



HAL
open science

L'encéphalopathie hépatique au cours de la cirrhose, de la physiopathologie au traitement

Sarah Mouri

► **To cite this version:**

Sarah Mouri. L'encéphalopathie hépatique au cours de la cirrhose, de la physiopathologie au traitement. Médecine humaine et pathologie. Sorbonne Université, 2019. Français. NNT : 2019SORUS250 . tel-03189283

HAL Id: tel-03189283

<https://theses.hal.science/tel-03189283>

Submitted on 3 Apr 2021

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.



Sorbonne Université

École doctorale 394

Laboratoire INSERM UMR_S938-Centre de Recherche Saint Antoine

Équipe de recherche du Professeur Chantal HOUSSET

Thèse de doctorat de Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Présentée par Sarah MOURI

Pour obtenir le grade de Docteur de Sorbonne Université

L'encéphalopathie hépatique au cours de la cirrhose, de la physiopathologie au traitement

Dirigée par Professeur Dominique THABUT

Présentée et soutenue publiquement le 1^{er} avril 2019

Devant un jury composé de :

Catherine LUBETZKI, Professeur de Neurologie, Paris – Présidente

Christophe BUREAU, Professeur d'Hépatologie, Toulouse – Rapporteur

Alexandre LOUVET, Professeur d'Hépatologie, Lille – Rapporteur

Filomena CONTI, Professeur de Biologie Cellulaire, Paris – Examinatrice

Pierre-Emmanuel RAUTOU, Professeur d'Hépatologie, Paris – Examineur

REMERCIEMENTS

LISTE DES ABBREVIATIONS

ACLF : Acute on Chronic Liver Failure
ADN : acide désoxyribonucléique
ARN : acide ribonucléique
BDL : Bile Duct Ligation
BHE : Barrière Hémato-Encéphalique
CCI4 : tétrachlorure de carbone
EAE : Experimental Autoimmune Encephalomyelitis
EEG : Electroencephalogramme
EH : Encéphalopathie hépatique
GABA : Acide gamma-aminobutyrique
GFAP : Glial Fibrillary Acid Protein
IFN : Interféron
IL1, IL6 : Interleukine 1, 6
iNOS : Oxyde Nitric Synthetase
IRM : Imagerie par résonance magnétique
LPS lipopolysaccharide
MELD : Model for End Stage Liver Disease
MMP9 : métalloprotéase
NFS : numération de la formule sanguine
NH3 : Régime hyperammoniémiant
NMDA : Acide N-Méthyl D-Aspartique
PCR : Polymerase Chain Reaction
PEG : Polyéthylène Glycol
PHES : Psychometric Hepatic Encephalopathy Sum-score
PBMC : Peripheral blood mononuclear cell
 α SMA : α Smooth Muscle Actin
TIPS : Transjugular Intra-hepatic Portosystemic Shunt
TNF : Tumor Necrosis Factor
VEGF : Vascular Endothelium Growth Factor
ZO1 : Zonula occludens 1

RESUME

L'encéphalopathie hépatique (EH) est une complication sévère de la cirrhose, dont le diagnostic en réanimation est souvent méconnu, et la physiopathologie, mal élucidée. Le rôle central de l'hyperammoniémie est connu depuis longtemps. Des études récentes suggèrent que l'inflammation systémique pourrait jouer un rôle majeur dans le développement de l'EH, notamment par le biais d'une altération de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Par ailleurs, une étude pilote faite sur des LCR de patients suggère qu'il pourrait exister des anomalies du cycle de Krebs au cours de l'EH.

Les objectifs de ce travail de thèse étaient : (1) de valider un score simple d'évaluation de l'EH; (2) d'étudier la présence éventuelle d'une augmentation de perméabilité de la BHE chez des patients atteints de cirrhose présentant une EH au moyen d'une mesure de la gravité spécifique du LCR en tomодensitométrie (TDM) et (3) de déterminer les parts respectives de l'hyperammoniémie, de l'inflammation et d'un éventuel déficit énergétique dans la survenue d'une EH, au moyen de différents modèles animaux de cirrhose, et (4) d'étudier la prévention des anomalies par des médicaments ciblant ces deux facteurs (benzoate de sodium et rifaximine-RFX) et la potentielle efficacité de la biotine, traitement actuellement en développement dans la sclérose en plaques permettant de restaurer les anomalies du métabolisme énergétique.

Méthodes : (1) par l'étude clinique, un score simple utilisé par les réanimateurs chez des malades dans le coma a été validé dans une cohorte monocentrique de patients encéphalopathes ; (2) d'un point de vue physiopathologique : deux modèles animaux différents de cirrhose ont été étudiés, l'un inflammatoire (ligature de la voie biliaire principale-BDL) et l'autre toxique (administration intra-gastrique de CCl₄), et comparés à des contrôles SHAM. Des groupes de rats ont été soumis à régime hyperammoniémiant (NH₃), un traitement hypoammoniémiant (benzoate de sodium-BNa 200 mg/kg/j), antibiotique (RFX-50 mg/kg/j) ou par la biotine (30 mg/kg/j). L'EH était objectivée par analyse du comportement des rats (dispositif de l'Open Field, validé chez les rats BDL). L'ammoniémie et les cytokines pro-inflammatoires plasmatiques ont été mesurées. La perméabilité de la BHE aux solutés a été analysée par injection de fluorochromes.

Résultats : L'ammoniémie des rats BDL et CCl₄ étaient significativement plus élevée que chez leurs contrôles respectifs, alors que les concentrations plasmatiques de TNF α , IL6 et IFN γ étaient significativement supérieures chez les rats BDL que chez les rats CCl₄ ou SHAM. Les rats BDL présentaient des signes d'EH à l'OpenField par comparaison avec les rats SHAM. Ces anomalies n'étaient pas potentialisées par le régime hyperammoniémiant. Les traitements par RFX, BNa et biotine permettaient de prévenir l'apparition de l'EH chez les rats BDL (différences significatives pour toutes les mesures par rapport aux rats BDL non traités, et non différentes de celles des rats SHAM). A l'inverse, les rats CCl₄ ne présentaient pas de signe d'EH à l'Openfield.

Une augmentation de perméabilité de la BHE aux solutés a été mise en évidence chez les rats BDL par rapport aux SHAM, mais pas chez les rats CCl₄. Chez les rats BDL traités par RFX, BNa et biotine, la perméabilité de la BHE était significativement

diminuée par rapport aux rats BDL non traités, et devenait non différente de celle observée chez les rats SHAM.

Conclusion : Cette étude suggère que l'inflammation est un facteur indispensable au développement d'une EH chez les rats atteints de cirrhose, même en présence d'hyperammoniémie, et ce par une augmentation de la perméabilité de la BHE aux solutés. Elle suggère également de façon tout-à-fait innovante qu'il pourrait exister un déficit énergétique au cours de l'EH (du fait de l'efficacité de la biotine). Les traitements par RFX, benzoate de sodium et biotine permettraient de prévenir ces anomalies. Des expériences complémentaires permettront de préciser les mécanismes qui sous-tendent ces modifications et ainsi ouvrir la voie à de nouvelles possibilités thérapeutiques.

ABSTRACT

Hepatic encephalopathy (HE) is a severe complication of cirrhosis. Pathophysiology is still debated. The role of ammonia is well established but recent studies suggest a potential implication of systemic inflammation that could alter the permeability of the blood-brain barrier (BBB). A pilot study of the patients' cerebrospinal fluid (CSF) suggests that a dysregulation of the Tricarboxylic Acid Cycle (TCA) occurs in HE.

The aim of this PhD thesis was to : 1-Validate a simple score for Intensive Care Units (ICU) physicians to evaluate HE 2- Evaluate a potential increase in the permeability of BBB in patients with HE using a software (Brainview on cerebral tomodensitometry) to calculate the specific gravity of CSF 3- Define the different contributions of hyperammonemia, systemic inflammation and of TCA dysregulation in animal models of cirrhosis 4- Examine the efficiency of different treatments (sodium benzoate and rifaximine targeting ammonia and inflammation, respectively, and biotine that could restore TCA, as currently tested in multiple sclerosis).

Methods : 1- A simple score has been designed in a monocentric cohort of comatose patients hospitalized in ICU, to help physicians to diagnose severe HE. 2- Pathophysiology : two models of cirrhosis in rats were used. Biliary and cytolytic types of cirrhosis were induced by Bile Duct Ligation (BDL), and carbon tetrachloride (CCl₄) gavage, respectively. Controls consisted in sham operation and vehicle gavage, respectively. Part of the animals were treated with an antibiotic, *i.e.* rifaximin (50mg/kg), sodium benzoate (200 mg/kg), to decrease hyperammonemia or biotine (30 mg/kg/j to restore TCA abnormalities. HE was monitored by a behavioral test called OpenField, validated in the BDL model. Ammonemia and cytokines were measured in serum. BBB permeability was evaluated by infusion of fluorochrome.

Results: BDL and CCl₄ rats developed cirrhosis and hyperammonemia. However, only BDL rats, as opposed to CCl₄, displayed HE, as shown by behavioral abnormalities in the OpenField test. Concentrations of pro-inflammatory cytokines in plasma (IFN γ , TNF α , IL6) were significantly higher in BDL rats than in CCl₄ rats , and were significantly higher in BDL rats with HE than in those without. Intracerebral concentrations of fluorochrome following intravenous injection, were significantly higher in BDL rats than in sham, and in BDL rats with HE than in those without, attesting

to a higher permeability of the BBB to solutes in HE. By contrast, the concentration of intra-cerebral fluorochrome was not different in CCl₄ rats as compared to controls. These abnormalities (of behavior and BBB permeability to solutes) were corrected by treatments with rifaximin, benzoate and biotin in BDL rats.

Conclusion: These results indicate that hyperammonemia is not sufficient to cause HE in cirrhotic rats. They suggest that inflammation plays a key synergistic role in the occurrence of HE, by increasing BBB permeability to solutes. In an innovative way, the efficiency of biotin suggests a role of TCA dysregulation in HE. Complementary experiments should be done to understand the mechanisms underlying these results and to propose new therapeutic means in HE.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	12
I. ENCEPHALOPATHIE HEPATIQUE (EH)	12
I.1. DEFINITION.....	12
I.2. EPIDEMIOLOGIE.....	12
I.3. DIAGNOSTIC.....	14
II- PHYSIOPATHOLOGIE DE L'EH	17
II.1. HYPERAMMONIEMIE ET EH.....	17
II.2. INFLAMMATION ET EH.....	19
II.3. AUTRES HYPOTHESES PHYSIOPATHOLOGIQUES.....	20
III- TRAITEMENT DE L'EH	22
III.1. TRAITEMENTS VALIDES.....	22
III.2. AUTRES TRAITEMENTS.....	24
IV. BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE	25
IV.1. DEFINITION ET SPECIFICITES.....	25
IV.2. HYPERAMMONIEMIE ET BHE.....	28
IV.3. INFLAMMATION, RÔLE DANS L'EH ET ACTION SUR LA BHE.....	29
OBJECTIFS	30
I- ARTICLE 1 : FOUR SCORE: A RELIABLE SCORE FOR ASSESSING OVERT HEPATIC ENCEPHALOPATHY IN CIRRHOTIC PATIENTS.	31
II- ARTICLE 2 : MODIFICATION IN CSF SPECIFIC GRAVITY IN ACUTELY DECOMPENSATED CIRRHOSIS AND ACUTE ON CHRONIC LIVER FAILURE INDEPENDANT OF ENCEPHALOPATHY, EVIDENCES FOR AN EARLY BLOOD-CSF BARRIER DYSFUNCTION IN CIRRHOSIS.	40
III- ARTICLE 3 EN COURS / BREVET BIOTINE DEPOSE	50
MATERIEL ET METHODES	53
I- ANIMAUX	53
II- MODELES DE CIRRHOSE :	53
II.1. LIGATURE-SECTION DE LA VOIE BILIAIRE PRINCIPALE (BDL).....	53
II.2. TETRACHLORURE DE CARBONE (CCL4).....	54
III- DIAGNOSTIC DE L'ENCEPHALOPATHIE HEPATIQUE : TEST COMPORTEMENTAL	54
IV- TRAITEMENTS	57
IV.1. TRAITEMENT POTENTIALISANT L'ENCÉPHALOPATHIE HÉPATIQUE.....	57
IV.2. TRAITEMENTS DE L'ENCÉPHALOPATHIE HÉPATIQUE.....	57
V- PERMÉABILITÉ DE LA BHE	58
VI- ANALYSES BIOCHIMIQUES ET HISTOLOGIQUES	58
VII- DOSAGE DES CYTOKINES PRO-INFLAMMATOIRES PLASMATIQUES	59
VIII- ISOLEMENT DES MICROVAISSEAUX CÉRÉBRAUX	59
IX- ETUDE DES JONCTIONS SERRÉES CÉRÉBRALES PAR qRT-PCR	61
X- ISOLEMENT DES LEUCOCYTES INTRA-CÉRÉBRAUX	62
XI- METABOLOMIQUE	63
XII- ANALYSE STATISTIQUE	64
RESULTATS	65
I- PHENOTYPAGE DES RATS BDL ET CCL4	65
I.1. HISTOLOGIE DU FOIE.....	65
I.2. BIOCHIMIE : BILAN HEPATIQUE.....	66
II- AMMONIEMIE ET CYTOKINES INFLAMMATOIRES DANS LES DIFFERENTS MODELES	68
II.1. AMMONIEMIE.....	68

II.2. CYTOKINES INFLAMMATOIRES	69
III- EVALUATION DE L'EH DANS LES DIFFERENTS MODELES	71
III.1. MODELE BDL.....	71
III.2. MODELE CCL4.....	73
IV- RELATION ENTRE EH ET AMMONIEMIE.....	75
IV.1. MODELE BDL.....	75
IV.2. MODELE CCL4.....	77
V- RELATION ENTRE EH ET INFLAMMATION.....	78
VI- PERMEABILITE DE LA BHE	81
VI.1. MODELE BDL.....	81
VI.2. MODELE CCL4.....	82
VII- PERMEABILITE DE LA BHE ET EH CHEZ LES RATS BDL.....	83
VIII- PERMEABILITE DE LA BHE ET AMMONIEMIE.....	84
VIII.1. MODELE BDL.....	84
VIII.2. MODELE CCL4.....	85
IX- PERMEABILITE DE LA BHE ET CYTOKINES PLASMATIQUES.....	85
IX.1. MODELE BDL.....	85
IX.2. MODELE CCL4.....	86
X- EFFETS DE DIFFERENTS TRAITEMENTS DIMINUANT L'EH	87
X.1. RIFAXIMINE.....	87
X.2. BENZOATE DE SODIUM.....	91
X.3. BIOTINE	96
XI- EXPLORATION DES JONCTIONS SERREES CEREBRALES	100
XI.1. PCR SUR LES MICROVAISSEAUX CEREBRAUX DES RATS BDL.....	100
XI.2. PCR SUR LES MICROVAISSEAUX CEREBRAUX DES RATS BDL TRAITES.....	101
XI.3. WESTERN BLOT SUR LES MICROVAISSEAUX CEREBRAUX.....	101
XII- INFILTRATION LEUCOCYTAIRE INTRA-CEREBRALE	102
EXPERIENCES EN ATTENTE.....	104
DISCUSSION.....	105
CONCLUSION	112
CONCLUSION DE LA THESE.....	114
REFERENCES.....	115
ANNEXES	122
ANNEXE I- FOUR SCORE, ADAPTE DE (94)	122
ANNEXE II- REVUE EH EN REANIMATION ET MISE AU POINT RIFAXIMINE	122

Table des figures

FIGURE 1	BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE (BHE)	27
FIGURE 2	MICROVAISSEAU	60
FIGURE 3	COMPARAISON MICROVAISSEAUX VS CERVEAU TOTAL, PCR	60
FIGURE 4	VALIDATION DES ANTICORPS CD45, CD3, GRANULOCYTE SUR RATE ET CERVEAU MELANGES	63
FIGURE 5	BIOPSIE HEPATIQUE DES DIFFERENTS MODELES DE RATS	66
FIGURE 6	BILIRUBINE TOTALE, ASAT ET ALAT CHEZ LES RATS BDL, CCL4 ET LEURS CONTROLES	68
FIGURE 7	AMMONIEMIE DES RATS BDL ET CCL4	69
FIGURE 8	CYTOKINES INFLAMMATOIRES CHEZ LES RATS BDL ET CCL4	71
FIGURE 9	OPENFIELD DES RATS BDL	72
FIGURE 10	PROPORTION D'EH CHEZ LES RATS BDL	73
FIGURE 11	OPENFIELD DES RATS CCL4	74
FIGURE 12	AMMONIEMIE DES RATS BDL AVEC OU SANS EH	76
FIGURE 13	CORRELATION AMMONIEMIE ET PARAMETRES DE L'OPENFIELD CHEZ LES RATS BDL ET LEURS CONTROLES SHAM	77
FIGURE 14	CORRELATION AMMONIEMIE ET PARAMETRES DE L'OPENFIELD CHEZ LES RATS CCL4 ET LEURS CONTROLES HUILE MINERALE	78
FIGURE 15	TAUX DE CYTOKINES PLASMATIQUES CHEZ LES BDL AYANT OU NON UNE EH	79
FIGURE 16	CORRELATION DES TAUX DE CYTOKINES PLASMATIQUES ET DISTANCE TOTALE PARCOURUE DANS L'OPENFIELD CHEZ LES RATS BDL ET SHAM	80
FIGURE 17	CORRELATION DES TAUX DE CYTOKINES PLASMATIQUES ET DISTANCE TOTALE PARCOURUE DANS L'OPENFIELD CHEZ LES RATS CCL4 ET HUILE MINERALE	81
FIGURE 18	QUANTITE INTRA-CEREBRALE DE DEXTRAN FLUORESCENT (μG/G) CHEZ LES BDL TRAITES OU NON PAR REGIME NH3	82
FIGURE 19	QUANTITE INTRA-CEREBRALE DE DEXTRAN FLUORESCENT (μG/G) CHEZ LES RATS CCL4 TRAITES OU NON PAR REGIME NH3	83
FIGURE 20	QUANTITE INTRA-CEREBRALE DE DEXTRAN FLUORESCENT (μG/G) CHEZ LES BDL SELON LA PRESENCE OU NON D'UNE EH	84
FIGURE 21	CORRELATION ENTRE AMMONIEMIE ET QUANTITE INTRA-CEREBRALE DE DEXTRAN FLUORESCENT CHEZ LES RATS BDL ET SHAM	85
FIGURE 22	CORRELATION ENTRE AMMONIEMIE ET QUANTITE INTRA-CEREBRALE DE DEXTRAN FLUORESCENT CHEZ LES RATS CCL4 ET LEURS CONTROLES HUILE MINERALE	85
FIGURE 23	CORRELATION ENTRE LES CYTOKINES PLASMATIQUES ET LA QUANTITE INTRA-CEREBRALE DE DEXTRAN FLUORESCENT CHEZ LES RATS BDL ET SHAM	86
FIGURE 24	CORRELATION ENTRE LES CYTOKINES PLASMATIQUES ET LA QUANTITE INTRA-CEREBRALE DE DEXTRAN FLUORESCENT CHEZ LES RATS CCL4 ET HUILE	87
FIGURE 25	AMMONIEMIE DES RATS BDL TRAITES OU NON PAR RFX ET LEURS CONTROLES SHAM	88
FIGURE 26	CYTOKINES PLASMATIQUES CHEZ LES RATS BDL TRAITES PAR LA RFX	89
FIGURE 27	OPENFIELD DES RATS BDL TRAITES OU NON PAR RFX	90

FIGURE 28	QUANTITE INTRA-CEREBRALE DE DEXTRAN FLUORESCENT CHEZ LES RATS TRAITES PAR RFX ET LEURS CONTROLES SHAM	91
FIGURE 29	AMMONIEMIE DES RATS TRAITES PAR BENZOATE DE SODIUM ET LEURS CONTROLES SHAM	92
FIGURE 30	CYTOKINES PLASMATIQUES CHEZ LES RATS TRAITES PAR BENZOATE DE SODIUM ..	93
FIGURE 31	OPENFIELD DES RATS BDL TRAITES OU NON PAR BENZOATE DE SODIUM (BNA) ..	94
FIGURE 32	QUANTITE INTRA-CEREBRALE DE DEXTRAN FLUORESCENT CHEZ LES RATS BDL TRAITES OU NON PAR BENZOATE DE SODIUM (BNA)ET LEURS CONTROLES	95
FIGURE 33	AMMONIEMIE DES RATS BDL TRAITES PAR LA BIOTINE OU LE PLACEBO AINSI QUE LES CONTROLES SHAM	96
FIGURE 34	CYTOKINES PLASMATIQUES CHEZ LES RATS TRAITES PAR BIOTINE OU SON PLACEBO AINSI QUE CHEZ LEURS CONTROLES	97
FIGURE 35	OPENFIELD DES RATS TRAITES PAR BIOTINE OU PLACEBO ET LEURS CONTROLES SHAM	99
FIGURE 36	QUANTITE INTRA-CEREBRALE DE DEXTRAN FLUORESCENT CHEZ LES RATS BDL TRAITES PAR BIOTINE OU SON PLACEBO ET LEURS CONTROLES	100
FIGURE 37	PCR DES GENES DE JONCTIONS SERREES SUR MICROVAISSEAUX CEREBRAUX CHEZ LES RATS BDL EN FONCTION DE LA PRESENCE D'UNE EH	101
FIGURE 38	IMMUNOMARQUAGE CD3 SUR COUPES DE CERVEAU DE RATS BDL ET SHAM ..	103
FIGURE 39	POURCENTAGE DE LEUCOCYTES AU SEIN DES CELLULES IMMUNES ISOLEES A PARTIR DU CERVEAU DE BDL ET SHAM	103

INTRODUCTION

I. ENCEPHALOPATHIE HEPATIQUE (EH)

I.1. DEFINITION

La cirrhose est une maladie chronique du foie dont la définition est histologique ; il s'agit d'une affection irréversible et diffuse du foie caractérisée par une fibrose cicatricielle évolutive ou non qui désorganise l'architecture lobulaire normale et induit la formation de nodules de régénération. Il en résulte trois conséquences : une insuffisance hépato-cellulaire liée à la diminution du nombre d'hépatocytes fonctionnels, une hypertension portale qui peut conduire à la formation d'ascite et de voies de dérivation porto-systémiques et un état pré-cancéreux (la cirrhose est le principal facteur de risque de l'apparition d'un carcinome hépato-cellulaire).

L'encéphalopathie hépatique (EH) est définie comme l'ensemble des signes neurologiques et/ou neuropsychologiques qui sont associés à une maladie hépatique, qu'elle soit aiguë ou chronique, et/ou à la présence d'un shunt porto-systémique (1). Elle se manifeste par un panel de signes cliniques très variés dans leur présentation et dans leur intensité. En effet, l'examen clinique peut être normal et l'EH ne sera détectée que par l'altération de tests neuropsychologiques, ce qui définit alors une EH minime ; au contraire, l'examen clinique peut être anormal avec des signes cliniques allant d'une confusion isolée, un astérisis ou des troubles du sommeil, jusqu'au coma. On parle alors d'une EH clinique. Plusieurs scores de gravité de l'EH ont été validés mais peu sont utilisés en pratique courante. Parmi eux, le score de West-Haven grade l'EH clinique en 5 stades de gravité (2). Nous pouvons également citer le CHESS ou le HESA score. Des scores non spécifiques d'altération de la conscience comme le score de Glasgow ou le FOUR score sont également validés dans l'EH (3).

I.2. EPIDEMIOLOGIE

La cirrhose est une maladie fréquente en France qui représente un véritable problème de santé publique. Actuellement, 12 millions de personnes en France présentent au moins un facteur de risque de développer une maladie chronique du foie. On estime

que 700 000 personnes environ sont atteintes de cirrhose en France (observatoire INSERM, Beaujon) ; parmi eux, 210 000 sont atteints de cirrhose sévère qui serait responsable de 17 000 décès par an. Outre la consommation excessive d'alcool, les causes de cirrhose sont multiples avec notamment les infections virales (virus des hépatites B, C, D et E) mais également le syndrome métabolique (associant diabète, surpoids, hypertension artérielle, dyslipidémie et constituant un risque cardiovasculaire élevé) responsable de la NASH (*Non Alcoholic Steato Hepatitis*) dont l'incidence est en augmentation dans les pays développés.

Le pronostic de la cirrhose a été considérablement amélioré ces 15 dernières années. En raison des progrès importants effectués dans la prise en charge des complications de la cirrhose, l'EH est devenue une préoccupation majeure, tant pour les médecins que pour les patients et leur famille. En effet, la proportion de malades développant une EH est plus fréquente maintenant que le pronostic des complications classiques (hémorragie digestive, ascite) est moins létal à court terme. De plus, le développement et l'élargissement des indications des techniques d'anastomoses porto-caves par voie trans-hépatique (*TIPS-Transjugular Intrahepatic Portosystemic Shunt*) a pour conséquence directe une augmentation des épisodes d'EH chez les malades. On considère qu'entre 10 et 15% des patients ont des signes d'EH au moment du diagnostic de la cirrhose. Par la suite, un patient atteint de cirrhose a 30 à 70% de risque de développer une EH minime au cours de sa vie et 30 à 45% de risque de développer une EH clinique (4). Peu de données sont disponibles sur la prévalence et l'incidence de l'EH en réanimation mais on peut considérer qu'environ 20% des patients atteints de cirrhose admis dans ces services présentent des troubles de la conscience (5) et qu'environ 50% de ceux-ci seraient en lien avec une EH. Dans une cohorte française de patients atteints de cirrhose, l'EH représentait 13% des causes d'admission en unité de soins intensifs d'hépatologie (6) ; une autre étude prospective réalisée en unité de soins intensifs d'hépatologie retrouvait 30% d'EH clinique et plus de 50% de ces malades présentaient des troubles sévères de la conscience pouvant aller jusqu'au coma (7).

L'EH devient donc en soi un véritable problème de santé publique et ce pour plusieurs raisons. Tout d'abord, la présence de troubles neurologiques altère de manière importante la qualité de vie des patients (8). En effet, plusieurs études ont montré que les patients atteints d'EH avaient plus d'accidents de la vie quotidienne et plus

d'accidents de la route que ceux n'ayant pas d'EH (9) (10). De plus, l'apparition d'une EH marque un tournant évolutif dans la maladie hépatique et constitue un facteur de mauvais pronostic : le développement d'un premier épisode d'EH au cours de la cirrhose est un facteur de risque indépendant de mortalité avec un taux de survie à 1 an de 35% (11). L'étude de Cordoba et al (12) a montré que chez les patients atteints de cirrhose, la présence d'une EH qu'il y ait ou non une ACLF (Acute on Chronic Liver Failure) augmente significativement l'incidence de la mortalité. Il faut noter que même si l'EH est minime elle constitue également un facteur de risque de mortalité et requiert donc une prise en charge à part entière (13).

I.3. DIAGNOSTIC

Du fait des grandes variété et variabilité des manifestations, le diagnostic positif d'EH n'est pas toujours aisé et aucun signe ni examen complémentaire n'est pathognomonique. Il s'agit le plus souvent d'éliminer un diagnostic différentiel. Sur le plan clinique, un grand nombre de signes neurologiques et/ou neuropsychiatriques ont été décrits dans l'EH mais aucun n'est spécifique. Par exemple, une modification des réflexes ostéo-tendineux, un déficit sensitivo-moteur, un signe de Babinski, un syndrome frontal, pyramidal ou extra-pyramidal voire des convulsions partielles ou généralisées peuvent être présents et mimer un accident vasculaire cérébral ou un état de mort encéphalique (14) (15). L'astérixis souvent présent en cas d'EH n'est lui non plus pas spécifique et signe plutôt la présence d'une encéphalopathie métabolique puisqu'il est également décrit dans l'hypercapnie, l'hyperurémie ou certaines intoxications médicamenteuses.

La gravité de l'EH est évaluée le plus fréquemment au moyen d'un score simple, le score de West-Haven(1). Il comporte 5 classes mais est le plus souvent utilisé de façon binaire, score de 0-1 : pas d'EH clinique, score 2-4 : EH clinique de gravité croissante.

En réanimation, l'EH est souvent non évoquée, ou mal évaluée(16). Cela est principalement lié au fait que les réanimateurs ne connaissent pas les scores de gravité de l'EH qui sont propres aux hépatologues et déclinés en de multiples versions(1). De fait, les réanimateurs utilisent plus souvent des scores généralistes comme le Glasgow ou le FOUR score (**Annexe I**).

Les examens complémentaires permettent alors de rechercher un facteur déclenchant et d'éliminer un diagnostic différentiel. C'est pourquoi il faut par exemple systématiquement réaliser un bilan sanguin standard (NFS, ionogramme sanguin, urée, créatinine, CRP). L'intérêt du dosage de l'ammoniémie plasmatique a été longtemps débattu du fait de l'absence de corrélation entre l'hyperammoniémie et la sévérité de l'EH ; il reste toutefois recommandé par les sociétés savantes d'hépatologie (1). En effet, sa valeur ajoutée est surtout liée à sa forte valeur prédictive négative : une ammoniémie normale permet d'éliminer quasi formellement le diagnostic d'EH. Une hyperammoniémie devant un tableau d'encéphalopathie doit faire évoquer une EH, mais il existe des hyperammoniémies sans EH (17). Il faut cependant attirer l'attention sur trois points : tout d'abord sur les conditions de prélèvement qui doivent être scrupuleusement respectées (garrot pas trop serré, tube de sang immédiatement plongé et transporté dans la glace) puisque pouvant faussement élever le dosage ; ensuite sur le fait qu'une ammoniémie trop élevée (>250 micromol/l) doit fortement faire suspecter une anomalie génétique du cycle de l'urée ; enfin, sur le fait que la cirrhose en soi élève le taux d'ammoniémie sans que cela soit forcément lié à la présence d'une EH et qu'il n'existe pas de corrélation positive entre l'hyperammoniémie et la gravité de l'EH (18).

La réalisation d'un scanner cérébral permet dans de très rares cas de montrer des signes en faveur d'une EH (œdème cérébral voire signes d'hypertension intracranienne surtout en cas d'hépatite fulminante) mais surtout d'éliminer un diagnostic différentiel (saignement méningé ou intra-cérébral qui sont 2 à 5 fois plus fréquents en cas de cirrhose (19).)

L'IRM cérébrale a quant à elle un intérêt non négligeable et connaît ces dernières années de remarquables progrès. Tout d'abord, on peut retrouver dans de rares cas des signes d'œdème cérébral en séquence T2 ou FLAIR. En séquence T1, il existe en cas d'EH des hypersignaux des noyaux gris centraux liés à des dépôts de manganèse (20). Ces derniers ne sont pas synonymes d'EH et sont probablement plutôt en relation avec l'existence de shunts porto-caves. Le profil spectroscopique, réalisable avec une machine standard, permet d'étudier et quantifier le métabolisme dans des régions prédéfinies du cerveau ; la comparaison avec un profil normal a permis d'établir un profil d'EH : il s'agit de l'augmentation du pic glutamine/glutamate (pic qui reflète les neurotransmetteurs intra-cellulaires), la diminution du myo-inositol (sucre de la glie,

osmotiquement actif) et de la choline (en rapport avec le métabolisme membranaire) (21). Ce profil, et notamment l'augmentation du pic glutamine/glutamate, témoigne de la surcharge du cerveau en glutamine, donc d'un passage accru de l'ammoniaque. On doit considérer au même titre que l'hyperammoniémie qu'un profil spectroscopique normal doit faire absolument rechercher une autre cause que l'EH pour expliquer les troubles neurologiques chez un patient. Récemment, certaines études se sont intéressées à l'IRM multimodale avec tenseur de diffusion au cours de l'EH sur cirrhose. Le tenseur de diffusion est une représentation du mouvement des molécules d'eau et dépend de l'intégrité axonale et de la myéline. L'extraction de ces paramètres permet de calculer l'anisotropie fractionnelle (FA, intégrité microstructurelle de la substance blanche) et le coefficient de diffusion moyen (mouvements d'eau à travers les membranes cellulaires), dont la modification a surtout été évaluée dans des populations de traumatisés crâniens (22) ; il apparaîtrait qu'au cours de la cirrhose, la baisse de la FA pourrait être prédictive de l'apparition d'une EH après la pose d'un TIPS (23). Des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer ces données.

Enfin la réalisation d'un électroencéphalogramme (EEG) apporte également des arguments en faveur d'une EH ou plus largement en faveur d'une encéphalopathie métabolique : ralentissement du rythme et apparition d'ondes lentes triphasiques (24). L'EEG permet également d'éliminer une activité épileptique. Certaines méthodes d'analyses plus sophistiquées de l'EEG permettent d'évoquer une EH ; il s'agit notamment de l'analyse en dominante spectrale qui consiste à segmenter l'EEG en époques de différentes durées allant de quelques secondes à quelques dizaines de secondes ; chaque époque est ensuite représentée sous forme d'un graphique exprimant les représentations respectives de chaque fréquence au sein de chaque époque (25). Grâce à ce type d'analyse, S. Montagnese et al. a par exemple pu montrer que l'EEG combiné au score de MELD a une valeur pronostique sur la mortalité plus précise que chacun séparément (26).

Les tests neuropsychologiques ont surtout un intérêt dans le dépistage de l'EH minime. Il s'agit entre autres du PHES (Psychometric Hepatic Encephalopathy Sum-score) qui comporte une batterie de 5 tests (Number connection test A et B, Line Tracing Test, Digit Symbol Test, Serial Dotting test), validé dans plusieurs pays du monde et en cours de validation en français. Il permet d'évaluer le ralentissement psycho-moteur,

le déficit attentionnel et l'atteinte des fonctions exécutives. Cependant, les résultats dépendent notamment de l'âge et du niveau d'éducation ; par ailleurs, la réalisation du PHES est consommatrice de temps ce qui le rend difficilement utilisable dans la pratique quotidienne et nécessite donc souvent une consultation spécialisée. Des tests automatisés comme le CFF (Critical Flicker Frequency test) ont également été développés ; bien que certaines études aient pu montrer une corrélation avec les scores d'EH et avec le PHES (27), il reste critiqué pour sa faible sensibilité et spécificité et n'est pas validé en France. Le stroop test , notamment utilisable à l'aide d'une application mobile (EncephalApp) est utilisé notamment aux Etats-Unis et a été validé pour dépister l'EH minime et clinique (28) (29).

Ces tests sont en pratique très difficilement utilisables car chronophages. Ainsi, il apparaît utile d'avoir un test de dépistage des troubles neuro-cognitifs évocateurs d'EH, qui permettrait d'identifier chez quels patients il faut effectuer des tests neuropsychologiques pour avancer dans le diagnostic. Le test de dénomination des animaux (30) semble prometteur et son efficacité va être testée prochainement sur des cohortes françaises.

II- PHYSIOPATHOLOGIE DE L'EH

La physiopathologie de l'EH n'est pas univoque à ce jour mais plusieurs hypothèses sont proposées. L'accumulation cérébrale de différentes substances toxiques, dont l'ammoniaque, déversées dans la circulation sanguine systémique par défaut de détoxification hépatique semble primordiale à l'apparition des troubles neurologiques. L'inflammation, l'altération de la neurotransmission, des modifications du métabolisme cérébral ou encore les acides biliaires pourraient également jouer un rôle.

II.1. HYPERAMMONIEMIE ET EH

Parmi les différentes substances accumulées au cours de l'EH, l'ammoniaque semble avoir un rôle central dans l'apparition des anomalies neurologiques. En effet, au cours de la cirrhose il existe très souvent une hyperammoniémie, même en l'absence d'encéphalopathie. L'ammoniaque est normalement produit dans l'intestin à partir des composés azotés (acides aminés provenant de l'alimentation notamment) puis

transporté jusqu'au foie lié à la glutamine. Dans le foie, la glutamine est dégradée en glutamate et l'ammoniaque est libéré pour être dégradé *via* le cycle de l'urée.

En cas d'insuffisance hépatique, la détoxification de l'ammoniaque diminue. De plus, l'hypertension portale induit l'apparition de shunts porto-systémiques ce qui augmente le taux d'ammoniaque dans la circulation systémique non pris en charge par le foie.

En dehors du foie, seuls deux autres organes possèdent la glutamine synthétase, appareil enzymatique nécessaire pour métaboliser l'ammoniaque. Il s'agit du muscle squelettique et du cerveau. Il faut cependant noter que les patients atteints de cirrhose sont très souvent dénutris avec une amyotrophie caractérisée (31) diminuant les possibilités d'épuration de l'ammoniaque. Au niveau cérébral, l'ammoniaque franchit la barrière hémato-encéphalique (BHE) par diffusion passive pour être pris en charge par la cellule compétente qui est l'astrocyte. L'excès de glutamine conduit alors à un œdème astrocytaire du fait de son pouvoir osmotique et peut conduire rapidement à l'engagement cérébral, essentiellement en cas d'insuffisance hépatique aiguë. Au cours de la cirrhose, les modifications se font de façon plus progressive permettant la mise en place d'une régulation ; la cellule astrocytaire élimine du myo-inositol et de la taurine afin de garder le plus stable possible l'équilibre osmotique. Ce phénomène semble toutefois induire une modification morphologique des astrocytes qui présentent une augmentation du volume du cytoplasme, un élargissement du noyau qui devient multinucléé et un nucléole excentré, décrits sous le nom d'astrocytes de type II d'Alzheimer (32). Ainsi, l'augmentation du taux de glutamate intra-cérébral résultant du métabolisme de l'ammoniaque induit une majoration de son relargage synaptique. Ceci modifie alors la neurotransmission GABA-ergique et glutamatergique, ce qui contribue à l'apparition de signes neurologiques liés à l'EH (33). La toxicité directe de l'hyperammoniémie sur le tissu cérébral et la BHE a été évoquée par certaines études et pourrait être impliquée dans l'EH.

L'équipe de Cordoba et al. (34) a montré sur un modèle animal d'anastomose porto-cave avec hyperammoniémie renforcée par un régime spécial, que les cellules de Purkinje cérébelleuses de ces animaux étaient moins nombreuses et présentaient une morphologie modifiée par un processus dégénératif ainsi qu'une augmentation en taille et en nombre des astrocytes du fait d'une activation microgliale. Ces modifications histo-morphologiques étaient corrélées aux symptômes neurologiques ainsi qu'à

l'ammoniémie. De plus, l'activation microgliale due à l'hyperammoniémie pourrait également induire une neuroinflammation comme le montre l'étude de Rodrigo (35) faite sur des rats BDL (Bile Duct Ligation, cf supra) qui recevaient un régime hyperammoniémiant ; ces animaux présentaient une augmentation des marqueurs de l'inflammation et du stress oxydatif dans le tissu cérébral (IL1 β , iNOs et prostaglandine E2 plus élevées que chez les contrôles), associée à une altération des performances cognitives. Ces anomalies étaient réversibles sous anti-inflammatoire (ibuprofène). Par ailleurs, l'hyperammoniémie pourrait altérer le métabolisme énergétique intra-cérébral ; l'étude de Jalan et al. (36) faite sur des rats BDL recevant un régime hyperammoniémiant a montré que ces animaux présentaient une diminution des flux cérébraux de lactate entre les astrocytes et les neurones qui pourrait être due à une altération qualitative des hémiconnexines (jonctions GAP) ; ces anomalies étaient corrigées par la prise d'un traitement hypoammoniémiant (ornithine phénylacétate).

L'hyperammoniémie aurait aussi un rôle direct sur les récepteurs intra-cérébraux NMDA (N-méthyl D-aspartate), qui sont des récepteurs au glutamate (neurotransmetteur excitateur). Un grand nombre d'études a montré que l'ammoniaque active ces récepteurs par l'excès extra-cellulaire de glutamate et que ceci a plusieurs conséquences néfastes, expliquant en partie la toxicité cellulaire neuronale ainsi que les symptômes neurologiques (37) :

- L'activation des récepteurs NMDA conduit à la production de NO et de cGMP. Le NO produit dans les neurones pourrait alors diffuser vers les astrocytes et induire une diminution de l'activité enzymatique de la glutamine synthétase (38)
- L'activation des récepteurs NMDA serait directement corrélée à la mortalité comme le montrent certaines études faites sur modèles animaux (39)
- L'activation des récepteurs NMDA induirait un déséquilibre énergétique avec déplétion de l'ATP intra-cérébral et altération des fonctions mitochondriales (40).

Enfin, l'hyperammoniémie pourrait entraîner des anomalies de la BHE (chapitre IV).

II.2. INFLAMMATION ET EH

Le lien entre sepsis et EH est maintenant clairement établi en clinique puisque toute infection peut induire ou aggraver une EH chez un patient atteint de cirrhose (41). L'EH

peut d'ailleurs parfois être le seul symptôme d'une infection et c'est aussi pour cette raison que la recherche du facteur précipitant d'un épisode d'EH doit comporter un bilan infectieux exhaustif. De plus, les patients ayant une cirrhose présentent, même en l'absence de toute infection, un taux de cytokines inflammatoires circulantes plus élevé que des patients contrôles (42). Celles-ci seraient produites en excès par des cellules immunitaires circulantes qui présentent chez le patient atteint de cirrhose un phénotype anormalement activé : expression augmentée de CD11b par les polynucléaires neutrophiles, sur-expression de molécules de co-stimulation (CD80 et CD86) et de l'HLA-DR sur les cellules présentatrices d'antigènes. Il n'existe cependant encore que peu de données confirmant une différence formelle en terme d'inflammation entre les patients ayant une EH et ceux sans EH. Il pourrait donc s'agir d'un facteur nécessaire mais pas suffisant. L'inflammation pourrait ainsi précipiter l'apparition des troubles neurologiques par un effet synergique avec l'hyperammoniémie (43) (44). L'altération des fonctions supérieures chez des patients atteints de cirrhose ayant un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS) est nette alors que leurs capacités s'améliorent lorsque le SIRS disparaît. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer le lien entre EH et inflammation : (i) diminution de la transmission glutaminergique par effet direct des cytokines pro-inflammatoire sur les astrocytes (45) ; (ii) augmentation des substances benzodiazépine-like induites par les cytokines IL-1 β et TNF- α , modifiant l'équilibre osmotique des cellules cérébrales (46) ; (iii) diminution du flux sanguin cérébral en réponse aux cytokines comme le TNF- α (47) ; (iv) augmentation de la diffusion de l'ammoniaque sous l'effet des cytokines inflammatoires IL-6 et TNF- α (48) ; (v) augmentation de la perméabilité de la BHE (cf chapitre IV).

Enfin, de nombreux arguments expérimentaux récents suggèrent l'importance du microbiote et de la translocation bactérienne à partir du tube digestif dans l'augmentation de la production de médiateurs de l'inflammation chez le patient atteint de cirrhose (49).

II.3. AUTRES HYPOTHESES PHYSIOPATHOLOGIQUES

Plusieurs autres hypothèses physiopathologiques ont été proposées comme étant impliquées dans l'apparition de l'EH. Le déséquilibre dans le transport des acides aminés à travers la BHE est une des anomalies la plus anciennement décrite. Il existerait ainsi un passage augmenté d'acides aminés aromatiques, précurseurs de certains neurotransmetteurs, et un passage diminué d'acides aminés branchés. Ceci serait dû à une compétition au niveau des transporteurs exprimés au niveau de la BHE avec la glutamine intra-cérébrale (50).

Par ailleurs, la production anormale de substances benzodiazepine-like aurait pour conséquence une augmentation du tonus GABA inhibiteur ; en effet, il s'agit de substances identifiées dans le sérum, le liquide céphalo-rachidien et le cerveau de patients atteints d'EH. Ces composés, ressemblant aux benzodiazépines, comme les neurostéroïdes, ont été détectés à des concentrations élevées et seraient capables de diminuer le tonus GABA-ergique (51) (52). L'atteinte des voies dopaminergiques pourrait être responsable de syndromes parkinsoniens retrouvés dans certaines formes d'EH.

L'accumulation de mercaptans, de manganèse, ou des anomalies de la vasorégulation ont également été évoquées. Plusieurs études ont développé la théorie du cheval de Troie selon laquelle l'entrée de glutamine dans l'astrocyte induirait un flux de glutamine vers la mitochondrie astrocytaire ; la glutamine y serait alors hydrolysée, conduisant au relargage d'ammoniaque en intra-mitochondrial responsable d'un stress oxydatif via les espèces réactives de l'oxygène. Ce phénomène pourrait aussi être impliqué dans l'apparition du ballonnement astrocytaire (53).

La toxicité des acides biliaires, bien que reconnue dans l'ictère nucléaire du nouveau-né, reste débattue dans l'EH. Les mécanismes sont probablement complexes avec certains acides biliaires qui pourraient voir un rôle délétère alors que d'autres seraient protecteurs (54). Récemment, la présence de concentrations importantes d'aides biliaires dans le liquide céphalo-rachidien de patients avec EH a été récemment mise en évidence (55); le rôle direct de la toxicité de la bilirubine ou des acides biliaires doit donc très probablement être considéré.

Le rôle des médicaments doit toujours être évoqué, tant comme un diagnostic différentiel (encéphalopathie métabolique d'origine médicamenteuse) que comme facteur aggravant de l'EH. En effet, il a été montré que l'induction d'une

hyperammoniémie aiguë chez des rats pourrait induire une augmentation du niveau protéique et de l'activité de certains transporteurs ABC comme la P-gp ou MRP2 par activation de la voie NF- κ b (56). Ceci pourrait être à l'origine d'une modification du passage de médicaments à travers la BHE. L'étude de Weiss et al. a d'ailleurs retrouvé la présence de plusieurs substances médicamenteuses dans le liquide céphalo-rachidien de patients encéphalopathes en quantité anormalement élevée(55) puisqu'ils n'étaient pas administrés à posologie méningée.

Enfin, une étude métabolomique que nous avons effectuée dans le liquide céphalo-rachidien de patients atteints de cirrhose ayant une EH a montré la présence de 73 métabolites absents du LCR des contrôles (55) ; en particulier, une accumulation des composés acétylés dans le LCR suggère une dérégulation du cycle de Krebs ; une concentration importante d'acides aminés, d'acylcarnitines, d'acides biliaires et de nucléosides dans le LCR est également en faveur d'une modification de la perméabilité de la BHE dans l'EH.

III- TRAITEMENT DE L'EH

Il existe des traitements de l'EH clinique à la phase aiguë et en prophylaxie secondaire de la récurrence. Il n'existe pas à ce jour de traitement validé de l'EH minime. Les avancées récentes en matière de thérapeutique concernent essentiellement la prévention secondaire de l'EH et assez peu la prise en charge en aigu. Peu de molécules sont disponibles et leur efficacité sur la diminution des symptômes d'EH mais également sur la mortalité reste relative en fonction des études.

III.1. TRAITEMENTS VALIDES

Nous pouvons tout d'abord citer le lactulose, un disaccharide non absorbable qui est métabolisé par les bactéries de la flore digestive en acide acétique et acide lactique. Cette diminution du pH colique crée un environnement impropre aux bactéries uréasiques productrices d'ammoniaque et favorise ainsi la métabolisation de l'ammoniaque NH_3 en ions NH_4^+ non absorbables et ainsi éliminés par diminution du temps de transit colique. Bien que controversée, son efficacité a été montrée dans plusieurs études (57) (58), que ce soit dans le cas d'EH minime ou clinique, à la phase

aiguë ou en prévention des récurrences. Une méta-analyse récente de 31 essais contrôlés randomisés (59) a montré que l'utilisation des disaccharides non absorbables (lactulose ou son alternative le lactitol) permettait une réduction plus fréquente de l'EH clinique aiguë ou chronique mais était également associée à une diminution de la mortalité. Les disaccharides non absorbables restent ainsi le traitement curatif de première ligne de l'EH clinique, recommandé par les sociétés savantes d'hépatologie (1). A la phase aiguë, l'administration d'un autre laxatif, le polyéthylène glycol (PEG) a été récemment étudiée (4L en 4h par voie orale ou sonde naso-gastrique) et il apparaît que la résolution des épisodes d'EH serait plus précoce que sous lactulose (60). Cependant, certains auteurs lui opposent un risque d'inhalation, une étude faite sur un faible effectif de patients et une mesure de l'EH faite sur une courte période. Cette option thérapeutique n'est donc pas recommandée.

Ensuite, la rifaximine (RFX), un antibiotique non absorbable, fait partie intégrante de la prise en charge de l'EH. Semi-synthétique, à large spectre, son absorption systémique est estimée entre 1 et 3% chez les sujets sains (61) mais peu d'études ont évalué son absorption chez les patients atteints de cirrhose chez lesquels il existe une augmentation de la perméabilité intestinale du fait de l'hypertension portale (62). La RFX agit localement sur la flore microbienne intestinale en modulant son profil métabolique plutôt qu'en modifiant qualitativement le microbiote (63). Plusieurs études ont montré que l'administration de RFX entraînait une diminution significative du nombre d'épisodes d'EH, en association ou non au lactulose (64) (65) ainsi qu'une diminution significative du nombre et de la durée d'hospitalisation liées à l'EH. Il faut également noter une diminution du taux de mortalité ainsi qu'une amélioration de la qualité de vie observées chez les patients sous RFX (66). Les sociétés savantes recommandent donc, avec des arguments solides issus de la littérature, actuellement la RFX en prévention secondaire après au moins 2 épisodes d'EH dans les 6 mois, en association avec le lactulose (1); son utilisation dans l'EH aiguë, dans l'EH minime ou chez des patients atteints de cirrhose n'ayant jamais présenté d'épisode d'EH reste discutée. Sa tolérance est bonne, moins de 10 à 15 % des patients se plaignent d'effets indésirables (principalement nausées ou douleurs abdominales) et il n'a pas été rapporté d'interactions médicamenteuses ni d'émergence de résistances bactériennes. Des réserves avaient initialement été émises quant au risque de colites à *Clostridium difficile* mais plusieurs études semblent finalement écarter ce risque (67).

Ainsi, les recommandations actuelles préconisent le lactulose à la phase aiguë et en prévention secondaire de l'EH. La RFX lui sera associée après au moins 2 épisodes au cours des 6 derniers mois.

Cependant, ces traitements ont une efficacité relative car malgré eux, la récurrence d'épisodes d'EH survient chez près de 25 % des patients et ceci pour la plupart dans les 90 jours qui suivent l'introduction du traitement (64). Il est même parfois nécessaire de recourir à une transplantation hépatique en cas d'EH persistante ou récidivante ; à ce titre, 355 demandes d'inscriptions avec composante expert ont été faites en 2016 pour les motifs « ascite réfractaire » et « encéphalopathie chronique » (agence de la biomédecine). L'exploration de nouvelles pistes thérapeutiques apparaît donc essentielle.

III.2. AUTRES TRAITEMENTS

Par ailleurs, différents épurateurs de l'ammoniaque commercialisés et recommandés pour la prise en charge des anomalies du cycle de l'urée ont récemment été proposés dans le traitement de l'EH. Une étude a mis en évidence que l'administration de glycérol phénylbutyrate *per os* permettait de réduire significativement le nombre de récurrence d'EH par rapport au placebo chez des patients ne recevant pas de RFX (68). Concernant leur utilisation à la phase aiguë, il n'existe encore que peu de données. La plus large étude prospective, randomisée, contrôlée, en double aveugle a été menée en 1992 sur 74 patients atteints de cirrhose avec EH ou ayant un shunt porto-systémique qui recevaient en phase aiguë soit du benzoate de sodium soit du lactulose (69). Les critères principaux de jugement étaient la sévérité de l'EH selon l'échelle de West Haven, l'ammoniémie, les signes EEG et les fonctions cognitives (déterminées par le Number Connection Test). L'amélioration de l'ensemble des paramètres a été constatée dans les 2 groupes de traitement (80% sous benzoate de sodium, 81% sous lactulose), faisant conclure les auteurs que le benzoate de sodium pouvait être une alternative efficace au lactulose dans la prise en charge aiguë de l'EH. Dans une étude pilote récente sur un plus faible effectif (70), il a été montré que l'utilisation de phénylbutyrate de sodium (en association au lactulose et/ou à la RFX si prescrits avant l'hospitalisation) permettait de diminuer rapidement l'ammoniémie et était associée à une amélioration neurologique dans la prise en charge de l'EH à la phase aiguë ; le traitement permettait également une diminution de la mortalité en unité de soins

intensifs sans que cela ne soit retrouvé à 6 mois. Par ailleurs, le butyrate de sodium pourrait prévenir les altérations de la BHE sur des modèles animaux de traumatisme cérébral (71). Cependant, à ce jour, aucun de ces traitements n'est recommandé dans l'EH par les sociétés savantes.

D'autres traitements tels que les probiotiques, les acides aminés branchés, le L-ornithine-L-aspartate (LOLA) font également l'objet de plusieurs études mais ne sont pas utilisés dans la pratique courante.

En dernier recours, la présence d'une EH sévère spontanée et/ou récurrente résistante aux traitements proposés devra faire discuter l'indication d'une transplantation hépatique.

En parallèle, la recherche et le traitement d'un éventuel facteur déclenchant sont primordiaux et doivent être systématiques en cas d'EH. En effet, l'EH est parfois le seul symptôme du facteur précipitant ; les plus fréquents sont : les infections, le saignement digestif et les troubles hydro-électrolytiques. Il convient également de mentionner les médicaments (diurétiques, antalgiques, antibiotiques, benzodiazépines...) qui peuvent être à l'origine de signes neurologiques pouvant être une EH mais aussi une encéphalopathie médicamenteuse.

IV. BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE

Des altérations de la BHE comme une modification de sa perméabilité ou de l'expression de certains transporteurs pourraient également être impliqués dans l'EH, mais cela n'a jamais été prouvé. Nous allons dans cette partie décrire ce qu'est la BHE, et dans quelles circonstances celle-ci peut être altérée, en prêtant une attention particulière aux conditions fréquemment rencontrées chez les patients atteints de cirrhose, comme l'hyperammoniémie et l'infection.

IV.1. DEFINITION ET SPECIFICITES

La BHE est localisée anatomiquement à l'interface entre le sang et le tissu cérébral et contrôle les échanges entre le sang et le système nerveux central (**Figure 1**). Elle est formée par les cellules endothéliales cérébrales qui sont caractérisées par la présence de jonctions intercellulaires et l'expression polarisée de différents systèmes de

transport. Différents types cellulaires participent à l'architecture de la BHE : les cellules endothéliales reposant sur une lame basale, les péricytes, les astrocytes et les neurones. Les cellules endothéliales des capillaires et des microvaisseaux cérébraux se distinguent des cellules endothéliales périphériques par différentes caractéristiques :

- l'absence de fenestrations du fait de la présence de jonctions serrées intercellulaires
- une faible transcytose non spécifique (pinocytose)
- une très faible diffusion paracellulaire des composés hydrophiles
- un grand nombre de mitochondries associées à une activité métabolique importante
- l'expression polarisée de récepteurs et transporteurs membranaires responsables du transport actif des nutriments du sang vers le cerveau ou l'efflux de substances toxiques du cerveau vers le compartiment vasculaire.

Ces cellules endothéliales reposent sur une lame basale qu'elles produisent en association avec les astrocytes. Les prolongements cellulaires des astrocytes (ou pieds astrocytaires) forment un manchon entourant les microvaisseaux cérébraux. L'endothélium microvasculaire cérébral présente également, comme les autres endothelia, des jonctions adhérentes formées par l'interaction homophile de molécules d'adhérence sensibles aux ions Ca^{2+} (VE-cadhérine, Vascular Endothelial Cadherin) et des glycoprotéines transmembranaires reliées au cytosquelette d'actine par le complexe des caténines. Les jonctions serrées intercellulaires le distinguent des autres endothelia et sont responsables de la très faible perméabilité de la BHE vis-à-vis des protéines ou des nutriments plasmatiques. Ces jonctions font intervenir trois types de molécules membranaires, l'occludine, les claudines (claudine 3, 5 et 12 au niveau cérébral) et les Junction Associated Molecules (JAM) qui interagissent de manière homo- ou hétérophile. De plus, les protéines cytoplasmiques accessoires comme les zonula occludens (ZO-1, 2, 3) et la cinguline relient les protéines membranaires au cytosquelette d'actine et participent ainsi au maintien de l'intégrité structurale et fonctionnelle de la BHE.

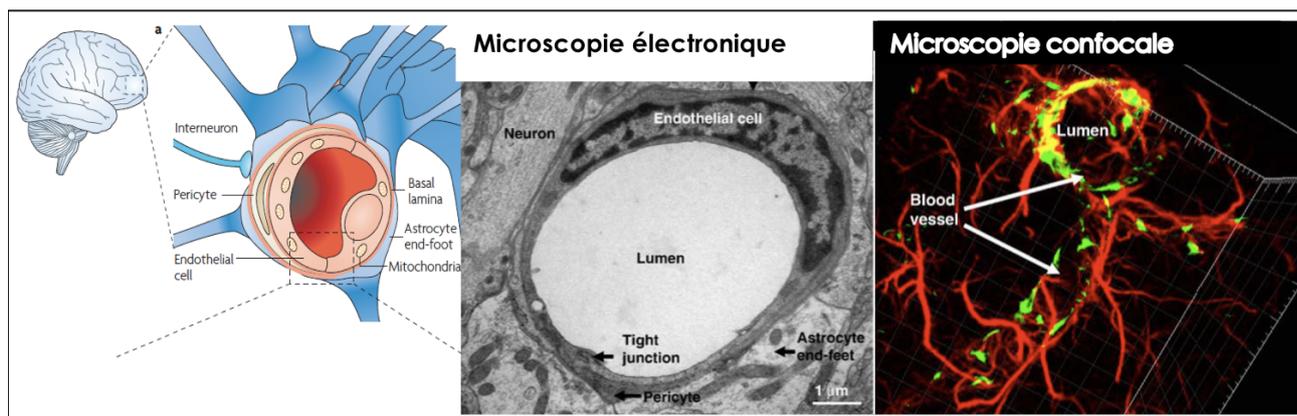


Figure 1 Barrière hémato-encéphalique (BHE)

Inspirée de (72-74)

Gauche : dessin de la BHE ; bleu : pieds astrocytaires et interneurones ; jaune : péricytes ; saumon : cellules endothéliales ; rouge : lumière du vaisseau. Milieu ; BHE observée en microscopie électronique. Droite : BHE observée en microscopie confocale

Plusieurs paramètres interviennent dans le transport au travers de la BHE (75) :

- (i) liposolubilité et taille : les molécules lipophiles de petite taille peuvent diffuser de façon passive vers le compartiment cérébral par voie transcellulaire, traversant ainsi la bicouche lipidique de la membrane plasmique de la cellule endothéliale. Ce phénomène est cependant limité par la présence de pompes d'efflux, qui refoulent certaines de ces molécules lipophiles vers le compartiment sanguin.
- (ii) Transporteurs : Il existe également un transport transcellulaire actif grâce à une grande variété de transporteurs qui permettent un transport spécifique et une biodisponibilité cérébrale de nutriments et ions essentiels (76).
- (iii) Charge : ce paramètre intervient essentiellement dans le transport facilité des acides aminés à travers la BHE, en fonction de la charge neutre ou basique de leur chaîne.
- (iv) Rôle du flux sanguin ou *shear-stress* : la force tangentielle générée par le flux sanguin sur l'endothélium cérébral pourrait influencer la synthèse des molécules de jonctions serrées ainsi que de nombreux transporteurs membranaires (77).

Par ailleurs, le maintien d'une perméabilité normale aux solutés au niveau de la BHE dépendrait également de modifications post-traductionnelles via une phosphorylation/déphosphorylation des protéines de jonctions serrées. Ainsi, la phosphorylation sur tyrosine des protéines ZO-1 ou VE-cadhérine est associée à une

augmentation de la perméabilité de la BHE ; cette phosphorylation peut être induite par le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) qui est un facteur angiogénique (78). Dans des conditions expérimentales, le VEGF induit une fuite de Blue Evans ou de FITC (isothiocyanate de fluorescéine) à travers la BHE traduisant une augmentation de perméabilité (79),(80). Des agents vasoactifs comme l'histamine ou la bradykinine peuvent augmenter la perméabilité vasculaire aux solutés en reconnaissant des récepteurs spécifiques à la surface des cellules endothéliales cérébrales ; cette liaison ligand-récepteur modifie le contenu cellulaire en calcium, phosphoryle des protéines jonctionnelles (ZO-1), modifiant alors la perméabilité aux solutés de la BHE (81),(82). Enfin, le rôle des médiateurs de l'inflammation est net dans l'altération de la perméabilité de la BHE ; ceci a été suggéré dans l'encéphalopathie septique (83) ou lors de maladies inflammatoires du système nerveux central (comme la sclérose en plaques) au cours desquelles l'afflux de cytokines pro-inflammatoires (IL6, IL1 β , TNF- α) module l'activité des astrocytes et modifie la perméabilité de la BHE par leur interaction avec les cellules endothéliales (qui possèdent des récepteurs aux cytokines)(84).

IV.2. HYPERAMMONIEMIE ET BHE

Le rôle de l'hyperammoniémie sur la perméabilité de la BHE et sur les jonctions serrées est encore débattu ; les résultats disparates peuvent entre autres s'expliquer par la diversité des modèles *in vitro* ou *in vivo*, des molécules choisies et des techniques d'expérimentation. Par exemple, un grand nombre d'études sont faites sur des modèles d'hépatite aiguë ou fulminante, peu portent sur des modèles d'hépatopathie chronique. Plusieurs études récentes semblent cependant conclure qu'il existerait dans l'EH, en plus de l'œdème cytotoxique, un œdème vasogénique due à des modifications fines de la BHE. Les jonctions serrées pourraient notamment être altérées par la métalloprotéinase-9 (MMP9). Nguyen et al. a montré par exemple dans un modèle d'hépatite fulminante sur souris qu'il existait une extravasation intracérébrale du marqueur Blue Evans associée à une augmentation de l'activité de MMP9 et réversible après administration d'un inhibiteur de MMP9 (85). L'équipe de Chen et al. a obtenu des résultats allant dans ce sens en montrant que l'augmentation de la perméabilité de la BHE à des marqueurs FITC est liée à l'augmentation de MMP9 et que cette dernière induit une dégradation significative de l'occludine et de la claudine

5 (86). L'hypothèse est donc que l'ammoniémie pourrait, *via* le stress oxydatif, activer la production des métalloprotéinases par les cellules endothéliales de la BHE et contribuer ainsi à la modification de perméabilité par altération des jonctions serrées. C'est ce qu'a montré l'étude de Skowronska (87) réalisée *in vitro* sur un modèle cellulaire de BHE (RBE-4, cellules endothéliales cérébrales de rat) dont le milieu de culture était enrichi en ammoniac. Les résultats de Bélanger et al (88) sont également concordants puisque la culture de cellules endothéliales murines (TM-BBB) avec enrichissement en ammoniac induit une augmentation de la perméabilité paracellulaire par diminution de la claudine 12.

Cependant, en clinique, même si l'hyperammoniémie semble constante en cas d'EH, les taux ne sont qu'imparfaitement corrélés à la sévérité de l'encéphalopathie, ce qui suggère que d'autres mécanismes physiopathologiques interviennent.

IV.3. INFLAMMATION, RÔLE DANS L'EH ET ACTION SUR LA BHE

L'étude de l'implication de l'inflammation dans l'EH peut également être faite par analogie avec l'encéphalopathie septique. De fait, les cellules endothéliales cérébrales sont sensibles à de nombreux stimuli inflammatoires. En effet, elles expriment par exemple des récepteurs au LPS (comme le TLR4 (89)) ainsi que des récepteurs aux cytokines dont l'activation induit la production de facteurs de transcription (NF- κ B ou AP1). Ces voies de signalisation peuvent ensuite agir directement sur la perméabilité de la BHE en induisant la redistribution de certaines protéines des jonctions serrées (90) ainsi que la sécrétion de molécules d'adhésion et de chémokines permettant de recruter des cellules inflammatoires. Chastre et al. (91) ont montré que l'injection de LPS précipitait l'apparition d'une EH dans des modèles murins d'insuffisance hépatique aiguë. Par ailleurs, l'étude post-mortem de cerveaux de patients décédés de choc septique a suggéré une dérégulation du flux sanguin cérébral ainsi qu'une altération de la perméabilité de la BHE ; ceci pourrait être associé à l'expression de iNOS dans l'endothélium cérébral et à l'augmentation du taux de cytokines plasmatiques pro-inflammatoires (92) (93).

OBJECTIFS

Les objectifs de ce travail de thèse étaient : (1) de valider un score simple d'évaluation de l'EH à l'usage des réanimateurs ; (2) d'étudier la présence éventuelle d'une augmentation de perméabilité de la BHE chez des patients atteints de cirrhose présentant une EH et hospitalisés en unité de soins intensifs au moyen d'une mesure de la gravité spécifique du LCR en tomodensitométrie (TDM) ; (3) de déterminer les parts respectives de l'hyperammoniémie, de l'inflammation et d'un éventuel déficit énergétique dans la survenue d'une EH, au moyen de différents modèles animaux de cirrhose, et (4) d'étudier la prévention des anomalies par des médicaments ciblant ces 2 facteurs (benzoate de sodium et RFX) et la potentielle efficacité de la biotine, traitement actuellement en développement dans la sclérose en plaques permettant de restaurer les anomalies du métabolisme énergétique.

Cette thèse a ainsi fait l'objet de la publication de 2 articles, un 3^{ème} est en cours de finalisation et de dépôt de brevet. Le 1^{er} article s'est attaché à la difficulté du diagnostic de l'EH en clinique, et en particulier chez les patients de réanimation. Le 2^{ème} et le 3^{ème} explorent la physiopathologie de l'EH afin de proposer de nouvelles pistes thérapeutiques et ce en particulier pour l'article en cours qui portera, entre autres, sur les résultats de l'utilisation de la biotine dans l'EH sur des modèles animaux. Le traitement de l'EH par la biotine sera d'ailleurs précisé au cours d'un essai de phase II et a fait l'objet d'un dépôt de brevet. Enfin, une revue traitant de l'EH en réanimation ainsi qu'une mise au point sur la RFX ont été publiées (**Annexe 2**).

I- ARTICLE 1 : *FOUR score: a reliable score for assessing overt hepatic encephalopathy in cirrhotic patients.*

L'objectif de ce travail était de valider un score généraliste de réanimation, le FOUR score, en cas d'EH, afin que celui-ci soit utilisé en réanimation. Du fait des écueils du score de Glasgow récemment décrits (94) (absence d'évaluation de la poursuite oculaire et du tronc cérébral) , le FOUR score a été étudié. Ce travail est résumé ci-dessous.

FOUR score: a reliable score for assessing overt hepatic encephalopathy in cirrhotic patients. S. Mouri, S. Tripon, M. Rudler, M. Mallet, J. Mayaux, D. Thabut, N. Weiss. **Neurocrit Care.** 2015 Apr;22(2):251-7.

L'EH au cours de la cirrhose est un facteur de risque de mortalité indépendant de la maladie hépatique. Ainsi, son diagnostic et sa prise en charge sont essentiels. Cependant, du fait de la multitude et de l'absence de spécificité des signes cliniques, le diagnostic de l'EH même clinique est compliqué. Il l'est d'autant plus lorsque les patients sont dans le coma, rendant la symptomatologie frustrante. Les échelles habituellement utilisées par les hépato-gastro-entérologues dans l'EH telles que le score de West Haven ou le HESA évaluent mal les troubles de conscience importants et sont mal connues des réanimateurs. Ces derniers utilisent majoritairement l'échelle de Glasgow, même si elle n'a pas été clairement validée dans l'EH. Pourtant, le score de Glasgow présente certains écueils tels que l'absence d'évaluation des fonctions du tronc cérébral ou de la poursuite oculaire. Le FOUR score, une nouvelle échelle d'évaluation du coma validée dans plusieurs pays dont la France a été proposée, notamment dans des populations de traumatisés cérébraux. Les quatre items pris en compte sont les réponses oculaires, motrice, les réflexes du tronc cérébral et la fonction respiratoire des patients. Il a l'avantage de ne pas dépendre de la réponse verbale.

L'objectif de ce travail a donc été d'évaluer l'utilisation du FOUR score dans l'EH clinique ainsi que sa capacité à prédire le devenir de ces patients.

Pour ce faire nous avons inclus tous les patients atteints de cirrhose admis à l'hôpital de la Pitié Salpêtrière en unités de soins intensifs hépatologique, neurologique et généraux entre juin 2012 et mars 2014. L'évaluation du score de West Haven était faite par un médecin hépatologue sénior dans les 24 heures suivant l'admission du patient et celle du Glasgow et du FOUR score par un médecin neurologue senior en aveugle.

Les données de 94 patients ont pu être étudiées. Elles ont permis de montrer que le FOUR score et le Glasgow permettaient de discriminer les patients présentant une EH clinique de ceux n'en ayant pas. De plus, le FOUR score était statistiquement différent entre les différents groupes du score de West Haven 0-1 et 2-3 ($p < 0,0001$) mais aussi entre les stades 2-3 et 4 ($p < 0,0001$). Enfin, un FOUR score < 16 permettait de prédire de façon significative ($p = 0,008$) une diminution de la survie à 2 ans.

Cette étude a donc permis de montrer que le FOUR score pouvait être utilisé pour le diagnostic de l'EH clinique chez les patients atteints de cirrhose, en particulier par les médecins réanimateurs non hépatologues moins familiers avec l'échelle de West Haven. Son avantage principal par rapport au score de Glasgow est la meilleure classification des patients dans le coma grâce à l'évaluation des fonctions respiratoires et oculaires sans prise en compte de la réponse verbale.

FOUR Score, a Reliable Score for Assessing Overt Hepatic Encephalopathy in Cirrhotic Patients

Sarah Mouri · Simona Tripon · Marika Rudler · Maxime Mallet · Julien Mayaux · Dominique Thabut · Nicolas Weiss

Published online: 21 October 2014
 © Springer Science+Business Media New York 2014

Abstract

Background Hepatic encephalopathy (HE) is a frequent complication of cirrhosis and a major public health problem. The incidence is increasing because of improved cirrhosis prognosis. The most widely used scale used to evaluate HE is the West-Haven (WH) scale, with scores ranging from 0 to 4. This scale is easy to use but not suitable for patients with altered consciousness and is not well known by physicians other than hepatologists who manage these conditions. For deep coma, the validated Glasgow Coma Scale (GCS) has been proposed. A new scale for comatose patients, the Full Outline of UnResponsiveness (FOUR) score, has recently been proposed and widely validated. The scale covers eye and motor responses, brainstem reflexes and breathing patterns and is the most validated coma scale.

Objective To assess the diagnostic value of the FOUR score for detecting overt HE (OHE) in cirrhotic patients.

Methods We prospectively included all patients admitted for cirrhosis at La Pitié-Salpêtrière Hospital from June 2012 to March 2014. Neurological status was assessed by a senior neurologic intensive care physician in the 24 first hours of ICU admission. The recently described and validated French version of the FOUR score was used.

Results We screened 100 cirrhotic patients and included 94 (70 males [75 %], mean age 57 ± 11 years); 29 (31 %) with OHE (WH grades 2–4) and 65 (69 %) with No-OHE (WH grades 0–1). Mean FOUR and GCS scores were lower for OHE than No-OHE patients ($p < 0.0001$). The FOUR score could distinguish between WH grades 0–1, 2–3 and 4 ($p < 0.0001$). Furthermore, it could accurately detect and quantify OHE with an area under the c-index of 0.88 ± 0.10 . The FOUR score was associated with outcome.

For the Brain-Liver Pitié-Salpêtrière Study Group (BLIPS).

S. Mouri · S. Tripon · M. Rudler · M. Mallet · D. Thabut · N. Weiss
 Brain-Liver Pitié-Salpêtrière Study Group (BLIPS), Paris, France

S. Mouri · S. Tripon · M. Rudler · M. Mallet · D. Thabut
 Soins Intensifs d'Hépatologie, Service d'Hépatogastroentérologie, Hôpital de la Pitié Salpêtrière, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France

J. Mayaux
 Réanimation médicale, Service de Pneumologie, Hôpital de la Pitié Salpêtrière, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France

D. Thabut
 INSERM & Université Pierre et Marie Curie - Univ Paris 06, UMR_S 938, Centre de Recherche Saint-Antoine, Paris, France

N. Weiss
 Institut de Neurosciences Translationnelles de Paris, Institut Hospitalo-Universitaire-A-Institut du Cerveau et de la Moelle (IHU-A-ICM), Paris, France

N. Weiss (✉)
 Unité de réanimation neurologique, Fédération de Neurologie 1, Pôle des maladies du système nerveux, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière Charles Foix, 47-83, boulevard de l'hôpital, 75013 Paris Cedex 13, France
 e-mail: nicolas.weiss@psl.aphp.fr

Conclusion The FOUR score can be used to detect and quantify HE in cirrhotic patients, especially by non-hepatologists who are not familiar with the WH scale.

Keywords Hepatic encephalopathy · Cirrhosis · Coma · FOUR score · Glasgow coma scale

Introduction

Hepatic encephalopathy (HE) is a frequent complication of cirrhosis and a major public health problem. Its incidence is increasing because of the improved prognosis of cirrhotic patients related to better prophylaxis and management of complications and because of the widespread use of transjugular porto-systemic shunts. HE that is clinically obvious is termed overt HE (OHE). OHE is associated with altered consciousness proceeding from stupor to profound coma.

The most widely used scale to rapidly assess OHE at the bedside is the West-Haven (WH) scale, with scores ranging from 2 to 4 for such patients [1]. The WH is recommended by the Working Party on HE for assessing OHE in clinical trials [1]. Used by all hepatologists, this scale is easy to use but not well known by other specialists and intensive care physicians who care for these patients; moreover, the scale may be not suitable for patients with altered consciousness. Other scores, such as the HE scoring algorithm (HESA) and Changes in Health, End-stage disease and Signs and Symptoms (CHESS) scale [1], may be useful for assessing low-grade HE but cumbersome and frequently unknown by physicians. No specific HE questionnaires exist for deep coma, in which patients are not verbally responsive, but the validated Glasgow Coma Scale (GCS) has been proposed. Although the GCS has not been rigorously evaluated in patients with HE, its widespread use with structural and metabolic brain disorders has justified its use for acute and chronic liver disease in patients with WH grades 3 and 4 [1–3]. The GCS is a more general scale and is well known by all intensive care physicians.

However, the GCS does not assess brainstem reflexes or visual pursuit and requires verbal assessment for patients in intensive care units (ICUs). Furthermore, breathing patterns are not assessed. A new coma scale, the Full Outline of UnResponsiveness (FOUR) score, has recently been proposed. This scale covers eye and motor responses, brainstem reflexes, and breathing patterns. Presently, the FOUR score is the most validated coma scale and it has been validated in several countries [4, 5], including France, where we published a translation of the scale [5].

The aim of this prospective study was to [1] assess the value of the FOUR score for diagnosing OHE in cirrhotic patients and [2] determine its ability to predict outcome.

We also assessed the value of the GCS for diagnosing OHE.

Patients and Methods

Patients

We prospectively evaluated all patients admitted for cirrhosis in the hepatological, neurological, and general ICUs at La Pitié-Salpêtrière Hospital from June 2012 to March 2014. Patients with previous neurological impairment or limitation of intensive/resuscitative measures were excluded. Cirrhosis was diagnosed on the basis of clinical, biological, and anatomopathological features. The following data were collected at admission: demographic data (age, gender), natural history of cirrhosis (etiology, the presence of ascites, previous episodes of bleeding, previous episodes of HE, hepatocellular carcinoma), and the presence of asterixis. The severity of cirrhosis was evaluated by the Child-Pugh and Model for End-Stage Liver Disease (MELD) scores [6]. The presence of OHE was assessed by a senior hepatologist who used the WH in the 24 first hours of ICU admission. Patients were considered to have OHE with WH grades 2–4. Patients with WH grades 0–1 were classified as No-OHE. Leukocyte and platelet count, partial thromboplastin time (PTT), international normalized ratio (INR), V factor, and levels of liver enzymes, bilirubin, creatinine, sodium, albumin, and C-reactive protein (CRP) were collected at admission in the ICU.

Neurological Assessment

Neurological status was assessed with GCS and FOUR scores in the 24 first hours of ICU admission by a senior neurologic intensive care physician (NW) who was blinded to WH assessment. The FOUR score consists of four response components (eye and motor responses, brainstem reflexes, and respiration); each with a maximal score of four [4]. The scores for each component are summed for a total score. We used the recently described and validated French version of the FOUR score [5]. In mechanically ventilated patients, the verbal response was scored 1 on the GCS. Cough reflex was evaluated only when both pupillary and corneal reflexes were absent, as recommended [4].

Endpoints

The primary endpoint was performance of the FOUR score for diagnosis of OHE. Secondary endpoints were performance of the GCS for diagnosis of OHE and prognostic value of the FOUR score for survival.

Table 1 Baseline characteristics of patients

	Total population <i>n</i> = 94	No-OHE <i>n</i> = 65	OHE <i>n</i> = 29	<i>p</i> value
Age (years)	57 ± 11	56 ± 11	58 ± 10	0.3079
Male gender (%)	70 (75 %)	47 (72 %)	23 (79 %)	0.8220
Etiology of cirrhosis				0.8057
Viral	24 (26 %)	17 (26 %)	7 (24 %)	
Alcohol consumption	55 (59 %)	37 (57 %)	18 (62 %)	
Other	4 (4 %)	3 (5 %)	1 (3 %)	
Ascites	59 (63 %)	41 (63 %)	18 (62 %)	0.7077
Previous gastrointestinal bleeding	41 (44 %)	30 (46 %)	11 (38 %)	0.3443
Previous hepatic encephalopathy	16 (17 %)	9 (14 %)	7 (24 %)	0.2821
Hepatocellular carcinoma	13 (14 %)	12 (18 %)	1 (3 %)	0.0250
Asterixis	37 (39 %)	16 (25 %)	21 (72 %)	< 0.0001
PTT (%)	49 ± 19	51 ± 20	46 ± 17	0.2937
INR	1.9 ± 0.7	1.9 ± 0.7	1.9 ± 0.7	0.9020
V factor (%)	58 ± 26	61 ± 27	52 ± 22	0.1577
Leukocyte count (/mm ³)	10036 ± 7142	10318 ± 8255	9547 ± 4748	0.6837
Hemoglobin level (g/dL)	12 ± 18	14 ± 22	10 ± 2	0.4535
Platelet count (/mm ³)	92132 ± 57996	96432 ± 60214	84652 ± 54400	0.4421
Creatinine level (μmol/L)	96 ± 84	83 ± 67	128 ± 110	0.0218
Albumin level (g/L)	28 ± 6	28 ± 6	29 ± 5	0.5163
Bilirubin level (mmol/L)	120 ± 137	119 ± 139	122 ± 133	0.9281
AST level (U/L)	124 ± 177	98 ± 75	188 ± 299	0.0324
ALT level (U/L)	72 ± 106	55 ± 49	112 ± 175	0.0230
Sodium level (mmol/L)	137 ± 5	136 ± 6	137 ± 5	0.6412
CRP level (mg/l)	24 ± 24	21 ± 18	30 ± 30	0.1812
Child-Pugh score				0.6754
A	14 (15 %)	11 (17 %)	3 (12)	
B	22 (23 %)	15 (24 %)	6 (19 %)	
C	58 (62 %)	39 (59 %)	20 (69 %)	
MELD score	20 ± 8	19 ± 8	22 ± 9	0.0922

p-values under 0.05 appear in bold characters

Data are mean ± SD or number (%)

ALT alanine aminotransferase, AST aspartate aminotransferase, CRP C-reactive protein, HE hepatic encephalopathy, INR international standardized ratio, MELD Model for End-Stage Liver Disease, No-OHE no overt hepatic encephalopathy, OHE overt hepatic encephalopathy, PTT prothrombin time

Statistical Analysis

Continuous variables are expressed as mean ± standard deviation. Categorical variables are expressed as frequencies and percentages. χ^2 or Fisher exact test was used to compare categorical variables and ANOVA for continuous variables, with Tukey range test for correction. The area under the c-index was used to compare the diagnostic value of the FOUR and GCS scores. Survival was estimated by the Kaplan–Meier estimator. Survival curves were compared by log-rank test. Factors associated with survival were examined by Cox proportional hazard ratio (HR) multivariate analysis including the MELD score, previous episodes of HE, the presence of ascites, and FOUR score < 16. $p < 0.05$ (2-sided) was considered statistically significant. Analysis involved use of JMP v9.0 (SAS Inst., Cary, NC).

Results

Patient Characteristics

From June 2012 to March 2014, we included 100 cirrhotic patients. One patient was excluded because of previous neurological impairment, 3 for limitation of intensive/resuscitative measures and 2 for missing data; thus we analyzed data for 94 patients (70 males [75 %]; mean age 57 ± 11 years; Table 1). The etiology of cirrhosis was alcohol consumption for 55 (59 %), viral for 24 (26 %), and other causes for 4 (4 %). A total of 58 patients (62 %) had the most severe Child-Pugh score for cirrhosis, C, and the mean MELD score was 20 ± 8. In total; 13 patients (14 %) had hepatocellular carcinoma. Overall, 65 patients (69 %) had No-OHE (WH grades 0–1) and 29 (31 %) had OHE (WH grades 2–4).

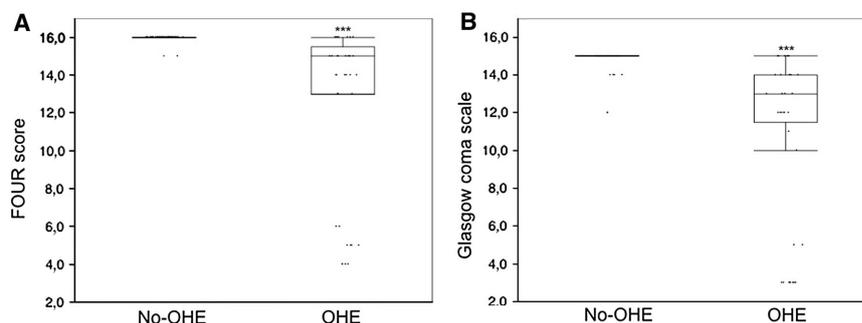


Fig. 1 Box plots for FOUR and Glasgow coma scale (GCS) scores by hepatic encephalopathy (HE) status, overt HE (OHE) and No-OHE. Data are median (horizontal line), range (outer box edges), and SE (whiskers). *** $p < 0.001$ compared with No-OHE

Table 2 FOUR score and Glasgow coma scale according to HE status

HE status	No-OHE		OHE		<i>p</i>
	Mean \pm SD	Median [IQR]	Mean \pm SD	Median [IQR]	
GCS	14.9 \pm 0.3	15 [15-15]	11.6 \pm 0.4	13 [11-14]	<0.0001
Motor response	6.0 \pm 0.1	6 [6-6]	4.7 \pm 0.2	5 [5-6]	<0.0001
Verbal response	4.9 \pm 0.1	5 [5-5]	3.8 \pm 0.2	4 [4-5]	<0.0001
Eyes response	4.0 \pm 0.1	4 [4-4]	3.0 \pm 0.1	4 [3-4]	<0.0001
FOUR score	16.0 \pm 0.3	16 [16-16]	13.1 \pm 0.4	15 [13-15]	<0.0001
Eyes response	4.0 \pm 0.1	4 [4-4]	2.8 \pm 0.2	4 [2-4]	<0.0001
Motor response	4.0 \pm 0.1	4 [4-4]	2.9 \pm 0.1	3 [3-4]	<0.0001
Respiration	4.0 \pm 0.1	4 [4-4]	3.4 \pm 0.1	4 [4-4]	0.0002
Brainstem response	4.0 \pm 0.0	4 [4-4]	4.0 \pm 0.0	4 [4-4]	0.1352

p-values under 0.05 appear in bold characters

GCS Glasgow coma scale, HE hepatic encephalopathy, IQR interquartile range, No-OHE no overt hepatic encephalopathy, OHE overt hepatic encephalopathy, SD standard deviation

FOUR and GCS Scores for Patients with OHE

The mean FOUR and GCS scores were lower for OHE than No-OHE patients (13.1 \pm 0.4 vs 16.0 \pm 0.3, $p < 0.0001$; and 11.6 \pm 0.4 vs 14.9 \pm 0.3, $p < 0.0001$, respectively) (Fig. 1). Except for brainstem response, the mean scores for all 4 FOUR and for 3 GCS score responses were lower for OHE than No-OHE patients (Table 2).

FOUR and GCS Scores Can Discriminate Between WH Grades

The FOUR scores differed by WH grades ($p < 0.0001$, Fig. 2a). Thus, the FOUR score was able to discriminate between WH 0–1 and WH 2–3 ($p < 0.0001$), between WH 2–3 and WH 4 ($p < 0.0001$) and between WH 0–1 and WH 4 ($p < 0.0001$). Similar results were found for the GCS score ($p < 0.0001$, Fig. 2b). However, neither GCS

nor FOUR was able to discriminate between WH0 and WH1 (data not shown).

The FOUR Score Shows Good Performance for the Diagnosis of OHE

The FOUR score was 16 for all but one of the 65 No-OHE patients (98.5 %) as compared with only 7 of 29 OHE patients (24.1 %). Details for patients with scores < 16 are in Table 3. The c-index for the FOUR score predicting OHE was 0.88 \pm 0.10 and was comparable to that for GCS (0.88 \pm 0.13).

FOUR Score < 16 Predicts Death

Kaplan–Meier analysis of survival by the FOUR score is in Fig. 3. The survival was lower for patients with a FOUR score < 16 than ≥ 16 ($p = 0.008$). The outcome by HE status is in Table 4. On Cox proportional analysis, death

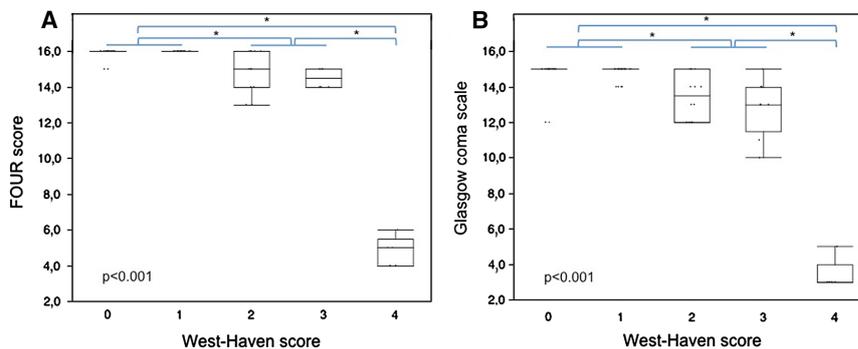


Fig. 2 FOUR and GCS scores by West-Haven scores. Data are median (horizontal line), range (outer box edges), and SE (whiskers). * $p < 0.01$ compared with No-OHE

Table 3 Details of FOUR score response components, GCS, and WH scores and outcome for 23 patients with FOUR score < 16

Patient no.	Age, years	FOUR score					GCS score	WH score	Outcome
		Total score	Eye response	Motor response	Respiration	Brainstem response			
1	61	15	4	3	4	4	13	2	Dead
2	69	15	4	3	4	4	13	2	LT
3	55	15	4	3	4	4	15	2	Dead
4	57	15	4	3	4	4	14	3	Dead
5	60	15	3	4	4	4	15	3	LT
6	53	15	4	3	4	4	12	3	Alive
7	44	15	4	3	4	4	12	0	Dead
8	53	15	4	3	4	4	14	3	Dead
9	64	15	4	3	4	4	12	2	Alive
10	72	14	2	4	4	4	13	2	Alive
11	50	14	3	3	4	4	13	2	LT
12	63	14	4	3	3	4	14	3	Dead
13	80	14	3	3	4	4	10	3	Dead
14	56	14	3	3	4	4	14	3	Dead
15	54	14	2	4	4	4	14	3	Dead
16	44	13	2	3	4	4	13	2	Alive
17	55	13	2	3	4	4	13	2	Dead
18	51	13	2	3	4	4	12	2	Alive
19	63	6	0	2	1	3	3	4	Dead
20	56	5	0	0	1	4	3	4	Dead
21	70	5	0	0	1	4	3	4	Dead
22	69	4	0	0	0	4	3	4	Dead
23	73	4	0	0	0	4	3	4	Alive

GCS Glasgow coma scale, LT liver transplantation, WH West-Haven score

was associated with the presence of ascites (HR = 2.98, 95 % confidence interval [95 % CI] [1.02–9.99], $p = 0.0450$) and FOUR score < 16 (HR = 2.77, 95 % CI [1.15–6.57], $p = 0.0237$) (Table 5).

Discussion

This is the first study to assess the performance of the FOUR score for the diagnosis of OHE in cirrhotic patients. Our

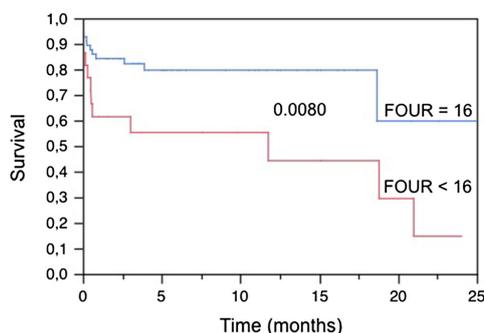


Fig. 3 Kaplan–Meier survival curves by FOUR score

population was a typical population of 94 cirrhotic patients with severe liver disease. This prospective study demonstrates that [1] the newly proposed FOUR score could accurately detect OHE; [2] the performance of the FOUR score for the diagnosis of OHE was good, as indicated by an c-index of 0.88 ± 0.10 for predicting OHE (WH grades 2–4); and [3] the FOUR score was associated with outcome.

The WH scale is most used to detect and follow HE. The score is based on impaired consciousness, intellectual function, and behavior. It classifies HE into 5 grades of severity. Grade 0 represents no detectable changes in personality or behavior; grade 1, trivial lack of awareness, shortened attention span, and altered sleep and mood; and grades 2–4, OHE and coma. Nevertheless, even if this score is well known by hepatologists and well implemented in hepatological units, it is not frequently used by other specialists, intensive care physicians or nurses outside the field of hepatology. This is a concern for severe OHE patients, who display confusion or coma and often require admission to a general ICU. These patients are, therefore, cared for by physicians who are unaware of HE-focused scales such as WH. More general scales such as the GCS have been proposed [1–3] for patients with deep coma, when patients are not verbally responsive. Although a weak performance of the GCS with low grades of HE has been described, the GCS can be used to assess severe HE by providing a wider separation between grades 3 and 4 [3].

Table 4 Outcome by HE status

Outcome	Total population <i>n</i> = 94	No-OHE <i>n</i> = 65	OHE <i>n</i> = 29	<i>p</i> value
At least one other HE episode in the following year*	16 (25 %)	9 (20.5 %)	7 (36.8 %)	0.3731
Survival	68 (72 %)	52 (80 %)	16 (55 %)	0.0150

p-values under 0.05 appear in bold characters

No-OHE no overt hepatic encephalopathy, OHE overt hepatic encephalopathy

* Data available for 63 patients

Table 5 Cox proportional analysis of factors associated with poor outcome with HE

	Hazard ratio	95 % CI	<i>p</i> value
MELD (per point increase)	1.02	[0.96–.08]	0.4653
Previous HE	1.26	[0.44–4.55]	0.6853
Ascites	2.98	[1.02–9.99]	0.0450
FOUR score < 16	2.77	[1.15–6.57]	0.0237

p-values under 0.05 appear in bold characters

95 % CI 95 % confidence interval, MELD Model for End-Stage Liver Disease

The FOUR score is the most validated coma scale and is largely used in emergency departments and ICUs. Furthermore, its reliability has been widely described, even for caregivers in various fields who have minimal training in the scale (neurologic intensive care physicians, emergency, or neurology specialists) and nurses [4, 5, 7]. The FOUR score also assesses breathing patterns, which are frequently impaired in OHE and not assessed in the WH. Here, we showed that the FOUR score was lower in OHE than No-OHE patients. The FOUR score accurately predicted severe stages of OHE and discriminated between WH grades 3 and 4 perhaps because it assesses breathing and does not require verbal assessment.

FOUR is better discriminating in deeper comatose patients, because GCS 3–5 patients may then lose brainstem function, omitted by the GCS and weighing for 1/4 of the FOUR score. Brainstem and Respiration points drop as the stupor/coma deepens and FOUR score continues to drop significantly and linearly as opposed to the GCS, which would come down minimally by 5, 4, then 3. Nevertheless, we found no differences in brainstem responses for the FOUR score between OHE and No-OHE patients. In HE cirrhotic patients, onset of brain edema is not rapid and, therefore, does not feature herniation or brainstem abnormalities. This situation would probably be different in acute liver failure, where severe cerebral edema is more frequent and occur rapidly. Testing the FOUR score in acute liver failure patients would be of interest.

Apart from FOUR score advantage of being better discriminating than the GCS, amongst the deeper comatose patients, it also has increased conspicuous discrimination amongst higher level of consciousness patients, by

measuring eye pursuit or tracking, therefore, detecting moderate encephalopathy/mild stupor. However, as expected, the diagnostic performance of the FOUR score, like the GCS, was lower for the early stages of WH, when cognitive dysfunction is present and assessed better by more specific scores (HESA and CHES) (data not shown).

The FOUR score was previously found to predict unfavorable outcome for traumatic brain injury, stroke and miscellaneous conditions [8]. The most important study, including 381 patients, demonstrated equally good performance for the FOUR score and the GCS [8]. In that study, the FOUR score provided more accurate information for the most severe patients with a GCS score of 3. Therefore, again, the FOUR score is particularly useful for patients with severe disease.

Our exploratory study has several limitations, as a monocentric study with a small number of patients. However, we prospectively included all consecutive cirrhotic patients admitted to an ICU; moreover, we tried to adhere to clinical practice, OHE being diagnosed by hepatologists using the WH scale, with neurological assessment performed by a neurologic intensive care physician familiar with coma scales. In addition, we did not measure ammonia levels. In fact, the association of ammonia levels and HE grading remains controversial. A recent study showed that use of ammonia level as a sole indicator of HE in emergency departments may result in frequent misinterpretations [9].

In conclusion, our results suggest that the FOUR score can be used for the diagnosis of OHE in cirrhotic patients, especially by physicians/nurses outside the field of hepatology who are not familiar with the WH scale. This

finding is of particular interest because the incidence of HE in cirrhotic patients is growing, for increased number of patients hospitalized in units other than hepatology units.

References

1. Ferenci P, Lockwood A, Mullen K, Tarter R, Weissenborn K, Blei AT. Hepatic encephalopathy—definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology* (Baltimore, MD). 2002;35(3):716–21.
2. Blei AT, Córdoba J. Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. Hepatic Encephalopathy. *Am J Gastroenterol*. 2001;96(7):1968–76.
3. Córdoba J. New assessment of hepatic encephalopathy. *J Hepatol*. 2011;54(5):1030–40.
4. Wijdsicks EFM, Bamlet WR, Maramattom BV, Manno EM, McClelland RL. Validation of a new coma scale: The FOUR score. *Ann Neurol*. 2005;58(4):585–93.
5. Weiss N, Mutlu G, Essardy F, Nacabal C, Sauves C, Bally C, et al. The French version of the FOUR score: A new coma score. *Rev Neurol (Paris)*. 2009;165(10):796–802.
6. Kamath PS, Kim WR. Advanced liver disease study group. The model for end-stage liver disease (MELD). *Hepatology* (Baltimore, MD). 2007;45(3):797–805.
7. Iyer VN, Mandrekar JN, Danielson RD, Zubkov AY, Elmer JL, Wijdsicks EFM. Validity of the FOUR score coma scale in the medical intensive care unit. *Mayo Clin Proc Mayo Clin*. 2009;84(8):694–701.
8. Wijdsicks EFM, Rabinstein AA, Bamlet WR, Mandrekar JN. FOUR score and Glasgow coma scale in predicting outcome of comatose patients: a pooled analysis. *Neurology*. 2011;77(1):84–5.
9. Gundling F, Zelihic E, Seidl H, Haller B, Umgelter A, Schepp W, et al. How to diagnose hepatic encephalopathy in the emergency department. *Ann Hepatol*. 2013;12(1):108–14.

II- ARTICLE 2 : *Modification in CSF specific gravity in acutely decompensated cirrhosis and acute on chronic liver failure independant of encephalopathy, evidences for an early blood-CSF barrier dysfunction in cirrhosis.*

Le but de ce travail était d'objectiver des anomalies de la BHE chez des patients atteints de cirrhose et présentant une EH, au moyen d'un nouvel outil, la mesure de la gravité spécifique du LCR. Ce travail a été effectué dans 2 unités : l'unité de soins intensifs d'hépatogastroentérologie de l'hôpital Pitié-Salpêtrière à Paris, et l'unité de médecine intensive du Royal Free Hospital à Londres. Ma contribution à ce travail a été de reprendre tous les dossiers cliniques. Les résultats de ce travail sont détaillés ci-dessous.

Modification in CSF specific gravity in acutely decompensated cirrhosis and acute on chronic liver failure independant of encephalopathy, evidences for an early blood-CSF barrier dysfunction in cirrhosis. N. Weiss, M. Rosselli, S. Mouri, D. Galanaud, L. Puybasset, B. Agarwal, D. Thabut, R. Jalan. **Metab Brain Dis.** 2017 Apr;32(2):369-376.

Le fait que la physiopathologie de l'EH reste encore assez débattue à ce jour tient principalement au fait que le cerveau des patients EH soit par définition peu accessible de façon directe. Les études sont donc faites soit sur des modèles expérimentaux *in vitro* et *in vivo*, soit s'attachent à trouver des méthodes d'exploration indirectes comme l'imagerie. L'hypothèse d'une anomalie de perméabilité de la BHE émerge donc de plus en plus grâce en particulier aux progrès de l'imagerie scanner ou IRM.

La gravité spécifique est définie par le poids du volume d'un objet. L'étude de la gravité spécifique du liquide céphalo-rachidien permettrait donc de caractériser la proportion d'eau et de solutés le composant. Pour ce faire, le logiciel Brainview sur des scanners cérébraux permettrait d'étudier des variations de la gravité spécifique du LCR donc par extrapolation des modifications de sa composition. Au cours de

l'EH, ces modifications éventuelles pourraient être expliquées par des anomalies de la perméabilité de la BHE.

Cette étude a porté sur 67 patients atteints de cirrhose décompensés admis entre janvier 2012 et avril 2013 dans les unités de soins intensifs hépatologiques de 2 centres (Hôpital Pitié Salpêtrière-Paris et Royal Free Hospital-Londres) et ayant eu un scanner cérébral en coupes fines. Ils ont été comparés à des patients contrôles présentant également une cirrhose mais non décompensée (patients en cours de bilan pré-transplantation pour carcinome hépato-cellulaire et ayant eu un scanner cérébral pour rechercher des métastases) ainsi qu'à des patients non atteints de cirrhose (admis aux urgences pour céphalées ou traumatisme cérébral).

L'analyse des scanners cérébraux a permis de montrer que les patients atteints de cirrhose, qu'ils soient ou non décompensés présentent une augmentation de la gravité spécifique de leur LCR par rapport aux patients contrôles non atteints de cirrhose ($p < 0,0001$), suggérant un passage de certaines substances à travers la barrière sang-LCR principalement localisée au niveau des plexus choroïdes. Ces modifications dépendent de la présence d'une ACLF (Acute or Chronic Liver Failure) puisque la gravité spécifique des LCR des patients avec une ACLF est plus basse que ceux n'ayant pas d'ACLF. La présence d'une EH ne modifie pas significativement la gravité spécifique ($p = 0,1757$).

Les résultats de cette étude pilote suggèrent une augmentation de la perméabilité de la barrière sang-LCR au cours de la cirrhose et celle-ci dépendrait de la gravité de la maladie hépatique. Ainsi, ce résultat pourrait être expliqué par le passage d'une ou plusieurs molécules dont la gravité spécifique propre est plus élevée que celle du LCR, comme les sels biliaires ou certains acides aminés. L'absence de modification de la gravité spécifique du LCR en présence d'une EH pourrait être expliquée par le fait que les altérations de l'homéostasie cérébrale surviennent au cours de la cirrhose même sans EH (modifications du transport du myoinositol et de la glutamine intracérébraux). Ainsi, les manifestations de l'EH pourraient ne pas être uniquement dues à des modifications de la BHE mais également à d'autres facteurs. Cette étude montre pour la première fois une modification de la gravité spécifique du LCR au cours de la cirrhose ; elle suggère des anomalies de

perméabilité de la BHE et de la barrière sang-LCR et souligne la physiopathologie multifactorielle de l'apparition d'une EH.



Modification in CSF specific gravity in acutely decompensated cirrhosis and acute on chronic liver failure independent of encephalopathy, evidences for an early blood-CSF barrier dysfunction in cirrhosis

Nicolas Weiss^{1,2,3} · Matteo Rosselli⁴ · Sarah Mouri^{1,5} · Damien Galanaud⁶ · Louis Puybasset⁷ · Banwari Agarwal⁴ · Dominique Thabut^{1,5} · Rajiv Jalan⁴

Received: 14 December 2015 / Accepted: 23 September 2016 / Published online: 11 October 2016
© Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract Although hepatic encephalopathy (HE) on the background of acute on chronic liver failure (ACLF) is associated with high mortality rates, it is unknown whether this is due to increased blood-brain barrier permeability. Specific gravity of cerebrospinal fluid measured by CT is able to estimate blood-cerebrospinal fluid-barrier permeability.

This study aimed to assess cerebrospinal fluid specific gravity in acutely decompensated cirrhosis and to compare it in patients with or without ACLF and with or without hepatic encephalopathy. We identified all the patients admitted for acute decompensation of cirrhosis who underwent a brain CT-scan. Those patients could present acute decompensation with or without ACLF. The presence of hepatic encephalopathy was noted. They were compared to a group of stable cirrhotic patients and healthy controls. Quantitative brain CT analysis used the Brainview software that gives the weight, the volume and the specific gravity of each determined brain regions. Results are given as median and interquartile ranges and as relative variation compared to the control/baseline group. 36 patients presented an acute decompensation of cirrhosis. Among them, 25 presented with ACLF and 11 without ACLF; 20 presented with hepatic encephalopathy grade ≥ 2 . They were compared to 31 stable cirrhosis patients and 61 healthy controls. Cirrhotic patients had increased cerebrospinal fluid specific gravity (CSF-SG) compared to healthy controls (+0.4 %, $p < 0.0001$). Cirrhotic patients with ACLF have decreased CSF-SG as compared to cirrhotic patients without ACLF (−0.2 %, $p = 0.0030$) that remained higher than in healthy controls. The presence of hepatic encephalopathy did not modify CSF-SG (−0.09 %, $p = 0.1757$). Specific gravity did not differ between different brain regions according to the presence or absence of either ACLF or HE. In patients with acute decompensation of cirrhosis, and those with ACLF, CSF specific gravity is modified compared to both stable cirrhotic patients and healthy controls. This pattern is observed even in the absence of hepatic encephalopathy suggesting that blood-CSF barrier impairment is manifest even in absence of overt hepatic encephalopathy.

Nicolas Weiss and Matteo Rosselli contributed equally to the work

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11011-016-9916-9) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Nicolas Weiss
nicolas.weiss@aphp.fr

- Brain-Liver Pitié-Salpêtrière Study Group (BLIPS), Hôpital de la Pitié Salpêtrière, and INSERM UMR_S 938, CDR Saint-Antoine, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France
- Unité de réanimation neurologique, Fédération de Neurologie, Pôle des maladies du système nerveux, Hôpital de la Pitié Salpêtrière, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France
- Institut de Neurosciences Translationnelles de Paris, Institut-Hospitalo-Universitaire-A-Institut du Cerveau et de la Moelle (IHU-A-ICM), Paris, France
- Liver Failure Group, UCL Institute for Liver and Digestive Health, UCL Medical School, Royal Free Hospital, London, UK
- Soins Intensifs d'Hépatologie, Service d'Hépatologie-Gastroentérologie, Hôpital de la Pitié Salpêtrière, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France
- Service de Neuroradiologie, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Paris, France
- Neuro-réanimation chirurgicale, département d'anesthésie-réanimation, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, France and Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

Keywords Hepatic encephalopathy · Brain edema · Blood-brain barrier · Blood-cerebrospinal fluid-barrier · CT scan

Introduction

Overt hepatic encephalopathy (HE) requiring hospital admission is a common complication of cirrhosis that is associated with high resource utilization and a significant in-hospital mortality (Stepanova et al. 2012; Orr et al., 2014). HE patients have a significantly lower survival compared with patients without HE at all severities of liver disease (Cordoba et al., 2014; Bajaj et al., 2010). Acute on chronic liver failure (ACLF) is a clinically and prognostically distinct syndrome that occurs in cirrhotic patients who are hospitalized with acute deterioration due to either known or unknown precipitating events, hepatic and/or extrahepatic organ failure and high short term mortality rates. Pathophysiologically, the syndrome is characterized by altered host response to injury. One major recent finding is that HE in patients displaying a diagnosis of ACLF have higher mortality compared with HE patients without ACLF (Cordoba et al., 2014).

The mechanism underlying the pathophysiology of HE in ACLF and this susceptibility to increased mortality is not known. In spite of its high frequency, HE pathophysiology is poorly understood. Increased cerebral ammonia uptake, and its transformation into glutamine by the astrocytes are thought to be important mechanisms causing neurological symptoms (Romero-Gómez, 2005). However, since there is poor correlation between ammonia and the severity of HE, other factors could be implicated (Shawcross et al., 2004; Ong et al., 2003). For instance, the cerebral accumulation of different substances besides ammonium, like amino acids (AA) (James et al., 1978), manganese (Rose et al., 1999), biliary salts, has been demonstrated in patients with cirrhosis or porto-systemic shunts. More recently, inflammation has been thought to contribute to the severity of HE both in animal models and also in humans (Shawcross et al., 2004; Wright et al., 2007). Indeed, inflammation is clearly more marked in patients with ACLF and HE compared with those with acute decompensation but no ACLF with similar severities of HE, suggesting that the underlying pathophysiological mechanisms may be different. Severe cerebral edema has been reported in some studies in cirrhotic patients with HE (Jalan & Bernauu, 2007). Indeed, death of about 5 % ACLF patients is thought to be caused by severe cerebral edema (Joshi et al., 2014). Whether this is associated with blood-brain barriers dysfunction is not known.

Brain homeostasis is of major importance to carry out the complex physiological functions, especially synaptic transmission. Thus, exchanges between the blood and the brain are tightly regulated by tight junctions on two main cellular

interfaces that restrict the permeability: the blood-brain barrier that is located on cerebral endothelial cells and the blood-cerebrospinal fluid barrier (BCSFB) located on epithelial cells of choroid plexuses (see (Gherzi-Egea et al., 1995; Gherzi-Egea & Strazielle, 2002) for review). Even if tight junctions are expressed in the cerebral endothelial cells of the blood-brain barrier and on epithelial cells of choroid plexuses on the BCSFB, their molecular and cellular organization is very closely organized (see for review (Gherzi-Egea et al., 1995; Weiss et al., 2009)). Dysfunction of these barriers have been recently highlighted in different neurological diseases and their dysfunction in cirrhotic patients, especially those with HE, has been suggested to be pathophysiologically relevant (Jalan & Bernauu, 2007; Weiss et al., 2009). Recent studies highlighted that the BCSFB constitute a large surface area for exchanges, greater than previously thought, and that this barrier intervene in availability of drugs. Thus, MRI studies have shown that in case of manganese accumulation for example, this metal first accumulates in CSF as a transfer across the choroid plexuses before spreading to periventricular regions where it enter into neural cells to reach the final destination via retrograde transport via axons (Aoki et al., 2004). Therefore, a more precise analysis of CSF in cirrhotic patients with or without ACLF would be of major interest but access to CSF is difficult since these patients often have low platelets that render lumbar puncture a high risk procedure.

The measurement of the specific gravity (SG), which is defined as the weight of the volume of an object, is a validated and reliable method to characterize any solute, estimate the water content of CSF or of different brain regions (Lescot et al., 2005; Lescot et al., 2008). CT scanning and post-processing analysis by a dedicated software, Brainview (Institut Nationale des Télécommunications (Lescot et al., 2005; Puybasset et al., 1998; Vieira et al., 1998)), has already been used to assess SG in patients for the evaluation of brain edema (Lescot et al., 2005; Degos et al. 2006, 2012; Lescot et al., 2006). Thus, studying CSF-SG allows this question to be addressed. The normal CSF-SG is between 1.007 and 1.008. Disease related variations of SG could be analyzed in patients that undergo a CT scan (Lescot et al., 2006). A decrease in CSF-SG suggests passage through the BCSFB of either a substances with a SG lower than that of the CSF or the passage of solute whereas an increase of CSF-SG suggests the passage through the BCSFB of a substances with a SG greater than that of the CSF. Interestingly, SG of the substances that has previously been shown as being present in the CSF of cirrhotic patients are well known and are as follows, ammonium has a SG of 0.9, bile salts a SG between 1.010 and 1.040 and, immunoglobulins a SG of more than 1.060.

Thus, the modification in the blood-CSF barrier permeability could represent a first step in the physiopathology of ACLF or

HE, responsible for modification in the CSF composition and afterwards in the brain extracellular compartment.

Therefore, the aims of this study were to assess CSF-SG in acutely decompensated cirrhosis and to compare it in patients with and without ACLF and with and without HE.

Patients and methods

Patient's selection

We retrospectively identified all the patients admitted for acute decompensation of cirrhosis in two Hepatology ICUs of two tertiary care centers (Royal Free Hospital, London, United-Kingdom and La Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France) who underwent a brain CT-scan between January 2012 and April 2013. Both center admit about 250 patients every years for acute decompensation of cirrhosis and 50 % of these patients present ACLF and 40 % present with HE. Those patients could present acute decompensation with or without ACLF (Jalan et al., 2014) and with or without HE. Patients were included, provided they fulfilled the following criteria: (1) CT-scan with contiguous slices without interspaces; (2) no previous neurological history except HE; (3) no cerebral hemorrhage on CT; (4) no history of contrast medium injection within the last 2 weeks for analysis purpose. Patients were compared to a group of stable cirrhotic patients followed up in the same units who underwent brain CT-scan in their pre-transplant workup for hepatocellular carcinoma in order to rule out brain metastasis. Cirrhosis was diagnosed using a combination of clinical, biological, radiological, histological and anatomo-pathological features.

Healthy controls

Non-cirrhotic patients that underwent a CT-scan with contiguous slices without interspaces at emergency department for headaches or trauma and that were finally interpreted as normal were used as healthy controls.

Data collection

The following data were collected at admission: demographic data (age, gender), natural history of cirrhosis (etiology, presence of ascites, previous episodes of bleeding, previous episodes of HE, hepatocellular carcinoma), cause of admission, physical examination, laboratory measurements (leukocyte and platelet count, prothrombin time (PT), international normalized ratio (INR), and levels of liver enzymes, bilirubin, creatinine, sodium, albumin and C-reactive protein (CRP)). The severity of cirrhosis was evaluated by the Child-Pugh score. The presence of HE and of ACLF was noted. The

presence of HE was diagnosed as impairment in consciousness, or motor function in a patient with cirrhosis after exclusion of other causes of mental disturbance. The severity of HE was assessed by senior hepatologists using West-Haven score (WH). Overt HE was considered if WH was equal or higher than 2. To quantify organ dysfunction, the CLIF-OFF score was used. This score derived from SOFA assess six organ systems (liver, kidneys, brain, coagulation, circulation, lungs) and takes in account the specificity of cirrhosis (Jalan et al., 2014). The presence or the absence and grade of ACLF was defined as previously described (Moreau et al., 2013).

CT-scan analysis

CT-scans were acquired on a Philips scanner (Netherlands) in London and on a Siemens scanner (Germany) in Paris. Quantitative brain CT analysis was performed using the Brainview software (Institut National des Télécommunications) (Puybasset et al., 1998). Briefly, this validated software (Puybasset et al., 1998; Vieira et al., 1998) is aimed to analyze DICOM images acquired from cerebral CT scans by performing automatic segmentation excluding extracranial compartments on each slices. Interactive slice-by-slice segmentation allows to delineate different anatomical regions. The software renders the weight, the volume and the specific gravity (SG) of the whole brain and of each individual region (right and left hemispheres, brainstem, cerebellum, and intraventricular CSF).

Statistical analysis

Continuous variables are expressed as median and interquartile range (IQR). Categorical variables are expressed as frequencies and percentages. Chi-square or Fisher exact test was used to compare categorical variables and ANOVA for continuous variables, with Tukey range test for correction. Univariate analysis was used to compare the variables between the different groups. In order to take in account the acquisition in two centers, and the possible differences in CT calibration, stratification according to the center was performed.

All statistical tests were two-tailed. *P* values that were less than 0.05 were considered to indicate statistical significance. Analysis involved use of JMP v9.0 (SAS Inst., Cary, NC).

According to the French law, the approval of the local ethics committee was not necessary since the CTs were included in the clinical management of the patients and the study was retrospective. The database in which the patients were identified had been submitted to and approved by the French national commission for computerized files and liberty (CNIL, Commission Nationale de l'Informatique

et des Liberte's). Royal Free Hospital research ethics committee gave its approval for the study.

Results

Subjects

From January 2012 to April 2013, 72 cirrhotic patients underwent a cerebral CT scan. Five CTs were not analyzable, thus 67 patients were finally retained for analysis. Overall, 36 cirrhotic patients were admitted for acute decompensation (25 presented with ACLF and 11 with acute decompensation without ACLF) and 31 for stable cirrhosis. Results were compared to that of 61 healthy controls. Baseline characteristics of the patients and the controls are displayed in Table 1. In patients with acute decompensation, 20 patients (56 %) displayed overt HE (WH grade 2: $n = 12$, grade 3, $n = 7$, grade 4, $n = 1$) and 25 (69 %) displayed ACLF. 15 patients (42 %) presented with both ACLF and HE. No patients had HE or ACLF in the stable cirrhotic patients. Indication for brain CT-scan differed significantly between patients with and without overt HE. Brain CT-scans in healthy controls were performed mainly because of headache.

Quantitative CT analysis

SG values did not differ between the two centers. Thus, data were analyzed together.

Cirrhotic patients whether they were or not decompensated display increased CSF-SG as compared to healthy controls

Compared to healthy controls, cirrhotic patients had increased CSF-SG (1.01178 [1.01014–1.01375] vs 1.00855 [1.00688–1.01045], +0.3 %, $p < 0.0001$, respectively) suggesting the passage of substances with a SG greater than that of the CSF through the BCSFB in cirrhotic patients.

Acutely decompensated cirrhotic patients display a mild decrease in CSF-SG as compared to patients with stable cirrhosis

Acutely decompensated cirrhotic patients compared to stable cirrhotic patients had a decreased CSF-SG (1.01088 [1.00922–1.01224] vs 1.01256 [1.01156–1.01458] respectively, -0.2 %, $p = 0.0002$) suggesting increased permeability of the BCSFB to either solutes or substances with a lower SG in this setting (Table 2 and Fig. 1a). CSF-SG in acutely decompensated cirrhotic patients remained however higher than in healthy controls (1.01088 [1.00922–1.01224] vs 1.00855 [1.00688–1.01045], respectively, +0.2 %, $p < 0.0001$).

Cirrhotic patients with ACLF have decreased CSF-SG as compared to cirrhotic patients without ACLF

Cirrhotic patients with ACLF displayed decreased CSF-SG as compared to patients without ACLF (1.01036 [1.00908–1.01207] vs 1.01218 [1.01103–1.01412] respectively, -0.2 %, $p = 0.0030$), suggesting increased permeability of the BCSFB to either solutes or substances with a lower SG in this setting (Table 3 and Fig. 1b).

The presence of HE does not modify the CSF-SG in cirrhotic patients

In cirrhotic patients, patients with HE displayed a CSF-SG of 1.01122 [1.00986–1.01224] compared to 1.01209 [1.01024–1.01408], -0.09 %, in patients without HE ($p = 0.1757$) (Table 3 and Fig. 1c).

Discussion

By using CT scanning analysis of the SG of the CSF, we found arguments in favor of increased permeability of the BCSFB in cirrhotic patients. Indeed, results of the present pilot study suggest that cirrhotic patients display alterations of the BCSFB, that are dependent on the severity of liver disease. Importantly, these alterations are influenced by the presence of ACLF, but occur even in the absence of HE. These results suggest that, in cirrhotic patients, BCSFB permeability to substances and solutes are altered.

It seems that, early in cirrhosis, even in those without acute decompensation, some substances with a SG higher than that of the CSF, i.e. higher than 1.008, cross the BCSFB. Elevated levels of glutamine, glutamate, alpha ketoglutarate, bile salts and increased concentrations of serotonin, dopamine and AA have been reported in the CSF of cirrhotic patients (Jellinger et al., 1978; Ono et al., 1978; Cascino et al., 1982). According to our results in stable cirrhotic patients compared to healthy controls, the passage of bile salts, the SG of which ranges from 1.010 to 1.040, into the CSF could explain the increase in CSF-SG. Indeed, bile salts have been shown to accumulate in these conditions (Gove et al., 1997). Furthermore, bile salts have a synergistic effect with endotoxin and ammonia on the formation of brain edema by their action on Na-K-ATPase (Tominaga et al., 1991). Several data also reported an increased level in both brain and CSF of tryptophan and its metabolites 5-HIAA, in patients with porto-systemic shunts and cirrhosis (Young et al., 1975). Hence, in cirrhotic patients the level of tryptophan in the CSF was 4-fold higher than in controls. Several AA were found to be elevated in the CSF in the setting of ALF (Mattson et al., 1995), and animal models of cirrhosis displayed an increased CSF level of tryptophan (Young et al., 1975). In the CSF of cirrhotic patients without

Table 1 Baseline characteristics of the patients and the controls

	Acute decompensation of cirrhosis <i>n</i> = 36	Stable cirrhotic patients <i>n</i> = 31	Healthy controls <i>n</i> = 61	<i>p</i> value
Age, years	55 [47–65]	59 [48–63]	64 [46–78]	0.3347
Male gender (%)	23 (64 %)	26 (84 %)	39 (64 %)	0.1134
Etiology of cirrhosis				
Viral	4 (11 %)	0 (0 %)	-	
Alcohol consumption	22 (61 %)	22 (72 %)	-	
Other	10 (28 %)	8 (25 %)	-	
Ascites	9 (56 %)	0 (0 %)	-	< 0.0001
ACLF	25 (69 %)	0 (0 %)	-	< 0.0001
Hepatocellular carcinoma	3 (8 %)	31 (100 %)	-	< 0.0001
Acute alcoholic hepatitis	6 (38 %)	0 (0 %)	-	0.0003
TIPS	7 (44 %)	-	-	
Asterixis	11 (69 %)	0 (0 %)	-	< 0.0001
PTT (%)	32 [31–44]	64 [46–76]	NA	0.0001
INR	2.0 [1.6–2.5]	1.4 [1.2–2.0]	NA	0.0081
Leukocyte count (/mm ³)	9625 [6683–16,848]	4900 [3450–7800]	10,030 [7140–12,920]	0.0055
Platelet count (/mm ³)	81,500 [50,500–125,750]	67,000 [47,500–88,500]	NA	0.3442
Creatinine level (mg/dL)	0.94 [0.63–1.35]	0.74 [0.67–0.89]	NA	0.1309
Albumin level (g/L)	25 [22–31]	34 [31–40]	NA	0.0014
Bilirubin level (mg/dL)	5.1 [1.7–8.9]	1.1 [0.8–1.9]	NA	0.0013
AST level (U/L)	82 [60–177]	67 [46–82]	NA	0.0931
ALT level (U/L)	48 [25–80]	45 [30–55]	NA	0.3700
Sodium level (mmol/L)	139 [133–145]	139 [134–142]	NA	0.3339
CRP level (mg/l)	20.5 [6.3–48.3]	7.5 [4.0–14.0]	NA	0.0203
Child-Pugh score				
A	2 (6 %)	26 (83 %)	-	
B	2 (6 %)	5 (17 %)	-	
C	32 (88 %)	0	-	
CLIF-SOFA score	11 [8–12]	NA	-	
Hepatic encephalopathy	20 (56 %)	0 (0 %)	-	< 0.0001
West-Haven score				< 0.0001
0	4 (11 %)	31 (100 %)	-	
1	12 (33 %)	-	-	
2	12 (33 %)	-	-	
3	7 (19 %)	-	-	
4	1 (3 %)	-	-	

Data are mean ± SD or number (%)

Bold entries show the statistically significant values

ALT alanine aminotransferase, AST aspartate aminotransferase, CRP C-reactive protein, HE hepatic encephalopathy, INR international standardized ratio, MELD Model for End-Stage Liver Disease, PTT prothrombin time

HE, a significant increase was found in nearly all amino acids, including those known not to cross the blood-brain barriers readily, suggesting the presence of a nonspecific modification of the BCSFB permeability (Cascino et al., 1982). This could also explain the increase of CSF-SG in the cirrhotic patients. The passage of proteins such as IgG seems less probable since no major brain edema was present. The possible passage of some yet unknown substance or medication cannot be ruled

out. Indeed, increase of CSF-SG is a classical finding in the administration of local anesthetics for spinal anaesthesia. In some pathological conditions such as seizures, increased blood osmolarity can induce dehydration of the brain and thus an increase its SG (Nitsch et al., 1984). We recently showed using metabolomics that the CSF of cirrhotic patients displaying neurological symptoms contained the main above mentioned substances and several xenobiotics, i.e. drugs, that

Table 2 Specific gravity of different brain regions according to the presence or not of cirrhosis and the presence or not of acute decompensation of cirrhosis

	Healthy controls <i>n</i> = 61	Stable cirrhotic patients <i>n</i> = 31	Acute decompensation of cirrhosis <i>n</i> = 36	p-value
CSF	1.00855 [1.00688–1.01045]	1.01256 [1.01156–1.01450]	1.01088 [1.00922–1.01224]	< 0.0001
Relative difference (%)	na	+ 0.4 %	+ 0.2 %	
Whole brain	1.02934 [1.02812–1.03108]	1.02920 [1.02792–1.03023]	1.02844 [1.02708–1.02967]	0.0329
Relative difference (%)	na	- 0.01 %	- 0.08 %	
Hemispheres	1.02903 [1.02753–1.03058]	1.02885 [1.02766–1.02965]	1.02793 [1.02657–1.02940]	0.0462
Relative difference (%)	na	- 0.01 %	- 0.1 %	
Brainstem	1.02138 [1.02080–1.02231]	1.02534 [1.02373–1.02593]	1.02448 [1.02290–1.02580]	< 0.0001
Relative difference (%)	na	+ 0.4 %	+ 0.3 %	
Cerebellum	1.03502 [1.03310–1.03619]	1.03297 [1.03081–1.03360]	1.03201 [1.03114–1.03430]	< 0.0001
Relative difference (%)	na	- 0.3 %	- 0.3 %	

Relative differences are given compared to controls

CSF cerebrospinal fluid, *na* not applicabla

all could contribute to the modification in CSF-SG (Weiss et al., 2016a; Weiss et al., 2016b).

In cirrhotic patients with HE, CSF-SG was not statistically different compared to cirrhotic patients without HE. This observation is somewhat surprising given that ammonia (SG: 0.9) has been shown to be increased in the CSF in patients with HE (Ropper et al., 2014). The data support the hypothesis that alterations of cerebral homeostasis occur even in the absence of HE, evidenced by studies showing alterations in myoinositol and glutamine in the brain of patients with cirrhosis with and without HE (Chavarria et al., 2013; Rovira et al., 2001). The manifestation of HE is therefore likely to be due not only to alterations of blood-brain barriers, but also to other interacting factors.

In cirrhotic patients with ACLF, CSF-SG was decreased compared to acute decompensation without ACLF patients. This finding suggests again an alteration in BCSFB. Inflammation is the main physiopathological hallmark of

ACLF. Hence, one hypothesis is an increased passage of solutes since BCSFB permeability to solutes, is particularly influenced by inflammatory mediators such as TNF-alpha or IFN-gamma. Our results suggest that ACLF patients present altered BCSFB even in the absence of HE. The significance of this observation is not clear. It is tempting to hypothesize that these abnormalities may make the patient susceptible to the development of HE but this hypothesis will have to be confirmed in future studies.

Our study has several limitations. First, it was retrospective and the diagnosis of ACLF and HE was retrieved in medical records. Bias could be introduced in our study by the fact that we considered only overt HE and not minimal HE. Since this retrospective design, case-mix cannot be excluded. For example, patients who underwent a CT-scan for another reason than HE were patients hospitalized for the workup of hepatocellular carcinoma, which were displayed far more severe liver disease than usual patients with hepatocellular carcinoma.

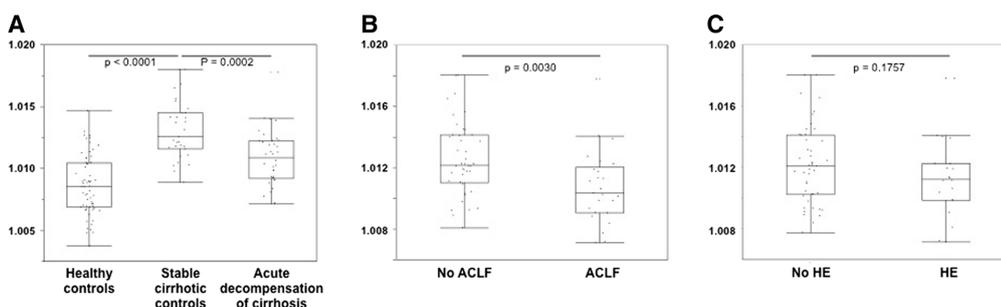


Fig. 1 CSF specific gravity according to the presence or not of cirrhosis, the presence or not of acute decompensation of cirrhosis, of ACLF and HE. **a** CSF SG according to the presence or not of cirrhosis and the

presence or not of acute decompensation of cirrhosis; **b** CSF SG according to the presence or not of ACLF; **c** CSF SG according to the presence or not of HE

Table 3 Specific gravity of different brain regions according to the presence or absence of ACLF and HE

	Hepatic encephalopathy			ACLF			p-value
	No n = 47		p-value	No n = 42		p-value	
	Yes n = 20	Yes n = 25					
CSF	1.01209 [1.01024–1.01408]	1.01122 [1.00986–1.01224]	0.1757	1.01218 [1.01103–1.01412]	1.01036 [1.00908–1.01207]	0.0030	
Relative difference (%)	Na	-0.09 %		na	-0.2 %		
Whole brain	1.02940 [1.02782–1.03023]	1.02854 [1.02718–1.02966]	0.4353	1.02912 [1.02781–1.03014]	1.02866 [1.02669–1.02975]	0.1450	
Relative difference (%)	na	-0.08 %		na	-0.05 %		
Hemispheres	1.02871 [1.02737–1.02968]	1.02812 [1.02663–1.02942]	0.3946	1.02873 [1.02747–1.02965]	1.02838 [1.02613–1.02960]	0.1255	
Relative difference (%)	na	-0.06 %		na	-0.03 %		
Brainstem	1.02494 [1.02342–1.02571]	1.02487 [1.02305–1.02630]	0.7815	1.02515 [1.02344–1.02572]	1.02479 [1.02292–1.02618]	0.6563	
Relative difference (%)	na	-0.01 %		na	-0.04 %		
Cerebellum	1.03266 [1.03083–1.03360]	1.03256 [1.03130–1.03455]	0.3952	1.03268 [1.03079–1.03359]	1.03226 [1.03122–1.03443]	0.6648	
Relative difference (%)	na	-0.01 %		na	-0.04 %		

Relative differences are given compared to controls

ACLF, acute on chronic liver failure, CSF, cerebrospinal fluid

Furthermore, we could include only patients that underwent CTs without interslice spaces. Last, the composition of substances that cross the BCSFB need further analysis of the CSF but lumbar puncture is rarely indicated in cirrhotic patients, and this type of study is probably not ethically possible. This study provides the novel data describing changes in CSF content in cirrhotic patients.

In conclusion, our study describes for the first time that CSF-SG is modified in cirrhotic patients, both with and without HE suggesting altered BCSFB permeability to substances and solutes. Patients with ACLF display further alterations of BCSFB, which may indicate their susceptibility to HE. The observation that abnormalities in the BCSFB are manifest even in the absence of overt HE may have important clinical and pathophysiological implications.

ACLF, Acute-on chronic liver failure; AA, Amino-acids; ALF, Acute liver failure; BCSFB, Blood-cerebrospinal fluid barrier; CSF, Cerebrospinal fluid, CRP, C-reactive protein; HE, Hepatic encephalopathy; INR, International normalized ratio; MRI, Magnetic resonance imaging; MELD, Model for End-Stage Liver Disease; PT, Prothrombin time; SG, Specific gravity; WH, West-Haven score.

Acknowledgment The authors gratefully acknowledge the help of Dr. Dominic Yu, Consultant Radiologist at Royal Free Hospital.

Financial support none.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest Nicolas Weiss declares the following potential conflicts of interest.

Research grant Eumedica, Gilead.

Speaker fees Alpha-Wasseman, Norgine, Gore.

Dominique Thabut declares the following potential conflicts of interest. Research grant: Eumedica, Gilead. Speaker fees: Alpha-Wasseman, Norgine, Gore, Gilead, BMS, Janssen.

Rajiv Jalan declares the following potential conflicts of interest. Inventor: Ornithinephenylacetate, a treatment for hepatic encephalopathy; UCL Liver dialysis device. Research grant: Ocera therapeutics, Gambro, Sequana and Grifols. Consultant: Ocera therapeutics, Conatus. Founder: Yaqril Ltd. (UCL spin out). Speaker fees: Grifols, Norgine.

The other authors have nothing to declare.

References

- Aoki I, Naruse S, Tanaka C (2004) Manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI) of brain activity and applications to early detection of brain ischemia. *NMR Biomed* 17:569–580
- Bajaj JS, Schubert CM, Heuman DM et al (2010) Persistence of cognitive impairment after resolution of overt hepatic encephalopathy. *Gastroenterology* 138:2332–2340

- Cascino A, Cangiano C, Fiaccadori F et al (1982) Plasma and cerebrospinal fluid amino acid patterns in hepatic encephalopathy. *Dig Dis Sci* 27:828–832
- Chavarría L, Alonso J, García-Martínez R et al (2013) Brain magnetic resonance spectroscopy in episodic hepatic encephalopathy. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab* 33:272–277
- Cordoba J, Ventura-Cots M, Simón-Talero M et al (2014) Characteristics, risk factors, and mortality of cirrhotic patients hospitalized for hepatic encephalopathy with and without acute-on-chronic liver failure (ACLF). *J Hepatol* 60:275–281
- Degos V, Lescot T, Zouaoui A et al (2006) Computed tomography-estimated specific gravity of noncontused brain areas as a marker of severity in human traumatic brain injury. *Anesth Analg* 103:1229–1236
- Degos V, Lescot T, Icke C et al (2012) Computed tomography-estimated specific gravity at hospital admission predicts 6-month outcome in mild-to-moderate traumatic brain injury patients admitted to the intensive care unit. *Anesth Analg* 114:1026–1033
- Ghersi-Egea J-F, Strazielle N (2002) Choroid plexus transporters for drugs and other xenobiotics. *J Drug Target* 10:353–357
- Ghersi-Egea JF, Leininger-Muller B, Cecchelli R, Fenstermacher JD (1995) Blood-brain interfaces: relevance to cerebral drug metabolism. *Toxicol Lett* 82–83:645–653
- Gove CD, Hughes RD, Ede RJ, Williams R (1997) Regional cerebral edema and chloride space in galactosamine-induced liver failure in rats. *Hepatol Baltim Md* 25:295–301
- Jalan R, Bernuau J (2007) Induction of cerebral hyperemia by ammonia plus endotoxin: does hyperammonemia unlock the blood-brain barrier? *J Hepatol* 47:168–171
- Jalan R, Saliba F, Pavesi M et al (2014) Development and validation of a prognostic score to predict mortality in patients with acute-on-chronic liver failure. *J Hepatol* 61:1038–1047
- James JH, Escourrou J, Fischer JE (1978) Blood-brain neutral amino acid transport activity is increased after portacaval anastomosis. *Science* 200:1395–1397
- Jellinger KA, Riederer P, Rausch WD, Kothbauer P (1978) Brain monoamines in hepatic encephalopathy and other types of metabolic coma. *J Neural Transm Suppl Epub* 1978(14):103–120
- Joshi D, O'Grady J, Patel A, et al (2014) Cerebral oedema is rare in acute-on-chronic liver failure patients presenting with high-grade hepatic encephalopathy. *Liver Int* 34(3):362–366
- Lescot T, Bonnet M-P, Zouaoui A et al (2005) A quantitative computed tomography assessment of brain weight, volume, and specific gravity in severe head trauma. *Intensive Care Med* 31:1042–1050
- Lescot T, Degos V, Zouaoui A, Prêteux F, Coriat P, Puybasset L (2006) Opposed effects of hypertonic saline on contusions and noncontused brain tissue in patients with severe traumatic brain injury. *Crit Care Med* 34:3029–3033
- Lescot T, Degos V, Puybasset L (2008) Does the brain become heavier or lighter after trauma? *Eur J Anaesthesiol Suppl* 42:110–114
- Mattson LR, Lindor NM, Goldman DH, Goodwin JT, Groover RV, Vockley J (1995) Central pontine myelinolysis as a complication of partial ornithine carbamoyl transferase deficiency. *Am J Med Genet* 60:210–213
- Moreau R, Jalan R, Gines P et al (2013) Acute-on-chronic liver failure is a distinct syndrome that develops in patients with acute decompensation of cirrhosis. *Gastroenterology* 144:1426–1437. doi:10.1016/j.gastro.2013.05.004
- Nitsch C, Fujiwara K, Kuroiwa T, Klatzo I (1984) Specific gravity increases and brain water content decreases during short epileptiform seizures in discrete rabbit brain areas. *J Neurosci* 4:119–129
- Ong JP, Aggarwal A, Krieger D et al (2003) Correlation between ammonia levels and the severity of hepatic encephalopathy. *Am J Med* 114:188–193
- Ono J, Hutson DG, Dombro RS, Levi JU, Livingstone A, Zeppa R (1978) Tryptophan and hepatic coma. *Gastroenterology* 74:196–200
- Orr JG, Homer T, Terment L et al (2014) Health related quality of life in people with advanced chronic liver disease. *J Hepatol* 61:1158–1165
- Puybasset L, Cluzel P, Chao N, Slutsky AS, Coriat P, Rouby JJ (1998) A computed tomography scan assessment of regional lung volume in acute lung injury. The CT scan ARDS study group. *Am J Respir Crit Care Med* 158:1644–1655
- Romero-Gómez M (2005) Role of phosphate-activated glutaminase in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 20:319–325
- Ropper A, Samuels M, Klein J (2014) Adams and Victor's principles of neurology 10th edition, 10 edn. McGraw-Hill Professional, New York
- Rose C, Butterworth RF, Zayed J et al (1999) Manganese deposition in basal ganglia structures results from both portal-systemic shunting and liver dysfunction. *Gastroenterology* 117:640–644
- Rovira A, Grivé E, Pedraza S, Rovira A, Alonso J (2001) Magnetization transfer ratio values and proton MR spectroscopy of normal-appearing cerebral white matter in patients with liver cirrhosis. *AJNR Am J Neuroradiol* 22:1137–1142
- Shawcross DL, Davies NA, Williams R, Jalan R (2004) Systemic inflammatory response exacerbates the neuropsychological effects of induced hyperammonemia in cirrhosis. *J Hepatol* 40:247–254
- Stepanova M, Mishra A, Venkatesan C, Younossi ZM (2012) In-hospital mortality and economic burden associated with hepatic encephalopathy in the United States from 2005 to 2009. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc* 10:1034–1041.e1
- Tominaga S, Watanabe A, Tsuji T (1991) Synergistic effect of bile acid, endotoxin, and ammonia on brain edema. *Metab Brain Dis* 6:93–105
- Vieira SR, Puybasset L, Richecoeur J et al (1998) A lung computed tomographic assessment of positive end-expiratory pressure-induced lung overdistension. *Am J Respir Crit Care Med* 158:1571–1577
- Weiss N, Miller F, Cazaubon S, Couraud P-O (2009) The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim Biophys Acta* 1788:842–857
- Weiss N, Junot C, Rudler M, Thabut D (2016a) Hepatic versus drug-induced encephalopathy in cirrhotic patients? *Liver Int* 36(8):1233–1234
- Weiss N, de Saint Hilaire, PB, Colsch B, et al (2016b) Cerebrospinal fluid metabolomics highlights dysregulation of energy metabolism in overt hepatic encephalopathy. *J Hepatol*. doi:10.1016/j.jhep.2016.07.046
- Wright G, Davies NA, Shawcross DL et al (2007) Endotoxemia produces coma and brain swelling in bile duct ligated rats. *Hepatol Baltim Md* 45:1517–1526
- Young SN, Lal S, Sourkes TL, Feldmuller F, Aronoff A, Martin JB (1975) Relationships between tryptophan in serum and CSF, and 5-hydroxyindoleacetic acid in CSF of man: effect of cirrhosis of liver and probenecid administration. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 38:322–330

III- ARTICLE 3 EN COURS / BREVET BIOTINE DEPOSE

Voir Annexe 3

L'objectif principal de ce travail a été d'étudier le rôle respectif de l'hyperammoniémie et de l'inflammation dans l'EH, mais également l'implication éventuelle d'un déficit énergétique en se concentrant sur les anomalies de perméabilité de la BHE dans des modèles animaux de cirrhose. L'objectif secondaire a été d'étudier l'effet de différents traitements sur ces anomalies. Pour répondre à ce deuxième objectif, nous avons tenté de cibler chacune des anomalies physiopathologiques en administrant aux animaux du benzoate de sodium, de la RFX et, de façon innovante, de la biotine.

Le rationnel du traitement de l'EH par la biotine est fondé sur l'étude métabolomique réalisée dans le liquide céphalo-rachidien de patients atteints de cirrhose ayant une EH qui a montré une accumulation des composés acétylés dans le LCR suggérant une dérégulation du cycle de Krebs (55). Une concentration élevée d'acides aminés, d'acylcarnitines, d'acides biliaires et de nucléosides dans le LCR est également en faveur d'une modification de la perméabilité de la BHE dans l'EH. Ainsi, en faisant une analogie avec les anomalies physiopathologiques observées au cours de la sclérose en plaques, l'administration de fortes doses de biotine pourrait restaurer les anomalies du cycle de Krebs et améliorer les troubles liés à l'EH. En effet, la biotine, une vitamine hydrosoluble, agit comme un transporteur de CO_2 dans les réactions de carboxylation. Chez les mammifères, elle sert de co-facteur à quatre carboxylases impliquées dans le métabolisme des carbohydrates, des acides aminés et des acides gras. Les carboxylases qui sont biotine-dépendantes sont la pyruvate carboxylase, la 3-méthylcrotonyl-CoA carboxylase et la propionyl-CoA carboxylase qui génèrent des métabolites du cycle de Krebs en trois points d'entrée. L'acétyl-CoA carboxylase catalyse l'étape limitante dans la synthèse d'acides gras qui est la formation de malonyl-CoA à partir d'acétyl-CoA. La biotine pourrait également réguler certains gènes codant pour des enzymes ou des transporteurs impliqués dans son propre métabolisme (95). En clinique, la biotine est utilisée depuis des décennies dans les carences vitaminiques mais également en cosmétique. La dose maximale qui était autorisée par l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM) est de 15 mg/j dans le traitement de l'alopécie. L'utilisation de biotine à forte dose a été développée par l'entreprise Medday Pharmaceuticals pour traiter certaines affections neurologiques et notamment la sclérose en plaques d'évolution progressive (96) pour laquelle une ATU de cohorte est en cours. Les études de toxicité et de

pharmacocinétique n'ont pas montré de toxicité hépatique ni d'accumulation en cas d'insuffisance hépatique.

Ce travail a comporté les étapes suivantes : tout d'abord, nous nous sommes attachés à bien décrire et phénotyper les modèles de cirrhose, tant sur le plan hépatique que sur le plan neurologique. La recherche d'une EH, un dosage de l'ammoniémie et l'exploration d'une inflammation systémique ont été réalisés dans tous les groupes. Nous nous sommes ensuite concentrés sur la recherche d'une perméabilité anormale de la BHE dans les différents modèles. Nous avons étudié l'effet des différents traitements sur les anomalies observées. Enfin, nous avons proposé des expériences complémentaires afin de préciser les mécanismes impliqués en analysant l'infiltration leucocytaire intra-cérébrale, les jonctions serrées inter-cellulaires et les différentes voies du métabolisme énergétique par une analyse métabolomique.

MATERIEL ET METHODES

I- ANIMAUX

Des rats adultes mâles Wistar (Janvier Labs, Le Gesnest-Saint-Isle), pesant 175-200 g en début d'expérimentation, ont été utilisés pour l'ensemble des expériences. Ils étaient hébergés à raison de deux ou trois animaux par cage dans un environnement contrôlé (T°, taux d'humidité, cycles jour/obscurité de 12 heures).

Ils avaient un accès *ad libitum* à l'eau et à la nourriture standard.

Il était prévu que chaque groupe d'expérience inclue 15 animaux au moins. En raison d'une impossibilité d'hébergement des rats à l'animalerie en janvier 2018 puis d'août 2018 à janvier 2019 pour des raisons de contamination puis de travaux, certains groupes de rats ne sont pas encore complets. De nouvelles séries de rats sont actuellement en cours pour l'étude des jonctions serrées et de l'infiltration leucocytaire cérébrale (BDL et SHAM traités ou non par benzoate de sodium, rifaximine et biotine). Les sacrifices sont prévus en mai 2019. Lorsque le nombre de rats était inférieur à 10, le nombre de rats a été spécifié dans les figures (expériences avec la biotine).

Cette étude a été menée dans l'animalerie du Centre de Recherche agréée par la ministère de l'agriculture (C-75-12-01). Le protocole a été approuvé par le Comité National de Réflexion Ethique sur l'Experimentation Animale « Charles Darwin » (Ile-de-France, Paris, n°5) (N° 02215 / #3374).

II- MODELES DE CIRRHOSE :

II.1. LIGATURE-SECTION DE LA VOIE BILIAIRE PRINCIPALE (BDL)

La BDL a été utilisée comme modèle de cirrhose biliaire. Tous les rats de ce groupe ont été opérés. Ils étaient attribués de façon aléatoire soit au groupe BDL soit au groupe SHAM (témoins). Les rats SHAM ont subi une laparotomie avec exposition de la voie biliaire principale. La BDL, procédure maîtrisée dans le laboratoire, a été faite comme décrit précédemment dans la littérature (97); après ouverture de l'abdomen, la

voie biliaire principale était exposée puis ligaturée à la fois à sa partie supérieure (au plus près de la convergence biliaire) et à sa partie inférieure (au plus près du duodenum) à l'aide d'un fil de soie (6/0 Peters Medical). Elle était ensuite sectionnée entre ces deux ligatures.

La chirurgie était faite sous anesthésie générale par inhalation d'isoflurane Aerrane, Baxter Maurepas (induction 5% puis maintien 2-3%).

Une injection sous-cutanée de 1 ml de buprenorphine (Buprécare 0,3 mg/ml, Axience) immédiatement avant puis après la procédure permettait de contrôler la douleur per- et post-opératoire. Une troisième injection pouvait être répétée dans les 48 heures qui suivaient en cas de douleur constatée à l'examen de l'animal.

Les animaux étaient ensuite examinés deux fois par semaine et pesés de façon hebdomadaire. Ils étaient sacrifiés 6 à 7 semaines après la chirurgie. La décision de sacrifice était prise en fonction des points limites fixés par le comité d'éthique : perte de poids de plus de 20%, animal moribond, prostré, ayant le poil hérissé, les flancs creusés et une forte diminution de l'activité motrice.

II.2. TETRACHLORURE DE CARBONE (CCL₄)

Un deuxième modèle de cirrhose, toxique, par intoxication chronique au CCl₄ a été utilisé dans cette étude (98). Les rats recevaient du CCl₄ 1 ml/kg dilué dans de l'huile minérale par voie intra-gastrique deux fois par semaine pendant 10 semaines. Les contrôles recevaient 1 ml/kg d'huile minérale seule à la même fréquence.

III- **DIAGNOSTIC DE L'ENCEPHALOPATHIE HEPATIQUE : TEST COMPORTEMENTAL**

Afin d'objectiver les troubles neurologiques des animaux dans les différents modèles de cirrhose et de traitement, nous avons utilisé un OpenField (Bioseb), test comportemental validé chez les rats BDL (99). Le test était fait pour chaque rat le jour du sacrifice, dans des conditions d'expérimentation standardisées (horaire, lieu, lumière, bruit). L'animal était placé au centre d'une boîte carrée de 1m² et libre d'explorer son environnement pendant 6 minutes. Nous avons défini deux zones: centre et périphérie. Les paramètres d'activité étaient enregistrés en continu par une caméra tridimensionnelle placée au-dessus de l'espace d'étude. Les données

suivantes ont été analysées: distance totale parcourue (cm), durée d'activité (s), vitesse moyenne (cm/s), nombre de changements de zone, distance parcourue et temps passé dans chaque zone, nombre et durée des redressements. Nous avons choisi de présenter uniquement les résultats des paramètres les plus modifiés chez les rats BDL.

Les résultats obtenus dans l'Openfield permettaient de classer les rats ; nous considérons qu'ils présentaient une EH lorsque leur performance était moins bonne que la moins bonne valeur des SHAM ; les groupes étaient comparés au cours d'une même période de chirurgie, d'élevage puis de sacrifice afin de s'affranchir au maximum des variabilités liées à l'environnement.



Photo 1: Openfield

L'OpenField (Bioseb) est test comportemental validé chez les rats BDL. Le test est fait dans des conditions d'expérimentation standardisées (horaire, lieu, lumière, bruit). L'animal est placé au centre d'une boîte carrée de 1m² et libre d'explorer son environnement pendant 6 minutes. Deux zones sont définies : centre et périphérie. Les paramètres d'activité sont enregistrés en continu par une caméra tridimensionnelle placée au-dessus de l'espace d'étude. Les paramètres suivants sont enregistrés : distance totale parcourue, vitesse moyenne, durée d'activité, distance parcourue et temps passé dans les zones

périphérique et central, nombre de changements de zone, nombre et durée des redressements. Les paramètres retenus dans ce travail sont ceux qui étaient les plus constants et les plus représentatifs de troubles pouvant être attribués à l'EH : distance totale parcourue, vitesse moyenne, durée d'activité, nombre de redressements.

IV- TRAITEMENTS

IV.1. TRAITEMENT POTENTIALISANT L'ENCÉPHALOPATHIE HÉPATIQUE

Afin de majorer les troubles neurologiques induits par le modèle BDL, nous avons administré un traitement hyperammoniémiant validé (100). Il s'agissait d'un mélange d'acides aminés mimant la composition d'une molécule d'hémoglobine, mélangé à l'eau de boisson (6 g/kg/jour). Le régime était débuté 3 jours après la chirurgie ou le début de l'administration de CCl₄ et continué jusqu'au sacrifice. Quatre groupes de rats ont reçu ce régime hyperammoniémiant (NH₃) : BDL + NH₃, SHAM + NH₃, CCl₄ + NH₃, HUILE + NH₃. Le traitement NH₃ était comparé à l'eau de boisson seule.

IV.2. TRAITEMENTS DE L'ENCÉPHALOPATHIE HÉPATIQUE

La RFX, antibiotique non absorbable validé en pathologie humaine en prévention secondaire des épisodes d'EH, a été donné aux rats BDL ainsi qu'à leurs témoins du 3ème jour après chirurgie jusqu'au sacrifice à la dose de 50 mg/kg/jour mélangée à l'eau de boisson. En raison de l'absence de trouble neurologique significatif observé chez les rats CCl₄ dans l'Openfield (voir infra – résultats), seulement deux groupes de rats ont reçu ce traitement antibiotique : BDL + RFX, SHAM + RFX. Le traitement par RFX était comparé à l'eau de boisson seule.

Le benzoate de sodium (BNa), épurateur de l'ammoniaque validé en pathologie humaine dans les troubles génétiques du cycle de l'urée, et ayant montré une certaine efficacité dans le traitement de l'EH dans quelques études pilotes, a été administré à la dose de 200 mg/kg/jour mélangé à l'eau de boisson. Le traitement était débuté 3 jours après la chirurgie et continué jusqu'au sacrifice. Deux groupes de rats ont reçu ce traitement hypoammoniémiant (BNa) : BDL + BNa, SHAM + BNa. Le traitement par benzoate de sodium était comparé à l'eau de boisson seule. De façon identique à la RFX, les rats CCl₄ n'ayant pas présenté de trouble neurologique significatif, seuls les BDL ont reçu le benzoate de sodium.

La biotine, vitamine hydro-soluble et co-facteur dans certaines réactions enzymatiques du métabolisme des carbohydrates, actuellement en ATU de cohorte pour traiter la

sclérose en plaques progressive, a été administrée mélangée à une préparation de croquettes à partir du 3ème jour après la chirurgie et jusqu'au sacrifice. La dose était de 30 mg/kg/j soit 300 mg/kg de croquettes (équivalent à 5 mg/kg/j chez l'humain). L'effet de ce traitement a été comparé à des croquettes contrôles dont la composition était identique en dehors du principe actif qui était remplacé par un placebo. Quatre groupes de rats ont reçu ce traitement : BDL + biotine, SHAM + biotine, BDL + placebo, SHAM + placebo

V- PERMÉABILITÉ DE LA BHE

L'intégrité de la BHE était étudiée par la mesure de l'extravasation d'un dextran couplé à un fluorochrome, le Texas Red, ayant un poids moléculaire de 10 kDa (Life Technologies), du compartiment intra-vasculaire vers le tissu cérébral.

Le jour du sacrifice, les rats étaient anesthésiés profondément par de l'isoflurane inhalé. Le Texas Red (0,75 mL, 10 mg/mL in PBS) était injecté dans la veine fémorale; après un temps de circulation de 6 minutes, une thoracotomie était faite afin de réaliser un lavage intra-vasculaire par perfusion intra-cardiaque de 300 mL de PBS froid au débit de 40 ml/min (injection dans le ventricule gauche et ouverture de l'oreillette droite).

Après décapitation de l'animal, le cerveau était rapidement prélevés; les bulbes olfactifs et le cervelet étaient séparés. L'hémisphère droit était pesé puis congelé dans de l'azote liquide. Après 24-48h de conservation à -80°C, il était broyé au Tissue Lyser et centrifugé. La quantité de dextran fluorescent (en µg/g d'hémisphère) dans le surnageant était mesuré par fluorimétrie (Tecan Infinite M200) (excitation à 588 nm, émission à 620 nm). La concentration du fluorochrome était évaluée à l'aide d'une gamme colorimétrique.

VI- ANALYSES BIOCHIMIQUES ET HISTOLOGIQUES

Les échantillons de sang prélevés dans la veine cave inférieure le jour du sacrifice étaient centrifugés (8000 rpm, 10 minutes) et les plasma collectés permettaient de mesurer les concentrations de transaminases (ASAT, ALAT), la bilirubinémie (totale et conjuguée) et l'ammoniémie. Ces analyses étaient faites par le service de biochimie de l'hôpital Saint Antoine.

Le foie et la rate étaient prélevés pour être pesés puis une biopsie hépatique permettait de déterminer le statut de fibrose et donc de confirmer la présence d'une cirrhose par marquage au rouge Sirius après fixation dans du formol. Si le score METAVIR (101) n'était pas F4 pour les rats BDL et CCl₄, les animaux étaient exclus de l'analyse.

VII- DOSAGE DES CYTOKINES PRO-INFLAMMATOIRES PLASMATIQUES

Les cytokines TNF α , IFN γ et IL6 étaient dosées dans les plasmas collectés le jour du sacrifice à l'aide d'un kit commercial (Legendplex, Biolegend) utilisant des billes selon le principe du sandwich immunologique ; l'analyte soluble est capturé entre deux anticorps; pour chaque population de billes, l'intensité de la fluorescence est mesurée par cytométrie de flux (Cytotflex, Beckman Coulter); la concentration de chaque cytokine dans les échantillons est obtenue grâce à une gamme et l'analyse était faite par le logiciel Legendplex data.

VIII- ISOLEMENT DES MICROVAISSEAUX CÉRÉBRAUX

Afin d'étudier avec précision la BHE, nous avons isolé les microvaisseaux cérébraux à l'aide d'un protocole validé (102) et adapté par l'équipe de Martine Salmon-Cohen (Collège de France) qui consiste en une digestion mécanique puis centrifugation et filtration dans des solutions de dextran et BSA.

A partir du culot de microvaisseaux, nous isolions soit les ARN pour RT-PCR soit les protéines pour Western Blot.

Nous avons validé le protocole d'isolement en comparant les proportions d'ARN de cellules endothéliales (facteur de Von Willebrandt), péricytes (α SMA) et astrocytes (GFAP), entre le culot obtenu et un broyat de cerveau total par PCR. Nous avons également étalé sur lame un extrait du culot obtenu et vérifié en microscopie l'aspect tubulaire des structures isolées, évoquant la morphologie d'un microvaisseau (**Figure 2**).

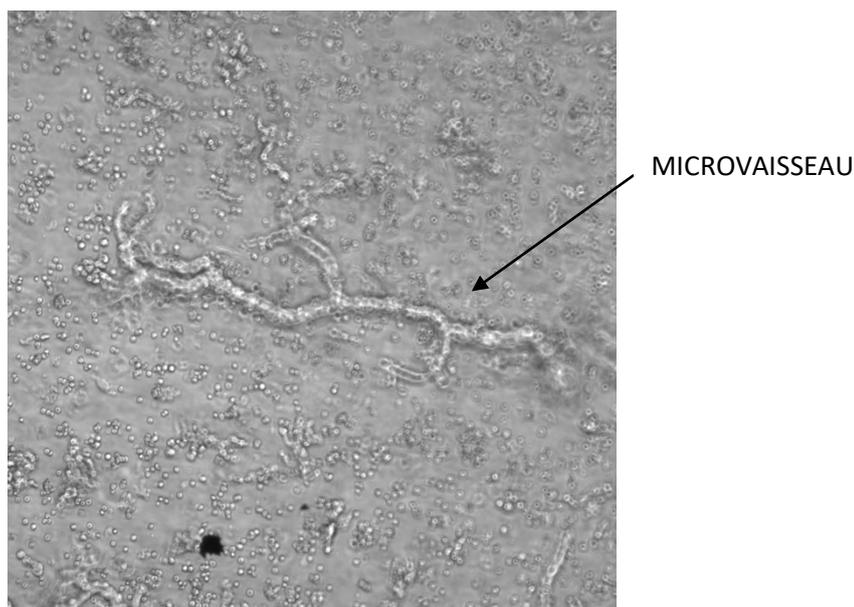


Figure 2 Microvaisseau

Microvaisseau issu du culot isolé, déposé sur lame de verre, visualisé en microscopie optique.

Par ailleurs, la comparaison en RT-PCR de la composition du culot de microvaisseaux à celle d'un cerveau total a montré une proportion significativement plus importante de péricytes (α SMA) et de cellules endothéliales (facteur de Von Willebrandt) associée à une quantité moindre d'astrocytes (marqueur GFAP).

(Figure 3a, b et c)

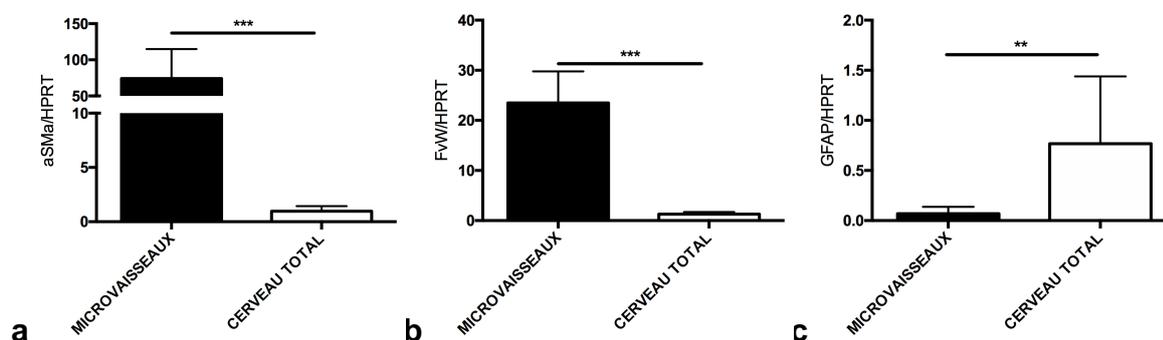


Figure 3 Comparaison microvaisseaux vs cerveau total, RT-PCR

3.a. RT-PCR aSMA comparée au gène de référence HPRT : le culot de microvaisseaux contient une proportion significativement plus élevée de péricytes ($p=0,0004$) que le cerveau total ($n=6$ dans chaque groupe)

3.b. PCR facteur von Willebrandt comparée au gène de référence HPRT : le culot de microvaisseaux contient une proportion significativement plus élevée de cellules endothéliales ($p=0,0004$) que le cerveau total ($n=6$ dans chaque groupe)

3.c. PCR GFAP comparée au gène de référence HPRT : le culot de microvaisseaux contient une proportion significativement plus basse d'astrocytes ($p=0,0022$) que le cerveau total ($n=6$ dans chaque groupe)

(* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ Dunn's test)

IX- ETUDE DES JONCTIONS SERRÉES CÉRÉBRALES PAR qRT-PCR

Les microvaisseaux isolés destinés à l'analyse en PCR étaient resuspendus dans du tampon RLT et les ARN totaux étaient extraits à l'aide d'un kit commercial (MicroKit Plus, Qiagen) puis quantifiés par spectrophotométrie. La transcription inverse en ADN simple brin était réalisée grâce à un kit commercial (High capacity cDNA reverse transcription kit, Applied Biosystems) et la PCR quantitative était faite à l'aide de SYBR Green Master Mix (LightCycler 480 SYBR Green I Master, Roche). Les amorces utilisées pour l'amplification ciblaient les gènes de la claudine 5, de l'occludine et de zonula occludens (103).

GENE	AMORCE
Claudine 5 F	TGGAAGGGGCTGTGGATG
Claudine 5 R	GCCGGTCAAGGTAACAAAGAG
Occludine F	GGGACAGAGCCTATGGAACG
Occludine R	CCAAGGAAGCGATGAAGCA
ZO1 F	TCCAGTCCCTTACCTTTTCGC
ZO1 R	CGGCAATGACACTCCTTCG

Tableau 1 : Amorces pour les PCR des gènes de jonctions serrées

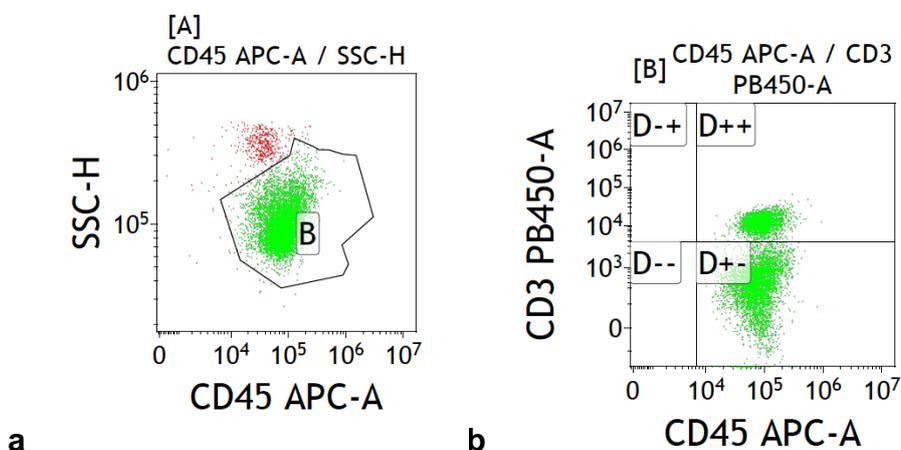
Les calculs étaient faits selon la méthode du delta delta Ct (104) et les données exprimées en modification relative d'expression par rapport à l'ARNm de référence HPRT.

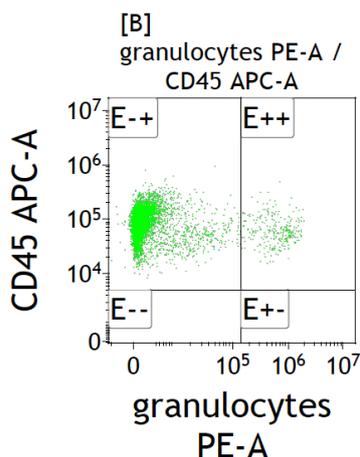
X- ISOLEMENT DES LEUCOCYTES INTRA-CÉRÉBRAUX

Afin de déterminer s'il existe une infiltration leucocytaire dans le tissu cérébral des rats atteints de cirrhose, nous avons isolé les cellules inflammatoires à l'aide d'un protocole validé (105) basé sur une digestion mécanique puis séparation dans un gradient de Percoll (70%, 37%, 30%). Le culot de cellules inflammatoires isolées était marqué par des anticorps couplés à des fluorochromes (CD45, CD3, granulocyte – Miltenyi) et lu en cytométrie de flux. Nous avons préalablement utilisé un contrôle positif de ce protocole par induction d'une encéphalomyélite auto-immune (EAE) sur des rats Agouti.

L'induction de l'EAE a consisté en une injection sous-cutanée de protéine recombinante rMOG (100 µg dans 100 µL de serum physiologique mélangés à 100 µL d'eau sterile) chez des rates Agouti (106). Après environ 10 jours les animaux présentaient une paralysie du train arrière et étaient alors sacrifiés.

Les anticorps ont également été validés sur des PMBC (cellules mononucléées sanguines périphériques) isolées du plasma d'un rat Wistar contrôle (protocole validé utilisé en routine dans notre laboratoire basé sur une séparation par centrifugation dans du Ficoll) ainsi que sur des cellules de rate mélangées à un broyat de cerveau puis isolées grâce au protocole sus-cité (**Figure 4a, b et c**).





c

Figure 4 Validation des anticorps CD45, CD3, granulocyte sur rate et cerveau mélangés

4.a. Isolement des leucocytes à partir d'une rate mélangée à un broyat de cerveau; marquage par un anticorps anti-CD45 et lecture en cytométrie de flux; population B positive pour CD45 dans l'isolat total

4.b. Isolement des leucocytes à partir d'une rate mélangée à un broyat de cerveau; marquage par un anticorps anti-CD3 et lecture en cytométrie de flux; population D+/+ positive pour CD3 dans la population positive pour CD45 (figure 4.a)

4.c. Isolement des leucocytes à partir d'une rate mélangée à un broyat de cerveau; marquage par un anticorps anti-granulocyte et lecture en cytométrie de flux; population E+/+ positive pour granulocyte parmi la population positive pour CD45 (figure 4.a)

XI- METABOLOMIQUE

Expériences en attente

Afin de préciser les modifications du métabolisme énergétique au cours de l'EH, certains groupes de rats ont été sacrifiés afin de prélever le plasma, une biopsie hépatique et l'hémisphère cérébral gauche. Les échantillons ont été adressés au Centre d'Énergie Atomique Saclay (CEA, Medday Pharmaceuticals) afin de réaliser une étude métabolomique.

XII- ANALYSE STATISTIQUE

Les données sont présentées en moyenne +/- dérivation standard et analysées avec le logiciel Prism (Graphpad, v5.0c). Les différences entre les groupes ont été comparées par une analyse de variance type ANOVA avec un test de Kruskal-Wallis. Lorsque ce test identifiait une différence statistiquement significative entre les groupes ($p < 0,05$, intervalle de confiance à 95%), un test de correction de Dunnet's permettait de comparer les groupes 2 à 2. La différence était considérée comme significative lorsque le coefficient p était inférieur à 0,05.

Les corrélations sont calculées par un test de Spearman.

RESULTATS

I- PHENOTYPAGE DES RATS BDL ET CCL4

I.1. HISTOLOGIE DU FOIE

Les rats témoins SHAM et Huile minérale présentaient bien un foie normal en histologie. En revanche, les rats BDL et traités par CCl₄ avaient, comme attendu, une cirrhose avec un score METAVIR F4 chez 100 % des animaux. Dans les 2 cas, il existait une destruction de l'architecture normale du tissu avec apparition de travées fibreuses jointives et de nodules de régénération. Cependant, des différences ont été observées en fonction du modèle. En effet, la dilatation des canaux biliaires au sein d'une architecture hépatique détruite prédomine chez les BDL alors que ce sont les travées fibreuses qui sont au premier plan chez les CCl₄ (**Figure 5**).

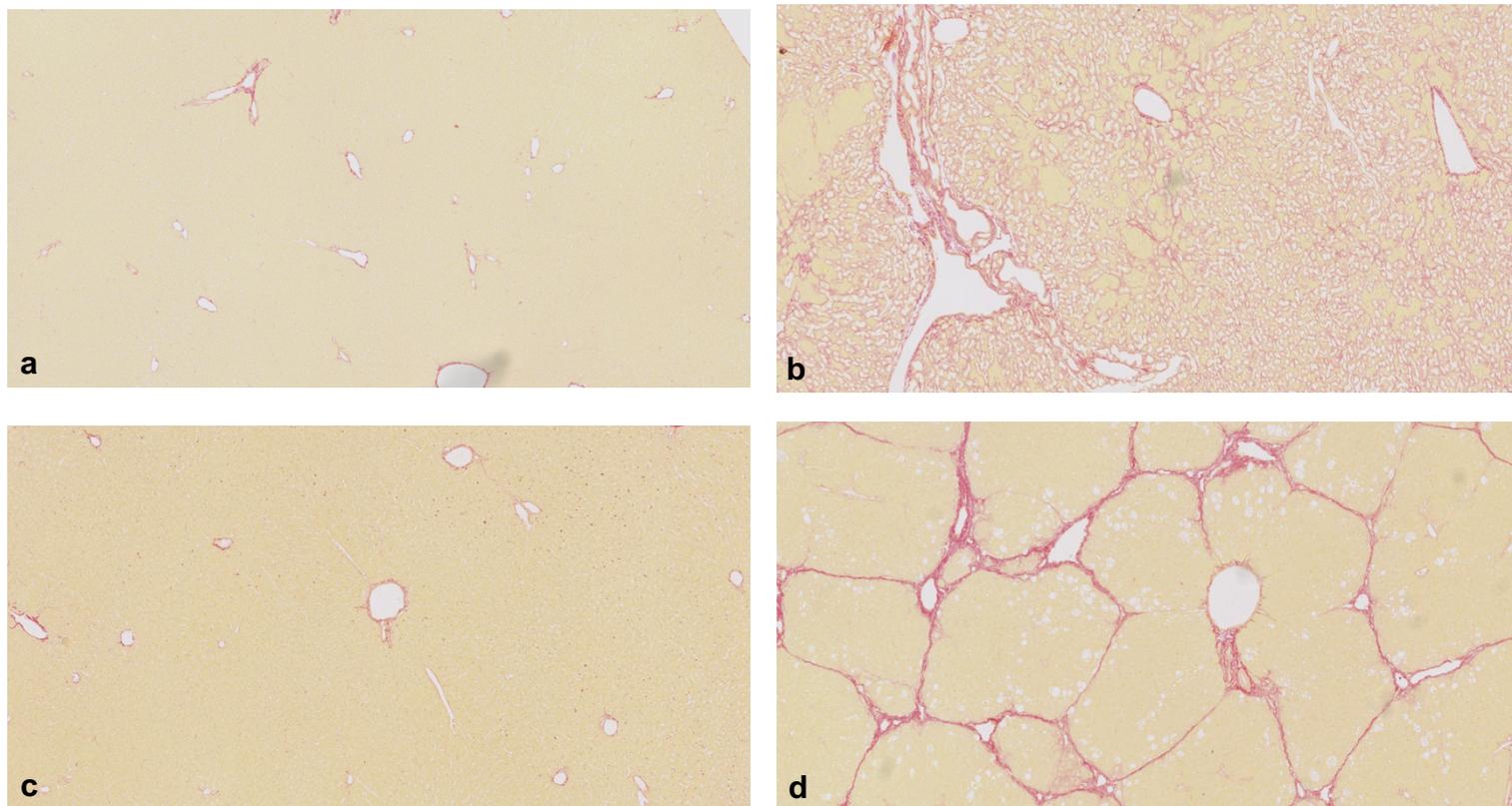


Figure 5 Biopsie hépatique des différents modèles de rats

5.a. Rat SHAM, x5, rouge Sirius, foie normal

5.b. Rat BDL, X5, rouge Sirius, cirrhose biliaire, ponts fibreux, nodules de régénération, dilatation et prolifération des canalicules biliaires

5.c. Rat Huile Minérale, X5, rouge Sirius, foie normal

5.d. Rat CCl₄, X5, rouge Sirius, cirrhose toxique, larges ponts fibreux reliant les espaces portes entre eux ou aux veines centro-lobulaires, nodules de régénération.

I.2. BIOCHIMIE : BILAN HEPATIQUE

Il existait, comme attendu, des anomalies des tests hépatiques dans les deux modèles de cirrhose mais celles-ci ne prédominaient pas sur les mêmes paramètres.

En effet, les rats BDL avaient des taux de bilirubine totale très élevés, significativement supérieurs à ceux des CCl₄ (**) et des contrôles SHAM (***) (**Figure 6.a.** ; respectivement 151,2 +/- 10,3 vs 7 +/- 1,3 vs 1,8 +/- 0,14 µM). Les CCl₄ avaient une augmentation de la bilirubine totale qui n'était pas statistiquement différente de celle

des rats contrôles recevant l'huile minérale (respectivement $7 \pm 1,3$ vs $1,7 \pm 0,14$ μM ns). Les BDL avaient également une élévation des transaminases hépatiques en comparaison aux SHAM mais qui étaient nettement moins importante que chez les rats CCl₄. Ceci était valable tant pour les ASAT (**Figure 6.b.** ; BDL vs SHAM, respectivement $284,5 \pm 24,2$ vs $58,1 \pm 4,6$ UI/L *** ; CCl₄ vs BDL 2096 ± 350 vs $284,5 \pm 24,2$ UI/L ** ; CCl₄ vs Huile 2096 ± 350 vs $62,1 \pm 3,6$ UI/L ***) que pour les ALAT (**Figure 6.c.** ; BDL vs SHAM, respectivement $81,9 \pm 5,3$ vs $46,7 \pm 2,3$ UI/L * ; CCl₄ vs BDL 2235 ± 308 vs $81,9 \pm 5,3$ UI/L ** ; CCl₄ vs Huile 2235 ± 308 vs $45,4 \pm 3,1$ UI/L ***).

Ces anomalies sont concordantes avec les modèles puisque la BDL induit une cirrhose biliaire donc essentiellement une hyperbilirubinémie alors que le CCl₄ induit une cirrhose toxique donc essentiellement une cytolyse avec élévation majeure des ASAT et ALAT.

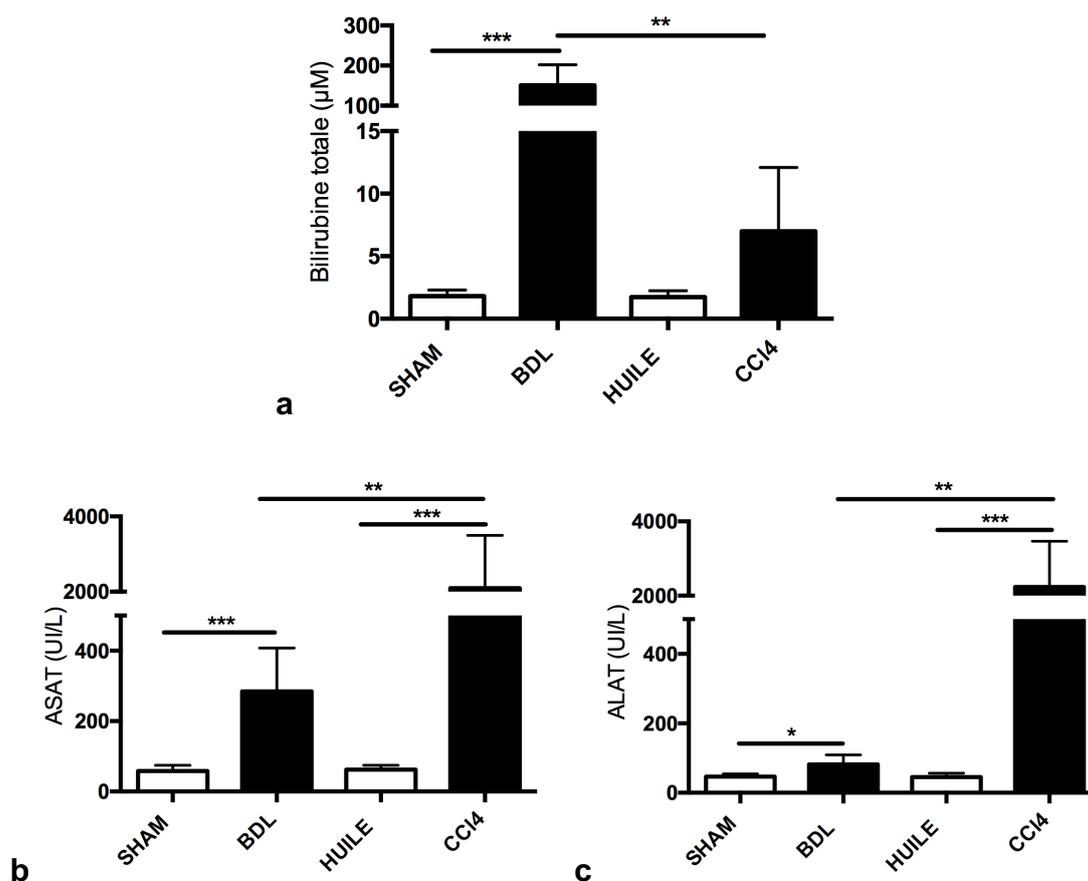


Figure 6 Bilirubine totale, ASAT et ALAT chez les rats BDL, CCl4 et leurs contrôles

6.a. Bilirubine totale (μM) plasmatique le jour du sacrifice (ANOVA $p < 0,0001$) ; le taux est significativement plus élevé chez les rats BDL que chez les SHAM (*) mais aussi que chez les rats CCl4 (**). Les rats CCl4 ont une bilirubinémie totale qui n'est pas statistiquement différente de leur contrôle huile minérale.**

6.b. ASAT (UI/L) le jour du sacrifice (ANOVA $p < 0,0001$) ; le taux est significativement plus élevé chez les rats CCl4 que chez les huile minérale (*) mais aussi que chez les rats BDL (**). Les rats BDL ont des ASAT significativement plus élevées que leur contrôle SHAM (***)**

6.c. ALAT (UI/L) le jour du sacrifice (ANOVA $p < 0,0001$) ; le taux est significativement plus élevé chez les rats CCl4 que chez les huile minérale (*) mais aussi que chez les rats BDL (**). Les rats BDL ont des ASAT significativement plus élevées que leur contrôle SHAM (*).**

(* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ Dunn's test)

II- AMMONIEMIE ET CYTOKINES INFLAMMATOIRES DANS LES DIFFERENTS MODELES

II.1. AMMONIEMIE

Les rats ayant une cirrhose ont une hyperammoniémie significativement plus élevée que les rats contrôles (**Figure 7a et b** : SHAM vs BDL respectivement $60,58 \pm 4,33$ vs $147,7 \pm 11,05 \mu\text{M}$ *** ; HUILE vs CCl4 respectivement $79,5 \pm 5,3$ vs $104,2 \pm 7,8 \mu\text{M}$ *).

Les groupes recevant le régime hyperprotéiné NH3 ont une ammoniémie comparable à ceux ne recevant par le traitement (**Figure 7a et b** : BDL vs BDL + NH3 respectivement $147,7 \pm 11,05$ vs $158,3 \pm 16,86 \mu\text{M}$ ns ; CCl4 vs CCl4 + NH3 respectivement $115,5 \pm 9,9$ vs $104,2 \pm 7,8 \mu\text{M}$ ns).

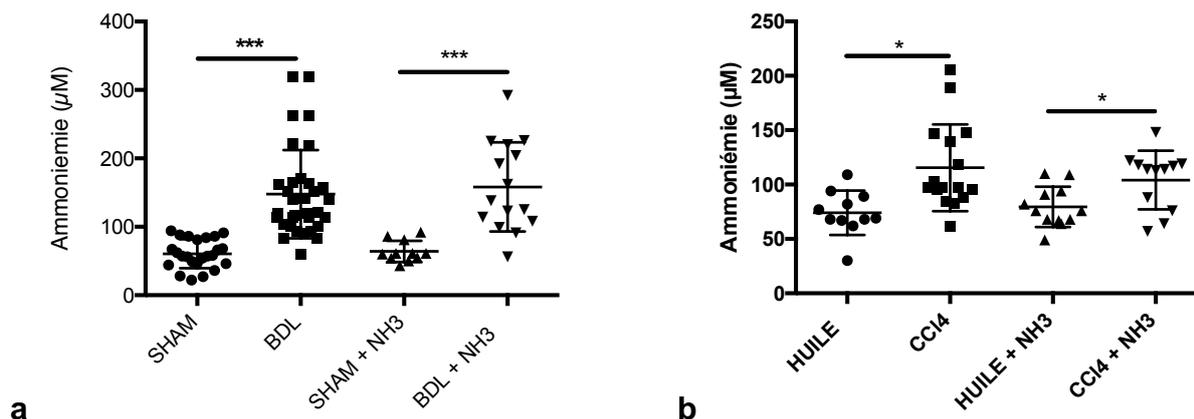


Figure 7 Ammonniémie des rats BDL et CCl4

7.a. Ammonniémie (µM) le jour du sacrifice des rats BDL et leurs contrôles SHAM traités ou non par régime hyperammonniémiant (NH3) (ANOVA $p < 0,0001$) ; les rats BDL ont une ammonniémie significativement plus élevée que les contrôles SHAM (*) mais qui n'est pas différente de ceux recevant le régime NH3.**

7.b. Ammonniémie (µM) le jour du sacrifice des rats CCl4 et leurs contrôles huile minérale traités ou non par régime hyperammonniémiant (NH3) (ANOVA $p = 0,0017$) ; les rats CCl4 ont une ammonniémie significativement plus élevée que les contrôles huile (*) mais qui n'est pas différente de ceux recevant le régime NH3.

(* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ Dunn's test)

II.2. CYTOKINES INFLAMMATOIRES

Les rats BDL avaient des taux plasmatiques de $TNF\alpha$ le jour de leur sacrifice significativement plus élevés que les contrôles SHAM ($39,76 \pm 5,153$ vs $24,39 \pm 4,052$ pg/ml *) et que les rats CCl4 ($39,76 \pm 5,153$ vs $25,42 \pm 12,77$ pg/ml *). Le taux de $TNF\alpha$ des rats CCl4 n'était pas statistiquement différent des rats contrôles recevant l'huile minérale ($25,42 \pm 12,77$ vs $15,37 \pm 8$ pg/ml) (ANOVA 0,0137) (**Figure 8a**). Les BDL avaient également des taux d' $IFN\gamma$ plus élevés que les rats SHAM ($91,42 \pm 48$ vs $41,41 \pm 8,28$ pg/ml) et que les CCl4 ($91,42 \pm 48$ vs $25,23 \pm 19$ pg/ml *). Le taux d' $IFN\gamma$ chez les CCl4 n'était pas significativement différent des rats contrôles recevant l'huile minérale ($25,23 \pm 19$ vs $17,79 \pm 7,36$ pg/ml) (ANOVA 0,016) (**Figure 8b**). Les taux d'IL6 des rats BDL étaient également significativement plus élevés que chez les SHAM ($305,9 \pm 87,13$ vs $100,2 \pm 20,32$ *) et que chez les CCl4 ($305,9 \pm 87,13$ vs $32,77 \pm 16,41$ **). Le taux d'IL6 des CCl4 n'était pas différent des rats

recevant l'huile minérale (32,77 +/- 16,41 vs 42 +/- 36 pg/ml) (ANOVA 0,0023) (**Figure 8c**).

Le modèle de rats BDL a donc un profil nettement plus inflammatoire que les rats CCl4 au moment du sacrifice. Le régime hyperammonémiant n'augmentant pas l'encéphalopathie chez les rats BDL et CCl4, les cytokines n'ont pas été dosées chez ces animaux (cf Chapitre III).

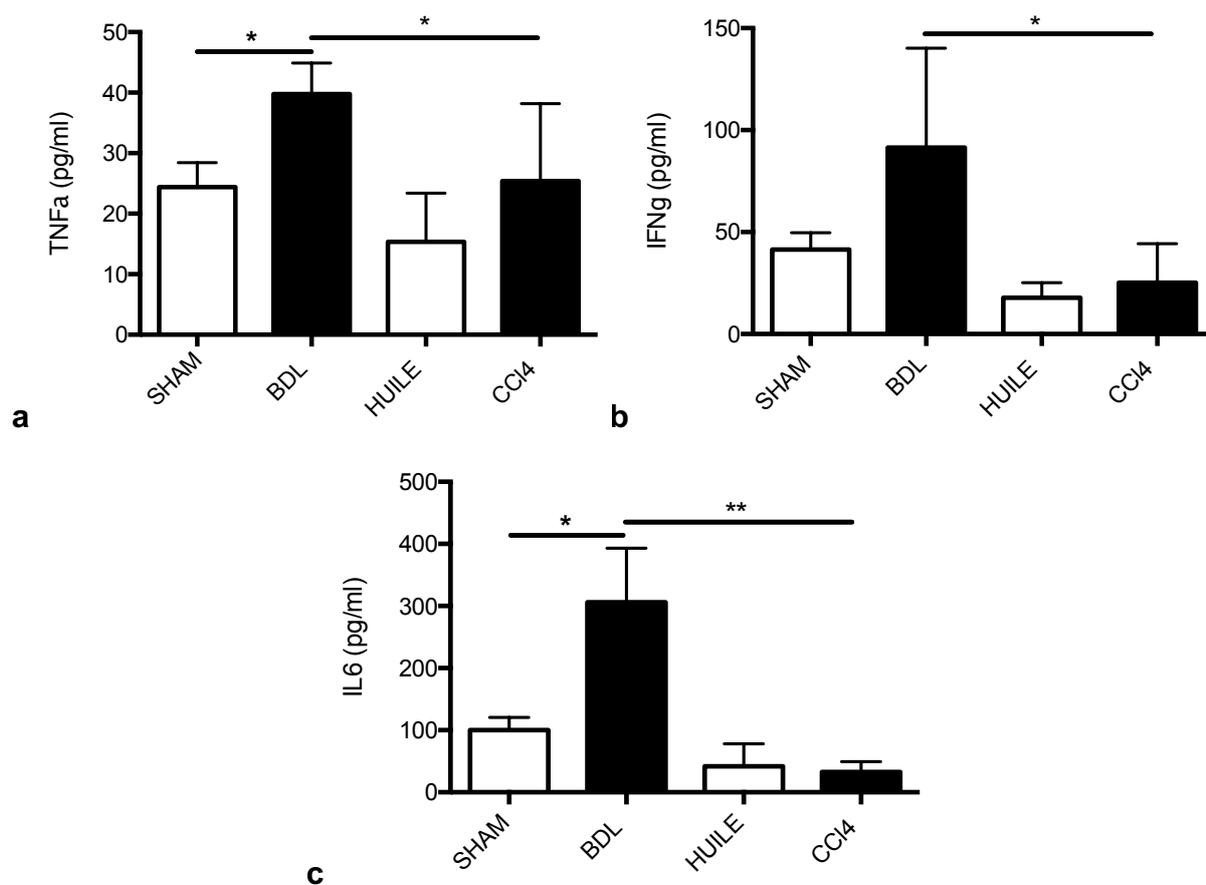


Figure 8 Cytokines inflammatoires chez les rats BDL et CCI4

8.a. Taux plasmatiques de $TNF\alpha$ chez les rats BDL, CCI4 et leurs contrôles SHAM et Huile minérale (pg/ml)

8.b. Taux plasmatiques d' $IFN\gamma$ chez les rats BDL, CCI4 et leurs contrôles SHAM et Huile minérale (pg/ml)

8.c. Taux plasmatiques d' $IL6$ chez les rats BDL, CCI4 et leurs contrôles SHAM et Huile minérale (pg/ml)

(* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ Dunn's test)

III- EVALUATION DE L'EH DANS LES DIFFERENTS MODELES

III.1. MODELE BDL

Les rats BDL et BDL + NH_3 présentaient une distance totale parcourue en 6 minutes significativement plus courte (ANOVA $p = 0,0002$) que les rats contrôles SHAM et SHAM + NH_3 (BDL vs SHAM respectivement $662,1 \pm 106$ vs $1772 \pm 167,8$ cm *** ; BDL + NH_3 vs SHAM + NH_3 respectivement $543,3 \pm 208,6$ cm vs $1588 \pm 185,9$ cm *) (**Figure 9a**), une vitesse moyenne significativement plus basse (ANOVA $p = 0,0003$) (BDL vs SHAM respectivement $6,1 \pm 0,3$ vs $9,0 \pm 0,3$ cm/s **; BDL + NH_3 vs SHAM + NH_3 respectivement $5,67 \pm 0,76$ vs $8,43 \pm 0,35$ cm/s *) (**Figure 9b**), une durée d'activité significativement plus courte (ANOVA $p = 0,0002$) (BDL vs SHAM respectivement $101,6 \pm 11,7$ vs $192,1 \pm 12,8$ s **; BDL + NH_3 vs SHAM + NH_3 respectivement $80,14 \pm 19,13$ vs $187,3 \pm 21,71$ s *) (**Figure 9c**), et un nombre de redressements significativement moins important (ANOVA $p = 0,017$) (BDL vs SHAM respectivement 20 ± 3 vs 30 ± 3 *) ; BDL + NH_3 vs SHAM + NH_3 respectivement 13 ± 4 vs 34 ± 2 ns) (**Figure 9d**).

En revanche, les rats BDL traités par régime hyperammonémiant n'avaient pas un comportement différent des rats BDL non traités.

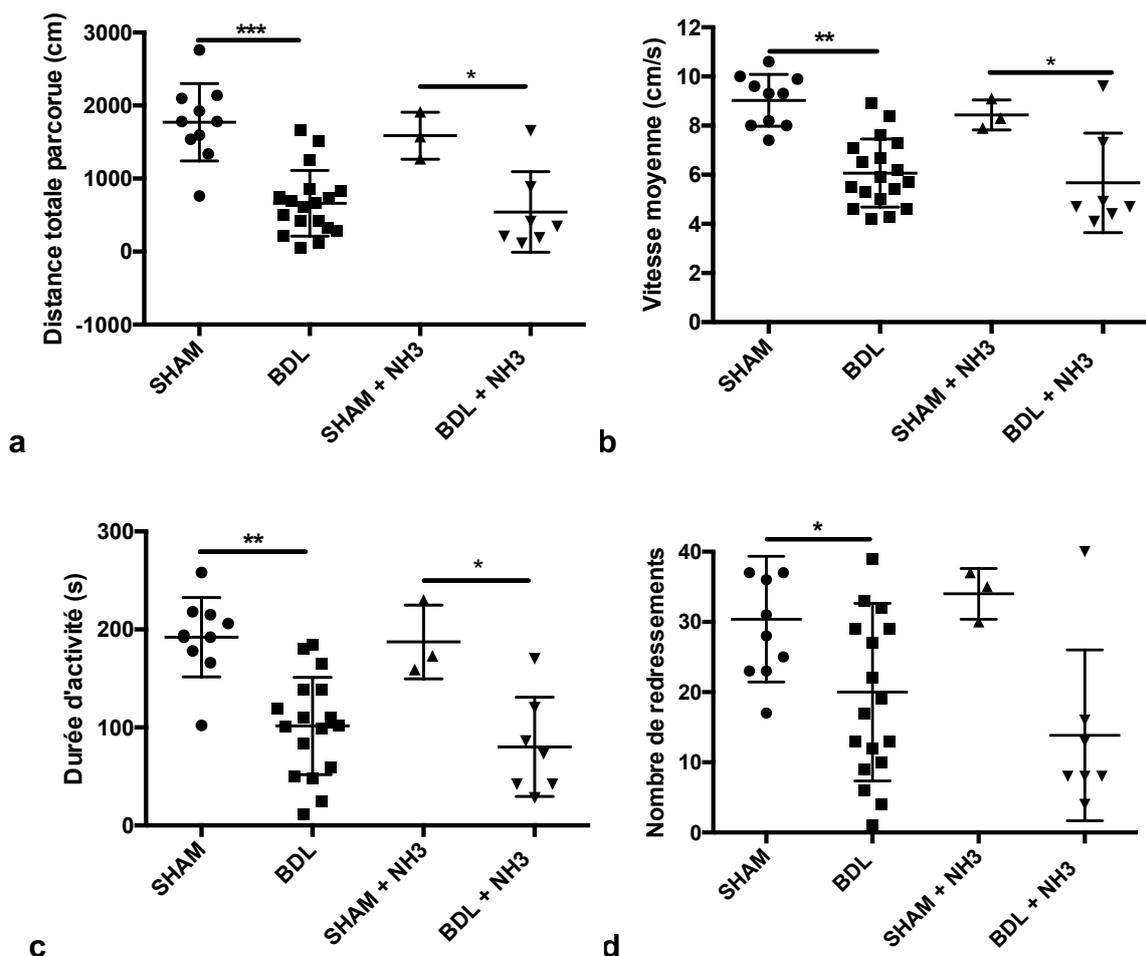


Figure 9 Openfield des rats BDL

9.a. Distance totale parcourue par les rats BDL traités ou non par régime hyperammonémiant (NH3) et leurs contrôles SHAM dans l'Openfield en 6 minutes

9.b. Vitesse moyenne des rats BDL traités ou non par régime hyperammonémiant (NH3) et leurs contrôles SHAM dans l'Openfield en 6 minutes

9.c. Durée d'activité des rats BDL traités ou non par régime hyperammonémiant (NH3) et leurs contrôles SHAM dans l'Openfield en 6 minutes

9.d. Nombre de redressements des rats BDL traités ou non par régime hyperammonémiant (NH3) et leurs contrôles SHAM dans l'Openfield en 6 minutes

(* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ Dunn's test)

Selon les résultats de l'Openfield, nous avons pu déterminer pour chaque sous-groupe d'animaux des valeurs seuils selon lesquelles ils étaient désignés comme ayant ou non une EH. Ainsi, les BDL présentaient pour la plupart une EH (75,76%) ; Le régime NH3 ne faisait pas augmenter la proportion de rats BDL encéphalopathes (68,75%) ;

de ce fait, nous avons considéré par la suite que le modèle BDL évoluant suffisamment longtemps permettait de faire apparaître une EH chez $\frac{3}{4}$ environ des animaux sans nécessité de potentialiser par un régime hyperammonémiant. Comme attendu, aucun rat contrôle SHAM n'avait d'anomalie à l'Openfield (**Figure 10**).

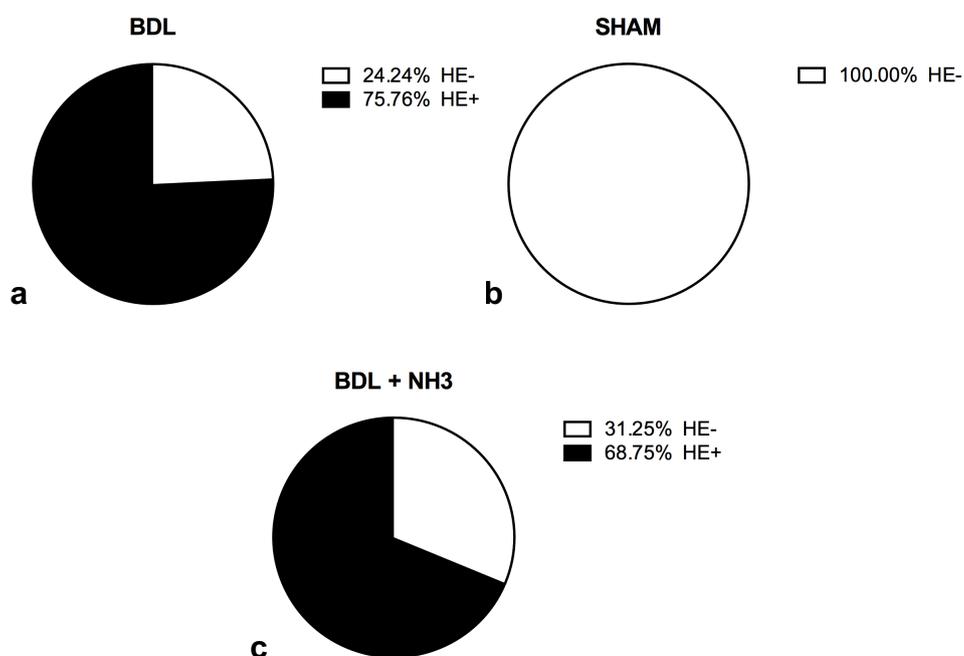


Figure 10 Proportion d'EH chez les rats BDL

10.a. Proportion d'EH chez les rats BDL

10.b. Proportion d'EH chez les rats SHAM

10.c. Proportion d'EH chez les rats BDL traités par régime hyperammonémiant (NH3)

(HE- : EH absente ; HE+ : EH présente)

III.2. MODELE CCL4

Les rats ayant une cirrhose induite par le CCl₄, qu'ils soient traités ou non par le régime hyperammonémiant avaient une distance totale parcourue (huile vs CCl₄ 1697 +/- 150,7 vs 1460 +/- 192 cm ns et huile + NH₃ vs CCl₄ + NH₃ 1591 +/- 162,3 vs 1360 +/- 209,1 cm ns) (**Figure 11a**), une vitesse moyenne (huile vs CCl₄ 8,65 +/- 0,51 vs 7,98 +/- 0,48 cm/s ns et huile + NH₃ vs CCl₄ + NH₃ 8,1 +/- 0,42 vs 8,1 +/- 0,52 cm/s ns)

(**Figure 11b**), une durée d'activité (huile vs CCl4 176 +/- 14,16 vs 168,1 +/- 16,6 s ns et huile + NH3 vs CCl4 + NH3 192,9 +/- 12,7 vs 162 +/- 20,12 s ns) (**Figure 11c**), et un nombre de redressements (huile vs CCl4 30,75 +/- 2,7 vs 28,13 +/- 2,91 ns et huile + NH3 vs CCl4 + NH3 30,33 +/- 2,17 vs 24,25 +/- 3,41 ns) (**Figure 11d**) qui n'étaient pas différents des contrôles qui recevaient l'huile minérale (respectivement $p=0,69$, $p=0,84$, $p=0,67$, $p=0,47$).

Les rats CCl4 traités par régime hyperammonémiant n'avaient pas un comportement différent des rats BDL non traités.

Nous pouvons donc considérer au vu de ces résultats que la cirrhose induite par le CCl4 ne rend pas les rats encéphalopathes.

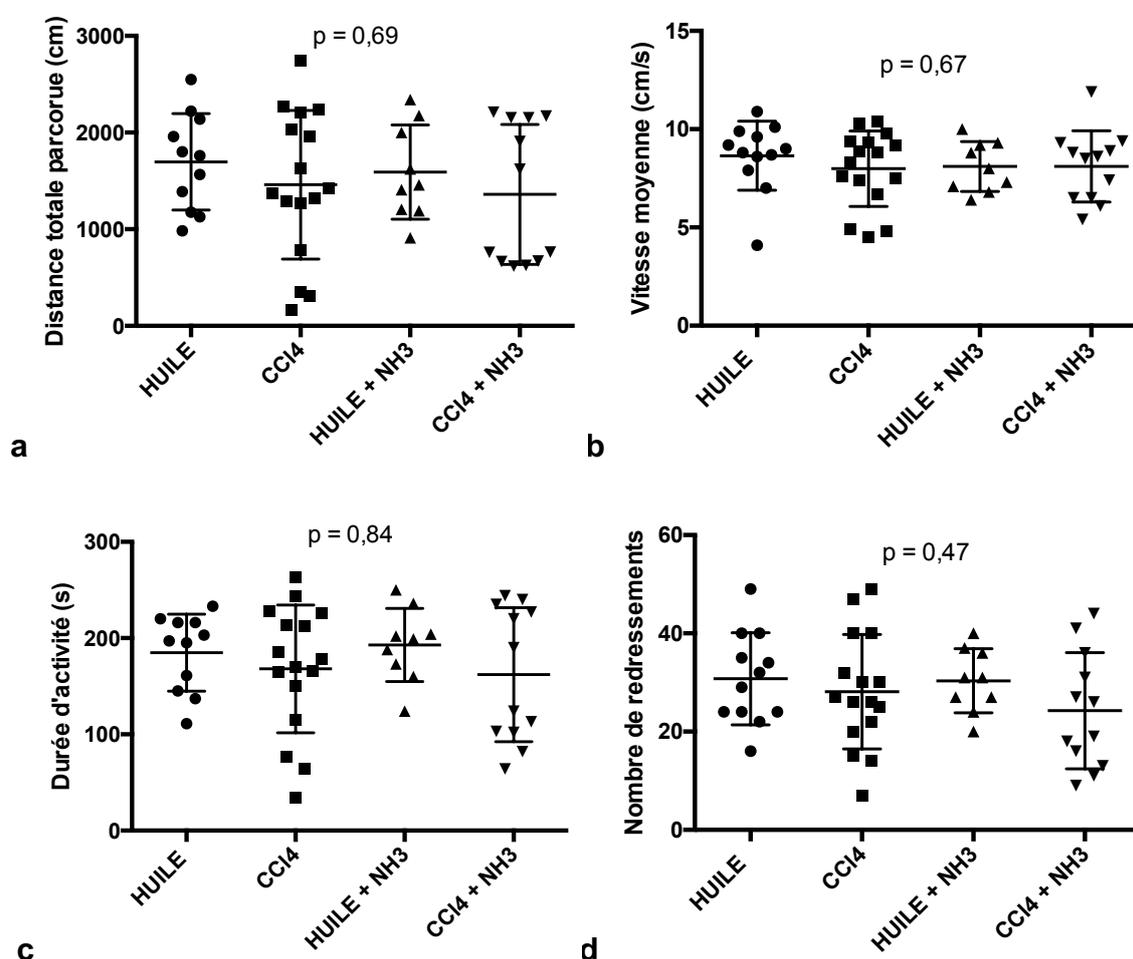


Figure 11 Openfield des rats CCl4

11.a. Distance totale parcourue par les rats CCl4 traités ou non par régime hyperammonémiant (NH3) et leurs contrôles Huile minérale dans l'Openfield en 6 minutes

11.b. Vitesse moyenne des rats CCl₄ traités ou non par régime hyperammonémiant (NH₃) et leurs contrôles Huile minérale dans l'Openfield en 6 minutes

11.c. Durée d'activité des rats CCl₄ traités ou non par régime hyperammonémiant (NH₃) et leurs contrôles Huile minérale dans l'Openfield en 6 minutes

11.d. Nombre de redressements des rats CCl₄ traités ou non par régime hyperammonémiant (NH₃) et leurs contrôles Huile minérale dans l'Openfield en 6 minutes

Le reste des expériences a été uniquement analysé chez les animaux sans régime hyperammonémiant, puisque ce dernier n'induisait pas d'EH. Cependant, pour certaines expériences, comme la perméabilité de la BHE, nous disposions des groupes de rats sous régime car ces expériences avaient été prévues chez les rats dont le comportement a été analysé. Nous en rapportons donc les résultats.

IV- RELATION ENTRE EH ET AMMONIEMIE

IV.1. MODELE BDL

L'ammoniémie des rats BDL était significativement plus élevée que chez les contrôles SHAM et ce d'autant plus qu'ils présentaient une EH à l'Openfield (ANOVA $p < 0,0001$) (SHAM vs BDL EH+ ; SHAM vs BDL EH- respectivement $60,6 \pm 4,3$ vs $159,2 \pm 11,4$ *** et $116,7 \pm 10,1 \mu\text{M}$ ** ; BDL EH+ vs BDL EH- $159,2 \pm 11,4$ vs $116,7 \pm 10,1 \mu\text{M}$ *) (Figure 12).

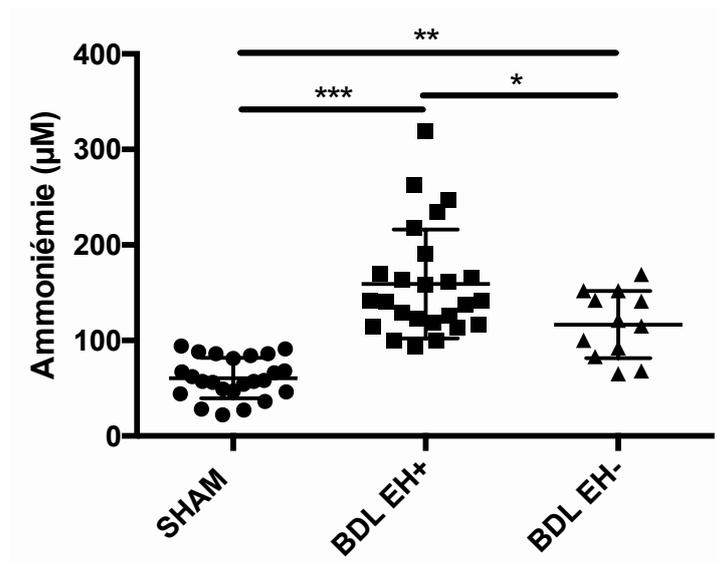


Figure 12 Ammoniémie des rats BDL avec ou sans EH

(EH+ : EH présente, EH- : EH absente ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ Dunn's test)

Les paramètres de l'Openfield étaient corrélés à l'ammoniémie.

En effet, la diminution de la distance totale parcourue et la baisse de la vitesse moyenne étaient statistiquement corrélées à l'augmentation de l'ammoniémie (respectivement ($|r| = 0,37$, $p = 0,03$ / $|r| = 0,47$, $p = 0,006$). La durée d'activité et le nombre de redressements tendaient à diminuer également lorsque l'ammoniémie s'élevait ($|r| = 0,31$, $p = 0,07$ / $|r| = 0,28$, $p = 0,10$). (Figure 13a, b, c et d)

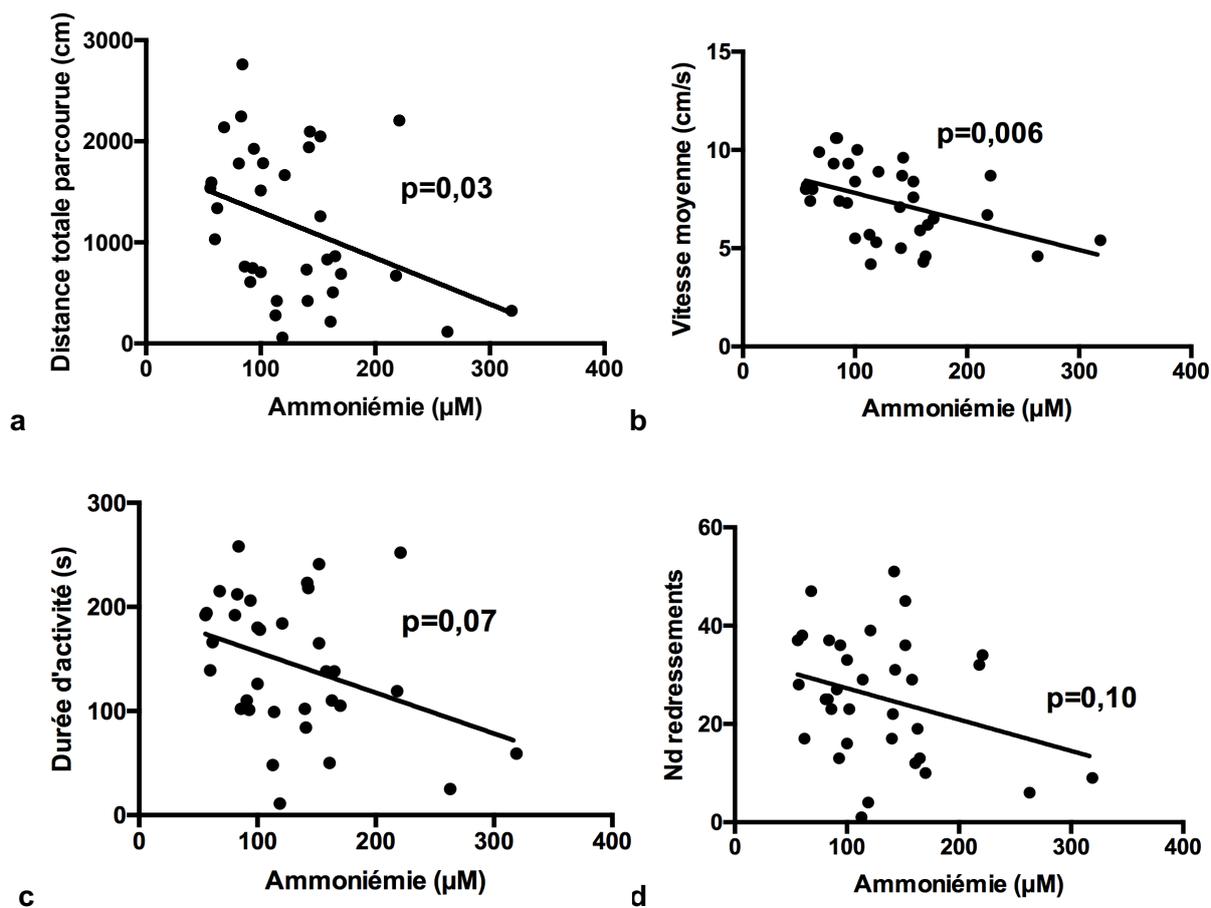


Figure 13 Corrélation ammoniémie et paramètres de l'Openfield chez les rats BDL et leurs contrôles SHAM

13.a. Corrélation ammoniémie et distance parcourue dans l'Openfield chez les rats BDL et les contrôles SHAM

13.b. Corrélation ammoniémie et vitesse moyenne dans l'Openfield chez les rats BDL et les contrôles SHAM

13.c. Corrélation ammoniémie et durée d'activité dans l'Openfield chez les rats BDL et les contrôles SHAM

13.d. Corrélation ammoniémie et nombre de redressements dans l'Openfield chez les rats BDL et les contrôles SHAM

IV.2. MODELE CCL4

Les rats CCl₄ ne sont pas encéphalopathes. Nous avons toutefois regardé si l'ammoniémie influençait, même de façon minime, les paramètres de l'Openfield. Chez les rats ayant une cirrhose induite par le CCl₄, l'augmentation de l'ammoniémie n'était pas corrélée à la distance totale parcourue ($|r|= 0,07$, $p=0,74$), ni à la durée d'activité

($|r|= 0,009$, $p=0,96$), ni à la vitesse moyenne ($(|r|= 0,09$, $p=0,64$) ni au nombre de redressements ($|r|=0,006$, $p=0,97$). (Figure 14 a, b, c et d)

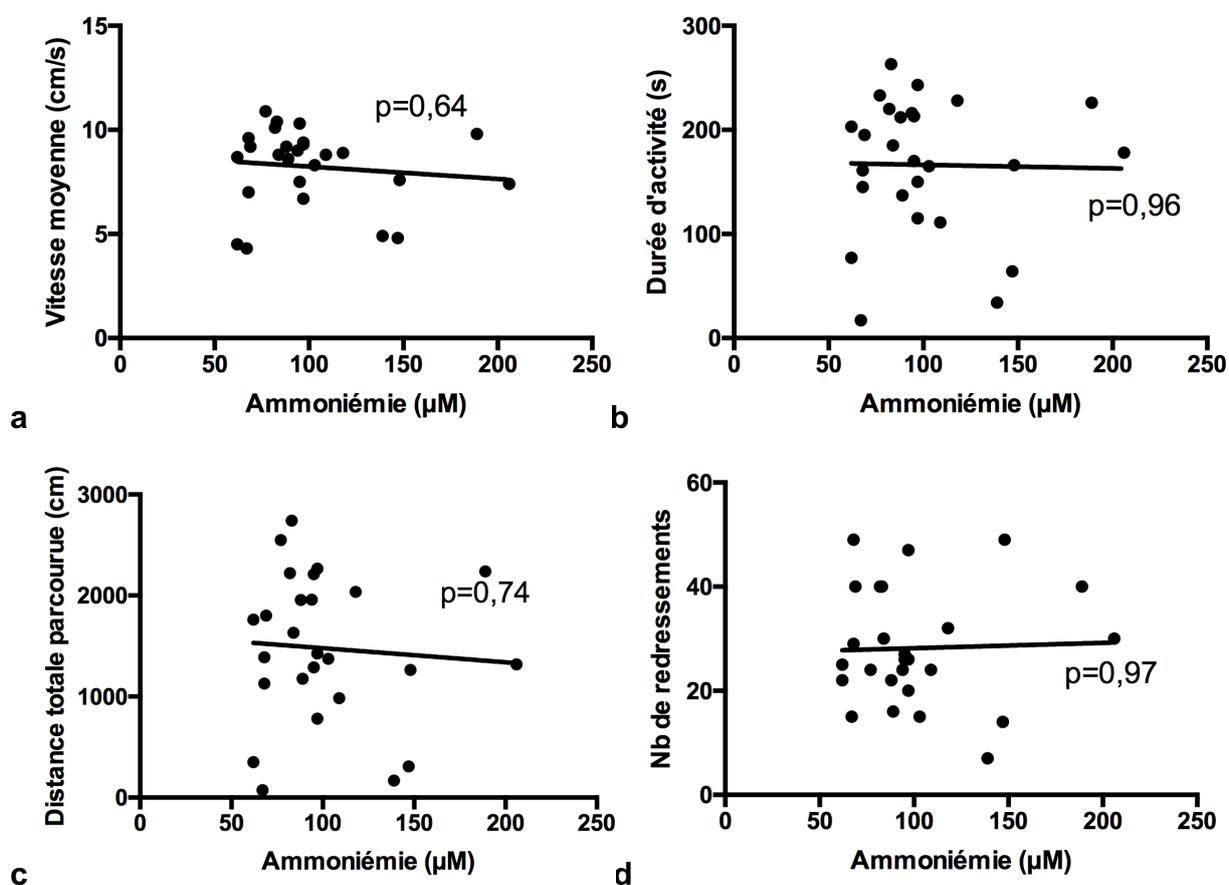


Figure 14 Corrélation ammoniémie et paramètres de l'Openfield chez les rats CCl4 et leurs contrôles Huile minérale

14.a. Corrélation ammoniémie et distance parcourue dans l'Openfield chez les rats CCl4 et les contrôles Huile

14.b. Corrélation ammoniémie et vitesse moyenne dans l'Openfield chez les rats CCl4 et les contrôles Huile

14.c. Corrélation ammoniémie et durée d'activité dans l'Openfield chez les rats CCl4 et les contrôles Huile

14.d. Corrélation ammoniémie et nombre de redressements dans l'Openfield chez les rats CCl4 et les contrôles Huile

V- RELATION ENTRE EH ET INFLAMMATION

Ces expériences ont été conduites uniquement chez les animaux sans régime hyperammonémiant, puisque ce dernier n'induisait pas d'EH.

Les rats BDL qui présentaient une EH à l'Openfield avaient des taux de $\text{TNF}\alpha$ plasmatiques significativement plus élevés que ceux n'ayant pas d'EH et que les contrôles SHAM (respectivement $47,74 \pm 7,657$ vs $30,85 \pm 5,967$ * vs $24,39 \pm 4$ * pg/ml) (ANOVA $p=0,016$) (**Figure 15a**). Les taux d' $\text{IFN}\gamma$ tendaient à être plus élevés en cas d'EH ($64,23 \pm 30$ vs $27,90 \pm 7,83$ vs $36,58 \pm 7$ pg/ml) (ANOVA $p=0,50$) (**Figure 15b**). Les taux d'IL6 étaient également significativement plus importants chez les BDL ayant une EH que chez ceux n'ayant pas d'EH et que chez les contrôles ($415,2 \pm 142$ vs $177,3 \pm 62,86$ vs $100,2 \pm 20$ pg/ml *) (ANOVA $p=0,029$) (**Figure 15c**).

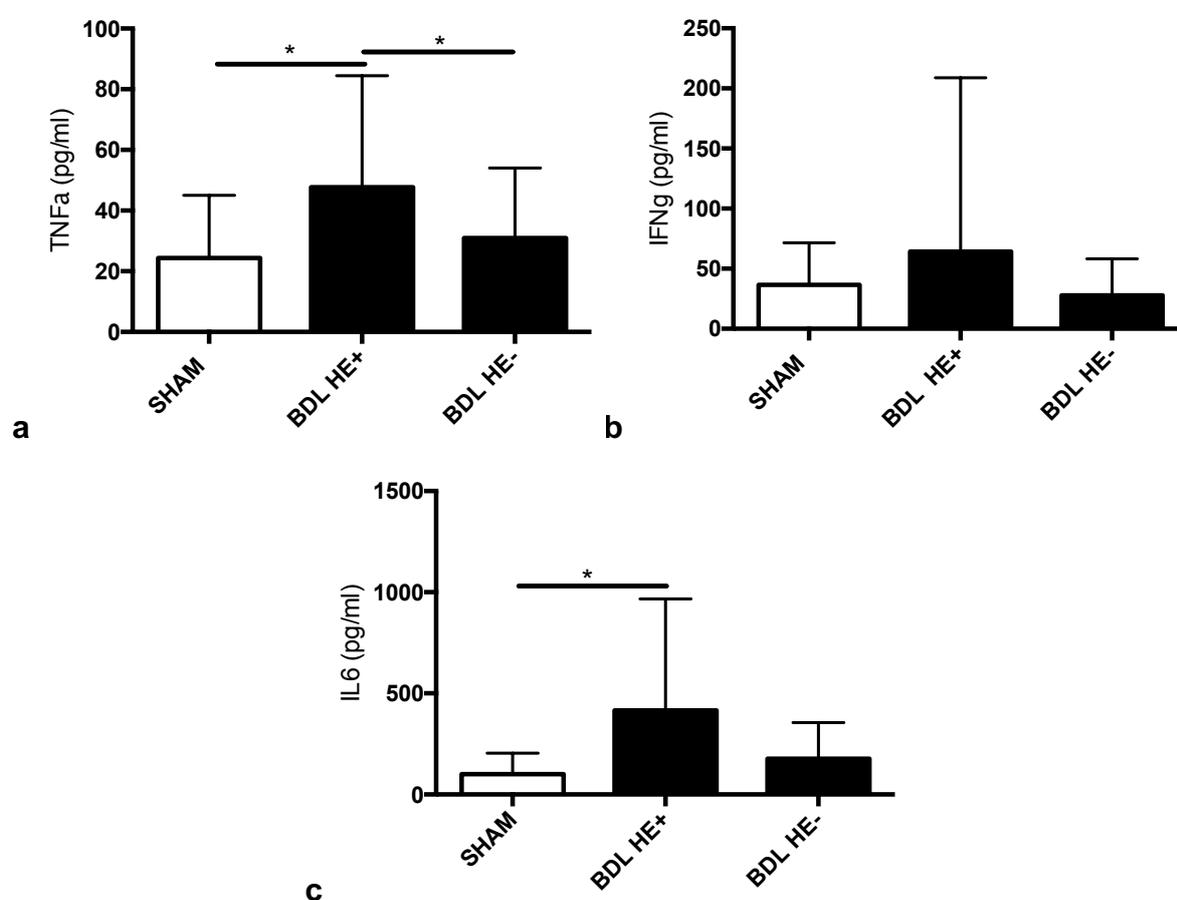


Figure 15 Taux de cytokines plasmatiques chez les BDL ayant ou non une EH

15.a. Taux plasmatiques de $\text{TNF}\alpha$ chez les rats BDL ayant ou non une EH et leur contrôle SHAM

15.b. Taux plasmatiques d' $\text{IFN}\gamma$ chez les rats BDL ayant ou non une EH et leur contrôle SHAM

15.c. Taux plasmatiques d'IL6 chez les rats BDL ayant ou non une EH et leur contrôle SHAM

(HE- : EH absente ; HE+ : EH présente / * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ Dunn's test)

L'augmentation de la distance totale parcourue dans l'Openfield en 6 minutes par les rats BDL et leurs contrôles SHAM était significativement corrélée à la diminution des taux de $\text{TNF}\alpha$ et d' $\text{IFN}\gamma$ (respectivement $|r|=0,37$, $p=0,008$ et $|r|=0,37$, $p=0,0077$). Cette corrélation n'était pas significative avec les taux d' IL6 ($|r|=0,15$, $p=0,51$). (Figure 16a, b et c).

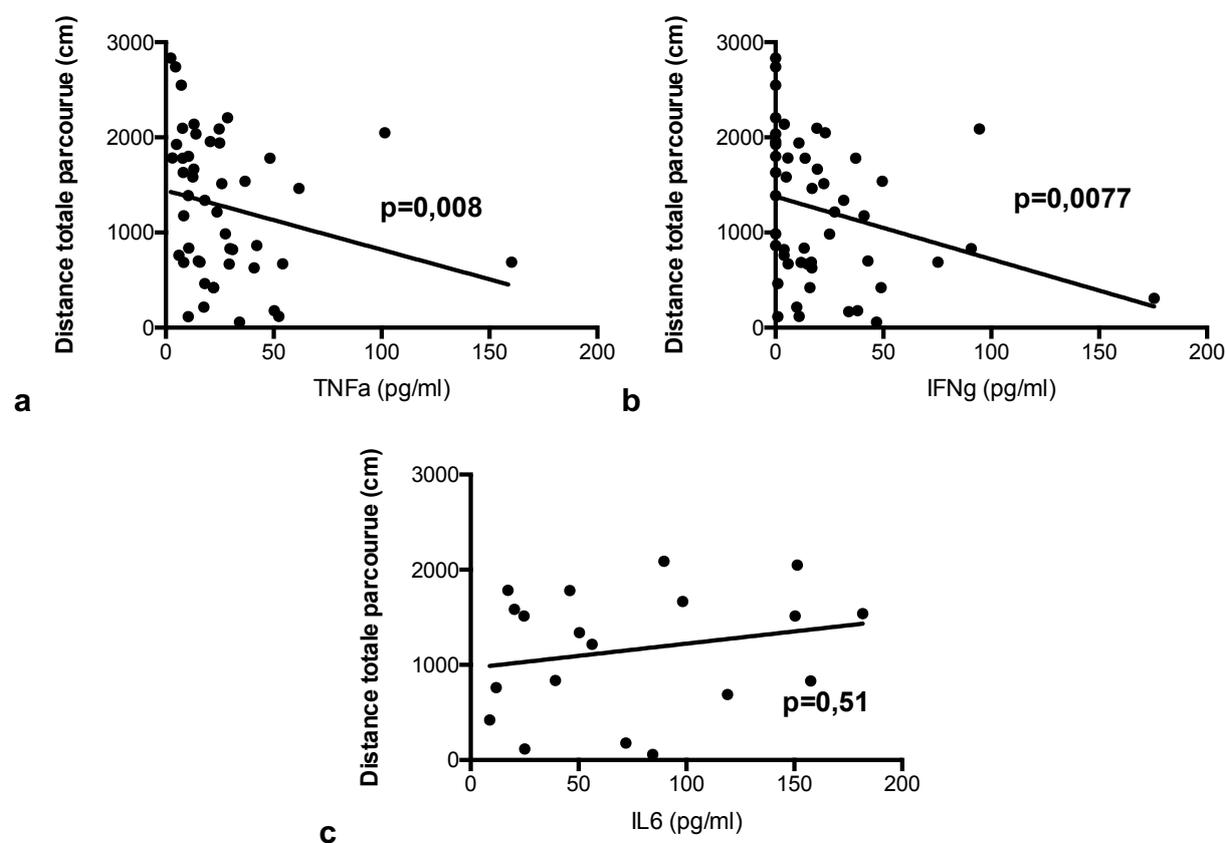


Figure 16 Corrélation des taux de cytokines plasmatiques et distance totale parcourue dans l'Openfield chez les rats BDL et SHAM

16.a. Corrélation entre les taux plasmatiques de $\text{TNF}\alpha$ et la distance totale parcourue dans l'Openfield chez les rats BDL et SHAM.

16.b. Corrélation entre les taux plasmatique d' $\text{IFN}\gamma$ et la distance totale parcourue dans l'Openfield chez les rats BDL et SHAM.

16.c. Corrélation entre les taux plasmatique d' IL6 et la distance totale parcourue dans l'Openfield chez les rats BDL et SHAM.

Comme attendu, il n'existait pas de corrélation entre les taux de cytokines $TNF\alpha$, $IFN\gamma$, $IL6$ et la distance parcourue dans l'Openfield chez les rats CCl4 et leurs contrôles recevant l'huile minérale (respectivement $|r|=0,22$ $p=0,53$; $|r|=0,08$, $p=0,79$; $|r|=0,52$ $p=0,13$) (Figure 17a,b,c).

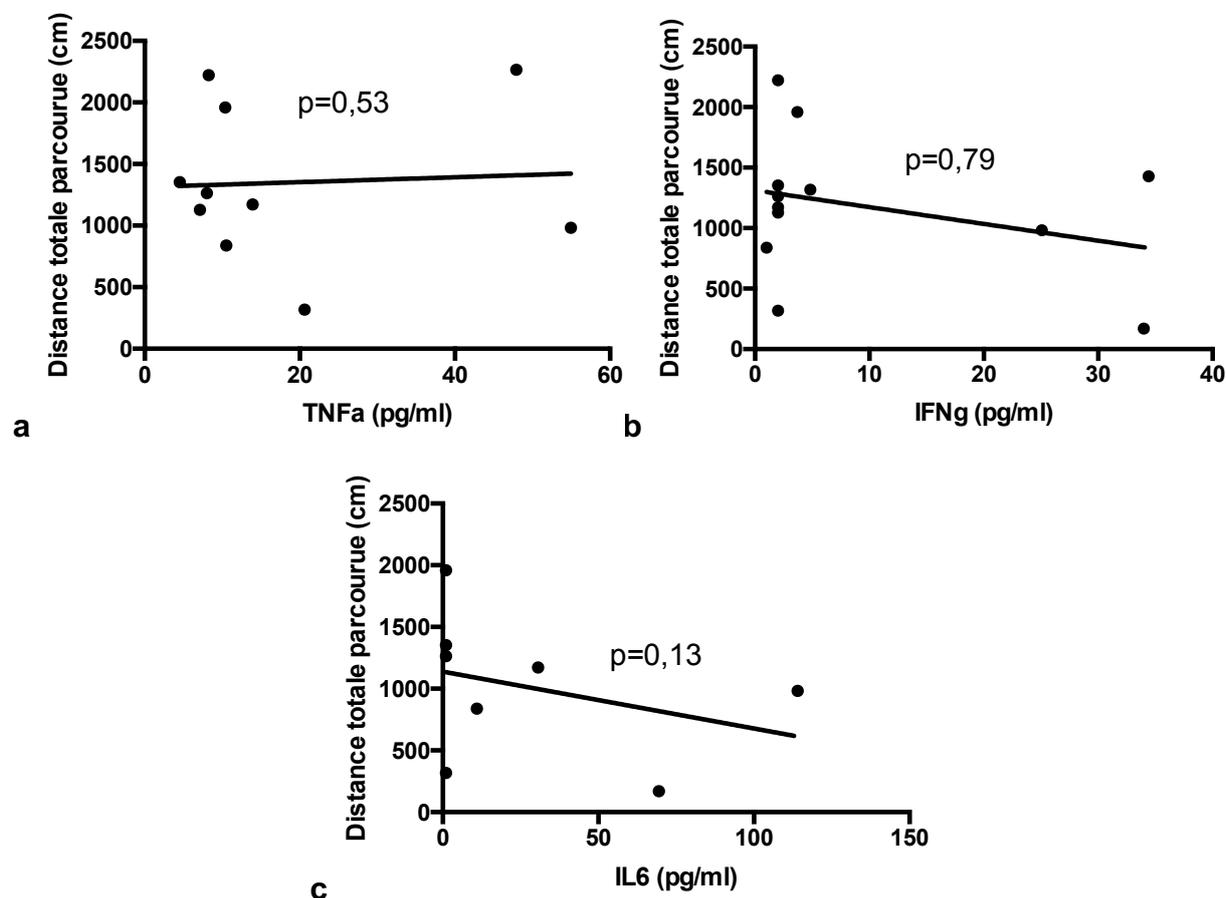


Figure 17 Corrélation des taux de cytokines plasmatiques et distance totale parcourue dans l'Openfield chez les rats CCl4 et Huile minérale

17.a. Corrélation entre les taux plasmatiques de $TNF\alpha$ et la distance totale parcourue dans l'Openfield chez les rats CCl4 et Huile

17.b. Corrélation entre les taux plasmatique d' $IFN\gamma$ et la distance totale parcourue dans l'Openfield chez les rats CCl4 et Huile

17.c. Corrélation entre les taux plasmatique d' $IL6$ et la distance totale parcourue dans l'Openfield chez les rats CCl4 et Huile

VI- PERMEABILITE DE LA BHE

VI.1. MODELE BDL

La quantité de dextran fluorescent intra-cérébral après lavage trans-cardiaque chez les rats BDL était significativement plus importante que chez les contrôles SHAM (ANOVA $p=0,03$) (respectivement $0,1395 \pm 0,0146$ vs $0,08146 \pm 0,0092$ μg dextran/g cerveau *). Elle était également plus élevée chez les BDL traités par le régime NH₃ que chez leur contrôles (respectivement $0,1937 \pm 0,072$ vs $0,095 \pm 0,012$ μg dextran/g cerveau *). La quantité de dextran fluorescent n'était pas augmentée par le régime NH₃ chez les rats BDL (**Figure 18**).

Ces résultats sous-entendent qu'il existerait, chez les rats BDL, une augmentation de la perméabilité de la BHE pour des molécules allant au moins jusqu'à 10 kDa.

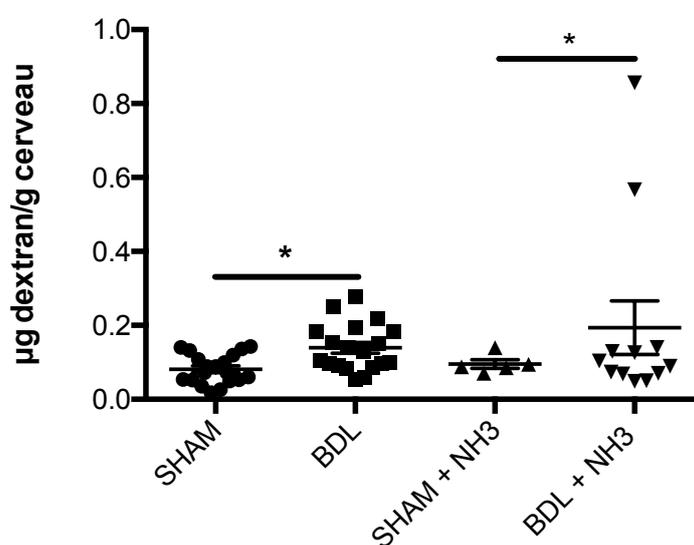


Figure 18 Quantité intra-cérébrale de dextran fluorescent ($\mu\text{g}/\text{g}$) chez les BDL traités ou non par régime NH₃

(* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ Dunn's test)

VI.2. MODELE CCL4

La quantité de dextran fluorescent chez les rats CCl₄ traités ou non par régime hyperammonémiant n'était pas différente des rats contrôles (ANOVA $p=0,051$) (huile vs CCl₄ vs huile + NH₃ vs CCl₄ + NH₃ $0,123 \pm 0,017$ vs $0,124 \pm 0,016$ vs $0,165 \pm 0,015$ vs $0,180 \pm 0,018$ μg dextran/g cerveau, ns) (**Figure 19**).

Ces résultats sous-entendent que la perméabilité de la BHE n'est pas modifiée chez les rats CCl₄.

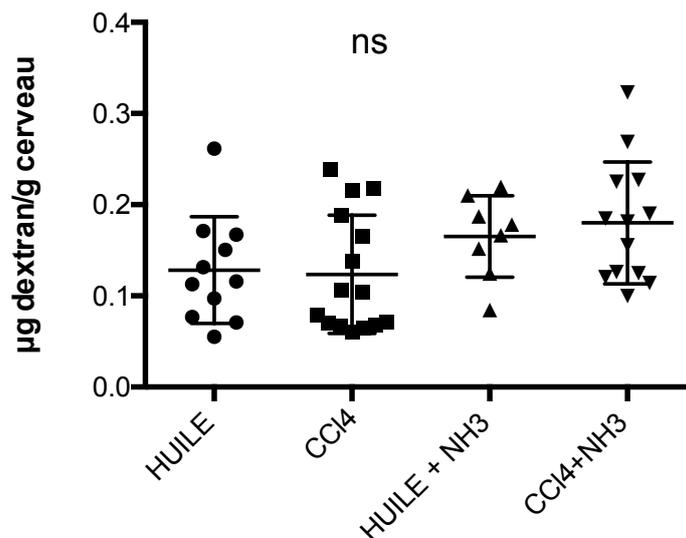


Figure 19 Quantité intra-cérébrale de dextran fluorescent ($\mu\text{g/g}$) chez les rats CCl₄ traités ou non par régime NH₃

VII- PERMEABILITE DE LA BHE ET EH CHEZ LES RATS BDL

Ces résultats ont été analysés uniquement chez les rats BDL puisque les rats CCl₄ n'étaient pas encéphalopathes.

Les rats BDL considérés comme ayant une EH dans le test de l'Openfield avaient une quantité de dextran fluorescent significativement plus importante que ceux n'ayant pas d'EH et que les rats contrôles (ANOVA $p=0,01$) (respectivement $0,15 \pm 0,017$ vs $0,12 \pm 0,02$ vs $0,09 \pm 0,01$ $\mu\text{g/g}$) (**Figure 20**).

Ceci suggère qu'il pourrait exister un lien entre la présence d'une EH et l'augmentation de perméabilité de la BHE dans la cirrhose.

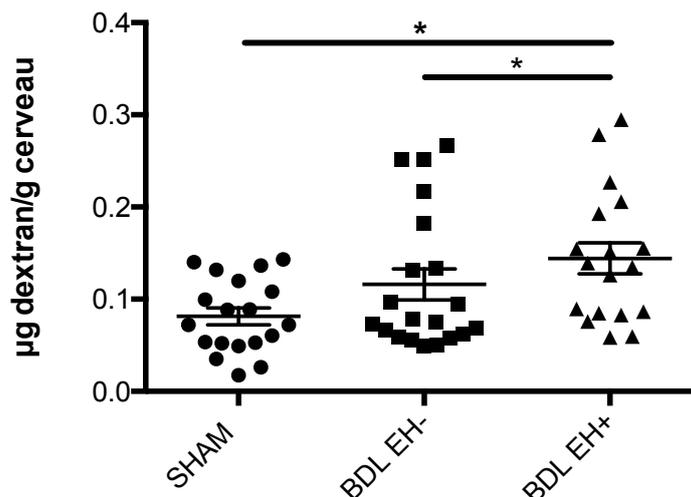


Figure 20 Quantité intra-cérébrale de dextran fluorescent ($\mu\text{g/g}$) chez les BDL selon la présence ou non d'une EH

(EH- : EH absente ; EH+ : EH présente / * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ Dunn's test)

VIII- PERMEABILITE DE LA BHE ET AMMONIEMIE

VIII.1. MODELE BDL

Chez les rats BDL, l'augmentation de l'ammoniémie était significativement corrélée à l'augmentation de la quantité de dextran fluorescent intra-cérébral donc par extrapolation à l'augmentation de la perméabilité de la BHE ($p = 0,0021$; $|r| = 0,51$) (Figure 21).

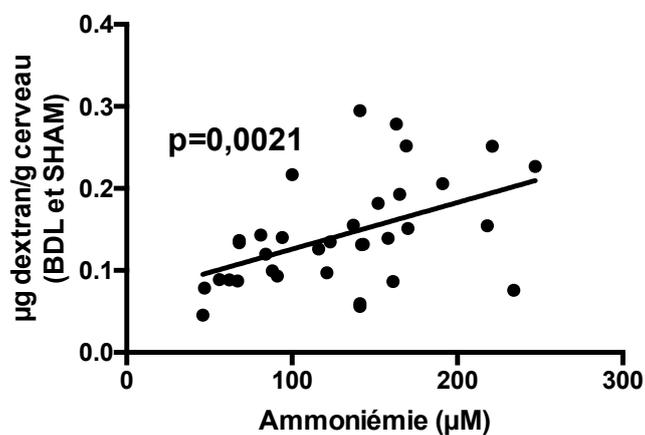


Figure 21 Corrélation entre ammoniémie et quantité intra-cérébrale de dextran fluorescent chez les rats BDL et SHAM

VIII.2. MODELE CCL4

La perméabilité de la BHE n'était pas corrélée à l'augmentation de l'ammoniémie (respectivement $|r|= 0,25$ $p=0,16$ / $|r|= 0,22$ $p=0,38$) (**Figure 22**).

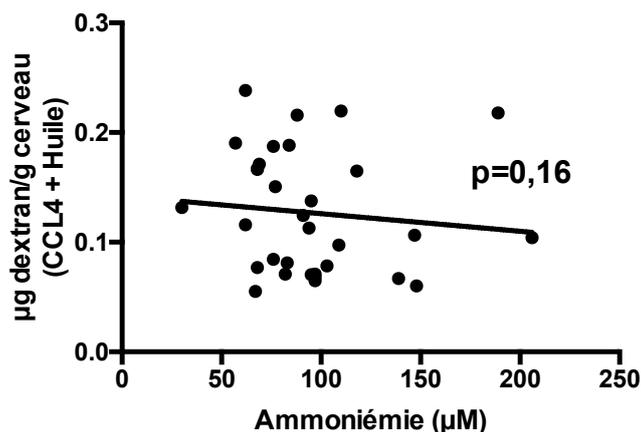


Figure 22 Corrélation entre ammoniémie et quantité intra-cérébrale de dextran fluorescent chez les rats CCl4 et leurs contrôles Huile minérale

IX- PERMEABILITE DE LA BHE ET CYTOKINES PLASMATIQUES

IX.1. MODELE BDL

Chez les rats BDL et leurs contrôles SHAM, les taux de $TNF\alpha$ étaient significativement corrélés à la quantité intra-cérébrale de dextran fluorescent ($p=0,04$; $|r|= 0,38$) donc par extrapolation, à la perméabilité de la BHE. Il existait également une tendance à l'augmentation de l' $IFN\gamma$ ($p=0,07$; $|r|= 0,37$) et l' $IL6$ ($p=0,13$; $|r|= 0,32$) chez ces rats (**Figure 23a, b et c**).

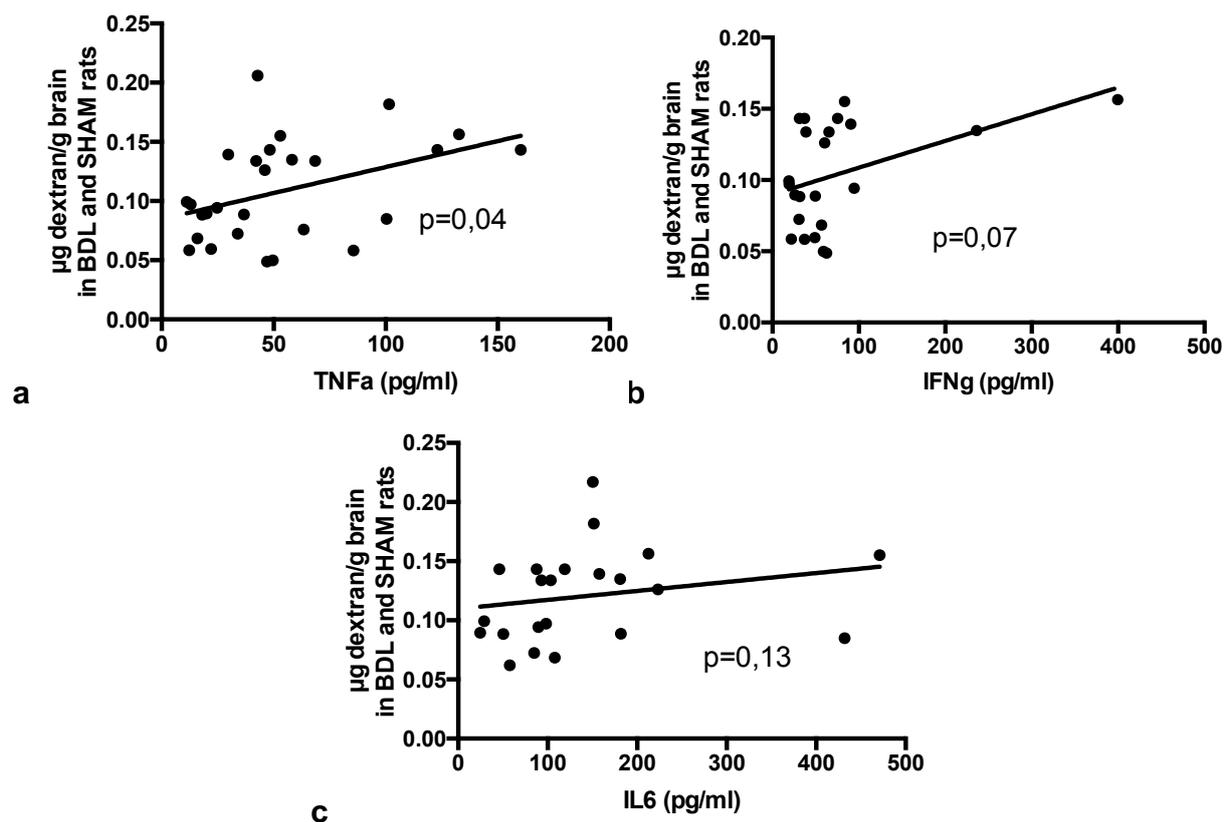


Figure 23 Corrélation entre les cytokines plasmatiques et la quantité intracérébrale de dextran fluorescent chez les rats BDL et SHAM

23.a. Corrélation entre les taux plasmatiques de TNF α (pg/ml) et la quantité intracérébrale de dextran fluorescent ($\mu\text{g}/\text{g}$) chez les rats BDL et leurs contrôles SHAM

23.b. Corrélation entre les taux plasmatiques d'IFN γ (pg/ml) et la quantité intracérébrale de dextran fluorescent ($\mu\text{g}/\text{g}$) chez les rats BDL et leurs contrôles SHAM

23.c. Corrélation entre les taux plasmatiques d'IL6 (pg/ml) et la quantité intracérébrale de dextran fluorescent ($\mu\text{g}/\text{g}$) chez les rats BDL et leurs contrôles SHAM

IX.2. MODELE CCL4

Comme attendu, chez les rats CCl $_4$ et leurs contrôles Huile, les taux de TNF α , d'IFN γ et d'IL6 n'étaient pas significativement corrélés à la quantité intracérébrale de dextran fluorescent (respectivement $|r|=0,1$ $p=0,77$; $|r|=0,01$ $p=0,91$; $|r|=0,15$ $p=0,70$) (**Figure 24a, b et c**).

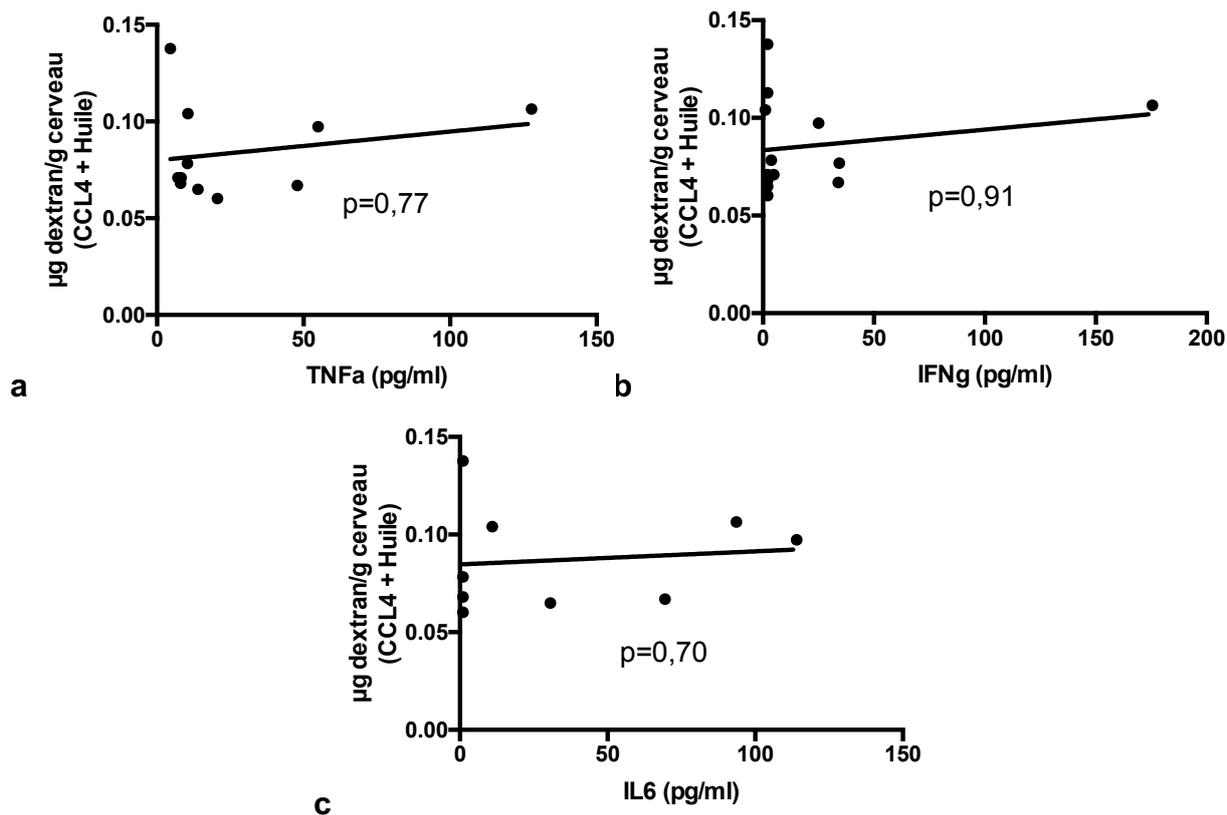


Figure 24 Corrélation entre les cytokines plasmatiques et la quantité intracérébrale de dextran fluorescent chez les rats CCL4 et Huile

24.a. Corrélation entre les taux plasmatiques de TNF α (pg/ml) et la quantité intracérébrale de dextran fluorescent (μ g/g) chez les rats CCl4 et leurs contrôles Huile minérale

24.b. Corrélation entre les taux plasmatiques d'IFN γ (pg/ml) et la quantité intracérébrale de dextran fluorescent (μ g/g) chez les rats CCl4 et leurs contrôles Huile minérale

24.c. Corrélation entre les taux plasmatiques d'IL6 (pg/ml) et la quantité intracérébrale de dextran fluorescent (μ g/g) chez les rats CCl4 et leurs contrôles Huile minérale

X- EFFETS DE DIFFÉRENTS TRAITEMENTS DIMINUANT L'EH

Seuls les rats BDL ont été traités, puisque les rats CCl4 ne présentaient pas d'EH.

X.1. RIFAXIMINE

X.1.A EFFETS DE LA RIFAXIMINE SUR L'AMMONIEMIE ET LES CYTOKINES PLASMATIQUES

L'ammoniémie des rats BDL et des rats SHAM n'était pas modifiée par le traitement par RFX (respectivement BDL + RFX vs BDL et SHAM + RFX vs SHAM $140 \pm 15,71$ vs $147,7 \pm 11,05 \mu\text{M}$ ns, et $89 \pm 16,87$ vs $69,15 \pm 5,48$ ns) (**Figure 25**).

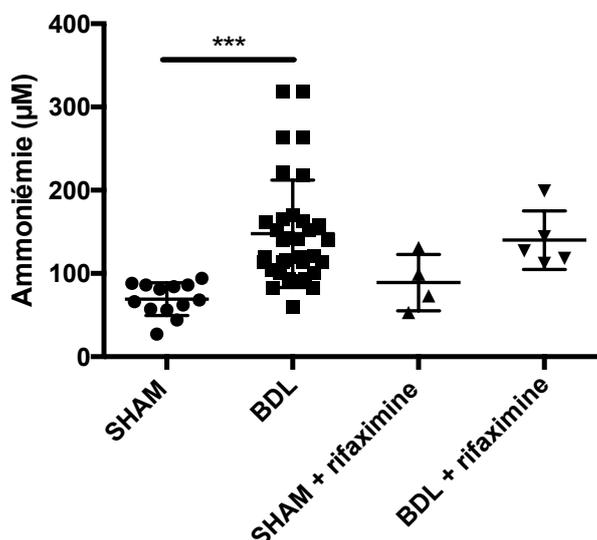


Figure 25 Ammoniémie des rats BDL traités ou non par RFX et leurs contrôles SHAM

(* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ Dunn's test)

X.1.B. EFFET DE LA RIFAXIMINE SUR LES CYTOKINES PLASMATIQUES DES RATS BDL

Les rats BDL traités par RFX avaient des taux de $\text{TNF}\alpha$ ($28,46 \pm 12,05$ vs $39,76 \pm 5,153$ pg/ml, ANOVA $p = 0,34$), d' $\text{IFN}\gamma$ ($23,99 \pm 14,83$ vs $91,42 \pm 48$ pg/ml, ANOVA $p = 0,39$) et d' IL6 ($234,8 \pm 147,4$ vs $305,9 \pm 87,13$ pg/ml, ANOVA $p = 0,12$) qui tendaient à diminuer par rapport aux rats BDL non traités. Les taux de cytokines n'étaient pas modifiés chez les rats SHAM (respectivement $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$, IL6 chez les SHAM + RFX vs SHAM $32,36 \pm 7,21$ vs $26,62 \pm 4,81$ ns ; $46,73 \pm 15,39$ vs $41,41 \pm 8,29$ pg/ml ns et $139,4 \pm 76$ vs $127 \pm 26,64$ pg/ml (**Figure 26 a, b et c**).

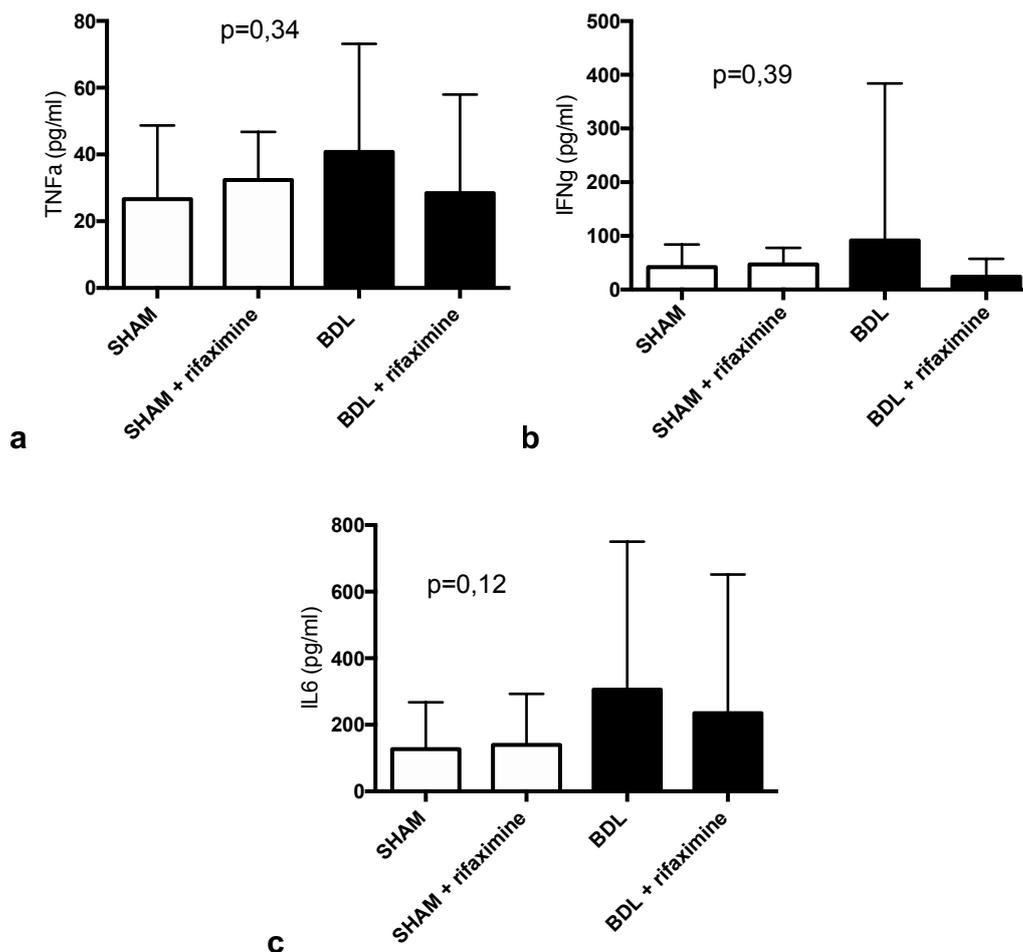


Figure 26 Cytokines plasmatiques chez les rats BDL traités par la RFX

26.a. Taux plasmatiques de TNF α chez les rats BDL traités ou non par RFX et leurs contrôles SHAM

26.b. Taux plasmatiques d'IFN γ chez les rats BDL traités ou non par RFX et leurs contrôles SHAM

26.c. Taux plasmatiques d'IL6 chez les rats BDL traités ou non par RFX et leurs contrôles SHAM

X.1.C. EFFETS DE LA RIFAXIMINE SUR L'EH

Le traitement des rats BDL par RFX induisait une augmentation significative de la distance totale parcourue dans l'Openfield par rapport aux BDL non traités (respectivement 1210 +/- 243,2 vs 630,8 +/- 86,37 cm p=0,02), une augmentation significative de la durée d'activité (respectivement 150,7 +/- 24,96 vs 106,1 +/- 11,33 s p=0,04) ainsi que du nombre de redressements (respectivement 32 +/- 4,7 vs 18,7 +/- 2,45 p=0,03). La vitesse moyenne n'était pas modifiée par le traitement par RFX

(respectivement $7,3 \pm 0,74$ vs $6,09 \pm 0,29$ ns). La RFX n'entraînait pas de modification des paramètres chez les rats SHAM. (Figure 27 a, b, c et d)

Le traitement par RFX permettrait donc chez les rats BDL de prévenir les anomalies constatées dans l'Openfield et donc de prévenir l'apparition d'une EH malgré l'absence de modification de l'ammoniémie.

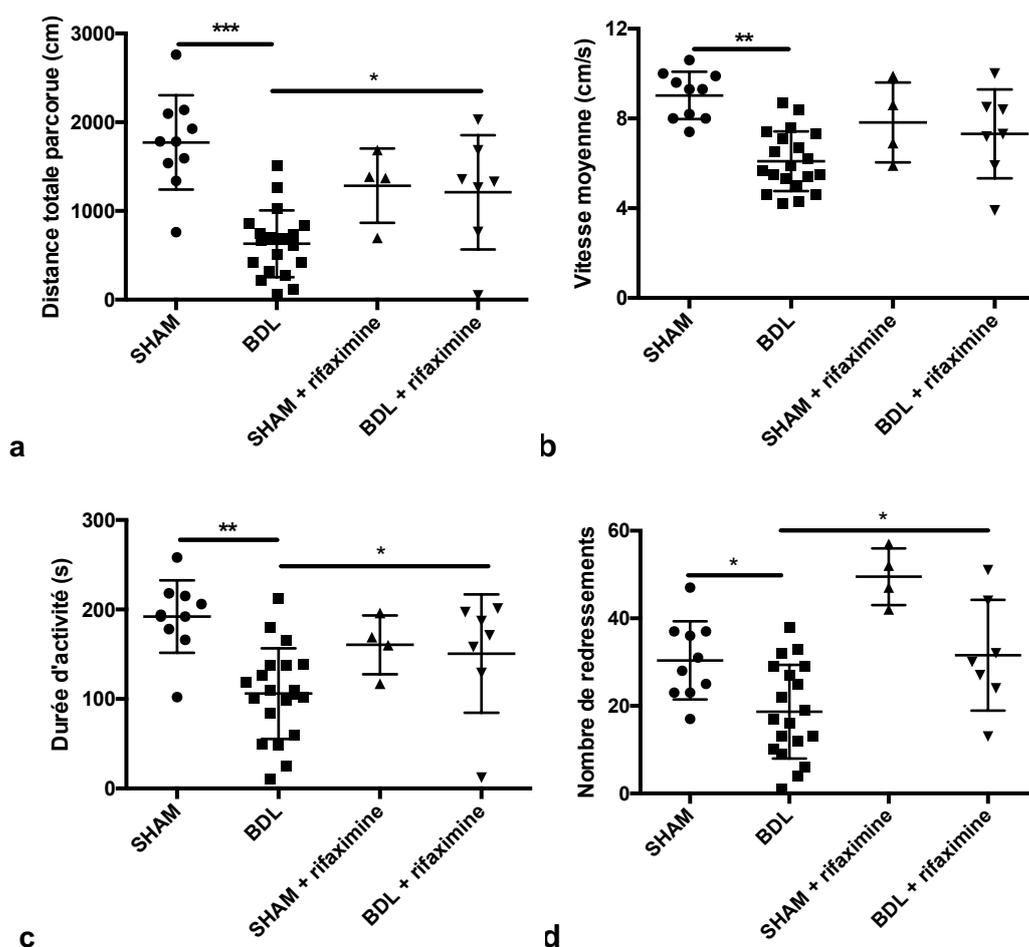


Figure 27 Openfield des rats BDL traités ou non par RFX

27.a. Distance totale parcourue par les rats BDL traités ou non par RFX et leurs contrôles SHAM dans l'Openfield en 6 minutes

27.b. Vitesse moyenne des rats BDL traités ou non par RFX et leurs contrôles SHAM dans l'Openfield en 6 minutes

27.c. Durée d'activité des rats BDL traités ou non par RFX et leurs contrôles SHAM dans l'Openfield en 6 minutes

27.d. Nombre de redressements des rats BDL traités ou non par RFX et leurs contrôles SHAM dans l'Openfield en 6 minutes

(* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ Dunn's test)

X.1.D. EFFETS DE LA RIFAXIMINE SUR LA BHE

La quantité de dextran fluorescent intra-cérébrale était significativement diminuée chez les rats BDL traités par RFX par rapport à ceux non traités (ANOVA $p=0,0044$) (respectivement $0,081 \pm 0,004$ vs $0,139 \pm 0,014$ *). Elle n'était pas différente des contrôles SHAM et SHAM + RFX (respectivement $0,081 \pm 0,009$ et $0,070 \pm 0,001$) (**Figure 28**).

Ces résultats sous entendent que le traitement par RFX pourrait prévenir les anomalies de perméabilité de la BHE chez les rats BDL.

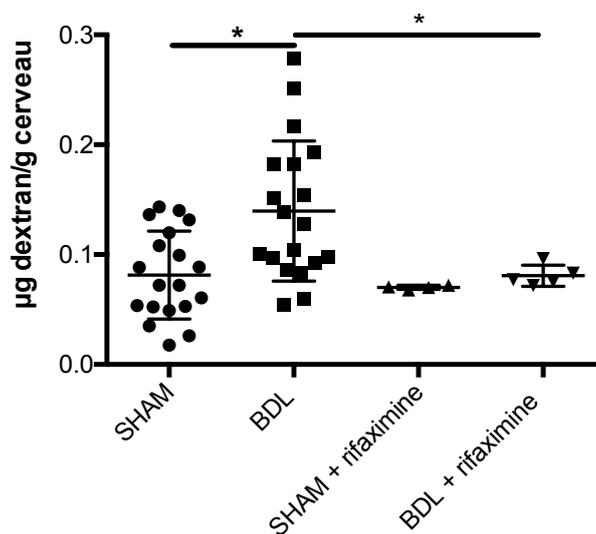


Figure 28 Quantité intra-cérébrale de dextran fluorescent chez les rats traités par RFX et leurs contrôles SHAM

(* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ Dunn's test)

X.2. BENZOATE DE SODIUM

X.2.A. EFFETS DU BENZOATE DE SODIUM SUR L'AMMONIEMIE ET LES CYTOKINES PLASMATIQUES

Le traitement par benzoate de sodium (BNa) diminuait significativement l'ammoniémie chez les rats BDL (respectivement 110,2 +/- 19,60 vs 147,7 +/- 11,05 μM $p=0,04$). L'ammoniémie n'était pas modifiée chez les rats SHAM (SHAM + BNa vs SHAM 59,17 +/- 7,36 vs 69,15 +/- 5,48 ns) (Figure 29).

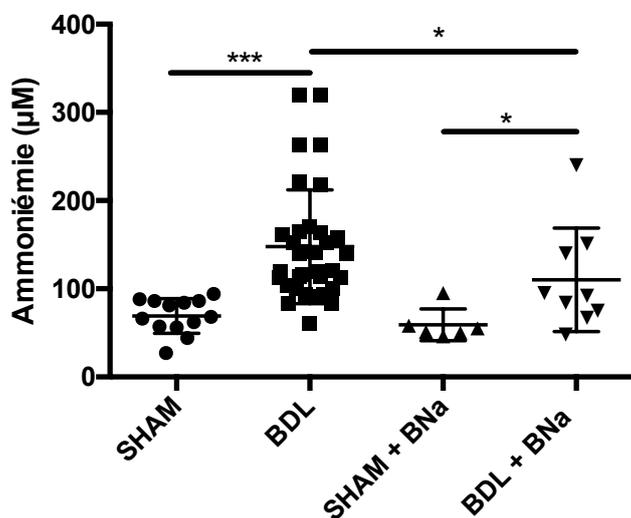
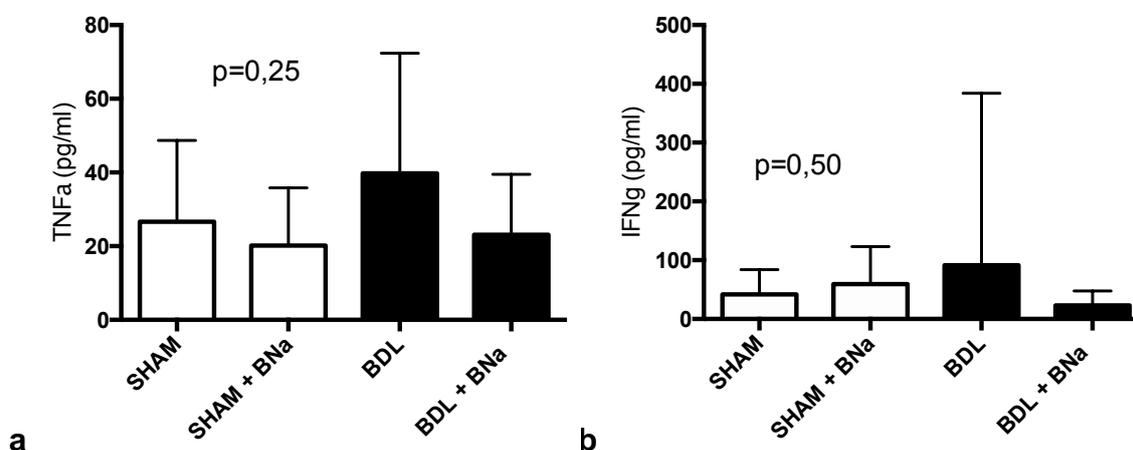


Figure 29 Ammoniémie des rats traités par benzoate de sodium et leurs contrôles SHAM

(* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ Dunn's test)

Les rats BDL traités par benzoate de sodium avaient des taux de $\text{TNF}\alpha$ (23,07 +/- 6,702 vs 39,76 +/- 5,153 pg/ml, ANOVA $p=0,25$), d' $\text{IFN}\gamma$ (23,20 +/- 9,29 vs 91,42 +/- 48 pg/ml, ANOVA $p=0,50$) et d' IL6 (255,3 +/- 122,6 vs 305,9 +/- 87,13 pg/ml, ANOVA $p=0,20$) qui tendaient à diminuer par rapport aux rats non traités. Les cytokines n'étaient pas modifiées chez les rats SHAM (Figure 30 a, b et c)



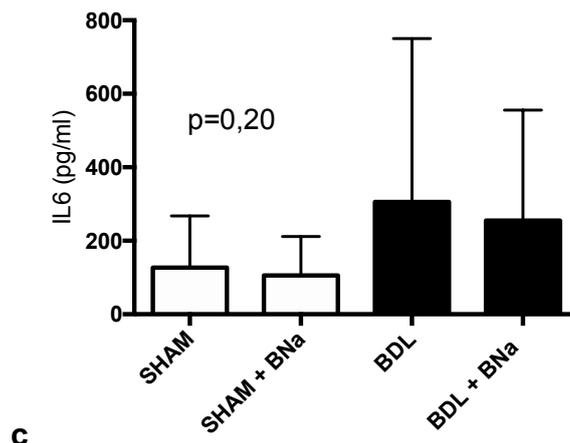


Figure 30 Cytokines plasmatiques chez les rats traités par benzoate de sodium

30a. Taux plasmatiques de $TNF\alpha$ chez les rats BDL traités ou non par benzoate de sodium et leurs contrôles SHAM

30.b. Taux plasmatiques d' $IFN\gamma$ chez les rats BDL traités ou non par benzoate de sodium et leurs contrôles SHAM

30.c. Taux plasmatiques d'IL6 chez les rats BDL traités ou non par benzoate de sodium et leurs contrôles SHAM

X.2.B. EFFETS DU BENZOATE DE SODIUM SUR L'EH

Le traitement des rats BDL par benzoate de sodium induisait une augmentation significative de la distance totale parcourue dans l'Openfield par rapport aux BDL non traités (respectivement 1121 +/- 229,1 vs 630,9 +/- 86,37 cm $p=0,04$), une augmentation significative de la durée d'activité (respectivement 143,4 +/- 22,17 vs 106,1 vs 11,33 s $p=0,04$) ainsi que du nombre de redressements (respectivement 30,78 +/- 5 vs 18,68 +/- 2,46 $p=0,04$). La vitesse moyenne n'était pas modifiée par le traitement par BNa (respectivement 6,67 +/- 0,45 vs 6,10 +/- 0,29 ns) (**Figure 31 a, b, c et d**).

Le traitement par benzoate de sodium permettrait donc chez les rats BDL de prévenir les anomalies constatées dans l'Openfield et donc de prévenir l'apparition d'une EH.

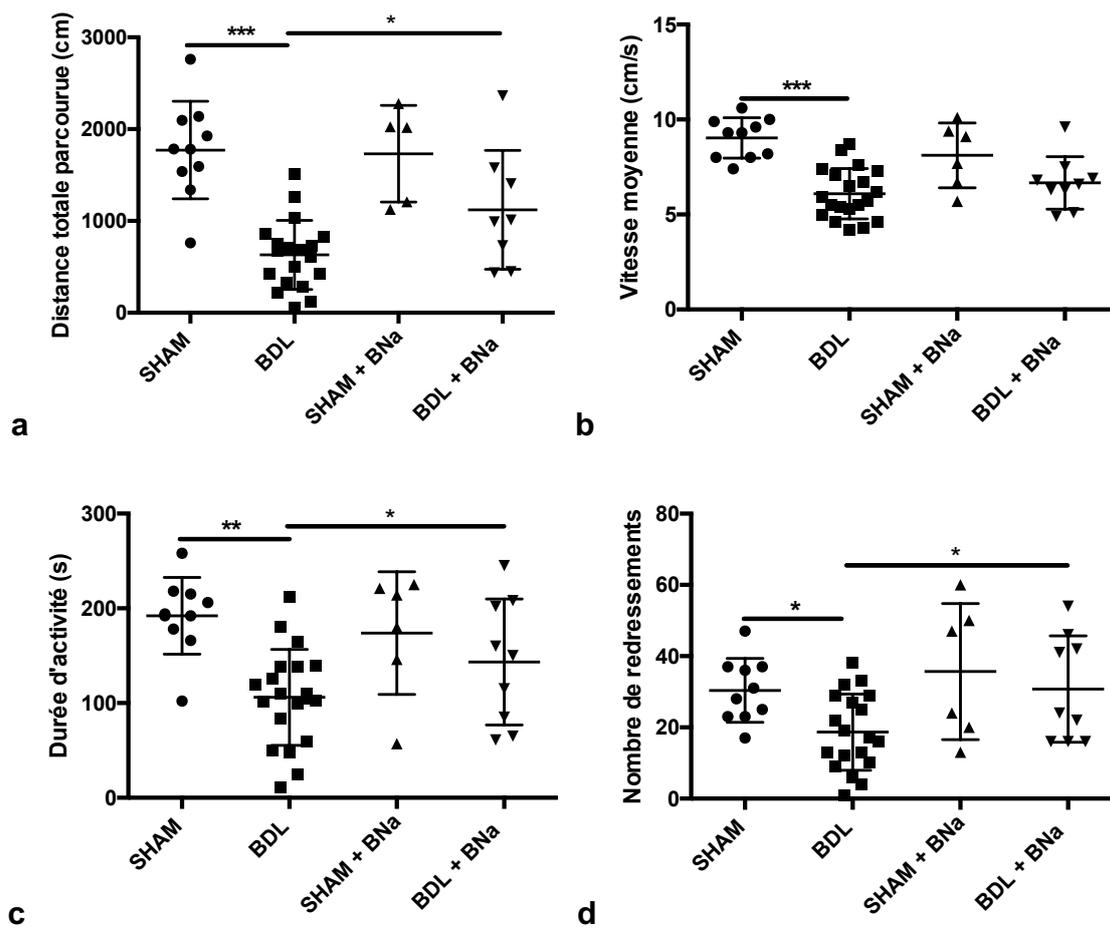


Figure 31 Openfield des rats BDL traités ou non par benzoate de sodium (BNa)

31.a. Distance totale parcourue par les rats BDL traités ou non par benzoate de sodium et leurs contrôles SHAM dans l'Openfield en 6 minutes

31.b. Vitesse moyenne des rats BDL traités ou non par benzoate de sodium et leurs contrôles SHAM dans l'Openfield en 6 minutes

31.c. Durée d'activité des rats BDL traités ou non par benzoate de sodium et leurs contrôles SHAM dans l'Openfield en 6 minutes

31.d. Nombre de redressements des rats BDL traités ou non par benzoate de sodium et leurs contrôles SHAM dans l'Openfield en 6 minutes

(* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ Dunn's test)

X.2.C. EFFETS DU BENZOATE DE SODIUM SUR LA PERMÉABILITÉ DE LA BHE

La quantité de dextran fluorescent intra-cérébrale était significativement diminuée chez les rats BDL traités par benzoate de sodium par rapport à ceux non traités (ANOVA $p=0,0027$) (respectivement $0,069 \pm 0,005$ vs $0,139 \pm 0,014$ *). Elle n'était pas différente des contrôles SHAM et SHAM + BNa (respectivement $0,081 \pm 0,009$ et $0,071 \pm 0,013$) (**Figure 32**).

Ces résultats sous entendent que le traitement par benzoate de sodium pourrait prévenir les anomalies de perméabilité de la BHE chez les rats BDL.

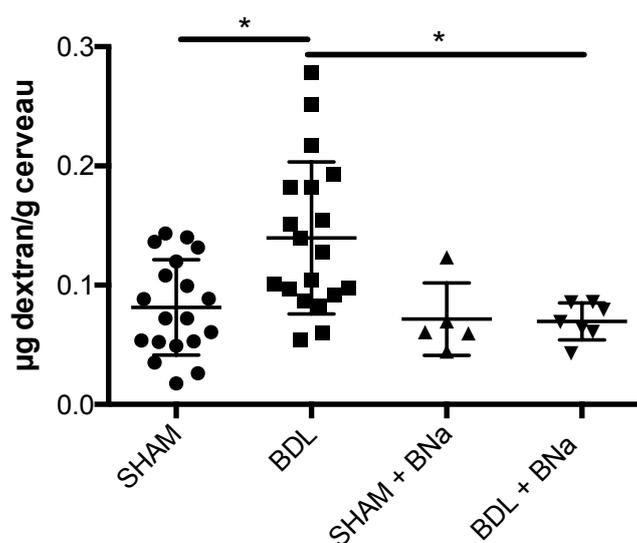


Figure 32 Quantité intra-cérébrale de dextran fluorescent chez les rats BDL traités ou non par benzoate de sodium (BNa) et leurs contrôles

(* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ Dunn's test)

X.3. BIOTINE

X.3.A. EFFETS DE LA BIOTINE SUR L'AMMONIEMIE DES RATS BDL

L'ammoniémie des rats BDL recevant le placebo était significativement plus élevée que celle des rats SHAM sous placebo ($150,8 \pm 10,94$ vs $66,24 \pm 5,89 \mu\text{M}$ ***). L'ammoniémie des rats BDL traités par la biotine était également significativement plus élevée que celle des rats SHAM sous biotine ($147,6 \pm 25,58$ vs $61,54 \pm 4,25 \mu\text{M}$ ***) (ANOVA $p < 0,0001$). L'ammoniémie n'était pas différente entre les BDL recevant la biotine et ceux recevant le placebo (**Figure 33**).

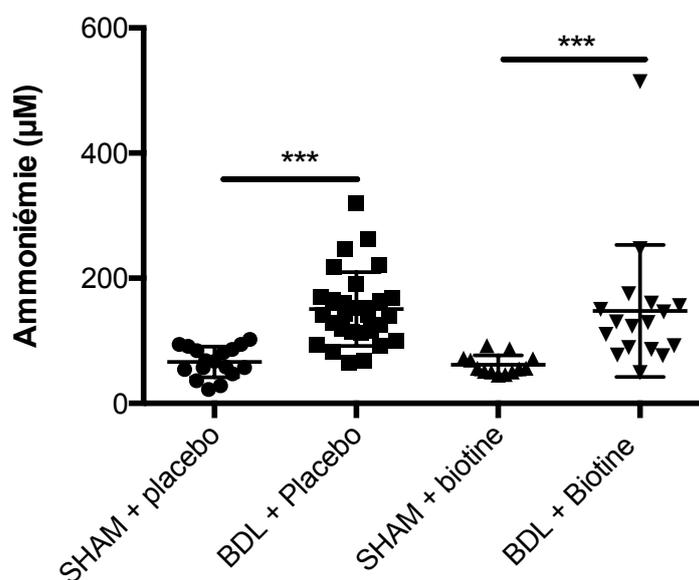


Figure 33 Ammoniémie des rats BDL traités par la biotine ou le placebo ainsi que les contrôles SHAM

(* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ Dunn's test)

X.3.B. EFFET DE LA BIOTINE SUR LES CYTOKINES DES RATS BDL

Les taux plasmatiques de $\text{TNF}\alpha$, d' $\text{IFN}\gamma$ et d' IL6 avaient tendance à diminuer chez les rats traités par biotine en comparaison à ceux recevant le placebo (respectivement BDL + biotine vs BDL + placebo : $16,29 \pm 8$ vs $36,63 \pm 33,63$ pg/ml $p = 0,49$; $16,28 \pm 10,26$ vs $42,84 \pm 21,62$ pg/ml $p = 0,51$; $37,05 \pm 16,53$ vs $74,18 \pm 28,14$ pg/ml

$p=0,32$). Ces différences n'étaient pas significatives ; des animaux sont en cours de traitement actuellement à l'animalerie pour consolider ces résultats (Figure 32 a, b et c).

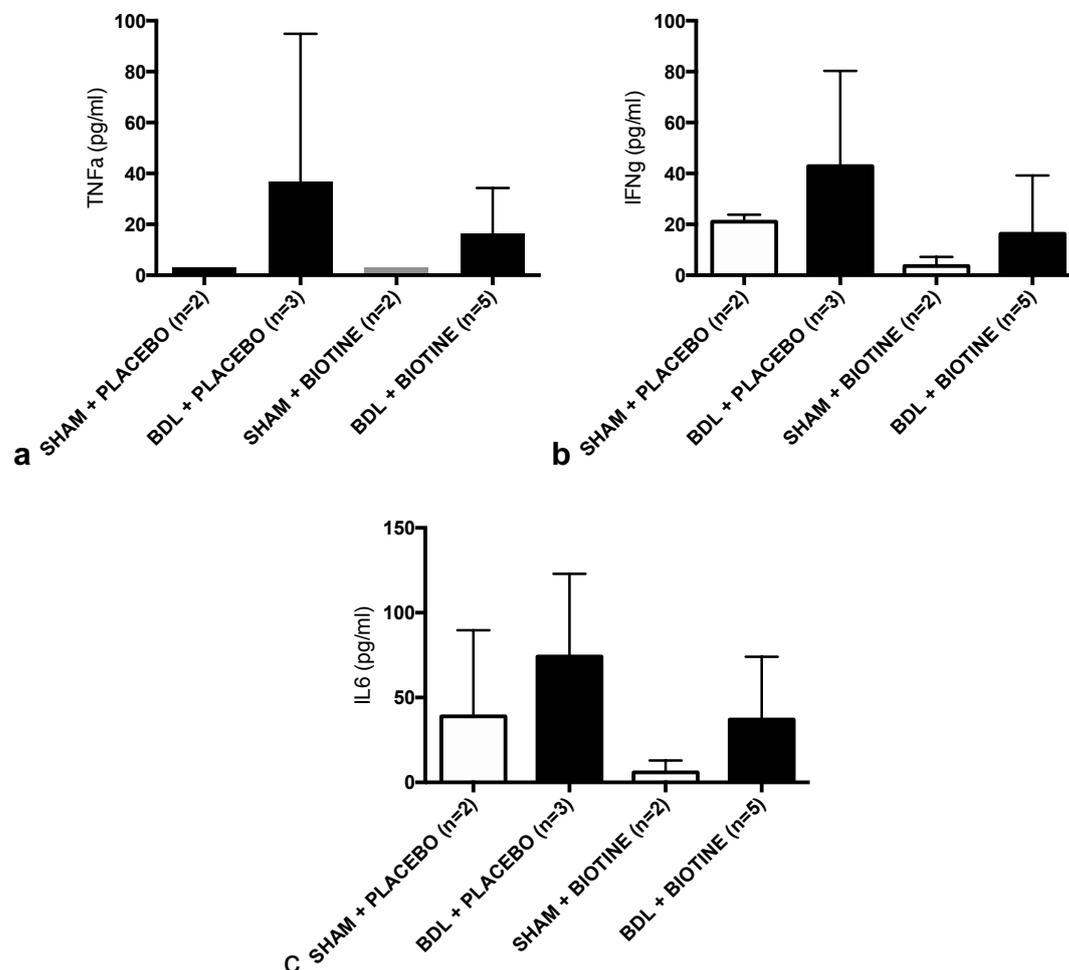


Figure 34 Cytokines plasmatiques chez les rats traités par biotine ou son placebo ainsi que chez leurs contrôles

32.a. Taux plasmatiques de TNF α chez les rats BDL traités par biotine ou son placebo et leurs contrôles SHAM

32.b. Taux plasmatiques d'IFN γ chez les rats BDL traités par biotine ou son placebo et leurs contrôles SHAM

32.c. Taux plasmatiques d'IL6 chez les rats BDL traités par biotine ou son placebo et leurs contrôles SHAM

X.3.C. EFFET DE LA BIOTINE SUR L'EH DES RATS BDL

Le traitement des rats BDL par biotine induisait une augmentation significative de la distance totale parcourue dans l'Openfield par rapport aux BDL sous placebo (respectivement 1318 +/- 234,4 vs 668,1 +/- 195,2 cm $p=0,04$), une augmentation significative de la vitesse moyenne (respectivement 9,0 +/- 1,07 vs 5,41 +/- 0,56 $p=0,01$) ainsi que du nombre de redressements (respectivement 24,20 +/- 4,44 vs 10,33 +/- 3,53 $p=0,015$). La durée d'activité (respectivement 144,9 +/- 13,78 vs 88,14 vs 22,73 s $p=0,051$) n'était pas significativement modifiée par le traitement par biotine. Le traitement par biotine ne modifiait pas les paramètres de l'Openfield chez les rats contrôles (**Figure 35 a, b, c et d**).

Le traitement par biotine permettrait donc chez les rats BDL de prévenir les anomalies constatées dans l'Openfield et donc de prévenir l'apparition d'une EH.

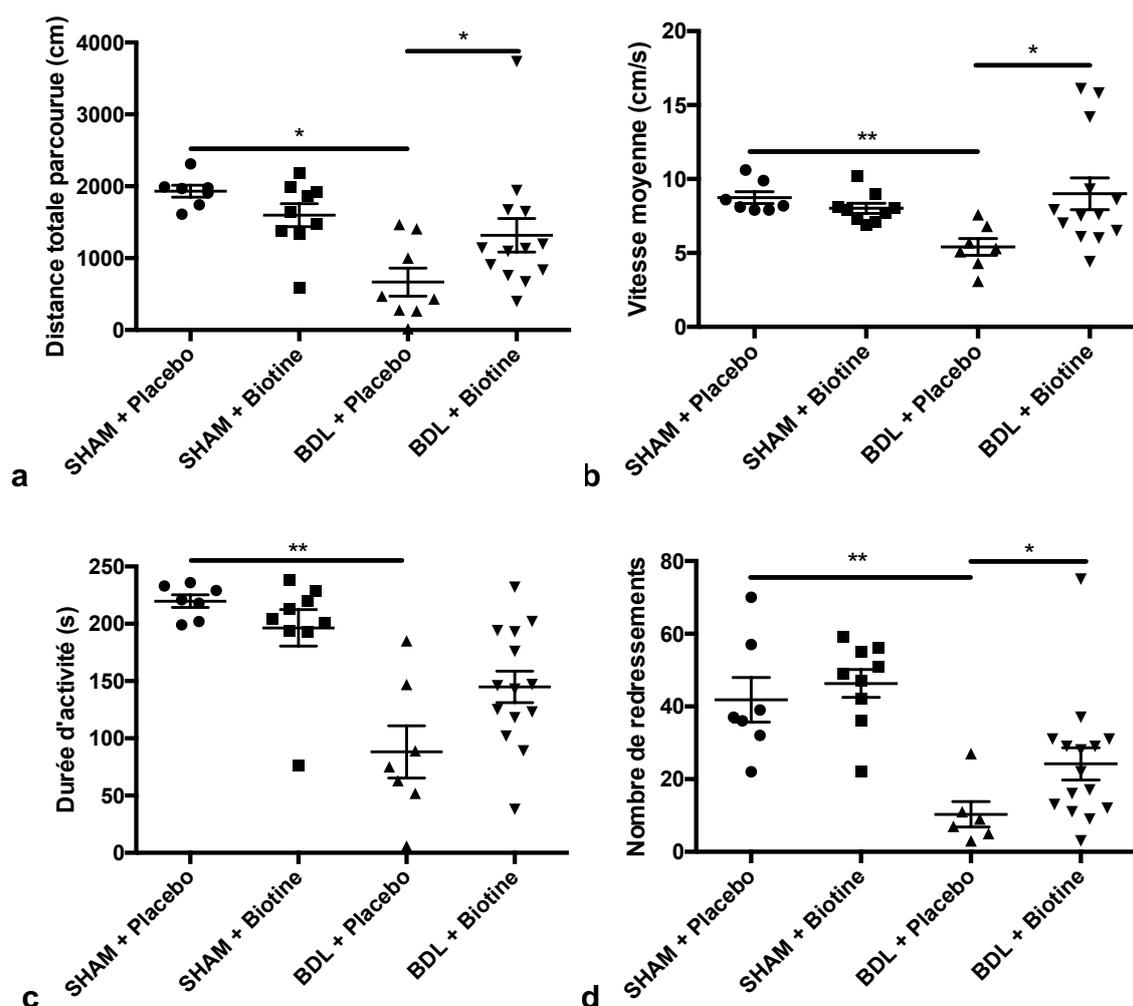


Figure 35 Openfield des rats traités par biotine ou placebo et leurs contrôles SHAM

35.a. Distance totale parcourue par les rats BDL traités par la biotine ou son placebo et leurs contrôles SHAM dans l'Openfield en 6 minutes

35.b. Vitesse moyenne des rats BDL traités par la biotine ou son placebo et leurs contrôles SHAM dans l'Openfield en 6 minutes

35.c. Durée d'activité des rats BDL traités par la biotine ou son placebo et leurs contrôles SHAM dans l'Openfield en 6 minutes

35.d. Nombre de redressements des rats BDL traités par la biotine ou son placebo et leurs contrôles SHAM dans l'Openfield en 6 minutes

(* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ Dunn's test)

X.3.D. PERMEABILITE DES RATS BDL TRAITES PAR BIOTINE

La quantité de dextran fluorescent intra-cérébrale était significativement diminuée chez les rats BDL traités par biotine par rapport à ceux recevant le placebo (ANOVA $p = 0,04$) (respectivement $0,092 \pm 0,008$ vs $0,161 \pm 0,022$ *). Elle n'était pas différente des contrôles SHAM + placebo et SHAM + biotine (respectivement $0,1065 \pm 0,009$ et $0,1094 \pm 0,012$) (**Figure 36**).

Ces résultats sous entendent que le traitement par biotine pourrait prévenir les anomalies de perméabilité de la BHE chez les rats BDL.

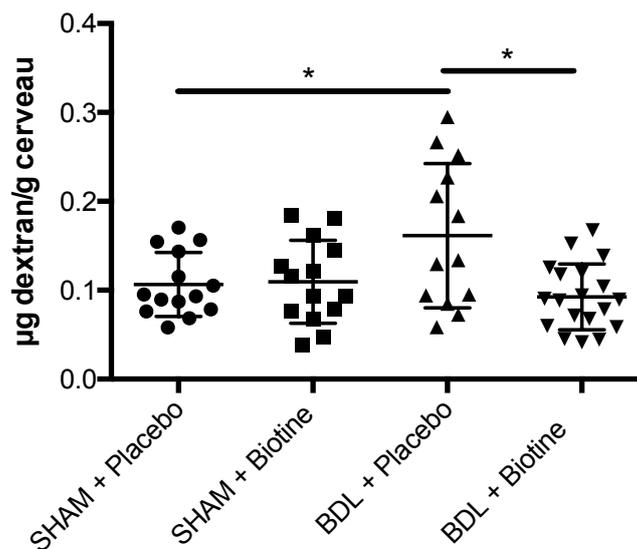


Figure 36 Quantité intra-cérébrale de dextran fluorescent chez les rats BDL traités par biotine ou son placebo et leurs contrôles

(* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ Dunn's test)

XI- EXPLORATION DES JONCTIONS SERREES CEREBRALES

XI.1. PCR SUR LES MICROVAISSEAUX CEREBRAUX DES RATS BDL

D'autres expériences sont prévues pour consolider ces résultats.

L'expression des gènes codant pour occludine et ZO1 dans les microvaisseaux cérébraux avaient une tendance à la diminution chez les rats encéphalopathes (respectivement $p = 0,08$ et $p = 0,13$) alors que celle de la claudine 5 ne semblait pas modifiée (**Figure 37 a, b et c**).

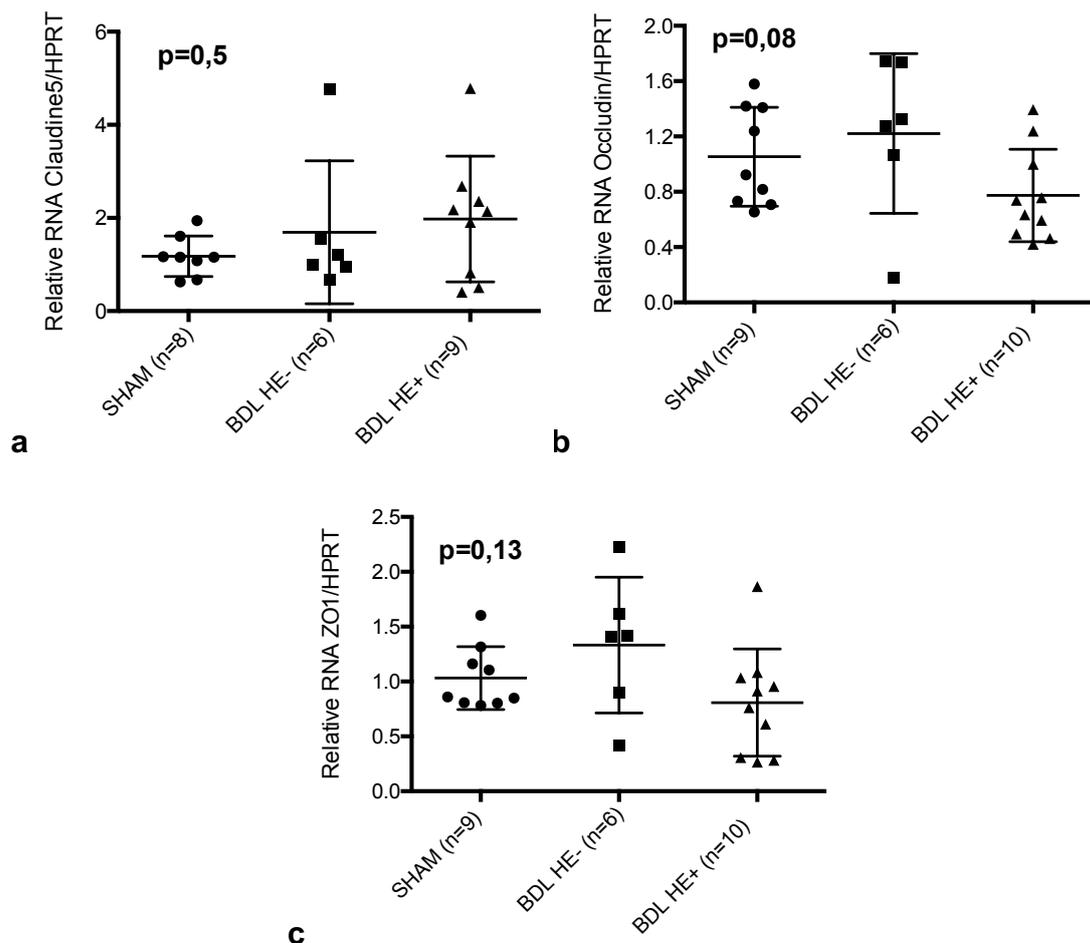


Figure 37 PCR des gènes de jonctions serrées sur microvaisseaux cérébraux chez les rats BDL en fonction de la présence d'une EH

37.a Expression relative de claudine 5 sur des microvaisseaux cérébraux isolés de rats BDL et SHAM

37.b. Expression relative de occludine sur des microvaisseaux cérébraux isolés de rats BDL et SHAM

37.c. Expression relative de ZO1 sur des microvaisseaux cérébraux isolés de rats BDL et SHAM

XI.2. PCR SUR LES MICROVAISSEAUX CEREBRAUX DES RATS BDL TRAITES

Expériences en cours

XI.3. WESTERN BLOT SUR LES MICROVAISSEAUX CEREBRAUX

Expériences en cours

XII- INFILTRATION LEUCOCYTAIRE INTRA-CEREBRALE

Résultats préliminaires

L'immunomarquage du CD3 sur des coupes de cerveau a montré une présence de lymphocytes plus importante chez les rats BDL que chez les rats SHAM. La répartition topographique semble plutôt péri-vasculaire (**Figure 38**).

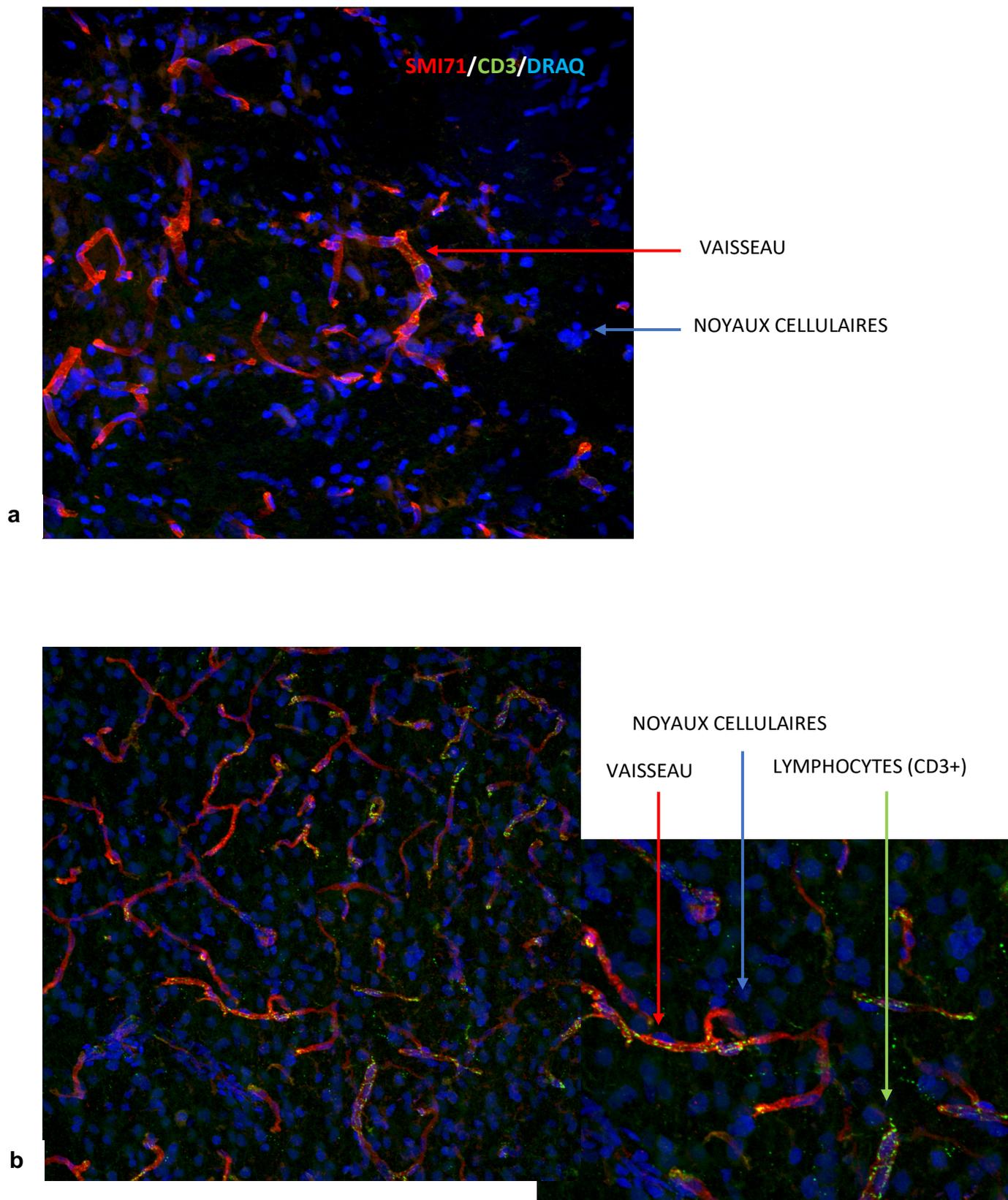


Figure 38 Immunomarquage CD3 sur coupes de cerveau de rats BDL et SHAM

38.a. Coupe de cerveau d'un rat SHAM. Bleu :DRAQ5 (noyaux cellulaires), Rouge : SMI71 (cellules endothéliales cérébrales), Vert : CD3

38.b. Coupe de cerveau d'un rat BDL. Bleu :DRAQ5 (noyaux cellulaires), Rouge : SMI71 (cellules endothéliales cérébrales), Vert : CD3

L'isolement des leucocytes intra-cérébraux a montré une proportion de cellules immunitaires plus élevée chez les rats BDL que chez les SHAM (15% vs 1%; pas de test statistique) (**Figure 39**).

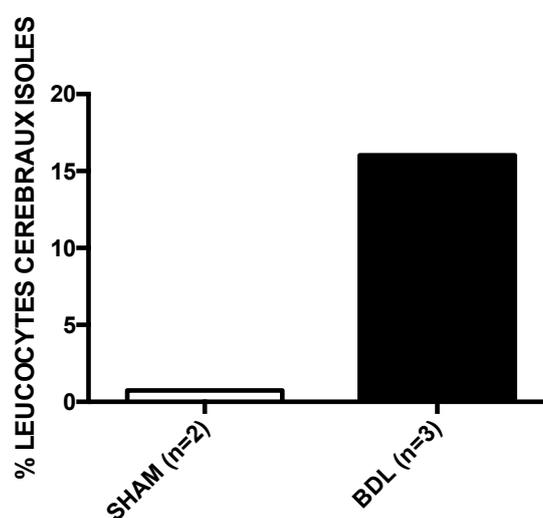


Figure 39 Pourcentage de leucocytes au sein des cellules immunes isolées à partir du cerveau de BDL et SHAM

EXPERIENCES EN ATTENTE

Ce travail n'est pas achevé. En effet, comme expliqué dans les méthodes, une fermeture de l'animalerie nous a contraints à décaler certaines manipulations de plusieurs mois. Ci-dessous figure une liste des expériences pour lesquelles du matériel est acquis ou en cours d'acquisition, et qui seront effectuées avant l'été :

-Plusieurs groupes de rats : BDL et SHAM traités par la biotine ou son placebo, et leurs contrôles sans biotine, avec dosages de l'ammoniémie, des cytokines, mesure de la perméabilité de la BHE, afin de consolider ces résultats qui sont nouveaux.

-Western-Blots des jonctions serrées

-Isolement des microvaisseaux : consolidation des résultats avec plus de matériel

-Infiltration leucocytaire cérébrale

-Analyse des résultats en métabolomique des cerveaux dans les groupes biotine et contrôles. Ces résultats feront probablement l'objet d'une publication séparée.

DISCUSSION

Ce travail suggère à nouveau que le développement d'une EH au cours de la cirrhose est multifactoriel. Pour une maladie hépatique de sévérité identique puisque F4 en histologie, les animaux de nos deux modèles de cirrhose ne présentent pas le même phénotype. Les rats BDL ont une hyperammoniémie marquée et présentent des troubles comportementaux francs au test de l'Openfield. A l'inverse, les rats CCl4, qui ont aussi une hyperammoniémie, présentent peu ou pas d'anomalies neurologiques. L'une des principales différences (outre celles inhérentes aux modèles) serait le niveau d'inflammation systémique. En effet, le taux de cytokines plasmatiques pro-inflammatoires (TNF α , IFN γ , IL6) est bien plus élevé chez les rats BDL que chez les rats CCl4. Ceci suggère que l'hyperammoniémie n'est probablement pas suffisante pour développer une EH. Le fait que la RFX et le benzoate, qui diminuent tous les deux les cytokines plasmatiques (ces résultats sont à consolider comme expliqué), diminuent l'EH chez les animaux BDL, alors que la RFX ne diminue pas l'ammoniémie, souligne bien le rôle de l'inflammation.

L'implication de l'hyperammoniémie dans l'EH est étudiée de longue date et apparaît désormais comme une donnée solide. Outre son effet osmotique induisant de l'œdème astrocytaire après métabolisation par la glutamine synthétase, son rôle sur la BHE est de plus en plus suspecté. L'ammoniaque induirait une neuro-inflammation et une activation microgliale ce qui augmenterait la production de métalloprotéases comme MMP9 ; celles-ci pourraient alors dégrader les protéines de jonctions serrées et augmenter ainsi modifier la perméabilité de la BHE (85, 86). Par ailleurs, chez les patients ayant une EH, l'hyperammoniémie, bien qu'imparfaitement corrélée à la sévérité des troubles neurologiques, est constante. Sa valeur prédictive négative est élevée et les sociétés savantes d'hépatologie recommandent d'ailleurs à ce titre de remettre en cause le diagnostic d'EH en cas d'ammoniémie normale (1).

Concernant le rôle synergique de l'inflammation, ceci est également concordant avec d'autres études qui ont par exemple montré que les patients ayant une hyperammoniémie ne développent une EH que si un SIRS est associé (41). De plus, les cellules endothéliales cérébrales possèdent des récepteurs aux cytokines inflammatoires, comme cela a été suggéré au cours de l'encéphalopathie septique et étudié au cours de maladies neurologiques inflammatoires comme la sclérose en

plaque ; l'afflux de cytokines sur la BHE pourrait ainsi moduler la perméabilité de celle-ci.

Plusieurs études cliniques ont montré qu'il existait une corrélation entre le taux de certaines cytokines pro-inflammatoires (comme IL6 ou IL18), la présence et la sévérité de l'EH minime (107) ou de l'EH clinique (108) au cours de la cirrhose. Certains auteurs ont montré une corrélation entre l'ammoniémie et l'élévation de l'IL6 et du $TNF\alpha$ sur les modifications observées en imagerie cérébrale (tenseur de diffusion) (109), allant dans le sens d'une synergie entre ces 2 facteurs. Même s'il n'a actuellement pas été montré que certaines étiologies de cirrhose pourraient augmenter le risque d'EH car plus inflammatoires (comme la cholangite sclérosante primitive par exemple), il est net pour tous les cliniciens que toute infection survenant chez un patient atteint de cirrhose peut se manifester uniquement par une EH isolée.

Nous rapportons des résultats originaux sur la perméabilité de la BHE chez les animaux atteints de cirrhose. Celle-ci, explorée par l'extravasation d'un fluorochrome, serait augmentée chez les rats BDL alors qu'elle ne serait pas modifiée chez les rats CCl4. Les rats BDL encéphalopathes avaient dans notre travail une augmentation de la perméabilité de la BHE par rapport aux rats non encéphalopathes. Il existait de plus une corrélation significative entre ammoniémie d'une part, cytokines d'autre part, et perméabilité de la BHE. S'il est tentant de faire l'hypothèse d'un lien de causalité entre augmentation de la perméabilité de la BHE et encéphalopathie, nous n'avons pu le démontrer dans cette étude. L'administration de traitements agissant directement sur la réparation de la BHE sans agir sur l'inflammation (ni l'ammoniémie), comme les statines, serait particulièrement intéressante pour creuser cette hypothèse. Par ailleurs, pour démontrer le rôle essentiel de l'inflammation, qui est peu importante chez les rats CCl4, dans la genèse de l'EH et des anomalies de perméabilité de BHE, l'administration de LPS (ou une ligature du caecum) dans ce modèle animal puis l'étude de l'EH et de la perméabilité de la BHE apporterait des éléments très importants (cf infra).

De façon originale, ce travail a permis également de montrer que les anomalies comportementales et de perméabilité de la BHE pouvaient être prévenues par l'administration de différents traitements. Le benzoate de sodium tout d'abord, épurateur d'ammoniaque dont l'utilisation n'est pas encore validée dans le traitement

de l'EH, permet comme attendu de diminuer l'ammoniémie des rats BDL traités. Son efficacité sur la diminution de la perméabilité de la BHE pourrait être médiée par ce mécanisme mais peut-être également par une action directe sur le système nerveux. Certaines études rapportent par exemple une efficacité de cette molécule dans le traitement de certaines affections psychiatriques comme la schizophrénie (110) via les récepteurs NMDA. Il est aussi à noter que dans notre travail le benzoate de sodium semblait diminuer un peu les cytokines plasmatiques, et là le lien entre inflammation et ammoniémie est à creuser.

La RFX, antibiotique non absorbable validé en prophylaxie secondaire contre l'EH n'induit pas de diminution significative de l'ammoniémie mais a cependant un effet systémique puisqu'il prévient lui aussi les anomalies neurologiques chez les rats BDL. Ceci pourrait s'expliquer par une augmentation de l'absorption de la RFX au cours de la cirrhose du fait d'une augmentation de la perméabilité intestinale. En effet, la production de iNOS, l'augmentation du NO, la présence de cytokines pro-inflammatoires comme IL6 (111), la dysbiose et la modulation de l'immunité innée locale (modulation de la synthèse des peptides anti-microbiens par les cellules de Paneth) (112) pourrait induire une modification des jonctions serrées entre les entérocytes et augmenter la perméabilité intestinale. De même, le mécanisme d'action de la RFX sur l'augmentation de la perméabilité de la BHE reste à préciser mais il pourrait être lié à une diminution de l'inflammation systémique. Certains auteurs ne rapportent pas de lien entre RFX et inflammation systémique (113) cependant, de plus en plus d'études montrent des effets anti-inflammatoires locaux comme dans la maladie de Crohn (114), dans le syndrome de l'intestin irritable post-infectieux (115) ou dans la maladie diverticulaire. Une étude évoque même un rôle de la RFX sur la fibrose hépatique au cours de la cirrhose sur un modèle de rat BDL, ce qui suggère une potentielle action systémique (116).

Enfin, le fait que la biotine ait également montré une efficacité sur les troubles comportementaux liés à l'EH et sur l'augmentation de perméabilité de la BHE est un résultat tout à fait novateur. Aucune autre étude n'a précédemment administré cette molécule pour traiter l'EH. Ainsi, cela est concordant avec l'étude clinique qui avait montré à partir de l'analyse de LCR de patients qu'il pourrait exister des modifications au niveau de certains métabolites du cycle de Krebs au cours de l'EH (notamment une accumulation des composés acétylés) (55). La biotine restaurerait alors le déficit

énergétique et améliorerait les symptômes de l'EH. Une étude métabolomique sur des extraits des cerveaux des rats sous Biotine et des contrôles est en cours pour mieux comprendre ces mécanismes. Une autre hypothèse, peut-être plus simple, serait que la biotine diminue également l'inflammation. En effet, ce traitement semblait diminuer les cytokines plasmatiques chez les rats, ces résultats restant à prouver.

Suite à ces résultats très encourageants, l'utilisation de la biotine dans l'EH a fait l'objet d'une demande de brevet et un essai thérapeutique de phase 2 va être mis en place chez l'humain dans le service d'hépto-gastro-entérologie de l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière.

Ainsi, ce travail a permis de montrer des résultats originaux sur la physiopathologie de l'EH au cours de la cirrhose. Le phénotype des animaux a été décrit de façon précise puisque l'atteinte hépatique a été documentée chez chacun d'entre eux biologiquement et histologiquement ; l'EH a été objectivée par un test comportemental validé ce qui est rarement fait dans les études faites sur les modèles BDL où les auteurs considèrent que la BDL est en soi un modèle d'EH. Nous avons cependant montré que la totalité des animaux ne développe pas des troubles neurologiques.

Cette étude présente certains écueils. Tout d'abord, le fait que les rats ayant une cirrhose induite par le CCl₄ ne développent pas, pour la plupart d'entre eux, d'inflammation systémique ni d'EH est discordant avec certains résultats obtenus dans d'autres équipes (117).

Ceci pourrait être expliqué par le statut sanitaire de l'animalerie de notre centre de recherche qui est EOPS c'est-à-dire Exempte d'Organisme Pathogène Spécifique. Les cages des animaux sont changées 2 fois par semaine et les conditions d'hygiène y sont strictes. La plupart des études de la littérature utilisent des animaux élevés dans des animaleries conventionnelles. L'autre donnée en faveur de cette hypothèse est la durée d'évolution de nos rats BDL. En effet, dans la littérature il est majoritairement décrit que les animaux développent une cirrhose atteignant le stade terminal avec des complications telles que l'EH en environ 4 semaines. Nous avons observé chez nos animaux que 4 semaines après la chirurgie, une minorité atteint un stade terminal. Nous sacrifions ces rats en moyenne à 7 semaines pour obtenir des signes d'atteinte francs. Il en a été de même lorsque nous avons induit une EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis), décrite dans les articles comme atteignant un pic 7 à

10 jours après l'injection de protéine recombinante ; les rates Agouti dans notre animalerie n'ont développé des signes neurologiques francs qu'après 15 jours et en ayant demandé de ne changer les cages qu'une fois par semaine. Le statut sanitaire et donc la difficulté à atteindre des niveaux d'inflammation importants est ainsi très probablement à l'origine de ces différences observées avec la littérature.

Les auteurs utilisant le modèle CCl₄ l'utilisent souvent comme modèle d'insuffisance hépatique aigue (118) ou comme modèle de cirrhose compensée (119). Pour ce faire, ils apportent du CCl₄ aux animaux pendant une durée prolongée (jusqu'à 28 semaines pour certains (119)), au risque d'une mortalité plus importante. Par ailleurs, plusieurs études utilisant le CCl₄ comme modèle de cirrhose doivent utiliser un co-facteur d'aggravation pour obtenir des signes plus marqués ; c'est le cas par exemple de Miguel et al qui ligaturent la veine porte afin de majorer l'hyperammoniémie et l'hypertension portale (120) ou de Wang et al. (117) qui apportent de l'alcool aux animaux en plus du CCl₄. Ces données sont donc concordantes avec nos résultats montrant que le modèle de cirrhose CCl₄ amène moins d'EH que le modèle BDL.

Par ailleurs, le fait que les rats BDL recevant le traitement hyperammoniémiant n'aient pas une hyperammoniémie, ni une EH, ni une augmentation de perméabilité de la BHE plus importantes que les rats BDL non traités est inattendu. L'explication que nous pouvons apporter est que la durée d'évolution de nos BDL (7 à 8 semaines) est probablement longue, ce qui fait que l'ammoniémie atteint un plateau ne permettant plus de discriminer les rats traités et non traités. De plus, à ce stade d'avancement de la maladie, les rats traités et non traités développent tous une inflammation importante ne permettant plus de discriminer les troubles comportementaux et de la BHE liés à l'hyperammoniémie seule. Dans les études utilisant ce type de régime, les auteurs laissent la maladie évoluer 4 semaines (100) en moyenne et ne phénotypent pas tous les animaux en terme de test comportemental comme nous l'avons fait.

Nous devons confirmer les résultats concernant l'étude des jonctions serrées. Dans notre étude, le fait que les PCR des jonctions serrées aient été dosées à partir de microvaisseaux issus de cerveaux entiers est peut-être inadéquat. En effet, plusieurs études ont montré une régionalisation des anomalies dans le cerveau au cours de l'EH. Notamment, plusieurs équipes rapportent une modification des jonctions serrées plus marquées au niveau de l'hippocampe, du striatum et du cervelet (121), dernière

partie que nous avons retirée en même temps que le tronc cérébral afin d'écartier les plexus choroïdes de notre analyse de perméabilité. Les modifications ont donc pu avoir été diluées au milieu de certaines régions moins atteintes. Différentes expériences en cours ou à prévoir, comme un travail sur des zones de cerveau distinctes, et un sacrifice des animaux BDL avec hyperammoniémie à un stade plus précoce, apporterait certainement un éclairage nouveau.

L'analyse protéique des jonctions serrées (occludine, claudine 5, ZO1) par Western Blot et immunofluorescence permettra de déterminer si ces protéines sont diminuées au cours de l'EH ce qui pourrait expliquer l'augmentation de perméabilité de la BHE. Si ces résultats sont négatifs, nous proposons de refaire les PCR et l'analyse protéique des jonctions en séparant différentes régions du cerveau. Par ailleurs, il est possible que la synthèse de ces protéines ne soit pas diminuée mais qu'elles soient internalisées en intra-cellulaire donc non disponibles à la membrane pour assurer leur fonction. Ceci pourrait notamment être le cas pour la claudine 5 comme le montre par exemple une étude *in vitro* dans laquelle le froid augmente la perméabilité inter-cellulaire en relocalisant cette protéine de la membrane vers le cytoplasme (122).

L'inflammation intra-cérébrale reste encore à confirmer en augmentant le nombre d'expériences d'extraction des leucocytes intra-cérébraux dans nos deux modèles de cirrhose BDL et CCl4. Nous prévoyons également de quantifier la neuroinflammation en étudiant l'activation microgliale par des immunomarquages de GFAP et Iba-1. Pour préciser le rôle de l'inflammation systémique, nous prévoyons de répéter l'étude comportementale et de perméabilité de la BHE dans des modèles animaux d'inflammation sans hyperammoniémie en réalisant par exemple une ligature-ponction du caecum ou en administrant du lipopolysaccharide. *A contrario*, nous pourrions s'affranchir de l'inflammation chez les BDL en leur donnant un traitement anti-inflammatoire comme l'indométacine et observer à quel point les anomalies liées à l'EH s'améliorent. Nous pourrions également étudier le phénotype d'animaux ayant une hyperammoniémie seule induite par une anastomose porto-cave chirurgicale.

Un des éléments majeurs que nous n'avons pas exploré dans ce travail est le rôle de l'hyperbilirubinémie qui reste un des paramètres permettant le plus de différencier les rats BDL et CCl4. La toxicité directe des acides biliaires sur le rein par exemple, a été rapportée dans plusieurs études (123) (124). Au niveau cérébral, la bilirubine est

connue pour ses effets délétères notamment au cours de l'ictère nucléaire du nouveau-né (125). Son implication dans l'EH n'a pas été étudiée à ce jour. Les données de métabolomique pourront nous aider à savoir si les acides biliaires sont augmentés dans le tissu cérébral de nos différents modèles animaux.

Enfin, le mécanisme d'action de la biotine dans l'EH n'est pas encore élucidé. L'axe principal est bien sûr celui de la restauration de voies métaboliques telles que le cycle de Krebs qui pourraient être altérées au cours de la cirrhose. Elle pourrait également agir en diminuant l'inflammation systémique, même si cela n'a jamais été démontré dans aucune autre pathologie avec ce traitement. Une tendance à la diminution des cytokines chez les rats traités pousse à explorer cette voie, en confirmant ces résultats d'abord sur un plus grand nombre d'animaux. Ici également les données de métabolomique pourront orienter sur le rôle plus précis de la biotine au cours de l'EH.

CONCLUSION

Ce travail a permis de mieux phénotyper deux modèles animaux de cirrhose et de mettre en exergue trois axes majeurs intervenant dans la physiopathologie de l'EH de la cirrhose : l'hyperammoniémie, l'inflammation et le déficit énergétique (**Figure 40**). Ce dernier doit cependant être encore précisé grâce aux expériences complémentaires prévues.

Tous trois semblent agir en synergie et avoir un rôle dans l'apparition de troubles comportementaux mais également dans l'augmentation de la perméabilité de la BHE aux solutés.

Les troubles observés sont prévenus par différents traitements, le benzoate de sodium, la RFX et de façon novatrice, par la biotine. Cette dernière molécule, au vu des résultats encourageants, a abouti au dépôt d'un brevet et va d'ailleurs faire l'objet de la mise en place d'un essai clinique de phase II en thérapeutique humaine.

Ces résultats sont encourageants car, conjugués avec ceux d'autres équipes, ils vont peut-être permettre de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques alors que l'EH est la complication la plus sévère de la cirrhose.

Nos hypothèses physiopathologiques sont synthétisées dans la **Figure 40** qui montre les interactions potentielles entre le foie cirrhotique, la circulation systémique et le tissu cérébral séparés par la BHE au cours de l'EH. Les 3 axes majeurs du travail que sont l'hyperammoniémie, l'inflammation systémique et la dérégulation du cycle de Krebs ainsi que les thérapeutiques pouvant les cibler (utilisées sur les modèles animaux au cours de ce travail de thèse) y sont résumés.

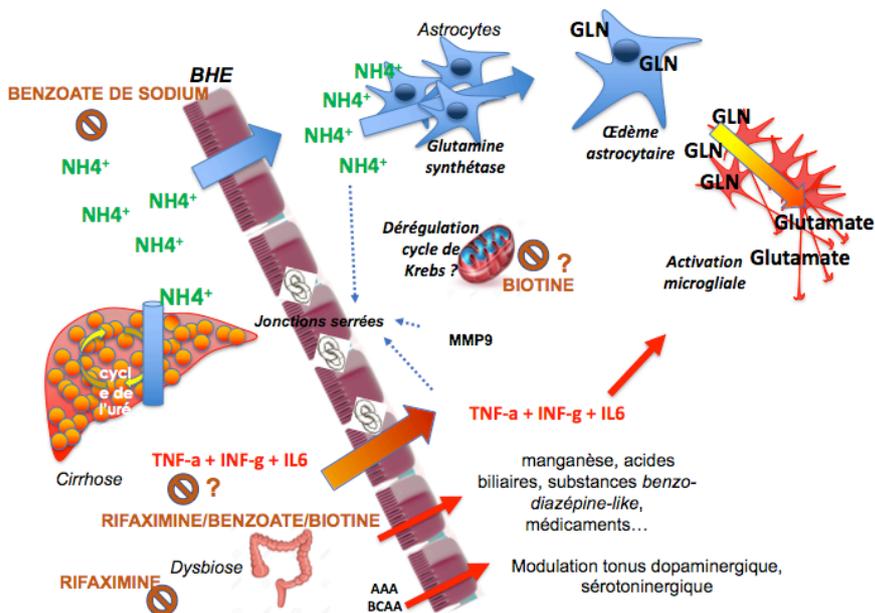


Figure 40 : Hypothèses physiopathologiques expliquant le rôle de la BHE dans l'EH.

Adapté de (126)

CONCLUSION DE LA THESE

Cette thèse a fait l'objet de 4 ans de travail. Elle a correspondu à la période de création et de structuration du groupe d'étude sur l'EH de la Pitié-Salpêtrière (Brain Liver Pitié-Salpêtrière Study Group-BLIPS). Pendant ces années, nous avons pu valider un score facile d'emploi en réanimation pour estimer la gravité de l'EH. Nous espérons ainsi que les réanimateurs pourrons s'appropriier plus facilement l'évaluation de cette pathologie dont les scores étaient pour l'instant réservés aux hépatologues. Nous avons exploré le concept d'anomalies de la BHE lors de l'EH, d'abord au moyen d'une mesure de la gravité spécifique du LCR par scanner chez des patients, puis de façon expérimentale sur différents modèles de rats atteints de cirrhose. Nous avons implémenté les techniques d'exploration de la BHE dans le laboratoire. Nous avons montré un rôle probablement synergique de l'inflammation et de l'hyperammoniémie, et nos résultats suggèrent aussi des anomalies du cycle de Krebs. Pour ces dernières, une cible thérapeutique a été trouvée. Nos résultats expérimentaux vont conduire à l'élaboration d'une étude de phase 2 chez les patients atteints d'EH.

Ce travail n'est qu'une première étape dans la compréhension de nouveaux mécanismes d'EH chez les patients atteints de cirrhose. A l'avenir, nous souhaitons poursuivre ce travail, en développant dans notre laboratoire la culture cellulaire de cellules endothéliales cérébrales humaines (D3, avec l'aimable collaboration du Pr PO Couraud). Nous souhaitons aussi explorer aussi les différentes pathologies cérébrales associées à l'EH chez nos patients, qui présentent souvent plusieurs facteurs de risque neurologiques. Enfin, la proximité avec les équipes de gastroentérologie de St Antoine qui ont une expertise internationale dans le domaine de la transplantation fécale est une opportunité unique d'explorer d'autres pistes physiopathologiques et thérapeutiques.

REFERENCES

1. Vilstrup H, Amodio P, Bajaj J, Cordoba J, Ferenci P, Mullen KD, et al. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: 2014 Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases and the European Association for the Study of the Liver. *Hepatology*. 2014;60(2):715-35.
2. Ferenci P, Lockwood A, Mullen K, Tarter R, Weissenborn K, Blei AT. Hepatic encephalopathy--definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology*. 2002;35(3):716-21.
3. Blei AT, Cordoba J, Practice Parameters Committee of the American College of G. Hepatic Encephalopathy. *Am J Gastroenterol*. 2001;96(7):1968-76.
4. Bajaj JS. Review article: potential mechanisms of action of rifaximin in the management of hepatic encephalopathy and other complications of cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2016;43 Suppl 1:11-26.
5. Joshi D, O'Grady J, Patel A, Shawcross D, Connor S, Deasy N, et al. Cerebral oedema is rare in acute-on-chronic liver failure patients presenting with high-grade hepatic encephalopathy. *Liver Int*. 2014;34(3):362-6.
6. Levesque E, Hoti E, Azoulay D, Ichai P, Habouchi H, Castaing D, et al. Prospective evaluation of the prognostic scores for cirrhotic patients admitted to an intensive care unit. *J Hepatol*. 2012;56(1):95-102.
7. Orman ES, Perkins A, Ghabril M, Khan BA, Chalasani N, Boustani MA. The confusion assessment method for the intensive care unit in patients with cirrhosis. *Metab Brain Dis*. 2015;30(4):1063-71.
8. Kircheis G, Knoche A, Hilger N, Manhart F, Schnitzler A, Schulze H, et al. Hepatic encephalopathy and fitness to drive. *Gastroenterology*. 2009;137(5):1706-15 e1-9.
9. Prasad S, Dhiman RK, Duseja A, Chawla YK, Sharma A, Agarwal R. Lactulose improves cognitive functions and health-related quality of life in patients with cirrhosis who have minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology*. 2007;45(3):549-59.
10. Bajaj JS. Minimal hepatic encephalopathy matters in daily life. *World J Gastroenterol*. 2008;14(23):3609-15.
11. Jepsen P, Ott P, Andersen PK, Sorensen HT, Vilstrup H. Clinical course of alcoholic liver cirrhosis: a Danish population-based cohort study. *Hepatology*. 2010;51(5):1675-82.
12. Cordoba J, Ventura-Cots M, Simon-Talero M, Amoros A, Pavesi M, Vilstrup H, et al. Characteristics, risk factors, and mortality of cirrhotic patients hospitalized for hepatic encephalopathy with and without acute-on-chronic liver failure (ACLF). *J Hepatol*. 2014;60(2):275-81.
13. Patidar KR, Thacker LR, Wade JB, Sterling RK, Sanyal AJ, Siddiqui MS, et al. Covert hepatic encephalopathy is independently associated with poor survival and increased risk of hospitalization. *Am J Gastroenterol*. 2014;109(11):1757-63.
14. Ferenci P. Hepatic encephalopathy. *Gastroenterol Rep (Oxf)*. 2017;5(2):138-47.
15. Wijdicks EF. Hepatic Encephalopathy. *N Engl J Med*. 2016;375(17):1660-70.
16. Gundling F, Zelihic E, Seidl H, Haller B, Umgelter A, Schepp W, et al. How to diagnose hepatic encephalopathy in the emergency department. *Ann Hepatol*. 2013;12(1):108-14.
17. Ong JP, Aggarwal A, Krieger D, Easley KA, Karafa MT, Van Lente F, et al. Correlation between ammonia levels and the severity of hepatic encephalopathy. *Am J Med*. 2003;114(3):188-93.
18. Tarantino G, Citro V, Esposito P, Giaquinto S, de Leone A, Milan G, et al. Blood ammonia levels in liver cirrhosis: a clue for the presence of portosystemic collateral veins. *BMC Gastroenterol*. 2009;9:21.
19. Lai CH, Cheng PY, Chen YY. Liver cirrhosis and risk of intracerebral hemorrhage: a 9-year follow-up study. *Stroke*. 2011;42(9):2615-7.
20. Chavarria L, Cordoba J. Magnetic resonance of the brain in chronic and acute liver failure. *Metab Brain Dis*. 2014;29(4):937-44.

21. Chavarria L, Cordoba J. Magnetic resonance imaging and spectroscopy in hepatic encephalopathy. *J Clin Exp Hepatol*. 2015;5(Suppl 1):S69-74.
22. Tollard E, Galanaud D, Perlberg V, Sanchez-Pena P, Le Fur Y, Abdennour L, et al. Experience of diffusion tensor imaging and 1H spectroscopy for outcome prediction in severe traumatic brain injury: Preliminary results. *Crit Care Med*. 2009;37(4):1448-55.
23. Rudler M, Weiss N, Perlberg V, Mallet M, Tripon S, Valabregue R, et al. Combined diffusion tensor imaging and magnetic resonance spectroscopy to predict neurological outcome before transjugular intrahepatic portosystemic shunt. *Aliment Pharmacol Ther*. 2018;48(8):863-74.
24. Marchetti P, D'Avanzo C, Orsato R, Montagnese S, Schiff S, Kaplan PW, et al. Electroencephalography in patients with cirrhosis. *Gastroenterology*. 2011;141(5):1680-9 e1-2.
25. Amodio P, Marchetti P, Del Piccolo F, de Tourtchaninoff M, Varghese P, Zuliani C, et al. Spectral versus visual EEG analysis in mild hepatic encephalopathy. *Clin Neurophysiol*. 1999;110(8):1334-44.
26. Montagnese S, De Rui M, Schiff S, Ceranto E, Valenti P, Angeli P, et al. Prognostic benefit of the addition of a quantitative index of hepatic encephalopathy to the MELD score: the MELD-EEG. *Liver Int*. 2015;35(1):58-64.
27. Romero-Gomez M, Cordoba J, Jover R, del Olmo JA, Ramirez M, Rey R, et al. Value of the critical flicker frequency in patients with minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology*. 2007;45(4):879-85.
28. Bajaj JS, Thacker LR, Heuman DM, Fuchs M, Sterling RK, Sanyal AJ, et al. The Stroop smartphone application is a short and valid method to screen for minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology*. 2013;58(3):1122-32.
29. Bajaj JS, Heuman DM, Sterling RK, Sanyal AJ, Siddiqui M, Matherly S, et al. Validation of EncephalApp, Smartphone-Based Stroop Test, for the Diagnosis of Covert Hepatic Encephalopathy. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2015;13(10):1828-35 e1.
30. Campagna F, Montagnese S, Ridola L, Senzolo M, Schiff S, De Rui M, et al. The animal naming test: An easy tool for the assessment of hepatic encephalopathy. *Hepatology*. 2017;66(1):198-208.
31. Merli M, Durand F. Muscle mass vs. adipose tissue to predict outcome in cirrhosis: Which matters and in which patients? *J Hepatol*. 2018;69(3):567-9.
32. Brumback RA, Lapham LW. DNA synthesis in Alzheimer type II astrocytosis. The question of astrocytic proliferation and mitosis in experimentally induced hepatic encephalopathy. *Arch Neurol*. 1989;46(8):845-8.
33. Palomero-Gallagher N, Zilles K. Neurotransmitter receptor alterations in hepatic encephalopathy: a review. *Arch Biochem Biophys*. 2013;536(2):109-21.
34. Garcia-Lezana T, Oria M, Romero-Gimenez J, Bove J, Vila M, Genesca J, et al. Cerebellar neurodegeneration in a new rat model of episodic hepatic encephalopathy. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2017;37(3):927-37.
35. Rodrigo R, Cauli O, Gomez-Pinedo U, Agusti A, Hernandez-Rabaza V, Garcia-Verdugo JM, et al. Hyperammonemia induces neuroinflammation that contributes to cognitive impairment in rats with hepatic encephalopathy. *Gastroenterology*. 2010;139(2):675-84.
36. Hadjihambi A, De Chiara F, Hosford PS, Habtation A, Karagiannis A, Davies N, et al. Ammonia mediates cortical hemichannel dysfunction in rodent models of chronic liver disease. *Hepatology*. 2017;65(4):1306-18.
37. Monfort P, Kosenko E, Erceg S, Canales JJ, Felipe V. Molecular mechanism of acute ammonia toxicity: role of NMDA receptors. *Neurochem Int*. 2002;41(2-3):95-102.
38. Minana MD, Kosenko E, Marcaida G, Hermenegildo C, Montoliu C, Grisolia S, et al. Modulation of glutamine synthesis in cultured astrocytes by nitric oxide. *Cell Mol Neurobiol*. 1997;17(4):433-45.
39. Hermenegildo C, Marcaida G, Montoliu C, Grisolia S, Minana MD, Felipe V. NMDA receptor antagonists prevent acute ammonia toxicity in mice. *Neurochem Res*. 1996;21(10):1237-44.

40. Kosenko E, Felipo V, Montoliu C, Grisolia S, Kaminsky Y. Effects of acute hyperammonemia in vivo on oxidative metabolism in nonsynaptic rat brain mitochondria. *Metab Brain Dis.* 1997;12(1):69-82.
41. Shawcross DL, Davies NA, Williams R, Jalan R. Systemic inflammatory response exacerbates the neuropsychological effects of induced hyperammonemia in cirrhosis. *J Hepatol.* 2004;40(2):247-54.
42. Srivastava A, Yadav SK, Yachha SK, Thomas MA, Saraswat VA, Gupta RK. Pro-inflammatory cytokines are raised in extrahepatic portal venous obstruction, with minimal hepatic encephalopathy. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011;26(6):979-86.
43. Shawcross DL, Wright G, Olde Damink SW, Jalan R. Role of ammonia and inflammation in minimal hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis.* 2007;22(1):125-38.
44. Scott TR, Kronsten VT, Hughes RD, Shawcross DL. Pathophysiology of cerebral oedema in acute liver failure. *World J Gastroenterol.* 2013;19(48):9240-55.
45. Hu S, Sheng WS, Ehrlich LC, Peterson PK, Chao CC. Cytokine effects on glutamate uptake by human astrocytes. *Neuroimmunomodulation.* 2000;7(3):153-9.
46. Oh YJ, Francis JW, Markelonis GJ, Oh TH. Interleukin-1-beta and tumor necrosis factor-alpha increase peripheral-type benzodiazepine binding sites in cultured polygonal astrocytes. *J Neurochem.* 1992;58(6):2131-8.
47. Moller K, Strauss GI, Qvist J, Fonsmark L, Knudsen GM, Larsen FS, et al. Cerebral blood flow and oxidative metabolism during human endotoxemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002;22(10):1262-70.
48. Duchini A, Govindarajan S, Santucci M, Zampi G, Hofman FM. Effects of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 on fluid-phase permeability and ammonia diffusion in CNS-derived endothelial cells. *J Investig Med.* 1996;44(8):474-82.
49. Albillos A, Lario M, Alvarez-Mon M. Cirrhosis-associated immune dysfunction: distinctive features and clinical relevance. *J Hepatol.* 2014;61(6):1385-96.
50. Shiota T, Watanabe A, Higashi T, Nagashima H. Prevention of methionine and ammonia-induced coma by intravenous infusion of a branched chain amino acid solution to rats with liver injury. *Acta Med Okayama.* 1984;38(5):479-82.
51. Basile AS, Hughes RD, Harrison PM, Murata Y, Pannell L, Jones EA, et al. Elevated brain concentrations of 1,4-benzodiazepines in fulminant hepatic failure. *N Engl J Med.* 1991;325(7):473-8.
52. Butterworth RF. Neurosteroids in hepatic encephalopathy: Novel insights and new therapeutic opportunities. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2016;160:94-7.
53. Rama Rao KV, Norenberg MD. Glutamine in the pathogenesis of hepatic encephalopathy: the trojan horse hypothesis revisited. *Neurochem Res.* 2014;39(3):593-8.
54. Quinn M, McMillin M, Galindo C, Frampton G, Pae HY, DeMorrow S. Bile acids permeabilize the blood brain barrier after bile duct ligation in rats via Rac1-dependent mechanisms. *Dig Liver Dis.* 2014;46(6):527-34.
55. Weiss N, Barbier Saint Hilaire P, Colsch B, Isnard F, Attala S, Schaefer A, et al. Cerebrospinal fluid metabolomics highlights dysregulation of energy metabolism in overt hepatic encephalopathy. *J Hepatol.* 2016;65(6):1120-30.
56. Zhang J, Zhang M, Sun B, Li Y, Xu P, Liu C, et al. Hyperammonemia enhances the function and expression of P-glycoprotein and Mrp2 at the blood-brain barrier through NF-kappaB. *J Neurochem.* 2014;131(6):791-802.
57. Luo M, Li L, Lu CZ, Cao WK. Clinical efficacy and safety of lactulose for minimal hepatic encephalopathy: a meta-analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2011;23(12):1250-7.
58. Sharma P, Agrawal A, Sharma BC, Sarin SK. Prophylaxis of hepatic encephalopathy in acute variceal bleed: a randomized controlled trial of lactulose versus no lactulose. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011;26(6):996-1003.
59. Gluud LL, Vilstrup H, Morgan MY. Nonabsorbable disaccharides for hepatic encephalopathy: A systematic review and meta-analysis. *Hepatology.* 2016;64(3):908-22.

60. Cutler T, Mints G. Lactulose vs Polyethylene Glycol for Treatment of Hepatic Encephalopathy. *JAMA Intern Med.* 2015;175(5):867-8.
61. Patidar KR, Bajaj JS. Antibiotics for the treatment of hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis.* 2013;28(2):307-12.
62. Kimer N, Krag A, Moller S, Bendtsen F, Gluud LL. Systematic review with meta-analysis: the effects of rifaximin in hepatic encephalopathy. *Aliment Pharmacol Ther.* 2014;40(2):123-32.
63. Bajaj JS, Heuman DM, Sanyal AJ, Hylemon PB, Sterling RK, Stravitz RT, et al. Modulation of the metabiome by rifaximin in patients with cirrhosis and minimal hepatic encephalopathy. *PLoS One.* 2013;8(4):e60042.
64. Bass NM, Mullen KD, Sanyal A, Poordad F, Neff G, Leevy CB, et al. Rifaximin treatment in hepatic encephalopathy. *N Engl J Med.* 2010;362(12):1071-81.
65. Sharma BC, Sharma P, Lunia MK, Srivastava S, Goyal R, Sarin SK. A randomized, double-blind, controlled trial comparing rifaximin plus lactulose with lactulose alone in treatment of overt hepatic encephalopathy. *Am J Gastroenterol.* 2013;108(9):1458-63.
66. Sanyal A, Younossi ZM, Bass NM, Mullen KD, Poordad F, Brown RS, et al. Randomised clinical trial: rifaximin improves health-related quality of life in cirrhotic patients with hepatic encephalopathy - a double-blind placebo-controlled study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011;34(8):853-61.
67. Neff GW, Jones M, Jonas M, Ravinuthala R, Novick D, Kaiser TE, et al. Lack of *Clostridium difficile* infection in patients treated with rifaximin for hepatic encephalopathy: a retrospective analysis. *J Clin Gastroenterol.* 2013;47(2):188-92.
68. Rockey DC, Vierling JM, Mantry P, Ghabril M, Brown RS, Jr., Alexeeva O, et al. Randomized, double-blind, controlled study of glycerol phenylbutyrate in hepatic encephalopathy. *Hepatology.* 2014;59(3):1073-83.
69. Sushma S, Dasarathy S, Tandon RK, Jain S, Gupta S, Bhist MS. Sodium benzoate in the treatment of acute hepatic encephalopathy: a double-blind randomized trial. *Hepatology.* 1992;16(1):138-44.
70. Weiss N, Tripon S, Lodey M, Guiller E, Junot H, Monneret D, et al. Treating hepatic encephalopathy in cirrhotic patients admitted to ICU with sodium phenylbutyrate: a preliminary study. *Fundam Clin Pharmacol.* 2018;32(2):209-15.
71. Li H, Sun J, Wang F, Ding G, Chen W, Fang R, et al. Sodium butyrate exerts neuroprotective effects by restoring the blood-brain barrier in traumatic brain injury mice. *Brain Res.* 2016;1642:70-8.
72. Weiss N, Miller F, Cazaubon S, Couraud PO. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1788(4):842-57.
73. Zlokovic BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron.* 2008;57(2):178-201.
74. Cecchelli R, Berezowski V, Lundquist S, Culot M, Renftel M, Dehouck MP, et al. Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6(8):650-61.
75. Weiss N, Miller F, Cazaubon S, Couraud PO. [Implication of the blood-brain barrier in neurological diseases: part II]. *Rev Neurol (Paris).* 2009;165(12):1010-22.
76. Loscher W, Potschka H. Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nat Rev Neurosci.* 2005;6(8):591-602.
77. Luissint AC, Artus C, Glacial F, Ganeshamoorthy K, Couraud PO. Tight junctions at the blood brain barrier: physiological architecture and disease-associated dysregulation. *Fluids Barriers CNS.* 2012;9(1):23.
78. Gavard J, Gutkind JS. VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat Cell Biol.* 2006;8(11):1223-34.
79. Dobrogowska DH, Lossinsky AS, Tarnawski M, Vorbodt AW. Increased blood-brain barrier permeability and endothelial abnormalities induced by vascular endothelial growth factor. *J Neurocytol.* 1998;27(3):163-73.

80. Wang W, Dentler WL, Borchardt RT. VEGF increases BMEC monolayer permeability by affecting occludin expression and tight junction assembly. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280(1):H434-40.
81. Dobrivojevic M, Spiranec K, Sindic A. Involvement of bradykinin in brain edema development after ischemic stroke. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2014.
82. Cote J, Bovenzi V, Savard M, Dubuc C, Fortier A, Neugebauer W, et al. Induction of selective blood-tumor barrier permeability and macromolecular transport by a biostable kinin B1 receptor agonist in a glioma rat model. *PLoS One*. 2012;7(5):e37485.
83. Alexander JJ, Jacob A, Cunningham P, Hensley L, Quigg RJ. TNF is a key mediator of septic encephalopathy acting through its receptor, TNF receptor-1. *Neurochem Int*. 2008;52(3):447-56.
84. de Vries HE, Blom-Rosemalen MC, van Oosten M, de Boer AG, van Berkel TJ, Breimer DD, et al. The influence of cytokines on the integrity of the blood-brain barrier in vitro. *J Neuroimmunol*. 1996;64(1):37-43.
85. Nguyen JH, Yamamoto S, Steers J, Sevlever D, Lin W, Shimojima N, et al. Matrix metalloproteinase-9 contributes to brain extravasation and edema in fulminant hepatic failure mice. *J Hepatol*. 2006;44(6):1105-14.
86. Chen F, Ohashi N, Li W, Eckman C, Nguyen JH. Disruptions of occludin and claudin-5 in brain endothelial cells in vitro and in brains of mice with acute liver failure. *Hepatology*. 2009;50(6):1914-23.
87. Skowronska M, Zielinska M, Wojcik-Stanaszek L, Ruskiewicz J, Milatovic D, Aschner M, et al. Ammonia increases paracellular permeability of rat brain endothelial cells by a mechanism encompassing oxidative/nitrosative stress and activation of matrix metalloproteinases. *J Neurochem*. 2012;121(1):125-34.
88. Belanger M, Asashima T, Ohtsuki S, Yamaguchi H, Ito S, Terasaki T. Hyperammonemia induces transport of taurine and creatine and suppresses claudin-12 gene expression in brain capillary endothelial cells in vitro. *Neurochem Int*. 2007;50(1):95-101.
89. Hang J, Zhou W, Zhang H, Sun B, Dai H, Su L, et al. TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms are very rare in the Chinese population. *J Endotoxin Res*. 2004;10(4):238-40.
90. Wang W, Lv S, Zhou Y, Fu J, Li C, Liu P. Tumor necrosis factor-alpha affects blood-brain barrier permeability in acetaminophen-induced acute liver failure. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2011;23(7):552-8.
91. Chastre A, Belanger M, Nguyen BN, Butterworth RF. Lipopolysaccharide precipitates hepatic encephalopathy and increases blood-brain barrier permeability in mice with acute liver failure. *Liver Int*. 2014;34(3):353-61.
92. Sharshar T, Annane D, de la Grandmaison GL, Brouland JP, Hopkinson NS, Francoise G. The neuropathology of septic shock. *Brain Pathol*. 2004;14(1):21-33.
93. Sonnevile R, Verdonk F, Rauturier C, Klein IF, Wolff M, Annane D, et al. Understanding brain dysfunction in sepsis. *Ann Intensive Care*. 2013;3(1):15.
94. Wijdicks EF, Bamlet WR, Maramattom BV, Manno EM, McClelland RL. Validation of a new coma scale: The FOUR score. *Ann Neurol*. 2005;58(4):585-93.
95. Zempeni J, Wijeratne SS, Hassan YI. Biotin. *Biofactors*. 2009;35(1):36-46.
96. Tourbah A, Lebrun-Frenay C, Edan G, Clanet M, Papeix C, Vukusic S, et al. MD1003 (high-dose biotin) for the treatment of progressive multiple sclerosis: A randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Mult Scler*. 2016;22(13):1719-31.
97. Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol*. 1984;65(3):305-11.
98. Jimenez W, Claria J, Arroyo V, Rodes J. Carbon tetrachloride induced cirrhosis in rats: a useful tool for investigating the pathogenesis of ascites in chronic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 1992;7(1):90-7.
99. Leke R, de Oliveira DL, Mussulini BH, Pereira MS, Kazlauckas V, Mazzini G, et al. Impairment of the organization of locomotor and exploratory behaviors in bile duct-ligated rats. *PLoS One*. 2012;7(5):e36322.

100. Wright G, Davies NA, Shawcross DL, Hodges SJ, Zwingmann C, Brooks HF, et al. Endotoxemia produces coma and brain swelling in bile duct ligated rats. *Hepatology*. 2007;45(6):1517-26.
101. Bedossa P. [Presentation of a grid for computer analysis for compilation of histopathologic lesions in chronic viral hepatitis C. Cooperative study of the METAVIR group]. *Ann Pathol*. 1993;13(4):260-5.
102. Molino Y, Jabes F, Lacassagne E, Gaudin N, Khrestchatsky M. Setting-up an in vitro model of rat blood-brain barrier (BBB): a focus on BBB impermeability and receptor-mediated transport. *J Vis Exp*. 2014(88):e51278.
103. Zhiyuan Q, Qingyong L, Shengming H, Hui M. Protective effect of rhEPO on tight junctions of cerebral microvascular endothelial cells early following traumatic brain injury in rats. *Brain Inj*. 2016;30(4):462-7.
104. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
105. Moller K, Stahl T, Boltze J, Wagner DC. Isolation of inflammatory cells from rat brain tissue after stroke. *Exp Transl Stroke Med*. 2012;4(1):20.
106. Davies AL, Desai RA, Bloomfield PS, McIntosh PR, Chapple KJ, Lington C, et al. Neurological deficits caused by tissue hypoxia in neuroinflammatory disease. *Ann Neurol*. 2013;74(6):815-25.
107. Montoliu C, Piedrafita B, Serra MA, del Olmo JA, Urios A, Rodrigo JM, et al. IL-6 and IL-18 in blood may discriminate cirrhotic patients with and without minimal hepatic encephalopathy. *J Clin Gastroenterol*. 2009;43(3):272-9.
108. Odeh M, Sabo E, Srugo I, Oliven A. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha correlate with severity of hepatic encephalopathy due to chronic liver failure. *Liver Int*. 2004;24(2):110-6.
109. Gupta RK, Yadav SK, Rangan M, Rathore RK, Thomas MA, Prasad KN, et al. Serum proinflammatory cytokines correlate with diffusion tensor imaging derived metrics and ¹H-MR spectroscopy in patients with acute liver failure. *Metab Brain Dis*. 2010;25(3):355-61.
110. Ryan A, Baker A, Dark F, Foley S, Gordon A, Hatherill S, et al. The efficacy of sodium benzoate as an adjunctive treatment in early psychosis - CADENCE-BZ: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 2017;18(1):165.
111. Du Plessis J, Vanheel H, Janssen CE, Roos L, Slavik T, Stivaktas PI, et al. Activated intestinal macrophages in patients with cirrhosis release NO and IL-6 that may disrupt intestinal barrier function. *J Hepatol*. 2013;58(6):1125-32.
112. Munoz L, Borrero MJ, Ubeda M, Conde E, Del Campo R, Rodriguez-Serrano M, et al. Intestinal immune dysregulation driven by dysbiosis promotes barrier disruption and bacterial translocation in rats with cirrhosis. *Hepatology*. 2018.
113. Kimer N, Pedersen JS, Tavenier J, Christensen JE, Busk TM, Hobolth L, et al. Rifaximin has minor effects on bacterial composition, inflammation, and bacterial translocation in cirrhosis: A randomized trial. *J Gastroenterol Hepatol*. 2018;33(1):307-14.
114. Lopetuso LR, Napoli M, Rizzatti G, Gasbarrini A. The intriguing role of Rifaximin in gut barrier chronic inflammation and in the treatment of Crohn's disease. *Expert Opin Investig Drugs*. 2018;27(6):543-51.
115. Jin Y, Ren X, Li G, Li Y, Zhang L, Wang H, et al. Beneficial effects of Rifaximin in post-infectious irritable bowel syndrome mouse model beyond gut microbiota. *J Gastroenterol Hepatol*. 2018;33(2):443-52.
116. Shin SK, Kwon OS, Lee JJ, Park YH, Choi CS, Jeong SH, et al. Effect of Rifaximin on Hepatic Fibrosis in Bile Duct-ligated Rat Model. *Korean J Gastroenterol*. 2017;70(5):239-46.
117. Wang WW, Zhang Y, Huang XB, You N, Zheng L, Li J. Fecal microbiota transplantation prevents hepatic encephalopathy in rats with carbon tetrachloride-induced acute hepatic dysfunction. *World J Gastroenterol*. 2017;23(38):6983-94.
118. LeSage GD, Benedetti A, Glaser S, Marucci L, Tretjak Z, Caligiuri A, et al. Acute carbon tetrachloride feeding selectively damages large, but not small, cholangiocytes from normal rat liver. *Hepatology*. 1999;29(2):307-19.

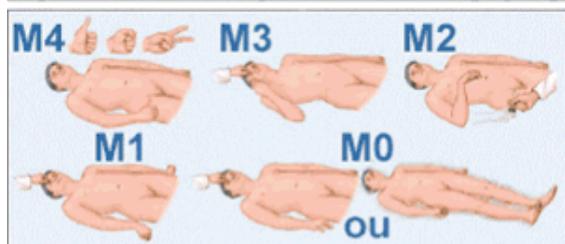
119. Regimbeau JM, Fuks D, Kohneh-Shahri N, Terris B, Soubrane O. Restrictive model of compensated carbon tetrachloride-induced cirrhosis in rats. *World J Gastroenterol.* 2008;14(45):6943-7.
120. Miquel M, Bartoli R, Odena G, Serafin A, Cabre E, Galan A, et al. Rat CCl(4)-induced cirrhosis plus total portal vein ligation: a new model for the study of hyperammonaemia and brain oedema. *Liver Int.* 2010;30(7):979-87.
121. Dhanda S, Sandhir R. Blood-Brain Barrier Permeability Is Exacerbated in Experimental Model of Hepatic Encephalopathy via MMP-9 Activation and Downregulation of Tight Junction Proteins. *Mol Neurobiol.* 2018;55(5):3642-59.
122. Inamura A, Adachi Y, Inoue T, He Y, Tokuda N, Nawata T, et al. Cooling treatment transiently increases the permeability of brain capillary endothelial cells through translocation of claudin-5. *Neurochem Res.* 2013;38(8):1641-7.
123. Adebayo D, Morabito V, Davenport A, Jalan R. Renal dysfunction in cirrhosis is not just a vasomotor nephropathy. *Kidney Int.* 2015;87(3):509-15.
124. van Slambrouck CM, Salem F, Meehan SM, Chang A. Bile cast nephropathy is a common pathologic finding for kidney injury associated with severe liver dysfunction. *Kidney Int.* 2013;84(1):192-7.
125. Mancuso C. Bilirubin and brain: A pharmacological approach. *Neuropharmacology.* 2017;118:113-23.
126. Weiss N, Jalan R, Thabut D. Understanding hepatic encephalopathy. *Intensive Care Med.* 2018;44(2):231-4.

ANNEXES

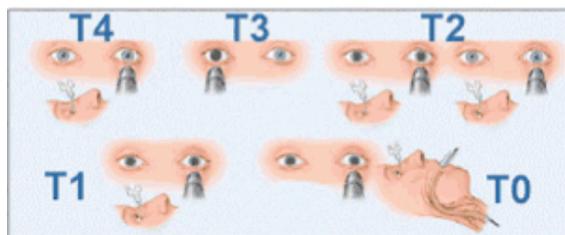
ANNEXE I- FOUR score, Adapté de (94)

**Y Réponse oculaire**

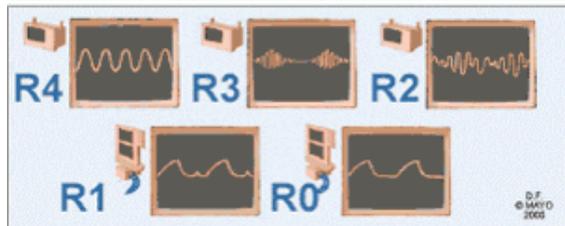
- 4 = ouvre les yeux et suit du regard à la demande
- 3 = ouvre les yeux mais ne suit pas du regard
- 2 = ouverture des yeux à l'ordre à voix haute
- 1 = ouverture des yeux à la stimulation nociceptive
- 0 = pas d'ouverture des yeux

**M Réponse motrice**

- 4 = activité normale, spontanée
- 3 = orientée à la douleur
- 2 = réponse en flexion à la douleur
- 1 = réponse en extension à la douleur
- 0 = pas de réponse ou état de mal myoclonique

**T Réflexes du tronc**

- 4 = réflexes pupillaires et cornéens présents
- 3 = mydriase unilatérale fixée
- 2 = réflexe pupillaire ou cornéen absent
- 1 = réflexes pupillaire et cornéen absents
- 0 = réflexes pupillaire et cornéen et de toux absents

**R Respiration**

- 4 = en VS, respiration régulière
- 3 = ventilation de type Cheyne-Stokes
- 2 = en VS, respiration irrégulière
- 1 = en VC : fréquence patient > fréquence machine
- 0 = en VC : fréquence patient = fréquence machine

ANNEXE II- Revue *EH en réanimation* et mise au point *Rifaximine*

L'encéphalopathie hépatique, du diagnostic au traitement en 2016

Hepatic Encephalopathy, from Diagnosis to Treatment in 2016

S. Mouri · C. Bouzbib · H. El Mourabit · A. Schaefer · F. Imbert-Bismut · D. Galanaud · S. Tripon · M. Mallet · M. Rudler · C. Housset · D. Thabut · N. Weiss

Reçu le 17 mai 2016; accepté le 8 juillet 2016
© SRLF et Lavoisier SAS 2016

Résumé L'encéphalopathie hépatique (EH) représente l'ensemble des anomalies neurologiques ou neuropsychiatriques pouvant survenir au cours d'une insuffisance hépatique aiguë ou chronique, et/ou en présence de shunts portosystémiques. La physiopathologie de l'EH est encore largement méconnue mais plusieurs facteurs semblent être impliqués, notamment l'hyperammoniémie, l'inflammation systémique et les anomalies de perméabilité de la barrière hémato-encéphalique.

Le diagnostic positif d'EH est difficile à affirmer et est porté sur un faisceau d'arguments en association avec un

contexte particulier. En effet, alors que les signes cliniques sont aspécifiques, certains examens complémentaires permettent d'orienter vers le diagnostic d'EH, notamment le dosage sanguin d'ammoniaque et l'EEG, qui doivent être réalisés au moindre doute. L'IRM cérébrale avec spectroscopie par résonance magnétique pourrait être intéressante dans cette situation à l'avenir.

L'apparition d'une EH doit systématiquement faire rechercher un facteur précipitant, en particulier une infection, une hémorragie digestive, une prise médicamenteuse ou des troubles hydro-électrolytiques. Les traitements spécifiques de l'EH sont essentiellement les disaccharides non absorbables et la rifaximine. De manière récente, l'utilisation d'épurateurs de l'ammoniaque a été proposée et semble efficace. En cas d'EH post-shunt portosystémique, son occlusion ou son recalibrage est parfois nécessaire.

Ainsi, l'EH est à l'heure actuelle traitable dans le cadre de la cirrhose, et la transplantation hépatique n'est plus la seule option en cas d'atteinte uniquement neurologique.

Mots clés Encéphalopathie hépatique · Hépatologie · Neurologie · Barrière hémato-encéphalique · Cirrhose

Abstract Hepatic encephalopathy (HE) is defined as neurological or neuropsychological manifestations associated with acute or chronic liver failure, and/or with portosystemic shunts. Pathophysiology of HE is still mostly unknown but many factors seem to be involved, including hyperammonaemia, systemic inflammation and blood-brain barrier permeability abnormalities.

It is difficult to ascertain the diagnosis of HE, which is based on combining elements with a suggestive context. Indeed, clinical signs are not specific and complementary explorations, including ammoniaemia and electroencephalogram should be mandatory if there is any doubt. Brain MRI with spectroscopy could be relevant in this setting.

The onset of HE requires seeking a precipitating factor, in particular infection, gastro-intestinal bleeding, drug intake or electrolyte disorders. Specific treatments of HE are mostly

S. Mouri · C. Bouzbib · H. El Mourabit · A. Schaefer · S. Tripon · M. Mallet · M. Rudler · D. Thabut · N. Weiss (✉)
Groupe d'étude sur l'encéphalopathie hépatique,
Brain Liver Pitié-Salpêtrière (BLIPS),
groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière,
47-83 boulevard de l'Hôpital, F-75013 Paris, France
e-mail : nicolas.weiss@aphp.fr

S. Mouri · C. Bouzbib · H. El Mourabit · A. Schaefer · C. Housset · D. Thabut · N. Weiss
Sorbonne universités, UPMC université Paris 06,
INSERM UMR_S 938/CDR Saint-Antoine & Institute of
Cardiometabolism and Nutrition (ICAN), F-75012 Paris, France

F. Imbert-Bismut
Service de biochimie, groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière,
47-83 boulevard de l'Hôpital, F-75013 Paris, France

D. Galanaud
Service de neuroradiologie, groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière,
47-83 boulevard de l'Hôpital, F-75013 Paris, France

S. Tripon · M. Mallet · M. Rudler · D. Thabut
Unité de soins intensifs d'hépatologie,
groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière,
47-83 boulevard de l'Hôpital, F-75013 Paris, France

N. Weiss
Unité de réanimation neurologique, département de neurologie,
pôle des maladies du système nerveux,
Institut de neurosciences translationnelles, IHU-A-ICM,
groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, 47-83 boulevard de l'Hôpital,
F-75013 Paris, France

 Lavoisier

non-absorbable disaccharides and rifaximine. Recently, treatments, which decrease ammoniaemia, have been suggested in this indication, and seem to be effective. When HE is due to an interventional portosystemic shunt, its obstruction or calibration has to be discussed.

Thus, HE in cirrhosis is now curable and hepatic transplant is not the only treatment in case of isolated neurological manifestations.

Keywords Hepatic encephalopathy · Hepatology · Neurology · Blood-brain barrier · Cirrhosis

Introduction

L'encéphalopathie hépatique (EH) correspond à l'ensemble des troubles neurologiques ou neuropsychiatriques associés à une atteinte aiguë ou chronique du foie et/ou à un shunt portosystémique. Ainsi, il est classique de distinguer trois types d'EH [1] : le type A, secondaire à une atteinte hépatique aiguë, cas de l'hépatite fulminante ; le type B, dans le cas d'un shunt portosystémique sans maladie associée du foie ; et le type C, dans le cadre d'une cirrhose ou d'une hypertension portale associée ou non à un shunt portosystémique.

L'insuffisance hépatique aiguë sévère est une pathologie assez rare qui touche environ 5 personnes sur 1 million [2]. Son pronostic est cependant sombre avec uniquement 50 % de survie sans transplantation hépatique [3]. Les causes les plus fréquentes dans les pays occidentaux sont les intoxications médicamenteuses, en particulier au paracétamol, et les hépatites aiguës virales (VHB, VHA, VHE). Plus rarement, l'insuffisance hépatique aiguë fait suite à une hépatite auto-immune, une maladie vasculaire du foie ou une infection à *herpes viridae*. La survenue d'une EH dans ce contexte fait envisager une transplantation hépatique en urgence, sans laquelle l'évolution vers une défaillance multiviscérale fatale peut être rapide.

La cirrhose représente un véritable problème de santé publique en France et à travers le monde. Son incidence croît chaque année en raison du vieillissement de la population et d'un meilleur dépistage grâce aux techniques non invasives. Actuellement, 12 millions de personnes en France présentent au moins un facteur de risque de développer une maladie chronique du foie. Parmi elles, environ 700 000 personnes seraient atteintes de cirrhose, et celle-ci serait responsable de 17 000 décès par an. Outre la consommation excessive d'alcool, les causes de cirrhose sont multiples, avec notamment les infections virales (virus des hépatites B, C, D et E), les causes auto-immunes et le syndrome dysmétabolique (associant diabète, surpoids, hypertension artérielle, dyslipidémie), responsable de la *Non Alcoholic Steato Hepatitis* (NASH) dont l'incidence est en augmentation dans les pays développés.

Lavoisier

Le pronostic de la cirrhose a été considérablement amélioré ces dix dernières années. Ainsi, en raison des progrès importants effectués dans la prise en charge des complications de la cirrhose, l'encéphalopathie hépatique (EH) est devenue une préoccupation majeure, tant pour les médecins que pour les patients et leur famille. En effet, la proportion de malades développant une EH est plus fréquente maintenant que le pronostic des complications classiques (hémorragie digestive, ascite) n'est plus léthal à court terme. De plus, le développement et l'élargissement des indications des techniques d'anastomoses porto-caves par voie trans-hépatique (*Transjugular Intrahepatic Portosystemic Shunt*, TIPS) a pour conséquence directe une augmentation des épisodes d'EH chez les malades. De nombreux patients présentent des troubles neurologiques alors même que la maladie hépatique est stabilisée, ce qui altère de manière importante leur qualité de vie. Enfin, l'apparition d'une EH marque un tournant évolutif dans la maladie hépatique et constitue un facteur de mauvais pronostic : ainsi, le développement d'un premier épisode d'EH au cours de la cirrhose est un facteur de risque indépendant de mortalité avec un taux de survie cumulée à un an et trois ans de respectivement 42 % et 23 % [4].

Bien que peu de données soient disponibles sur la prévalence et l'incidence de l'EH en réanimation, 20 % des patients cirrhotiques admis en réanimation présentent des troubles de la conscience [5] et environ 50 % de ceux-ci seraient en lien avec une EH. Dans une cohorte française de cirrhotiques, l'EH représentait 13 % des causes d'admission en unité de soins intensifs d'hépatologie [6]. L'incidence de l'EH chez le patient cirrhotique varie entre 30 et 80 % selon les critères diagnostiques retenus. Ainsi, une étude prospective réalisée dans une unité de soins intensifs d'hépatologie retrouvait 30 % d'EH patente [7]. Plus de 50 % de ces malades présentaient des troubles sévères de la conscience pouvant aller jusqu'au coma. Il existe encore moins de données quant à l'apparition d'une EH au décours de l'hospitalisation. En effet, différentes causes de décompensation de la cirrhose (hémorragie digestive, sepsis, etc.) sont des facteurs déclenchants d'EH et peuvent être en elles-mêmes la cause de l'admission en réanimation.

Nous allons, dans cette mise au point, aborder successivement les données physiopathologiques récentes concernant l'EH, la présentation clinique, les examens à réaliser, les pièges diagnostiques, les diagnostics différentiels et enfin le traitement de l'EH.

Physiopathologie

La physiopathologie de l'EH n'est pas univoque à ce jour mais plusieurs hypothèses ont été proposées. L'accumulation cérébrale de différentes substances toxiques, et en

particulier de l'ammoniaque [8,9], en raison du défaut de détoxification hépatique, semble être un mécanisme primordial. Par ailleurs, une altération du transport de certains acides aminés (AA) à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE) par altération de l'expression ou de la fonctionnalité de transporteurs spécifiques a été décrite [10]. D'autres hypothèses physiopathologiques ont été proposées, comme la production anormale de substances *benzodiazepine-like* avec pour conséquences une augmentation du tonus GABA inhibiteur, l'accumulation de mercaptans, de manganèse, ou des anomalies de la vaso-régulation. Dans tous les cas, il semble bien établi que l'inflammation joue un rôle primordial dans la physiopathologie de l'EH en conjonction avec l'hyperammoniémie : il est admis qu'une inflammation aggrave les symptômes d'EH, et serait, pour certains auteurs, un élément indispensable à son apparition.

L'ammoniaque

La dégradation des composés azotés dans l'intestin va aboutir à la présence d'ammoniaque dans le sang de la circulation porte. En situation normale, l'ammoniaque va être métabolisée au niveau du foie par le cycle de l'urée. En cas d'insuffisance hépatique et/ou de shunt portosystémique, l'ammoniaque ne peut plus être détoxifiée et son taux augmente dans la circulation systémique. En dehors du foie, seuls les muscles et les astrocytes intracérébraux sont en mesure de métaboliser l'ammoniaque en glutamine grâce à l'action de la glutamine synthétase. L'induction de l'expression de la glutaminase dans les reins permet en outre d'augmenter l'élimination de l'ammoniaque. Les astrocytes vont répondre à l'augmentation intracellulaire de glutamine, osmotiquement active, par l'extrusion d'osmoles actifs (le myoinositol et la taurine) prévenant la survenue d'un œdème cytotoxique important. Le taux de glutamate intracérébral résultant du métabolisme de l'ammoniaque est donc augmenté, majorant ainsi son relargage synaptique. Ceci modifie alors la neurotransmission GABA-ergique médiée par le glutamate et contribue à l'apparition de signes neurologiques liés à l'EH, notamment les signes extrapyramidaux [11].

De plus, de nombreuses études ont développé la théorie du cheval de Troie selon laquelle l'entrée de glutamine dans l'astrocyte induirait également un flux de glutamine vers la mitochondrie astrocytaire ; la glutamine y serait alors hydrolysée, conduisant au relargage d'ammoniaque en intramitochondrial responsable d'un stress oxydatif via les espèces réactives de l'oxygène. Ce phénomène pourrait également être impliqué dans l'apparition de la ballonnisation astrocytaire [12].

Cependant, même si l'hyperammoniémie semble constante en cas d'EH, les taux ne sont qu'imparfaitement corrélés à la sévérité de l'encéphalopathie [13]. Ainsi, même si l'ammoniaque joue un rôle central dans l'apparition de l'EH,

d'autres processus physiopathologiques semblent impliqués, notamment l'inflammation systémique.

L'inflammation

Le lien entre sepsis et EH est suggéré depuis longtemps par les cliniciens. En effet, une infection même peu sévère est en mesure de déclencher un épisode d'EH chez le patient cirrhotique. De plus, une étude expérimentale a pu montrer, chez des patients cirrhotiques, que l'administration d'un régime hyperprotidique, afin de créer une hyperammoniémie, n'était en mesure d'entraîner la survenue d'une EH que chez les patients présentant un syndrome de réponse inflammatoire systémique [13]. Une autre expérience de la même équipe a pu démontrer que l'importance des symptômes d'EH était corrélée au taux d'IL-6 circulant et non d'ammoniémie. L'inflammation pourrait ainsi précipiter l'apparition des troubles neurologiques par un effet synergique avec l'hyperammoniémie [14,15].

Différentes cytokines pro-inflammatoires (TNF-alpha, IL-1 β , IL-6 et IFN-gamma) sont classiquement retrouvées à des concentrations élevées dans le plasma des patients cirrhotiques. Celles-ci seraient produites en excès par des cellules immunitaires circulantes qui présentent chez le cirrhotique un phénotype anormalement activé : expression augmentée de CD11b par les polynucléaires neutrophiles, sur-expression des molécules de co-stimulation (CD80 et CD86) et de l'HLA-DR sur les cellules présentatrices d'antigènes. Il existe cependant assez peu de données suggérant l'existence de différences en termes d'inflammation entre les patients avec EH et les patients cirrhotiques sans EH. Il s'agit ainsi d'un facteur nécessaire mais non suffisant. De nombreux arguments expérimentaux récents suggèrent l'importance du microbiote, et possiblement de la translocation bactérienne à partir du tube digestif, dans l'augmentation de la production de médiateurs de l'inflammation chez le patient cirrhotique [16].

Augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique

Au cours de l'EH, différentes anomalies à la fois structurales et fonctionnelles de la BHE ont été décrites. Le déséquilibre dans le transport des acides aminés (AA) à travers la BHE est une des anomalies physiopathologiques la plus anciennement décrite avec l'hyperammoniémie. Il existe ainsi un passage augmenté d'AA aromatiques, précurseurs de certains neurotransmetteurs, et un passage diminué d'AA branchés [17]. Ceci serait dû à une compétition au niveau des transporteurs exprimés au niveau de la BHE avec la glutamine intracérébrale, conséquence de l'hyperammoniémie. Cela est aggravé par un défaut d'apport en protéines et particulièrement en AA branchés, qui partagent les mêmes transporteurs que les AA

Lavoisier

aromatiques au niveau de la BHE. De manière plus récente, des anomalies structurales ont été identifiées comme conséquence de l'hyperammoniémie et de l'inflammation (altération des protéines des jonctions serrées, activation des métalloprotéases) dans le cas de l'EH au cours de l'insuffisance hépatique aiguë et de manière plus récente dans le cas de l'EH au cours de la cirrhose [18]. Cette augmentation de la perméabilité de la BHE induirait ainsi un état pré-morbide chez le patient cirrhotique qui est ainsi plus sensible à une agression cérébrale de moindre importance, que celle-ci soit endogène (hyperammoniémie ou inflammation) ou exogène (accumulation de médicaments) [19]. En effet, nous avons récemment montré que près de 30 % des patients cirrhotiques avec EH présentaient des taux détectables en métabolomique dans le LCR de différents anti-infectieux administrés à dose non neurologique (pipéracilline-tazobactam, ciprofloxacine, métronidazole, fluconazole) [19].

Bien que la toxicité des acides biliaires soit reconnue chez les nouveau-nés, leur toxicité au cours de l'EH reste débattue [20]. Il semble cependant que certains types d'acides biliaires puissent avoir un effet délétère alors que d'autres pourraient au contraire avoir un effet bénéfique.

Quelques différences existent entre les différentes circonstances associées à l'apparition d'une EH. Ainsi, dans l'hépatite fulminante, l'élévation rapide de l'ammoniémie rend moins efficaces les mécanismes de compensation au niveau des astrocytes. Ceci explique la présence d'un œdème cytotoxique astrocytaire qui, accompagné d'une perméabilité de la BHE augmentée, rend compte de l'œdème vasogénique potentiellement léthal. L'hyperammoniémie est également responsable dans cette circonstance d'un relargage de glutamate qui rendrait compte de certaines manifestations neurologiques telles que les crises convulsives [21]. Dans le cadre de la décompensation hépatique aiguë sur chronique (*acute on chronic liver failure*, ACLF), concept développé récemment, il existe assez peu de connaissances physiopathologiques mais il semble que l'hyperammoniémie en conjonction avec une altération de l'oxygénation cérébrale soit impliquée [22]. L'œdème cérébral ne semble pas majeur dans cette circonstance (*données personnelles*).

Présentation clinique

Signes cliniques

Les troubles observés au cours de l'EH vont d'anomalies subtiles, détectées uniquement par des tests neuropsychologiques, à des troubles de la conscience allant jusqu'au coma [23]. Le *flapping tremor* et l'*asterixis* sont les signes les plus souvent recherchés dans l'EH. Cependant, au même titre que des myoclonies plus diffuses, ces signes peuvent

s'observer dans d'autres circonstances d'encéphalopathies métaboliques et/ou médicamenteuses. D'autres signes neurologiques peuvent s'observer au cours de l'EH [24] : anomalies des réflexes ostéotendineux, déficits sensitivomoteurs, anomalies pupillaires, anomalies des réflexes oculocéphaliques ou oculocaloriques. Comme au cours de l'hypoglycémie, l'EH est parfois associée à un ou plusieurs signe(s) de localisation (déficit sensitivomoteur, aréflexie, signe de Babinski, syndrome pyramidal ou extrapyramidal) suggérant une lésion structurelle et amenant à la réalisation d'examens d'imagerie [25]. Dans le cas de l'EH minime, les signes sont parfois limités à un syndrome frontal qui peut facilement passer inaperçu en réanimation (désinhibition, jovialité, comportement d'utilisation), des troubles pratiques, des troubles de calcul, ou des anomalies du rythme nyctéméral.

Contexte

Le contexte clinique est d'une importance capitale. Il est cependant important de ne pas méconnaître un diagnostic différentiel (Tableau 1). Certaines études retrouvent un facteur déclenchant à l'EH dans plus de 90 % des cas [26]. Les circonstances favorisant les plus fréquemment incriminées sont l'infection (dans plus d'un tiers des cas ; infection du liquide d'ascite, infection pulmonaire, etc.), l'hémorragie digestive, la prise d'un médicament sédatif (benzodiazépines, morphiniques et hypnotiques), l'hypokaliémie, la prise de diurétiques et la constipation [26].

Présentations en fonction de la situation clinique

En cas d'hépatite fulminante, la mise en évidence de signes neurologiques signe une aggravation neurologique sévère pouvant rapidement mener au décès par œdème cérébral avec engagement. Cette situation nécessite souvent une prise en charge spécifique (traitement de l'hypertension intracrânienne) et fait envisager la transplantation hépatique en urgence. Des signes positifs sous forme d'une agitation psychomotrice ou de crises convulsives sont possibles.

En cas de cirrhose, l'EH patente est souvent associée à un facteur déclenchant. Certains patients présentent cependant des tableaux d'EH sans facteur déclenchant qui peuvent se présenter sous la forme de troubles neurologiques persistants, avec ralentissement psychomoteur, *flapping* ou *asterixis* (EH patente chronique). L'EH minime se présente sous la forme de troubles neurologiques subtils tels qu'un syndrome frontal (jovialité, applaudissements, imitations, comportement d'utilisation), une apraxie, des troubles du sommeil et du nyctémère, ou sous la forme d'anomalies détectées uniquement aux tests neuropsychologiques. Elle peut également se révéler au décours d'un facteur déclenchant ayant conduit à une hospitalisation en réanimation, et peut alors

Lavoisier

Tableau 1 Diagnostics différentiels à évoquer devant une suspicion d'EH			
Diagnostic différentiel	Éléments en faveur	Examens complémentaires	Remarques
Sevrage en alcool	Contexte, tremblements des extrémités, hallucinations visuelles (zoopsies), convulsions	Aucun	Très fréquent en cas de cirrhose alcoolique ; nécessite souvent des BZO malgré l'atteinte hépatique Prévenir les manifestations du sevrage secondaire
Intoxication alcoolique aiguë	Contexte, syndrome cérébelleux	Alcoolémie	
Hypoglycémie	Malaise, sueurs, pâleur, troubles de conscience	Glycémie capillaire	
Accident vasculaire cérébral hémorragique	Signe(s) de localisation, convulsions	TDM ou IRM cérébrale	Peut apparaître spontanément en raison des troubles de l'hémostase Risque majoré en cas de cirrhose Peut rarement être spontanée sans traumatisme
Hématome sous-ou extradural	Contexte (traumatisme), signe(s) de localisation, convulsions	TDM cérébrale	
Hémorragie méningée	Contexte (traumatisme), signe(s) de localisation, convulsions	TDM cérébrale	
Autres encéphalopathies métaboliques	Toxidrome, hypercapnie, hyperurémie	Urée, gaz du sang, dosage de toxiques	
Encéphalopathies médicamenteuses	Prise de médicaments (bêta-lactamines, fluoroquinolones, morphiniques...), apparition après quelques jours d'hospitalisation	Dosages sanguins	Fréquent car prises médicamenteuses fréquentes Un dosage sanguin normal n'élimine pas le diagnostic
Sevrage en benzodiazépines	Contexte (prise de somnifères), convulsions	Toxiques urinaires	
Thrombophlébite cérébrale	Déficit neurologique à bascule, hypertension intracrânienne, coma possible	Angio-IRM cérébrale	Rechercher une maladie thromboembolique (association possible avec un syndrome de Budd-Chiari)
Méningite et/ou encéphalite	Fièvre, syndrome méningé, convulsions	Ponction lombaire, discuter TDM ou IRM cérébrale, EEG	
Prise de psychodysléptiques (cocaïne, amphétamine, MDMA, LSD...)	Contexte, tachypsychie, hallucinations, illusions	Toxiques sanguins et urinaires	Plus fréquent en cas d'insuffisance hépatique aiguë
État de mal épileptique	Convulsions (crises généralisées tonico-cloniques), coma possible	EEG	Peu fréquent sans la mise en évidence de crises cliniques. Se méfier du diagnostic d'état de mal épileptique non convulsivant conclu à l'EEG
Encéphalopathie de Gayet-Wernicke-Korsakoff	Ataxie, ophtalmoplégie, nystagmus, troubles mnésiques, troubles de la conscience, hypothermie	Dosage de la vitamine B1, IRM cérébrale (hypersignaux inconstants des corps mamillaires)	
Myélinolyse centro-ou extrapontine	Tétraparésie associée ou non à des troubles de la conscience, contexte (variation rapide de natrémie)	IRM cérébrale (hypersignaux du pont en FLAIR) IRM cérébrale	Susceptibilité interindividuelle importante

(Suite page suivante)

Tableau 1 (suite)			
Diagnostic différentiel	Éléments en faveur	Examens complémentaires	Remarques
Encéphalopathie postérieure réversible	Confusion, crises convulsives, cécité corticale, hypertension artérielle		Surtout en post-transplantation (contexte d'immunosuppression)
Maladie neurodégénérative	Troubles neurocognitifs peu fluctuants	IRM cérébrale (atrophie hippocampique), marqueurs spécifiques dans le LCR	Diagnostic souvent difficile dans ce contexte
Encéphalite auto-immune	Tableau d'encéphalite, troubles de la conscience, crises convulsives, dyskinésies bucco-faciales	Ponction lombaire : méningite lymphocytaire	Contexte de maladie auto-immune (association possible avec cirrhose auto-immune)
Troubles psychiatriques	Idées délirantes, troubles de l'humeur		Diagnostic d'élimination
TDM : tomodensitométrie ; IRM : imagerie par résonnance magnétique ; EEG : électro-encéphalogramme ; BZO : benzodiazépines ; LCR : liquide céphalorachidien			

être de diagnostic plus difficile en raison de l'absence fréquente d'éléments de comparaison récente, de l'existence de facteurs confondants (médicaments) ou de diagnostics différentiels (delirium, encéphalopathie septique).

Scores d'EH, un outil de surveillance

Bien que suggérées pour le diagnostic d'EH, il nous paraît plus important d'envisager les échelles d'EH pour le suivi et l'estimation de la réponse thérapeutique. Le score classique d'EH est le score de West-Haven qui classe les atteintes de 0 à 4 avec des items définis pour chaque stade [27]. Il faut préciser cependant que bien que largement utilisé, il en existe plusieurs versions en langue anglaise et qu'aucune version n'a été validée en français. Il reste par ailleurs assez peu connu par les non hépatologues. De plus, de nombreuses études suggèrent que les spécialistes utilisent le score comme un score visuel analogique allant de 0 (pas d'EH) à 4 (EH associée à un coma), ou de façon binaire (score 0-1 vs 2-4). Nous avons ainsi récemment testé, dans une cohorte de malades hospitalisés en unités de soin intensif ou de surveillance continue ou en réanimation, l'utilité de scores généralistes comme le score de Glasgow ou le FOUR score [23,28] (Tableau 2). Ces 2 scores, mieux connus des réanimateurs, possèdent des caractéristiques comparables en termes de description de l'état clinique des malades et possèdent en plus une valeur pronostique. Ces scores généralistes permettent donc une meilleure communication pour la description clinique de patients entre hépatologues, neurologues et réanimateurs.

Le manque de spécificité des manifestations cliniques rend nécessaire la réalisation d'examens complémentaires. Ils permettent en outre la recherche de facteurs déclenchants et éliminent certains diagnostics différentiels.

Lavoisier

Examens complémentaires

Ammoniémie

L'utilité du dosage de l'ammoniaque reste très controversée dans le domaine de l'EH. Dans l'insuffisance hépatique aiguë, il existe une association entre l'élévation des taux d'ammoniémie et l'existence d'une EH démontrée depuis de nombreuses années [9]. Cette corrélation est encore meilleure entre les taux d'ammoniaque dans le liquide céphalorachidien et la gravité clinique d'après des études datant des années 70 [8]. Cependant, ce lien n'est pas démontré au cours de la cirrhose. Il existe en effet de larges zones de chevauchement des valeurs d'ammoniémie entre les patients cirrhotiques sans et avec EH, et entre les sujets contrôles et les patients cirrhotiques. La multiplicité des mécanismes conduisant à l'EH chez le cirrhotique l'explique probablement en grande partie. Certaines limites techniques liées au dosage peuvent aussi entrer en ligne de compte. En effet, une fois prélevé, le tube doit être acheminé immédiatement dans la glace au laboratoire, où le dosage doit être réalisé rapidement. Un tube resté sur la paillasse ou transporté avec délai va donner un résultat d'ammoniémie faussement élevé (faux dosage de plus de 150 $\mu\text{mol/L}$ possible si le tube reste 20 minutes sur la paillasse). L'ammoniémie artérielle est plus fiable que l'ammoniémie veineuse mais cette différence ne semble pas majeure si les comparaisons sont faites selon les mêmes modalités. Des dispositifs permettant de mesurer au lit du malade l'ammoniémie capillaire ont été développés et ceux-ci améliorent les corrélations à un niveau individuel (état clinique neurologique et EEG) selon les équipes qui les utilisent [29].

Ainsi, quelle est l'utilité du dosage sanguin de l'ammoniaque ? Dans notre expérience, il est nécessaire de mesurer

l'ammoniémie afin d'identifier deux situations distinctes où ce dosage sera utile pour modifier la stratégie diagnostique et/ou thérapeutique. Devant une ammoniémie basse chez un patient présentant des troubles neurologiques évidents dans un contexte d'atteinte hépatique aiguë ou chronique (possible EH patente), il nous semble nécessaire d'éliminer un diagnostic différentiel (encéphalopathie septique, encéphalopathie médicamenteuse, hématome, etc.) (Tableau 1). De la même manière, devant une ammoniémie très élevée

(>200 µmol/L par exemple, mais aucun chiffre limite n'est déterminé à ce jour) sans atteinte hépatique majeure, il faut savoir évoquer une anomalie innée du métabolisme, anomalie du cycle de l'urée en particulier, qui modifierait la prise en charge thérapeutique.

Ceci fait d'ailleurs l'objet des dernières recommandations de la société américaine d'hépatologie (AASLD) qui propose de remettre en cause le diagnostic d'EH en cas d'ammoniémie normale [25].

Tableau 2 Scores d'évaluation de la sévérité de l'encéphalopathie hépatique

2A – Score de West-Haven				
Grade	Symptômes			
0	Aucune altération de la conscience, des fonctions intellectuelles, de la personnalité ou du comportement			
1	Euphorie ou anxiété Erreurs dans le calcul d'addition ou soustraction Altération des capacités attentionnelles Altération minimale de la conscience			
2	Modification du rythme nyctéméral Léthargie ou apathie Discrète désorientation temporelle OU spatiale Modification de la personnalité Comportement inapproprié			
3	Confusion Désorientation totale temporelle ET spatiale Somnolence ou stupeur avec persistance de la réponse à la stimulation verbale			
4	Coma (absence de réponse aux stimulations verbales ou nociceptives)			
2B – FOUR Score				
	Réponse oculaire	Réponse motrice	Réflexes tronc cérébral	Respiration
0	Paupières restant fermées à la stimulation douloureuse	Absente à la douleur ou état de mal myoclonique généralisé	Absence des réflexes pupillaires, cornéens et de toux	Patient intubé, incapable de déclencher le ventilateur
1	Paupières fermées, s'ouvrant à la stimulation douloureuse	Extension à la stimulation douloureuse	Réflexes pupillaires ET cornéens absents mais réflexe de toux présent	Patient intubé, capable de déclencher le ventilateur
2	Paupières fermées, s'ouvrant à la stimulation auditive forte	Flexion à la stimulation douloureuse	Réflexes pupillaires OU cornéens absents	Patient non intubé, respiration irrégulière
3	Paupières ouvertes mais absence de poursuite oculaire	Localisation de la douleur	Une pupille en mydriase fixée	Patient non intubé, respiration de Cheyne-Stokes
4	Paupières ouvertes spontanément ou par l'examineur, montrant une poursuite oculaire ou un clignement à la demande	Le patient montre son pouce, montre le poing, fait le V de la victoire (au moins un des trois signes avec une main)	Réflexes pupillaires et cornéens présents	Patient non intubé, respiration régulière

Électroencéphalogramme (EEG)

L'EEG apporte des éléments positifs forts en faveur d'une EH. En effet, la mise en évidence d'ondes lentes triphasiques (Fig. 1) signe l'existence d'une encéphalopathie métabolique ou médicamenteuse. Les ondes lentes triphasiques sont des ondes ayant une périodicité d'environ 1,6 à 3 Hz, généralisées, à prédominance antérieure et qui ont tendance à disparaître à la stimulation. Dans les cas les plus sévères, l'EEG ne montre qu'un ralentissement diffus important. Il existe une classification de la gravité de l'EH en fonction des anomalies à l'EEG [30] qui a même pu récemment être automatisée par l'utilisation d'analyse spectrale [29]. Il est ainsi possible qu'avec l'amélioration de l'analyse du signal, l'EEG puisse à l'avenir avoir à nouveau toute sa place dans le diagnostic d'EH (Fig. 2). En effet, d'anciennes études ont montré que même en l'absence d'EH patente, 40 % des patients cirrhotiques présentaient des modifications électrophysiologiques [31]. Il faut cependant noter que les ondes triphasiques sont parfois interprétées à tort comme des grapho-éléments de nature épileptique. Ceci peut alors conduire au traitement d'un état de mal épileptique qui va

aggraver le tableau d'EH. Cette situation pourrait être d'autant plus fréquente que le patient est dans le coma et qu'aucun élément clinique de nature clonique n'a été observé (*données personnelles*). En cas de coma, le tracé EEG peut parfois être tellement pauvre du fait de la perte de fréquence et d'amplitude des ondes delta qu'il peut être presque plat à amplification habituelle [32].

Imagerie cérébrale

Le scanner cérébral reste l'examen standard pour éliminer un hématome sous- ou extradural, un hématome intracérébral, une hémorragie méningée, et ce d'autant plus sur un terrain de cirrhose et de consommation d'alcool. En effet, les patients cirrhotiques ont un risque relatif 2 à 5 fois plus important d'hémorragie intracérébrale par rapport à une population contrôlée [33]. Le scanner permet également de mettre en évidence des signes d'hypertension intracrânienne dans le contexte d'insuffisance hépatique aiguë. Néanmoins, il ne permet pas de faire le diagnostic positif d'EH et ignore bon nombre de diagnostics différentiels.

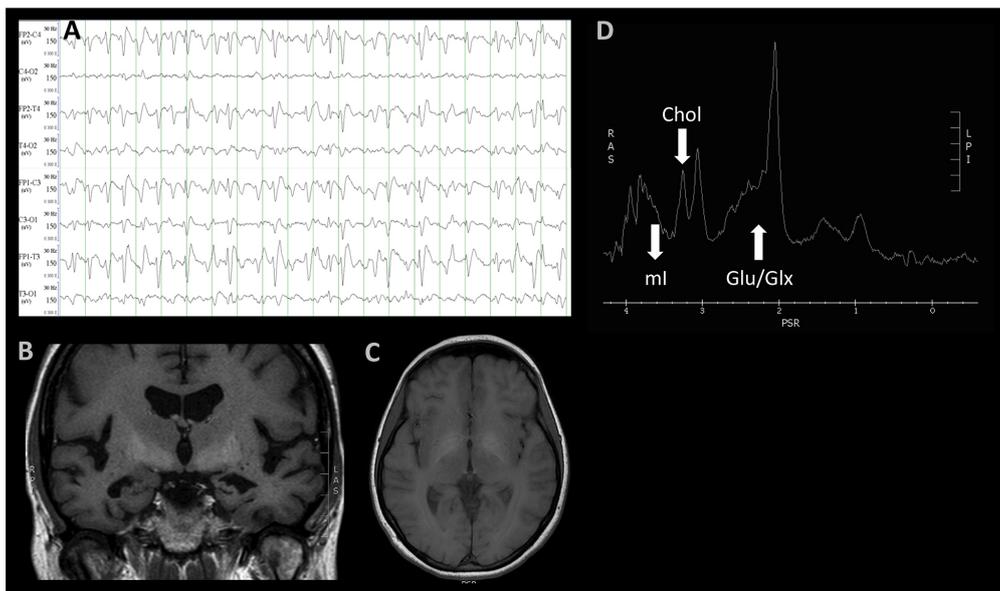


Fig. 1 Examens complémentaires typiques d'EH. A. EEG classique d'EH, associant des ondes triphasiques, des anomalies à présence antérieure, une aggravation en cas de stimulation auditive ou douloureuse et un ralentissement ; B. IRM cérébrale en coupe coronale, séquence T1. Hypersignaux spontanés des noyaux gris centraux. Ils seraient en rapport avec une surcharge en manganèse ; C. IRM cérébrale en coupe frontale, séquence T1. Hypersignaux spontanés des noyaux gris centraux. D. Spectroscopie par résonance magnétique, permettant d'étudier le métabolisme dans une zone d'intérêt définie. Le profil d'EH est caractérisé par une augmentation du rapport glutamine/glutamate (Glu/Glx), une baisse du myoinositol (ml) et une baisse de la choline (Cho)

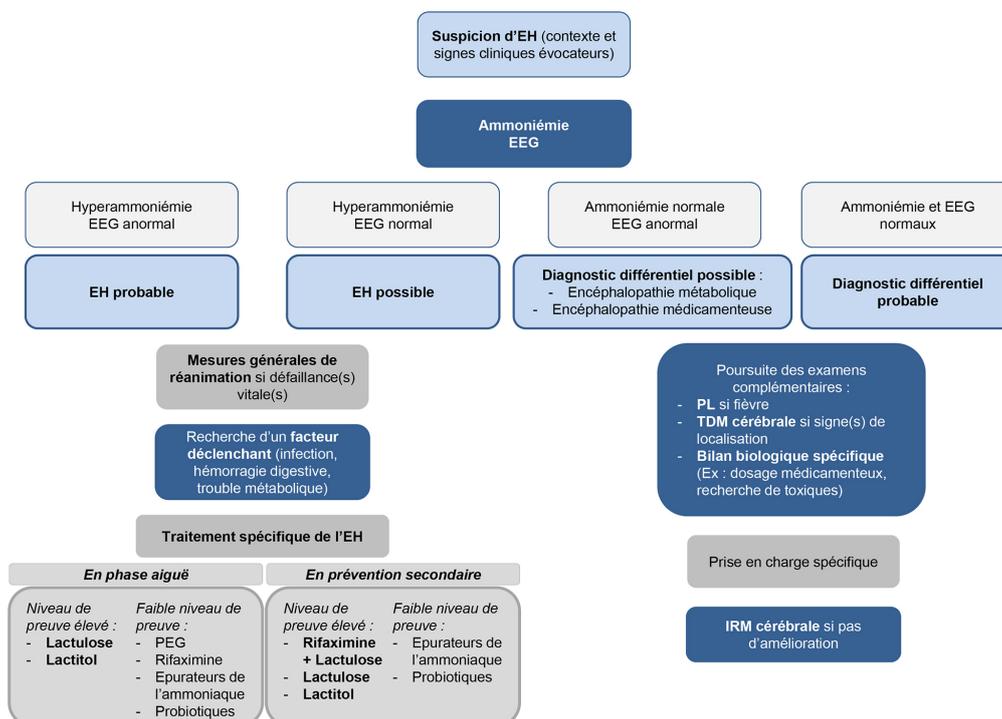


Fig. 2 Arbre diagnostique et thérapeutique de l'EH. NB : une RFE concernant l'encéphalopathie hépatique est en cours de préparation. Elle devrait permettre de proposer une prise en charge plus codifiée

L'IRM cérébrale s'est imposée comme la technique d'imagerie de référence pour l'exploration du cerveau. Elle permet, outre les diagnostics évoqués ci-dessus, de faire le diagnostic d'accident vasculaire cérébral ischémique, d'hémorragie méningée tardive ou de syndrome d'encéphalopathie postérieure réversible. L'IRM cérébrale avec spectroscopie (analyse du profil métabolique des tissus) permet également de montrer des signes spécifiques d'EH.

En séquences IRM standards et notamment en séquence T1 sans injection de gadolinium, il est possible d'observer des hypersignaux des noyaux gris centraux (Fig. 1). Ces hypersignaux, attribués à la surcharge en manganèse, ont été proposés comme des éléments du diagnostic d'EH [34]. Il apparaît cependant qu'ils seraient le signe de l'existence d'un shunt portosystémique plutôt que de celui d'EH car ils sont mal corrélés à l'état neurologique. L'ajout d'une séquence de spectroscopie par résonance magnétique (SRM) permet de poser le diagnostic d'EH. En effet, la SRM permet d'obtenir le profil métabolique d'un voxel déterminé. Il est ainsi possible de quantifier, le plus souvent à l'aide d'un voxel

dans la couronne rayonnante, l'importance du pic de glutamine/glutamate, produit en réponse à l'augmentation de la concentration intracérébrale d'ammoniaque, le pic de choline et surtout celui du myoinositol, osmole actif extrudé du cytoplasme astrocytaire, afin de garder stable l'équilibre osmotique (Fig. 1). Ainsi, l'augmentation du pic de glutamine/glutamate, et la baisse des pics de choline et de myoinositol signent le diagnostic d'EH [35]. Il faut noter que cette séquence est de pratique courante dans différentes autres situations cliniques et ne prend que quelques minutes à être réalisée. Cependant, la réalisation d'IRM chez le patient non sédaté présentant une EH patente ou chez le patient intubé-ventilé reste complexe.

Pièges diagnostiques et diagnostics différentiels

Les principaux diagnostics différentiels à évoquer et les éléments en leur faveur sont donnés dans le Tableau 1. Les diagnostics classiques à ne pas méconnaître sont les

complications hémorragiques spontanées ou traumatiques et les syndromes de sevrage, au premier rang desquels le *delirium tremens*. Dans certaines circonstances comme le syndrome de Budd-Chiari, la maladie sous-jacente responsable d'un état procoagulant peut entraîner des thromboses au niveau cérébral (thrombophlébites cérébrales principalement). Dans un contexte d'auto-immunité, l'association à des maladies auto-immunes neurologiques serait théoriquement également possible.

Une problématique fréquente et récurrente en réanimation est celle du diagnostic par excès d'état de mal épileptique dans ces circonstances. En effet, il est facilement possible, de porter à tort le diagnostic de crises cloniques ou toniques devant des myoclonies et d'interpréter abusivement les ondes triphasiques comme des grapho-éléments épileptiques à l'EEG. Les conséquences sont importantes dans la mesure où le diagnostic d'état de mal épileptique conduit à la prescription de médicaments sédatifs, au premier rang desquels les benzodiazépines, contre-indiqués dans le cadre de l'EH. Dans une étude récente, nous avons pu montrer : 1) que le diagnostic d'état de mal épileptique était relativement rare dans le cadre de la cirrhose ; et que 2) plus d'un tiers des patients diagnostiqués comme ayant un état de mal avait en fait une EH, après relecture par un électrophysiologiste, un neurologue et un hépatologue, tous trois seniors (*données personnelles*).

Traitement

De nouvelles stratégies thérapeutiques ont été proposées pour améliorer la prévention secondaire de l'EH. Il n'en est pas de même du traitement de l'EH en phase aiguë, où relativement peu d'études sont disponibles et manquent souvent d'une méthodologie suffisante pour en extrapoler les résultats. Nous présenterons brièvement les produits disponibles ; leur utilisation en fonction de la prise en charge à la phase aiguë de l'EH ou de sa prévention secondaire sont données dans le Tableau 3 et la Figure 2.

Disaccharides non absorbables et polyéthylène glycol

Le lactulose (*Duphalac*[®]) est un disaccharide non absorbable qui diminue le temps de transit colique, diminue la production intestinale d'ammoniaque et augmente son excrétion fécale par réduction du pH colique après métabolisation en acide acétique et acide lactique dans le côlon. Une étude randomisée contre placebo avait suggéré dès 1969 son efficacité. Bien que controversée, son efficacité est retrouvée dans différentes études, dont des méta-analyses récentes [36], dans le cas d'EH minime ou patente, ainsi qu'en prévention primaire en cas d'hémorragie digestive [37]. Il s'agit du traitement de première ligne recommandé par les sociétés

européenne et américaine d'hépatologie [38]. Il est à noter cependant que le lactulose n'a pas d'effet significatif sur la mortalité. Par ailleurs, l'administration par lavements est également efficace et a été proposée aux patients présentant des difficultés à l'administration orale. Cependant, celle-ci peut parfois être responsable d'ulcérations rectales, qui sont le plus souvent bénignes mais peuvent dans de rares cas être à l'origine de complications hémorragiques.

Le lactitol (*Importal*[®]) constitue une alternative au lactulose [39], qui présente l'avantage de causer moins d'effets secondaires digestifs et d'être moins sucré. Il est cependant très peu utilisé en France.

Le polyéthylène glycol (PEG) (*Fortrans*[®], *Colopeg*[®]), un laxatif utilisé habituellement pour les préparations coliques avant coloscopie, augmente l'excrétion d'ammoniaque dans les fécès par un phénomène osmotique. Son efficacité dans l'EH a été récemment rapportée dans des études randomisées comme meilleure que le lactulose après administration orale de 4L en 4h [40]. Le PEG était ainsi associé à une résolution plus précoce des épisodes d'EH. Cependant, certains auteurs lui opposent un risque potentiel d'inhalation.

Antibiotiques non absorbables

La rifaximine (*Refero*[®], *Tixtar*[®], *Normix*[®]), un antibiotique semi-synthétique de large spectre visant les bactéries Gram positif, négatif et les anaérobies, inhibe la synthèse d'ARN par liaison à l'ARN polymérase. Son absorption systémique est estimée entre 1 et 3 % chez les sujets sains [41] mais peu d'études ont évalué l'absorption chez les patients cirrhotiques [42], chez lesquels il existe une augmentation de la perméabilité intestinale. Cet antibiotique présente l'avantage d'agir localement sur la flore microbienne, en modulant son profil métabolique plutôt qu'en modifiant qualitativement le microbiote [43], bien que certaines études aient mis en évidence une croissance préférentielle dans le côlon de certaines espèces bactériennes (*Bifidobacteria sp.* et *Lactobacilli sp.*) [44]. Plusieurs études ont retrouvé que l'administration de rifaximine entraînait une diminution significative par rapport à un placebo du nombre d'épisodes d'EH récurrente, en association [45, 46] ou non au lactulose [47], ainsi qu'une diminution significative du nombre et des durées d'hospitalisations liées à l'EH. De plus, il est à noter qu'une diminution du taux de mortalité et une amélioration de la qualité de vie [48] ont été observées avec la rifaximine. Bien que sa supériorité par rapport au lactulose reste débattue, ce traitement présente l'avantage d'être mieux toléré au long terme chez les patients cirrhotiques [49]. En effet, moins de 10 à 15 % des patients se plaignent d'effets indésirables (principalement nausées, douleurs abdominales, œdèmes) [50], et il n'a pas été rapporté d'interactions médicamenteuses, ni d'émergence de résistances bactériennes [51]. Certaines réserves avaient initialement été émises quant au risque associé de développement de

Lavoisier

Tableau 3 Traitements médicamenteux utilisés dans l'EH

Traitement	AMM dans l'EH	Phase aiguë	Prévention secondaire	Post-TIPS	Dose et voie	Études princeps de l'utilisation dans l'EH	Effets indésirables	Contre-indications
Disaccharides non absorbables et polyéthylène glycol (PEG)								
Lactulose	Oui	En 1 ^{ère} ligne	En 1 ^{ère} ligne	Non validé	30 à 60 mL/j per os, à adapter QSP 2-3 selles molles par jour Un lavement rectal/j avec 6 à 10 sachets, si prise orale impossible	Elkington et al., NEJM 1969	Douleurs abdominales, ballonnements, flatulences, hypokaliémie	Aucune
Lactitol	Oui	En 1 ^{ère} ligne	En 1 ^{ère} ligne	Non validé	10 g x 3-4/j per os	Blanc et al., Hepatology 1992		
Polyéthylène glycol	Non	Oui	Non	Non validé	4L en 4h per os	Rahimi et al., JAMA Intern Med 2015		
Antibiotiques non absorbables								
Rifaximine	Oui	Non validé	En 1 ^{ère} ligne, en association au lactulose, si EH récurrente	Non validé	550 mg x 2/j per os	Bass et al., NEJM 2010	Nausées, douleurs abdominales (10-15 %), céphalées (<10 %)	Grossesse Allergie à la classe de la rifampicine
Épurateurs du cycle de l'urée								
Glycérol phénylbutyrate	Non	Non validé	Une étude randomisée disponible montrant son efficacité	Non validé	Non consensuelles	Rockey et al., Hepatology 2014	Troubles gastro-intestinaux (40 %) Perturbations des tests hépatiques (20 %)	Allergie
Phénylbutyrate de sodium	Non	Non validé	Non validé	Non validé	10 g/m ² /j per os	McGuire et al., Hepatology 2010	Troubles gastro-intestinaux Aténorrhée	Grossesse Allaitement Hypersensibilité
Phénylacétate de sodium ou benzoate de sodium	Non	Non validé	Non validé	Non validé	Voie intraveineuse	Mendenhall et al., Am J Gastroenterol 1986	Troubles gastro-intestinaux (13 %) Hypokaliémie (7 %)	Aucune

Lavoisier

(Suite page suivante)

Tableau 3 (suite)

Traitement	AMM dans l'EH	Phase aiguë	Prévention secondaire	Post-TIPS	Dose et voie	Études princeps de l'utilisation dans l'EH	Effets indésirables	Contre-indications
L-ornithine-L-aspartate	Non	Non validé	Non validé	Non validé	3g x 3/j per os	Kircheis et al., Hepatology 1997	Très bonne tolérance, rares troubles gastro-intestinaux	Aucune
Flumazénil	Non	Pour certains auteurs seulement si intoxication aux BZO	Non	Non validé	Titration intraveineuse 0,3 mg/mm (max 2 mg) puis IVSE	Laccetti et al., Dig Liver Dis 2000	Crises convulsives	Précautions en cas d'épilepsie ou d'abaissement du seuil épileptogène

NB : une recommandation formalisée d'experts (RFE) concernant l'encéphalopathie hépatique est en cours de préparation. Elle devrait permettre de proposer une prise en charge plus codifiée.

colites à *Clostridium difficile*, mais plusieurs études semblent finalement écarter ce risque [52].

La néomycine, la vancomycine orale et le métronidazole ont été historiquement proposés dans la prise en charge de l'EH patente, avec des résultats mitigés selon les études [41], mais leur utilisation en pratique courante n'est pas recommandée du fait de leurs effets indésirables gênant leur prise au long cours : néphrotoxicité et ototoxicité pour la néomycine, neurotoxicité et cas décrits d'effets paradoxaux pour le métronidazole, sélection de souches d'Entérocoques résistants à la vancomycine pour la vancomycine.

Épurateurs de l'ammoniaque

De manière récente, différents épurateurs de l'ammoniaque, commercialisés pour la prise en charge des anomalies du cycle de l'urée, ont été proposés dans l'EH. Ainsi, une étude multicentrique contrôlée randomisée en double aveugle, réalisée chez 178 patients cirrhotiques avec EH récidivante et ne présentant pas d'autre complication aiguë de la cirrhose, a mis en évidence que l'administration de glycérol phénylbutyrate per os était en mesure de réduire efficacement la récurrence de l'EH par rapport à un placebo, en particulier chez les patients non traités par rifaximine, alors que cet effet n'était pas observé chez ceux traités par rifaximine [53]. Ce traitement prometteur n'est cependant pas encore commercialisé en France. Quant à son utilisation en phase aiguë, il n'existe que peu de données. Dans une étude récente de faible effectif (25 patients contre 25 patients historiques), nous avons pu montrer que l'utilisation de phénylbutyrate de sodium (*Ammonaps*[®], *Pheburane*[®]) permettait de diminuer rapidement l'ammoniémie et semblait associée à une amélioration neurologique dans la prise en charge d'épisodes d'EH à la phase aiguë (*données personnelles*).

Probiotiques

L'utilisation de probiotiques, apportant des espèces de *Lactobacillus* sp., a également été proposée afin de rétablir un microbiote plus riche en bactéries à activité uréase négative et de diminuer l'absorption intestinale d'ammoniaque. Bien que l'efficacité sur l'hyperammoniémie ait été démontrée dans plusieurs études, le retentissement sur l'EH semble plus aléatoire [54]. De manière similaire, un cas de transplantation fécale a été récemment rapporté [55] mais cette stratégie ne semblait efficace que pendant quelques semaines. Des études complémentaires sont ainsi nécessaires pour ces deux stratégies.

Acides aminés branchés et régimes spécifiques

Bien que suggéré des années 1950 aux années 1990 afin de diminuer les apports en substances neurotoxiques (ammoniaque, mercaptans, phénols), le régime pauvre en protéines

n'est plus recommandé chez les patients cirrhotiques avec EH. En effet celui-ci ne semble ni améliorer l'EH, ni prévenir son apparition, mais accentue au contraire les risques de dénutrition, malnutrition et sarcopénie, pouvant eux-mêmes aggraver l'EH par diminution du métabolisme de l'ammoniaque [54]. Ainsi, les apports nutritionnels quotidiens recommandés sont habituellement de 35 à 45 kcal/kg/j, avec une dose protéique quotidienne de 1 à 1,5 g/kg/j et un fractionnement des repas afin de minimiser la consommation protéique (recommandations de grade 1A) [56]. Cependant, chez les patients les plus graves, nécessitant une hospitalisation en réanimation, il semble raisonnable de ne pas excéder un apport calorique de 20 à 25 kcal/kg/j afin de ne pas déséquilibrer la balance protéique, ce qui pourrait être à l'origine de perturbations du métabolisme hépatique ou difficultés de sevrage ventilatoire [57]. Par ailleurs, les protéines d'origine végétale, si elles sont bien tolérées, sont à privilégier dans l'EH chronique, afin d'améliorer la clairance intestinale de l'ammoniaque (recommandation de grade 2B) [58]. En raison du déséquilibre du transport des acides aminés à travers la BHE, avec une diminution des acides aminés ramifiés (BCAA, *branched-chain amino acids*), une supplémentation du régime en BCAA est proposée par certains auteurs [59]. Aucune préparation pharmaceutique n'est cependant disponible en France.

Flumazénil

Le flumazénil (*Anexate*[®]) est un antagoniste compétitif des récepteurs des benzodiazépines. Son utilisation dans l'EH a d'abord été proposée afin de bloquer les effets des substances endogènes benzodiazépines-*like*, supposées impliqués dans la physiopathologie de l'EH. Plusieurs méta-analyses ont révélé que le flumazénil pouvait améliorer l'EH par rapport à un placebo [60], sans effet observé sur la mortalité. Cependant, le bénéfice de ce traitement n'a été rapporté que chez 25 à 30 % des patients selon les études, et semble observé encore plus rarement en pratique clinique. Ainsi, le flumazénil n'est pas recommandé en routine. Son utilisation peut en particulier être intéressante dans les cas d'EH secondaire à une prise de benzodiazépines [61].

Thérapies non pharmacologiques

Recalibrage de TIPS et embolisation de shunts portosystémiques

En cas d'EH compliquant la mise en place d'un TIPS, il est possible de réduire ou d'occlure le shunt par voie radiologique. En cas de larges shunts portosystémiques spontanés, certaines équipes ont proposé leur occlusion par voie radiologique, avec des résultats satisfaisants sur l'EH [62]. Cette procédure est cependant associée à un risque d'aggravation

de l'hypertension portale avec majoration du risque hémorragique et de l'ascite. Elle n'est donc discutée qu'au cas par cas, notamment pour des patients avec une insuffisance hépatique modérée (MELD \leq 15) et n'ayant pas accès à la transplantation hépatique.

Albumine et Molecular Adsorbent Recirculating System (MARS[®])

Certains auteurs ont proposé d'administrer de l'albumine pour traiter l'EH, notamment dans le cadre d'une EH induite par la prise de diurétiques [63]. Cependant, deux essais ont infirmé son efficacité dans l'EH toutes causes confondues [64], ce qui explique l'absence de recommandation quant à son utilisation à l'heure actuelle. L'utilisation de la dialyse à l'albumine, notamment le système MARS[®], a été également proposée en émettant l'hypothèse que l'épuration des toxines hydrosolubles et liées à l'albumine, dont l'ammoniaque et les phénols, serait associée à une amélioration du tableau d'EH. Plusieurs études ont démontré une amélioration de l'EH, une amélioration de l'ictère, de l'instabilité hémodynamique, de l'hypertension portale et de la pression intracrânienne [65]. Néanmoins, les mécanismes de l'amélioration de l'EH dans ce contexte ne sont pas établis : des études proposent que cela soit lié à une diminution significative des AA aromatiques phénoliques circulants, mais la majorité de ces études sont de faible effectif et aucune n'a mis en évidence de bénéfice sur la survie, notamment sur la survie sans transplantation hépatique [66]. Cela suggère que la dialyse à l'albumine pourrait surtout constituer un traitement d'attente avant transplantation hépatique, mais n'est pas recommandée en routine dans la prise en charge de l'EH.

Mesures générales

La recherche et le traitement des facteurs déclenchants sont primordiaux et permettraient une amélioration de l'EH dans 80 % des cas. Il s'agit en premier lieu de corriger les troubles hydro-électrolytiques, de rechercher une hémorragie digestive et de rechercher systématiquement une infection, même en l'absence de fièvre et de syndrome inflammatoire biologique, ceux-ci étant fréquemment absents chez les patients cirrhotiques. Il est également important de rechercher et arrêter la prise d'un médicament contre-indiqué ou nouvellement introduit, notamment des diurétiques ou benzodiazépines.

Dans certaines circonstances, l'EH est résistante à l'ensemble des traitements proposés. La transplantation hépatique est alors la seule solution. En cas d'inscription sur liste de transplantation hépatique, la caractérisation exacte de l'EH permet parfois d'obtenir des points supplémentaires pour l'attribution plus rapide d'un greffon (composante experts).

 Lavoisier

Conclusion

Les progrès récents dans la prise en charge des complications de la cirrhose, dont par exemple la mise en place précoce de TIPS après une hémorragie digestive, et l'augmentation de la survie qui en résulte, amènent à être de plus en plus souvent confrontés à des patients présentant une EH. Bien que la physiopathologie reste non univoque, les progrès récents en biologie suggèrent un effet synergique de l'hyperammonémie et de l'inflammation systémique sur la barrière hémato-encéphalique dans la genèse de la maladie. Associée au contexte, devant des signes cliniques compatibles, la réalisation du dosage de l'ammoniaque, d'un EEG et d'une imagerie cérébrale, idéalement une IRM avec SRM, permet d'obtenir des arguments diagnostiques forts. Le traitement à la phase aiguë repose sur l'administration de disaccharides non absorbables en association aux mesures non spécifiques, qui pourra ensuite être associé à la rifaximine en prévention secondaire. Récemment l'utilisation d'épurauteurs de l'ammoniaque a fait son entrée dans la prise en charge de ces patients avec des résultats prometteurs, qui permettraient d'avoir à terme un traitement médical de l'EH efficace et pourrait faire reculer l'indication de la transplantation hépatique dans ce contexte.

Liens d'intérêts : Groupe d'étude sur l'encéphalopathie hépatique, Brain Liver Pitié-Salpêtrière (BLIPS), a bénéficié de financements de recherche de la part des laboratoires BMS, Eumédica, Gore et Abbvie. Le Dr Nicolas Weiss déclare avoir été rémunéré pour des interventions pour les laboratoires BMS, Norgine et Alfa-Wassermann.

Références

1. Ferenci P, Lockwood A, Mullen K, et al (2002) Hepatic encephalopathy--definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congress of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology* 35:716-21
2. Stretz KL, Tacke F, Koch A, et al (2013) [Acute liver failure. Diagnosis and therapy]. *Med Klin Intensivmed Notfmed* 108: 639-45
3. Reuben A, Tillman H, Fontana RJ, et al (2016) Outcomes in Adults With Acute Liver Failure Between 1998 and 2013: An Observational Cohort Study. *Ann Intern Med* 11:724-32
4. Bustamante J, Rimola A, Ventura PJ, et al (1999) Prognostic significance of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 30:890-5
5. Orman ES, Perkins A, Ghabril M, et al (2015) The confusion assessment method for the intensive care unit in patients with cirrhosis. *Metab Brain Dis* 30:1063-71
6. Levesque E, Hoti E, Azoulay D, et al (2012) Prospective evaluation of the prognostic scores for cirrhotic patients admitted to an intensive care unit. *J Hepatol* 56:95-102
7. Joshi D, O'Grady J, Patel A, et al (2014) Cerebral oedema is rare in acute-on-chronic liver failure patients presenting with high-grade hepatic encephalopathy. *Liver Int* 34:362-6
8. Lockwood AH, McDonald JM, Reiman RE, et al (1979) The dynamics of ammonia metabolism in man. Effects of liver disease and hyperammonemia. *J Clin Invest* 63:449-60
9. Drolz A, Jager B, Wewalka M, et al (2013) Clinical impact of arterial ammonia levels in ICU patients with different liver diseases. *Intensive Care Med* 39:1227-37
10. Watanabe A, Higashi T, Shiota T, et al (1983) Alterations in neutral amino acid transport across the blood-brain barrier in hepatic failure. *Res Exp Med (Berl)* 183:11-8
11. Palomero-Gallagher N, Zilles K (2013) Neurotransmitter receptor alterations in hepatic encephalopathy: a review. *Arch Biochem Biophys* 536:109-21
12. Rama Rao KV, Norenberg MD (2014) Glutamine in the pathogenesis of hepatic encephalopathy: the trojan horse hypothesis revisited. *Neurochem Res* 39:593-8
13. Shawcross DL, Davies NA, Williams R, et al (2004) Systemic inflammatory response exacerbates the neuropsychological effects of induced hyperammonemia in cirrhosis. *Journal of Hepatology* 40:247-54
14. Shawcross DL, Wright G, Olde Damink SW, et al (2007) Role of ammonia and inflammation in minimal hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 22:125-38
15. Coltart I, Tranah TH, Shawcross DL (2013) Inflammation and hepatic encephalopathy. *Arch Biochem Biophys* 536:189-96
16. Albillos A, Lario M, Alvarez-Mon M (2014) Cirrhosis-associated immune dysfunction: distinctive features and clinical relevance. *J Hepatol* 61:1385-96
17. Watanabe A, Shiota T, Okita M, et al (1983) Effect of a branched chain amino acid-enriched nutritional product on the pathophysiology of the liver and nutritional state of patients with liver cirrhosis. *Acta Med Okayama* 37:321-33
18. Nguyen JH, Yamamoto S, Steers J, et al (2006) Matrix metalloproteinase-9 contributes to brain extravasation and edema in fulminant hepatic failure mice. *J Hepatol* 44:1105-14
19. Weiss N, Junot C, Rudler M, et al (2016) Hepatic versus drug-induced encephalopathy in cirrhotic patients? *Liver Int* [in press]
20. Quinn M, McMillin M, Galindo C, et al (2014) Bile acids permeabilize the blood brain barrier after bile duct ligation in rats via Rac1-dependent mechanisms. *Dig Liver Dis* 46:527-34
21. Prabhakar S, Bhatia R (2003) Management of agitation and convulsions in hepatic encephalopathy. *Indian J Gastroenterol* 22 Suppl 2:S54-8
22. Sawhney R, Holland-Fischer P, Rosselli M, et al (2016) Role of ammonia, inflammation and cerebral oxygenation in brain dysfunction of acute on chronic liver failure patients. *Liver Transpl* 22:732-42
23. Mouri S, Tripon S, Rudler M, et al (2015) FOUR score, a reliable score for assessing overt hepatic encephalopathy in cirrhotic patients. *Neurocrit Care* 22:251-7
24. Cadranet JF, Lebiez E, Di Martino V, et al (2001) Focal neurological signs in hepatic encephalopathy in cirrhotic patients: an underestimated entity? *Am J Gastroenterol* 96:515-8
25. Vilstrup H, Amodio P, Bajaj J, et al (2014) Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: 2014 Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases and the European Association for the Study of the Liver. *Hepatology* 60:715-35
26. Strauss E, da Costa MF (1998) The importance of bacterial infections as precipitating factors of chronic hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatogastroenterology* 45:900-4
27. Conn HO (1969) A rational program for the management of hepatic coma. *Gastroenterology* 57:715-23
28. Weiss N, Mutlu G, Essardy F, et al (2009) [The French version of the FOUR score: A new coma score]. *Rev Neurol (Paris)* 165: 796-802

29. Schiff S, Casa M, Di Caro V, et al (2016) A low-cost, user-friendly electroencephalographic recording system for the assessment of hepatic encephalopathy. *Hepatology* 63:1651–9
30. Amodio P, Montagnese S (2015) Clinical neurophysiology of hepatic encephalopathy. *J Clin Exp Hepatol* 5:S60–8
31. Parsons-Smith BG, Summerskill WH, Dawson AM, et al (1957) The electroencephalograph in liver disease. *Lancet* 273:867–71
32. Marchetti P, D'Avanzo C, Orsato R, et al (2011) Electroencephalography in patients with cirrhosis. *Gastroenterology* 141:1680–9 e1–2
33. Lai CH, Cheng PY, Chen YY (2011) Liver cirrhosis and risk of intracerebral hemorrhage: a 9-year follow-up study. *Stroke* 42:2615–7
34. Chavarria L, Cordoba J (2014) Magnetic resonance of the brain in chronic and acute liver failure. *Metab Brain Dis* 29:937–44
35. Alonso J, Cordoba J, Rovira A (2014) Brain magnetic resonance in hepatic encephalopathy. *Semin Ultrasound CT MR* 35:136–52
36. Als-Nielsen B, Gluud LL, Gluud C (2004) Non-absorbable disaccharides for hepatic encephalopathy: systematic review of randomised trials. *BMJ* 328:1046
37. Sharma P, Agrawal A, Sharma BC, et al (2011) Prophylaxis of hepatic encephalopathy in acute variceal bleed: a randomized controlled trial of lactulose versus no lactulose. *J Gastroenterol Hepatol* 26:996–1003
38. American Association for the Study of Liver D, European Association for the Study of the L (2014) Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: 2014 practice guideline by the European Association for the Study of the Liver and the American Association for the Study of Liver Diseases. *J Hepatol* 61:642–59
39. Blanc P, Daures JP, Rouillon JM, et al (1992) Lactitol or lactulose in the treatment of chronic hepatic encephalopathy: results of a meta-analysis. *Hepatology* 15:222–8
40. Cutler T, Mints G (2015) Lactulose vs Polyethylene Glycol for Treatment of Hepatic Encephalopathy. *JAMA Intern Med* 175:867–8
41. Patidar KR, Bajaj JS (2013) Antibiotics for the treatment of hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 28:307–12
42. Kimer N, Krag A, Gluud LL (2014) Letter: the effects of rifaximin in hepatic encephalopathy--authors' reply. *Aliment Pharmacol Ther* 40:858–9
43. Ponziani FR, Gerardi V, Pecere S, et al (2015) Effect of rifaximin on gut microbiota composition in advanced liver disease and its complications. *World J Gastroenterol* 21:12322–33
44. Ponziani FR, Scalfaferrì F, Petito V, et al (2016) The Role of Antibiotics in Gut Microbiota Modulation: The Eubiotic Effects of Rifaximin. *Dig Dis* 34:269–78
45. Bass NM, Mullen KD, Sanyal A, et al (2010) Rifaximin treatment in hepatic encephalopathy. *N Engl J Med* 362:1071–81
46. Sharma BC, Sharma P, Lunia MK, et al (2013) A randomized, double-blind, controlled trial comparing rifaximin plus lactulose with lactulose alone in treatment of overt hepatic encephalopathy. *Am J Gastroenterol* 108:1458–63
47. Bajaj JS, Barrett AC, Bortey E, et al (2015) Prolonged remission from hepatic encephalopathy with rifaximin: results of a placebo crossover analysis. *Aliment Pharmacol Ther* 41:39–45
48. Sanyal A, Younossi ZM, Bass NM, et al (2011) Randomised clinical trial: rifaximin improves health-related quality of life in cirrhotic patients with hepatic encephalopathy - a double-blind placebo-controlled study. *Aliment Pharmacol Ther* 34:853–61
49. Mullen KD, Sanyal AJ, Bass NM, et al (2014) Rifaximin is safe and well tolerated for long-term maintenance of remission from overt hepatic encephalopathy. *Clin Gastroenterol Hepatol* 12:1390–7 e2
50. Bajaj JS, Riggio O (2010) Drug therapy: rifaximin. *Hepatology* 52:1484–8
51. De Leo C, Eftimiadi C, Schito GC (1986) Rapid disappearance from the intestinal tract of bacteria resistant to rifaximin. *Drugs Exp Clin Res* 12:979–81
52. Neff GW, Jones M, Jonas M, et al (2013) Lack of *Clostridium difficile* infection in patients treated with rifaximin for hepatic encephalopathy: a retrospective analysis. *J Clin Gastroenterol* 47:188–92
53. Rockey DC, Vierling JM, Mantry P, et al (2014) Randomized, double-blind, controlled study of glycerol phenylbutyrate in hepatic encephalopathy. *Hepatology* 59:1073–83
54. Tapper EB, Jiang ZG, Patwardhan VR (2015) Refining the ammonia hypothesis: a physiology-driven approach to the treatment of hepatic encephalopathy. *Mayo Clin Proc* 90:646–58
55. Kao D, Roach B, Park H, et al (2016) Fecal microbiota transplantation in the management of hepatic encephalopathy. *Hepatology* 63:339–40
56. Cordoba J, Lopez-Hellin J, Planas M, et al (2004) Normal protein diet for episodic hepatic encephalopathy: results of a randomized study. *J Hepatol* 41:38–43
57. Lefrant JY, Hurel D, Cano NJ, et al (2014) [Guidelines for nutrition support in critically ill patient]. *Ann Fr Anesth Reanim* 33:202–18
58. Merli M, Riggio O (2009) Dietary and nutritional indications in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 24:211–21
59. Les I, Doval E, Garcia-Martinez R, et al (2011) Effects of branched-chain amino acids supplementation in patients with cirrhosis and a previous episode of hepatic encephalopathy: a randomized study. *Am J Gastroenterol* 106:1081–8
60. Als-Nielsen B, Gluud LL, Gluud C (2004) Benzodiazepine receptor antagonists for hepatic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev*:CD002798
61. Romero-Gomez M (2010) Pharmacotherapy of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Expert Opin Pharmacother* 11:1317–27
62. Laleman W, Simon-Talero M, Maleux G, et al (2013) Embolization of large spontaneous portosystemic shunts for refractory hepatic encephalopathy: a multicenter survey on safety and efficacy. *Hepatology* 57:2448–57
63. Jalan R, Kapoor D (2004) Reversal of diuretic-induced hepatic encephalopathy with infusion of albumin but not colloid. *Clin Sci (Lond)* 106:467–74
64. Simon-Talero M, Garcia-Martinez R, Torrens M, et al (2013) Effects of intravenous albumin in patients with cirrhosis and episodic hepatic encephalopathy: a randomized double-blind study. *J Hepatol* 59:1184–92
65. Hassanein TI, Tofteng F, Brown RS Jr, et al (2007) Randomized controlled study of extracorporeal albumin dialysis for hepatic encephalopathy in advanced cirrhosis. *Hepatology* 46:1853–62
66. Saliba F, Camus C, Durand F, et al (2013) Albumin dialysis with a noncell artificial liver support device in patients with acute liver failure: a randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 159:522–31

Dans quelles situations faut-il prescrire la rifaximine au cours de l'encéphalopathie hépatique et quels sont les effets attendus ?

Sarah Mouri*, Dominique Thabut*

Ce qu'il faut retenir

L'antibiothérapie par rifaximine en association avec le lactulose est recommandée en prévention secondaire des épisodes d'encéphalopathie hépatique (EH) au cours de la cirrhose ; elle permet de diminuer la survenue d'une récurrence et le taux de réhospitalisations.

Niveau
de preuve
Grade 1A

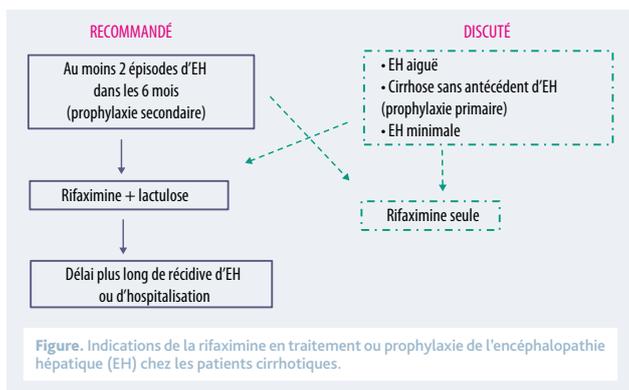
Elle pourrait également être efficace dès la phase aiguë en diminuant la durée d'hospitalisation lors d'un épisode d'EH et en améliorant la survie.

L'encéphalopathie hépatique (EH) correspond à l'ensemble des troubles neurologiques ou neuropsychiatriques causés par une insuffisance hépatique aiguë ou chronique et/ou par l'existence d'un shunt porto-systémique (1). Les symptômes observés vont d'anomalies subtiles détectées uniquement par des tests neuropsychologiques à des troubles de la conscience allant jusqu'au coma. L'apparition d'une EH, même minimale, est un facteur de risque indépendant de mortalité mais altère également la qualité de vie en favorisant, par exemple, les accidents de la route. L'EH constitue ainsi un véritable problème de santé publique puisqu'un patient cirrhotique a 30 à 70 % de risque de développer une EH minimale au cours de sa vie et 30 à 45 % de risque de développer une EH clinique. La physiopathologie reste à ce jour débattue, mais il semble maintenant clair que l'hyperammoniémie provenant, entre autres, des bactéries intestinales, et associée à une inflammation chronique et au stress oxydatif a probablement un rôle central dans l'apparition d'une EH. De ce fait, l'utilisation d'une antibiothérapie dans le traitement de l'EH a été proposée depuis plus de 30 ans ; historiquement, l'utilisation de néomycine, vancomycine ou métronidazole a montré des résultats mitigés selon les études mais leur prescrip-

tion en pratique courante n'est pas recommandée du fait de leurs effets indésirables au long cours (néphrotoxicité, ototoxicité, sélection de souches d'entérocoques résistants à la vancomycine). La rifaximine, un antibiotique à large spectre visant les bactéries Gram positif ou négatif et les anaérobies, est recommandée en association au lactulose depuis 2010 en prévention secondaire de l'EH. Son absorption systémique est très faible, estimée entre 1 et 3 % chez les sujets sains (il faut noter que peu d'études ont analysé l'absorption chez les patients cirrhotiques qui ont une perméabilité intestinale augmentée par l'hypertension portale). L'étude de N.M. Bass et al (2), multicentrique, randomisée, en double aveugle, contrôlée contre placebo a ainsi évalué l'efficacité de la rifaximine pour maintenir la rémission de patients ayant une histoire récente d'EH. Ce travail a porté sur des patients cirrhotiques ayant présenté au moins 2 épisodes d'EH clinique au cours des 6 derniers mois et ne présentant pas de facteurs de risque précipitants d'EH (hémorragie digestive, insuffisance rénale, infection, etc.) ; ils recevaient soit la rifaximine (140 sujets, 550 mg \times 2/j) soit le placebo (159 sujets), pendant 6 mois ou jusqu'à l'apparition d'une HE ou d'un autre événement intercurrent. L'utilisation du lactulose était permise et retrouvée chez environ 90 % des patients des 2 groupes. Il a ainsi été démontré que la rifaximine réduisait de façon significative le risque de survenue d'un nouvel épisode d'EH par rapport au placebo (HR = 0,42 ; IC₉₅ : 0,28-0,64 ; p < 0,001), mais également le risque d'hospitalisation pour EH (13,6 % des patients sous rifaximine contre 22,6 % sous placebo). Cette étude a permis la mise sur le marché de la rifaximine en prévention secondaire, associée au lactulose.

Une autre étude randomisée contrôlée publiée par B.C Sharma et al. (3) a permis de confirmer ces résultats en comparant le traitement par rifaximine

* Service d'hépatogastroentérologie, hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris.



Question non résolue

» Doit-on recommander la prescription systématique de rifaximine en dehors d'une indication de prophylaxie secondaire, par exemple dès l'épisode aigu ou en cas d'encéphalopathie minimale ?

et lactulose au lactulose seul. Cent vingt patients cirrhotiques avec EH ont été inclus, les traitements étaient débutés pendant l'épisode aigu puis poursuivis au long cours ; les résultats ont montré une disparition des signes d'EH plus rapide sous rifaximine et lactulose que sous lactulose seul mais également une réduction de la durée d'hospitalisation et de la mortalité. La rifaximine, en association au lactulose, aurait donc un intérêt dès l'épisode aigu d'EH en plus de la prévention secondaire. L'étude prospective, randomisée, contrôlée, en double aveugle de A. Mas et al. (4) va également dans ce sens. La bithérapie par rifaximine et lactulose

pendant 5 à 10 jours permettait une amélioration des symptômes et de la gravité de l'EH, une diminution de l'ammoniémie et une amélioration de l'électroencéphalogramme statistiquement plus importante que sous lactulose seul (figure).

D'autres études suggèrent un intérêt de la rifaximine même en cas d'EH minimale, permettant une amélioration de la qualité de vie et des tests cognitifs. Il n'existe pas d'étude en prophylaxie primaire de l'EH actuellement.

Concernant le mécanisme d'action de la rifaximine, plusieurs hypothèses ont été proposées et il s'agirait d'une modulation du profil métabolique du microbiote plutôt que d'une modification de sa composition. L'étude de J.S. Bajaj et al. (5), menée chez des patients ayant une EH minimale, a montré, en analyse métabolomique et lipidomique, une modification des carbohydrates et des métabolites lipidiques plasmatiques sans modification de la composition du microbiote sous rifaximine ainsi qu'une diminution du taux de lipopolysaccharide circulant. Ces modifications métaboliques étaient corrélées à l'amélioration des troubles cognitifs, ce qui conduit à penser que la rifaximine pourrait avoir une action locale mais également systémique.

Enfin, plusieurs études non randomisées suggèrent que la rifaximine pourrait également prévenir les autres complications dues à la cirrhose telles que les hémorragies digestives liées à l'hypertension portale et l'infection spontanée du liquide d'ascite. ■

Références bibliographiques

1. Vilstrup H, Amodio P, Bajaj J et al. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: 2014 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases and the European Association for the Study of the Liver. *Hepatology* 2014;60(2):715-35.
2. Bass NM, Mullen KD, Sanyal A et al. Rifaximin treatment in hepatic encephalopathy. *N Engl J Med* 2010;362:1071-81.
3. Sharma BC, Sharma P, Lunia MK, Srivastava S, Goyal R, Sarin SK. A randomized, double-blind, controlled trial comparing rifaximin plus lactulose with lactulose alone in treatment of overt hepatic encephalopathy. *Am J Gastroenterol* 2013;108(9):1458-63.
4. Mas A, Rodés J, Sunyer L et al. Comparison of rifaximin and lactitol in the treatment of acute hepatic encephalopathy: results of a randomized, double-blind, double-dummy, controlled clinical trial. *J Hepatol* 2003;38(1):51-58.
5. Bajaj JS, Heuman DM, Sanyal AJ et al. Modulation of the microbiome by rifaximin in patients with cirrhosis and minimal hepatic encephalopathy. *PLoS One* 2013;8(4):e60042.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau(10) International Publication Number
WO 2018/020010 A1(43) International Publication Date
01 February 2018 (01.02.2018)

(51) International Patent Classification:

A61K 31/4188 (2006.01) A61P 1/16 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/EP2017/069194

(22) International Filing Date:

28 July 2017 (28.07.2017)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

16305989.2 29 July 2016 (29.07.2016) EP

(71) Applicant: MEDDAY PHARMACEUTICALS [FR/FR];
24/26 rue de la Pépinière, 75008 Paris (FR).(72) Inventor: SEDEL, Frédéric; 17 rue des rigoles, 75020
PARIS (FR).(74) Agent: FLESSELLES, Bruno; 36 rue Jean de La Fontaine,
75016 Paris (FR).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

WO 2018/020010 A1

(54) Title: METHOD FOR TREATING HEPATIC ENCEPHALOPATHY

(57) Abstract: The invention relates to the use of biotin at a daily dose of at least 100 mg for treating hepatic encephalopathy.

METHOD FOR TREATING HEPATIC ENCEPHALOPATHY

The invention relates to the treatment of hepatic encephalopathy.

- 5 Hepatic encephalopathy (HE), also known as portosystemic encephalopathy, is a severe complication of acute or chronic liver failure. Patients suffer from various neurologic and neuropsychiatric abnormalities (asterixis, confusion, altered level of consciousness, coma as a result of liver failure).
- 10 During cirrhosis, hepatic encephalopathy negatively impacts patient survival. About 30% of patients dying of end-stage liver disease experience significant encephalopathy, approaching coma. Consequently, the economic burden of hepatic encephalopathy is substantial, as it is the second most common reason for hospitalization of cirrhotic patients in the
- 15 United States. Hepatic encephalopathies can be subdivided in type A, B and C depending on the underlying cause.
- Type A (=acute) describes hepatic encephalopathy associated with acute liver failure, typically associated with cerebral oedema. Acute liver failure is a rapid
- 20 deterioration (within days and weeks) of liver function in a person who had no pre-existing liver disease. Acute liver failure is commonly caused by paracetamol (acetaminophen) overdose, idiosyncratic reaction to medication (e.g. tetracycline, troglitazone), autoimmune causes, viral hepatitis (hepatitis A or B), acute fatty liver of pregnancy, or can be idiopathic.
- 25 Type B (=bypass) is caused by portal-systemic shunting without associated intrinsic liver disease. The blood thus by-passes the liver, which therefore cannot metabolize and clear blood substances which can be toxic like ammonium. Type B usually occurs as a result of congenital abnormalities and/or as a result of an invasive procedure or trauma.
- 30 Type C (=cirrhosis) occurs in patients with cirrhosis. Cirrhosis is a late stage of chronic liver disease when scarring (fibrosis) develops. The major causes of cirrhosis are:
- chronic alcoholism
 - viral infections caused by chronic viral hepatitis (types B, C and D)
 - 35 - metabolic diseases such as NASH (Non Alcoholic Steato Hepatitis)

- alpha-1-antitrypsin deficiency, galactosemia and glycogen storage disorders
- inherited diseases such as Wilson disease and hemochromatosis
- biliary cirrhosis resulting from diseases such as primary biliary cholangitis (PBC) and primary sclerosing cholangitis (PSC)
- toxic hepatitis caused by severe reactions to prescribed drugs or prolonged exposure to environmental toxins
- repeated bouts of heart failure with liver congestion.

Type-C HE can be subdivided in episodic (return to normal neural state between episodes), persistent (no return to normal neural state) and minimal encephalopathy (Bajaj, Aliment Pharmacol Ther. 2010 Mar;31(5):537-47).

Minimal encephalopathy is an encephalopathy that does not lead to clinically overt cognitive dysfunction, but can be evidenced using neuropsychological tests, and has been demonstrated to impair quality of life and to increase the risk of involvement in road traffic accidents.

Minimal HE may affect 30-70% of patients with cirrhosis ; overt HE (either episodic or persistent) is observed in 30-45% of patients with cirrhosis during their lifetime.

It is to be noted that HE, even minimal, is an independent risk of mortality.

The physiopathology of hepatic encephalopathy is still debated but many hypothesis are studied. Ammonia may have a central key role, together with systemic inflammation and changes in specific carriers on the blood-brain barrier. Hepatic encephalopathy could be a consequence of accumulation in the bloodstream of toxic substances, in particular ammonia, that are normally cleared by the liver. Ammonemia is not sufficient to induce HE. It is hypothesized that a combination of both increased blood ammonia and inflammation is necessary for HE to occur, in particular by a modification of the blood-brain barrier leading to intracerebral accumulation of toxic substances and modulation of neurotransmission.

Treatments of hepatic encephalopathy

Most specific current therapies are designed to decrease intestinal ammonia production and the resulting hyperammonemia.

During acute hepatic encephalopathy, lactulose (beta-galactosidofructose) or lactilol (beta-galactosidosorbitol) are given to patients to accelerate the transit and to inhibit intestinal ammonia production. These are nonabsorbable disaccharides

that are degraded by intestinal bacteria to lactic acid and other organic acids. Lactulose is administered to patients at a dose of 30 mL orally, daily or twice daily, and the dose may be increased, or reduced, depending on the tolerance or adverse effect observed in the patients.

- 5 Higher doses of lactulose (60 mL every eight hours) may be administered to patients with severe hepatic encephalopathy. Lactulose is given after the first episode of hepatic encephalopathy to prevent recurrence.

Various antibiotics are also used, in order to decrease the ammoniagenic bacterial load. Antibiotics are generally used if treatment with lactulose is not effective
10 enough and in secondary prevention.

One can use neomycin, metronidazole, rifaximin, oral vancomycin, paromomycin, and oral quinolones. Rifaximin a nonabsorbable derivative of rifampin with a broad spectrum antibacterial activity. It can reduce endotoxemia, including hyperammonemia, by reducing the intestinal translocation of bacteria. Used in a
15 number of trials, rifaximin effect was equivalent or superior to the compared agents with good tolerability. The recommended posology is 550 mg twice a day.

Recently, therapies used for the treatment of inborn errors of urea metabolism begin to be used in patients with hepatic encephalopathy, but are not yet formally recommended. These include:

- 20
- A stable salt of 2 constituent amino acids, L-ornithine and L-aspartate (LOLA), can also be used to increase ammonia clearance. It may be combined with lactulose and/or rifaximin.
 - Sodium benzoate, sodium phenylbutyrate, sodium phenylacetate, and glycerol phenylbutyrate may also be used for the treatment of hepatic
25 encephalopathy. The oral doses of sodium benzoate are about 5 g twice a day, although lower doses (2.5 g three times a week) may also help patients recover from symptoms of hepatic encephalopathy. Glycerol phenylbutyrate may be used at an oral dose of 6 ml twice-daily.

Nutritional intervention is necessary in case of malnutrition or insufficient dietary
30 intake. Eating vegetables proteins rather than proteins derived from red meat, and chicken and fish proteins may be favourable. It is also advised to supplement the diet with branched-chain amino acids. Zinc administration can also be used, with the potential to improve hyperammonemia, with zinc sulfate and zinc acetate that can be administered at a dose of 600 mg orally every day. L-carnitine is also used

to improve hepatic encephalopathy symptoms, in particular in patients with cirrhosis.

5 WO 2011/124571 describes the use of biotin at a high dose (in the range of 100 to 600 mg/day) for the treatment of visual impairments, in particular related to optic atrophy. It should be noted that the visual impairments actually described in this application are symptoms related to a particular leukoencephalopathy, i.e. an involvement of the white matter of the brain. This document neither describes nor suggests that biotin could be used for the treatment of HE.

10

WO 2014/016003 describes the use of biotin at a high dose (of the order of 100 to 600 mg/day) for the treatment of multiple sclerosis (MS), stroke and X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD), in particular adrenomyeloneuropathy (AMN).

WO 2014/177286 provides evidence that biotin is useful for treatment of AMN.

15

WO2016151132 provides evidence that biotin is useful for treating amyotrophic lateral sclerosis (ALS).

20 Nagamine et al (J Gastroenterol. 1995 Jun;30(3):351-5; and Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi. 1989 Jul;86(7):1519-24) and in JPH01226814A have induced acute hyperammonemia in rats by administering urease or ammonium acetate. In another model, acute liver failure was induced by injecting a single high dose of CCl₄. The authors observed an ability of biotin to decrease the serum ammonium level in this animal acute liver failure model. The amount of biotin when administered was not controlled when given orally and was 0.5 mg/kg BW (body weight) when a single dose was injected intraperitoneally (Nagamine, 1989). In Nagamine (1995), the dose of biotin (provided as a single intraperitoneal shot) is also very low.

25 In JPH01226814A, the biotin is provided as a single intraperitoneal shot of 1mg of biotin. Results are reported for human, with doses used therein in the range of a few mg (about 5-10mg) per day. The results reported for the patients are, however, not conclusive. Indeed, there is a high natural variability of the general state and of the ammonia level in the serum of patients with HE. Tables 7 and 8 only report data obtained during 10 days, without any control or information about other treatments that the patients received. From patient 2, it can be seen that there is a

35

high variability in the ammonia level (rising and decreasing) for the first 5 days, even though this patient did not receive any biotin during this timespan. It is also true for patient 3, where ammonia level had well decreased between days 48 and 96 although no biotin had been administered to the patient in this timespan. There is thus no possibility to reach a conclusion on the actual role of biotin on ammonia levels and for controlling HE in these patients.

It is further to be noted that despite the results reported therein more than 20 years ago, no drug based on biotin was developed or proposed to the market to treat or prevent hepatic encephalopathy.

In particular, a review by Bajaj (2010, Aliment Pharmacol Ther 31, 537–547) does not mention biotin as a product that is or can be used for the treatment of type C hepatic encephalopathy.

In the context of the present invention, it is proposed to use biotin, at a much higher dose, in order to improve the condition of patients suffering from hepatic encephalopathy.

The fact that biotin at a high dose (a higher dose than the one presented in the prior art) can be useful for hepatic encephalopathy treatment and could ultimately limit the evolution of the disease, and even revert some symptoms thereof is particularly novel and surprising.

The invention therefore relates to biotin for use thereof in the treatment or prevention of hepatic encephalopathy, wherein the biotin is very preferably used at a high dose, i.e. at least 100 mg per day. It is preferably used at a daily dose higher than 100 mg.

Also subjects of the invention are compositions containing biotin for the use thereof in the treatment of hepatic encephalopathy, and also the use of biotin for the production or manufacture of a drug intended for the treatment of hepatic encephalopathy. In particular, the drug shall contain more than 20 mg, more preferably more than 40 mg, more preferably more than 50 mg, more preferably more than 70mg, more preferably about or exactly 100 mg of biotin, in particular when used by oral administration.

The teachings of the invention thus make it possible to implement treatment methods comprising the administration of biotin to patients suffering from hepatic

encephalopathy. The invention thus also relates to a method for treating a patient suffering from hepatic encephalopathy, comprising the step of administering biotin to said patient. Examples of dosage of biotin, and treatment regimen are disclosed below.

5

Biotin can be used alone or in combination with another compound used for treating hepatic encephalopathy (or symptoms thereof).

The invention therefore covers a composition containing biotin and also another medicament, as listed above, against hepatic encephalopathy, for simultaneous, separate or sequential (spread out over time) use in the treatment of a hepatic encephalopathy.

The invention also describes and relates to a method of treating a patient suffering from hepatic encephalopathy, comprising the steps of providing biotin to said patient, and optionally (but preferably) another drug useful for providing relief to said patients with regards to the symptoms of hepatic encephalopathy.

Biotin can, in particular, be used to improve cognitive and psychomotor processing speed, memory and motor control and coordination.

Treatment with biotin can also lead to increase of the weight of the patient.

20 The biotin is preferably used for treating type C hepatic encephalopathy, whether persistent, episodic or minimal. However, biotin may be used in patient with type A or type B hepatic encephalopathy to decrease the symptoms before the situation comes back to normal. Administration of biotin to type A patients would allow these patients to wait for a longer time before receiving a liver graft and/or to be in a better condition when receiving it.

25 Biotin can also be used for preventing episodes of hepatic encephalopathy. In particular such prevention is useful in patients with diagnosed cirrhosis, whether they have already presented an episode of HE (i.e. whether they have episodic or persistent HE) or whether they have not been diagnosed with HE (they have not presented any episode of HE symptoms, or no clinical sign of HE), and thus have minimal HE or no HE at all.

30 Biotin at a high dose is particularly interesting to prevent secondary episodes of HE, in patients that have already presented an episode of HE.

For treatment of the above disease, or preparation of a drug intended for the treatment of the above disease, biotin may be used as follows.

5 The biotin is preferentially administered at a therapeutically effective amount, which is generally a high dose, *i.e.* at a dose of at least or about or exactly 100 mg per day. Even if a maximum dose is not really envisaged, the latter should not generally exceed 500 mg, 600 mg or 700 mg per day. This makes it possible to observe improvement in the condition of the patient, and/or stop or decrease of the worsening of the condition of the patient.

10 In that way, the physician may determine the dose according to the weight of the patient. In particular, a dose at least equal to 1 mg/kg/day, preferably 3 mg/kg/day, preferably 5 mg/kg/day, or at least equal to 7.5 mg/kg/day, or even around 10 mg/kg/day, is administered to the patient.

15 Between 100 and 700 mg of biotin per day are thus preferably administered to the patients, generally between 100 and 500 mg per day, or between 100 and 600 mg per day, more preferably between 100 and 300 mg per day, generally around or exactly 300 mg per day. One can thus administered at least or about or exactly 100 mg per day, or at least or about or exactly 150 mg per day, or even at least or about or exactly 200 or at least or about or exactly 250 mg per day, or at least or
20 about or exactly 300 mg per day.

In one particular embodiment which is preferred (in particular for problems of ease of use by the patient), the biotin is in a form suitable for oral administration. This therefore involves a composition for oral administration, which will contain at least
25 or about or exactly 20 mg, preferably at least or about or exactly 40 mg of biotin, or even at least or about or exactly 50 mg, at least or about or exactly 75 mg, at least or about or exactly 100 mg, at least or about or exactly 150 mg or at least or about or exactly 250 mg of biotin, or at least or about or exactly 300 mg of biotin. This composition is preferentially for pharmaceutical use, and is therefore a medicine. It
30 is understood that each unit dose of this composition contains at least or about or exactly 20 mg, preferably at least or about or exactly 40 mg, or even at least or about or exactly 50 mg, at least or about or exactly 100 mg, at least or about or exactly 150 mg or at least or about or exactly 250 mg of biotin or about or exactly 300 mg of biotin, as active ingredient.

35

The total dose of biotin may be administered once a day, or through multiple intakes. In particular, biotin may be taken through two or three intakes a day. It is preferred when biotin is taken around meal times, and when the amount of biotin is substantially the same for each intake.

5

It is to be noted that the diseases herein described are chronic diseases, with worsening over time. It is thus preferable that treatment with biotin is performed in the long run, in order to be the most effective, to prevent the occurrence of new HE episodes and to stabilize any improvement that it will bring. Consequently, it is preferred when said treatment with biotin has a duration of at least 3 months. It is even preferred when said treatment with biotin has a duration of at least 6 months. As indicated, such treatment may be extended as long as possible in order to prevent the occurrence of new HE episodes, increase the improvement that could bring biotin, and stabilize the therapeutic effects. In particular, said treatment with biotin has a duration of at least one year. There is no envisioned end for the treatment and it is expected that the patient will take biotin as long as it is needed and will stabilize or improve the condition of the patient.

In one particular embodiment, this composition for oral administration contains biotin as sole active ingredient, and also excipients, without any other active ingredient.

An excipient should be understood to mean any compound being part of the formulation which is intended to act as a simple support, *i.e.* which is not intended to have a biological activity.

This composition can be in any form known in the art. In particular, it is in the form of gel capsules, tablets (optionally film-coated), pills or lozenges. In another embodiment, it is in the form of a syrup. Said syrup contains an amount such that it contains at least or about or exactly 20 mg, preferably at least or about or exactly 40 mg, or even at least or about or exactly 50 mg, at least or about or exactly 75 mg or at least or about or exactly 100 mg of biotin per unit dose. The concentration of biotin in this syrup depends on the unit dose that it is desired to give to the patient.

35

Excipients which can be used by those skilled in the art are well known in the art. Talc (E553b), microcrystalline cellulose, lactose, mannose, starch (in particular corn starch), magnesium stearate (E572) and stearic acid (E570) can thus be chosen. This list is not exhaustive.

5

When this composition is prepared in the form of gel capsules, a preferred excipient is microcrystalline cellulose.

When the composition is in the form of a film-coated tablet, said film-coating may be formed from any substance known in the art, such as hypromellose (E464), ethylcellulose, macrogol, talc (E553b) titanium dioxide (E171) or iron oxide (E172).

10

The active ingredient may also be colored (by any acceptable coloring, such as cochineal), thereby making it possible to verify that the biotin is well dispersed in the excipient.

15

A slow release (or slow sustained) form may also be envisaged given the fact that plasma half life of biotin is short (about 2 hours).

Said slow release compositions are known in the art and described in particular in WO 2011/077239. In particular, said slow release compositions may comprise a slow release matrix comprising biotin alone or with one or more active ingredient(s).

20

In a specific embodiment, the slow release composition comprises a matrix allowing immediate release, wherein said matrix comprises biotin alone or with one or more other active ingredient(s) and the slow release is achieved by a release modifying matrix or coating.

25

Thus, the slow release composition may provide immediate release and differed (slow) release of biotin.

In a specific embodiment slow release may be achieved through an osmotically driven release system.

30

In another embodiment, the slow release composition comprises a core comprising biotin, optionally one or more active ingredient(s), and optionally pharmaceutical excipient(s) and one or more outer layers, wherein the outer layers comprises one or more slow release agent(s).

35

In another aspect, the biotin may be in the form which allows administration by injection: this then involves an injectable composition containing at least or about or exactly 20 mg, preferably at least or about or exactly 40 mg, or even at least or about or exactly 50 mg, at least or about or exactly 75 mg, at least or about or exactly 100 mg, at least or about or exactly 150 mg or at least or about or exactly 250 mg of biotin per unit dose.

This injectable composition may be in the form of a vial containing the biotin, and also acceptable excipients. The concentration of biotin is adjusted according to the envisaged volume of the vial. Certain excipients which improve biotin solubility can be used.

The excipients that can be used for the production of injectable compositions are well known in the art. Mention may in particular be made of sodium dihydrogen phosphate, sodium bicarbonate (E550i), methyl para-hydroxybenzoate (E218) and propyl para-hydroxybenzoate (E216), which can be used together in proportions that those skilled in the art are capable of determining. The water used is water for injection. The injection is preferably carried out intramuscularly. It can also be carried out intravenously.

20

Description of the Figures

Figure 1: levels of ASAT (A), ALAT (B), bilirubin (C) and albumin (D) in the serum of control (sham) or bile duct ligated (BDL) rats.

Figure 2: 6 minutes comportmental analysis of control and BDL rats without or with a water enriched in NH₃. A. Total distance; B. mean speed; C. activity duration (time during which the animal is active rather than passive); D. number of zone changes; E. number of rearing; F. total duration of rearing.

Figure 3: blood ammoniemia in control (sham) or BDL rats (A) or in rats injected with oil (control rats) or CCl₄ (B).

Figure 4: levels of ASAT (A), ALAT (B), bilirubin (C) and albumin (D) in the serum of control (oil) or rats injected with CCl₄.

Figure 5: 6 minutes comportmental analysis of control (oil) and rats injected with CCl₄. A. Total distance; B. mean speed; C. activity duration (time during which the animal is active rather than passive); D. number of zone changes; E. number of rearing; F. total duration of rearing.

35

Figure 6: blood ammoniemia in control or BDL rats fed with placebo or with biotin (300 mg/kg in food, corresponding to a daily dose of 30mg/kg BW/day in rats or 300mg/day in humans).

Figure 7: 6 minutes comportmental analysis of control (sham) or BDL rats, with a diet without or with biotin (dose corresponding to 300 mg in human). A. Total distance; B. mean speed; C. activity duration (time during which the animal is active rather than passive); D. number of zone changes; E. number of rearing.

Figure 8: 6 minutes comportmental analysis of control and BDL rats without or with a diet enriched biotin (2 dosages corresponding to daily dose of 50 mg or 300 mg in human). A. Total distance; B. mean speed; C. activity duration (time during which the animal is active rather than passive); D. number of zone changes; E. number of rearing.

Figure 9: blood-brain barrier permeability observed by penetration into the CNS of Texas red coupled to dextran. A. control and BDL rats without or with water enriched in NH₃. B. control (oil) and rats injected with CCl₄ rats without or with a diet enriched in NH₃.

Figure 10: blood-brain barrier permeability observed by penetration into the CNS of Texas red coupled to dextran. A. control and BDL rats without or with a diet enriched in biotin (300 mg/kg of food). B. control (oil) and rats injected with CCl₄ rats without or with a diet enriched in biotin (50 mg/kg of food).

Figure 11: Mesure of serum IFN gamma (A) or TNF alpha (B) in control animals, BDL animals and CCl₄ animals with or without NH₃-enriched water. HE+: animals showing comportmental signs of hepatic encephalopathy; HE-: animals not showing signs of hepatic encephalopathy.

Figure 12: Mesure of serum IFN gamma (A), TNF alpha (B) or IL 6 (C) in control animals, BDL animals with or without NH₃-enriched water and/or biotin (300 mg/kg food) enriched diet.

30 **Examples**

Example 1 - Study in the rat bile duct ligation model plus hyperammonemic (NH₃-enriched) water

- Rats with bile duct ligation (BDL) is a model of cholestatic liver injury with associated oxidative stress and fibrogenesis.

- These rats develop progressive hepatic injury with the onset of fibrosis within 2 weeks and the development of biliary cirrhosis within 4-6 weeks.
- When given hyperammonemic supplements, more bile duct ligated rats develop encephalopathy.

5

The effect of biotin is evaluated in bile duct ligated rats treated with hyperammonemic water regarding clinical efficacy in terms of orientation in open-field and body weight gain.

"Clinical" evaluation:

- 10 - 4 groups of 5 rats: sham-operated rats treated with either 1) control diet and control water; 2) control diet and hyperammonemic (NH₃-enriched) water; 3) biotin-supplemented diet and control water; and 4) biotin-supplemented diet and hyperammonemic water.
- 15 - 4 groups of 10 rats: bile duct-ligated rats treated with either 1) control diet and water; 2) control diet and hyperammonemic water; 3) biotin-supplemented diet and control water; and 4) biotin-supplemented diet and hyperammonemic water.
- The dose of biotin used is 30 mg/kgBW/day which is equivalent to a human dose of 300 mg/day.
- 20 - Biotin is delivered mixed in dry food
- "Clinical" examination:
 - o Weight
 - o Open-field (orientation)
- Treatment start: at day 3 post-surgery
- 25 - Treatment is continued for 6 weeks, when rats are cirrhotic.
- Blood-brain barrier permeability is evaluated at the end of the study.

30 This experiment makes it possible to evaluate the effect of high-dose biotin treatment in terms of clinical improvement, blood-brain barrier reduction and metabolic normalization, in a model of chronic HE.

Example 2 - Another model of hepatic encephalopathy in rats is the model of liver fibrosis induced CCl₄ plus hyperammonemic water

- 35 - Rats administered with CCl₄ have hepatotoxicity mediated by free radical production.

WO 2018/020010

PCT/EP2017/069194

13

- These rats develop progressive hepatic injury with development of cirrhosis within 8 weeks.
- When given hyperammonemic supplements, more CCl₄-treated rats develop encephalopathy.

5

The same clinical protocol as described in Example 1 is applied to these animals.

Example 3 - Detailed material and methods

Animals

- 10 Adult male Wistar rats (weight 175-200g at the initiation of the surgical procedure) were obtained from the Janvier labs (Le Gesnest-Saint-Isle) and were used for the whole experiments.

Bile duct ligation

- 15 Bile duct ligation (BDL) was used as a biliary cirrhosis model. All rats of this group were operated on. They were randomly separated in two groups : BDL or simple laparotomy (SHAM, control-group). The BDL procedure was conducted as described previously (Kountouras J, Prolonged bile duct obstruction : a new experimental model for cirrhosis in the rat ; Br J Exp Pathol 1984) and as controlled
20 in our lab.

Surgery was done under total anesthesia with inhaled isofluran (Aerrane, Baxter Maurepas) 3% mixed with air. Analgesia was done by sub-cutaneous injection of buprenorphin 2% (Buprécare 0,3 mg/ml, Axience) immediately before and after surgery.

- 25 Animals were examined twice a week and weighted weekly. All animals were maintained for 6 weeks following surgery.

CCl₄

- 30 In order to obtain a control of the results, another cirrhosis model was used, consisting in a chronic poisoning by carbon tetrachloride (CCl₄) ; Wistar rats received CCl₄ 1 ml/kg body weight twice weekly for 8 weeks in mineral oil. Controls received mineral oil without CCl₄. Treatments were administered intragastrically by gavage using a polyethylene catheter, without sedation.

- 35 The dose of CCl₄ used in this experiment is below the dose used in Nagamine, which is more a model of acute liver injury (type A HE).

In the present model, use of a lower dose over a longer time makes it possible to better mimic progressive liver injury and thus type C HE.

Hepatic encephalopathy

- 5 An intervention was used (Wright et al, Hepatology 2007, Jun;45(6):1517-26) with the aim to increase hepatic encephalopathy incidence and consisted of addition of high protein/ ammoniagenic food supplements (NH₃-enriched supplements) for 6 or 8 weeks (depending on the cirrhosis model). The NH₃ treatment began 3 days after the surgery or CCl₄ procedure. It consisted of a tailor-made mixture mimicking
- 10 the amino-acid composition of the hemoglobin molecule (4g/kg/g ; EF Rat Hyperammonemia AA mixture Crude protein 88,9%, SSNIFF) mixed with water. Rats were given 2 bottles, one with water only and one with the treatment. The aim of this regimen was to produce chronic hyperammonemia. Four groups of rats received this NH₃-enriched treatment among BDL, SHAM,
- 15 CCl₄ and oil.

Treatment against hepatic encephalopathy

- Rifaximin is an oral non-absorbable antibiotic validated in human to prevent recurrence of HE in association with lactulose. The exact mechanism of action is
- 20 not well known but it supposed to decrease hyperammonemia and bacterial translocation because of its role on gut microbiota. Thereby, it could play a role on the two main actors of HE, hyperammonemia and systemic inflammation. Rifaximin (Sigma Aldrich) was mixed with water at the dose of 50 mg/kg/d and began 3 days after the surgery.
- 25 Four groups of rats received rifaximin (RFX) : BDL, SHAM, BDL + RFX, SHAM + RFX. Sodium benzoate, validated in genetic disorder of urea cycle, was also mixed with water at the dose of 200 mg/kg/d and began 3 days after the surgery.
- 30 Biotin was given mixed in animal food at a dose of 50mg/kg or 300mg/kg of food, corresponding to an ingested dose of 5mg/kg of animal/day or 30mg/kg of animal/day and a daily dose of 50mg or 300 mg in human. It it to be noted that biotin is provided to the animals prior to inducement of HE, as the animals only experience one HE episod and quickly die after the development
- 35 of HE following Bile Duct Ligation. Therefore, in this animal model, biotin can't be

provided after surgery to study the ability of biotin to prevent a second HE episod. Survival of the animals was not studied as the animals were sacrificed to study the Blood-Brain Barrier permeability.

5 Behavioral Test

To assess the hepatic encephalopathy, the Open Field Test (BioSeb) was used, a behavioral test validated in BDL rats to explore neurological impairments (Leke, Plos One 2012;7(5)). The test was done the day of sacrifice, in standardized experimental conditions (hour, place, light, noise). Each rat was placed in a square
10 1m² box and was free to explore the arena during 6 minutes. Two areas were defined in the square, center and periphery. Mobility parameters were registered by a three-dimensional camera. The data analyzed after 6 minutes of experiments were : total distance travelled (cm), time of mobility (s), speed (cm/s), number of zone changes, distance travelled in the center and periphery zone, time spent in
15 the center and periphery zone, number of rearing, total duration of rearing.

Determination of BBB permeability with the use of dextran Texas Red

The integrity of BBB was investigated by measuring the extravasation from intra-vascular compartment of dextran-Texas Red (Life Technologies) conjugated.

20 Six weeks after the surgery, all rats were anesthetized with inhaled isofluran 3%. 0,75ml of fluorochrome was injected in the femoral vein (Texas Red 10kDa 10mg/ml) and circulated during 6 minutes. Then, we took a blood sample (2ml) in the inferior vena cava by a median laparotomy. To remove the intravascular localized dye, we did a large thoracotomy to perfuse 300 ml of cold PBS (40 ml/min
25 with a peristaltic pump) through the left cardiac ventricle.

After decapitation, the brain was rapidly removed and the olfactory bulbs and brain stem eliminated with the cerebellum.

After grinding the right hemisphere by vigorously shaking and centrifugation, the amount of fluorescent dextran (µg/g) in supernatants was measured by fluorimetry
30 (Tecan Infinite M200) at 620 nm upon excitation at 588 nm. The content of dye was valued by interpolation in standard curve.

Biochemical and histological analysis

The blood sample taken during the sacrifice was centrifuged and the plasma was
35 used to determine the levels of hepatic transaminases, total and conjugated

bilirubin and ammonia. Plasmatic cytokines (IL6, TNFa, IFNg) were determined by a multiplex commercial kit.

After the sacrifice, livers were extracted and weighted ; then we did a biopsy of the organ to determine the fibrosis status, confirm cirrhosis by a Sirius red coloring after fixing in 10% formalin.

If the METAVIR score was not F4 for the BDL rats, these animals were excluded of the analysis.

Statistical analysis

All data were presented as mean +/- standard derivation and analyzed with Prism (Graphpad, v5.0c). Differences between groups were compared by using a one-way analysis of variance (ANOVA). When the ANOVA identified significant between-group differences, Dunnett's test was used for intergroup comparisons.

The difference was considered to be statistically significant if p was inferior to 0,05.

Example 4 - Results

- BDL and CCl₄ rat models both have cirrhosis. Extensive fibrosis and a destroyed architecture of the liver parenchyma can be observed, classified F4 with the METAVIR score. Consistently, the plasma hepatic markers are changed in the two models and differences between the two models reflects the origine of the liver disease. In BDL, the preponderant alteration is hyperbilirubinemia, whereas in CCl₄ it is transaminase (ASAT and ALAT) elevation (Figure 1 and 4). Both BDL and CCl₄ rat models develop hyperammonemia (Figure 3).

- The OpenField test shows that BDL rats develop neurological impairments: a significant shorter total distance travelled, a shorter duration of activity, a slower velocity, and less and shorter rearings, were observed, compared to Sham rats. These abnormalities were not found in CCl₄ rats. This suggests that BDL rats displayed HE in the OpenField test but not CCl₄ rats (Figures 2 and 5).

- Biotin treatment (300 mg/kg of food) was able to reduce hyperammonemia in BDL rats (Figure 6; ANOVA, p=0.01).

- When biotin is given at a high dose (300 mg/kg of food) to BDL rats, the neurological impairments observed in the OpenField test are reduced compared to BDL rats without biotin. Some of the analysed parameters (total distance travelled, mean speed and duration of activity) are almost normalized in BDL rats treated with biotin as compared to Sham rats. Biotin would therefore prevent HE

occurrence if given to BDL rats at a high dose (Figures 7 and 8 showing that a 50 mg/kg of food dose is not high enough to have an effect). The results are similar to those observed with rifaximin or sodium benzoate (not shown).

5 - BDL rats have a significant increase in the intra-cerebral quantity of dextran-TexasRed compared to Sham even when not fed with a NH₃-enriched water; this result was not confirmed in CCl₄ rats compared to those who received only mineral oil (Figure 9 and 10). This suggests that BDL rats would have an increased blood-brain barrier permeability to solutes.

10 - Treatment with biotin (300 mg/kg of food) was able to normalize intra-cerebral quantity of dextran compared to BDL rats treated with control diet (Figure 11), while the dose of 50 mg/kg of food did not reach normalization. This suggests that high-dose biotin is able prevent alterations of BBB permeability during HE in cirrhosis

15 - Our results show that both BDL and CCl₄ rats develop cirrhosis, and both develop hyperammonemia. However, BDL rats displayed HE and had an increased permeability of BBB to solutes, whereas CCl₄ rats did not. Differences observed between BDL and CCl₄ groups could be due to inflammatory cytokines (Figures 12 and 13). A higher rate of IFN γ and TNF α was observed in BDL rats with HE compared to all the other groups of rats (BDL without HE, Sham, CCl₄ and Oil). In 20 BDL rats treated with biotin, IFN γ levels in plasma were decreased. These results seem to confirm that hyperammonemia alone is not sufficient to develop HE during cirrhosis and that inflammation together with hyperammonemia would be required to trigger HE. Biotin would prevent HE both by reducing hyperammonemia and by reducing directly or indirectly inflammatory cytokine production.

25 To summarize, in BDL rats one can observe a small increase of transaminases (ALAT and ASAT), a large increase of bilirubin and a low decrease of albumin (Figure 1).

30 The CCl₄ model herein disclosed is different from the CCl₄ model disclosed in Nagamine et al or JPH01226814A which is a model of acute hyperammonemia with a single high dose shot. In the present model, small doses of CCl₄ are administered to the animals over a few days to more closely mimick a chronic disease. One can observe a very high increase of transaminases, a low increase of bilirubin and no modification of albumin (Figure 4).

35

WO 2018/020010

PCT/EP2017/069194

18

Both animals in the models have increased ammoniemia, but only BDL animals displayed HE, in view of the comportmental alterations, whereas such alterations were not oserved observed in CCl₄ animals.

5 One can further observe that BDL rats have increased BBB permeability, but not CCl₄ rats.

10 Biotin, provided at 30 mg/kg of animal /day (corresponding to a daily dosage of 300 mg in humans), but not biotin provided at 5 mg/kg of animal /day (corresponding to a daily dosage of 50 mg in humans) improves the animal's condition in terms of comportmental improvement and normalization of BBB permeability and would thus prevent development of HE.

15 From the date reported herein and the figures, it is postulated that biotin acts by decreasing ammonemia and modulating inflammatory profile.

Claims

1. Biotin for use thereof in the treatment or prevention of hepatic encephalopathy wherein the daily amount of biotin administered to the patient is at least 100 mg.
2. Biotin for use according to claim 1, wherein the hepatic encephalopathy is a type C hepatic encephalopathy.
3. Biotin for use according to claim 2, wherein the hepatic encephalopathy is a persistent type C hepatic encephalopathy.
4. Biotin for use according to claim 2, wherein the hepatic encephalopathy is an episodic type C hepatic encephalopathy.
5. Biotin for use according to claim 2, wherein the hepatic encephalopathy is a minimal type C hepatic encephalopathy.
6. Biotin for use thereof for the prevention of hepatic encephalopathy in a patient with cirrhosis, wherein the daily amount of biotin administered to the patient is at least 100 mg.
7. Biotin for use according to any one of claims 1 to 4, in which the daily amount of biotin administered to the patient is comprised between 100 and 700 mg.
8. Biotin for use according to any one of Claims 1 to 5, in which the daily amount of biotin administered to the patient is at least 300 mg.
9. Biotin for use according to any one of Claims 1 to 5, in which the daily amount of biotin administered to the patient is comprised between 100 mg and 300 mg.
10. Biotin for use according to any one of claims 1 to 7, characterized in that it is a form suitable for oral administration.

WO 2018/020010

PCT/EP2017/069194

20

11. Biotin for use according to any one of claims 1 to 8, characterized in that it is in the form of gel capsules, tablets (optionally film-coated), lozenges or pills.
12. Biotin for use according to any one of claims 1 to 9, characterized in that it is
5 in the form of a composition containing biotin and excipients, without any other active ingredient.
13. Biotin for use according to claim 10, characterized in that the excipients are
10 chosen from the group consisting of talc, microcrystalline cellulose, lactose and mannose.
14. Biotin for use according to any one of claims 1 to 7, characterized in that it is a form suitable for injectable administration.
- 15 15. Biotin for use according to any one of claims 1 to 12, characterized in that it is in the form of a slow release composition.
16. Biotin for use according to any one of claims 1 to 13, wherein said treatment
20 with biotin has a duration of at least 3 months.
17. Biotin for use according to any one of claims 1 to 14, wherein said treatment with biotin has a duration of at least 6 months.
18. Biotin for use according to any one of claims 1 to 15, wherein said treatment
25 with biotin has a duration of at least one year.
19. Composition of biotin and at least another drug against Hepatic encephalopathy for simultaneous, separate or sequential (spread out over time) use in the treatment of hepatic encephalopathy.
30
20. Composition according to claim 14, wherein said other drug is chosen in the group consisting of Lactulose, lactitol, neomycin, metronidazole, rifaximin, and a combination of L-ornithine and L-aspartate (LOLA).

WO 2018/020010

PCT/EP2017/069194

1 / 14

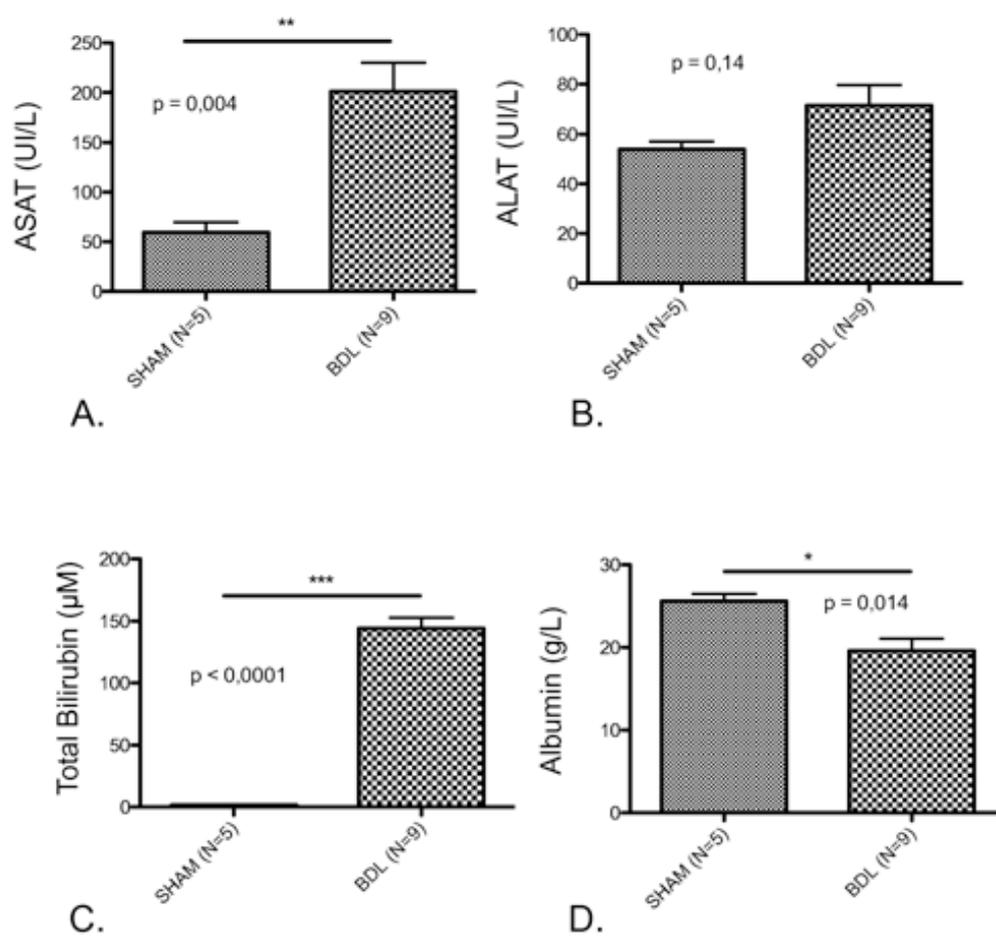


Figure 1

2 / 14

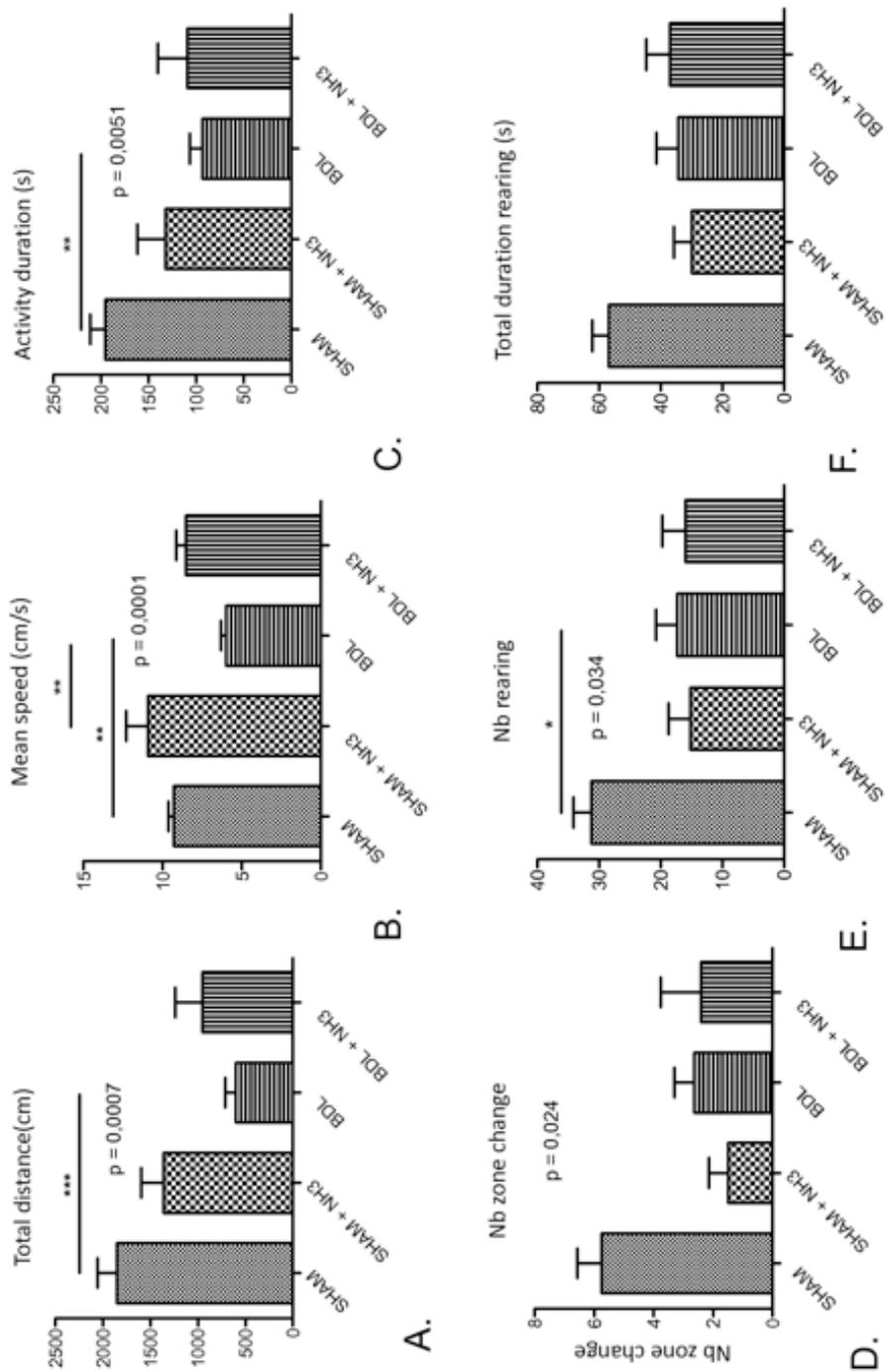


Figure 2

WO 2018/020010

PCT/EP2017/069194

3 / 14

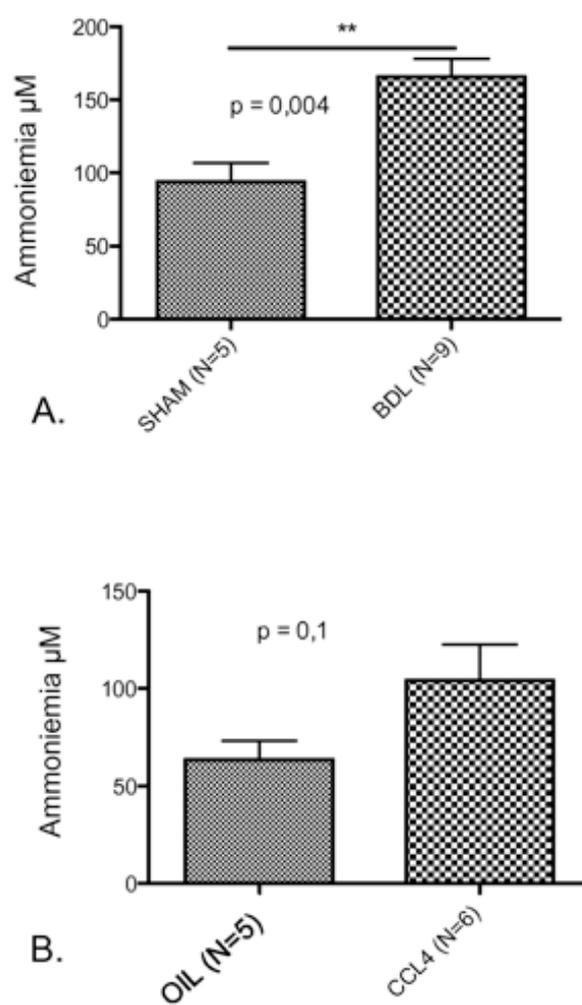


Figure 3

WO 2018/020010

PCT/EP2017/069194

4 / 14

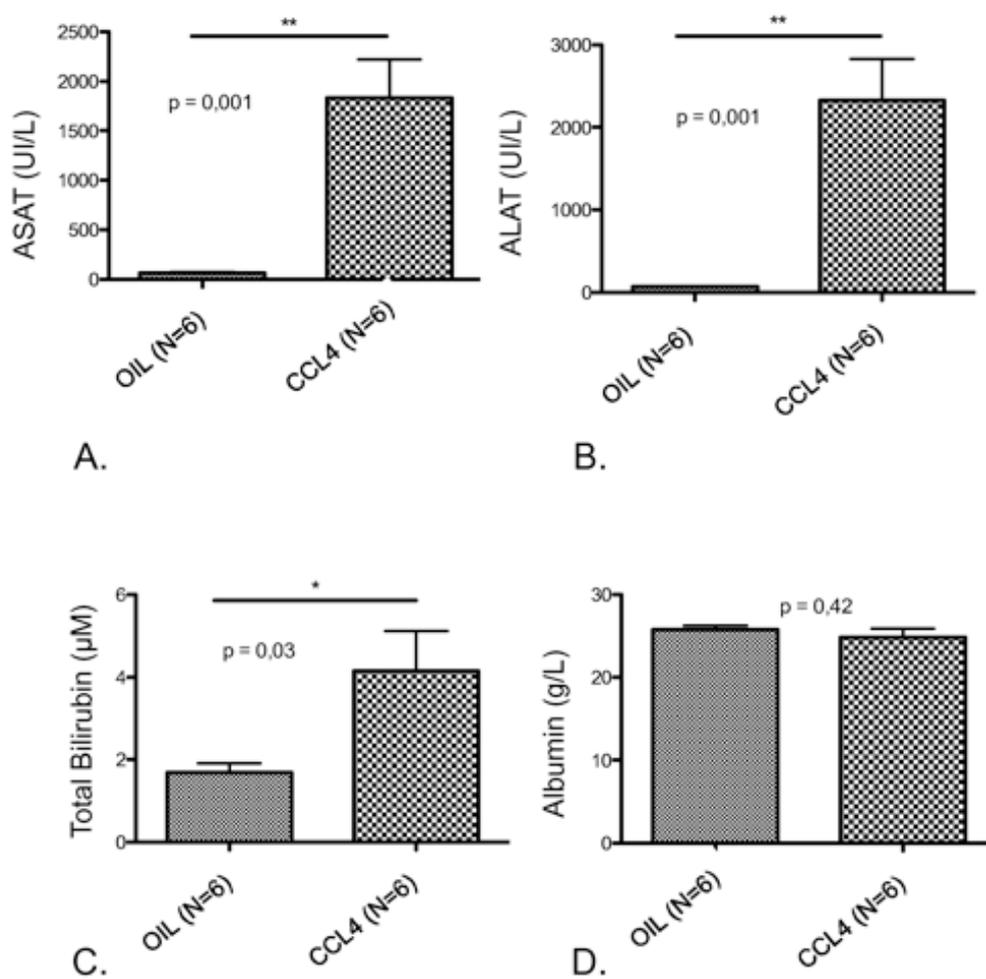


Figure 4

WO 2018/020010

PCT/EP2017/069194

5 / 14

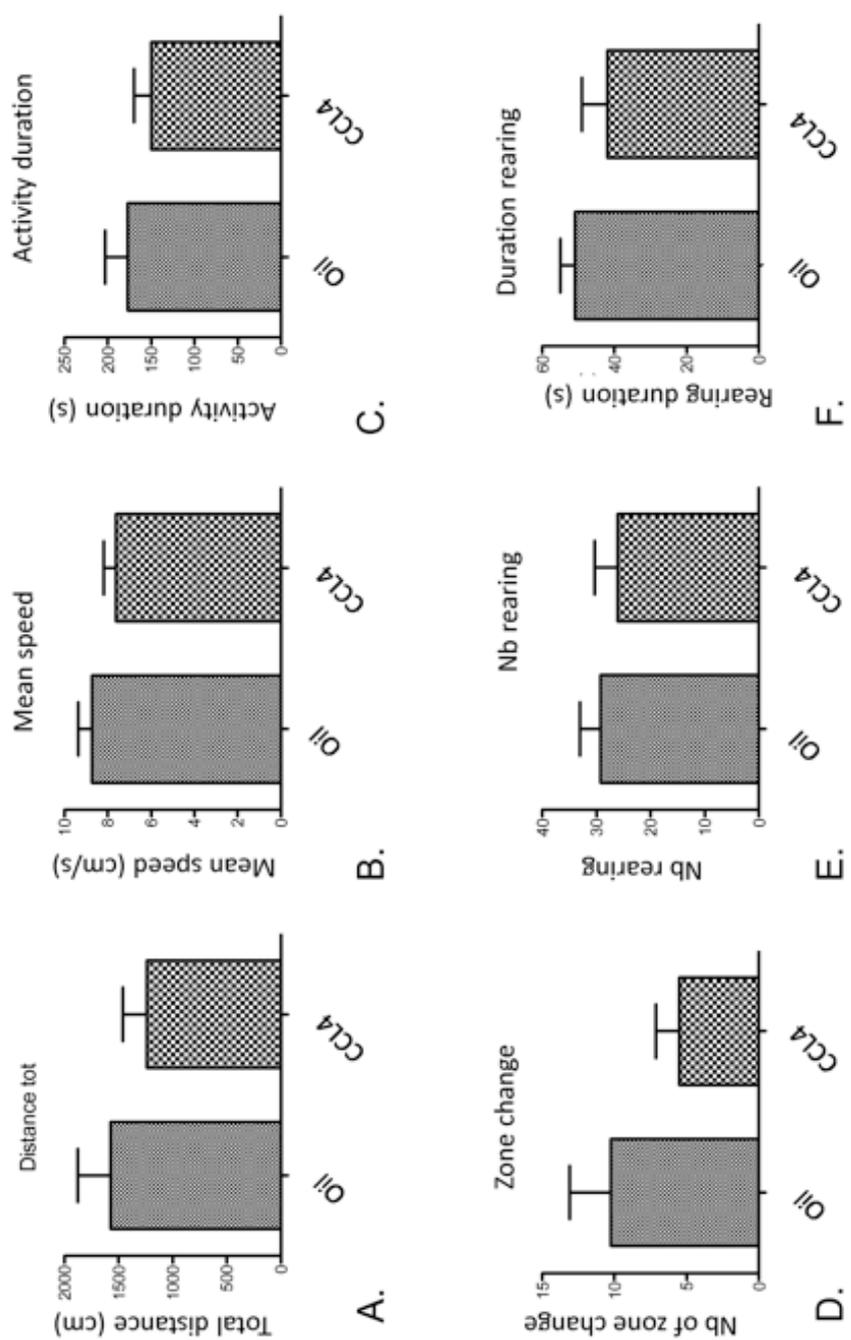


Figure 5

WO 2018/020010

PCT/EP2017/069194

6 / 14

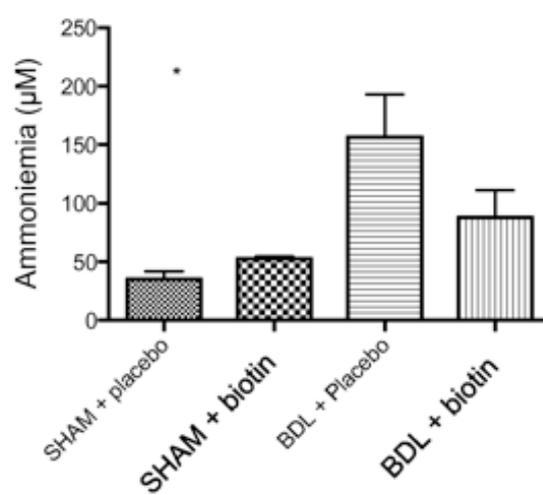


Figure 6

7 / 14

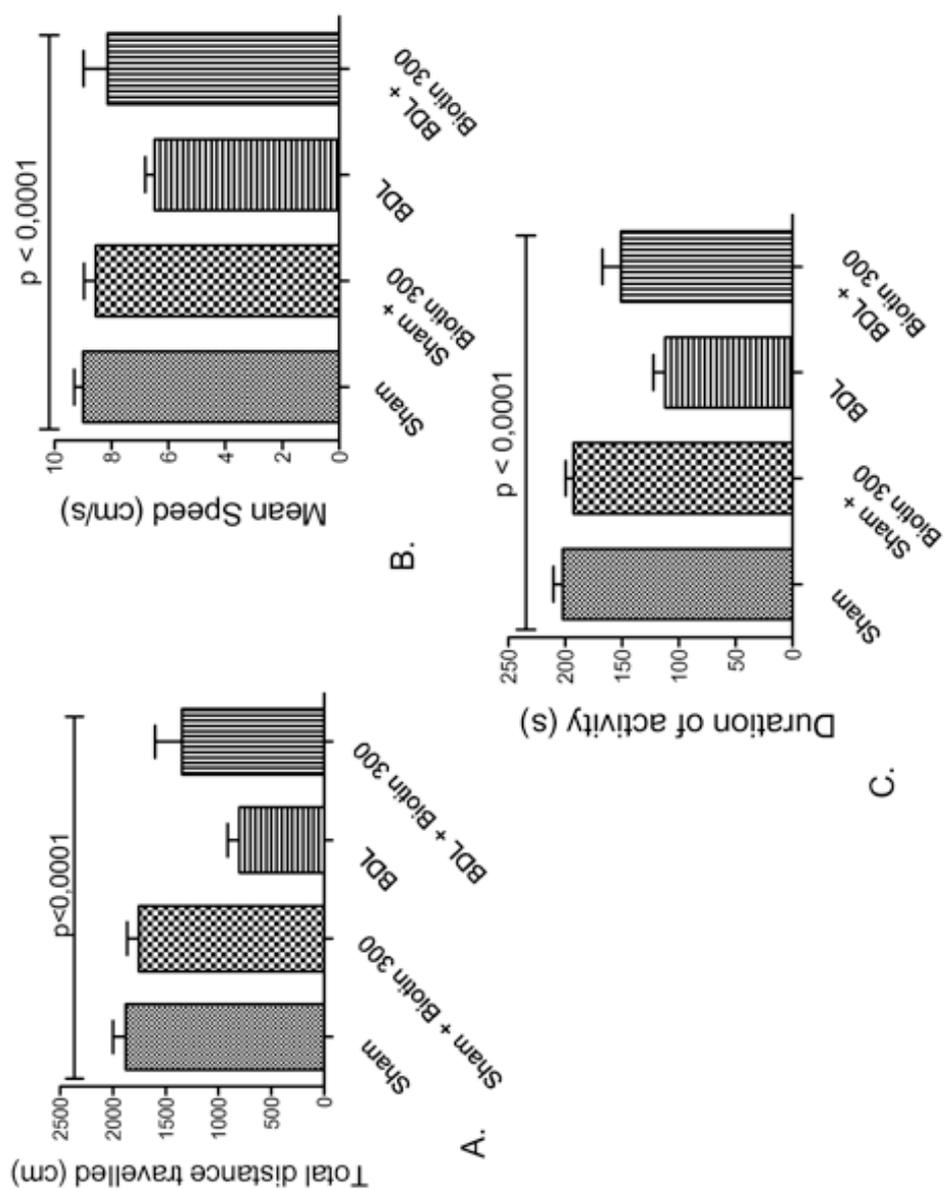


Figure 7

8 / 14

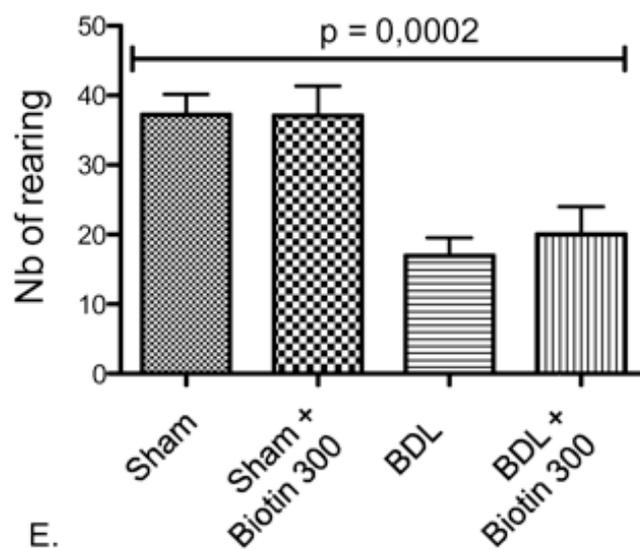
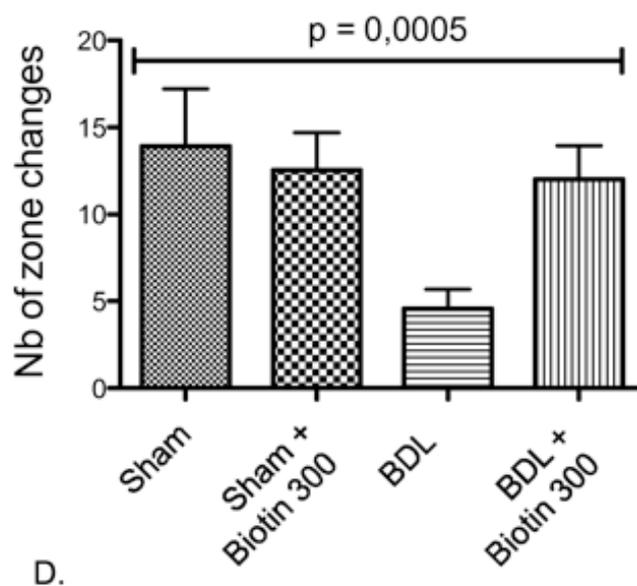
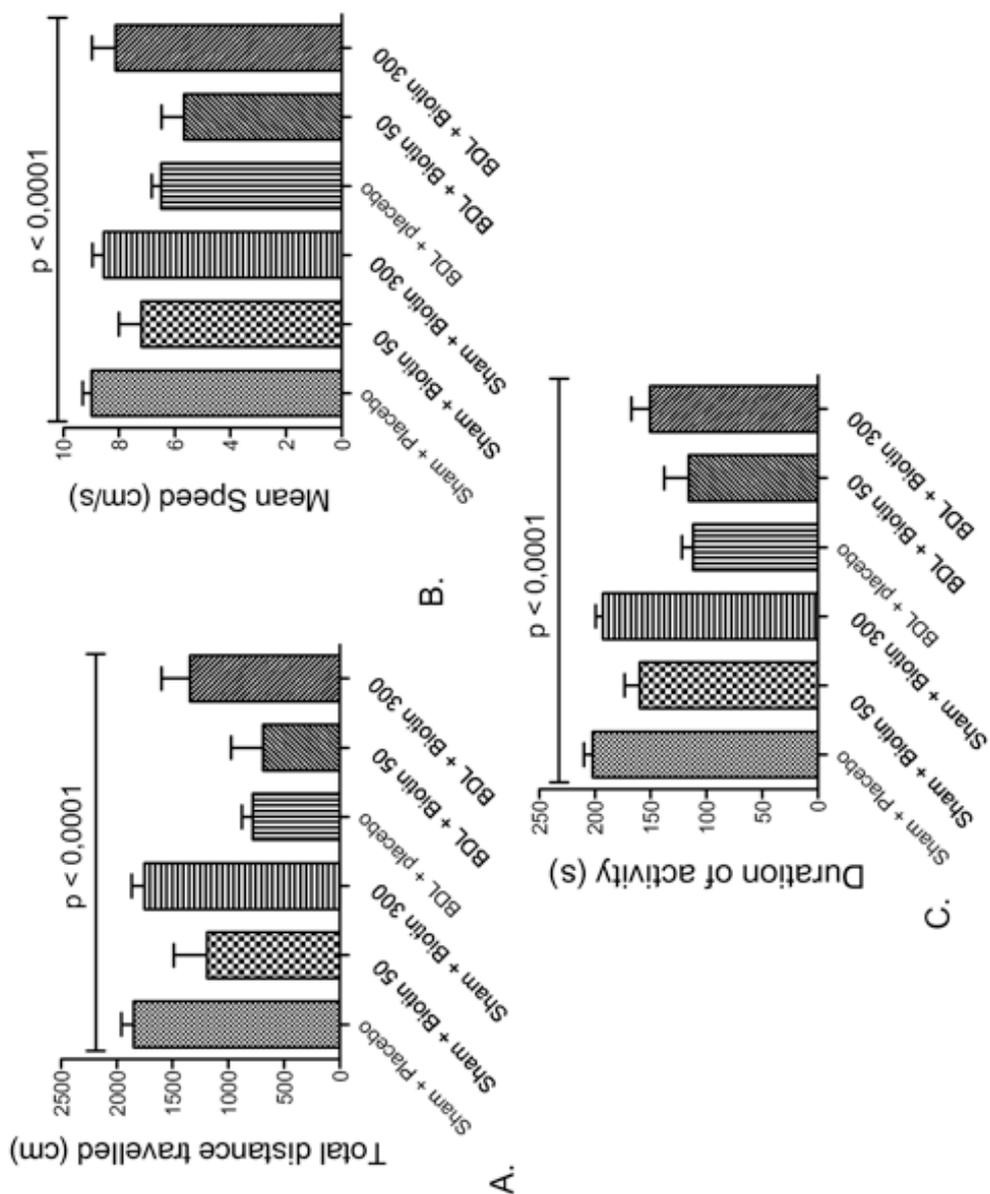


Figure 7 (continued)



10 / 14

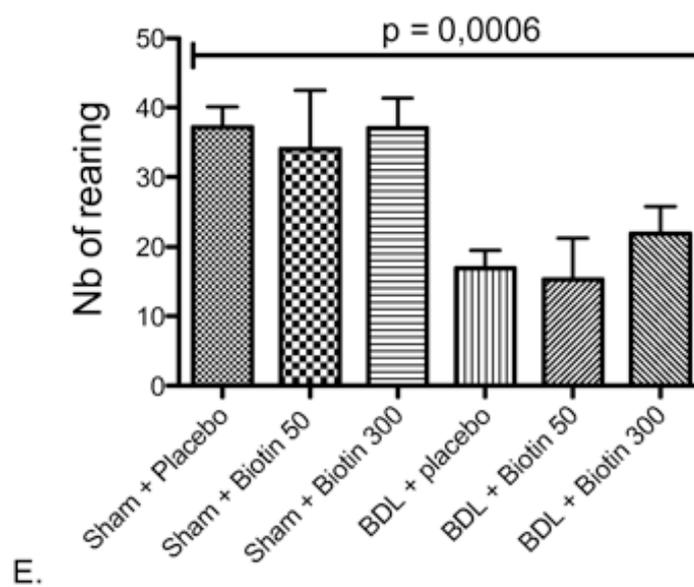
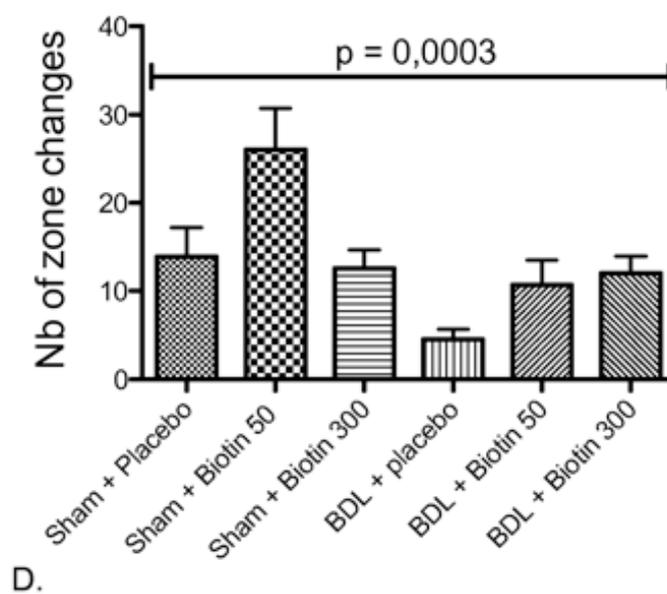
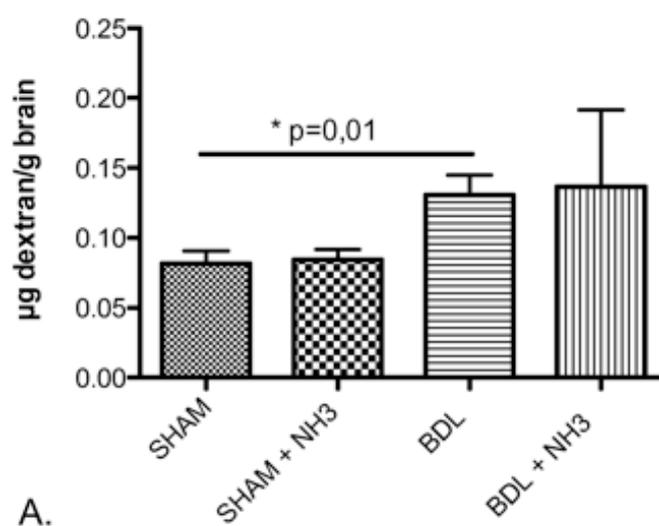
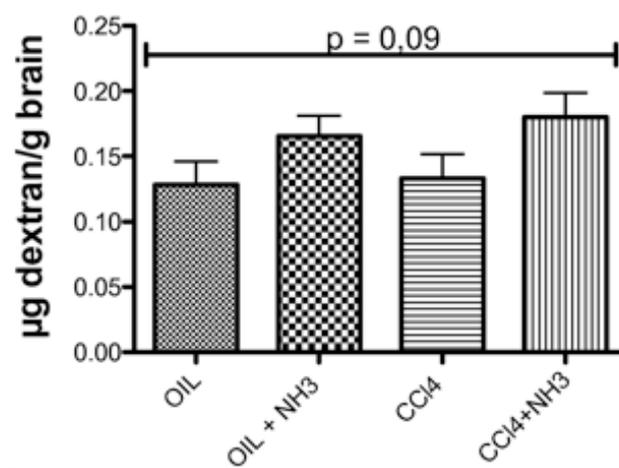


Figure 8 (continued)

11 / 14



A.



B.

Figure 9

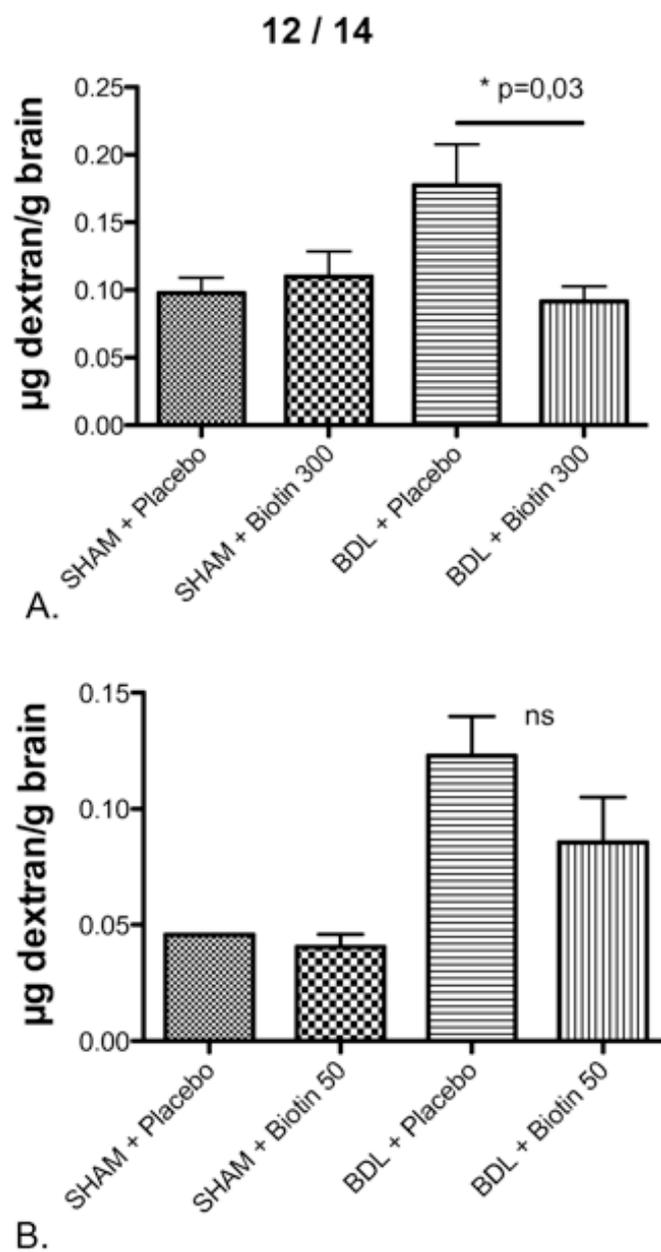
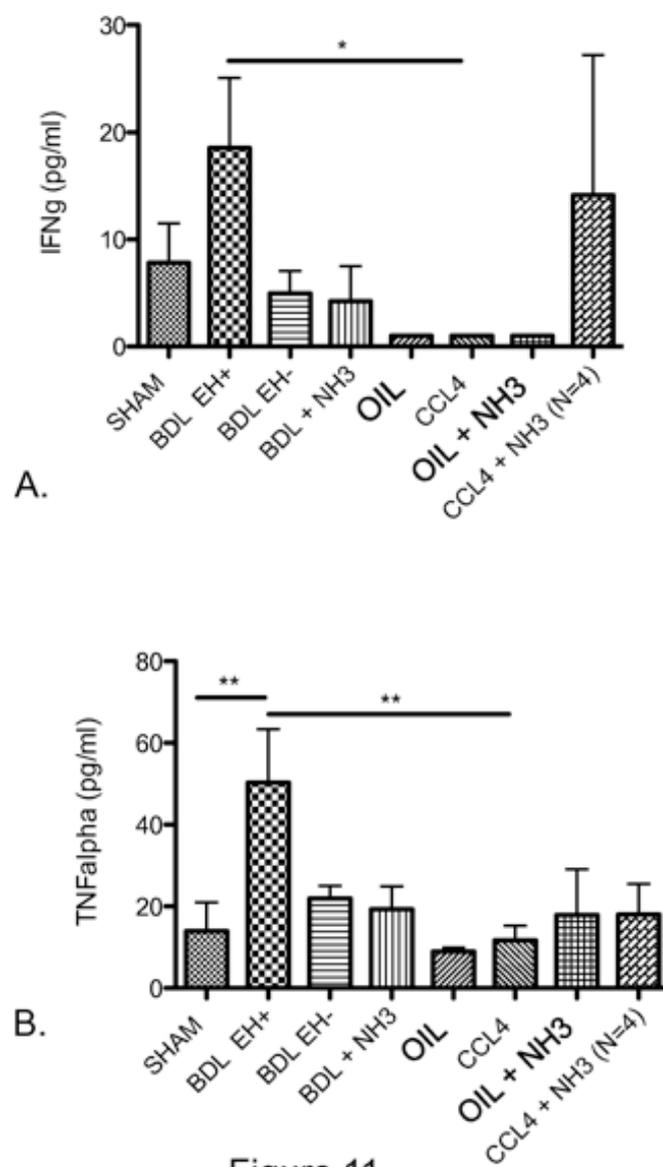


Figure 10

WO 2018/020010

PCT/EP2017/069194

13 / 14



WO 2018/020010

PCT/EP2017/069194

14 / 14

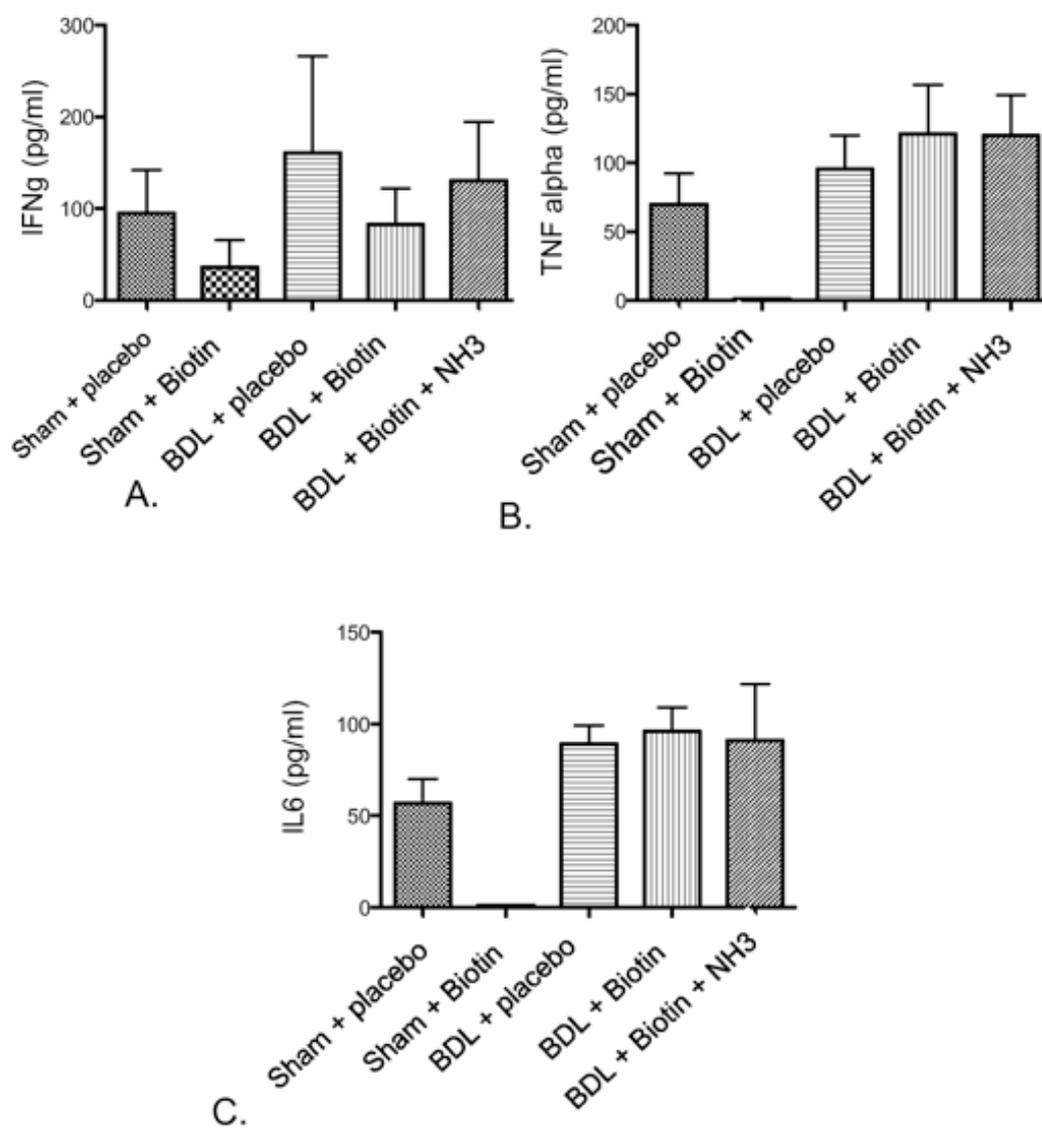


Figure 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/069194

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K31/4188 A61P25/00 A61P1/16 A61K45/06 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP H01 226814 A (SANSEI SEIYAKU KK) 11 September 1989 (1989-09-11) cited in the application abstract page 2 page 5 - page 6	1-20
A	----- DE 202 02 562 U1 (ORTHOMOL PHARMAZEUTISCHE VERTR [DE]) 23 May 2002 (2002-05-23) page 10 page 12	1-20
A	----- US 2004/219188 A1 (COMER GAIL M [US] ET AL) 4 November 2004 (2004-11-04) tables 8, 9 paragraph [0078] -----	1-20
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 September 2017		Date of mailing of the international search report 27/09/2017
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Uryga-Polowy, V

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/069194

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP H01226814 A	11-09-1989	JP H0788304 B2 JP H01226814 A	27-09-1995 11-09-1989
DE 20202562	U1 23-05-2002	NONE	
US 2004219188	A1 04-11-2004	NONE	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)