d'épuration des cytokines et des endotoxines à la phase aiguë d'un choc septique expérimental.

Nous avons vu précédemment que le phénomène d'adsorption permettait de capter des molécules dans la membrane elle-même après interactions ioniques entre la membrane et ces molécules. Ce principe est proche de celui utilisé en biologie moléculaire avec les résines échangeuses d'ions. Les membranes d'hémofiltration ont des propriétés d'adsorption variables qui dépendent de leur composition. Le principal intérêt de ces propriétés réside dans le fait que ces membranes peuvent ainsi épurer des molécules dont le poids moléculaire est supérieur au point de coupure de la membrane. Ceci semble relativement intéressant lorsque l'on sait que les médiateurs pro- et anti-inflammatoires ont un poids moléculaire très variable, allant de 0,5 kDa à 60 kDa.

Concernant la composition des membranes d'hémofiltration, l'étude expérimentale conduite par Rogiers et al. sur un modèle canin de choc endotoxinique aigu, a rapporté une supériorité hémodynamique transitoire lorsqu'une membrane en polyacrylonitrile était utilisée par rapport à une membrane en polysulfone. Cet effet serait expliqué par une adsorption plus efficace des médiateurs de l'inflammation (63). Dans notre étude, les propriétés d'adsorption de la membrane d'hémofiltration en polyacrylonitrile ont été renforcées par un traitement de surface modifiant la polarité de surface de la membrane (addition d'un polycation chargé positivement permettant ainsi de capter les endotoxines qui sont considérées comme chargées négativement) (107). Ainsi, cette membrane est capable d'adsorber fortement *in vitro* les endotoxines et les médiateurs inflammatoires (Figures 6 et 7).

Dans notre modèle porcin de choc septique, l'utilisation de la membrane Oxiris pendant 6 h d'hémofiltration à haut débit a permis de diminuer la sévérité clinique et biologique du choc, par rapport à l'utilisation d'une membrane d'hémofiltration standard (107). Ceci était objectivé par une réduction des besoins interventionnels nécessaires pour maintenir la PAM et la PAPO désirées. Les besoins en expansion volémique, l'acidose lactique et l'hypertension artérielle pulmonaire étaient moins prononcés dans le groupe Oxiris

par rapport au groupe AN69 à la fin de l'expérience. En ce qui concerne les paramètres immunologiques, nous avons observé une diminution significative du taux d'endotoxines après 1 h d'hémofiltration à haut débit avec la membrane Oxiris (Tableau 9). Aucune différence n'a été observée pour les concentrations sanguines en cytokines, excepté pour IL-1ß qui était légèrement diminué dans le groupe Oxiris à T6 (Tableau 10). Ces résultats immunologiques ne sont pas surprenants et sont similaires à ceux observés au cours d'études précédentes où les taux sanguins de cytokines n'étaient pas influencés par l'hémofiltratrion à haut débit même lorsqu'une élimination des cytokines et des bénéfices cliniques étaient démontrés (33,108-110). Les cytokines du compartiment sanguin représentent seulement une faible partie de l'ensemble des cytokines de l'organisme et les mécanismes régissant les échanges de cytokines entre le compartiment sanguin, l'insterstitium et les tissus ne sont toujours pas clairs (21). Le concept d'Honoré, appelé aussi « The Threshold Immunomodulation Hypothesis » et décrit précédemment, suggère que l'hémofiltration à haut débit entraîne un flux de cytokines depuis les tissus et l'interstitium vers le compartiment sanguin, ce qui veut dire un effet du traitement au-delà du compartiment sanguin (21). La mesure de la concentration plasmatique en cytokines est donc discutable. La mesure des taux tissulaires serait probablement préférable si cela était aisé à obtenir (18). Enfin, il est probable que les mécanismes gouvernant l'épuration des endotoxines soient aussi compliqués que ceux gouvernant l'épuration des cytokines.

Tous ces résultats *in vitro* et *in vivo* donnent à cette membrane une certaine attractivité mais il faut néanmoins rappeler les limites de cette étude. L'extrapolation de ces données à la clinique humaine est tout d'abord discutable en raison du délai très rapide (2 h) entre le début de la perfusion bactérienne et l'hémofiltration. En pratique clinique, le traitement d'un patient en choc septique débute beaucoup plus tard et l'hémofiltration est habituellement débutée au stade où la défaillance rénale est présente. La notion de « timing » concernant les techniques de purification sanguine semble fondamentale. Les experts préconisent aujourd'hui d'essayer d'agir le plus précocement possible même si les arguments pour avancer une telle recommandation sont encore minces. Une évaluation clinique est donc bien sûr nécessaire pour compléter nos données. Par ailleurs, la mortalité des porcs n'a pas été évaluée au cours de ce travail puisque tous les porcs étaient sacrifiés à la fin de la manipulation. En effet, il ne nous était pas possible pour diverses raisons, notamment logistiques, de suivre l'évolution des porcs sur plusieurs jours après le traitement. Egalement, la courte durée des sessions d'hémofiltration (6 h) est critiquable puisque ces techniques de purification sanguine sont

normalement prévues pour être mises en place de façon continue. Les mêmes difficultés logistiques peuvent être avancées pour expliquer cela. Néanmoins, de nombreuses autres études de la littérature médicale ont été conduites selon le même schéma avec une période observationnelle courte (35,59,62,66,70,111). De plus, en raison de la complexité de la procédure, nous n'avons pas effectué d'analyse *in vitro* a posteriori des hémofiltres afin d'essayer de mesurer les endotoxines et les cytokines qui ont été adsorbées. Ceci aurait permis de potentiellement directement quantifier l'adsorption des endotoxines et des cytokines. Cela aurait aussi permis d'évaluer s'il existait ou non une adsorption du lactate, adsorption qui aurait pu participer à la diminution de la lactatémie observée dans le groupe Oxiris. Enfin, il est établi que l'adsorption des médiateurs inflammatoires avec les membranes d'hémofiltration est un phénomène transitoire en raison de la saturation des membranes. Ce phénomène de saturation, qui peut même déboucher sur une désadsorption des molécules préalablement adsorbées est donc à prendre en considération afin d'optimiser au maximum les propriétés de la membrane. Puisque plus la membrane est petite, plus vite apparaît la saturation de la membrane, la surface de la membrane semble devoir être plus importante que 0,9 m^2, en particulier lorsque la membrane est utilisée chez l'homme et non pas chez un porc de 35 kg. La surface de la membrane Oxiris commercialisée aujourd'hui chez l'homme est de 1,5 m^2. De plus, si l'on veut profiter au maximum de ces propriétés d'adsorption, il peut être nécessaire de changer régulièrement la membrane, toujours en raison de ces problèmes de saturation. Ces changements fréquents de membrane peuvent être source de difficultés en pratique clinique avec une augmentation significative du coût de la technique et de la charge de travail en soins infirmiers. D'autres travaux expérimentaux et cliniques sont nécessaires pour déterminer combien de temps cette membrane peut être utilisée en pratique clinique sans changement et trouver le meilleur compromis entre des changements de membrane fréquents et des considérations financières raisonnables. Par exemple, une des réponses pourrait être de changer fréquemment la membrane à la phase très précoce du sepsis, quand les concentrations en cytokines et endotoxines sont élevées.

Dans la littérature, l'hémofiltration dite « hautement adsorbante » est justement abordée uniquement sur le versant changement fréquent des membranes (112). Pour utiliser au maximum les propriétés adsorbantes des hémofiltres, certains auteurs suggèrent donc des changements fréquents de membranes. Claudio Ronco aborde cette question dans son étude de doses du Lancet 2000 et utilise des membranes qui sont changées toutes les 24h (50). En outre, dans une petite étude pilote ayant évalué un collectif de 12 patients septiques, Haase et

al. ont comparé une période de traitement de 9 h avec changement de filtres toutes les 3 h (membrane AN69) avec une hémofiltration continue standard. Une réduction significative des concentrations d'IL-8 et d'IL-10 ainsi qu'une diminution plus rapide des amines ont été observées avec l'approche changements fréquents (113). A notre connaissance, notre étude est la première rapportant des résultats concernant de l'hémofiltration « hautement adsorbante » obtenue suite à la manipulation des propriétés d'adsorption de la membrane.

En conclusion, le principal résultat de cette étude peut être résumé de la façon suivante : l'utilisation de cette membrane d'hémofiltration aux propriétés d'adsorption renforcées pendant 6 h d'hémofiltration à haut débit améliore l'hémodynamique d'un modèle porcin de choc septique à *Pseudomonas aeruginosa*. Ces résultats sont très probablement à mettre en rapport avec l'adsorption des cytokines et des endotoxines par la membrane. Une étude clinique, réalisée à large échelle, évaluant la membrane Oxiris sur le versant « purification sanguine » serait très intéressante.

V - Autres techniques

1) La filtration et adsorption plasmatiques couplées (FAPC) = La Coupled Plasma Filtration Adsorption (CPFA)

Principe

La FAPC est une méthode d'épuration extra-rénale dont la mise en œuvre est proche des techniques d'hémofiltration continue utilisées en réanimation. L'extraction du sang est assurée par un cathéter de dialyse standard. Un débit sanguin de 150 à 200 mL/min est nécessaire. Une pompe entraîne le sang vers un plasmafiltre en polyéthersulfone de 0,45 m² de surface et de point de coupure 800 kDa (114). Une fraction de plasma d'environ 15 % est alors extraite, puis circule à faible vitesse sur la résine d'adsorption (Figure 9) (115). Ainsi, ce contact prolongé entre les médiateurs de l'inflammation du plasma et la résine permet d'améliorer les rendements d'adsorption sans risquer l'agrégation plaquettaire ou une hémolyse. De plus, la séparation du plasma évite également une activation de la coagulation, inéluctable lors d'une circulation sanguine à faible débit sur un dispositif extracorporel.

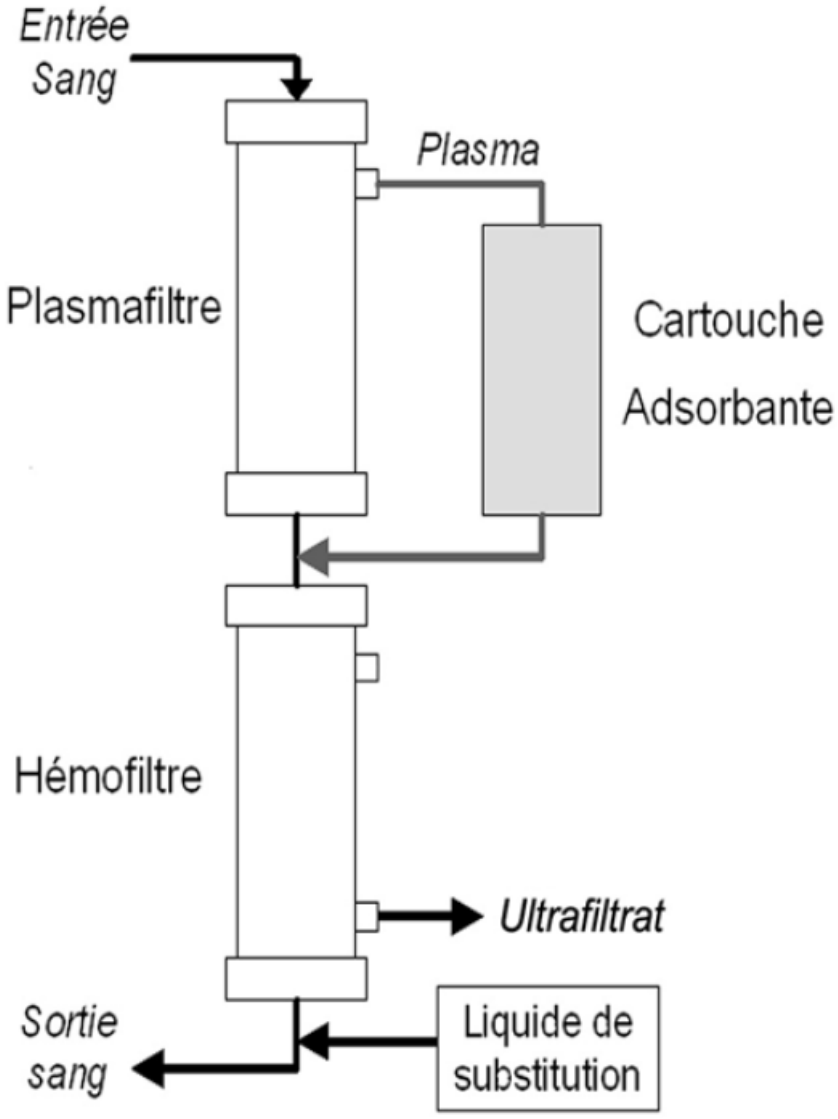
L'épuration des médiateurs inflammatoires est assurée par une résine spécifique (Mediasorb®; Bellco Soludia, Mirandola, Italie). Ces molécules hydrosolubles établissent des liaisons physiques stables avec la structure de la résine (liaisons non-covalentes, forces de van der Waals) (116). Plusieurs facteurs influencent l'efficacité de l'adsorption : le type de résine et ses propriétés chimiques, la surface de contact de la résine et la durée de contact entre la résine et le plasma (114). Le plasma est ensuite restitué dans le circuit sanguin à la sortie du plasmafiltre, puis le sang passe dans un hémofiltre. Ce second filtre permet d'assurer une perte hydrique et un équilibre électrolytique, permettant ainsi une suppléance rénale si besoin. Les échanges sont le plus souvent effectués par convection (hémofiltration continue). Le circuit permet, en cas de

nécessité, l'adjonction d'un dialysat si un transfert diffusif est souhaitable. Ainsi, cette deuxième partie du circuit de FAPC peut être une hémofiltration, une hémodialyse voire une hémodiafiltration (116).

Un dispositif optique de mesure de l'hématocrite en continu, situé sur la ligne d'entrée du circuit sanguin (ligne artérielle), permet d'évaluer en continu l'état d'hydratation du compartiment intravasculaire (117). Au cours de la séance, la perte de poids réalisée par le système entraîne des déplacements successifs d'eau entre les différents compartiments de l'organisme. Lors de l'initiation de l'épuration, la soustraction d'eau du secteur vasculaire conduit parfois à une hypovolémie relative responsable d'une mauvaise tolérance hémodynamique. Puis, les liquides sont mobilisés du secteur interstitiel et intracellulaire vers le secteur vasculaire, restaurant une volémie et rendant possible la poursuite de la soustraction liquidienne. La perte de poids, réalisée par le générateur de FAPC, peut donc être modulée au cours du temps grâce à cette mesure continue de l'hématocrite, selon la tolérance hémodynamique du patient. Une anticoagulation du circuit est obtenue par perfusion continue d'héparine à l'entrée du circuit. Pour les patients présentant un risque hémorragique accru, une anticoagulation régionale par perfusion de citrate est également possible (118).

La durée du traitement adsorbant est approximativement de dix heures, correspondant aux durées appliquées lors des principales études (28,119). À la fin de la séance, par annulation du débit d'extraction plasmatique sur le générateur, l'hémofiltration peut être poursuivie seule avec le même circuit jusqu'à la séance suivante. Un schéma de quatre séances de FAPC est proposé par la plupart des études. L'initiation précoce du traitement pourrait avoir un rôle essentiel mais les données soutenant cette hypothèse restent limitées (120,121).

FIGURE 9. Schéma représentant un circuit de FAPC (d'après (126)).



Principales études expérimentales

Déjà en 1998, sur leur modèle *in vitro* comparant un circuit associant une plasmafiltration et une adsorption à un circuit d'hémofiltration seule au débit d'ultrafiltration de 20 mL/min, Tetta et al. avaient rapporté des taux d'épuration supérieurs par adsorption pour le TNF-α, l'IL-1ß, l'IL-1 Ra et IL-8, variant selon les différents types de résines employées. De plus, les auteurs avaient montré l'adsorption plus importante des cytokines avec un passage lent du plasma sur la résine (122).

Une étude animale, randomisée, sur un modèle de choc septique de lapin, a évalué l'effet de la FAPC sur le pronostic vital. L'objectif de cette étude était de démontrer une amélioration de la survie avec cette technique d'épuration. Dans ce modèle, une injection intraveineuse de lipopolysaccharide bactérien, capable d'induire une mortalité de 80 % des individus, était réalisée. Les animaux étaient alors aléatoirement alloués dans le groupe traité ou non par FAPC. Une augmentation significative de 85 % de la survie dans le groupe traité par FAPC a été observée (123).

Plus récemment, l'équipe de Martin Matejovic (Plzen, République tchèque) a publié deux articles dans la revue « Shock » rapportant des résultats expérimentaux. Dans la première publication (étude négative), 16 porcs en choc septique hyperkinétique à point de départ péritonéal étaient randomisés en 2 groupes de 8. Un groupe recevait un traitement standard et l'autre groupe recevait ce traitement plus une séance de FAPC. Les porcs du groupe FAPC n'ont pas expérimenté d'amélioration hémodynamique par rapport aux porcs du groupe contrôle et la FAPC n'a pas permis non plus d'atténuer les altérations microcirculatoires, endothéliales et inflammatoires liées au sepsis. Les perturbations en rapport avec la coagulation et le stress oxydatif étaient même plus importantes dans le groupe FAPC (124). La deuxième publication a comparé les effets de la FAPC et de l'hémofiltration sur la repolarisation cardiaque au cours du même modèle de choc septique porcin hyperkinétique (125). Les résultats sont en faveur de l'hémofiltration qui serait capable d'épurer des médiateurs inflammatoires impliqués

dans le ralentissement de la repolarisation cardiaque alors qu'aucun effet similaire n'a été observé avec la FAPC (125).

Principales études cliniques

Claudio Ronco a publié en 2002 une étude pilote, prospective et randomisée en deux groupes croisés, évaluant l'efficacité clinique et biologique de la FAPC (28). Dix patients de réanimation avaient été inclus. Tous présentaient un choc septique hyperdynamique associé à un AKI oligurique nécessitant une épuration extra-rénale. Le score APACHE II calculé était de 27,6 ± 1,8. Ces patients bénéficiaient alors, dans un ordre aléatoire, d'une séance de FAPC durant dix heures et d'une hémodiafiltration veino-veineuse continue (HDFVVC) durant les dix heures suivantes, espacées d'une période libre nocturne. Les paramètres hémodynamiques de pression artérielle et de posologie de vasopresseurs étaient évalués. Des paramètres immunologiques étaient également étudiés, par la mesure des concentrations plasmatiques de TNF-α et d'IL-10, mais également par l'analyse de la réponse immunitaire des leucocytes des patients traités (production de TNF-α par les monocytes, stimulation de leucocytes témoins par le plasma de patients traités par FAPC). Une réduction du niveau d'immunoparalysie était recherchée. Les auteurs ont rapporté une réduction significative de la consommation des vasopresseurs et une augmentation de la pression artérielle moyenne dans le groupe FAPC. Alors que les taux mesurés de TNF-α et d'IL-10 en aval de la résine adsorbante étaient indétectables, les auteurs n'ont pas mis en évidence de réduction des taux sanguins de ces cytokines. Cela n'est pas étonnant si l'on prend en compte les hypothèses physiopathologiques de Patrick Honoré détaillées précédemment. Enfin, cette étude a montré que le traitement par FAPC permettait de restaurer une réponse immunitaire à la stimulation endotoxinique (28).

Une seconde étude, prospective et en intention de traiter, sur des patients en choc septique présentant ou non une insuffisance rénale et traités par FAPC a par la suite été réalisée. Douze patients, admis en réanimation pour un choc septique nécessitant une ventilation mécanique, ont bénéficié de plusieurs séances de FAPC. Plusieurs paramètres

hémodynamiques (pression artérielle moyenne, index cardiaque, résistances vasculaires périphériques) et respiratoires (rapport PaO_2/FiO_2) étaient évalués au début puis à la fin des séances. Une amélioration significative de ces paramètres après FAPC a été rapportée par cette étude (119).

Ces deux études cliniques ont surtout mis en évidence une sécurité d'application de la FAPC. Ainsi, dans l'étude menée par Ronco et al., aucun effet secondaire lié à la technique n'a été observé sur une durée totale de cent heures de traitement (28). La seconde étude, publiée par Formica et al., n'a également pas rapporté de complication du traitement (119). Notre équipe a également montré l'application clinique de la technique de FAPC, illustrant cette simplicité de mise en œuvre (115).

En 2008, nous avons également publié une revue de la littérature sur ce sujet (126). Une recherche dans la base de données Medline a été effectuée sur la période 1984 à 2008. Les mots clés utilisés étaient "coupled plasmafiltration", "coupled plasma filtration", "adsorption", "blood purification", "cytokines" et "sepsis". Les articles anglophones et francophones relatifs à une technique de purification sanguine extracorporelle par adsorption couplée à une filtration plasmatique au cours du choc septique ont été sélectionnés. Les publications traitant de l'épuration par hémoadsorption sur une résine adsorbante sans séparation plasmatique étaient exclues. Les articles de revue, les cas cliniques ainsi que les études cliniques et expérimentales étaient retenues. La bibliographie de ces publications était analysée à la recherche de sources additionnelles. Parmi treize publications identifiées abordant la technique de FAPC, neuf articles essentiels ont été retenus. Ceux-ci sont présentés dans le tableau 11. Quatre articles de revue et actes de congrès présentant des informations redondantes par de mêmes auteurs ont par ailleurs été exclus. Les niveaux de preuve des études cliniques sont définis selon le type de méthodologie expérimentale employée.

TABLEAU 11. Principales publications concernant la technique de FAPC issues de l'analyse de la littérature et niveaux de preuve des études cliniques définis selon le type de protocole expérimental (d'après (126)).

Auteur et année (référence)	*Type de publication*	*Paramètre principal évalué*	*Niveau de Preuve*
Tetta 1998 (122)	EE *in vitro*	Adsorption des cytokines	NA
Tetta 2000 (123)	EE animale contrôlée	Survie à 72h	NA
Ronco 2002 (28)	ECR	Paramètres hémodynamiques et réponse leucocytaire	Niveau II
Formica 2003 (119)	ECNC	Paramètres hémodynamiques	Niveau III
Mariano 2004 (118)	ECR	Anticoagulation par citrate	Niveau III
Ronco 2003 (116)	Revue		NA
Formica 2007 (114)	Revue		NA
Page 2007 (115)	Cas clinique	Application clinique	Niveau V
Bellomo 2003 (127)	Revue		NA

EE = étude expérimentale ; ECR = essai contrôlé randomisé ; ECNC = essai clinique non contrôlé ; NA = non applicable.
Niveau I = large ECR avec résultats significatifs ; niveau II = petits ECR aux résultats incertains ; niveau III = essais non randomisés ; niveau IV = études rétrospectives ; niveau V = séries de cas, cas cliniques.

Très récemment, Lentini et al. (équipe de Claudio Ronco) ont cherché à comparer sur le plan clinique les deux techniques de purification sanguine utilisées dans ce département à Vicenza en Italie. Aucune différence n'a été observée sur le plan hémodynamique entre la « pulse high-volume hemofiltration » et la FAPC sur ce petit collectif de 8 patients évalués en cross-over (128).

Les travaux de Ronco et al. en 2002 avaient suggéré un effet de la FAPC sur la fonction immunitaire, au-delà de la simple épuration de certains médiateurs inflammatoires. Une équipe chinoise a récemment rapporté des données semblables au cours d'une petite étude pilote en self cross over sur 7 patients. L'expression d'HLA DR par les monocytes augmentait après FAPC (84,32 % ± 4,63 % *vs* 73,65 % ± 11,52 %, p = 0,037) alors qu'il n'y avait pas de changement après hémofiltration à haut débit (p > 0,05). De même, la production spontanée de TNF-α et la réponse leucocytaire à la stimulation endotoxinique étaient augmentées après FAPC alors qu'elles ne changeaient pas avec l'hémofiltration à haut débit. Les auteurs proposent donc en conclusion une amélioration de la capacité à présenter l'antigène après FAPC de même qu'une restauration de la réponse leucocytaire, suggérant ainsi un rôle potentiellement bénéfique de la FAPC au cours du syndrome de défaillance viscérale (129).

Perspectives

La FAPC est aujourd'hui une technique que l'on peut considérer encore comme récente et dont le développement semble relativement lent. Seulement une vingtaine de publications importantes ont été rapportées en un peu plus de 10 ans. Néanmoins, ces premières études ont montré des résultats intéressants. Bien que les effectifs de ces études soient de faible taille, une amélioration hémodynamique a été mise en évidence plusieurs fois. D'autres résultats sont bien sur nécessaires pour préciser la place de la FAPC dans l'arsenal des techniques de purification sanguine existant de nos jours. Une étude multi-centrique a débuté en Italie en décembre 2006. Cette étude, baptisée COMPACT (pour *COMbining Plasmafiltration and Adsorption Clinical Trial*) a pour objectif de comparer l'effet sur la mortalité de l'adjonction ou non d'un traitement par FAPC à une prise en

charge médicale standard du choc septique. Elle inclut des patients admis en réanimation pour un choc septique ou développant un choc septique au cours de leur hospitalisation.

La pharmacocinétique de molécules thérapeutiques au cours des traitements par FAPC doit par ailleurs être étudiée. La fixation sur la résine des différentes classes d'agents anti-infectieux est peu connue. Or, une adsorption importante d'antibiotiques ou d'antifongiques peut conduire à des concentrations plasmatiques insuffisantes et se traduirait par une inefficacité sur les micro-organismes responsables du sepsis. La détermination de l'adsorption des principaux agents anti-infectieux est donc nécessaire pour proposer des adaptations posologiques ou recommander un monitorage biologique des concentrations de certains agents lors de l'application d'une épuration par FAPC. L'identification éventuelle d'une élimination délétère d'oligoéléments et de vitamines pourrait également permettre de proposer une substitution lors des séances de FAPC.

D'autres études doivent apprécier la place de la FAPC dans l'arsenal thérapeutique des états septiques. L'importance d'une instauration précoce et le nombre de séances restent encore à préciser.

Conclusion

La FAPC ou CPFA, basée sur l'adsorption des médiateurs de l'inflammation, pourrait être une technique prometteuse. L'application de cette thérapie à la phase précoce du choc septique semble améliorer les paramètres hémodynamiques des patients. Pourtant, des arguments soutenant l'efficacité de la technique sont encore nécessaires et des études en cours permettront probablement de préciser le rôle de la FAPC dans l'amélioration du pronostic des états septiques graves.

2) L'hémoadsorption

Généralités

Nous avons rapporté précédemment que l'un des responsables du taux de mortalité si élevé du choc septique est l'endotoxine, au travers de la réponse inflammatoire systémique de l'hôte qu'elle génère. L'endotoxine en elle-même ne semble pas intrinsèquement toxique, c'est la non adéquation de la réponse inflammatoire générée qui est aujourd'hui perçue comme responsable de l'évolution vers le syndrome de défaillance multiviscérale et le décès. A ce propos, on comprend pourquoi les antibiotiques bactéricides peuvent exacerber temporairement cette réponse inflammatoire en lysant les bactéries et en libérant ainsi de nouvelles endotoxines qui sont des composants de la paroi des bactéries à gram négatif.

L'hémoadsorption, appelée aussi « direct hemoperfusion » en anglais, consiste à mettre un dispositif adsorbant en contact direct avec le sang au sein d'un circuit extracorporel. Les matériaux adsorbants non spécifiques, tels que charbons et résines, attirent les solutés *via* différents types de forces incluant interactions hydrophobiques, attractions ioniques (ou électrostatiques) et forces de van des Waals. Il a clairement été montré que les médiateurs inflammatoires et les endotoxines pouvaient efficacement être pris pour cibles par cette technique (130,131). Dans certains cas, l'hémoadsorption est davantage focalisée sur l'épuration des endotoxines plutôt que les cytokines. En effet, l'hémoadsorption utilisant des fibres de polymyxine B est la technique la plus utilisée et probablement la plus efficace aujourd'hui pour épurer les endotoxines du sang d'un patient septique. La polymyxine B est un polypeptide basique cyclique qui agit comme un détergent de surface cationique pouvant altérer la perméabilité de la membrane des bactéries à gram négatif. Cet agent a une haute affinité pour le lipide A, l'un des composants de l'endotoxine. La polymyxine B est néphrotoxique et neurotoxique et ne peut donc pas être injectée dans la circulation systémique. En conséquence, le seul moyen pour bénéficier de ces effets d'adsorption sur l'endotoxine est l'utilisation d'un circuit extracorporel.

La polymyxine B est attachée de façon covalente à une fibre insoluble de polystyrène α-chloracétamide-methylé *via* son groupe amine. La quantité de polymyxine B relarguée dans le sang depuis la fibre est infime, aboutissant à des niveaux de concentration non toxiques. Thrombopénies et leucopénies transitoires sont les principaux effets secondaires de cette thérapie. De nombreuses études expérimentales ont montré l'efficacité de l'hémoadsorption à la polymyxine B pour épurer l'endotoxine (130,132). Cependant, la production de cytokines n'est pas complètement éliminée avec cette thérapie, suggérant que des composants bactériens autres que l'endotoxine pourraient également contribuer à la réponse inflammatoire systémique.

Cette technique n'est pas récente. Depuis 1994, l'hémoperfusion directe à la polymyxine B (Toraymyxin, Toray industries, Tokyo, Japon) est largement utilisée au Japon en tant que technique de purification sanguine pour épuration des endotoxines. Les séances d'hémoadsorption à la polymyxine B sont d'ailleurs remboursées par la sécurité sociale japonaise (133). La colonne adsorbante est un tube en polypropylène de 170 mL contenant 53 g de fibres de polystyrène attachés de façon covalente à 370 mg de polymyxine B (7 mg de polymyxine B / 1 g de fibre). Les sessions d'hémoadsorption à la polymyxine B sont habituellement conduites sur une durée de 2 h, une à deux fois par jour, avec un débit sang de 100 mL/min. Les différents anticoagulants à disposition peuvent être utilisés. Cependant, l'hémoadsorption est toujours au stade de l'évaluation en Europe et aux Etats-Unis en raison du manque de preuves concernant ses effets bénéfiques sur le devenir des patients.

Etudes cliniques avec la polymxyxine B

La plus grosse étude jamais réalisée concernant l'hémoadsorption vient récemment d'être publiée par Cruz et al. (équipe de Claudio Ronco) dans la revue JAMA (134). L'étude EUPHAS (Early Use of Polymyxin B Hemoperfusion in Abdominal Sepsis) est une étude prospective, multicentrique, randomisée, contrôlée qui s'est

déroulée dans 10 réanimations italiennes entre décembre 2004 et décembre 2007. 64 patients en sepsis sévère ou choc septique en rapport avec une infection intra abdominale ont été randomisés dans les 6 h suivant leur intervention chirurgicale abdominale. 30 patients ont été inclus dans le groupe thérapie conventionnelle et 34 patients ont été inclus dans le groupe traitement conventionnel plus 2 sessions d'hémoadsorption à la polymyxine B. Les sessions d'hémoadsorption duraient 2 h et la deuxième session devait être réalisée 24 h après la fin de la première session. L'hémodynamique du groupe hémoadsorption était améliorée à 72 h avec une réduction des besoins en amines vasopressives alors que cela n'a pas été le cas dans le groupe conventionnel. Les paramètres d'oxygénation tels que le rapport PaO_2/FiO_2 étaient également meilleurs dans le groupe hémoadsorption. Le score SOFA était aussi amélioré mais le principal résultat reste la mortalité à 28 j qui était diminuée de façon drastique pour atteindre 32 % dans le groupe hémoadsorption contre 53 % dans le groupe contrôle (hazard ratio : 0,36 ; intervalle de confiance à 95 % : 0,16 – 0,80) (134).

Cette étude reste néanmoins très controversée et les conclusions doivent être prises avec la plus grande prudence. D'abord, l'étude a été élaborée pour déterminer si l'hémoadsorption avec polymyxine B améliorait ou non l'hémodynamique de cette population cible. Le critère mortalité était seulement un critère secondaire et compte tenu des différences hémodynamiques observées, certes statistiquement significatives mais non spectaculaires, il est surprenant d'obtenir une telle réduction de mortalité à 28 jours : 11/34 (32 %) pour le groupe hémoadsorption contre 16/30 (53 %) pour le groupe conventionnel (p=0,03). L'étude a cependant été arrêtée avant son terme car il a été jugé non éthique de priver les autres patients du traitement. Cette décision est extrêmement discutable car basée sur l'analyse d'un paramètre secondaire. Il est d'ailleurs intéressant de noter qu'un devenir différent pour un seul patient aurait annulé la significativité statistique des résultats concernant la mortalité (135). On pourrait même ajouter que l'arrêt prématuré de cette étude a en fait malheureusement privé la communauté scientifique de données plus robustes concernant ce traitement. Enfin, le caractère contrôlé de l'étude est à remettre en cause lorsque l'on constate que les paramètres hémodynamiques et respiratoires ont en fait simplement été analysés séparément, au sein

de chacun des 2 groupes, entre la 72ème heure et le temps de base. Les valeurs à 72 h n'ont en effet pas été comparées entre les groupes (sauf pour le score SOFA).

Bien qu'à prendre donc avec précaution, cette étude s'ajoute cependant à d'autres travaux ayant montré des résultats intéressants avec l'hémoadsorption (136,137). En 2005, Jean-Louis Vincent et al. ont publié une étude pilote, multicentrique, randomisée, contrôlée chez 36 patients en choc septique secondaire à une infection bactérienne. 19 patients étaient alloués au traitement standard et 17 bénéficiaient en plus d'une séance de 2 h d'hémoadsorption à la polymyxine B. Les concentrations en endotoxines et en IL-6 n'étaient pas différentes entre les groupes dans les 24 h qui suivirent le début de la prise en charge. En revanche, les patients traités par hémoadsorption présentaient une amélioration hémodynamique franche (augmentation de l'index cardiaque et de l'index de travail systolique du ventricule gauche) ainsi qu'une amélioration de la fonction de transport de l'oxygène. Les besoins en EER continue après l'étude étaient par ailleurs diminués dans le groupe hémoadsorption (P = 0,043) et aucun effet secondaire lié à la technique n'avait été rapporté (138). Ces effets bénéfiques de l'hémoadsorption dans cette indication ont récemment été également rapportés par une revue systématique de la littérature ayant poolé 28 publications (1425 patients dont 978 ayant bénéficié de l'hémoadsorption à la polymyxine B et 447 ayant bénéficié d'un traitement conventionnel) (139). En effet, bien que Cruz et al. mettent en avant la qualité médiocre (nombreux biais méthodologiques, absence d'aveugle) de la plupart des études disponibles dans la littérature, des effets positifs sont rapportés sur la pression artérielle, les besoins en amines, les échanges gazeux et même la mortalité (139). Cette revue insiste donc sur la nécessité de réalisation d'autres travaux plus rigoureux afin de mieux préciser les effets réels de l'hémoadsorption en tant que traitement adjuvant du choc septique. Une large étude multicentrique, similaire à l'étude EUPHAS, vient d'ailleurs de démarrer aux Etats-Unis.

Notre expérience de l'hémoadsorption

L'hémoadsorption est très utilisée en pratique clinique au Japon. En Europe et aux Etats-Unis, son développement est moins avancé et son utilisation est limitée au cadre d'études cliniques ou expérimentales.

Le laboratoire CRISMA (Clinical Research, Investigation, and Systems Modeling in Acute Illness) du département de réanimation de l'Université de Pittsburgh aux Etats-Unis travaille sur le développement d'une nouvelle colonne d'hémoadsorption pour le traitement des patients en choc septique. De nombreuses études sont donc réalisées au sein de cette équipe pour le développement de cette colonne adsorbante (*in vitro*, *ex vivo*, animales, humaines). Plusieurs départements de l'Université de Pittsburgh travaillent en étroite collaboration sur ce projet (bioingénierie, réanimation, chirurgie, médecine, biostatistiques, mathématiques). La compagnie Cytosorb^{TM} est le laboratoire qui développe ces cartouches de billes adsorbantes de nature polymérique (divinylbenzène) en vue de réaliser cette colonne d'hémoadsorption. Une étude clinique est en cours en Allemagne et des travaux expérimentaux d'optimisation des billes adsorbantes sont effectués en parallèle à Pittsburgh.

La technologie Cytosorb^{TM} ne cible pas l'endotoxine. Il a été montré en 2004 une élimination rapide *in vitro* et *in vivo* de plusieurs cytokines inflammatoires avec ce produit (131). Des travaux *in vivo* chez le rat ont également été effectués par la suite. 33 rats septiques (modèle de ligature ponction cæcale) ont été randomisés en 2 groupes 20 h après la ligature ponction caecale. 17 rats bénéficiaient d'une circulation extracorporelle avec passage du sang dans une mini colonne hémoadsorbante et 16 rats appelés rats témoins bénéficiaient de la circulation extracorporelle sans hémoadsorption. Les concentrations en TNF-α, IL-1 ß, IL-6 et IL-10 étaient significativement plus faibles dans le groupe hémoadsorption à la fin du traitement et cette différence persistait 6 h après le traitement (Figure 10). La pression artérielle moyenne des rats du groupe hémoadsorption était également meilleure (Figure 11). Enfin, la survie moyenne était plus longue pour les rats du groupe hémoadsorption (720 vs 381 min, $p = 0,02$) et la survie globale (12 h après

randomisation) était également meilleure (11/17 *vs* 2/16, hazard ratio : 2,87 ; intervalle de confiance à 95 % : 1,19 – 7,26 ; p<0,01) (figure 12) (140).

FIGURE 10. Effets de l'hémoadsorption sur l'élimination des cytokines (mean ± SEM, pg/mL). Hémoadsorption en noir, témoin en blanc. Les 4 cytokines ont montré des différences significatives au cours du temps et entre les groupes. * hemoadsorption *vs* témoin (p<0,05) et † en comparaison par rapport à la concentration de base (p<0,05) (d'après (140)).

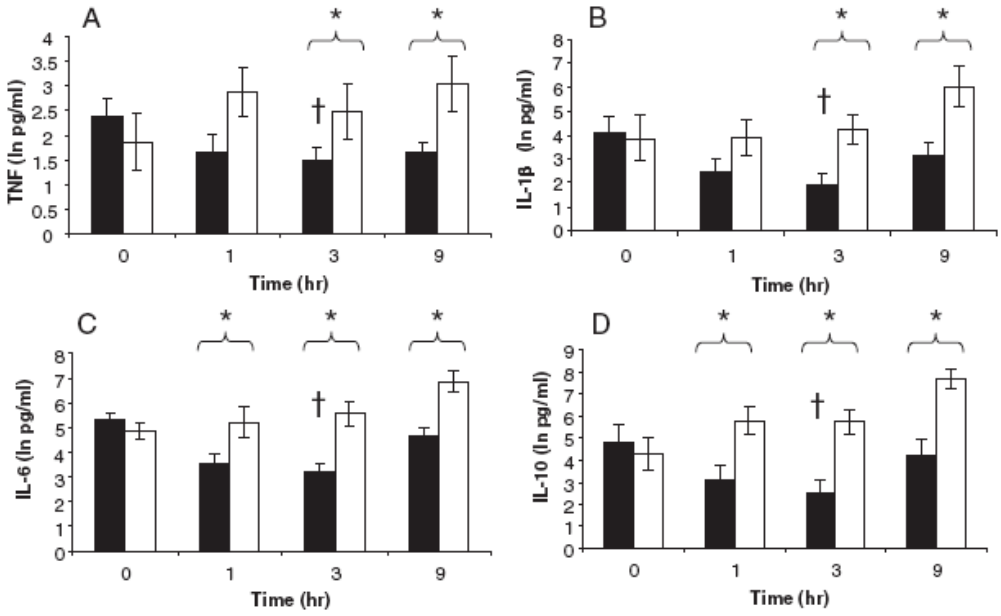


Figure 11. Effets de l'hémoadsorption sur la PAM (mean ± SEM, mmHg). Hémoadsorption en pointillés, témoin en continu. La PAM était significativement différente au cours du temps et selon les groupes (p<0,01). * hemoadsorption *vs* témoin (p<0,05) et † en comparaison par rapport à la concentration de base (p<0,05) (d'après (140)).

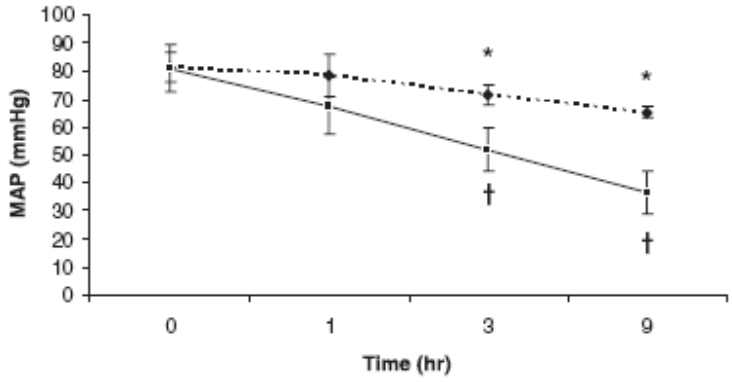
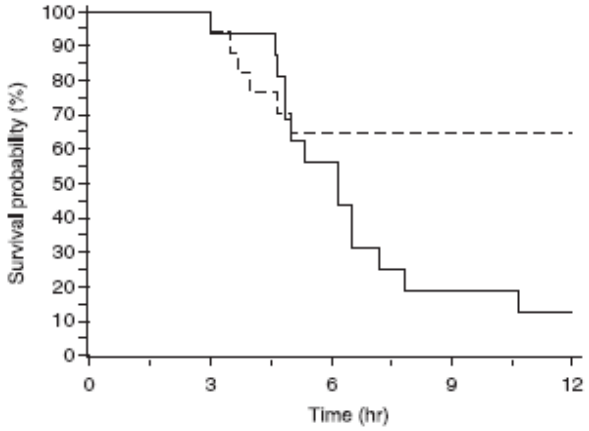


Figure 12. Effets de l'hémoadsorption sur la survie à court terme. La période d'observation allait du début de l'intervention jusqu'à 12 h après. Hémoadsorption en pointillés, témoin en continu. La survie moyenne était significativement meilleure dans le groupe hémoadsorption (p = 0,02) et la survie globale (jusqu'à 12h) était significativement améliorée (p<0,01) (d'après (140)).



La partie *ex vivo* est aussi intéressante. Le laboratoire fournit différentes mini-colonnes d'hémoadsorption (1 mL d'espace mort) et nous testons ces mini colonnes au sein d'un circuit extracorporel miniaturisé. Du sang est prélevé chez des malades en choc

septique hospitalisés en réanimation et le sang passe ensuite dans ces circuits extracorporels miniaturisés. Bien sur le sang ne retourne pas au malade après la fin de l'expérience. L'objectif est d'étudier l'effet des mini colonnes d'hémoadsorption sur les différents paramètres de l'inflammation (cytokines inflammatoires, marqueurs de surface des leucocytes dont l'expression est quantifiée par cytométrie en flux).

La première étape de ce projet a d'abord consisté à élaborer un circuit extracorporel expérimental miniaturisé, *ex vivo*, clos (141). A des fins de recherche, les circuits *ex vivo* sont fréquemment utilisés car ils permettent l'évaluation d'hémofiltres, de dialyseurs, de cartouches d'adsorption ou autres outils sans exposition à un animal ou à un patient et ils peuvent être miniaturisés permettant ainsi un rapide screening des produits (142-146). Le sang est habituellement placé dans un réservoir et circule alors en circuit fermé avec de multiples passages au travers du produit étudié. Les réglages de ce genre de circuit ne sont absolument pas standardisés et les conditions expérimentales varient d'une étude à l'autre (142-146). Ces circuits *ex vivo* extracorporels sont aussi sous l'influence d'une activation inflammatoire due à des conditions environnementales spéciales telles que le circuit artificiel (tubes, lignes, réservoir), la température extérieure, le mouvement du sang et l'interface sang/air. Cependant, si l'on veut évaluer des produits de purification sanguine en utilisant ces circuits, il est important d'établir des conditions qui entrainent l'activation inflammatoire la moins importante possible puisque cette activation peut interférer avec voire masquer les effets du produit lui-même. Les variables étudiées étaient des marqueurs de la réponse inflammatoire (concentrations sériques en cytokines, marqueurs de surface des leucocytes étudiés en cytométrie de flux, compte différentiel des leucocytes). L'objectif de cette étude a donc été d'optimiser sur le plan inflammatoire un circuit extracorporel miniature *ex vivo* en minimisant l'activation inflammatoire propre liée au circuit.

L'un des paramètres connu pour avoir un impact sur l'activation des cellules inflammatoires est la température du sang lors de son passage dans le circuit *ex vivo*. Dans les circuits *ex vivo*, la température à laquelle doit être effectuée l'expérience n'est pas déterminée clairement dans la littérature. La manipulation doit-elle être effectuée à

température corporelle (ce qui implique la présence d'un réchauffeur dans le circuit) ou bien à une autre température (par exemple la température ambiante de la pièce) ? Conserver la température du sang à 37 °C à l'aide d'un réchauffeur apparait comme étant physiologique. Cependant, si maintenir la température corporelle en *ex vivo* est pro inflammatoire en soi, alors cet effet pourrait perturber l'évaluation du produit censé être étudié. D'autre part, l'hypothermie (température ambiante = 20°C) est connue pour avoir des effets anti-inflammatoires, inhibant la réponse leucocytaire après certaines agressions tissulaires telles que l'ischémie cérébrale ou l'agression hépatique (147-149). Par conséquent, au cours de cette étude, nous avons évalué l'influence de différentes températures du sang sur la production de cytokines et l'expression de marqueurs de surface des leucocytes dans un modèle de circuit extracorporel miniaturisé.

Matériels et méthodes

L'étude a été approuvée par le "University of Pittsburgh Institutional Review Board". Après obtention d'un consentement éclairé, 20 volontaires sains ont donné leur sang. Les volontaires sains étaient définis comme étant âgés de plus de 18 ans, n'étant pas enceinte, pesant au moins 50 kg, et n'ayant pas de problèmes médicaux de type anémie, hémophilie, de problèmes médicaux chroniques, ou d'infection aiguë dans les 2 semaines précédant le prélèvement.

Le sang était collecté dans des tubes sodium héparinés. La ponction sanguine était réalisée dans un local adapté par un personnel qualifié. L'expérience a consisté à faire circuler le sang dans 3 conditions expérimentales différentes pendant 4 heures : 1. Un circuit *ex vivo* miniaturisé équipé d'un réchauffeur réglé à 37 °C ; 2. Le même circuit sans le réchauffeur (sang à température ambiante) ; et 3. Prélèvement sanguin placé dans un incubateur à 37 °C (pas de circuit). Ces 3 conditions expérimentales sont représentées sur la figure 13.

Le circuit extracorporel était constitué de lignes en polyéthylène (Intramedic^{TM}, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA), d'un tube de 15 mL servant de réservoir de 10 mL (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA), d'autres lignes en silicone et d'une mini pompe (Control Company, Friendswood, TX, USA) réglée pour obtenir un débit sang de 0,75 mL/min. De l'héparine non fractionnée (Heparin Sodium for Injection, USP, Hospira, Inc., Lake Forest, IL, USA) était ajoutée au sang avant le début de chaque expérience avec comme objectif de concentration 10 UI/mL.

Figure 13. Les 3 conditions expérimentales : circuit extracorporel avec réchauffeur, circuit sans réchauffeur, tube placé dans un incubateur à 37 °C (pas de circuit) (d'après (141)).



Pour le dosage des cytokines, le sang était prélevé du circuit à l'aide d'une pipette depuis le réservoir ou bien à partir de tube placé dans l'incubateur aux différents temps suivants : temps de base, 15 min, 1, 2 et 4 heures. Les prélèvements étaient immédiatement centrifugés à 1500 tours par minute pendant 5 minutes, le plasma était ensuite retiré et placé dans des eppendorfs (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) au congélateur à -80 ºC jusqu'à la mesure. Les concentrations en granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), tumor necrosis factor (TNF), et en interleukines (IL) -1 β, IL-6, IL-8, and IL-10 étaient mesurées en double *via* la technique Luminex®. Les analyses étaient effectuées avec un Bio-Rad Bio-Plex™ 200 Protein Array System avec le software Bio-Plex Manager™ 4.0 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Les limites de détection étaient les suivantes : 3,1 pg/mL pour GM-CSF, 6,7 pg/mL pour IL-1 β, 1,6 pg/mL pour IL-6, 3,8 pg/mL pour IL-8, 2,3 pg/mL pour TNF, 4,1 pg/mL pour IL-10. Pour vérifier si le temps entre la ponction sanguine chez le volontaire sain et le début de l'expérience (entre 20-30 min) avait une influence sur les mesures des concentrations en cytokines (la température du sang décroit juste après le prélèvement, puis ré-augmente lors de l'utilisation du réchauffeur), nous avons réalisé une manipulation supplémentaire où chaque prélèvement sanguin à partir du volontaire sain était séparé en 3 tubes. Un tube était placé immédiatement dans l'incubateur à 37 ºC (pour cette expérience, le prélèvement était effectué au laboratoire, devant l'incubateur), un tube était placé dans l'incubateur après avoir été laissé à température ambiante pendant 1 heure, et le tube restant était laissé à température ambiante pendant la totalité de la manipulation. Des prélèvements pour mesure de la concentration en cytokines étaient effectués régulièrement pendant 4 h.

Pour la mesure de l'expression des marqueurs de surface des leucocytes, réalisée par cytométrie en flux, le sang était prélevé du circuit à l'aide d'une pipette depuis le réservoir ou bien à partir de tube placé dans l'incubateur aux différents temps suivants : temps de base, 2 et 4 heures. Les globules rouges étaient lysés à l'aide d'une solution lysante appelée BD Pharm Lyse^{TM} lysing solution (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) et lavés avec une solution de serum bovin d'albumine à 1 %. Les récepteurs Fc étaient bloqués avec un excès d'IgG. Les cellules dont les marqueurs

de surface devaient être étudiés étaient incubées avec l'anticorps approprié et fixées dans une solution de paraformaldehyde à 1 % avant analyse par un Beckman Coulter XL-MCL. Tous les anticorps provenaient de Becton Dickinson and Company, excepté hTACE (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) et l'Annexine V (Millipore, Billerica, MA, USA). Les cellules dont l'expression du NFkB était mesurée étaient traitées par un cycletest Plus Kit (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) selon les recommandations de la compagnie avant d'être marquées par un anticorps anti-NFkB (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA). Toutes les données étaient analysées avec le logiciel FCS Express (De Novo Software, Los Angeles, CA, USA). Les cellules polynucléées et les monocytes étaient séparés selon leur différence de taille. HLA-DR, CD 11b, CD 11a, CD 62L, TACE, et l'expression de NFkB étaient mesurés avec la moyenne géométrique de l'intensité de fluorescence. L'apoptose était mesurée selon le pourcentage de cellules positives pour le marquage annexine V avec le propidium iodide excluant les cellules nécrotiques.

Pour l'analyse statistique, les concentrations en cytokines étaient comparées entre les 3 groupes avec un test exact de Kruskal-Wallis. S'il y avait une différence globale significative, le test exact de Wilcoxon Rank Sum était utilisé pour la comparaison par paires. Pour les marqueurs de surface des leucocytes, nous avons réalisé une analyse à mesures répétées sur le logarithme naturel de la donnée en utilisant l'approche GEE (Generalized Estimating Equations) afin d'estimer la corrélation entre les mesures répétées. Les modèles incluaient le groupe, le temps et leur interaction en tant que variables indépendantes. Si l'effet groupe changeait significativement au cours du temps (c'est à dire que l'effet « interaction temps-groupe » était statistiquement significatif), la différence entre les groupes était alors estimée à chaque temps. Pour la manipulation supplémentaire comparant le sang placé immédiatement dans l'incubateur ou bien ayant été laissé à température ambiante pendant une heure, nous avons réalisé un test exact de Wilcoxon Signed Rank pour les données pairées afin d'évaluer l'effet groupe. Enfin, le test exact de Wilcoxon Signed Rank était aussi réalisé pour la comparaison de l'expression du NFkB. Les données sont exprimées selon moyennes ± DS. Une valeur de

p<0,05 était considérée comme statistiquement significative. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Résultats

Aucun phénomène de coagulation n'a été observé pour l'ensemble des conditions expérimentales étudiées. Pour la condition 1, circuit avec réchauffeur, la température du sang était mesurée entre 28 ºC à la surface et 35 ºC au fond du réservoir. Pour la condition 2, circuit sans réchauffeur, la température du sang était de 23 ºC (température de la pièce). Enfin, pour la condition 3, absence de circuit, incubateur, la température du sang était maintenue à 37 ºC.

Les concentrations en cytokines ont augmenté au cours du temps dans les 3 conditions expérimentales. A température ambiante, l'augmentation était insignifiante pour GM-CSF et IL-10 ou seulement très légère pour les autres cytokines étudiées, de < 6,7 à 8,9 ± 3,1 pg/mL pour IL-1 β, de < 1,6 à 3,3 ± 1,7 pg/mL pour IL-6, de 4,5 ± 1,3 à 107 ± 84 pg/mL pour IL-8 et de < 2,3 à 11 ± 6 pg/mL pour TNF. En revanche, pour les 2 autres conditions expérimentales, nous avons observé une élévation très marquée des concentrations en cytokines, atteignant à T4h 42 ± 15 pg/mL pour GM-CSF, 221 ± 108 pg/mL pour IL-1 β, 1126 ± 451 pg/mL pour IL-6, 3902 ± 2360 pg/mL pour IL-8 et 520 ± 392 pg/mL pour TNF dans le circuit équipé du réchauffeur. A T4h, les concentrations en cytokines les plus élevées étaient observées au cours de la condition 3 (incubateur seulement). Les concentrations en cytokines étaient statistiquement différentes entre les différentes conditions à T2h et T4h pour toutes les cytokines étudiées excepté pour IL-10 qui était différente seulement à T4h (Figure 14).

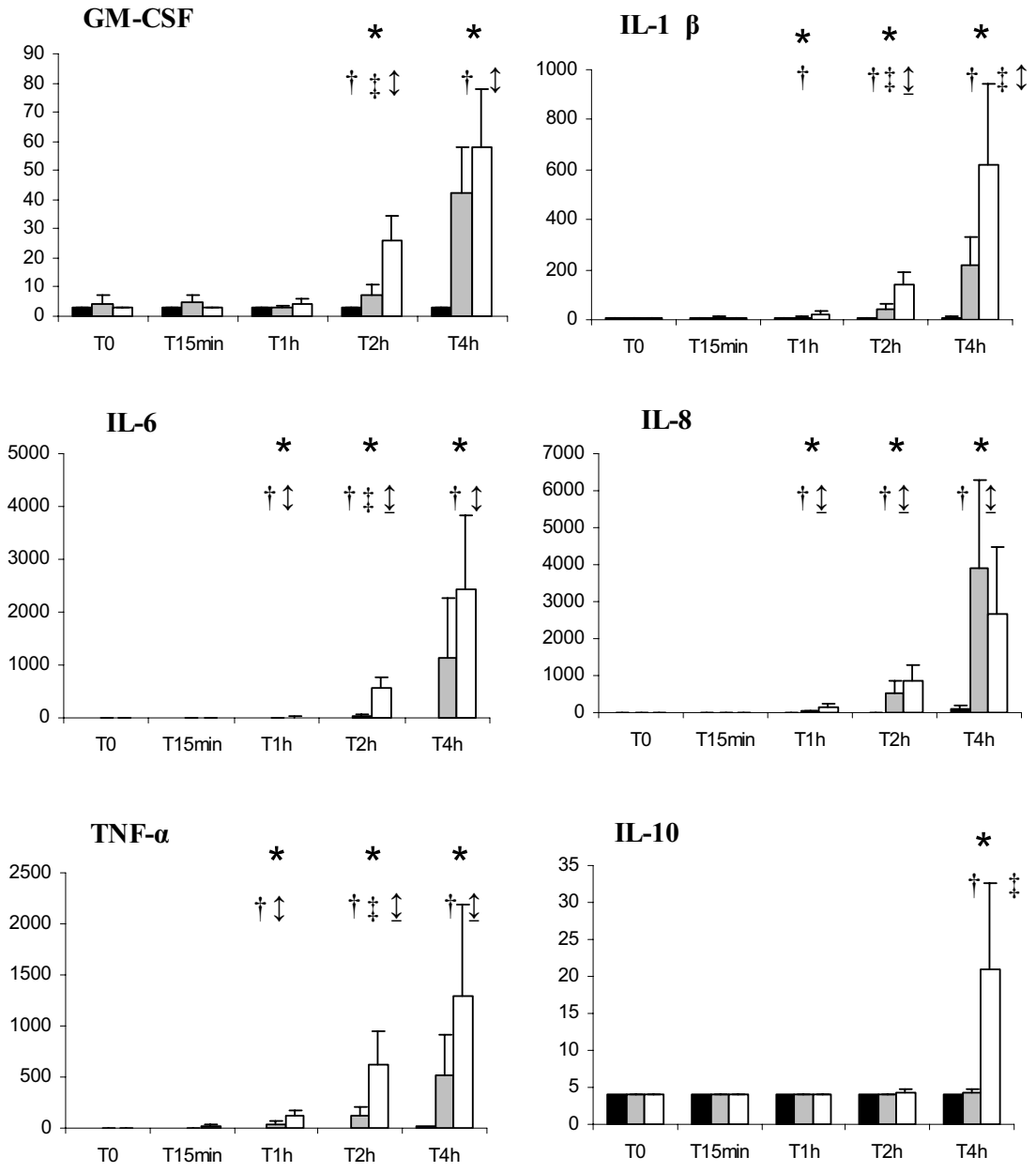
Des différences dans l'expression des marqueurs de surface des leucocytes étaient également observées entre la condition 2 et les 2 autres conditions « chauffées ». La différence entre ces conditions changeait de façon significative au cours du temps pour l'expression de CD11b par les polynucléaires (p<0,0001), d'HLA-DR par les monocytes (p=0,0019) et de CD 11a par les polynucléaires (p<0,0001). Aucune différence n'était en

revanche observée entre les 3 conditions pour l'expression de CD62L et TACE. L'évolution de l'expression d'annexine V était aussi différente au cours du temps entre les 3 groupes (p=0,0178 pour les monocytes et p=0,0011 pour les polynucléaires). L'expression des marqueurs de surface des leucocytes est représentée sur la figure 15.

Concernant la manipulation supplémentaire conduite pour déterminer si la variation de température avait une influence sur les résultats précédents, nous n'avons pas observé de différence statistiquement significative en termes de production de cytokines entre les tubes placés immédiatement après prélèvement dans l'incubateur et ceux placés dans l'incubateur après avoir été laissés à température ambiante pendant une heure, excepté pour IL-8 et IL-6 à T1h et T2h (figure 16). Là aussi, l'activation inflammatoire la moins importante était observée avec la température du sang maintenue à température ambiante.

Enfin, dans l'optique de mieux comprendre les mécanismes responsables des changements des concentrations en cytokines engendrées par le facteur température, nous avons mesuré l'expression du NFkB. L'expression de NFkB était moins importante dans le circuit gardé à température ambiante par rapport aux 2 conditions chauffées mais cela n'était pas statistiquement différent (Figure 17).

FIGURE 14. Concentrations sériques en cytokines au cours du temps (pg/mL) (d'après (141)).

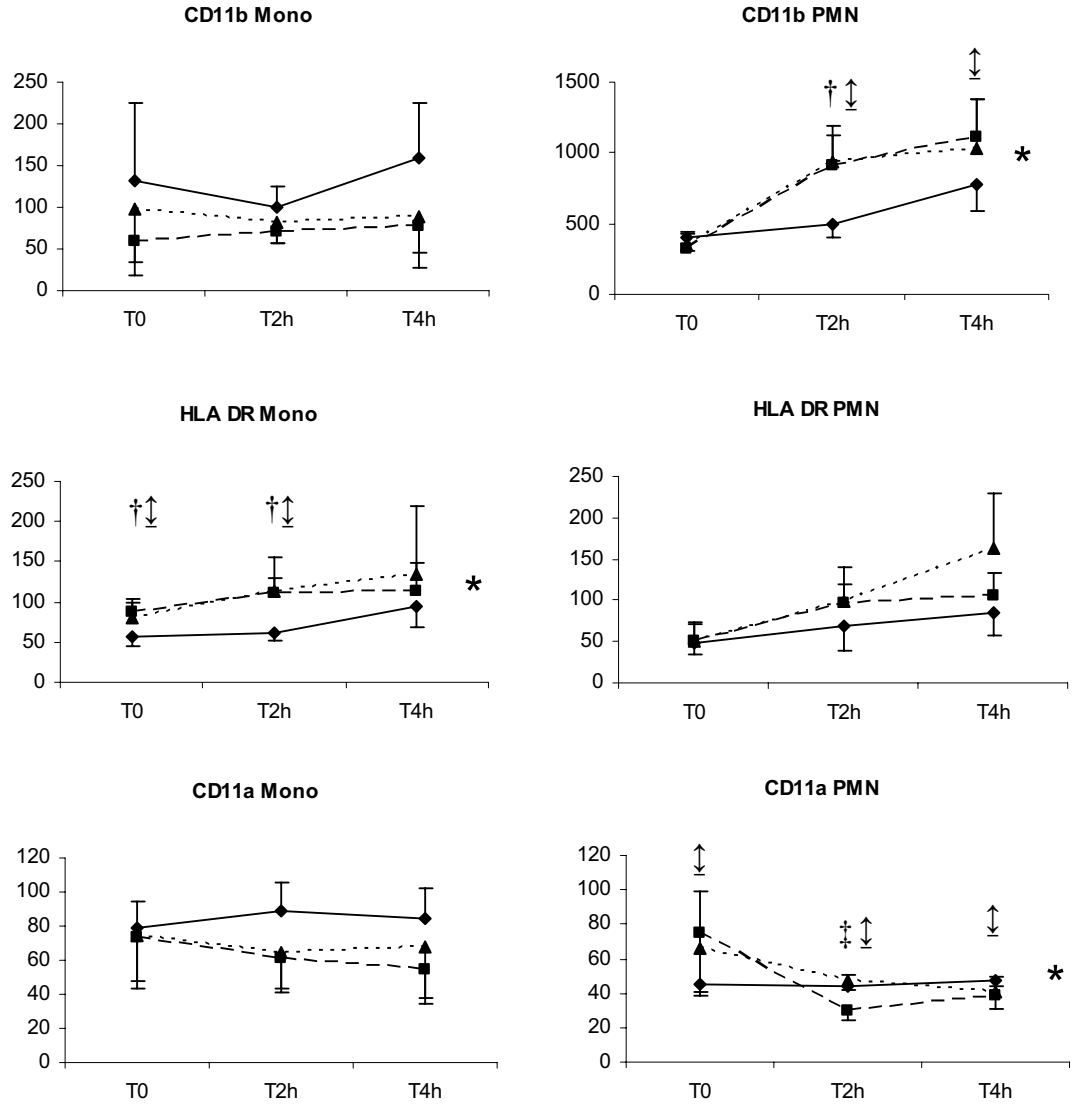


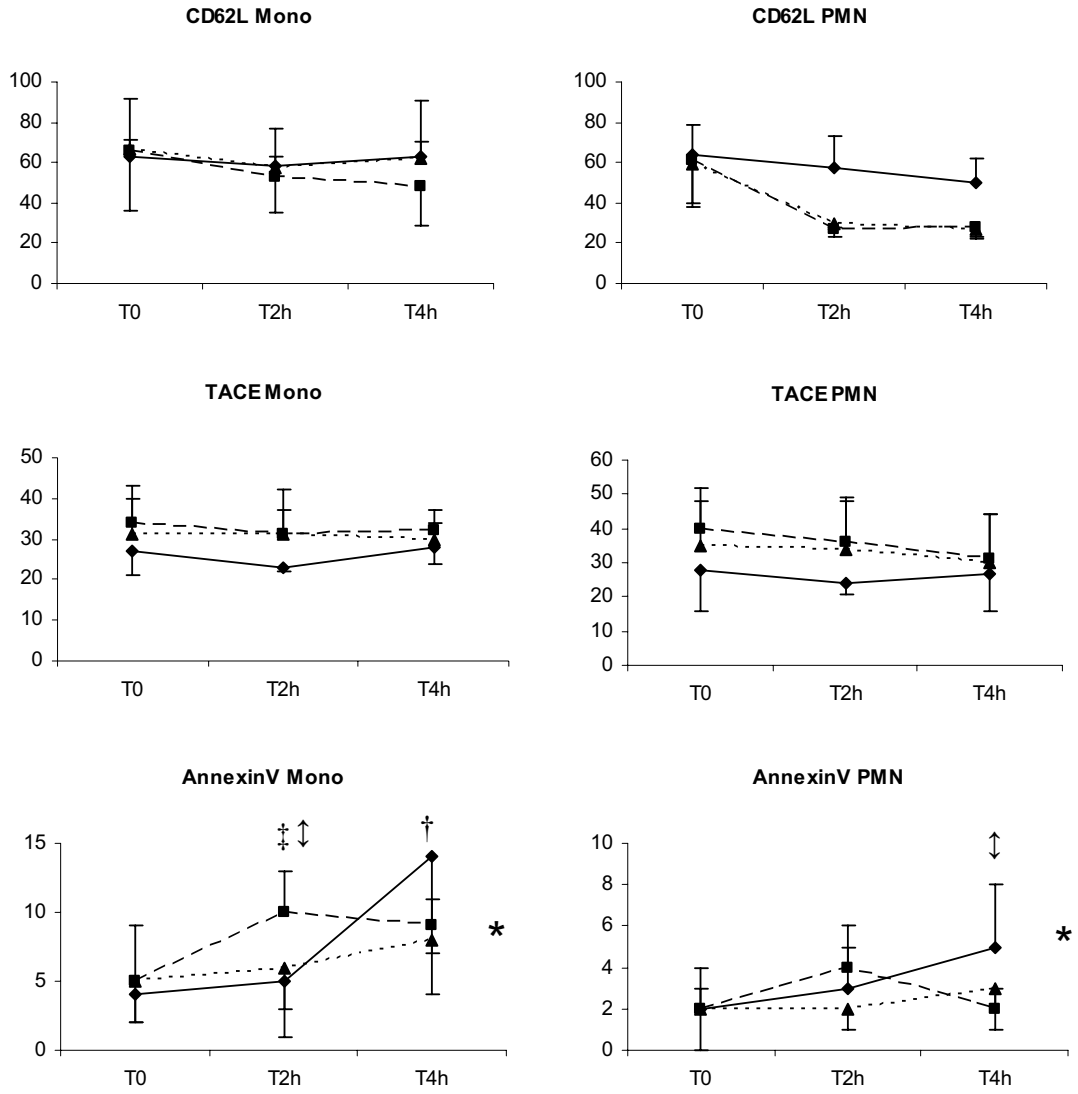
Noir : circuit à 23 °C. Gris : circuit à 37 °C. Blanc : pas de circuit, sang à 37 °C. Les données sont exprimées en moyennes ± DS.

Statistiques :
* = p<0,05 avec test exact de Kruskal-Wallis pour la différence globale entre les 3 groupes.

† = $p<0,05$ avec test exact de Wilcoxon Rank Sum pour la comparaison entre pas de réchauffeur et incubateur.
‡ = $p<0,05$ avec test exact de Wilcoxon Rank Sum pour la comparaison entre réchauffeur et incubateur.
↕ = $p<0,05$ avec test exact de Wilcoxon Rank Sum pour la comparaison entre réchauffeur et pas de réchauffeur.

FIGURE 15. Expression des marqueurs de surface des leucocytes mesurée par cytométrie en flux (moyenne géométrique de l'intensité de fluorescence) (d'après (141)).

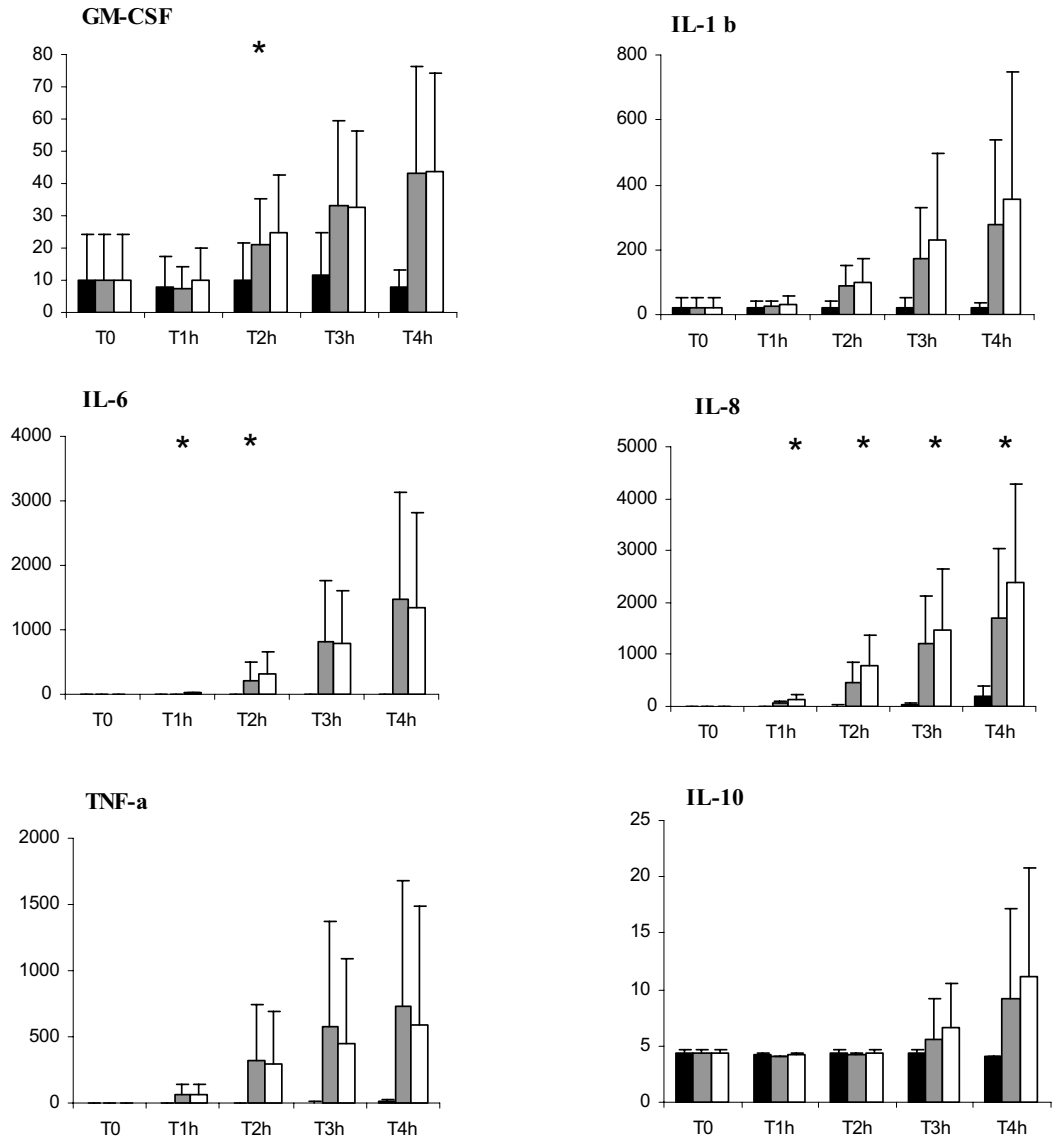




Losanges avec ligne continue = Circuit à 23 °C. Carrés en pointillés = Circuit à 37 °C. Triangles en pointillés = Absence de circuit, tube de sang à 37 °C. Les données sont exprimées selon les moyennes ± DS. Statistiques : * = p<0,05 pour l'interaction groupe × temps avec l'approche GEE.

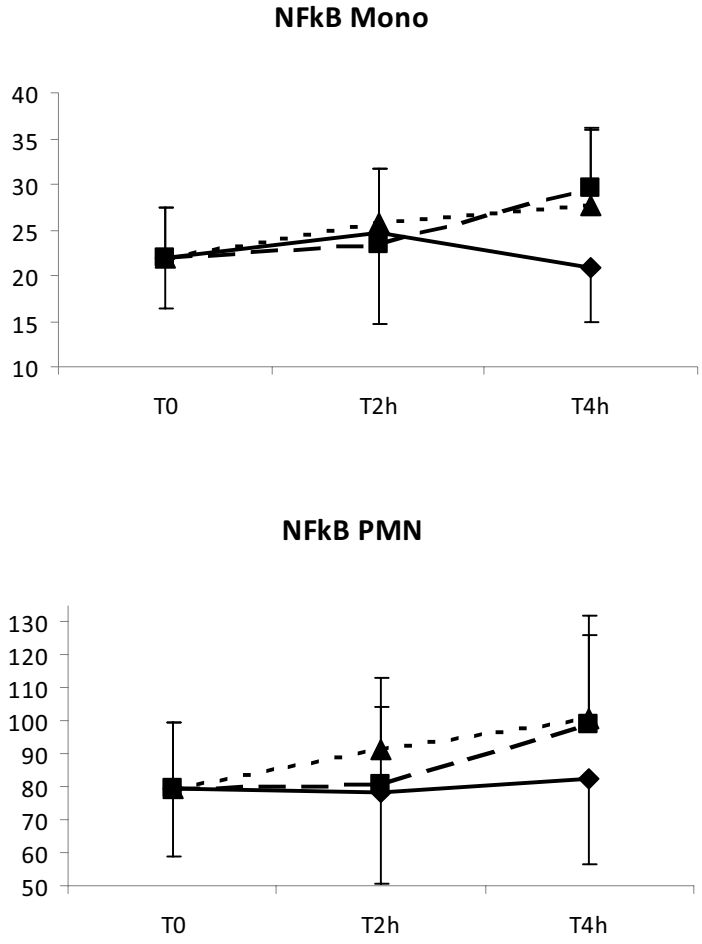
† = p<0,05 pour la comparaison entre pas de réchauffeur et incubateur à chaque temps.
‡ = p<0,05 pour la comparaison entre réchauffeur et incubateur à chaque temps.
↕ = p<0,05 pour la comparaison entre réchauffeur et pas de réchauffeur à chaque temps.

FIGURE 16. Concentrations sériques en cytokines au cours du temps (pg/mL) (d'après (141)).



Noir : pas de circuit, 23 °C. Gris : pas de circuit, 37 °C immédiatement après prélèvement. Blanc : pas de circuit, sang laissé à température ambiante (23 °C) pendant 1 h puis placé à 37 °C. Les données sont exprimées en moyennes ± DS. Statistiques : * = p<0,05 pour la comparaison entre 37 °C immédiatement après prélèvement ET sang laissé à température ambiante (23 °C) pendant 1 h puis placé à 37 °C, utilisant un test exact de Wilcoxon Signed Rank.

FIGURE 17. Expression du NFkB mesurée par cytométrie en flux (moyenne géométrique de l'intensité de fluorescence) (d'après (141)).



Losanges avec ligne continue = Circuit à 23 °C. Carrés en pointillés = Circuit à 37 °C. Triangles en pointillés = Absence de circuit, tube de sang à 37 °C. Les données sont exprimées selon les moyennes ± DS. Statistiques : test exact de Wilcoxon Signed Rank.

Discussion

Dans cette étude *ex vivo*, nous avons prélevé du sang chez 20 volontaires sains et nous avons étudié l'expression des cytokines et des marqueurs de surface des leucocytes lors de la circulation du sang dans un circuit extracorporel miniaturisé pendant 4 h. Nous avons évalué l'influence de la température du sang sur ces paramètres et trouvé que travailler à température ambiante aboutissait à la production de cytokines la moins importante. Nous avons aussi observé une modification de l'expression de différents marqueurs de surface des leucocytes impliqués dans la migration, l'adhésion et la présentation d'antigène lorsque le sang circulait dans le circuit à température ambiante par rapport au sang circulant dans le circuit chauffé.

Il est établi que l'exposition du sang à des matériaux artificiels entraîne une activation des leucocytes (150). L'adsorption des protéines sur les matériaux exogènes initie une série de réactions incluant adhésion des plaquettes, coagulation et inflammation (151). Cette réaction inflammatoire, partie de la bioincompatibilité du circuit, peut être délétère en entraînant différentes dysfonctions d'organes (cytotoxicité des cytokines sur les tissus) (150,152). Au cours de la dernière décennie, la recherche médicale s'est efforcée de développer différentes stratégies pour atténuer cette réponse inflammatoire. L'héparine a d'abord été suggérée comme revêtement de surface des circuits en raison de sa capacité à réduire l'activation cellulaire et protéique (153,154). Aujourd'hui, les biomatériaux polymériques sont utilisés pour le revêtement des circuits cardio-pulmonaires utilisés lors des pontages coronariens parce qu'ils sont hautement biocompatibles (inhibition de l'adsorption des protéines sur la surface intraluminale du circuit) (151,155). Enfin, quand un hémofiltre fait partie du circuit extracorporel, il est aussi parfois proposé d'augmenter la taille des pores pour éliminer directement les cytokines en excès formées localement (152,156).

Le principal objectif de cette étude était de développer un modèle optimal de circuit extracorporel *ex vivo* miniature. Ce modèle pourrait être utile pour d'autres travaux *ex vivo* car il engendre l'activation inflammatoire la moins importante possible,

cette activation pouvant interférer voire masquer les effets d'un produit étudié. L'hypothermie thérapeutique est un traitement ayant prouvé son efficacité dans les atteintes neurologiques post ischémiques. Bien que l'inhibition de la réponse immune ne soit pas le seul mécanisme impliqué dans les effets neuroprotecteurs de l'hypothermie, de nombreuses études animales et humaines ont en effet montré que l'hypothermie supprimait la production de cytokines pro-inflammatoires faisant suite à l'ischémie (148,157-160). Il reste également à savoir comment l'hypothermie stimule la réduction de la production de ces cytokines mais l'altération des voies du NFkB est suggérée puisque le NFkB joue un rôle pivot dans la régulation de la transcription des cytokines, des molécules d'adhésion et autres médiateurs impliqués dans la réponse inflammatoire (149,159,161). Dans notre étude, la production de toutes les cytokines était réduite dans le circuit à température ambiante et l'évolution de l'expression de HLA-DR et des molécules d'adhésion CD-11b et CD-11a sur les polynucléaires était différente par rapport aux conditions chauffées. Certains de ces résultats sont à rapprocher de ceux rapportés par el Habbal et al. dans leur étude où les effets de la température ont été étudiés sur l'activation des neutrophiles dans des circuits extracorporels pédiatriques (162). Dans cette étude, le refroidissement diminuait l'augmentation d'expression de CD-11b et la diminution de la L-sélectine. Enfin, il est intéressant de constater que lorsque le sang est conservé à 37 ºC, la production de cytokines démarre environ 1 h après le début des expériences et ce délai est le même que celui observé après reperfusion d'atteintes ischémiques cérébrales (148).

Il n'existe aucun travail ayant évalué les effets de la température sanguine sur les paramètres de l'inflammation lorsque le sang circule au sein d'un circuit extracorporel *ex vivo*. Bien qu'il existe des études utilisant des circuits *ex vivo* pour tester différents outils tels que des membranes d'hémodialyse, d'hémofiltration ou des cartouches adsorbantes, très peu d'information concernant les réglages du circuit sont fournies dans ces articles. Nos données pourraient d'ailleurs maintenant guider ce genre d'expériences et aider aux réglages des circuits. Néanmoins, notre étude présente des limites. D'abord, la température du sang dans le circuit avec réchauffeur n'a pas atteint 37 ºC. Le réchauffeur chauffait uniquement la base du réservoir et la température à la surface du réservoir était

donc seulement de 28ºC. Ceci explique probablement en partie les différences de concentrations en cytokines entre le circuit avec réchauffeur et le tube dans l'incubateur, bien que ces différences ne soient pas statistiquement significatives (Figure 14). De plus, cette étude ne permet pas d'élucider la relation mécanistique entre l'élévation des cytokines et la modification de l'expression des marqueurs de surface des leucocytes au cours du temps. Egalement, nos résultats ne peuvent pas être extrapolés aux conditions cliniques mais, comme déjà dit auparavant, cela n'était pas le but de l'étude. Enfin, et ce point est important, cette étude ne permet pas de dire si les effets observés sont dus à une augmentation de la réponse cytokinique liée au chauffage du sang ou bien à une inhibition de la réponse inflammatoire liée à l'hypothermie de la température ambiante.

En conclusion, dans ce modèle *ex vivo*, maintenir la température à 37 ºC aboutit à une activation significative des cellules inflammatoires avec production de cytokines et modulation de l'expression de certains marqueurs de surface des leucocytes impliqués dans l'adhésion , la migration et l'apoptose des leucocytes. Nos résultats suggèrent que l'altération des voies du NFkB pourrait au moins partiellement être responsable de ces effets. Par conséquent, dans les études utilisant un circuit *ex vivo*, chauffer le sang peut conduire à des conclusions erronées concernant le circuit ou le produit testé tandis que travailler à température ambiante apparait comme être une bonne stratégie pour éviter ces effets confondants.

Travaux en cours suivant le développement de ce modèle ex vivo

Après avoir validé cet outil méthodologique, nous avons entrepris de l'utiliser pour la partie *ex vivo* du projet de développement de la colonne d'hémoadsorption du laboratoire CRISMA de Pittsburgh. Une mini colonne d'hémoadsorption est incorporée à ce circuit et nous testons les effets de ce produit sur différents paramètres de l'inflammation avec du sang prélevé chez des malades en choc septique (concentrations sériques en cytokines, marqueurs de surface des leucocytes étudiés en cytométrie de flux, compte différentiel des leucocytes). Nous comparons ce circuit avec hémoadsorption à un

circuit témoin (sans colonne) mais également à un mini circuit d'hémofiltration que nous avons développé parallèlement. Nous comparons donc actuellement hémofiltration *versus* hémoadsorption au sein de ce modèle, ce qui donnera des données nouvelles et intéressantes. Enfin, nous réalisons depuis peu une étude similaire, avec la même comparaison hémoadsorption *versus* hémofiltration, mais en *in vivo* chez le rat septique.

Conclusion sur l'hémoadsorption

Bien que l'hémoadsorption ne soit pas une technique récente, elle doit probablement rester considérée comme prometteuse. De nombreuses études expérimentales et cliniques ont montré que cette technique était relativement bien tolérée, efficace pour adsorber les médiateurs inflammatoires et/ou les endotoxines du plasma (selon le matériau adsorbant utilisé), et responsable d'une amélioration de certains paramètres physiologiques (hémodynamique, oxygénation). Cependant, des questions restent sans réponse en ce qui concerne le timing, la durée et la fréquence de cette technique en condition clinique. De larges études multicentriques sont maintenant nécessaires pour mieux préciser le rôle de l'hémoadsorption dans le traitement du choc septique.

3) L'hémodialyse à haute perméabilité

Généralités

Nous avons vu que l'hémofiltration épurait plus efficacement les molécules moyennes que l'hémodialyse avec les membranes habituellement utilisées en réanimation (32). L'utilisation de membranes possédant des pores plus larges, appelées membranes à haut point de coupure, est une autre stratégie de purification sanguine proposée pour accroître la clairance de ces moyennes molécules (163). L'emploi de telles membranes en hémofiltration continue expose cependant au risque d'épurer des molécules de masse moléculaire plus élevée comme l'albumine, ce qui peut apparaître comme potentiellement dangereux chez les patients de réanimation dont l'albuminémie est déjà souvent diminuée (111).

Afin de palier à cet inconvénient, l'utilisation de ces membranes à haut point de coupure en mode hémodialyse est maintenant suggérée (111,164). L'hémodialyse continue avec une membrane à haut point de coupure pourrait rendre possible l'épuration de ces molécules de poids moléculaire moyen sans perte importante d'albumine. Dans une étude *ex vivo*, Morgera et al. ont montré une épuration équivalente des cytokines par hémofiltration à haute perméabilité ou hémodialyse à haute perméabilité, dès lors que des débits de 3 L/h (d'ultrafiltration ou dialysat) étaient appliqués (111). A ces mêmes débits, l'épuration d'albumine était moindre en hémodialyse (111). Par ailleurs, la supériorité de l'hémodialyse à haute perméabilité sur l'hémodialyse standard en termes d'épuration de cytokines a été bien mise en évidence au cours d'une petite étude clinique randomisée, croisée et en double-aveugle, incluant 10 patients en choc septique avec AKI. L'épuration de l'urée était comparable mais des clairances diffusives de certaines cytokines (IL-6, IL-8, IL-10) étaient observées avec l'hémodialyse à haute perméabilité uniquement. Des répercussions sur les concentrations plasmatiques en cytokines étaient même décrites (164).

A noter que l'épuration des molécules de l'inflammation par hémodialyse plutôt que par hémofiltration pourrait apporter certains autres avantages pratiques. La production de dialysat à partir d'un circuit d'eau pouvant être employée en hémodialyse, il serait alors possible de s'affranchir des contraintes liées à l'utilisation des solutés de substitution en hémofiltration (mobilisation, stockage).

Nous avons réalisé un essai clinique contrôlé, randomisé, en simple aveugle, monocentrique, sur des patients de réanimation, dont l'objectif principal était de tester l'hémodialyse continue avec un nouvel hémofiltre à haut point de coupure qui pourrait autoriser des clairances de petites et moyennes molécules équivalentes à celles observées en hémofiltration continue standard, tout en limitant l'épuration des grosses molécules comme l'albumine. La tolérance de la technique sur le plan hémodynamique était aussi évaluée.

.

Etude clinique

Matériel et méthodes

Schéma de l'étude : Cette étude monocentrique, prospective et randomisée a été approuvée par le comité de protection des personnes Sud-Est et a été réalisée en accord avec la déclaration d'Helsinki. Elle a été conduite dans une réanimation de 10 lits (P Réanimation, service d'Anesthésie-Réanimation, Hôpital Edouard Herriot, Lyon). Les patients ont été recrutés à partir du 1e juillet 2008, après signature d'un consentement éclairé par un parent ou un représentant légal.

Population étudiée : Les patients de plus de dix-huit ans présentant un choc septique avec un AKI nécessitant l'instauration d'une technique d'EER continue étaient inclus. Le choc septique était diagnostiqué cliniquement comme l'association d'une dysfonction d'organe avec une hypotension artérielle réfractaire à une expansion volémique, selon les critères de la conférence de consensus de l'American College of Chest Physicians and the Society of Critical Care Medicine (ACCP/SCCM). L'AKI était définie par une oligurie persistante malgré une réanimation hémodynamique efficace. L'objectif était de diagnostiquer rapidement l'AKI pour instituer l'EER précocement. Les critères d'exclusion étaient la présence d'une grossesse ou d'un allaitement, la participation à un autre protocole d'étude ou un décès rapidement prévisible. Chaque patient inclus était aléatoirement alloué au traitement par hémodialyse veino-veineuse continue avec membrane à haut point de coupure (groupe HDHPC) ou au groupe hémofiltration veino-veineuse continue (groupe HVVC). La randomisation était effectuée par la technique des enveloppes opaques scellées. La sévérité de la pathologie était évaluée par le calcul à l'inclusion du score Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II (APACHE II), du score Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) et de l'Indice de Gravité Simplifié II (IGS II).

Méthodes d'épuration extra-rénale : Tous les patients bénéficiaient d'une EER réalisée par un moniteur Multifiltrate® (Fresenius Medical Care, Fresnes, France). Un accès veineux était rendu possible par la mise en place d'un cathéter de dialyse double lumière de diamètre 13 Fr. Les débits sanguins étaient ajustés afin d'obtenir une fraction de filtration (débit d'ultrafiltration / débit sanguin) de 20 %, pour un débit d'ultrafiltration ou dialysat de 40 mL/kg/h. Chaque patient bénéficiait d'une séance de 48 h au maximum, au-delà de laquelle le circuit d'EER était entièrement changé. En cas de thrombose du circuit d'EER, la séance était terminée et le circuit changé. Un maximum de trois séances de 48 h par patient était réalisé pour le protocole d'étude, la décision de poursuivre l'EER étant réévaluée par les réanimateurs du service à la fin de chaque séance selon la nécessité clinique. À l'issue de ces trois séances, si l'EER était encore nécessaire, une des techniques habituelles du service était alors choisie par les praticiens. Dans le groupe HDHPC, une membrane à haute perméabilité Ultraflux® HD 1000 (Fresenius Medical Care, Fresnes, France) en polysulfone possédant une surface de 1,8 m^2 était utilisée. Le point de coupure *in vitro* est estimé à 40 kDa. Le mode hémodialyse continue était appliqué et le débit de dialysat était fixé à 40 mL/kg/h afin d'obtenir des débits comparables avec le groupe HVVC. Dans le groupe HVVC, une membrane dite standard Ultraflux® AV 1000 S (Fresenius Medical Care, Fresnes, France) en polysulfone possédant une surface de 1,8 m^2 était choisie. Le point de coupure estimé *in vitro* est de 30 kDa. Un mode HVVC était appliqué et le débit d'ultrafiltration était fixé à 40 mL/kg/h. Dans les deux groupes, la balance hydrique était laissée à l'appréciation des praticiens et l'anticoagulation était obtenue par perfusion continue d'héparine, entre 500 et 1000 UI/h selon le risque hémorragique. Les concentrations de potassium des solutés de dialyse ou des solutés de substitution étaient ajustées selon la kaliémie des patients.

Analyses de laboratoire : Les marqueurs des petites masses moléculaires analysés étaient l'urée et la créatinine (respectivement de 60 et 113 Da). Les marqueurs des moyennes molécules choisis étaient la ß2-microglobuline de masse moléculaire de 11 800 Da, et les chaînes légères kappa des immunoglobulines (CKIg) de masse moléculaire de 23 000 Da. L'albumine (68 000 Da) et les protéines totales étaient également dosées comme

marqueurs des molécules de haute masse moléculaire. Un prélèvement sanguin (5 mL) était réalisé avant le branchement, puis trois prélèvements simultanés, pré-filtre (5 mL), post-filtre (5 mL), de l'effluent ou du dialysat (5 mL), étaient réalisés à 15 min, 1 h, 4 h, 12 h, 24 h et 48 h pour les calculs de clairance. Les prélèvements effectués sur l'effluent ou le dialysat étaient recueillis sur des tubes à adsorption limitée pour détecter les faibles concentrations de molécules. Les prélèvements sanguins étaient conservés à 4°C puis centrifugés pour isoler le plasma. Les six marqueurs étaient dosés sur chaque échantillon ainsi obtenu. L'urée était dosée par méthode enzymatique de Talke et Schubert et la créatinine par test colorimétrique cinétique avec compensation (analyseur Roche/Hitachi 917, Bâle, Suisse). La ß2-microglobuline, les CKIg et l'albumine étaient dosées par immunonéphélométrie (Néphélomètre Dade Behring BN II, Marburg, Allemagne). Les protéines totales étaient dosées par test colorimétrique (analyseur Roche/Hitachi 917, Bâle, Suisse). Une gazométrie artérielle était prélevée aux mêmes temps afin de d'évaluer la PaO_2 et ainsi calculer le rapport PaO_2/FiO_2. L'acide lactique était également dosé à partir de la gazométrie.

Calculs : Plusieurs calculs étaient effectués pour déterminer l'épuration des marqueurs biologiques.

Pour l'hémofiltration, le coefficient de tamisage (CT) et la clairance (Cl) étaient calculés de la manière suivante (164) :

$CT = 2 \times C_{UF} / (C_a + C_v)$ avec $Cl = CT \times Q_{UF}$

C_{UF} est la concentration dans l'ultrafiltrat, C_a la concentration dans le circuit à l'entrée du filtre, C_v la concentration dans le circuit à la sortie du filtre et Q_{UF} le débit d'ultrafiltration.

Pour l'hémodialyse, la clairance était calculée par la formule suivante (164) :

$Cl = 2 \times C_d \times Q_d / (Ca + Cv)$

C_d est la concentration dans le dialysat en sortie du filtre et Q_d le débit du dialysat.

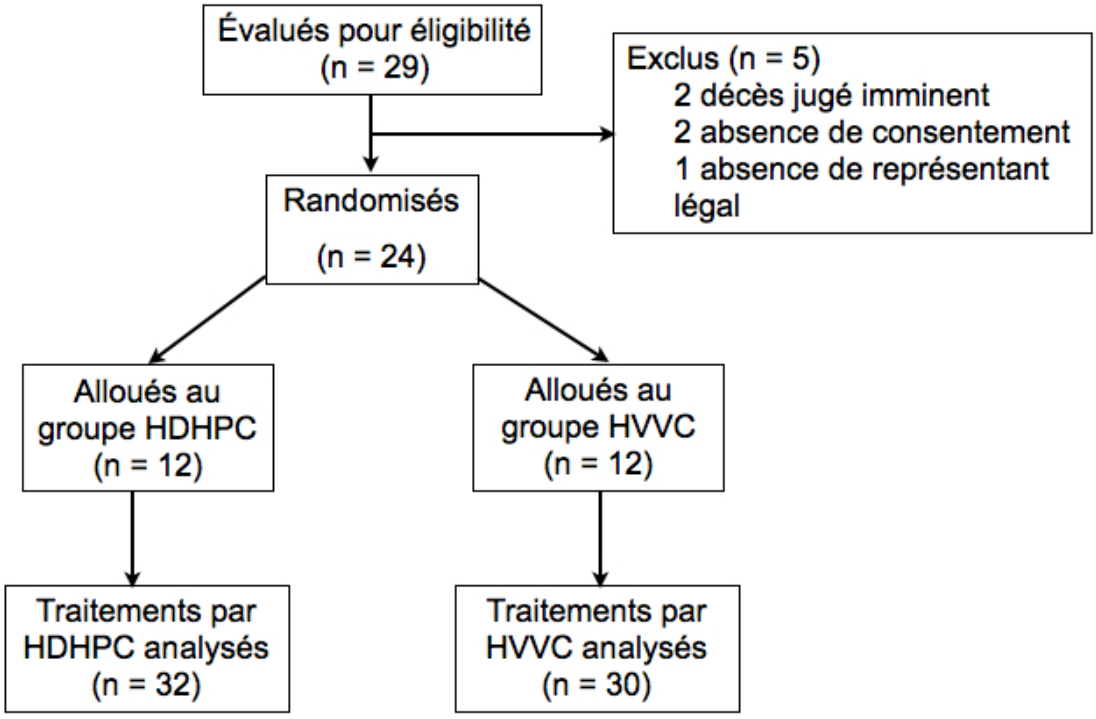
Monitorage et ajustement des catécholamines et de la FiO_2 : Un monitorage hémodynamique était également réalisé par mesure de la pression artérielle invasive par un cathéter artériel radial ou fémoral. Les posologies de noradrénaline étaient adaptées toutes les heures par l'équipe soignante de réanimation afin d'obtenir une pression artérielle moyenne supérieure à 75 mmHg. L'adjonction de dobutamine ou d'adrénaline était décidée, et la posologie adaptée, sur les données d'échographies cardiaques ou de l'enregistrement continu du débit cardiaque par doppler aortique oesophagien. La FiO_2 était modulée selon les données des gazométries effectuées à chaque temps d'analyse des données afin de maintenir une hématose suffisante. Au moment du branchement de l'EER (T_0), puis à 15 min (T_{15min}), 1 h (T_{1h}), 4 h (T_{4h}), 12 h (T_{12h}), 24 h (T_{24h}) et 48 h (T_{48h}), les paramètres hémodynamiques comprenant la pression artérielle moyenne, la fréquence cardiaque et le débit de noradrénaline étaient relevés. À chaque temps, la FiO_2 était relevée sur le respirateur et le rapport PaO_2/FiO_2 calculé à partir d'une gazométrie artérielle.

Analyse statistique : L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel Statistica®. Les données sont exprimées en moyenne ± déviation standard. La normalité des distributions a été vérifiée par le test de Kolmogorov-Smirnov. La durée d'EER était comparée par test *t* de Student. Les clairances des molécules et les paramètres cliniques ont été comparés par analyse de variance pour mesures répétées. L'analyse *post hoc* a été effectuée avec le test de Tukey. Une valeur de *p* inférieure à 0,05 était considérée comme statistiquement significative.

Résultats

Les résultats présentés ici sont les résultats finaux de l'étude. Vingt-quatre patients en choc septique ont été inclus. Douze patients ont été alloués au groupe HDHPC et douze patients au groupe HVVC. Dans le groupe HDHPC, un total de 32 séances a été réalisé pour les 12 patients. Dans le groupe HVVC, 30 séances ont été réalisées pour les 12 patients (Figure 18). Les caractéristiques de base des patients étaient similaires entre les deux groupes (Tableau 12).

Figure 18. Schéma d'inclusion des patients (d'après manuscrit en cours de rédaction).



HDHPC : Hémodialyse veino-veineuse continue avec membrane à haut point de coupure,
HVVC : Hémofiltration veino-veineuse continue.

La durée moyenne de chaque séance d'EER n'était pas différente entre le groupe HDHPC (31 ± 16 h) et le groupe HVVC (23 ± 17 h) (p = 0,07) même si une tendance à un allongement de la durée des séances était observée avec l'HDHPC.

La clairance de la ß2-microglobuline était équivalente entre les deux groupes (p = 0,45). Aucune différence significative n'était retrouvée au cours du temps (Figure 19). La clairance des CKIg était plus élevée en HDHPC par rapport à HVVC (p<0,001). L'analyse *post hoc* démontrait une épuration plus importante des CKIg par HDHPC à T_{15min}, T_{1h}, T_{4h}, $T_{12h,}$ T_{24h} et T_{48h} (Figure 19).

La clairance de l'albumine était significativement plus importante en HDHPC qu'en HVVC (p<0,001). L'analyse *post hoc* retrouvait cette différence entre les deux groupes à T_{15min} et T_{1h} (Figure 20). Pour HDHPC, la clairance variait au cours du temps (résultat intra-groupe p<0,001), et l'analyse *post hoc* retrouvait une différence significative entre T_{15min} et les autres temps de l'étude (T_{1h}, T_{4h}, T_{12h}, T_{24h} et T_{48h}). La clairance des protéines totales était significativement supérieure dans le groupe HDHPC par rapport au groupe HVVC (p<0,001). L'analyse *post hoc* identifiait cette différence à T_{15min} et T_{1h} (Figure 20). L'albuminémie était plus basse dans le groupe HDHPC que dans le groupe HVVC (p=0,027). L'analyse *post hoc* (test de Tukey) n'a rien montré de statistiquement significatif entre les 2 groupes (Figure 21).

Aucune différence statistiquement significative entre les deux groupes n'a été mesurée pour la clairance de l'urée et pour la clairance de la créatinine (Figure 22).

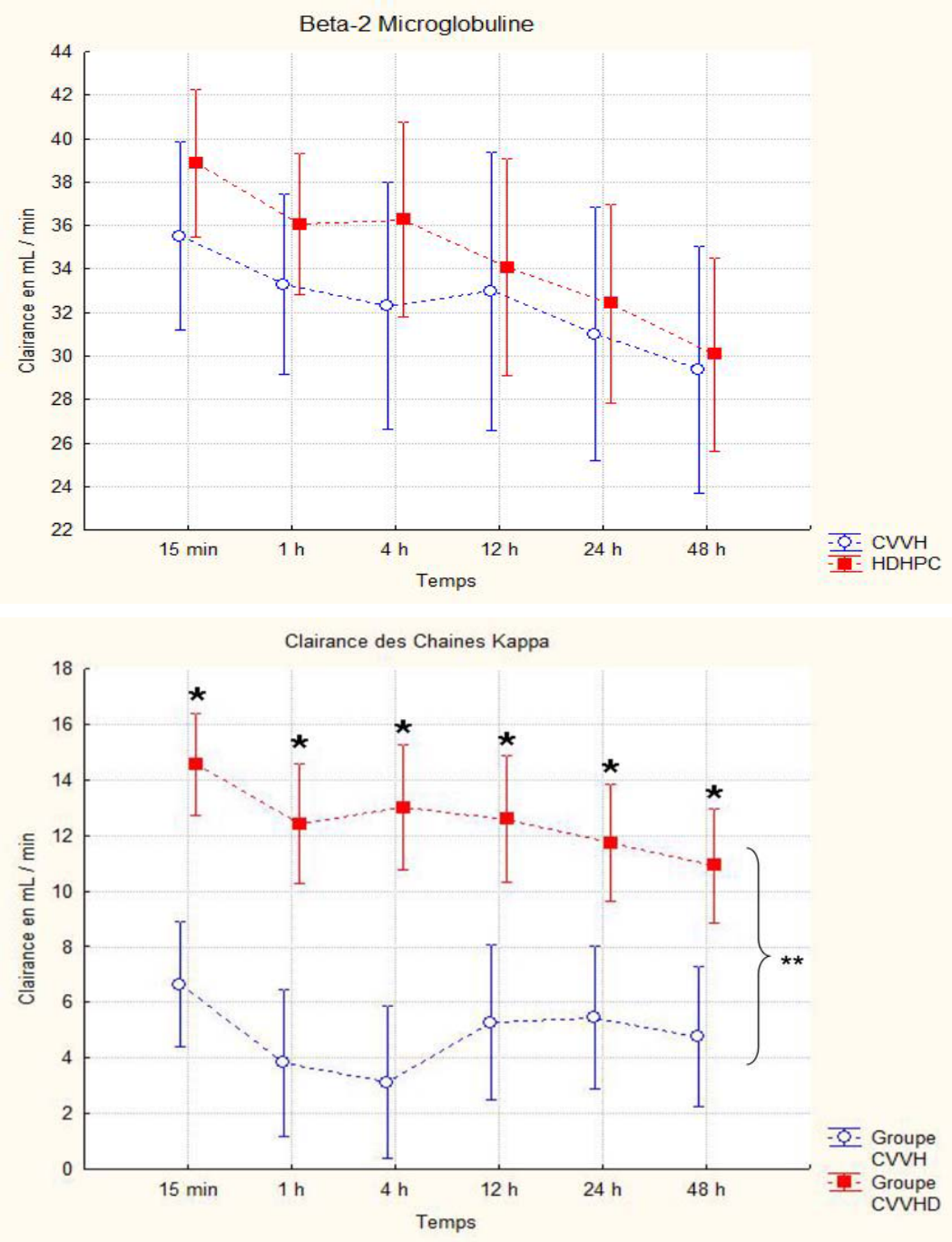
Lors de l'inclusion, tous les patients bénéficiaient d'une perfusion continue de noradrénaline. Aucune différence significative n'a été observée entre l'HDHPC et l'HVVC pour la PAM, la FC et les besoins en noradrénaline. Enfin, le rapport PaO_2/FiO_2 et la lactatémie n'étaient pas différent entre les deux groupes (Tableau 13).

Tableau 12. Caractéristiques des patients à l'inclusion (d'après manuscrit en cours de rédaction).

	Groupe HDHPC (N = 12)	**Groupe HVVC (N = 12)**
Age (ans)	69 ± 14	66 ± 13
Poids (kg)	77,9 ± 17,2	81,1 ± 22,1
Taille (cm)	172 ± 10	170 ± 8
Homme / Femme	9 / 3	6 / 6
Score APACHE II	30 ± 7	28 ± 10
Score SOFA	12 ± 3	14 ± 4
Score IGS II	73 ± 15	80 ± 19
PAM (mmHg)	73 ± 15	69 ± 15
FC (bpm)	98 ± 26	109 ± 29
Noradrénaline (µg/kg/min)	0,88 ± 0,52	0,72 ± 0,60
PaO2/FiO2	215 ± 91	231 ± 132

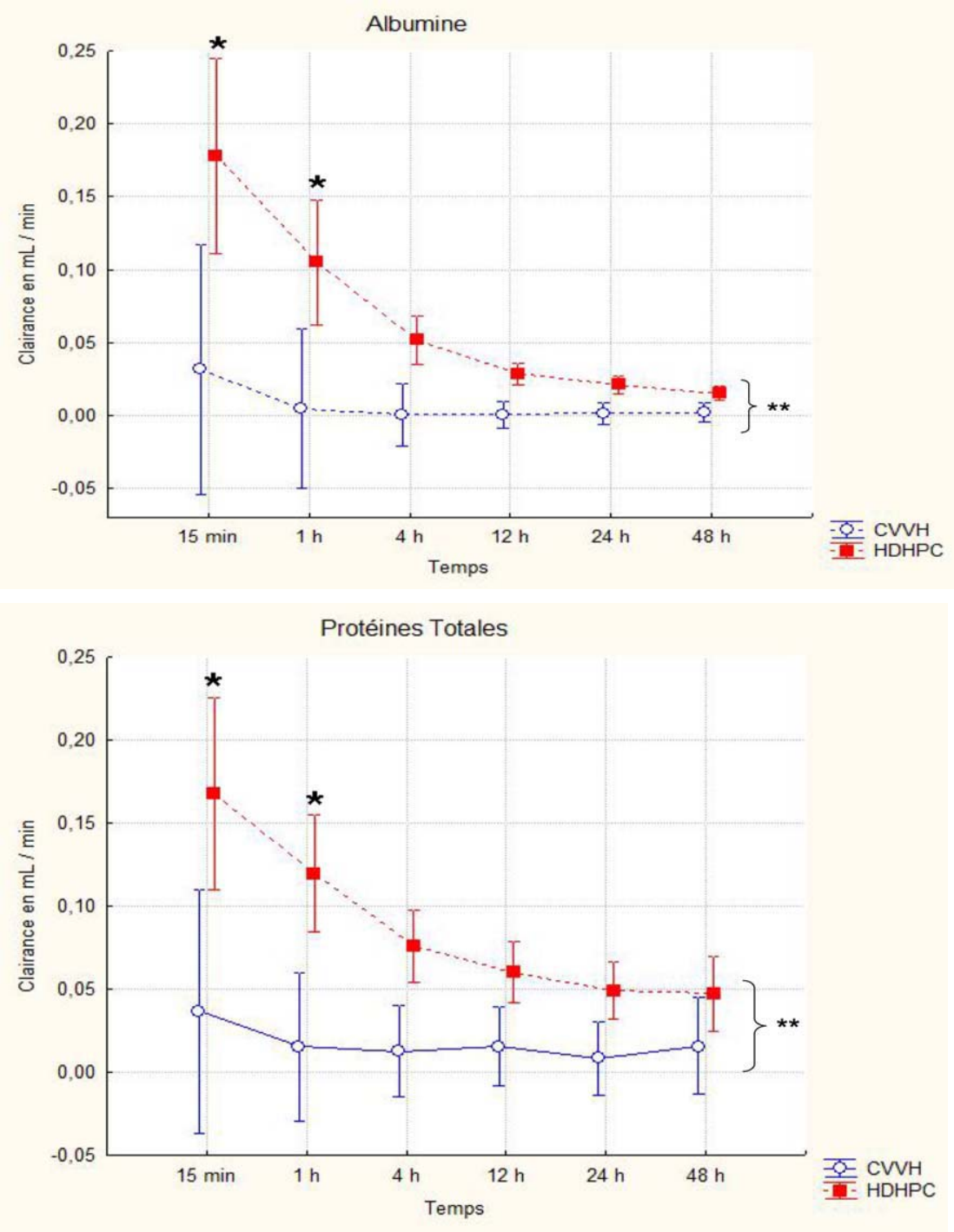
Données exprimées en moyenne ± déviation standard.

Figure 19. Clairances de la ß2-microglobuline et des CKIg en fonction du temps (d'après manuscrit en cours de rédaction).



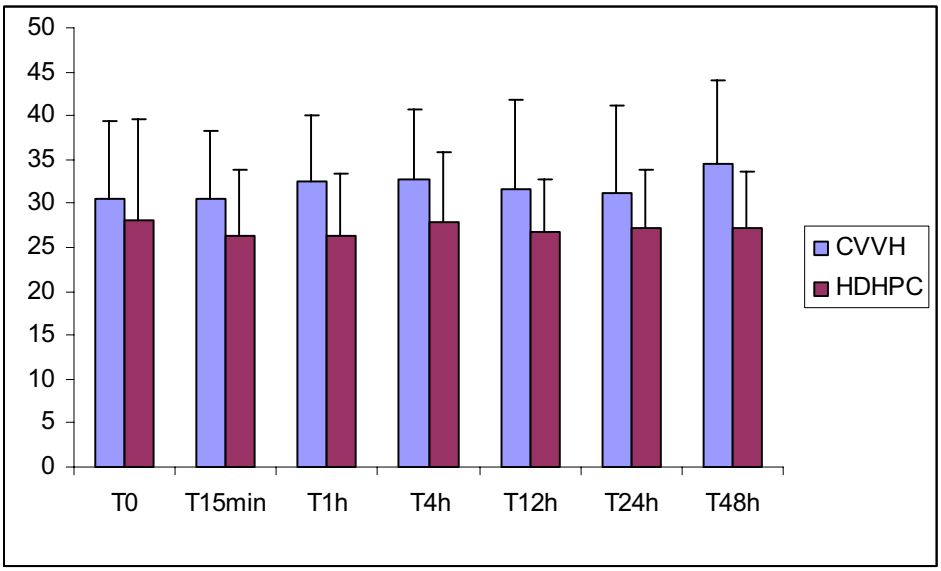
Clairances moyennes au cours du temps. Les barres d'erreur représentent la DS. Résultats inter-groupe de l'analyse de variance pour mesures répétées : ß2-microglobuline : p = 0,45; CKIg : ** *p* <0,001. Analyse *post hoc* inter-groupe (test de Tukey) : * *p*<0,05.

Figure 20. Clairances de l'albumine et des protéines totales en fonction du temps (d'après manuscrit en cours de rédaction).



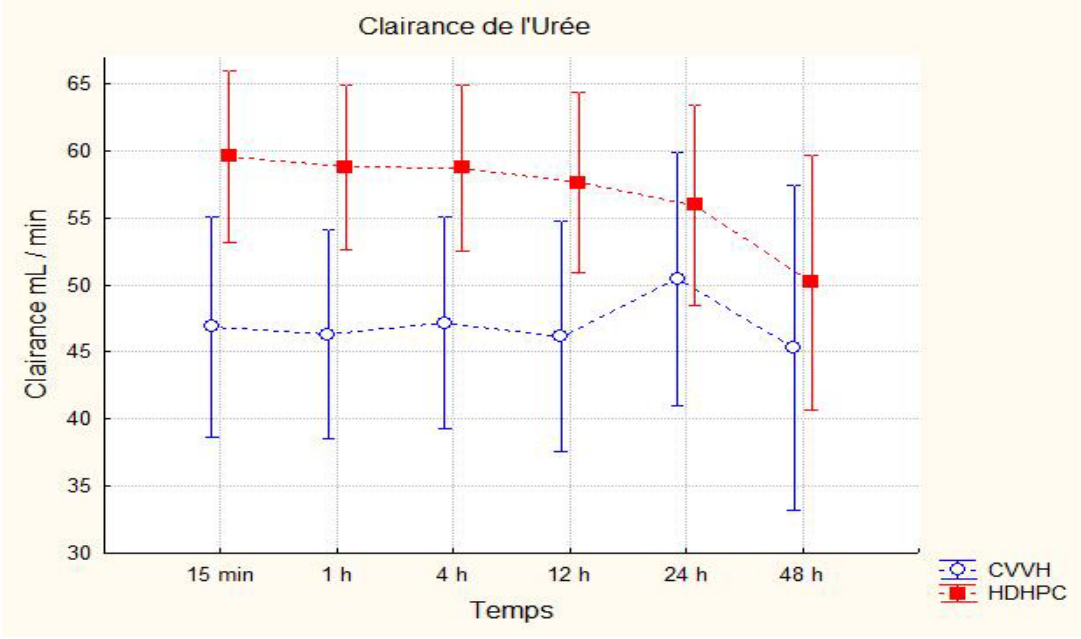
Clairances moyennes au cours du temps. Les barres d'erreur représentent la DS. Résultats inter-groupe de l'analyse de variance pour mesures répétées : albumine et des protéines totales : ** $p <$ 0,001. Analyse *post hoc* inter-groupe (test de Tukey) : * p<0,05.

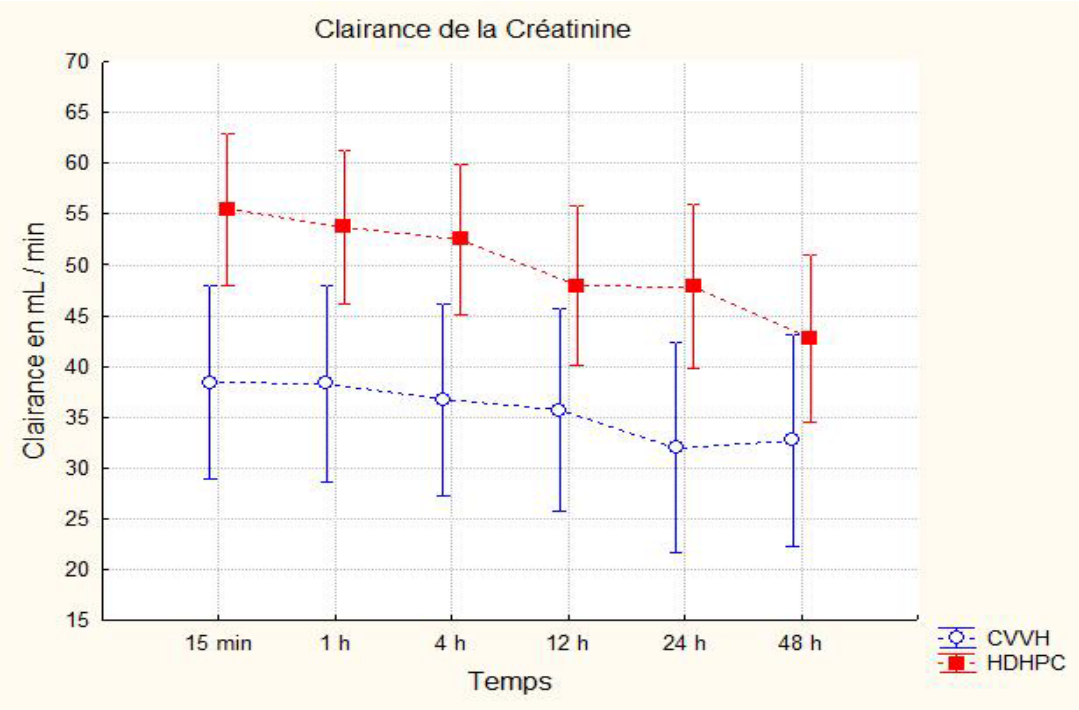
Figure 21. Albuminémie au cours du temps (d'après manuscrit en cours de rédaction).



Résultat inter-groupe de l'analyse de variance pour mesures répétées : p = 0,027.
Analyse *post hoc* inter-groupe (test de Tukey): * $p<0,05$

Figure 22. Clairances de l'urée et de la créatinine en fonction du temps (d'après manuscrit en cours de rédaction).





Clairances moyennes au cours du temps. Les barres d'erreur représentent la DS. Absence de différence statistiquement significative entre les 2 groupes en analyse de variance pour mesures répétées.

Tableau 13. Paramètres cliniques à chaque temps de l'étude (d'après manuscrit en cours de rédaction).

	Groupe	T_0	T_{15min}	T_{1h}	T_{4h}	T_{12h}	T_{24h}	T_{48h}	*p*
PAM	HDHPC	75 ± 12	75 ± 13	77 ± 13	81 ± 13	80 ± 11	84 ± 12	79 ± 13	*0,30*
(mmHg)	HVVC	73 ± 15	72 ± 14	79 ± 14	84 ± 17	88 ± 18	80 ± 14	75 ± 10	
FC	HDHPC	95 ± 24	98 ± 24	96 ± 23	94 ± 24	87 ± 26	93 ± 22	90 ± 15	*0,45*
(bpm)	HVVC	95 ± 28	96 ± 26	95 ± 27	94 ± 26	91 ± 21	88 ± 25	84 ± 27	
NADN	HDHPC	0,70 ± 0,54	0,72 ± 0,56	0,71 ± 0,55	0,81 ± 0,60	0,62 ± 0,60	0,64 ± 0,64	0,41 ± 0,48	*0,13*
(µg/kg/min)	HVVC	0,60 ± 0,54	0,63 ± 0,53	0,63 ± 0,53	0,61 ± 0,52	0,63 ± 0,49	0,54 ± 0,53	0,68 ± 0,64	
PaO_2 / FiO_2	HDHPC	240 ± 112	252 ± 106	247 ± 118	257 ± 102	251 ± 108	307 ± 115	420 ± 136	*0,08*
	HVVC	245 ± 147	235 ± 131	222 ± 122	238 ± 142	206 ± 113	275 ± 132	244 ± 140	
Lactate	HDHPC	3,0 ± 1,8	2,9 ± 1,6	2,8 ± 1,6	2,8 ± 1,5	2,5 ± 1,4	2,9 ± 1,7	2,5 ± 0,6	*0,55*
(mmol/L)	HVVC	2,7 ± 1,5	2,5 ± 1,3	2,5 ± 1,4	2,9 ± 2,4	3,2 ± 2,8	2,2 ± 0,9	2,8 ± 1,8	

Données exprimées en moyenne ± DS. T : Temps de mesure (T_0 : Début du traitement), PAM : Pression artérielle moyenne, FC : Fréquence cardiaque, NADN : noradrénaline, HDHPC : Hémodialyse veino-veineuse continue avec membrane à haut point de coupure, HVVC : Hémofiltration veino-veineuse continue. Le test statistique utilisé est l'analyse de variance pour mesures répétées.

Discussion

Cette étude démontre que l'épuration des molécules de masse moléculaire moyenne est au moins aussi efficace par hémodialyse continue effectuée avec une membrane à haut point de coupure que par hémofiltration continue conventionnelle, chez des patients présentant un choc septique associé à un acute kidney injury, à débits d'effluent (ultrafiltration ou dialysat) équivalents. Les clairances des molécules proches de 23 000 Da sont même supérieures par HDHPC.

L'hémodialyse a longtemps été considérée comme peu performante pour épurer les moyennes molécules telles que les médiateurs de l'inflammation (32). Brunet et al. ont démontré par exemple que la clairance diffusive de la ß2-microglobuline était inférieure à la clairance convective avec une membrane classique de type AN69 (166). Des données plus récentes tendent à réhabiliter l'hémodialyse continue comme moyen d'épuration des médiateurs inflammatoires. En effet, une étude *ex vivo*, publiée par Uchino et al., a démontré expérimentalement qu'il était possible d'épurer l'IL-1β, l'IL-6, l'IL-8 et le TNF-α par hémodialyse avec une membrane à point de coupure élevé de l'ordre de 100 kDa (146). La clairance de ces molécules était également augmentée par l'application d'un débit de dialysat plus élevé (9 L/h). Morgera et al. ont comparé l'épuration d'IL-1ra et d'IL-6 chez des patients bénéficiant d'une hémofiltration continue ou d'une hémodialyse continue avec une membrane à haut point de coupure (60 kDa) (165). La clairance de ces deux cytokines restait supérieure avec l'hémofiltration par rapport à l'hémodialyse, mais la clairance diffusive était accrue lorsque le débit de dialysat était augmenté de 1 à 2,5 L/h. Un essai clinique randomisé portant sur dix patients présentant un choc septique avec un AKI a confirmé que l'hémodialyse pouvait épurer aussi efficacement les cytokines si une membrane de haute porosité était employée (164). Nos résultats confirment que la ß2-microglobuline peut être épurée de façon similaire en HDHPC et en HVVC et que les CKIg sont, elles, mieux épurées par HDHPC.

Notre étude comporte plusieurs limites. Le mécanisme d'épuration prédominant entre les marqueurs choisis pour les moyennes molécules (ß2-microglobuline et CKIg) et les cytokines pourrait être sensiblement différent, notamment concernant leur adsorption sur la membrane. La ß2-microglobuline est une molécule naturellement filtrée par le glomérule rénal et qui s'accumule en cas d'insuffisance rénale (167). Elle est utilisée pour l'évaluation de membranes d'hémodialyse au cours de l'insuffisance rénale chronique (168). Sa clairance a été également évaluée dans un essai clinique comparant l'hémofiltration continue et l'hémodialyse continue chez des patients avec AKI (167). Les données de cette étude rapportaient une adsorption extrêmement faible sur la membrane de type AN69 utilisée. Les chaînes légères des immunoglobulines (kappa et

lambda) s'accumulent également au cours de l'insuffisance rénale chronique (169). Elles peuvent être épurées par diffusion et convection avec des membranes à haut point de coupures (170). L'adsorption de ces chaînes légères des immunoglobulines est, à notre connaissance, peu évaluée. Or, nous avons déjà démontré que l'adsorption était une voie additionnelle d'épuration des médiateurs de l'inflammation en EER (139,171). L'adsorption des cytokines sur la membrane Ultraflux® HD 1000 en HDHPC est inconnue. Elle pourrait être différente de l'adsorption sur la membrane Ultraflux® AV 1000 S et constituer un mécanisme additionnel d'épuration aux mécanismes décrits de convection ou de diffusion. L'impossibilité de réaliser un double insu est une autre limite pouvant être source de biais lors du recueil des données cliniques. Les résultats portant sur la clairance des molécules étudiées ne devraient, eux, logiquement pas être influencés. Enfin, le schéma de l'étude avec deux groupes comparant deux techniques et deux membranes différentes constitue une limite méthodologique. Deux groupes supplémentaires auraient théoriquement été nécessaires : un groupe bénéficiant d'une hémodialyse continue avec une membrane conventionnelle et un groupe bénéficiant d'une hémofiltration continue avec une membrane à haut point de coupure. Un nombre important de patients aurait été nécessaire et des problèmes éthiques auraient été soulevés par l'utilisation de la membrane à haut point de coupure Ultraflux® HD 1000 en hémofiltration. En effet, cette membrane n'a pas été précédemment évaluée en mode hémofiltration continue.

Le mode hémodialyse continue pourrait limiter la perte d'albumine observée avec l'utilisation de membranes à haut point de coupure. Morgera *et al*. ont démontré que la fuite d'albumine était plus élevée dans le groupe hémofiltration continue avec une membrane de point de coupure 100 kDa que dans le groupe hémodialyse continue, suggérant un intérêt de ce mode pour limiter la fuite d'albumine (165). Dans notre étude, les clairances de l'albumine et des protéines totales étaient supérieures dans le groupe HDHPC, comparativement au groupe HVVC avec une membrane de point de coupure de 30 kDa. Au cours du temps, nous avons constaté une réduction rapide de cette fuite d'albumine et de protéines. Ce phénomène est probablement lié à une obstruction progressive des pores par des composants plasmatiques réduisant leur taille efficace

(111,171). En outre, le retentissement clinique de cette fuite reste incertain. Ainsi, l'albuminémie était plus basse dans le groupe HDHPC et aucune différence sur les paramètres hémodynamiques n'a été constatée entre les deux groupes.

L'hémodialyse continue avec une membrane à haut point de coupure permet donc une épuration équivalente de ß2-microglobuline et une meilleure épuration des chaînes kappa des immunoglobulines que l'hémofiltration continue. Cette technique permettrait donc d'épurer les médiateurs de l'inflammation incriminés dans la pathogénie du choc septique de manière aussi voire plus efficace qu'en hémofiltration standard. L'HDHPC est aussi associée à une fuite d'albumine plus importante, qui reste limitée à la première heure du traitement et sans conséquences hémodynamiques. L'épuration des petites molécules est superposable entre les deux techniques comparées. Enfin, l'HDHPC semble aussi bien tolérée cliniquement qu'une hémofiltration continue classiquement réalisée en réanimation.

D'autres données sont nécessaires afin de préciser la place de cette technique par rapport à d'autres méthodes d'épuration sanguine pour le choc septique, comme l'hémofiltration à haut débit ou l'hémofiltration avec membrane à haut point de coupure. Une étude comparant l'HDHPC à l'HVVC avec membrane à haut point de coupure devrait être conduite. De plus, le débit optimal de dialysat n'est pas connu et une augmentation de ce débit pourrait être possible sans risquer une fuite importante d'albumine.

Enfin, la clairance d'autres molécules telles que les antibiotiques devrait être étudiée par cette technique afin d'identifier peut-être un éventuel intérêt par rapport à l'hémofiltration continue. En effet, leur épuration par convection pose des problèmes de posologie en réanimation qui pourraient être moindre avec l'hémodialyse continue. Les réponses à ces questions sont donc indispensables pour juger de l'intérêt de l'hémodialyse à haute perméabilité comme traitement adjuvant du choc septique.

Conclusions et perspectives

Ce travail de recherche translationnelle concernant le concept de purification sanguine au cours du choc septique met l'accent sur les points suivants :

- De nombreuses techniques extracorporelles sont aujourd'hui proposées pour atteindre cet objectif d'immnumodulation de la réponse inflammatoire de l'hôte lors d'un choc septique.
- L'hémofiltration à haut débit, l'hémofiltration en cascade, l'hémofiltration hautement adsorbante, l'hémoadsorption, la filtration et adsorption couplée, l'hémodialyse continue à haute perméabilité sont basées sur les différents principes de convection, diffusion et adsorption. Certaines de ces thérapies cumulent ces principes (techniques hybrides). Convection, diffusion et adsorption sont désormais des mécanismes complémentaires.
- L'hémofiltration en cascade et l'hémodialyse continue à haute perméabilité sont de nouvelles stratégies intéressantes de purification sanguine, techniquement faisables et présentant une certaine sécurité d'application.
- L'hémofiltration hautement adsorbante et l'hémoadsorption sont non seulement capables d'épurer les médiateurs de l'inflammation mais aussi les endotoxines avec des résultats hémodynamiques intéressants.
- De manière générale, les techniques de purification sanguine améliorent l'état hémodynamique des patients à la phase aiguë d'un choc septique. Cependant, un gain en termes de survie n'a pas encore été démontré, probablement en raison des difficultés méthodologiques de réalisation de telles études.
- Sur le plan physiopathologique, certaines thérapies semblent faire plus que simplement épurer de manière non sélective les cytokines. L'hémoadsorption ainsi que la filtration et adsorption couplée pourraient agir plus directement au niveau de la fonction leucocytaire en modifiant l'expression de certains marqueurs de surface des leucocytes tels que HLA-DR, restaurant la réponse immune au cours des états d'immunoparalysie. Les *a priori* d'indication temporelle très précoce sont donc peut-être à rediscuter.
- Pour les années à venir, l'optimisation technologique de ces techniques par l'industrie doit se poursuivre. Les effets des techniques de purification sanguine au cours du choc

septique doivent être mieux précisés lors d'études de plus grande ampleur, indiscutables sur le plan méthodologique. Ces études doivent notamment mieux cibler la population de patients susceptibles de bénéficier de ces thérapies en différenciant bien « purification sanguine » de « suppléance rénale pour AKI ».

Références

1. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. Crit Care Med 2001;29:1303-10.

2. Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL et al. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. Crit Care Med 2006;34:344-53.

3. Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H et al. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. Intensive Care Med 2002;28:108-21.

4. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. N Engl J Med 2003;348:1546-54.

5. Christaki E, Opal SM. Is the mortality rate for septic shock really decreasing? Curr Opin Crit Care 2008;14:580-6.

6. Kellum JA, Kong L, Fink MP et al. Understanding the inflammatory cytokine response in pneumonia and sepsis: results of the Genetic and Inflammatory Markers of Sepsis (GenIMS) Study. Arch Intern Med 2007;167:1655-63.

7. Suntharalingam G, Perry MR, Ward S et al. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. N Engl J Med 2006;355:1018-28.

8. Hotchkiss RS, Coopersmith CM, McDunn JE, Ferguson TA. The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression. Nat Med 2009;15:496-7.

9. Adib-Conquy M, Cavaillon JM. Compensatory anti-inflammatory response syndrome. Thromb Haemost 2009;101:36-47.

10. Turnbull IR, Clark AT, Stromberg PE et al. Effects of aging on the immunopathologic response to sepsis. Crit Care Med 2009;37:1018-23.

11. Limaye AP, Kirby KA, Rubenfeld GD et al. Cytomegalovirus reactivation in critically ill immunocompetent patients. JAMA 2008;300:413-22.

12. Luyt CE, Combes A, Deback C et al. Herpes simplex virus lung infection in patients undergoing prolonged mechanical ventilation. Am J Respir Crit Care Med 2007;175:935-42.

13. Tetta C, Bellomo R, Inguaggiato P et al. Endotoxin and cytokine removal in sepsis. Ther Apher 2002;6:109-15.

14. Bone RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. Crit Care Med 1996;24:1125-8.

15. Standiford TJ, Strieter RM, Lukacs NW, Kunkel SL. Neutralization of IL-10 increases lethality in endotoxemia. Cooperative effects of macrophage inflammatory protein-2 and tumor necrosis factor. J Immunol 1995;155:2222-9.

16. Brendolan A, D'Intini V, Ricci Z et al. Pulse high volume hemofiltration. Int J Artif Organs 2004;27:398-403.

17. Ronco C, Ricci Z, Bellomo R. Importance of increased ultrafiltration volume and impact on mortality: sepsis and cytokine story and the role for CVVH. Edtna Erca J 2002;Suppl 2:13-8.

18. Ronco C, Tetta C, Mariano F et al. Interpreting the mechanisms of continuous renal replacement therapy in sepsis: the peak concentration hypothesis. Artif Organs 2003;27:792-801.

19. Honore PM, Joannes-Boyau O. High volume hemofiltration (HVHF) in sepsis: a comprehensive review of rationale, clinical applicability, potential indications and recommendations for future research. Int J Artif Organs 2004;27:1077-82.

20. Honore PM, Matson JR. Extracorporeal removal for sepsis: Acting at the tissue level--the beginning of a new era for this treatment modality in septic shock. Crit Care Med 2004;32:896-7.

21. Honore PM, Joannes-Boyau O, Gressens B. Blood and plasma treatments: the rationale of high-volume hemofiltration. Contrib Nephrol 2007;156:387-95.

22. Klouche K, Cavadore P, Portales P et al. Continuous veno-venous hemofiltration improves hemodynamics in septic shock with acute renal failure without modifying TNFalpha and IL6 plasma concentrations. J Nephrol 2002;15:150-7.

23. Di Carlo JV, Alexander SR. Hemofiltration for cytokine-driven illnesses: the mediator delivery hypothesis. Int J Artif Organs 2005;28:777-86.

24. Olszewski WL. The lymphatic system in body homeostasis: physiological conditions. Lymphat Res Biol 2003;1:11-21; discussion -4.

25. Onarheim H, Missavage AE, Gunther RA et al. Marked increase of plasma hyaluronan after major thermal injury and infusion therapy. J Surg Res 1991;50:259-65.

26. Wasserman K, Mayerson HS. Dynamics of lymph and plasma protein exchange. Cardiologia 1952;21:296-307.

27. Peng Z, Singbartl K, Simon P et al. blood purification in sepsis: a new paradigm. Contrib Nephrol 2010;165:322-8.

28. Ronco C, Brendolan A, Lonnemann G et al. A pilot study of coupled plasma filtration with adsorption in septic shock. Crit Care Med 2002;30:1250-5.

29. Yekebas EF, Eisenberger CF, Ohnesorge H et al. Attenuation of sepsis-related immunoparalysis by continuous veno-venous hemofiltration in experimental porcine pancreatitis. Crit Care Med 2001;29:1423-30.

30. Ono S, Tsujimoto H, Matsumoto A et al. Modulation of human leukocyte antigen-DR on monocytes and CD16 on granulocytes in patients with septic shock using hemoperfusion with polymyxin B-immobilized fiber. Am J Surg 2004;188:150-6.

31. Cheron A, Monneret G, Landelle C et al. [Low monocytic HLA-DR expression and risk of secondary infection.]. Ann Fr Anesth Reanim 2010 *(in press).*

32. De Vriese AS, Vanholder RC, Pascual M et al. Can inflammatory cytokines be removed efficiently by continuous renal replacement therapies? Intensive Care Med 1999;25:903-10.

33. Cole L, Bellomo R, Hart G et al. A phase II randomized, controlled trial of continuous hemofiltration in sepsis. Crit Care Med 2002;30:100-6.

34. Payen D, Mateo J, Cavaillon JM et al. Impact of continuous venovenous hemofiltration on organ failure during the early phase of severe sepsis: a randomized controlled trial. Crit Care Med 2009;37:803-10.

35. Cole L, Bellomo R, Journois D et al. High-volume haemofiltration in human septic shock. Intensive Care Med 2001;27:978-86.

36. Gasche Y, Pascual M, Suter PM et al. Complement depletion during haemofiltration with polyacrilonitrile membranes. Nephrol Dial Transplant 1996;11:117-9.

37. Kellum JA, Bellomo R, Mehta R, Ronco C. Blood purification in non-renal critical illness. Blood Purif 2003;21:6-13.

38. Kellum JA, Johnson JP, Kramer D et al. Diffusive vs. convective therapy: effects on mediators of inflammation in patient with severe systemic inflammatory response syndrome. Crit Care Med 1998;26:1995-2000.

39. Mariano F, Tetta C, Guida G et al. Hemofiltration reduces the serum priming activity on neutrophil chemiluminescence in septic patients. Kidney Int 2001;60:1598-605.

40. Boussekey N, Chiche A, Faure K et al. A pilot randomized study comparing high and low volume hemofiltration on vasopressor use in septic shock. Intensive Care Med 2008;34:1646-53.

41. Palevsky PM, Zhang JH, O'Connor TZ et al. Intensity of renal support in critically ill patients with acute kidney injury. N Engl J Med 2008;359:7-20.

42. Honore PM, Joannes-Boyau O, Kotulak T et al. Report of the working party on high volume hemofiltration including definitions and classification. Proc 2nd Czech Conference on Critical Care Nephrology, Pardubice, Czech Republic, 2007.

43. Honore PM, Joannes-Boyau O, Boer W, Collin V. High-volume hemofiltration in sepsis and SIRS: current concepts and future prospects. Blood Purif 2009;28:1-11.

44. Metnitz PG, Krenn CG, Steltzer H et al. Effect of acute renal failure requiring renal replacement therapy on outcome in critically ill patients. Crit Care Med 2002;30:2051-8.

45. Uchino S, Kellum JA, Bellomo R et al. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. JAMA 2005;294:813-8.

46. Overberger P, Pesacreta M, Palevsky PM. Management of renal replacement therapy in acute kidney injury: a survey of practitioner prescribing practices. Clin J Am Soc Nephrol 2007;2:623-30.

47. Palevsky PM. Indications and timing of renal replacement therapy in acute kidney injury. Crit Care Med 2008;36:S224-8.

48. Uchino S, Bellomo R, Morimatsu H et al. Continuous renal replacement therapy: a worldwide practice survey. The beginning and ending supportive therapy for the kidney (B.E.S.T. kidney) investigators. Intensive Care Med 2007;33:1563-70.

49. Vesconi S, Cruz DN, Fumagalli R et al. Delivered dose of renal replacement therapy and mortality in critically ill patients with acute kidney injury. Crit Care 2009;13:R57.

50. Ronco C, Bellomo R, Homel P et al. Effects of different doses in continuous veno-venous haemofiltration on outcomes of acute renal failure: a prospective randomised trial. Lancet 2000;356:26-30.

51. Schiffl H, Lang SM, Fischer R. Daily hemodialysis and the outcome of acute renal failure. N Engl J Med 2002;346:305-10.

52. Bouman CS, Oudemans-Van Straaten HM, Tijssen JG et al. Effects of early high-volume continuous venovenous hemofiltration on survival and recovery of renal

function in intensive care patients with acute renal failure: a prospective, randomized trial. Crit Care Med 2002;30:2205-11.

53. Tolwani AJ, Campbell RC, Stofan BS et al. Standard versus high-dose CVVHDF for ICU-related acute renal failure. J Am Soc Nephrol 2008;19:1233-8.

54. Saudan P, Niederberger M, De Seigneux S et al. Adding a dialysis dose to continuous hemofiltration increases survival in patients with acute renal failure. Kidney Int 2006;70:1312-7.

55. Bellomo R, Warrillow SJ, Reade MC. Why we should be wary of single-center trials. Crit Care Med 2009;37:3114-9.

56. Eckmanns T, Bessert J, Behnke M et al. Compliance with antiseptic hand rub use in intensive care units: the Hawthorne effect. Infect Control Hosp Epidemiol 2006;27:931-4.

57. Bellomo R, Cass A, Cole L et al. Intensity of continuous renal-replacement therapy in critically ill patients. N Engl J Med 2009;361:1627-38.

58. Bellomo R. Do we know the optimal dose for renal replacement therapy in the intensive care unit? Kidney Int 2006;70:1202-4.

59. Grootendorst AF, van Bommel EF, van der Hoven B et al. High volume hemofiltration improves right ventricular function in endotoxin-induced shock in the pig. Intensive Care Med 1992;18:235-40.

60. Grootendorst AF, van Bommel EF, van Leengoed LA et al. High volume hemofiltration improves hemodynamics and survival of pigs exposed to gut ischemia and reperfusion. Shock 1994;2:72-8.

61. Wang H, Zhang ZH, Yan XW et al. Amelioration of hemodynamics and oxygen metabolism by continuous venovenous hemofiltration in experimental porcine pancreatitis. World J Gastroenterol 2005;11:127-31.

62. Bellomo R, Kellum JA, Gandhi CR et al. The effect of intensive plasma water exchange by hemofiltration on hemodynamics and soluble mediators in canine endotoxemia. Am J Respir Crit Care Med 2000;161:1429-36.

63. Rogiers P, Zhang H, Pauwels D, Vincent JL. Comparison of polyacrylonitrile (AN69) and polysulphone membrane during hemofiltration in canine endotoxic shock. Crit Care Med 2003;31:1219-25.

64. Grootendorst AF, van Bommel EF, van Leengoed LA et al. Infusion of ultrafiltrate from endotoxemic pigs depresses myocardial performance in normal pigs. J Crit Care 1993;8:161-9.

65. Lee PA, Matson JR, Pryor RW, Hinshaw LB. Continuous arteriovenous hemofiltration therapy for Staphylococcus aureus-induced septicemia in immature swine. Crit Care Med 1993;21:914-24.

66. Rogiers P, Zhang H, Smail N et al. Continuous venovenous hemofiltration improves cardiac performance by mechanisms other than tumor necrosis factor-alpha attenuation during endotoxic shock. Crit Care Med 1999;27:1848-55.

67. Journois D, Israel-Biet D, Pouard P et al. High-volume, zero-balanced hemofiltration to reduce delayed inflammatory response to cardiopulmonary bypass in children. Anesthesiology 1996;85:965-76.

68. Journois D, Pouard P, Greeley WJ et al. Hemofiltration during cardiopulmonary bypass in pediatric cardiac surgery. Effects on hemostasis, cytokines, and complement components. Anesthesiology 1994;81:1181-9; discussion 26A-27A.

69. Cornejo R, Downey P, Castro R et al. High-volume hemofiltration as salvage therapy in severe hyperdynamic septic shock. Intensive Care Med 2006;32:713-22.

70. Honore PM, Jamez J, Wauthier M et al. Prospective evaluation of short-term, high-volume isovolemic hemofiltration on the hemodynamic course and outcome in patients with intractable circulatory failure resulting from septic shock. Crit Care Med 2000;28:3581-7.

71. Joannes-Boyau O, Rapaport S, Bazin R et al. Impact of high volume hemofiltration on hemodynamic disturbance and outcome during septic shock. Asaio J 2004;50:102-9.

72. Oudemans-van Straaten HM, Bosman RJ, van der Spoel JI, Zandstra DF. Outcome of critically ill patients treated with intermittent high-volume haemofiltration: a prospective cohort analysis. Intensive Care Med 1999;25:814-21.

73. Piccinni P, Dan M, Barbacini S et al. Early isovolaemic haemofiltration in oliguric patients with septic shock. Intensive Care Med 2006;32:80-6.

74. Ratanarat R, Brendolan A, Piccinni P et al. Pulse high-volume haemofiltration for treatment of severe sepsis: effects on hemodynamics and survival. Crit Care 2005;9:R294-302.

75. Laurent I, Adrie C, Vinsonneau C et al. High-volume hemofiltration after out-of-hospital cardiac arrest: a randomized study. J Am Coll Cardiol 2005;46:432-7.

76. Adrie C, Adib-Conquy M, Laurent I et al. Successful cardiopulmonary resuscitation after cardiac arrest as a "sepsis-like" syndrome. Circulation 2002;106:562-8.

77. Jiang HL, Xue WJ, Li DQ et al. Influence of continuous veno-venous hemofiltration on the course of acute pancreatitis. World J Gastroenterol 2005;11:4815-21.

78. Mandolfo S, Galli F, Costa S et al. Factors influencing permanent catheter performance. J Vasc Access 2001;2:106-9.

79. Ricci Z, Ronco C. Pre- versus post-dilution CVVH. Blood Purif 2005;23:338.

80. Bellomo R, Tan HK, Bhonagiri S et al. High protein intake during continuous hemodiafiltration: impact on amino acids and nitrogen balance. Int J Artif Organs 2002;25:261-8.

81. Maxvold NJ, Smoyer WE, Custer JR, Bunchman TE. Amino acid loss and nitrogen balance in critically ill children with acute renal failure: a prospective comparison between classic hemofiltration and hemofiltration with dialysis. Crit Care Med 2000;28:1161-5.

82. Srisawat N, Lawsin L, Uchino S et al. Cost of acute renal replacement therapy in the intensive care unit: results from The Beginning and Ending Supportive Therapy for the Kidney (BEST Kidney) Study. Crit Care 2010;14:R46.

83. Rimmele T, Hayi-Slayman D, Page M et al. [Cascade hemofiltration: principle, first experimental data]. Ann Fr Anesth Reanim 2009;28:249-52.

84. Rimmele T, Wey PF, Bernard N et al. Hemofiltration with the Cascade system in an experimental porcine model of septic shock. Ther Apher Dial 2009;13:63-70.

85. Agishi T, Kaneko I, Hasuo Y et al. Double filtration plasmapheresis. Trans Am Soc Artif Intern Organs 1980;26:406-11.

86. Valbonesi M, Giannini G. Nine years of cascade filtration for thrombotic thrombocytopenic purpura. Ther Apher Dial 2004;8:87-92.

87. Rimmele T, Assadi A, Benatir F et al. Validation of a Pseudomonas aeruginosa porcine model of septic shock. J Infect 2006;53:199-205.

88. Freise H, Bruckner UB, Spiegel HU. Animal models of sepsis. J Invest Surg 2001;14:195-212.

89. Han JJ, Windsor A, Drenning DH et al. Release of endothelin in relation to tumor necrosis factor-alpha in porcine Pseudomonas aeruginosa-induced septic shock. Shock 1994;1:343-6.

90. Herity NA, Allen JD, Silke B, Adgey AA. Inhaled nitric oxide in combination with volume resuscitation refines a porcine model of endotoxic shock. Ir J Med Sci 2001;170:172-5.

91. Allaouchiche B, Duflo F, Debon R et al. Influence of sepsis on minimum alveolar concentration of desflurane in a porcine model. Br J Anaesth 2001;87:280-3.

92. Allaouchiche B, Duflo F, Tournadre JP et al. Influence of sepsis on sevoflurane minimum alveolar concentration in a porcine model. Br J Anaesth 2001;86:832-6.

93. Murphey ED, Traber DL. Pretreatment with tumor necrosis factor-alpha attenuates arterial hypotension and mortality induced by endotoxin in pigs. Crit Care Med 2000;28:2015-21.

94. Parker SJ, Watkins PE. Experimental models of gram-negative sepsis. Br J Surg 2001;88:22-30.

95. Deitch EA. Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. Shock 1998;9:1-11.

96. Ritter C, Andrades M, Frota Junior ML et al. Oxidative parameters and mortality in sepsis induced by cecal ligation and perforation. Intensive Care Med 2003;29:1782-9.

97. Esmon CT. Why do animal models (sometimes) fail to mimic human sepsis? Crit Care Med 2004;32:S219-22.

98. Wyler F, Neutze JM, Rudolph AM. Effects of endotoxin on distribution of cardiac output in unanesthetized rabbits. Am J Physiol 1970;219:246-51.

99. Haberstroh J, Breuer H, Lucke I et al. Effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hemodynamic and cytokine response in a porcine model of Pseudomonas sepsis. Shock 1995;4:216-24.

100. Haberstroh J, Wiese K, Geist A et al. Effect of delayed treatment with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on survival and plasma cytokine levels in a non-neutropenic porcine model of Pseudomonas aeruginosa sepsis. Shock 1998;9:128-34.

101. Santak B, Radermacher P, Adler J et al. Effect of increased cardiac output on liver blood flow, oxygen exchange and metabolic rate during longterm endotoxin-induced shock in pigs. Br J Pharmacol 1998;124:1689-97.

102. Trager K, Radermacher P, Rieger KM et al. Norepinephrine and nomega-monomethyl-L-arginine in porcine septic shock: effects on hepatic O2 exchange and energy balance. Am J Respir Crit Care Med 1999;159:1758-65.

103. Casey LC, Balk RA, Bone RC. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. Ann Intern Med 1993;119:771-8.

104. Riche FC, Cholley BP, Panis YH et al. Inflammatory cytokine response in patients with septic shock secondary to generalized peritonitis. Crit Care Med 2000;28:433-7.

105. Girardin E, Dayer JM. [Cytokines and antagonists in septic shock]. Schweiz Med Wochenschr 1993;123:480-91.

106. Morgera S, Haase M, Kuss T et al. Pilot study on the effects of high cutoff hemofiltration on the need for norepinephrine in septic patients with acute renal failure. Crit Care Med 2006;34:2099-104.

107. Rimmele T, Assadi A, Cattenoz M et al. High-volume haemofiltration with a new haemofiltration membrane having enhanced adsorption properties in septic pigs. Nephrol Dial Transplant 2009;24:421-7.

108. De Vriese AS, Colardyn FA, Philippe JJ et al. Cytokine removal during continuous hemofiltration in septic patients. J Am Soc Nephrol 1999;10:846-53.

109. Heering P, Morgera S, Schmitz FJ et al. Cytokine removal and cardiovascular hemodynamics in septic patients with continuous venovenous hemofiltration. Intensive Care Med 1997;23:288-96.

110. Sander A, Armbruster W, Sander B et al. Hemofiltration increases IL-6 clearance in early systemic inflammatory response syndrome but does not alter IL-6 and TNF alpha plasma concentrations. Intensive Care Med 1997;23:878-84.

111. Morgera S, Klonower D, Rocktaschel J et al. TNF-alpha elimination with high cut-off haemofilters: a feasible clinical modality for septic patients? Nephrol Dial Transplant 2003;18:1361-9.

112. Joannidis M. Continuous renal replacement therapy in sepsis and multisystem organ failure. Semin Dial 2009;22:160-4.

113. Haase M, Silvester W, Uchino S et al. A pilot study of high-adsorption hemofiltration in human septic shock. Int J Artif Organs 2007;30:108-17.

114. Formica M, Inguaggiato P, Bainotti S, Wratten ML. Coupled plasma filtration adsorption. Contrib Nephrol 2007;156:405-10.

115. Page M, Hayi-Slayman D, Ber CE et al. [Use of coupled plasma filtration adsorption for septic shock treatment]. Ann Fr Anesth Reanim 2007;26:990-3.

116. Ronco C, Brendolan A, d'Intini V et al. Coupled plasma filtration adsorption: rationale, technical development and early clinical experience. Blood Purif 2003;21:409-16.

117. Schroeder KL, Sallustio JE, Ross EA. Continuous haematocrit monitoring during intradialytic hypotension: precipitous decline in plasma refill rates. Nephrol Dial Transplant 2004;19:652-6.

118. Mariano F, Tetta C, Stella M et al. Regional citrate anticoagulation in critically ill patients treated with plasma filtration and adsorption. Blood Purif 2004;22:313-9.

119. Formica M, Olivieri C, Livigni S et al. Hemodynamic response to coupled plasmafiltration-adsorption in human septic shock. Intensive Care Med 2003;29:703-8.

120. Bouman CS, Oudemans-van Straaten HM, Schultz MJ, Vroom MB. Hemofiltration in sepsis and systemic inflammatory response syndrome: the role of dosing and timing. J Crit Care 2007;22:1-12.

121. Palevsky PM. Clinical review: timing and dose of continuous renal replacement therapy in acute kidney injury. Crit Care 2007;11:232.

122. Tetta C, Cavaillon JM, Camussi G et al. Continuous plasma filtration coupled with sorbents. Kidney Int Suppl 1998;66:S186-9.

123. Tetta C, Gianotti L, Cavaillon JM et al. Coupled plasma filtration-adsorption in a rabbit model of endotoxic shock. Crit Care Med 2000;28:1526-33.

124. Sykora R, Chvojka J, Krouzecky A et al. Coupled plasma filtration adsorption in experimental peritonitis-induced septic shock. Shock 2009;31:473-80.

125. Stengl M, Sykora R, Chvojka J et al. Differential effects of hemofiltration and of coupled plasma filtration adsorption on cardiac repolarization in pigs with hyperdynamic septic shock. Shock;33:101-5.

126. Page M, Rimmele T. [Coupled plasma filtration adsorption: rationale and perspectives in septic shock]. Can J Anaesth 2008;55:847-52.

127. Bellomo R, Tetta C, Ronco C. Coupled plasma filtration adsorption. Intensive Care Med 2003;29:1222-8.

128. Lentini P, Cruz D, Nalesso F et al. [A pilot study comparing pulse high volume hemofiltration (pHVHF) and coupled plasma filtration adsorption (CPFA) in septic shock patients.]. G Ital Nefrol 2009;26:695-703.

129. Mao HJ, Yu S, Yu XB et al. Effects of coupled plasma filtration adsorption on immune function of patients with multiple organ dysfunction syndrome. Int J Artif Organs 2009;32:31-8.

130. Aoki H, Kodama M, Tani T, Hanasawa K. Treatment of sepsis by extracorporeal elimination of endotoxin using polymyxin B-immobilized fiber. Am J Surg 1994;167:412-7.

131. Kellum JA, Song M, Venkataraman R. Hemoadsorption removes tumor necrosis factor, interleukin-6, and interleukin-10, reduces nuclear factor-kappaB DNA binding, and improves short-term survival in lethal endotoxemia. Crit Care Med 2004;32:801-5.

132. Cohen J, Aslam M, Pusey CD, Ryan CJ. Protection from endotoxemia: a rat model of plasmapheresis and specific adsorption with polymyxin B. J Infect Dis 1987;155:690-5.

133. Shoji H. Extracorporeal endotoxin removal for the treatment of sepsis: endotoxin adsorption cartridge (Toraymyxin). Ther Apher Dial 2003;7:108-14.

134. Cruz DN, Antonelli M, Fumagalli R et al. Early use of polymyxin B hemoperfusion in abdominal septic shock: the EUPHAS randomized controlled trial. JAMA 2009;301:2445-52.

135. Kellum JA, Uchino S. International differences in the treatment of sepsis: are they justified? JAMA 2009;301:2496-7.

136. Cantaluppi V, Assenzio B, Pasero D et al. Polymyxin-B hemoperfusion inactivates circulating proapoptotic factors. Intensive Care Med 2008;34:1638-45.

137. Kanesaka S, Sasaki J, Kuzume M et al. Effect of direct hemoperfusion using polymyxin B immobilized fiber on inflammatory mediators in patients with severe sepsis and septic shock. Int J Artif Organs 2008;31:891-7.

138. Vincent JL, Laterre PF, Cohen J et al. A pilot-controlled study of a polymyxin B-immobilized hemoperfusion cartridge in patients with severe sepsis secondary to intra-abdominal infection. Shock 2005;23:400-5.

139. Cruz DN, Perazella MA, Bellomo R et al. Effectiveness of polymyxin B-immobilized fiber column in sepsis: a systematic review. Crit Care 2007;11:R47.

140. Peng ZY, Carter MJ, Kellum JA. Effects of hemoadsorption on cytokine removal and short-term survival in septic rats. Crit Care Med 2008;36:1573-7.

141. Rimmelé T, Bishop J, Simon P et al. What blood temperature for an extracorporeal *ex vivo* circuit? Artif Organs 2010 (accepté pour publication).

142. Cole L, Bellomo R, Davenport P et al. Cytokine removal during continuous renal replacement therapy: an ex vivo comparison of convection and diffusion. Int J Artif Organs 2004;27:388-97.

143. Cole L, Bellomo R, Davenport P et al. The effect of coupled haemofiltration and adsorption on inflammatory cytokines in an ex vivo model. Nephrol Dial Transplant 2002;17:1950-6.

144. Haase M, Bellomo R, Baldwin I et al. The effect of three different miniaturized blood purification devices on plasma cytokine concentration in an ex vivo model of endotoxinemia. Int J Artif Organs 2008;31:722-9.

145. Tetta C, Cavaillon JM, Schulze M et al. Removal of cytokines and activated complement components in an experimental model of continuous plasma filtration coupled with sorbent adsorption. Nephrol Dial Transplant 1998;13:1458-64.

146. Uchino S, Bellomo R, Morimatsu H et al. Cytokine dialysis: an ex vivo study. Asaio J 2002;48:650-3.

147. Kato A, Singh S, McLeish KR et al. Mechanisms of hypothermic protection against ischemic liver injury in mice. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2002;282:G608-16.

148. Polderman KH. Mechanisms of action, physiological effects, and complications of hypothermia. Crit Care Med 2009;37:S186-202.

149. Webster CM, Kelly S, Koike MA et al. Inflammation and NFkappaB activation is decreased by hypothermia following global cerebral ischemia. Neurobiol Dis 2009;33:301-12.

150. Ueyama K, Nishimura K, Nishina T et al. PMEA coating of pump circuit and oxygenator may attenuate the early systemic inflammatory response in cardiopulmonary bypass surgery. Asaio J 2004;50:369-72.

151. Tanaka M, Motomura T, Kawada M et al. Blood compatible aspects of poly(2-methoxyethylacrylate) (PMEA)--relationship between protein adsorption and platelet adhesion on PMEA surface. Biomaterials 2000;21:1471-81.

152. Oudemans-van Straaten HM. Primum non nocere, safety of continuous renal replacement therapy. Curr Opin Crit Care 2007;13:635-7.

153. Aldea GS, O'Gara P, Shapira OM et al. Effect of anticoagulation protocol on outcome in patients undergoing CABG with heparin-bonded cardiopulmonary bypass circuits. Ann Thorac Surg 1998;65:425-33.

154. Jansen PG, te Velthuis H, Huybregts RA et al. Reduced complement activation and improved postoperative performance after cardiopulmonary bypass with heparin-coated circuits. J Thorac Cardiovasc Surg 1995;110:829-34.

155. Courtney JM, Zhao X, Qian H. Biomaterials in cardiopulmonary bypass. Perfusion 1999;14:263-7.

156. Clark WR, Gao D. Low-molecular weight proteins in end-stage renal disease: potential toxicity and dialytic removal mechanisms. J Am Soc Nephrol 2002;13 Suppl 1:S41-7.

157. Aibiki M, Maekawa S, Ogura S et al. Effect of moderate hypothermia on systemic and internal jugular plasma IL-6 levels after traumatic brain injury in humans. J Neurotrauma 1999;16:225-32.

158. Dietrich WD, Chatzipanteli K, Vitarbo E et al. The role of inflammatory processes in the pathophysiology and treatment of brain and spinal cord trauma. Acta Neurochir Suppl 2004;89:69-74.

159. Kimura A, Sakurada S, Ohkuni H et al. Moderate hypothermia delays proinflammatory cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells. Crit Care Med 2002;30:1499-502.

160. Suehiro E, Fujisawa H, Akimura T et al. Increased matrix metalloproteinase-9 in blood in association with activation of interleukin-6 after traumatic brain injury: influence of hypothermic therapy. J Neurotrauma 2004;21:1706-11.

161. Yenari MA, Han HS. Influence of hypothermia on post-ischemic inflammation: role of nuclear factor kappa B (NFkappaB). Neurochem Int 2006;49:164-9.

162. el Habbal MH, Carter H, Smith LJ et al. Neutrophil activation in paediatric extracorporeal circuits: effect of circulation and temperature variation. Cardiovasc Res 1995;29:102-7.

163. Morgera S, Haase M, Rocktaschel J et al. Intermittent high-permeability hemofiltration modulates inflammatory response in septic patients with multiorgan failure. Nephron Clin Pract 2003;94:c75-80.

164. Haase M, Bellomo R, Baldwin I et al. Hemodialysis membrane with a high-molecular-weight cutoff and cytokine levels in sepsis complicated by acute renal failure: a phase 1 randomized trial. Am J Kidney Dis 2007;50:296-304.

165. Morgera S, Slowinski T, Melzer C et al. Renal replacement therapy with high-cutoff hemofilters: Impact of convection and diffusion on cytokine clearances and protein status. Am J Kidney Dis 2004;43:444-53.

166. Brunet S, Leblanc M, Geadah D et al. Diffusive and convective solute clearances during continuous renal replacement therapy at various dialysate and ultrafiltration flow rates. Am J Kidney Dis 1999;34:486-92.

167. Ricci Z, Ronco C, D'Amico G et al. Practice patterns in the management of acute renal failure in the critically ill patient: an international survey. Nephrol Dial Transplant 2006;21:690-6.

168. Pellicano R, Polkinghorne KR, Kerr PG. Reduction in beta2-microglobulin with super-flux versus high-flux dialysis membranes: results of a 6-week, randomized, double-blind, crossover trial. Am J Kidney Dis 2008;52:93-101.

169. Cohen G, Haag-Weber M, Mai B et al. Effect of immunoglobulin light chains from hemodialysis and continuous ambulatory peritoneal dialysis patients on polymorphonuclear leukocyte functions. J Am Soc Nephrol 1995;6:1592-9.

170. Hutchison CA, Harding S, Mead G et al. Serum free-light chain removal by high cutoff hemodialysis: optimizing removal and supportive care. Artif Organs 2008;32:910-7.

171. Mariano F, Fonsato V, Lanfranco G et al. Tailoring high-cut-off membranes and feasible application in sepsis-associated acute renal failure: in vitro studies. Nephrol Dial Transplant 2005;20:1116-26.

Annexes (format pdf des publications)

1- Rimmelé T, Wey PF, Bernard N et al. Hemofiltration with the Cascade system in an experimental porcine model of septic shock. Ther Apher Dial 2009;13:63-70.
(= référence 84).

2- Rimmelé T, Assadi A, Benatir F et al. Validation of a Pseudomonas aeruginosa porcine model of septic shock. J Infect 2006;53:199-205.
(= référence 87).

3- Rimmelé T, Assadi A, Cattenoz M et al. High-volume haemofiltration with a new haemofiltration membrane having enhanced adsorption properties in septic pigs. Nephrol Dial Transplant 2009;24:421-7.
(= référence 107).

4- Page M, Rimmele T. [Coupled plasma filtration adsorption: rationale and perspectives in septic shock]. Can J Anaesth 2008;55:847-52.
(= référence 126).

5- Rimmelé T, Hayi-Slayman D, Page M et al. [Cascade hemofiltration: principle, first experimental data]. Ann Fr Anesth Reanim 2009;28:249-52.
(référence 83).

6- Page M, Hayi-Slayman D, Ber CE et al. [Use of coupled plasma filtration adsorption for septic shock treatment]. Ann Fr Anesth Reanim 2007;26:990-3.
(= référence 115).

7- Rimmelé T, Bishop J, Simon P et al. What blood temperature for an extracorporeal *ex vivo* circuit? Artif Organs 2010 (accepté pour publication). *Epreuves non disponibles au moment de l'impression de la thèse.*