

Effets de la protéine C activée et des glucocorticoïdes dans le choc septique expérimental

Youcef Bouazza

▶ **To cite this version:**

Youcef Bouazza. Effets de la protéine C activée et des glucocorticoïdes dans le choc septique expérimental. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2011. Français. NNT : 2011NAN10098 . tel-01746246

HAL Id: tel-01746246
https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01746246

Submitted on 29 Mar 2018

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.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY1

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

Par **Youcef Bouazza**

Effets de la protéine C activée et des glucocorticoïdes dans le choc septique expérimental

Le 14 Novembre 2011

JURY

Rapporteurs :	
Pr Francis Schneider	PU-PH, CHU Strasbourg, France
Pr Xavier Monnet	PU-PH, CHU de Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France
Examinateurs :	
Pr Lecompte Thomas	PU-PH. CHU Genève, Suisse
Dr Arnaud Mansart	MCU-PH, Hôpital Raymond Poincaré, Garches, France
Président	
Pr Nevière Remi :	PU-PH, EA 4484, Faculté de Médecine, Lille. France
Directeur de thèse :	
Pr Levy Bruno	PU-PH, U961, Faculté de Médecine, Nancy, France

---

Groupe Choc-Contrat Avenir Inserm-U961. Faculté de Médecine de Nancy, 9 Avenue de la forêt de haye 54500 Vandoeuvre les Nancy

Remerciements

Un immense merci au Professeur Bruno Levy, mon directeur de thèse, pour m'avoir proposé de travailler sur cette thématique et de m'avoir accordé sa confiance pour mener à bien ce projet. Merci pour la qualité de son encadrement et la pertinence de ses remarques. Je le remercie également pour sa disponibilité quotidienne et pour son degré d'implication dans ces travaux. Merci enfin pour sa sympathie, sa simplicité et sa convivialité.

Mes remerciements s'adressent également :

Au Professeur Xavier monnet, CHU de Bicêtre, Service de Réanimation, Le Kremlin-Bicêtre pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être rapporteur.

Au Professeur Francis Schneider, Service de Réanimation Médicale, Hôpital de Starsbourg, de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être rapporteur de mon travail.

Au Professeur Remi Neviere, Faculté de Médecine de Lille pour m'avoir initié à la recherche et m'avoir transmis cette passion qui est la sienne. Merci de m'avoir fait l'honneur de faire partie du jury de thèse.

Au Professeur Thomas Lecompte, HDR, PU-PH. CHU Genève, Suisse pour avoir accepté de juger ce travail.

Au Docteur Arnaud Mansart, MCU-PH, Service de Réanimation, Hôpital Raymond Poincaré, AP-HP, Université de Versailles qui a accepté de faire partie du jury de cette thèse.

Au Professeur Sébastien Gibot pour toutes ces discussions passionnantes, enrichissantes, mais également pour son soutien.

Au Doteur Nacira Sennoun pour sa participation dans ce travail, et ses encouragements.

Au Docteur Patrick Lacolley, directeur de recherche INSERM U981, pour m'avoir permis d'accéder à ses installations

Au Docteur Hassoun, Faculté de Médecine de Lille pour son soutien et amitié.

Un grand merci à tous mes collègues et amis du Laboratoire Groupe Choc : Je tiens à remercier chaleureusement Chantal, Charlène, Amir. Je n'oublie pas tous les étudiants en année recherche pour leur gentillesse.

A Marc pour son amitié indéfectible et son soutien permanent.

.

A ma famille :

A ma compagne Maud pour son amour quotidien, son soutien, et sa grande patience à mon égard, merci pour la lecture critique du manuscrit.

A ma fille Manon.

A mes parents, pour leur soutien et leur amour inestimables, ici et là - haut. J'espère pouvoir être digne de votre fierté, dans mon travail et dans ma vie.

Publications

Comparative effects of Recombinant Human Activated Protein C and Dexamethasone in experimental septic shock. **Bouazza, Youcef**; Sennoun, Nacira; Charlène Strub, Véronique Regnault, Sebastien Gibot, Ferhat Meziani, Patrick Lacolley & Bruno Levy. Intensive Care Med. Intensive Care Med. 2011 Nov;37(11):1857-64.

Caspase-dependent protein phosphatase 2A activation contributes to endotoxin-induced cardiomyocyte contractile dysfunction. Neviere R, Hassoun SM, Decoster B, **Bouazza Y**, Montaigne D, Maréchal X, Marciniak C, Marchetti P, Lancel S. Crit Care Med. 2010 Oct;38(10):2075-6. Article non abordé dans la thèse.

Prevention of endotoxin-induced sarcoplasmic reticulum calcium leak improves mitochondrial and myocardial dysfunction. Hassoun SM, Marechal X, Montaigne D, **Bouazza Y,** Decoster B, Lancel S, Neviere R. Crit Care Med. 2008 Sep;36(9):2695-6. Article non abordé dans la thèse.

Congrès

- **Y. Bouazza,** N. Sennoun, J. Lemarié, C. Montemont, S. Gibot, B. Levy. La Protéine C activée et glucocorticoïdes : effet synergique dans le traitement du choc septique expérimental. Société de Réanimation de Langue Française. Paris 2011.

- Jérémie Lemarié, **Youcef Bouazza**, Alice Blet, Bruno Levy. Corticosteroids and Activated Protein C improve sepsis-induced cardiac dysfunction during septic shock. Printemps de la cardiologie recherché Clinique et fondamentale. Lyon 2011.

- A. Boufenzer, N. Sennoun, **Y. Bouazza**, M. Derive, P.E. Bollaert, B. Levy, S. Gibot. Rôle de TREM-1 dans la dysfonction endothéliale au cours du sepsis expérimental. Société de Réanimation de Langue Française. Paris 2011.

- M. Derive, **Y. Bouazza**, F. Massin, C. Alauzet, B. Levy, P.E. Bollaert, S. Gibot. TLT-1 est un inhibiteur naturel de TREM-1 et favorise la survie au cours du sepsis expérimental. Société de Réanimation de Langue Française. Paris 2011.

• Jérémie Lemarié, **Youcef Bouazza,** Alice Blet, Bruno Levy. Les corticoïdes et la protéine C activée améliorent la performance myocardique au cours du choc septique. Société de Réanimation de Langue Française. Paris 2011.

• Marc Derive, **Youcef Bouazza,** Frédéric Massin, Corentine Alauzet, Bruno Levy, Pierre-Edouard Bollaerts, Sébastien GibotI. Soluble TLT-1 is a naturally occuring TREM-1 inhibitor and protects mice from hyperresponsiveness and death during sepsis.international sepsis forum. SEPSIS 2010. Paris.

• A Kimmoun; N Sennoun; C Montemont; **Y Bouazza;** N Ducrocq; S Gibot; B Levy. Impact cardiovasculaire de la correction de l'acidose lactique secondaire à un état de choc par bicarbonate de sodium après adaptation de la calcémie et de la PaCO2. Société de Réanimation de Langue Française. Paris 2010.

• M. Derive, **Y. Bouazza,** F. Massin, C. Montemont, B. Levy, P.E. Bollaert, S. Gibot. Rôle des Myeloid derived suppressor cells au cours du sepsis expérimental. Société de Réanimation de Langue Française. Paris 2010.

• **Y. Bouazza,** N Sennoun, C. Montemont, B. Levy. Protéine C activée et glucocorticoïdes sont synergiques dans le choc septique expérimental. 26e Congrès Annuel du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire. Nancy 2009.

• **Y. Bouazza,** N Sennoun, C. Montemont, S. Gibot, B. Levy. Protéine C activée et glucocorticoïdes sont synergiques dans le choc septique expérimental. Société de Réanimation de Langue Française. Paris 2009.

TABLE DES MATIERES

I. LISTE DES ABREVIATIONS 9

II. LISTE DES FIGURES 12

III. INTRODUCTION 14

IV. LE CHOC SEPTIQUE 16

V. CHOC SEPTIQUE ET DEFAILLANCE CARDIOVASCULAIRE 18

V.1 DYSFONCTION CARDIAQUE 18

ALTERATION DE LA MICROCIRCULATION 19

ANOMALIES STRUCTURELLES 20

PERTURBATION DE L'HOMEOSTASIE CALCIQUE CARDIAQUE 20

ALTERATIONS MITOCHONDRIALES 22

STRESS RADICALAIRE 24

⇒ Les espèces réactives de l'oxygène 24

⇒ Les espèces réactives de l'azote 25

CHANGEMENTS METABOLIQUES 27

ANOMALIE DE LA TRANSDUCTION DU SIGNAL B- ADRENERGIQUE 27

LES MEDIATEURS CIRCULANTS PRO-INFLAMMATOIRES DE LA DEPRESSION MYOCARDIQUE 29

V.2 DYSFONCTION VASCULAIRE 30

COAGULATION, INFLAMMATION ET SEPSIS 30

HYPOREACTIVITE VASCULAIRE 31

Monoxyde d'azote (NO) 31

Les cyclooxygénases 32

Altération de la relaxation endothélium dépendante au cours du sepsis 33

Désensibilisation des récepteurs adrénergiques 35

Les canaux potassiques ATP-dépendants (K^+_{ATP}) 35

VI. TRAITEMENTS UTILISES DANS LE CHOC SEPTIQUE 35

VI.1 L'ERADICATION DU FOYER INFECTIEUX (ANTIBIOTHERAPIE) **35**

VI.2 TRAITEMENT HEMODYNAMIQUE DE LA DEFAILLANCE CARDIOVASCULAIRE **36**

L'OPTIMISATION HEMODYNAMIQUE PRECOCE (EARLY GOAL DIRECTED THERAPY). 36

⇒ Expansion volémique 36

⇒ Agents vasopresseurs 37

Les catécholamines 37

Pharmacologie des principales catécholamines 37

Les récepteurs adrénergiques 38

Effets cardiovasculaires des catécholamines 39

Effets hémodynamiques des catécholamines dans le choc septique 42

VI.3 TRAITEMENT PAR LA PROTEINE C ACTIVEE **43**

SYSTEME DE LA PROTEINE C 43

EFFET ANTICOAGULANT 43

ACTIVITE PROFIBRINOLYTIQUE 44

EFFET CYTOPROTECTEUR 45

EFFET ANTI-INFLAMMATOIRE 45

EFFET ANTI APOPTOTIQUE 47

VI.4 LES CORTICOÏDES **47**

PRINCIPAUX EFFETS PHYSIOLOGIQUES DES GLUCOCORTICOÏDES 50

⇒ Effets immunologiques et anti-inflammatoires 50

⇒ Effet hémodynamique des corticoïdes : 51

PRINCIPAUX MECANISMES D'ACTION DES GLUCOCORTICOÏDES 53

⇒ Action génomique 53

⇒ Action non génomique 55

CHOC SEPTIQUE ET INSUFFISANCE SURRENALIENNE AIGUË 56

⇒ Défaillance de l'axe corticotrope 57

⇒ Résistance tissulaire aux corticoïdes 57

CORTICOÏDES ET CHOC SEPTIQUE 57

VII. MATERIELS ET METHODES **60**

VII.1 MODELE ANIMAL **60**

VII.2 METHODOLOGIE **60**

PROTOCOLE 61

ETUDE DE SURVIE 63
VII.3 CHOIX ET DOSE DU GLUCOCORTICOÏDE 63
VII.4 DOSE DE PCA ADMINISTREE 64
VII.5 MESURE *IN-VIVO* 64
MESURES HEMODYNAMIQUES 64
⇒ Mesure de pression 64
⇒ Mesure du débit cardiaque 64
MESURE DES PARAMETRES PHYSIOPATHOLOGIQUES 65
⇒ Mesure du taux de lactates 65
⇒ Mesure du taux de nitrites et nitrates 65
⇒ Mesure du taux de cytokines 66
VII.6 WESTERN BLOT 66
VII.7 MESURE *EX-VIVO* 67
VII.8 METHODOLOGIE STATISTIQUE : 68

VIII. RESULTATS 70

VIII.1 OBJECTIFS DU TRAVAIL 70
VIII.2 RESULTATS 71
MESURES HEMODYNAMIQUES 71
MARQUEURS BIOLOGIQUES 73
REACTIVITE VASCULAIRE 75
EXPRESSION PROTEIQUE 77
LA SURVIE 79

IX. DISCUSSION 82

X. CONCLUSION ET PERSPECTIVES 86

XI. BIBLIOGRAPHIE 87

XII. ANNEXES 101

I. LISTE DES ABREVIATIONS

AC: Adénylate Cyclase

ACCP: American College of Chest Physicians

ACTH: Adreno-CorticoTrophine Hormone

ADP: Acide DésoxyRibonucléotide

AIS: Anti-Inflammatoire Stéroïdiens

AMPc: Adénosine Mono-Phosphate cyclique

ATP: Adénosine Tri-Phosphate

AVP : vasoprissine

CIVD: Coagulation IntraVasculaire Disseminée

CLP: Ligature Perforation Caecale

COMT : catéchol-O-méthyl transférase.

COX: Cyclo-Oxygénase

CRF: Corticotropin Releasing Factor

CRH: Corticotropin Releasing Hormone

CuZn-SOD: Cuivre Zinc SuperOxyde Dismutase

eNOS: endothélial NOS

EPCR : Endothelial Protein C Receptor

ESPVR: End systolic pressure volume relationship

FIO_2 : Fraction Inspirée en O_2

FT : Facteur Tissulaire

GMPc: Guanosine Mono-Phosphate cyclique

GPx: Gluthation Peroxydase

GRE: Glucocorticoids-Responsive-Elements

GTP: Guanosine Tri-Phosphate

HSP: Heat Shock Protein

ICAM : Inter-Cellular Adherence Molecule

IFN-γ: Interféron gamma

Il: Interleukine

iNOS: inductible NOS

IP: Immunophiline

IκB: Inhibitor of NFκB

k-ATP : Canal Potassique sensible à l'ATP

L-NAME: NG-Nitroarginine methyl ester

LPS : Lipopolysaccharide

MAO : Mono amine oxydase

MDF: Facteur de Dépression Myocardique

MIF: Macrophage migration inhibitory factor

mmHg : millimètre de mercure

mNOS: mitochondrial NOS

Mn-SOD: Manganèse SuperOxyde Dismutase

NAD: Nicotinamide Adenine Dinucléotide

NCX: Sodium Calcium Exchanger

NFκB: Nuclear Factor kappa B

nGRE: negative Glucocorticoids-Responsive-Elements

nNOS: neuronal NOS

NO : Monoxyde d'azote

NOO^- : Peroxynitrite

NOS : NO synthase

O^{-2} : Anion superoxyde

O_2 : oxygène

$PaCO_2$: Pression artérielle en CO_2

PAF: Platelet Activating Factor

PAI-1: Plasminogen Activator Inhibitor-1

PAM : Pression Artérielle Moyenne

PaO_2 : Pression artérielle en O_2

PAR: Protease Activated Receptors

PARP: Poly ADP Ribose Polymérase

PAS : Pression Artérielle Systolique

PCa : Protéine C activée

PDE : PhosphoDiEstérase

PG : Prostaglandines

PGE2 : Prostaglandines E2

PGF2 : Prostaglandines F2

PGI_2: Prostacycline

PKA : Protéine Kinase A

PLA2 : Phospholipase A2

PLB: Phospholamban

PROWESS : Recombinant human PROtein C Worldwide

PRSW: Preload recrutable stroke work

PTP : Pore de Transition de Perméabilité

PVC : Pression Veineuse Centrale

RG: Récepteurs aux Glucocorticoïdes

RNS: Reactive Nitrogen Species

ROS: Reactive Oxygen Species

RS: Réticulum Sarcoplasmique

SCCM: Society of Critical Care Medicine

$SERCA_2$: Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase

sGC : Guanylate Cyclate soluble

SIRS: Syndrome Inflammatoire de Réponse Systémique

SNos: S-Nitrosothiol

SSC: Surviving Sepsis Campaign

TAFI: Thrombin Activable Fibrinolysis Inhibitor

TFPI: Tissue Factor Pathway Inhibitor

TM: Thrombomoduline

TNF-α: Tumor Necrosis Factor alpha

t-PA: Tissue Plasminogen Activator

TXA: Thromboxane

UP: Uniport

u-PA: urokinase Plasminogen Activator

VCAM: Vascular Cell Adherence Molecule

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VIP: peptide intestinal vasoactif

β-AR: Récepteurs β-adrénergiques

II. LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Evénements impliqués dans la dysfonction cardiaque d'origine septique.

Figure 2: Calcium-Induced Calcium Release (CICR), couplage excitation-contraction.

Figure 3 : Structure et rôle de la mitochondrie.

Figure 4 : Origine mitochondriale des espèces réactives de l'oxygène.

Figure 5 : Atteinte du signal β adrénergique au cours du sepsis.

Figure 6 : Biosynthèse des prostaglandines et des thromboxanes.

Figure 7 : Biosynthèse des catécholamines endogènes.

Figure 8 : Système protéine C-protéine C activée.

Figure 9 : Régulation de la synthèse de cortisol.

Figure 10 : Structure chimique des glucocorticoïdes.

Figure 11 : Schéma illustrant les propriétés des corticoïdes.

Figure 12 : Structure du récepteur aux corticoïdes.

Figure 13 : Action génomique des corticoïdes.

INTRODUCTION

III. INTRODUCTION

Le choc septique représente la forme la plus grave de la réponse de l'organisme à une infection et reste grevé d'une mortalité élevée pouvant atteindre 50%. Au total, 700 000 patients en Europe sont atteints de sepsis et finalement 200 000 patients vont décéder dans un tableau de défaillance multiviscérale [1].

La physiopathologie du choc septique se traduit par une diminution de la contractilité myocardique [2], une anomalie de la distribution du débit sanguin et une diminution du tonus vasomoteur. L'altération conjointe de la fonction cardiaque et circulatoire se traduit cliniquement par une hypotension persistante, malgré une expansion volémique optimale.

Le traitement du choc septique exige la mise en œuvre de conduites thérapeutiques et diagnostiques multiples et complexes, dans un délai limité. Les recommandations de bonne pratique clinique de la conférence internationale sur le sepsis [3], sont : une antibiothérapie à large spectre et une réanimation hémodynamique précoce par une expansion volémique et l'utilisation d'agents vasoactifs. A cette trithérapie essentielle peuvent être associés des traitements adjuvants, les glucocorticoïdes et la protéine C activée, dont l'étude fait l'objet de ce travail

Le choc septique peut s'accompagner d'une insuffisance surrénalienne, il a été démontré qu'une synergie d'action existe entre les corticoïdes et les amines vasoconstrictrices par une potentialisation des effets hémodynamiques de ces dernières. L'administration de corticoïdes est recommandée au cours du choc septique chez les sujets non répondeurs aux catécholamines.

La Protéine C activée (PCa) ou drotrécogine alpha (Xigris®) a donné des résultats positifs dans le traitement du sepsis sévère. L'étude PROWESS [4], a montré que l'administration de la Protéine C activée chez des patients septiques adultes est associée à une amélioration de la survie.

Le but de ce travail est d'améliorer la compréhension des mécanismes hémodynamiques et cellulaires impliqués dans la dysfonction cardiovasculaire d'origine septique afin d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Au moyen d'un modèle de choc septique cliniquement pertinent par ligature et perforation caecale (CLP), nous avons étudié les effets de la PCa et des glucocorticoïdes seuls ou en

association sur les mécanismes cellulaires responsables des anomalies cardiovasculaires observées au cours du choc septique.

Dans la première partie de ce travail, nous avons observés *in vivo* les modifications induites par l'administration de la PCa et des corticoïdes seuls ou en association sur les paramètres hémodynamiques (pression artérielle moyenne, débit cardiaque) d'une part, et sur les marqueurs biologiques de réponse au sepsis (lactates, nitrites, nitrates et cytokines) d'autre part.

Dans la seconde partie en *ex-vivo*, les aortes et artères mésentériques ont été prélevées dans le but d'étudier l'impact de la PCa et des glucocorticoïdes seuls ou combinés sur la réactivité vasculaire : contraction et relaxation vasculaire suivie par une exploration des différentes voies de signalisation impliquées dans la réactivité vasculaire.

Enfin ce travail est complété par une étude de survie afin d'évaluer l'intérêt de l'association de ces deux traitements.

IV. LE CHOC SEPTIQUE

Le terme sepsis ou septicémie provient du grec Σήψις, qui veut dire putréfaction, renvoyant à la notion d'infection générale grave de l'organisme par des germes pathogènes. Le choc septique est la forme la plus grave du sepsis, il est une des premières causes d'admission dans les services de réanimation avec une mortalité qui reste très élevée. Un patient est dit en état de choc septique lorsqu'il est victime d'une défaillance circulatoire aiguë, entraînant des désordres hémodynamiques, métaboliques, viscéraux, déclenchée par une dérégulation de la réponse de l'hôte à une infection. Ces bouleversements de l'homéostasie conduisent au décès dans un tableau de défaillance multi-viscérale.

La conférence de consensus internationale de 1992 [5] de l'American College of Chest Physicians (ACCP) et de la Society of Critical Care Medicine (SCCM), révisée en 2001 [6], a permis de distinguer différents états septiques selon leur gravité.

Les niveaux de gravité des états septiques se définissent comme suit :

- L'infection se définit comme une réponse inflammatoire à la présence de micro-organismes ou à leur passage à l'intérieur de tissus habituellement stériles.

- Le Syndrome inflammatoire de réponse systémique (SIRS) :

Ce syndrome est caractérisé par la présence d'au moins deux des signes suivants :

- une température corporelle > 38 ° C ou < 36 ° C.
- une fréquence cardiaque > 90 battements par minute
- une fréquence respiratoire > 20/min ou une hyperventilation se traduisant par une PaCO2 < 32 mm Hg.
- une leucocytose > 12.000/mm3 ou < 4.000/mm3 ou > 10 % de cellules immatures.

- Le Sepsis est un syndrome de réponse systémique à une inflammation dont l'étiologie infectieuse est prouvée ou fort probable.

- Le Sepsis sévère est un sepsis associant défaillance hémodynamique à celle d'un ou de plusieurs organes.

- Le Choc septique est la complication la plus grave et sévère du sepsis avec une hypotension réfractaire et une hypovolémie non corrigée par l'expansion volumique (remplissage vasculaire).

SIRS	**Deux ou plus des signes suivants :** Température > 38,3°C ou < 36,0°C ; Fréquence cardiaque > 90/min ; Fréquence respiratoire > 20/min ou $PaCO_2$ < 32 mmHg ou ventilation mécanique ; Compte leucocytaire > 12000/mm3 ou < 4000/mm3 ou > 10 % de cellules immatures.
Sepsis	***SIRS*** + **infection** « cliniquement ou microbiologiquement documentée »
Sepsis sévère	***Sepsis*** **+ au moins un signe d'hypoperfusion ou d'une dysfonction d'organe :** **Fonction circulatoire** : hypotension artérielle (PAS < 90 mmHg ou PAM < 60 mmHg) ; hyperlactatémie artérielle (lactate > 2 mmol/l) ; **Fonction respiratoire :** hypoxémie (PaO2/FIO2 < 300) ; **Fonctions supérieures :** présence d'encéphalopathie ou syndrome confusionnel (score Glasgow < 14) ; **Fonction rénale :** oligurie (débit urinaire < 0,5 ml/kg/h persistant malgré le remplissage) ; créatinine > 177 µmol/l (20 mg/l) ; **Coagulation :** thrombopénie < 100 000/mm3 ; **Fonction hépatique :** hyperbilirubinémie > 34 µmol/l ;
Choc septique	***Sepsis sévère*** + persistance, malgré un remplissage vasculaire adapté : **hypotension artérielle** (PAS < 90 mmHg, PAM < 60 mmHg), **signes d'hypoperfusion** (lactatémie > 4 mmol/l, oligurie, troubles de la conscience,…).

Tableau I : Critères diagnostiques de SIRS, sepsis et choc septique d'après Bone [5]

V. CHOC SEPTIQUE ET DÉFAILLANCE CARDIOVASCULAIRE

La difficulté d'appréhender le sepsis réside dans son aspect multifactoriel impliquant plusieurs fonctions : inflammatoire, cardiovasculaire / endothéliale, hémostatique, énergétique / mitochondriale... Le sepsis est associé à une dysfonction de l'endothélium vasculaire corrélée à un stress oxydatif, des phénomènes d'hypercoagulation, une hypoperfusion des tissus à l'origine de la défaillance multiviscérale.

La survenue d'une défaillance circulatoire au cours du sepsis est un facteur de mauvais pronostic : la mortalité qui atteint 20 à 30 % dans le sepsis, passe de 40 à 70 % en cas de choc septique. À la phase aiguë, c'est la défaillance la plus fréquemment retrouvée chez les patients en sepsis sévère [7]. La défaillance cardio-vasculaire d'origine septique est caractérisée par la survenue d'une hypovolémie secondaire à la dysfonction endothéliale entraînant une fuite liquidienne vers l'interstitium. Parallèlement, la chute des résistances vasculaires systémiques se traduit par une vasodilatation avec effondrement de la pression artérielle diastolique [8]. En réponse à cette baisse des résistances vasculaires systémiques, la fréquence cardiaque ainsi que le débit cardiaque s'élèvent pour maintenir la pression artérielle. Le choc septique s'accompagne également d'une diminution de la contractilité myocardique et du tonus vasoconstricteur. Ces anomalies entraînent une diminution de la réponse inotrope des fibres myocardiques aux agents β- adrénergiques et une diminution de la réponse vasoconstrictrice des fibres musculaires lisses aux agonistes α- adrénergiques.

V.1 Dysfonction cardiaque

Décrite pour la première fois par l'équipe de Parker en 1984 [9], la dysfonction cardiaque est diagnostiquée chez plus de la moitié des patients en état de choc septique. Cette dernière se caractérise par une fraction d'éjection ventriculaire réduite, une accélération de la fréquence et du débit cardiaque ainsi que par une dilatation bi-ventriculaire [10]. En effet, alors que le débit cardiaque est habituellement normal ou accru pendant le choc septique, la contractilité myocardique est réduite dans les ventricules gauche et droit [11].

La dysfonction cardiaque septique est bien décrite comme la conséquence d'une complication du sepsis sévère et du choc septique. Toutefois la dysfonction cardiaque est complexe et plusieurs mécanismes physiopathologiques impliqués (Figure1) dans la dysfonction myocardique ont été étudiés :

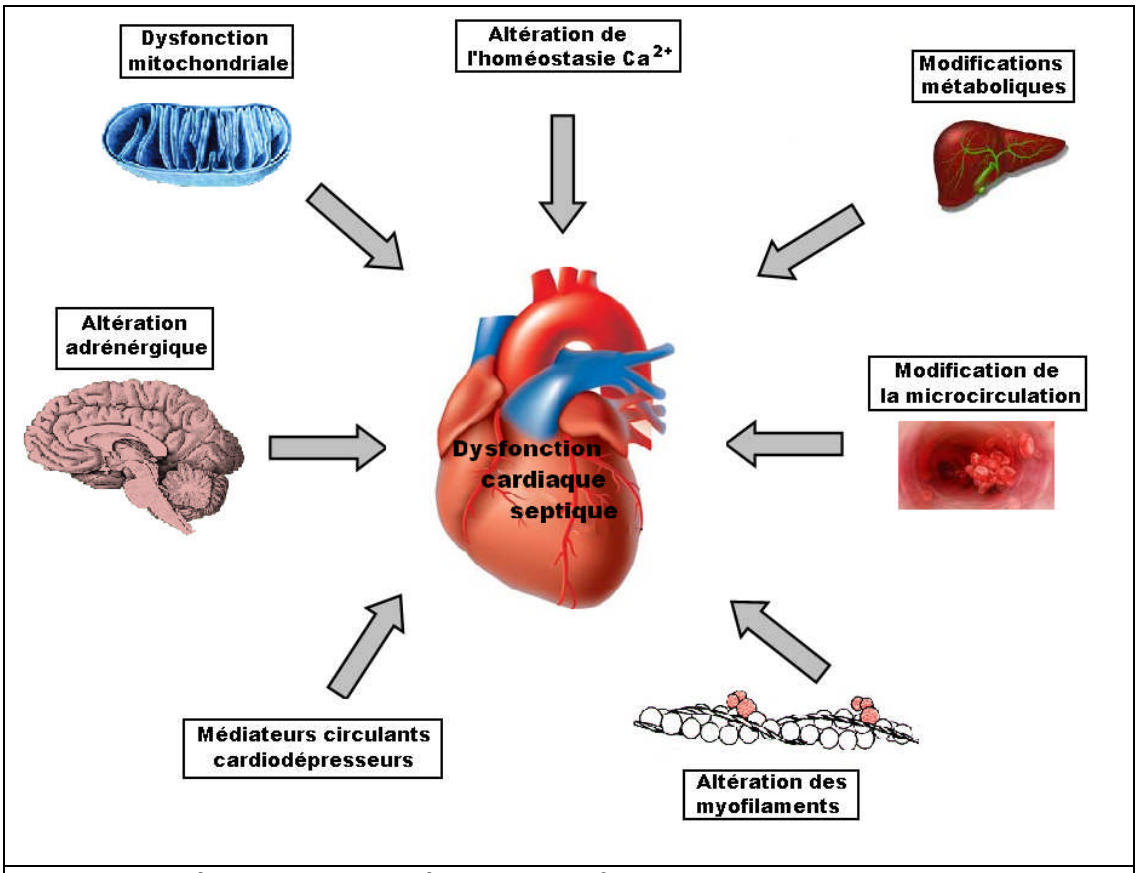


Figure 1 : Evénements impliqués dans la dysfonction cardiaque d'origine septique.

ALTÉRATION DE LA MICROCIRCULATION

La circulation coronarienne compte trois compartiments : épicardique, préartériolaire et capillaire. Le compartiment capillaire constitue l'essentiel du volume sanguin intra myocardique [12].

Actuellement il est établi que le sepsis et le choc septique entraînent une modification de la microcirculation myocardique. Dans un modèle canin d'endotoxémie, Groeneveld a démontré une altération de la distribution du flux sanguin coronarien [13]. Ces résultats pourraient être à l'origine d'un oedème endothélial [14]. Chez la souris septique, les cardiomyocytes activent la migration trans-endothéliale ainsi que les polynucléaires neutrophiles circulants dans l'espace interstitiel [15]. Ces derniers peuvent augmenter l'inflammation intracardiaque induite par le sepsis et contribuer ainsi à une augmentation de la fuite vasculaire avec oedème myocardique [16].

ANOMALIES STRUCTURELLES

Plusieurs travaux expérimentaux ont mis en évidence des anomalies structurelles lors de l'examen du cœur d'animaux septiques. Chez l'homme, Fernandes et al, [17] ont démontrés plusieurs anomalies structurelles dans une étude autopsique de 71 patients décédés de choc septique.

Dans de nombreux modèles expérimentaux de sepsis, les lésions histologiques cardiaques principalement retrouvées sont : nécrose subendocardique, oedème myocardique, oedème capillaire, altérations mitochondriales, infiltration leucocytaire, atteinte des cardiomyocytes, perte de myofibrilles [18-22] ainsi qu'une désorganisation des sarcomères des cardiomyocytes ventriculaires associée à un clivage des protéines contractiles par des protéases de type caspases [2].

Ces anomalies structurelles sont souvent présentes au cours du choc septique, cependant elles ne sont ni nécessaires à l'apparition de la dysfonction myocardique, ni spécifiques du sepsis, et aucune corrélation entre l'atteinte structurelle et l'intensité de l'atteinte fonctionnelle n'a été rapportée.

PERTURBATION DE L'HOMÉOSTASIE CALCIQUE CARDIAQUE

L'administration de lipopolysaccharide (LPS) ou endotoxine, constituant de la paroi bactérienne à Gram négatif, reproduit chez l'animal et chez l'homme sain, les manifestations cardiovasculaires du choc septique [8], [9]. L'utilisation de ces modèles a permis l'étude des mécanismes impliqués dans la dépression myocardique septique. Bien que leurs mécanismes d'action soient encore imparfaitement connus, il est suggéré que les médiateurs libérés au cours du choc septique sont responsables directement ou indirectement de perturbations du couplage entre l'activité électrique et mécanique du cœur. Le couplage excitation-contraction permet la contraction du cardiomyocyte en réponse à un potentiel d'action, rendue possible grâce à une fine régulation de l'homéostasie calcique, une production d'ATP (Adénosine Tri-Phosphate) soutenue, et des protéines capables de générer une force musculaire.

La contraction cardiaque est initiée par une entrée de calcium extracellulaire suite à une dépolarisation de la membrane sarcolemmique. La dépolarisation membranaire propagée le long du sarcolemme provoque l'ouverture des canaux calciques et notamment ceux des tubules T (canaux calciques voltage dépendant de type L) avec entrée de calcium dans la cellule. Les ions calcium se fixent sur les récepteurs à la ryanodine (RyR2 : isoforme du muscle cardiaque) entraînant leur ouverture et la libération massive du calcium contenue dans

le réticulum (Calcium induced Calcium release) [23]. L'augmentation du calcium intracellulaire initie la contraction après activation des myofilaments. La relaxation musculaire s'effectue par le rétablissement de la concentration du calcium à sa valeur initiale, principalement par un re-captage du calcium dans le réticulum par des pompes calcium-ATPase ou Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase (SERCA2) et dont l'inhibition est largement levée par la phosphorylation du phospholamban (PLB). En parallèle, le calcium est également expulsé vers le milieu extracellulaire grâce aux échangeurs NCX ($3Na^+/1Ca^{2+}$) et à des pompes Ca^{2+}-ATPase situées dans le sarcolemme. La mitochondrie a également la capacité de capturer du calcium intracytosolique essentiellement par l'uniport calcique (UP) qui utilise l'énergie du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi m$) afin d'amener les ions Ca^{2+} dans la matrice mitochondriale (Figure 2).

Au cours du choc septique, les principales perturbations du couplage excitation contraction qui ont été décrites associent une désensibilisation des myofilaments au calcium, une diminution de l'amplitude des variations du calcium cytosolique et une inhibition des pompes SERCA2 impliquées dans le re-captage du calcium dans le réticulum. Des travaux ont démontrés que la désensibilisation des myofilaments au calcium induite par le LPS bactérien pouvait être attribuée à l'activation de cystéine protéase ou caspases qui sont des enzymes effectrices de l'apoptose, dans les cellules contractiles myocardiques [24-26]. En effet, l'activation des caspases (essentiellement caspase-3) s'accompagne d'un clivage de nombreuses protéines de l'appareil contractile cardiaque comme l'α-actine, l'α-actinine, la chaîne légère de myosine et la troponine T [2], [27-29]. En plus de ces phénomènes de destruction du sarcomère, le rôle de l'activation des caspases dans la régulation des flux calciques doit être envisagé. En effet il a été démontré que les caspases actives peuvent directement induire des perturbations de l'homéostasie calcique dans les cellules neuronales [30], et de lymphocytes T [31] par le clivage des récepteurs et des pompes régulant les flux calciques intracellulaires. Des études plus récentes montrent que suite à une endotoxémie, le réticulum sarcoplasmique est responsable ou provoque une surcharge calcique mitochondriale, une dysfonction cardiaque [32] et que l'endotoxine réduit la capacité de recapture du calcium par le réticulum sarcoplasmique dans les cardiomyocytes et que l'inhibition des caspases protège de cette baisse et préserve la fonction mitochondriale [33].

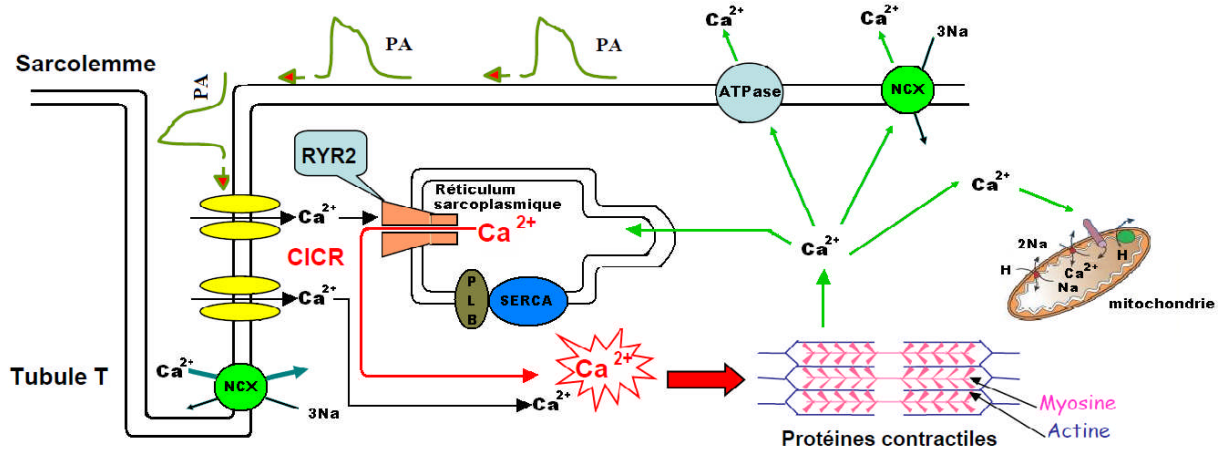


Figure 2: Calcium-induced calcium release (CICR), couplage excitation-contraction.

ALTÉRATIONS MITOCHONDRIALES

Les mitochondries sont des petits organites ou organelles intracellulaires d'environ 1 µm (micromètre) présents dans toutes les cellules des organismes eucaryotes, constituée de deux membranes bilipidiques (une externe et une interne), un espace intermembranaire et la matrice (Figure 3). Elles jouent un rôle essentiel dans le processus énergique cellulaire via la respiration cellulaire, puisque les mitochondries sont responsables de la production d'une grande partie de l'ATP.

Les mitochondries jouent un rôle primordial dans la vie et la mort cellulaire. Elles contribuent non seulement à la synthèse d'ATP, des hormones stéroïdes et de l'hème, au maintien de l'homéostasie calcique et la production d'espèces réactives de l'oxygène ainsi qu'à la thermogenèse, qui est une fonction mitochondriale essentielle du tissu graisseux brun.

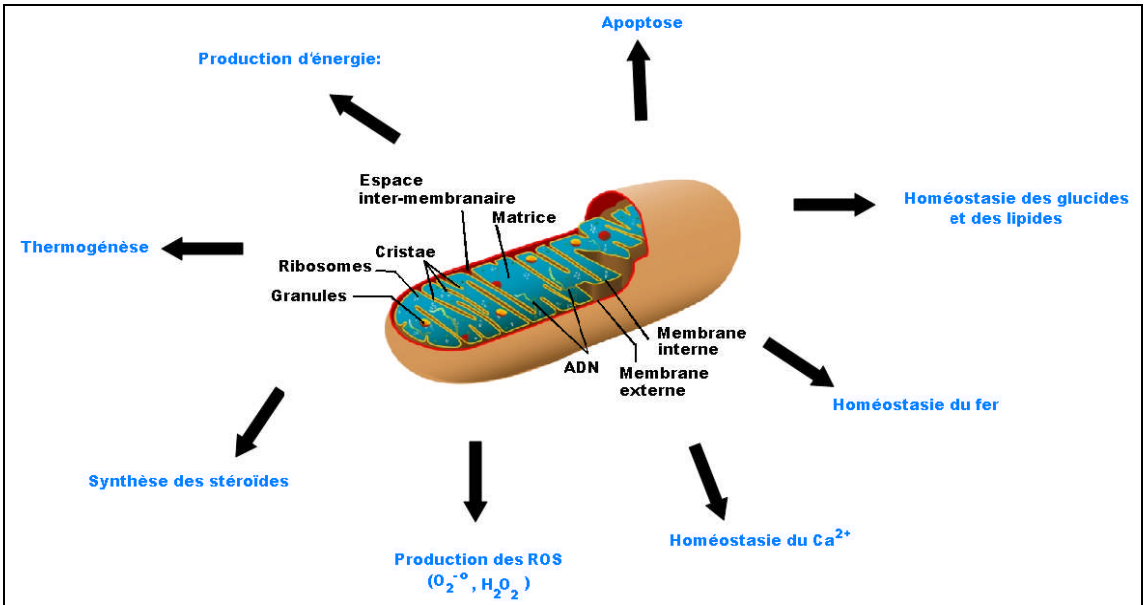


Figure 3 : Structure et rôle de la mitochondrie.

Hassoun et al [34] suggèrent une atteinte majeure du complexe PTP (Pore de transition de perméabilité) par les sphingosines dont les effets conduisent à un découplage de la respiration, une dissipation du ΔΨm (potentiel de membrane mitochondrial) et une réduction de la production d'ATP. L'ensemble de ces effets participe au développement d'une dysfonction mitochondriale qui pourrait contribuer aux anomalies mitochondriales et contractiles cardiaques chez les animaux septiques.

Une inhibition réversible du complexe IV (cytochrome c oxydase) par le NO (monoxyde d'azote) ou une inhibition irréversible des différents complexes de la chaîne de transfert électronique par les peroxynitrites ou encore une déplétion en nucléotides pyridiniques (NAD) consécutive à l'activation de la poly-ADP ribose polymérase (PARP) avaient été retenues comme des mécanismes potentiels de la dysfonction mitochondriale induite par le sepsis [35].

Des données récentes suggèrent que la sévérité de la dysfonction myocardique et peut-être même la gravité et le pronostic du sepsis [36] pourraient être liés à un dysfonctionnement mitochondrial. Au cours du sepsis, les mitochondries [37], [38] cardiaques montrent des dommages ultra structuraux chez les rongeurs [39], [40] et les patients [41]. Une autophagie est décrite chez les rats péritonites (CLP) associée à une déplétion mitochondriale [40]. Fait intéressant, l'ADN (Adénosine Désoxyribonucléotide) mitochondrial est plus susceptible aux dommages induits par l'endotoxine que de l'ADN nucléaire [42], [43].

STRESS RADICALAIRE

Les espèces réactives de l'oxygène ROS « *reactive oxygen species* » et les espèces réactives de l'azote RNS « *reactive nitrogen species* » sont à l'origine du stress radicalaire et toutes les deux impliquées dans le choc septique et dans la dysfonction cardiaque.

⇒ *Les espèces réactives de l'oxygène*

Les ROS comportent deux sous familles : les radicaux libres (exemple : anion superoxyde $O_2°^-$) et les espèces non radicalaires (exemples : peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et peroxynitrite $ONOO^-$). Les sites de production de ROS sont nombreux et varient suivant le type cellulaire. Au niveau cardiaque, les ROS sont produits par la mitochondrie et par des systèmes enzymatiques (Figure 4). En effet, la chaîne respiratoire mitochondriale peut être responsable d'une partie de la production des ROS [44]. Entre 1 et 3% de l'oxygène consommé par la mitochondrie génère des radicaux libres. La production de ces ROS a lieu au niveau des complexes I et III ainsi qu'au niveau de l'ubiquinone. Des systèmes enzymatiques endogènes sont prévus pour lutter contre cette production physiologique. L'$O_2°^-$ est converti en H_2O_2 par la manganèse superoxyde dismutase (Mn-SOD) du côté matriciel et par la Cuivre-Zinc superoxyde dismutase (CuZn-SOD) dans l'espace intermembranaire. Ce peroxyde d'hydrogène est ensuite neutralisé soit par la glutathion peroxydase (GPx), soit par la catalase. Récemment, il a été montré que parmi d'autres cytokines pro-inflammatoires, le TNF-α (Tumor necrosis factor) conduisait a une augmentation d'$O_2°^-$ *via* la stimulation de systèmes enzymatiques tels que la NADH oxydase ou la xanthine oxydase [45], et ce au niveau cardiaque.

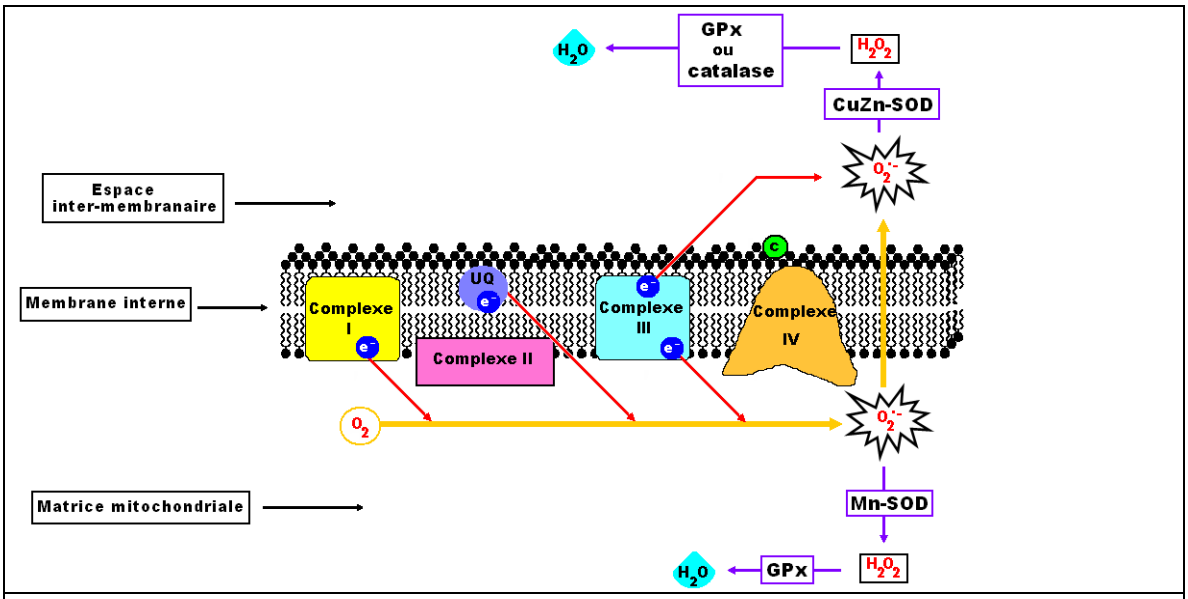


Figure 4 : Origine mitochondriale des espèces réactives de l'oxygène.

GPx, glutathion peroxydase ; Mn-SOD, manganèse superoxyde dismutase ; CuZn-SOD, Cuivre-Zinc superoxyde dismutase ; UQ, ubiquinone ; c, cytochrome c ; e^-, électron.

⇒ ***Les espèces réactives de l'azote***

Les RNS incluent le NO et les S-nitrosothiols (SNOs). Ces derniers se composent d'acides aminés, de peptides ou de protéines modifiées au niveau de leurs résidus cystéine par le NO. Le NO est produit par des enzymes spécialisées : les NO synthases (NOS). Ces enzymes convertissent la L-arginine en L-citrulline et NO. Dans le système cardiovasculaire, deux isoformes jouent un rôle important : la eNOS (NOS endothéliale ou constitutive ou NOS3) et la iNOS (NOS inductible calcium dépendante ou NOS2). L'expression de cette dernière est sous le contrôle de NFκB (nuclear factor κappa B). L'hémoglobine est une autre source potentielle de NO. Enfin, la xanthine oxydase des cardiomyocytes est une enzyme capable de transformer les nitrates/nitrites en NO. L'ensemble du NO produit peut réagir avec des molécules soufrées et former des SNOs.

L'oxyde nitrique est une molécule gazeuse extrêmement réactive, produite par l'enzyme oxyde nitrique synthétase (NOS). Il en existe trois isoformes chez l'homme (endothéliale, neuronale et inductible). En fonction du système cellulaire où l'oxyde nitrique est généré par NOS, la signalisation du NO peut suivre différentes voies. L'oxyde nitrique diffuse ensuite très rapidement à travers les membranes cellulaires des cellules de muscle lisse voisines pour venir se lier à la protéine hétérodimérique sGC (Guanylate Cyclase soluble) et activer la

production du second messager 3',5'-guanosine monophosphate cyclique (cGMP) à partir du guanosine triphosphate (GTP). A son tour, cGMP va se lier spécifiquement à une protéine kinase (PKG) qui va activer par phosphorylation une cascade de voies cellulaires et entraîner ainsi la réponse biologique. Le NO est un important médiateur intra- et intercellulaire responsable, entre autre, de la vasodilatation endothélium-dépendante. Le cGMP est ensuite dégradé en GMP par des phosphodiéstérases (PDE). Le NO est une molécule peu réactive aux doses physiologiques (1-100 nM). Il exerce un rôle inotrope positif *via* une augmentation de la concentration d'AMPc (adénosine mono-phosphate cyclique) et du Ca^{2+} intramyocytaire [46]. Dans le cœur normal, le NO est produit par la NO synthase (NOS) endothéliale « *constitutive* » (eNOS) des vaisseaux coronaires et de l'endocarde.

Le NO est capable, *in vitro* et à concentration élevée, d'induire une diminution de la force de concentration myocardique [47] . En revanche, à faible concentration (< 1μM/L), le NO pourrait exercer un effet inotrope positif, lié au moins en partie à une augmentation d'AMPc et du calcium intracellulaire [46]. *In vivo,* chez le sujet sain, les effets cardiaques du NO endogène ou de donneurs de NO exogènes sont essentiellement des modifications de la fonction diastolique avec relaxation plus précoce du ventricule gauche et augmentation de la distensibilité [47]. L'augmentation de la production de NO dans les vaisseaux d'animaux septiques est principalement due à l'expression d'une isoforme « *inductible* » de la NOS (iNOS) par les cellules musculaires lisses vasculaires qui peuvent produire de grandes quantités de NO.

L'équipe de Finkel [48] a rapporté l'effet inotrope négatif précoce du TNF-α, de l'Interleukine (IL) 2 et de l'IL-6 par l'intermédiaire du NO. En effet, l'ajout d'inhibiteurs des NO Synthases (NOS) prévient la dysfonction causée par ces médiateurs. Ces effets rapides s'expliqueraient par une augmentation de l'activité des NOS constitutives (eNOS). Ce mécanisme ne nécessite aucune transcription génique. Depuis, d'autres études ont pu confirmer l'importance du NO dans la dysfonction cardiaque induite par les cytokines [49], [50]. TNF-α, IL-1β, et IFN-γ (interféron gamma) sont capables d'induire l'expression de la NOS inductible (iNOS) [51]. En effet, le NO peut altérer la fonction cardiaque via l'activation de la NOS inductible (iNOS) par le TNF-α, dans le cardiomyocyte par l'intermédiaire des récepteurs TNFR-2 « TNF Receptor-2 ». Cette signalisation dépendante du TNFR-2 permet la translocation du NFκB vers le noyau pour activer la transcription de gènes cibles tels le gène codant pour le TNF-α ou encore celui codant pour la NOS inductible (iNOS). Le NO, produit localement par l'iNOS, sera ainsi responsable de certains des effets cardio-dépresseurs tardifs.

CHANGEMENTS MÉTABOLIQUES

Au cours du sepsis et du choc septique, plusieurs changements métaboliques profonds ont été décrits dans la cellule cardiaque. Les patients en sepsis sévère et choc septique montrent une augmentation de 30% de la consommation d'oxygène et du métabolisme basal par rapport aux valeurs normales, mais une nette réduction par rapport au sepsis [52].Cependant, une fois que le dysfonctionnement d'organe se développe, la consommation d'oxygène et le taux métabolique au repos baissent, suggérant que, au cours de la défaillance multi-organes, les patients semblent tolérer des valeurs plus faibles de l'approvisionnement en oxygène [53]. En outre, lors de l'évolution du sepsis dans le temps, on constate une augmentation progressive de la pression partielle en oxygène des tissus parallèlement à la sévérité de la maladie [54], [55]. Il a été suggéré, qu'au cours du sepsis sévère, les cellules utilisent moins d'oxygène. Dans le but de maintenir ses fonctions essentielles, la cellule utilise le métabolisme anaérobie pour assurer une production minimale d'ATP. La mise en jeu de ce métabolisme anaérobie se traduit par la formation de lactate et de protons.

Plusieurs études suggèrent que les cellules seraient capables de diminuer leur métabolisme par suppression de certaines synthèses (phénomène adaptatif appelé conformance) face à une baisse des apports énergétiques, afin de mettre en adéquation leurs besoins métaboliques et la production limitée d'ATP par voie anaérobie. Malgré ces mécanismes adaptatifs, une diminution brutale des apports en oxygène et en autres substrats tels que le glucose, expose à des lésions cellulaires et à une dysfonction des organes.

Considérant que le sepsis est généralement associé à une augmentation des taux sanguins de lactate, le cœur septique chez l'homme présente une extraction positive entre lactate artériel et le sang du sinus coronarien [56]. Dans une étude récente chez des patients qui avaient succombés à un sepsis sévère, l'accumulation de lipides a été trouvée à l'intérieur des cardiomyocytes [57]. Au cours du sepsis, les cardiomyocytes humains ont également une diminution de la consommation des corps cétoniques, d'acides gras libres et de glucose [58]. En outre, les souris septiques présentent une augmentation intra-cardiomyocytaire des dépôts de glycogène [59].

ANOMALIE DE LA TRANSDUCTION DU SIGNAL B- ADRÉNERGIQUE

Après la stimulation des centres autonomes cardiaques, les catécholamines sécrétées stimulent les récepteurs β-adrénergiques (β-AR) des cardiomyocytes. Ces récepteurs sont couplés à l'adénylate cyclase (AC), qui transforme l'ATP en AMPc. Les deux protéines-G, à la fois

stimulatrice (G_S) et inhibitrice (G_I), modifient la transmission du signal à travers la membrane cellulaire. L'AMPc active la protéine kinase A (PKA), qui phosphoryle les enzymes clés qui stimulent le métabolisme, la contraction et la relaxation du cardiomyocyte, et influencent le débit cardiaque.

La stimulation β-adrénergique aiguë par les catécholamines augmente la contractilité cardiaque et la fréquence cardiaque. Toutefois, une stimulation prolongée et exagérée peut conduire à la nécrose cellulaire par surcharge calcique [60].

Le choc septique est marqué par une stimulation sympathique globalement élevée et soutenue, plusieurs études ont montré des niveaux élevés de catécholamines chez les patients [61-63] et les animaux pendant le sepsis [64], [65]. Le sepsis induit une perturbation à différents niveaux de cette cascade de signalisation, en partie par l'intermédiaire du NO. En effet, des études ont montrés chez des patients [66] et chez des souris septiques [67], dont la fonction ventriculaire gauche (LV) est réduite, une réduction de la réponse β-adrénergique ; cette dernière est associée à des niveaux élevés de NO [47], [68].

Chez les rats septiques, la densité des récepteurs β-adrénergiques myocardiques est diminuée [69], [70]. D'autres auteurs ont écrit que la réponse contractile est affaiblie dans les cardiomyocytes de rats après stimulation par les cytokines, malgré une densité de récepteurs normale [71].

Chez les lapins endotoxiniques, les protéines-G stimulatrices sont diminuées [72] alors que pour les animaux qui n'ont pas survécus au choc septique [73] et les animaux septiques [74] , les protéines-G inhibitrices sont augmentées.

En résumé, au cours du sepsis, la stimulation β-adrénergique est diminuée (Figure 5) et la sévérité de la dysfonction cardiaque septique peut être secondaire à des modifications dans le temps de la voie de l'adénylyl cyclase (AC) [75].

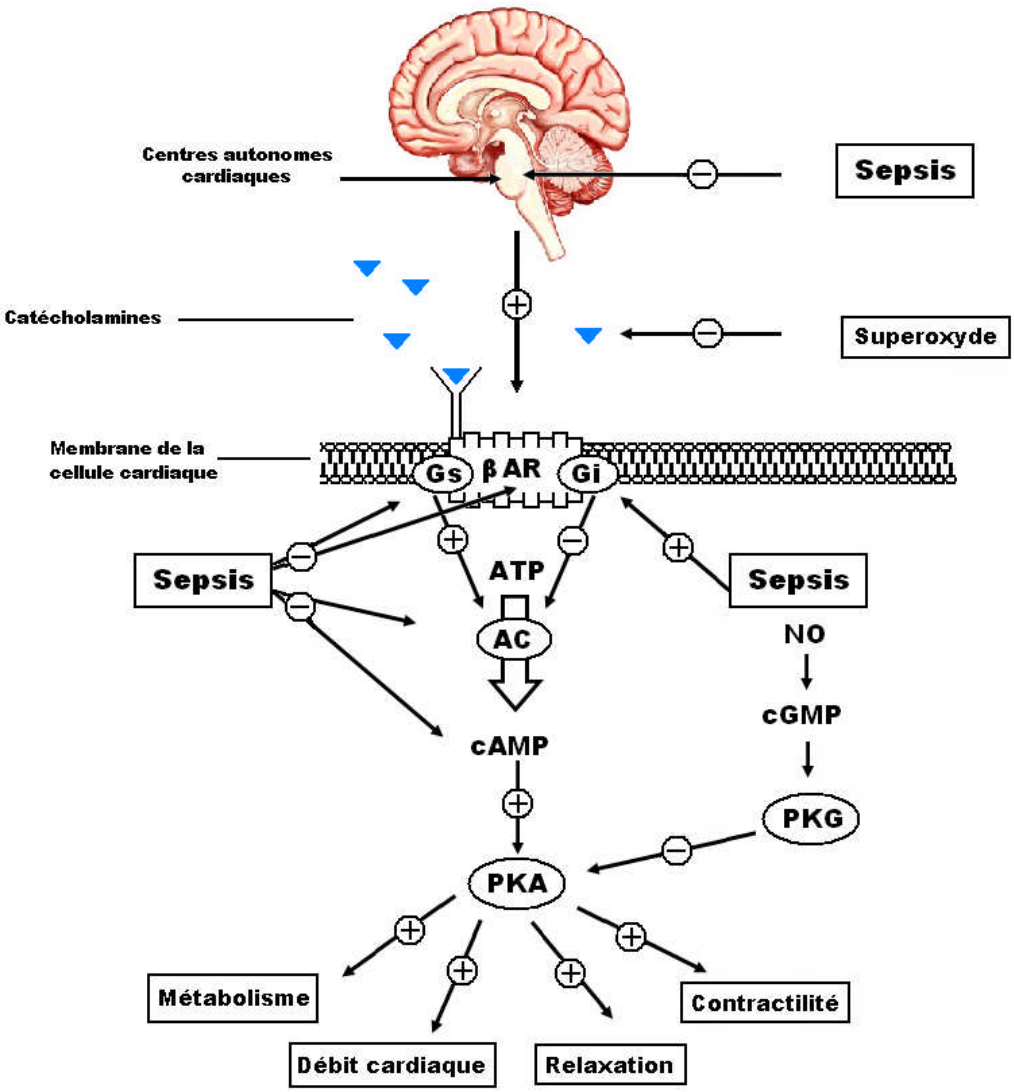


Figure 5 : Atteinte du signal β adrénergique au cours su sepsis.

LES MÉDIATEURS CIRCULANTS PRO-INFLAMMATOIRES DE LA DÉPRESSION MYOCARDIQUE

La dysfonction myocardique observée au cours du sepsis pourrait être en rapport avec les effets directs ou indirects des différents facteurs circulants ou produits localement par les bactéries.

L'existence d'un facteur de dépression myocardique (MDF) de 2 kDa avec un profil hydrophile a été démontré par incubation des cardiomyocytes isolés de rat avec du sérum obtenu à partir des patients en choc septique, conduisant à une diminution d'amplitude et de vitesse de raccourcissement des cardiomyocytes [76]. D'autres études ont également montré le côté hydrophile de la molécule mais lui ont attribué un poids moléculaire compris entre 10

et 30 kDa [77], [78]. Au départ, une seule substance était soupçonnée d'agir comme facteur dépresseur myocardique, mais par la suite il a été montré que le sérum septique perdait sa capacité à induire la dysfonction contractile lorsque le TNF-α et l'IL1-β étaient immuno-adsorbés [79].

Ces observations suggèrent que le MDF pourrait provenir de différents médiateurs de l'inflammation [79] et qui agissent de concert pour conduire à la dysfonction contractile dont les principaux sont : l'endotoxine, TNF-α , Interleukine (IL-1, IL-2, IL-6), Platelet activating factor (PAF), les dérivés de l'acide arachidonique (prostaglandines, leucotriènes), les facteurs d'origine endothéliale (monoxyde d'azote NO, endothéline) et les dérivés réactifs de l'oxygène (anions superoxydes, peroxynitrite).

V.2 Dysfonction vasculaire

La défaillance vasculaire est caractérisée par une diminution du tonus artériel (vasoplégie) et une hyporéactivité vasculaire avec une moindre sensibilité aux agents vasopresseurs. Il en résulte une vasodilatation et une hypotension artérielle persistante pouvant conduire au décès du patient. Le choc septique représente l'archétype du choc vasoplégique et en constitue la cause la plus fréquente.

COAGULATION, INFLAMMATION ET SEPSIS

L'interaction entre inflammation et coagulation a été mise en évidence. Plusieurs études ont démontré que le système de coagulation est activé par les médiateurs inflammatoires, eux-mêmes activés par le système de coagulation. L'endothélium est fortement impliqué dans ce processus [80].

Lors de l'infection sévère, le facteur tissulaire est exprimé au niveau des monocytes et des cellules endothéliales et sa concentration plasmatique s'élève. Parallèlement, l'endothélium activé exprime des molécules d'adhésions leucocytaires. Il en résulte une génération inappropriée de thrombine et la formation de fibrine. L'efficacité des systèmes de régulation négative décroît avec la sévérité clinique du sepsis. La concentration plasmatique des anticoagulants naturels (le système protéine C - protéine S - thrombomoduline et l'antithrombine III) est diminuée précocement lors des infections graves [81]. L'efficacité de la fibrinolyse est d'autant plus altérée que l'infection est cliniquement bruyante [82]. Le tissue factor pathway inhibitor (TFPI), qui limite l'activation de la coagulation par interaction avec

le facteur X, est moins actif lors du sepsis [83]. L'augmentation des phénomènes de coagulation et la dysfonction des systèmes régulateurs conduit à une coagulation intra-vasculaire disséminée (CIVD) qui contribue à la défaillance multiviscérale.

Le rôle de la coagulation dans le sepsis ne se limite pas à la formation de micro-thrombi. Elle est également à l'origine d'une régulation de l'inflammation. Ainsi, le système de la protéine C régule l'activation des phénomènes inflammatoires médiés par l'endothélium via les platelet-expressed G-protein-coupled protease activated receptors (PAR), dont l'activation provoque la production de cytokines pro-inflammatoires responsables de lésions tissulaires [84]. Une régulation du même type a été décrite avec le TFPI. La protéine C est également capable de limiter les phénomènes de mort cellulaire programmés en particulier de l'endothélium [85].

HYPORÉACTIVITÉ VASCULAIRE

L'hyporéactivité vasculaire peut être définie par une augmentation moindre de la pression artérielle pour une même dose d'agent vasopresseur. Son importance est appréciée cliniquement par la posologie de vasopresseurs nécessaires au maintien de la pression artérielle moyenne et par la chute de la pression artérielle diastolique traduisant la vasoplégie.

L'évidence clinique démontre cette hyporéactivité vasculaire puisque les patients en choc septique, réanimés sur un plan volémique, restent hypotendus malgré des concentrations élevées de catécholamines endogènes, L'administration de doses majeures de catécholamines est alors nécessaire pour augmenter leur pression artérielle. Sur un plan expérimental, Bellissant et Annane [86] ont comparés 20 patients en choc septique à 12 sujets sains. Des courbes dose réponse à la phényléphrine, agoniste alpha-adrénergique pur, ont été établies et ont montré une moindre réponse à la stimulation alpha-adrénergique chez les patients septiques.

Monoxyde d'azote (NO)

Le NO est synthétisé à partir de l'un des atomes de l'azote terminal du groupement guanidine de la L-arginine par voie enzymatique faisant intervenir les NOS, en présence d'oxygène et de cofacteurs. A ce jour plusieurs isoformes sont identifiées, une forme inductible (iNOS), une forme neuronale (nNOS), mitochondriale (mNOS). Au niveau vasculaire le NO est produit physiologiquement en faible quantité à partir de la L-arginine par la NO synthase endothéliale constitutive (eNOS). Une fois produit, le NO diffuse hors de la cellule endothéliale vers les cellules musculaires lisses, les macromolécules et les cellules du sang circulant.

Le NO diffuse dans le muscle lisse vasculaire sous jacent et stimule la guanylate cyclase soluble, induisant une augmentation de la GMPc intracellulaire. Ce dernier active alors la phosphatase de la chaîne légère de myosine, permettant le relâchement de l'appareil contractile de la cellule musculaire lisse entrainant ainsi une vasodilatation.

Dans le milieu des années 1980, des études montrèrent que les inhibiteurs des NOS étaient capables de rétablir la réponse contractile aux agents vasopresseurs au cours du choc [87]. En effet lors du sepsis et sous l'influence des cytokines pro inflammatoires, il y a une hyper expression de la NOS inductible (iNOS) au niveau du muscle lisse de la paroi vasculaire, il s'ensuit une production excessive de NO qui aboutit à une altération de la réponse contractile. MacMicking a démontré que des souris déficientes pour le gène de l'iNOS (iNOS-/-) résistent particulièrement bien au choc septique et ne présentent que très peu d'hypotension artérielle comparées à des souris sauvages [88].

D'autres effets délétères de la surproduction du NO ont été considérés dans la physiopathologie du choc vasoplégique. Ainsi, le NO peut interagir avec le radical anion superoxyde et être à l'origine de la surproduction de peroxynitrite, puissant agent oxydant et inhibiteur de la respiration mitochondriale, aboutissant ainsi à la réduction de la glycolyse et de la production d'ATP. Enfin le NO et le peroxynitrite sont également susceptibles d'activer les canaux potassiques ATP dépendants.

L'ensemble de ces observations a conduit à l'utilisation d'inhibiteurs non sélectifs des NOS comme le L-NAME (NG-Nitroarginine methyl ester) en expérimentation animale puis chez des patients en choc septique. Ces traitements permirent de restaurer des valeurs de pression artérielle, malheureusement leur utilisation fut associée à une surmortalité [89]. Il a alors été supposé que l'utilisation d'inhibiteurs plus sélectifs de l'iNOS, telles que l'aminoguanidine ou la L-canavanine, pouvait apporter un bénéfice aux patients mais aucun n'a été retenu à ce jour pour un essai clinique. En effet, bloquer la production du NO pourrait être à l'origine de nombreux effets délétères notamment une altération du flux microcirculatoire, une diminution de l'activité bactéricide NO-dépendante, une diminution de l'activité de neutralisation des espèces radicalaires dérivées de l'oxygène ou encore une diminution de la modulation de l'activation de la coagulation.

Les cyclooxygénases

La cyclo-oxygénase est la principale enzyme impliquée dans la transformation de l'acide arachidonique (constituant des parois cellulaires) en prostaglandines et thromboxanes (Figure 6). Elle existe sous deux isoformes : la cyclo-oxygénase-1 (COX-1), qui est constitutive,

trouvée dans des conditions basales dans les cellules endothéliales et les plaquettes ; elles sont peu ou pas modifiées par l'inflammation. La deuxième isoforme est la cyclo-oxygénase-2 inductible (COX-2) responsable d'une libération accrue de métabolites de la cyclo-oxygénase localement dans les sites d'inflammation aiguë ou dans la circulation lors des infections systémiques. Les COX-2 sont produits dans certains tissus en réponse à des stimuli tels que les cytokines et les facteurs de croissances [90]. Les médiateurs lipidiques générés via les COX-2 agissent à travers un récepteur spécifique couplé à la protéine G, et in fine favorisent l'inflammation, altèrent le tonus vasomoteur et la perméabilité vasculaire. Les souris déficientes PLA2, ou COX2, ou 5-Lipooxygénase, sont plus résistantes à l'endotoxine [91].

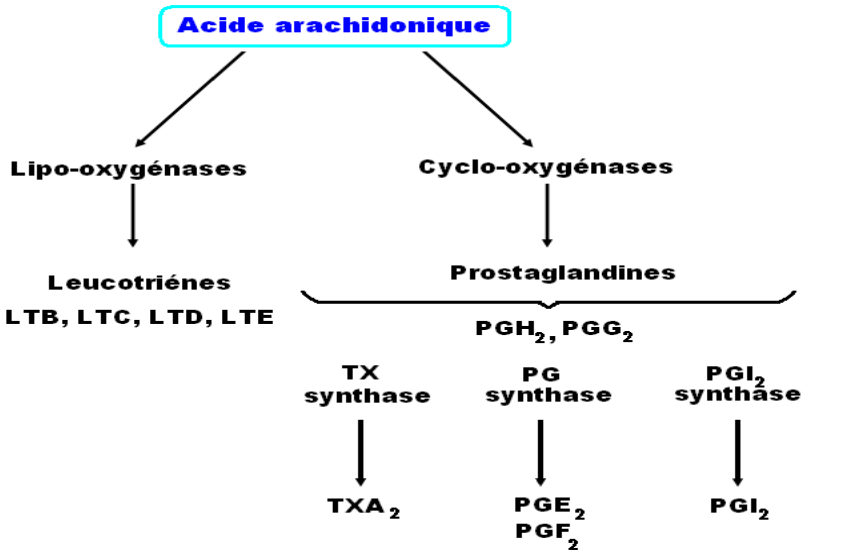


Figure 6 : Biosynthèse des prostaglandines et des thromboxanes.

Altération de la relaxation endothélium dépendante au cours du sepsis

Initialement décrit comme étant une simple frontière entre le sang et les tissus, l'endothélium apparaît maintenant comme un organe à part entière.

L'endothélium participe activement à la défense de l'organisme contre les agents pathogènes en recrutant les leucocytes vers les sites infectés, en libérant des médiateurs inflammatoires et en favorisant localement la coagulation, évitant ainsi la diffusion hématogène de l'infection.

L'endothélium contribue au contrôle de la pression en produisant des molécules vasoactives qui régulent le tonus artériolaire. On retrouve des produits vasodilatateurs comme le monoxyde d'azote (NO) et la prostacycline (PGI2), ainsi que des vasoconstricteurs comme l'endothéline, le thromboxane A2 et le Platelet Activating Factor (PAF) [92].

Cependant, la réponse immunitaire systémique adaptée peut se généraliser et s'amplifier lors d'un sepsis et déréguler l'homéostasie endothéliale : on parle alors de dysfonction endothéliale.

Physiologiquement, le NO d'origine endothéliale, produit par la eNOS, régule le tonus musculaire, l'agrégation plaquettaire et le recrutement des leucocytes [93]. L'expression de la eNOS est stimulée par de multiples facteurs incluant les forces de cisaillement, VEGF (vascular endothelial growth factor), l'acétylcholine, les oestrogènes et la voie de signalisation Akt [94].

Par contre, au cours du choc endotoxinique, la défaillance de la relaxation endothélium dépendante a bien été démontrée dans les vaisseaux. Cette défaillance observée peut être le résultat de plusieurs mécanismes : altération des récepteurs de surface endothéliaux, modification de la voie de transduction des récepteurs, découplage de la eNOS, altération de la fonction et de l'expression de la eNOS entre autre par les peroxynitrites. En effet, *in vitro,* la stimulation de cellules endothéliales par le TNF-α ou le LPS induit une *down-regulation* de l'ARN messager de la eNOS [95], [96].

Chez le rat, l'induction d'un choc septique s'accompagne de la diminution de la densité endothéliale de eNOS [97]. Chez le lapin, l'injection d'une dose létale de LPS altère la relaxation endothélium-dépendante et cela pendant 5 à 20 jours [98]. Chez le volontaire sain, une brève exposition à l'endotoxine diminue la relaxation dépendante pendant plusieurs jours [99], [100].

La diminution de la synthèse endothéliale des molécules vasorelaxantes NO et PGI2 contribue également aux anomalies de perfusion, même si l'induction des enzymes NO synthase (iNOS) et Cyclooxygenase-2 (COX-2) permet au moins théoriquement, de relayer secondairement le défaut de production initial de NO et de PGI2 [101], [102]. La production musculaire lisse de ces molécules est multipliée par un facteur 1000 par rapport au niveau de production endothéliale. Une étude a montrée que le Knock out du gène d'iNOS protège les artères des souris de la dysfonction endothéliale induite par le LPS [103].

En effet, le caractère d'adaptation du tonus vasomoteur est perdu avec l'atteinte endothéliale : le vaisseau septique est en vasoplégie à cause notamment de l'excès de NO produit. Le vaisseau n'est donc plus capable d'adapter son tonus aux stimuli locaux, en particulier aux modifications du débit de perfusion, de la pression endoluminale, ou des apports en oxygène.

Désensibilisation des récepteurs adrénergiques

Cette désensibilisation ferait intervenir une diminution du nombre de récepteurs et/ou un découplage entre les récepteurs et leurs messagers intracellulaires.

La régulation des récepteurs adrénergiques a été beaucoup plus étudiée sur les bêtarécepteurs au niveau myocardique que les alpharécepteurs au niveau vasculaire. En ce qui concerne les alpharécepteurs, McMillan a observé une réduction du nombre de récepteurs α-1 hépatiques dans un modèle de sepsis chronique chez le rat [104]. La désensibilisation des récepteurs semble être due à l'excès de catécholamines circulantes puisque celles-ci interviennent en premier lieu dans la régulation des récepteurs adrénergiques.

Les canaux potassiques ATP-dépendants (K^+_{ATP})

Les canaux K^+_{ATP} sont impliqués dans l'état de choc vasoplégique. A l'état physiologique, ces canaux restent fermés. Mais en situation de crise énergétique, comme c'est le cas dans l'état de choc, on observe notamment une déplétion des stocks intracellulaires en ATP et une acidose lactique en raison de la mise en place des voies métaboliques anaérobiques. Ces 2 stimuli activent l'ouverture des canaux $K\text{-}_{ATP}$, de même que l'augmentation de NO, de peroxynitrite et l'hypoxie [105]. Dans la membrane plasmique des cellules musculaires lisses vasculaires, cette ouverture permet la sortie sélective d'ions K^+ hors de la cellule, ce qui provoque une hyperpolarisation et ainsi le blocage des canaux calciques voltage-dépendants. Il en résulte une vasodilatation réfractaire aux catécholamines.

VI. TRAITEMENTS UTILISÉS DANS LE CHOC SEPTIQUE

La conférence internationale, la Surviving Sepsis Campaign, reprend les règles de bonnes pratiques cliniques de la prise en charge du choc septique [3].

VI.1 L'éradication du foyer infectieux (Antibiothérapie)

Comprenant une antibiothérapie très précoce, sans attendre la confirmation bactériologique de l'infection ou l'identification du germe. Le choix du traitement antibiotique est fonction du mode d'acquisition de l'infection (communautaire ou lié aux soins), du foyer infectieux présumé et de l'épidémiologie générale et éventuellement locale (notamment pour les infections hospitalières) associée à ce type d'infection.

VI.2 Traitement hémodynamique de la défaillance cardiovasculaire

L'objectif de la prise en charge hémodynamique dans le sepsis sévère et le choc septique est la restauration d'une perfusion adéquate des tissus. Les composantes vasculaire et cardiaque de la défaillance doivent être distinguées.

La réanimation hémodynamique du choc septique consiste à mener de front une évaluation des anomalies cardiovasculaires et leur correction par les mesures les plus adaptées : expansion volémique, emploi d'agents cardio-vasoactifs, corticoïdes, administration de protéine C activée.

L'OPTIMISATION HÉMODYNAMIQUE PRÉCOCE (EARLY GOAL DIRECTED THERAPY).

Dans les 6 heures, comprenant en premier lieu une expansion volémique et l'utilisation d'agents vasoactifs, en se fixant des objectifs de réanimation simple de restauration d'une pression artérielle, et de restauration d'un transport artériel en oxygène suffisant, permet de faire baisser la mortalité d'un groupe de patients septiques de 46,5 % à 30% [106].

⇒ *Expansion volémique*

Une des premières actions thérapeutiques dans le sepsis est la mise en œuvre précoce d'un remplissage vasculaire, qui a pour objectif de corriger l'hypovolémie et de restaurer les paramètres hémodynamiques adéquats. La correction de l'hypovolémie permet une restauration du remplissage des ventricules et, par voie de conséquence, du débit cardiaque et de la pression artérielle.

Le remplissage vasculaire peut être réalisé par deux types de solutés : les cristalloïdes (isotoniques ou hypertoniques) et les colloïdes (naturels ou synthétiques). Leurs propriétés physicochimiques les différencient au niveau pharmacocinétique et pharmacodynamique. Leurs effets sont basés sur le pouvoir osmotique pour les premiers et le pouvoir oncotique pour les seconds.

Le remplissage doit être poursuivi jusqu'à l'obtention d'une PAM ≥ 65 mmHg. Il doit être rapide (*fluid challenge*) : l'administration de 1000 ml de cristalloïdes ou de 300-500 ml de colloïdes doit être faite sur 30 minutes, voire plus rapidement et de façon plus ample en volume en cas de signes d'hypoperfusion tissulaire. Il doit être ralenti ou stoppé si les pressions de remplissage cardiaque s'élèvent sans amélioration concomitante des paramètres hémodynamiques.

⇒ ***Agents vasopresseurs***

Les catécholamines

Toutes les catécholamines vasopressives augmentent la pression artérielle de manière dose dépendante. L'administration de catécholamines restaure la pression artérielle et, dès lors, la perfusion des différents organes. Les catécholamines (noradrénaline, adrénaline, dopamine et dobutamine) sont actuellement les agents vasoactifs les plus utilisés. Ces agents influencent non seulement la pression artérielle mais également les circulations régionales et les besoins métaboliques [107]. Si l'emploi des catécholamines permet d'améliorer la pression de perfusion, leur utilisation est délicate en raison de l'inhomogénéité du tonus vasculaire d'un territoire à l'autre.

Pharmacologie des principales catécholamines

La structure des catécholamines est ainsi principalement caractérisée par un noyau benzène, une chaîne latérale éthylamine (structure β-phényl-éthylamine) et des radicaux hydroxyles (OH) substitués dans les positions 3 et 4 du cycle aromatique. Cette particularité est en partie responsable de l'importance de leurs effets agonistes α et β (Figure 7).

Les catécholamines endogènes sont synthétisées dans l'organisme à partir d'un précurseur commun : la L-tyrosine, acide aminé qui provient de l'alimentation, est présente dans le sang. La synthèse des catécholamines commence par l'hydroxylation de la L-tyrosine en L-DOPA (dihydroxyphénylalanine) par la tyrosine hydroxylase. Cette étape est une étape limitante de la synthèse des catécholamines, la tyrosine hydroxylase étant soumise à un rétrocontrôle.

La DOPA est décarboxylée par la DOPA décarboxylase en dopamine, qui est ensuite oxydée en noradrénaline, puis méthylée en adrénaline.

D'une manière générale, les catécholamines ont une demi-vie très courte, ce qui impose en pratique une perfusion continue. Qu'elles soient endogènes ou administrées comme médicament, elles diffusent à travers l'endothélium pour se fixer aux récepteurs. Durant leur distribution dans l'organisme, elles peuvent être métabolisées par un captage tissulaire ubiquitaire (uptake-2) ou un captage par les extrémités neuronales sympathiques (uptake-1). Le métabolisme initial des catécholamines est assuré de façon prédominante par la mono-amine oxydase (MAO) et la catéchol-O-méthyltransférase (COMT) [108].

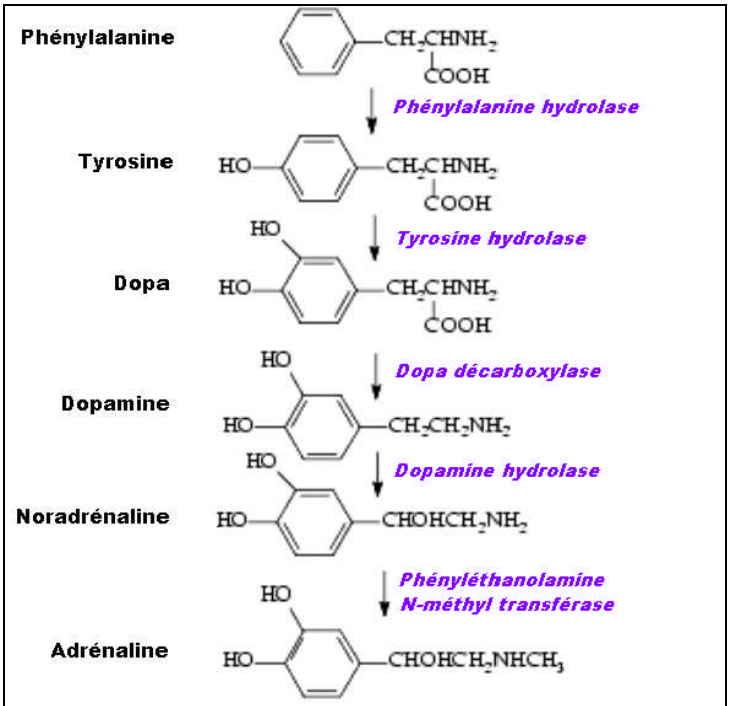


Figure 7 : Biosynthèse des catécholamines endogènes.

Les effets pharmacodynamiques des catécholamines sont caractérisés par l'existence d'une concentration seuil à partir de laquelle l'effet attendu est décelable (de l'ordre de 100 pg/ml pour l'adrénaline et 1000 pg/ml pour la noradrénaline chez l'homme), puis d'un accroissement linéaire de l'effet en fonction du logarithme des concentrations [109]. La posologie et la concentration plasmatique sont liées par une relation linéaire [110], [111]. L'effet maximal est habituellement atteint pour des doses comprises entre 100 et 1000 fois la dose seuil chez l'homme.

Les récepteurs adrénergiques

Les récepteurs adrénergiques font partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Les effets viscéraux des catécholamines vont s'exercer par l'intermédiaire de 3 grandes classes de récepteurs : les récepteurs α et β-adrénergiques et les récepteurs dopaminergiques (DA) :

- ✓ Les récepteurs α1-adrénergiques sont localisés de manière prépondérante sur la fibre musculaire lisse vasculaire en regard d'une terminaison nerveuse noradrénergique (récepteurs post-synaptiques). Leur stimulation entraîne une vasoconstriction.
- ✓ Les récepteurs α2-adrénergiques sont localisés, soit en position pré-synaptique et leur stimulation entraîne une diminution de la libération synaptique de

noradrénaline, soit sur la fibre musculaire lisse vasculaire en dehors d'une terminaison nerveuse noradrénergique et leur stimulation entraîne une vasoconstriction. Ces derniers récepteurs sont stimulés physiologiquement par l'adrénaline circulante d'origine surrénalienne.

- ✓ Les récepteurs βl-adrénergiques sont localisés principalement sur la fibre myocardique (récepteurs post-synaptiques) et leur stimulation entraîne principalement une augmentation de la force de contraction (inotrope +) et de la fréquence cardiaque (chronotrope +).
- ✓ Les récepteurs β2-adrénergiques sont localisés, soit sur la fibre musculaire lisse vasculaire (récepteurs post-synaptiques) et leur stimulation entraîne une vasodilatation, soit en position pré-synaptique et leur stimulation entraîne une augmentation de la libération synaptique de noradrénaline.
- ✓ Les récepteurs dopaminergiques DA1 sont localisés principalement sur la fibre musculaire lisse des vaisseaux rénaux et splanchniques et leur stimulation entraîne une vasodilatation.
- ✓ Les récepteurs dopaminergiques DA2 sont pré-synaptiques et leur stimulation, comme celle des récepteurs α2, entraîne une diminution de la libération synaptique de noradrénaline.

Effets cardiovasculaires des catécholamines

Les diverses amines vasopressives agissent via la stimulation des récepteurs α et β adrénergiques. De manière intéressante, la spécificité de chacun de ces agents vient du fait que le rapport de stimulation α / stimulation β varie en fonction de la nature et de la dose de l'agent.

L'adrénaline.

L'adrénaline est une hormone naturelle sympathomimétique de référence. Elle est synthétisée et sécrétée par la médullosurrénale en réponse au stress, sa demi-vie est brève en raison de la rapidité de son élimination par le métabolisme essentiellement hépatique, mais aussi par l'importance de son recaptage neuronal. C'est une catécholamine β et α adrénergique d'action directe. Son action est complexe du fait d'une part de l'inhomogénéité de la répartition des récepteurs et d'autre part des effets doses dépendants sur les récepteurs. L'adrénaline a une action essentiellement cardiaque inotrope β1. Ces effets au niveau cardiaque et vasculaire sont différents.

Au niveau cardiaque, l'adrénaline est un puissant agent inotrope positif essentiellement par action sur les récepteurs β1 du myocarde. Une action inotrope positive existe aussi par action sur les récepteurs α1. Elle a aussi un effet chronotrope positif, c'est-à-dire tachycardisant. Cet effet chonotrope est contrecarré quand on emploie de fortes posologies d'adrénaline car l'action vasopressive entraîne une augmentation du tonus cholinergique dont l'effet bradycardisant neutralise l'effet chronotrope positif. Elle a un effet dromotrope positif, elle augmente la vitesse de conduction au niveau du faisceau de His. Elle a un effet bathmotrope positif, elle a un effet arythmogène. Les deux récepteurs α et β sont impliqués. Elle augmente nettement le travail cardiaque.

Au niveau vasculaire, l'effet sur la pression artérielle systémique est dose dépendant. A faible dose, l'effet β prédomine entraînant une hypotension. Puis dès que les posologies augmentent, l'effet α devient prédominant, entraînant une augmentation de la pression artérielle. Sur les veines, l'effet vasopresseur domine, il donne une veinoconstriction.

La phényléphrine.

La phényléphrine est une hormone de synthèse aux propriétés α1-agonistes. Elle diffère de l'adrénaline par la perte d'un groupe « OH » en position 4 du cycle aromatique et n'est donc pas, pour cette raison, au sens strict une catécholamine. Pour des doses correspondantes à des doses élevées d'adrénaline, elle augmente les résistances vasculaires et donc la pression artérielle.

La noradrénaline.

La noradrénaline est une catécholamine naturelle très proche cliniquement de l'adrénaline. Libérée par les neurones adrénergiques post ganglionnaires. Son catabolisme est strictement comparable à celui de l'adrénaline. Son effet prédominant est la stimulation des récepteurs α. Elle agit également sur les récepteurs β. Elle possède des effets sur le cœur, les vaisseaux et le métabolisme.

Au niveau cardiaque, les effets sont liés essentiellement à l'activation des récepteurs β1. Ils sont rapidement masqués par l'effet dominant α sur les vaisseaux. L'effet inotrope positif existe mais n'a pas de traduction en termes d'augmentation du débit cardiaque. L'effet chronotrope se traduit le plus souvent par une bradycardie réflexe à l'hypotension artérielle. Sans augmentation du débit cardiaque, elle permet une augmentation de la post-charge. L'effet dromotrope négatif peut donner des troubles de la conduction.

Au niveau vasculaire, la noradrénaline entraîne une vasoconstriction intense intéressant l'ensemble du système artériel et veineux. Cet effet est dose dépendant.

Au niveau métabolique, les effets métaboliques de la noradrénaline sont beaucoup moins marqués que ceux de l'adrénaline : l'hyperglycémie est peu importante.

La dopamine.

La dopamine est le précurseur immédiat de la noradrénaline dans la biosynthèse des catécholamines endogènes, elle diffère de celle-ci par l'absence d'un groupe β-OH.

La dopamine est un neurotransmetteur physiologique du système nerveux central et périphérique. A l'état physiologique, la dopamine diminue l'activité gastro-intestinale, la synthèse et la sécrétion d'aldostérone, accroît le débit sanguin rénal et l'excrétion sodée rénale.

A des posologies variant entre 2 et 5 µg/kg/min, on note une augmentation du débit cardiaque sans modification considérable de la fréquence, de la pression artérielle et des résistances vasculaires systémiques. A des doses supérieures, on observe une augmentation plus importante de l'index cardiaque, de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle ; une augmentation des résistances vasculaires systémiques peut être observée, mais elle survient en général pour des doses supérieures à 10 µg/kg/min. cependant cette drogue induit fréquemment des troubles du rythme cardiaque.

Effets hémodynamiques des catécholamines dans le choc septique

Toutes les amines pressives augmentent la pression artérielle de manière dose dépendante. Les avantages théoriques de l'adrénaline sur la noradrénaline et la phényléphrine résident principalement dans une meilleure préservation du débit cardiaque grâce à la stimulation β adrénergique. Qu'en est-il de la réalité ? Plusieurs études ont montré que l'utilisation de l'adrénaline est associée à un débit cardiaque plus élevé que celle de la noradrénaline. Contre toute attente, les effets de la phényléphrine ne semblent pas différer de ceux de la noradrénaline, deux études ayant comparé les effets de ces 2 agents sur le débit cardiaque n'ont pas montrés de différence [112], [113]. De même, une tachycardie voire une tachyarythmie est plus souvent attendue avec l'adrénaline qu'avec la noradrénaline et la phényléphrine. L'incidence exacte des tachyarythmies reste difficile à déterminer, mais celles-ci sont facilitées par des désordres ioniques sous-jacents et surtout par l'hypovolémie. Différents facteurs vont affecter la réponse à ces agents et rendent parfois difficile la comparaison des diverses études. Parmi ces facteurs retenons, le niveau de pression artérielle avant et après traitement (une augmentation de pression artérielle de 20 mmHg n'aura pas les mêmes conséquences si la pression artérielle avant traitement est de 45 ou de 65 mmHg), le niveau de réanimation liquidienne et, pour les modèles animaux, le type de modèle (endotoxine versus infection), les agents anesthésiques et l'espèce animale. Enfin, toutes ces amines ont des effets métaboliques non négligeables. L'adrénaline augmente fortement le métabolisme cellulaire et est associée à une augmentation des taux de lactate, la dopamine a des effets endocriniens et tous ces agents sont immunosuppresseurs. Cependant, l'impact de ces effets sur l'évolution du patient reste indéterminé [114]. L'étude CATS a montré qu'il n'existait aucune différence entre l'utilisation de noreepinephrine plus dobutamine versus epinephrine seule dans le traitement du choc septique [115].

Il est important de noter que le traitement du choc septique par les sympathomimétiques ne fait que combattre les conséquences du sepsis mais pas les causes. C'est pourquoi le traitement anti-infectieux est essentiel. Par ailleurs, d'autres moyens thérapeutiques adjuvants ont fait la preuve de leur efficacité (corticoïdes et protéine C activée essentiellement).

VI.3 Traitement par la Protéine C activée

SYSTÈME DE LA PROTÉINE C

Connu comme inhibiteur physiologique de la thrombinoformation, le système de la protéine C possède des propriétés anticoagulantes, profibrinolytiques, anti-inflammatoires et anti-apoptotiques (Figure 8).

La protéine C est une glycoprotéine synthétisée par le foie sous la dépendance de la vitamine K et à l'état de zymogène inactif. Elle circule dans le plasma sous cette forme avec une demi-vie de 8h. Le système de la protéine C joue un rôle essentiel dans les processus d'inhibition physiologique de la coagulation. Elle est activée par la thrombine (IIa) en présence de deux récepteurs membranaires présents à la surface des cellules endothéliales et des monocytes : la thrombomoduline (TM) et le récepteur endothélial de la protéine C (EPCR). La PCa est inhibée physiologiquement par l'α-1 protéinase inhibiteur, l'α-2 macroglobuline et par un inhibiteur plasmatique (PC inhibiteur) dont l'activité est augmentée par l'héparine.

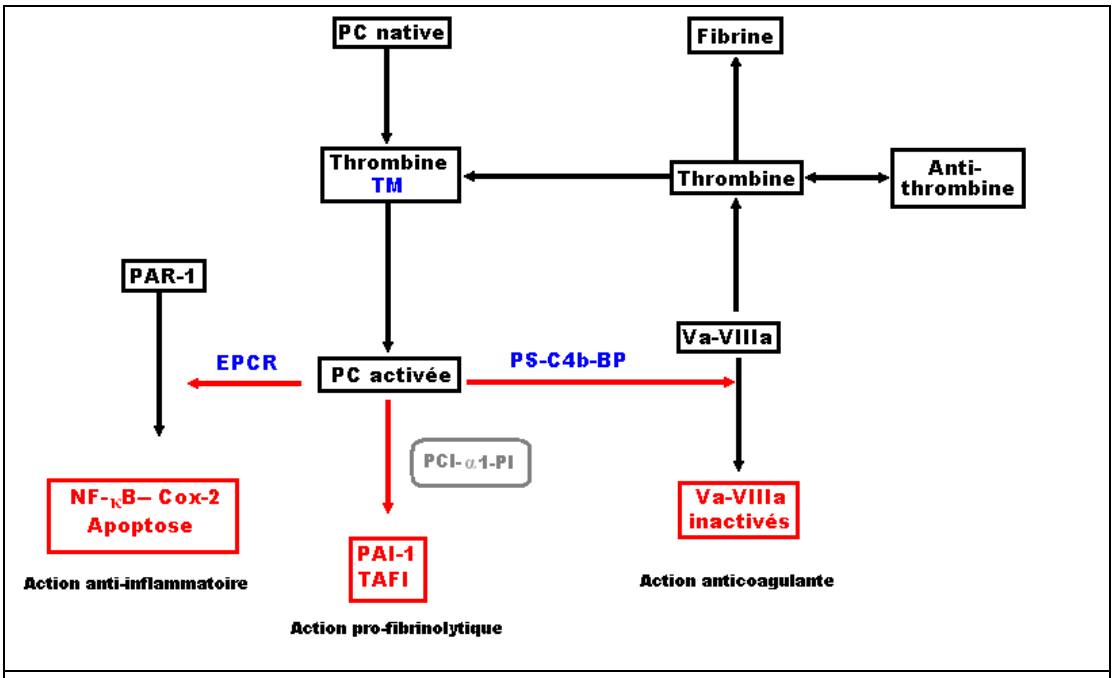


Figure 8 : Système protéine C-protéine C activée, adapté de Rezaie [116]

EFFET ANTICOAGULANT

Une fois activée, la PCa se lie à la protéine S (PS) à la surface des cellules activées et dégrade les cofacteurs Va et VIIIa en V et VIII. Indispensable au bon fonctionnement des complexes tenase et prothrombinase, la dégradation de ces deux cofacteurs est responsable d'une

inhibition de la phase d'amplification de la coagulation. Elle limite ainsi la génération de thrombine.

Dans cette réaction, la PS, glycoprotéine hépatocytaire vitamine K-dépendante, se comporte comme un catalyseur. La PS circule dans le plasma sous une forme libre et sous forme liée à une protéine transporteuse du complément, la C4b binding protein (C4bBP). Le taux de PS libre active dépend ainsi de cette liaison.

La PC exerce donc une rétroaction négative sur la production de thrombine, selon une cascade d'activation faisant intervenir le complexe thrombine-thrombomoduline comme mécanisme activateur du zymogène synthétisé par le foie, le récepteur cellulaire endothélial spécifique (EPCR) comme modulateur de l'activation et la PS libre comme cofacteur de l'activité anticoagulante [117], [118].

ACTIVITÉ PROFIBRINOLYTIQUE

La fibrinolyse est le processus qui entraîne la dissolution de la fibrine formée au niveau de la brèche vasculaire. Ce processus fait intervenir le plasminogène, une glycoprotéine plasmatique de synthèse hépatique, comportant dans sa structure cinq boucles lui permettant de se fixer au caillot de fibrine. Sous l'influence d'activateurs, le plasminogène est transformé en une sérine protéase, la plasmine, qui scinde la fibrine en produits de dégradation solubles dans le plasma qui seront emportés par le flux sanguin. Les cellules endothéliales synthétisent l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) et son inhibiteur, le *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1).

Le TAFI (*thrombin activatable fibrinolysis inhibitor*) ou procarboxypeptidase B est synthétisé par le foie et présent dans le plasma. Il est transformé par le complexe thrombine-TM en carboxypeptidase. Son activité carboxypeptidase élimine les sites C-terminaux de la fibrine sur lesquels se lient le t-PA et le plasminogène ayant ainsi un effet inhibiteur sur la fibrinolyse.

La protéine C activée exerce son activité profibrinolytique en inhibant l'activité de deux enzymes : le PAI-1 et le TAFI.

En ce qui concerne le PAI-1, l'inhibition est à la fois directe et indirecte, d'une part grâce à la formation d'un complexe stable PCa-PAI-1, et d'autre part grâce à la diminution de la libération de cette enzyme par les cellules endothéliales.

En ce qui concerne le TAFI, l'inhibition est indirecte : l'activation du TAFI étant dépendante des concentrations de thrombine, l'inhibition de la thrombinoformation par la PCa limite indirectement l'activation du TAFI.

La conjonction de ces deux phénomènes a pour résultante une levée de l'inhibition exercée par le PAI-1 et le TAFI sur les deux acteurs de la fibrinolyse, t-PA et u-PA.

EFFET CYTOPROTECTEUR

Même si l'on sait depuis longtemps que la PCa est capable de se lier à des protéines membranaires (EPCR et TM), ce n'est que récemment que son mécanisme d'action cellulaire a été élucidé. Il semble en effet qu'une fois liée à l'EPCR, la PCa devient capable de cliver le Protease Activated Receptor 1 (PAR1) présent à la surface de certaines cellules et conduit ainsi à l'activation de différentes voies de signalisation intracellulaires [119], ceci aboutit à un effet cytoprotecteur. Cet effet cytoprotecteur inclut : une altération de l'expression génique, une activité anti-inflammatoire, une activité anti-apoptotique et une protection de la fonction endothéliale [119]. Par ce mécanisme cytoprotecteur, la PCa limite la synthèse des cytokines pro inflammatoires, des radicaux libres oxygénés et diminue la perméabilité endothéliale au cours du sepsis.

Il a été démontré dans une étude récente [120] sur des aortes de souris stimulées *in-vitro* par du LPS que la PCa, en dehors de ses propriétés anticoagulantes, améliore la dysfonction endothéliale et potentialise la réponse contractile d'un vaisseau septique. En effet, la PCa possède un effet protecteur sur la dysfonction endothéliale induite par le LPS et potentialise la réponse contractile. L'amélioration de la dysfonction endothéliale par la PCa passe par la voie de signalisation AKt qui active l'eNOS et améliore la réponse dilatatrice des vaisseaux.

EFFET ANTI-INFLAMMATOIRE

La protéine C activée se trouve impliquée dans le processus inflammatoire par différents mécanismes. Tout d'abord de façon indirecte par diminution de la génération de thrombine, connue pour ses propriétés pro-inflammatoires, mais aussi de façon directe. Elle exerce des effets anti-inflammatoires en diminuant la sécrétion de TNFα et d'IL-6, en modulant l'expression des molécules d'adhésion et l'activation leucocytaire, en diminuant l'activation du NF-κB et les voies de l'apoptose cellulaire [116], [121-123].

En bloquant l'expression des sous unités p50 et p52 de NF-κB, la protéine C activée induit une inhibition de l'activation et de la translocation nucléaire de ce dernier. Cette inhibition existe même en présence de TNFα, principal activateur de NF-κB, dont le rôle est central dans la réaction pro-inflammatoire liée au sepsis. Sans ce facteur, l'expression des gènes codants pour les molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1, E-sélectine) et les cytokines pro-inflammatoires (TNFα, IL-1, IL-6, IL-8) ne peut être induite. Ces médiateurs voient leurs taux chuter, supportant ainsi l'activité anti-inflammatoire de la protéine C activée. Il en résulte une diminution de l'activation, de l'adhésion et du rolling des leucocytes.

Dans cette inhibition, la PCa n'agit pas seule : elle fait intervenir les deux récepteurs membranaires déjà impliqués dans ses propriétés anticoagulantes, l'EPCR et la thrombomoduline. Les mécanismes par lesquels l'EPCR et la PCa interviennent dans la modulation de l'expression des gènes sont vraisemblablement multiples. Il est établit qu'une fois liée à l'EPCR, la PCa est capable de cliver PAR-1, lequel bloque la voie de signalisation du facteur nucléaire NF-κB. L'EPCR et PAR-1 font ainsi le lien entre la PCa et la modulation de l'expression des gènes sous la dépendance du facteur NF-κB. Toutefois, ce modèle n'explique pas par quels mécanismes sont régulés les gènes ne dépendant pas de NF-κB. Dans ce dernier cas, les propriétés de translocation intranucléaire de l'EPCR seraient mises en jeu, permettant au complexe EPCR-PCa d'agir directement comme facteur modulateur de l'expression des gènes. De plus, même si l'implication de PAR-1 dans ce système a été largement confirmée, il reste à élucider les mécanismes par lesquels la réponse est de type pro-inflammatoire lorsque ce récepteur est clivé par la thrombine alors qu'elle est de type anti-inflammatoire et lorsqu'il est clivé par la PCa. La réponse réside probablement dans la différence des complexes activateurs, EPCR ou FT-VIIa-Xa.

Comme l'EPCR, la thrombomoduline intervient à plusieurs niveaux dans la régulation du processus inflammatoire. D'une part, elle possède des propriétés anti-inflammatoires indépendantes du système de la protéine C, via un domaine homologue à la lectine et point de départ d'une inhibition de la voie de NF-κB. D'autre part, elle est à l'origine de l'activation massive de la PCa puisqu'elle augmente d'un facteur mille son activation par la thrombine. Ainsi, en initiant la voie de la protéine C, elle inverse les propriétés de signalisation de la thrombine qui devient indirectement anti-inflammatoire via la PCa et l'EPCR alors qu'elle est initialement pro-inflammatoire.

EFFET ANTI APOPTOTIQUE

En plus des effets anti-inflammatoires de la PCa, cette dernière serait douée d'une activité antiapoptotique mise en évidence *in vitro* puis *in vivo*. Elle a en effet été impliquée dans l'inhibition de l'apoptose sur un modèle de cellules endothéliales dans un premier temps, puis *in vivo* sur un modèle d'ischémie cérébrale murin. Cet effet nécessite la présence du site actif de l'enzyme puisqu'une PC mutée au niveau de son site actif en est dépourvue. Enfin, comme pour ses effets anti-inflammatoires, il semble que la PCa doit se fixer à l'EPCR puis cliver le PAR-1 pour induire un effet antiapoptotique [124]. La réduction de l'activité apoptotique est associée à une réduction de la mortalité dans le sepsis. La PCa pour son action antiapoptotique agit à plusieurs niveaux de la voie de signalisation, incluant la dégradation de l'ADN, l'activation des caspases-3, et la translocation de la phosphatidylsérine. A ce jour, la voie de la PCa impliquée dans l'inhibition de l'apoptose n'a pas pu être déterminée avec certitude. Durant le stress hypoxique des cellules endothéliales cérébrales, la PCa réduit l'up régulation des Bax et maintient l'action protectrice de la protéine Bcl-2.

VI.4 Les corticoïdes

Les corticoïdes sont des hormones stéroïdiennes naturelles synthétisées par le cortex de la glande surrénale, elle même contrôlée par l'axe hypothalamo-hypophysaire. L'activité hormonale des corticoïdes intéressent les régulations métaboliques organiques, notamment le métabolisme protido glucidique. Ils exercent une action anti-inflammatoire, ce sont des anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) et ont une action immunosuppressive, ils tendent à augmenter la destruction des lymphocytes qui maturent dans le thymus.
Depuis la découverte de la cortisone par Reichstein et Kendall en 1937, la corticothérapie est devenue le traitement de référence de la plupart des maladies inflammatoires et immunitaires.

Les corticoïdes sont subdivisés en deux sous classes en fonction de leur activité principale :
Les glucocorticoïdes comme le cortisol, qui agissent essentiellement sur le métabolisme glucidique et protéique.
Les minéralocorticoïdes comme l'aldostérone, qui agissent sur le métabolisme hydro-électrolytique (réabsorption de sodium, l'excrétion urinaire de potassium et de protons au niveau rénal).

La synthèse des corticoïdes est sous l'influence de la CRH (corticotropin releasing hormone) aussi désignée sous le nom de CRF (corticotropin releasing factor), constitué de 41 acides aminés, synthétisée au niveau hypothalamique puis véhiculée par le système porte de la tige pituitaire jusqu'à l'hypophyse où il stimule la sécrétion d'ACTH (adreno-corticotrophine hormone), appelée aussi corticotropine. L'ACTH stimule la biosynthèse et la sécrétion de cortisol, principal glucocorticoïde endogène, par la glande corticosurrénale. L'arginine vasopressine (AVP) stimule faiblement la sécrétion d'ACTH, mais augmente l'action de la CRH. La sécrétion d'ACTH est également stimulée par les catécholamines, l'angiotensine II, la sérotonine et le peptide intestinal vasoactif (VIP).

Certaines cytokines inflammatoires stimulent la sécrétion d'ACTH telles que l'IL 1, IL2, IL6, le *tumor necrosis factor* (TNF). D'autres cytokines inhibent la sécrétion d'ACTH comme le *transforming growth factor β*. La production de CRH est stimulée par les agonistes adrénergiques (noradrénaline), la sérotonine et inhibée par la substance P, les opiacés et l'acide γ-aminobutyrique. Il existe un rétrocontrôle négatif des glucocorticoïdes sur l'axe corticotrope : ils inhibent la production d'ACTH, de CRH et d'AVP (Figure 9).

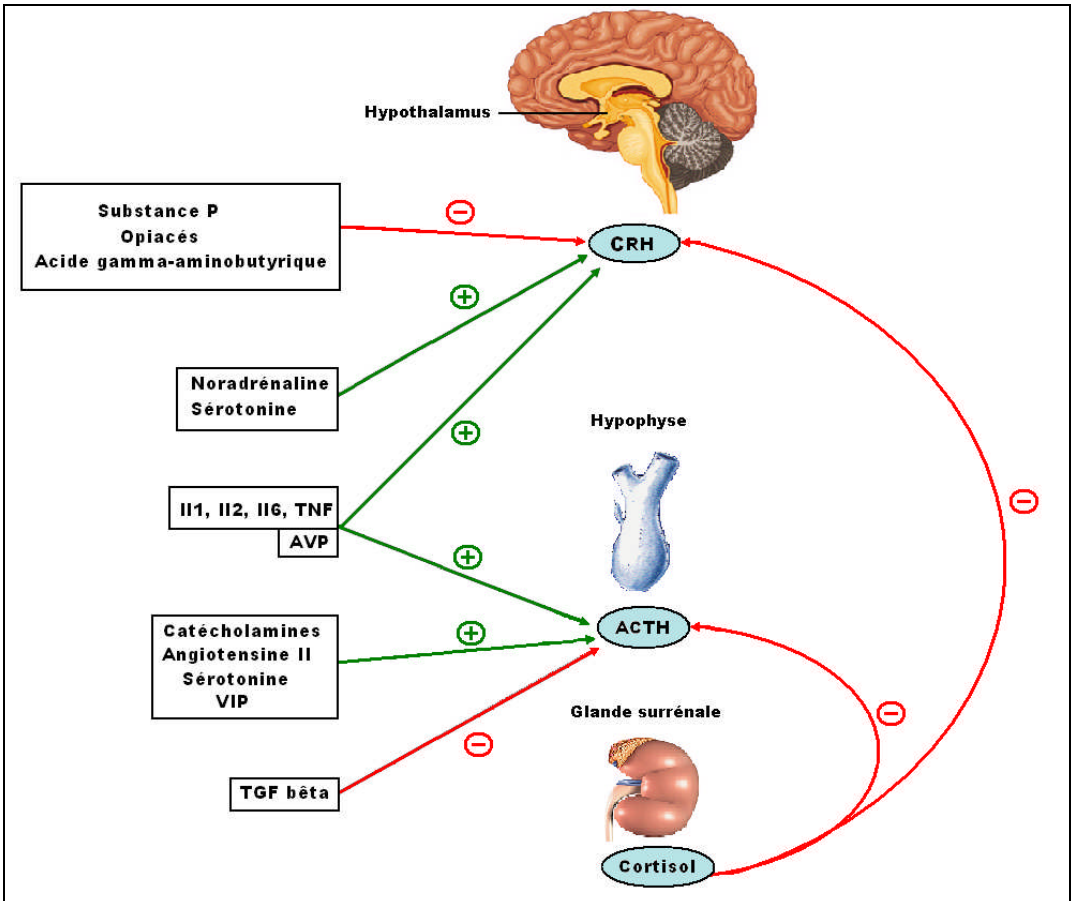


Figure 9 : Régulation de la synthèse de cortisol.

Le squelette de base des glucocorticoïdes naturels est le 5 β-pregnane ou 10,13-diméthyl-cyclopentoperhydrophénantrène auquel s'ajoute une chaîne à 2 atomes de carbone sur le cycle D en position 17 (Figure 10).

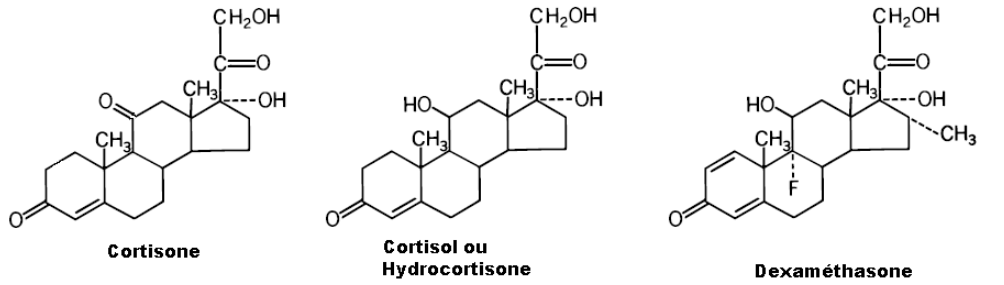


Figure 10 : Structure chimique des glucocorticoïdes.

Les dérivés des glucocorticoïdes synthétisés à partir du cortisol (tableau 2) ont une durée d'action plus longue, une activité anti-inflammatoire plus importante, et des propriétés minéralocorticoïdes moindre que la molécule mère, parmi lesquels on trouve la dexaméthasone, analogue synthétique élaboré à partir des corticoïdes naturels qui sont la cortisone et l'hydrocortisone.

	Activité anti-inflammatoire	**Activité minéralo-corticoïde**	**Demi-vie biologique (heures)**
Hydrocortisone	1	1	8-12
Cortisone	0.8	0.8	8-12
Prednisolone	4	0.8	12-36
Méthylprednisolone	5	0.5	12-36
Triamcinolone	5	0	12-36
Bétaméthasone	25	0	36-54
Dexaméthasone	25	0	36-54
Cortivazol	60	0	>60

Tableau 2 : Tableau comparatif de l'efficacité des différents glucocorticoïdes.

PRINCIPAUX EFFETS PHYSIOLOGIQUES DES GLUCOCORTICOÏDES

⇒ *Effets immunologiques et anti-inflammatoires*

Le cortisol agit sur quasiment toutes les cellules de l'immunité (polynucléaires neutrophiles, lymphocytes, monocytes, macrophages, éosinophiles, basophiles) en modulant d'importantes fonctions cellulaires telles que la migration, le chimiotactisme, l'apoptose, la phagocytose, le métabolisme anti-oxydatif, l'adhérence et la production de cytokines. Il favorise la migration des lymphocytes de la circulation vers les organes lymphoïdes et inhibe la migration des neutrophiles et des macrophages vers les sites inflammatoires, ce qui a pour conséquence une diminution de l'inflammation locale.

Les glucocorticoïdes stimulent la production de multiples facteurs anti-inflammatoires comme l'agoniste du récepteur à l'IL1. L'équipe de Skundric [125] a démontré que les corticoïdes augmentent le taux d'expression de l'agoniste au récepteur de IL 1 dans les cellules de Schwann ; d'autres auteurs ont montré une augmentation de l'activité de l'agoniste au récepteur de IL1 dans les cellules épidermiques [126] ; il a aussi été démontré qu'une stimulation des cellules hépatocytaires avec de l'IL 1 ou de l'IL 6 conduisait à une amplification de la libération d'IL1-ra (interleukin 1 receptor antagonist) [127]. Par ailleurs, les corticoïdes augmentent le taux d'IL-10 chez l'homme et chez la souris suite à une exposition au LPS [128], [129].

Les glucocorticoïdes inhibent la synthèse ou l'action de la plupart des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-8, TNF-α) [130], [131] , IL-2, interféron (IFN-γ) [132], [133], IL-5 [134]. Calandra et al ont démontré que les corticoïdes induisent la production de MIF (Macrophage Migration Inhibitory Factor) [135], un produit de l'hypophyse qui fut la première cytokine décrite en 1966. La production de MIF est down régulée par IL-10 [136]. Le MIF s'oppose aux effets inhibiteurs des corticoïdes sur la production de cytokines de l'inflammation par les monocytes humains activés par le LPS. La production des corticoïdes est également inhibée par l'α-defensine qui entre en compétition avec l'ACTH pour son récepteur [137].

En favorisant la production de lipocortine1, les glucocorticoïdes inhibent la synthèse de phospholipase A2 et ainsi, la cascade de l'acide arachidonique permettant de réduire la production des leucotriènes pro-inflammatoires [138]. Enfin, la synthèse de la COX-2 [139] et de la NO synthase inductible [140] est aussi inhibée par les corticoïdes (Figure 11). Il a été montré que les corticoïdes inhibent l'expression de l'iNOS [140], [141], mais pas son activité.

Ce qui réduit la production de NO, connu pour être un vasodilatateur, intervenant dans les défaillances cardiovasculaires au cours du sepsis.

Les glucocorticoïdes augmentent la synthèse et la transcription d'IκB, inhibiteur du NF-$_{\kappa}$B. Au cours du sepsis la stimulation des cellules provoque l'addition de groupements phosphates sur la protéine I$_{\kappa}$B, qui vont subir une dégradation protéolytique conduisant à la libération de NF-$_{\kappa}$B qui va transloquer dans le noyau pour activer ses gènes cibles [142].

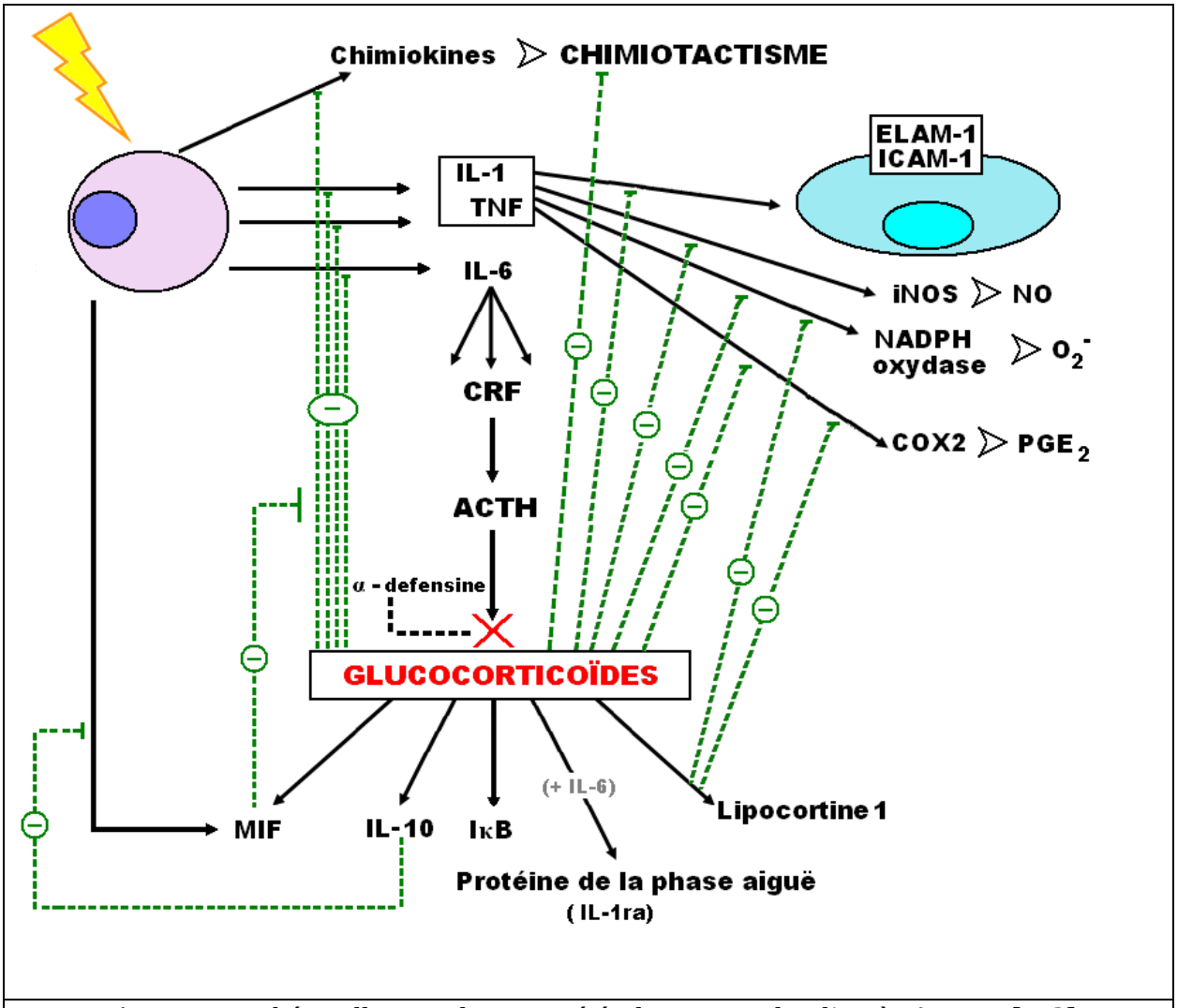


Figure 11 : schéma illustrant les propriétés des corticoïdes d'après Annane [143]

⇒ ***Effet hémodynamique des corticoïdes :***

Les effets hémodynamiques des corticoïdes sur l'élévation de la pression artérielle sont connus depuis fort longtemps. Un traitement prolongé par corticoïde est souvent à l'origine

d'une hypertension artérielle tandis qu'à l'inverse, l'hypotension artérielle est l'un des symptômes de l'insuffisance surrénalienne. L'inhibition du cortisol endogène par l'administration de RU486 est responsable, sur un modèle de rat Wistar, d'une baisse de 20 mmHg de la pression artérielle moyenne sans altération du débit cardiaque et témoigne donc essentiellement d'un abaissement des résistances vasculaires périphériques [144]. Toujours dans cette étude, l'inhibition du cortisol par le RU486 s'accompagne d'une hypovaso-réactivité aux catécholamines sans modification de l'activité de la vasopressine. Ces constatations sont probablement plus en rapport avec l'activité glucocorticoïde que minéralocorticoïde étant donné l'absence de modification du bilan sodé par le RU486 et la correction de l'hypovaso-réactivité par l'administration de corticoïde exogène.

Sur un modèle de choc endotoxinique par LPS chez le rat, l'administration concomitante de glibenclamide (inhibiteur des canaux potassiques ATP-dépendants) et de dexaméthasone limite les effets correcteurs du glibenclamide sur la pression artérielle. A l'inverse, l'administration de dexaméthasone seule corrige l'hypotension. Les auteurs concluent que la dexaméthasone limite l'activation des canaux potassiques ATP-dépendants [145]. Cependant, aucune étude n'a, par la suite, mis en évidence un rôle direct des glucocorticoïdes sur les canaux potassiques ATP-dépendants. L'hypothèse la plus probable est que les glucocorticoïdes, en inhibant NF-κB, bloquent la synthèse de iNOS et ainsi de NO, principal activateur de ces canaux [146]. Par ailleurs, l'inhibition par la dexaméthasone de la conversion de l'acide arachidonique en prostacycline (PGI2) par la cyclo-oxygénase 2, au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires, participe aussi très probablement à la restauration de la vasoréactivité. Enfin, une étude *in vitro* sur des cellules musculaires lisses vasculaires d'aorte de rat évoque l'implication du système des phospho-inositides. L'incubation de ces cellules avec du cortisol (0,02 à 5 μg/ml) entraîne une augmentation d'inositol-3-phosphate avec libération de calcium du réticulum sarcoplasmique et l'amélioration de la réactivité vasculaire [147].

Ces travaux expérimentaux sont concordants et sont complétés par les résultats des différents essais cliniques menés chez l'homme. Une étude randomisée en *cross over* chez des volontaires masculins montre que les effets vasculaires précoces de l'administration d'hydrocortisone (200 mg sur une période de 3 heures) ne sont pas liés au NO [148]. Ces données chez le sujet sain confortent les résultats antérieurs du travail de Baghat *et al.* Dans lequel l'hypotension induite par l'injection de LPS chez des volontaires était corrigée par l'administration deux heures avant de 100 mg d'hydrocortisone *per os* [149]. L'utilisation

d'inhibiteurs de la COX-2 ou de la NO synthase ne corrigeait pas, là aussi, l'hypovaso-réactivité. Chez les patients en choc septique, la réponse vasculaire à la noradrénaline est rétablie une heure après l'administration de 50 mg d'hydrocortisone en intraveineux [150]. Le même résultat est retrouvé dans un autre travail avec non-implication du système rénine angiotensine ou du monoxyde d'azote [86].

De nombreux essais thérapeutiques randomisés ont été réalisés avec de faibles doses de corticoïdes sur une période prolongée et retrouvent de façon concordante une amélioration de l'hémodynamique périphérique et des résistances vasculaires sans augmentation du débit cardiaque [151-155]. La rapide normalisation (< 3 heures) de la pression artérielle par les corticoïdes oriente vers des mécanismes non génomiques tandis que, dans les suites, l'inhibition d'iNOS participe à l'amélioration de la vasoréactivité.

PRINCIPAUX MÉCANISMES D'ACTION DES GLUCOCORTICOÏDES

⇒ *Action génomique*

La molécule de glucocorticoïde (RG) traverse la membrane cellulaire par diffusion passive et se lie ensuite à un récepteur spécifique intracytosolique. C'est une protéine de 94 kD, ubiquitaire et présentant de nombreux isoformes. RGα est la forme se liant aux glucocorticoïdes tandis que RGβ a probablement une fonction inhibitrice sur RGα en créant un hétéro dimère inactif RGα/RGβ [156]. Ce récepteur appartient à la superfamille des récepteurs aux stéroïdes, on distingue 3 domaines fonctionnels (Figure 12):

- Domaine d'activation du gène (ou de régulation transcriptionnelle), ou domaine immunogénique.
- Domaine de liaison à l'ADN
- Domaine de liaison au ligand

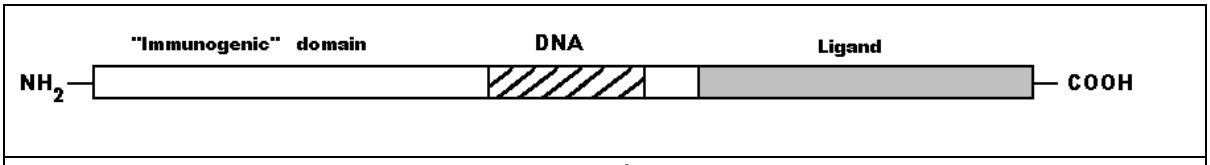


Figure 12 : Structure du récepteur aux corticoïdes

Le RG est présent sous forme inactive dans le cytosol, lié à un complexe protéique dont la « heat-shock protein » HSP 90 (protéine de choc thermique) et l'immunophiline (IP) ainsi que

d'autres protéines encore mal connues [157], [158]. La liaison du ligand sur le récepteur va provoquer la dissociation du complexe protéique et l'ensemble ligand-récepteur migre dans le noyau. Le complexe interagit avec l'ADN au niveau de sites accepteurs appelés « Glucocorticoids-Responsive-Elements » ou GRE, et exerce ainsi soit une activation soit une inhibition de la transcription. Lorsque la transcription est activée il se produit une augmentation de production de protéines anti-inflammatoires comme la lipocortine-1 (ou annexine-1), IL 10, protéine IkB [138], [159], [160], cette dernière participe aussi à la transrépression en empêchant la translocation nucléaire de NF-κB et sa fixation sur la séquence NF-κB *responsive element* [161]. A l'inverse lorsque la transcription est inhibée par régulation négative directe via un site de liaison négatif ou nGRE, la transcription des gènes de l'inflammation comme l'interleukine-1 (IL-1) ou l'interleukine-2 (IL-2) est réprimée par l'interaction directe du RG activé avec des GREs négatifs [162]. Le complexe ligand-récepteur peut entrer en compétition directe avec les facteurs de transcription tels que AP-1 pour la fixation des co-activateurs nucléaires nécessaires à leur liaison à l'ADN, empêchant ainsi la promotion de gènes pro-inflammatoires [163] (Figure 13).

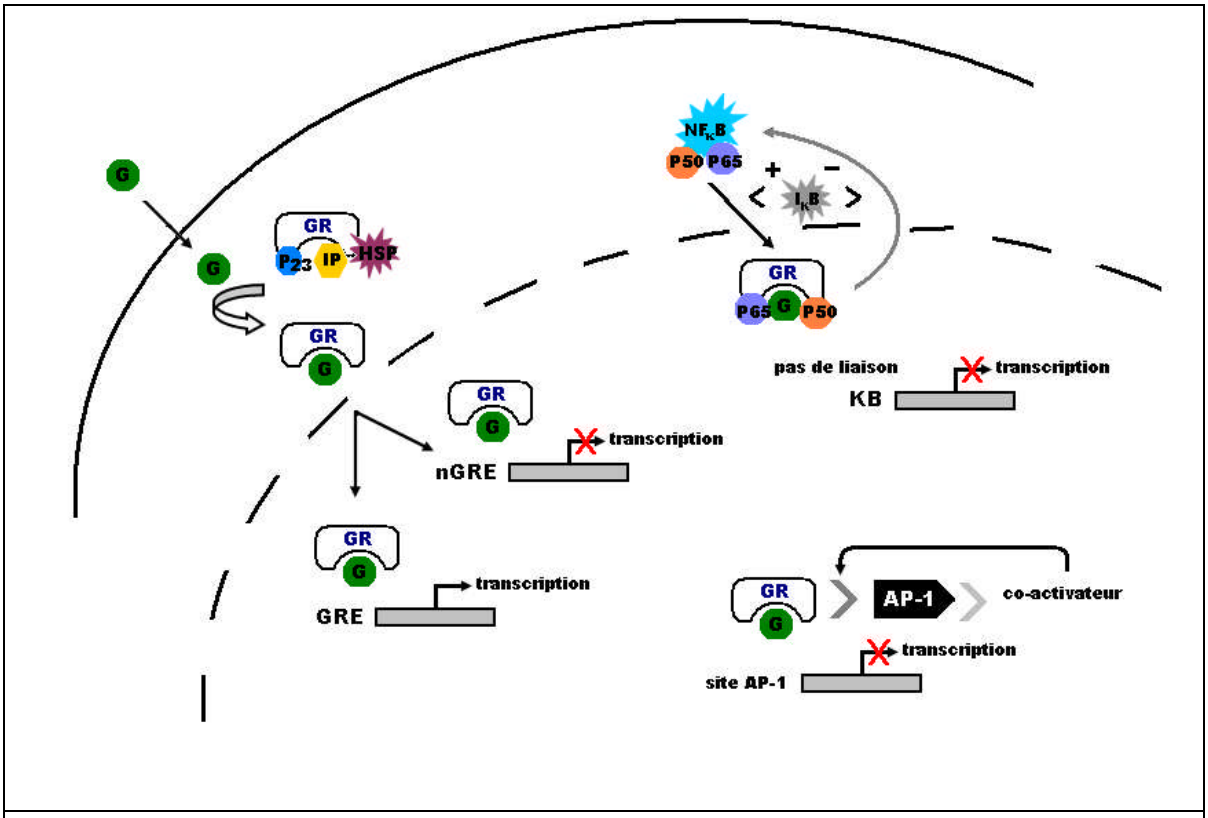


Figure 13 : Action génomique des corticoïdes

⇒ ***Action non génomique***

L'action non génomique peut être spécifique, avec la membrane elle-même, des canaux ioniques (Na^+, Ca^{++}), ou médiée par le récepteur aux glucocorticoïdes. Cette réponse est responsable des effets rapides des corticoïdes (de quelques minutes jusqu'à quelques heures).

Interactions non spécifiques avec la membrane cellulaire. Les glucocorticoïdes peuvent interagir rapidement avec les membranes cellulaires cytosoliques et mitochondriales. Ils s'intercalent dans la membrane phospholipidique, modifiant ses propriétés physico-chimiques et ses interactions membrane-protéines [164]. En diminuant les flux transmembranaires de sodium dans les cellules de l'immunité, les glucocorticoïdes participent à une immunosuppression rapide et à une diminution de la réponse inflammatoire [165]. Il semblerait aussi que la production d'ATP soit diminuée dans les mitochondries des cellules immunes, altérant ainsi la réponse inflammatoire et anti-infectieuse.

Interactions spécifiques avec un récepteur membranaire aux glucocorticoïdes. Les récepteurs membranaires aux glucocorticoïdes sont de découverte récente, mis en évidence sur les monocytes circulants par immunofluorescence. Ils sont structurellement différents des récepteurs cytosoliques et leur origine reste encore incertaine. Dans les pathologies inflammatoires chroniques comme la polyarthrite rhumatoïde, le nombre de récepteurs aux corticoïdes membranaires est fortement augmenté sur les cellules de l'immunité comme les monocytes ou les lymphocytes B [166]. Leur nombre, en particulier dans la polyarthrite rhumatoïde, peut d'ailleurs être un stigmate de l'activité de la maladie. L'une des hypothèses suggérées est que leur surexpression à la surface des cellules est un mécanisme protecteur dans ces situations inflammatoires chroniques.

Les effets immunosuppresseurs ont récemment été expliqués par la découverte, chez les lymphocytes T, des kinases p56lck (Lck) et p59fyn (Fyn), de la famille des tyrosines kinases Src, cibles cytosoliques des RG membranaires activés. Directement impliquées dans la transduction du signal des récepteurs lymphocytaires T, ces kinases jouent un rôle crucial dans la qualité de la transmission de l'activation lymphocytaire. Lck s'associe avec les corécepteurs CD4 ou CD8 tandis que Fyn est spécifique de CD3. Or, les glucocorticoïdes inhibent *in vitro* l'activité de Lck et de Fyn par un mécanisme dépendant du RG activé. Il semble aujourd'hui certain que, dans les lymphocytes T, les RG appartiennent à un complexe protéique incluant HSP 90 mais aussi Lck et Fyn lié étroitement au récepteur lymphocytaire

T. Ainsi, la fixation d'un glucocorticoïde au RG disjoint le complexe multiprotéique lié au récepteur lymphocytaire T et redistribue les kinases Fyn et Lck, perturbant ainsi très rapidement la transmission de l'activation lymphocytaire et favorise l'effet immunosuppresseur des corticoïdes [167].

Effets médiés par le récepteur aux glucocorticoïdes. Le récepteur aux corticoïdes, dans sa forme inactive, est retenu dans le cytoplasme par un complexe multiprotéique masquant ses sites de liaison à l'ADN. Cet ensemble comprend entre autres les HSP et une série de kinases de la famille du système de signalisation MAPK (mitogen-activated protein kinase) dont fait partie Src. Lors de l'activation du RG, outre la libération du site de liaison à l'ADN œuvrant pour les effets génomiques, Src est libéré du complexe HSP90. Src inhibe très rapidement le relargage de l'acide arachidonique de la voie de la phospholipase A2 (PLA2) en stimulant l'activation de la lipocortine 1, tous deux importants médiateurs de la synthèse des leucotriènes pro inflammatoires [168]. Enfin, les glucocorticoïdes inhibent deux enzymes clefs de la réponse inflammatoire : iNOS (inductible nitric oxide synthase) responsable de la production de NO et la COX-2 (cyclo-oxygénase 2).

CHOC SEPTIQUE ET INSUFFISANCE SURRÉNALIENNE AIGUË

La prise en charge de l'insuffisance surrénalienne au cours du choc septique reste aujourd'hui débattue. L'abandon des fortes doses de corticostéroïdes au profit de faibles posologies administrées sur de courtes périodes témoigne des hésitations encore récentes sur la physiopathologie de l'insuffisance surrénalienne au cours du choc septique. En effet, ces patients présentent une réponse inflammatoire exagérée en rapport avec l'insuffisance surrénalienne relative.

La définition de l'insuffisance surrénalienne dans le cadre du choc septique recouvre deux champs distincts. On retrouve la classique défaillance de l'axe corticotrope mais aussi, démontrée plus récemment, l'apparition d'une résistance périphérique tissulaire à l'action des corticoïdes.

⇒ *Défaillance de l'axe corticotrope*

L'incidence globale de l'insuffisance surrénalienne chez les patients en sepsis sévère s'élève à 20 % mais atteint plus de 50 % chez les patients en choc septique [169]. Les mécanismes mis en jeu sont complexes et, finalement, assez peu connus. Il existe une synthèse non adaptée à la demande tissulaire de CRH, d'ACTH et de cortisol. Néanmoins, dans certains cas, l'axe peut être physiquement altéré. De même, certains traitements comme l'étomidate, agent anesthésique largement utilisé en réanimation, inhibent les enzymes de la synthèse du cortisol comme la 11-β-hydroxylase qui permet la transformation du 11-β-désoxycortisol en cortisol [170]. De façon plus anecdotique, le kétoconazole à fortes doses aboutit aux mêmes conséquences [171]. Récemment, la physiopathologie de l'insuffisance surrénalienne relative s'est enrichie de l'implication du relargage de TNF-α et d'IL-1 au cours du choc septique. Le TNF-α inhibe la stimulation de la synthèse d'ACTH par le CRH [172], [173] et celle du cortisol en bloquant les effets de l'ACTH et de l'angiotensine II sur les cellules surrénaliennes [174]. La diminution de production du cortisol semble aussi en rapport, dans certains états graves septiques, postopératoires ou chez les brûlés étendus, avec un manque de substrat dont l'HDL [175-177].

⇒ *Résistance tissulaire aux corticoïdes*

La cortico-résistance est une conséquence bien connue des traitements prolongés par corticoïde, en particulier dans les maladies inflammatoires chroniques et la broncho-pneumopathie obstructive. Néanmoins, l'affirmation de son implication dans les phénomènes aigus comme le choc septique est de découverte relativement récente. Ainsi, sur des modèles expérimentaux, la capacité de fixation des récepteurs aux corticoïdes est abaissée et le taux de PLA2 augmenté malgré une cortisolémie élevée. D'autres travaux ont par ailleurs démontré que l'activité dans le noyau des récepteurs aux glucocorticoïdes est altérée malgré des concentrations suffisantes en cortisol.

CORTICOÏDES ET CHOC SEPTIQUE

L'utilisation de corticoïdes pour traiter les infections sévères datent des années cinquante et était une pratique courante jusqu'au milieu des années soixante-dix. Weitzmann [178] a conclu que cette pratique ne reposait sur aucune évaluation rigoureuse d'efficacité et de

tolérance dans cette indication. Par la suite Schumer [179] a confirmé un probable effet bénéfique des corticoïdes dans le traitement du choc septique. Mais là encore des critiques furent émises concernant la méthodologie employée et plusieurs essais thérapeutiques contrôlés, randomisés, ont alors été conduits pour évaluer l'efficacité et la tolérance des corticoïdes administrés à fortes doses pendant de courtes périodes. Ces études n'ont pas permis de montrer de réel bénéfice d'une telle stratégie et leurs résultats ont abouti à l'abandon de la corticothérapie dans le traitement des sepsis sévères [180]. Cette thérapeutique initialement administrée sous forme de bolus à forte dose, avec l'objectif de limiter le relargage cytokinique, ne permettait pas de gain de survie.

Depuis quelques années, un regain d'intérêt pour les corticoïdes dans le traitement du choc septique est apparu suite aux résultats de nouvelles études, contrôlées contre placebo, randomisées, ayant évalué l'efficacité et la tolérance des corticoïdes administrés. Fait important, les doses de corticoïdes étaient moindres comparées aux études précédentes et dites supraphysiologiques, permettaient un sevrage complet des catécholamines avec une mortalité faible chez les patients en choc septique dépendant des catécholamines. En effet, des posologies de plus en plus faibles sur des périodes prolongées (< 300 mg/24 heures d'hydrocortisone pendant plus de cinq jours) ont été étudiées et tendent à retrouver une amélioration de la survie chez les patients en choc septique. Néanmoins, une étude multicentrique récente n'a pas mis en évidence de bénéfice sur la survie à 28 jours et en souligne les effets secondaires délétères (survenue d'un nouveau choc septique, hyperglycémie) [181]. Ainsi, les recommandations les plus récentes en limitent l'usage au choc septique ne répondant pas à l'expansion volémique et aux vasopresseurs [182].

La dernière méta-analyse sur le sujet ne retrouve pas d'amélioration globale de la survie à J28 [169]. Cependant, les auteurs soulignent l'hétérogénéité des doses et des durées de corticothérapie. Ainsi, l'analyse préétablie en sous-groupes retrouve, pour des faibles doses (< 300 mg/24 heures) et des durées prolongées (> 5 jours), une amélioration significative de la survie à J28 et de la mortalité hospitalière.

Matériels et Méthodes

VII. MATÉRIELS ET MÉTHODES

VII.1 Modèle animal

Pour étudier les nombreux et complexes mécanismes moléculaires du sepsis, divers modèles animaux ont été développés, le modèle le plus souvent employé étant la péritonite, il s'agit de ligaturer et perforer le caecum des animaux (CLP) [183]. Ce modèle animal constitue le gold standard par sa pertinence clinique et sa prise en charge le rapprochant du choc septique humain. C'est un modèle facile à mettre en place et ne nécessitant que peu de manipulation. Dans ce modèle, le sepsis provient d'un foyer infectieux poly microbien dans la cavité abdominale, suivie de la translocation bactérienne dans le compartiment sanguin, qui déclenche alors une réponse inflammatoire systémique. L'évolution du sepsis sera plus ou moins rapide en fonction du diamètre ou du nombre de perforations réalisés dans le caecum, avec une évolution métabolique et hémodynamique au cours du temps proche de ce que l'on retrouve chez l'homme [184], [185].
Ce modèle permet d'analyser de larges échantillons, de maitriser les variables confondantes, et ce à des coûts acceptables.

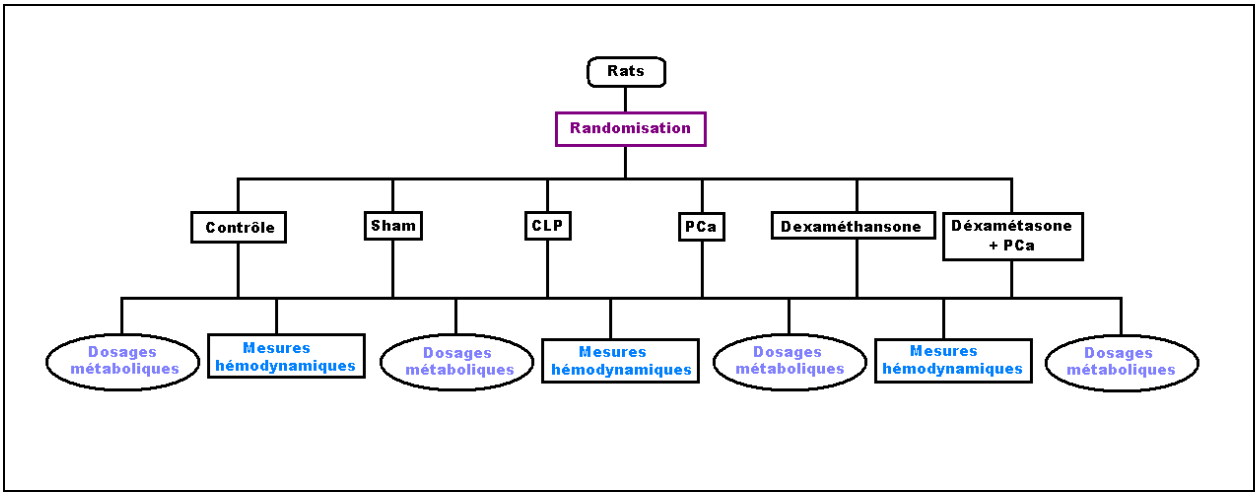
VII.2 Méthodologie

Toutes les expérimentations de cette étude ont été approuvées par la commission institutionnelle de Nancy sur les soins et l'utilisation des animaux. Tous les animaux ont été traités conformément aux principes de soin d'animaux de laboratoire du NIH.
Des rats mâles Wistar (Dépré, St Doulchard, France) pesant entre 300-350g, chaque animal est hébergé en cage individuelle dans un environnement contrôlé au sein d'une animalerie règlementaire et certifiée pendant au moins 7 jours après réception à une température de 22 C° et exposés à un cycle de 12 heures de lumière pour 12 heures d'obscurité avec une humidité maintenue autour de 65% , les animaux ont accès à la nourriture et à l'eau *ad libitum.*

6 groupes de rats ont été définis :

- ✓ Un groupe **Contrôle** : animaux sains et n'ayant subi aucune intervention chirurgicale avant la prise de mesures.
- ✓ Un groupe **Sham** : animaux ayant subi une incision de l'abdomen avec manipulation de caecum mais sans ligature et perforation caecale.
- ✓ Un groupe **péritonites « CLP»** : animaux ayant subi une ligature et perforation caecale.
- ✓ Un groupe **dexaméthasone « DEXA»** : animaux ayant subi une CLP et perfusés avec de la dexaméthasone (2mg/kg de H+4 à H+18).
- ✓ Un groupe **Protéine C Activée « PCa»** : animaux ayant subi une CLP et perfusés avec de la PCa (33µg/kg/h de H+4 à H+18).
- ✓ Un groupe **Dexaméthasone + protéine C activée «DEXA+PCa»** : animaux ayant subi une CLP et traités avec la dexaméthasone (2mg/kg de H+4 à H+18) et la protéine C activée (33 µg/kg/h de H+4 à H+18).

Tous les groupes ont reçu une expansion volémique de 10 ml/kg/h de H+4 après la fin de la chirurgie jusqu'à H+18, excepté le groupe contrôle.



PROTOCOLE

Les rats sont anesthésiés à flux continu à l'isoflurane (un agent anesthésique volatil de la famille des éthers halogénés) avec 95% d'oxygène et 5% de dioxyde de Carbone. Les halogénés actuels permettent une réversibilité rapide de la profondeur de l'anesthésie

(quelques minutes pour l'isoflurane). Cela permet un réveil rapide et donc une diminution des temps de surveillance postopératoire. L'animal est ensuite préparé pour la chirurgie. Il est placé sur une plaque chauffante afin de garder la température de l'animal stable (aux environs de 37.9-38°C pour le rat). Le rat est opéré dans le respect des conditions d'asepsie.

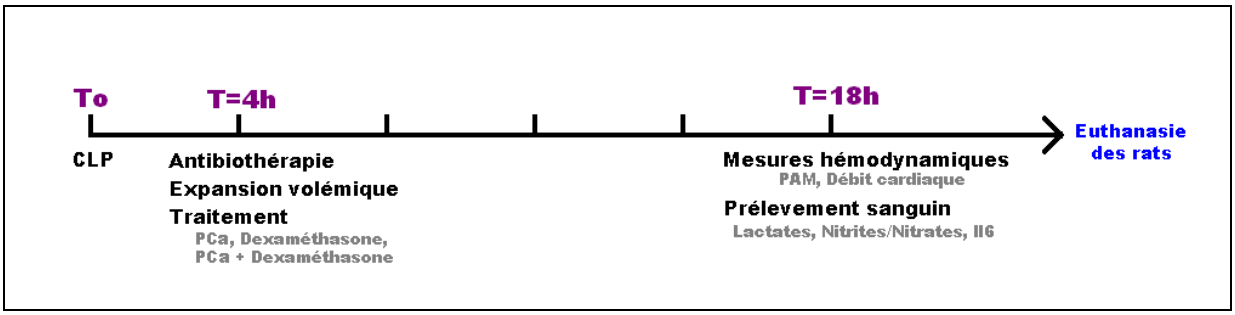
Une incision médiane de la peau et de la paroi musculaire abdominale de 2 à 3 cm est réalisée afin de pouvoir atteindre le caecum. Celui-ci est ligaturé grâce à du fil (3/0) et une partie de son contenu libéré dans la cavité abdominale à l'aide d'une aiguille 21G, par la formation d'un seul orifice. Le caecum est ensuite remis dans l'abdomen et la paroi abdominale refermée.

L'artère carotide interne gauche ainsi que la veine jugulaire externe droite ont été cathétérisées (PE-50). Les cathéters sont tunnelisés en sous cutané avec un orifice de sortie au niveau de la région cervicale postérieure. La partie extériorisée du cathéter est reliée à un dispositif de pivotement laissant la possibilité à l'animal de se mouvoir librement et évitant que ce dernier atteigne, arrache ou ronge les cathéters. Ce dispositif est lui-même relié à des seringues électriques.

La mise en place de cathéters tunnelisés permet de mesurer les paramètres vitaux tels que la pression artérielle moyenne et la fréquence cardiaque. Après avoir suturé les différentes incisions, l'animal est placé dans une chambre de réveil. Immédiatement après la chirurgie, une injection de nalbuphine (Nubain® 1mg/kg) est réalisée à visée antalgique chez tous les rats. A H+4, un remplissage vasculaire est débuté (sérum physiologique 10mL/Kg/h) jusqu'à H+18 et une antibiothérapie à large spectre est injectée (imipenem, Tienam® 10mg/Kg).

Les investigations sont débutées après une période de 18 heures, soit 14 heures de perfusion continue, avec accès libre à l'eau et à la nourriture. Ce délai permet d'avoir un rapport optimal entre le nombre d'animaux survivants et la gravité de la pathologie. Dans le groupe CLP non traitée, la mortalité avoisine en effet les 50%, comparable au taux de mortalité du choc septique en pathologie humaine.

En plus du groupe SHAM, un sixième groupe sert de comparateur. Il s'agit du groupe CONTROLE, dans lequel les rats ne sont ni opérés ni perfusés chroniquement la veille des investigations. Chaque groupe est composé de six rats.



Une fois l'expérimentation et les prises des mesures hémodynamiques et les prélèvements sanguins terminés, les rats sont euthanasiés par l'injection d'une dose létale de thiopental sodique. Les cadavres sont ensuite stockés dans un container dans une chambre froide qui est vidé une fois par semaine et envoyé à l'incinérateur de la Faculté de Médecine.

ETUDE DE SURVIE

L'étude de survie a été réalisée sur des animaux différents de ceux ayant permis d'obtenir les résultats hémodynamiques. Les groupes et le protocole sont identiques à ceux utilisés précédemment, exception faite de la pose d'un cathéter fémoral pour la mesure de pression artérielle moyenne, chaque groupe de rats est composé de quinze individus.

VII.3 Choix et dose du glucocorticoïde

Le choix et la dose de glucocorticoïdes utilisés dans nos expériences doivent impérativement répondre à ces deux critères :

1. le glucocorticoïde employé doit avoir une demi-vie suffisante pour être encore efficace au delà de 18 heures après son injection
2. une dose dite supra-physiologique faible doit être employée car seule reconnue comme efficace.

La dexaméthasone, cinq fois plus anti inflammatoire que l'hydrocortisone, répond au premier critère. En effet sa demi-vie plasmatique est élevée, de 36 à 54 heures. La dose de dexaméthasone de 1mg/kg a été déterminée sur base des travaux de A. Mansart [186] effectués dans notre laboratoire.

VII.4 Dose de PCa administrée

La disponibilité de la rhAPC (Xigris®) sur le marché facilite sa procuration, de ce fait nous avons utilisé la PCa recombinante humaine dans notre étude. De plus l'activité anticoagulante de la PCa est espèce spécifique, par contre ses effets cytoprotecteurs ne sont pas espèce spécifique. Dans notre étude nous avons cherché à nous rapprocher de la dose utilisée en clinique (24µg/kg/h) et à limiter l'action anticoagulante de la PCa. Plusieurs doses de PCa ont été testées au laboratoire et c'est la concentration 33µg/kg/h qui a montré son efficacité sur le plan hémodynamique par amélioration de la dysfonction cardiovasculaire [187].

VII.5 Mesure *In-vivo*

MESURES HÉMODYNAMIQUES

⇒ ***Mesure de pression***

Au bout de 18 heures après les premières manipulations (péritonites et pose de cathéter) les rats sont à nouveau anesthésiés à l'isoflurane, la température rectale est monitorée en continu et maintenue à 37C°. L'artère fémorale est canulée (PE-50), la pression artérielle et la fréquence cardiaque sont suivies en continu grâce à une tête de pression et un moniteur (Cardiomax III ®, *Colombus Instruments, Ohio, USA).*

Le cathéter introduit dans l'artère fémorale est relié à un capteur de pression. Les variations perçues par le capteur sont transformées en variations électriques. En effet, une sonde de pression est un dispositif destiné à convertir les variations de pression en variations de tension électrique. Lorsque la sonde est reliée à un système numérique, les variations analogiques sont d'abord converties en signaux numériques binaires par une interface avant d'être transmises à l'ordinateur de contrôle et de gestion.

⇒ ***Mesure du débit cardiaque***

Le débit cardiaque (Qc) est un volume de sang éjecté par le cœur sur un laps de temps donné. Il est très souvent exprimé en litre de sang par minute (l/min).Il dépend de la fréquence cardiaque (nombre de battements par minute) et du Volume d'éjection systolique « VES» (Volume de sang éjecté par le cœur dans la circulation systémique à chaque battement).

Qc (l/min)= VES (l) * Fc (contractions /min).

Le débit cardiaque est mesuré grâce à un cathéter veineux et un cathéter artériel doté d'une thermistance, après injection par voie veineuse d'un indicateur thermique (sérum physiologique entre 2et 8 C°). La thermistance du cathéter artériel permet d'enregistrer une courbe de thermodilution via un système d'acquisition et un logiciel Cardiomax III *(Colombus Instruments, Ohio, USA).* Une certaine quantité de liquide (0.1ml) est injectée par la voie veineuse et la variation de la température par la thermistance située au bout du cathéter artériel (donc, en aval du lieu d'injection) est enregistrée.

Le débit cardiaque est calculé selon le principe de Stewart-Hamilton (l'aire sous la courbe de la thermodilution est inversement proportionnelle au débit circulant). La reproductibilité de la mesure du débit cardiaque répétée 2 à 3 fois et moyennée est très fiable.

MESURE DES PARAMÈTRES PHYSIOPATHOLOGIQUES

⇒ *Mesure du taux de lactates*

0,3 ml de sang artériel sont prélevés via l'artère fémorale dans des seringues pour prélèvement de sang artériel. La concentration en lactate a été déterminée avec un analyseur automatique des gaz du sang (ABL 700 ; Radiometer, Copenhagen, Danemark).

⇒ *Mesure du taux de nitrites et nitrates*

Les métabolites du NO (NO_2^-/NO_3^-) sont mesurés dans le plasma selon une méthode colorimétrique. Les échantillons sont dilués dans un volume égal et déprotéinisés par ultrafiltration dans des tubes avec un potentiel filtrant de 5 000 Dalton (Sartorius, Goettingen, Allemagne) centrifugés à 3000rpm pendant 45 minutes à 4°C. Les échantillons sont ensuite incubés à l'abri de la lumière en présence (10U/mL) de nitrate réductase, (629.2 µg/mL) de NADPH et de FAD (Roche Diagnostics) pendant 30 minutes à 37°C afin de réduire les nitrates en nitrites. Les nitrites totaux sont ensuite incubés 5 minutes en présence d'un volume égal du réactif de Greiss préparé en combinant une solution de sulfanilamide 1% dans HCl 10N et de N-(1-naphthyl)éthylène diamide 0.1% dans H3PO4 5% selon une proportion 1:1. L'absorbance est mesurée à 550 nm et la concentration de nitrites est déterminée à l'aide d'une courbe standard linéaire.

⇒ ***Mesure du taux de cytokines***

L'interleukine 6 a été dosé par la technique ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay), c'est une technique immuno-enzymatique de détection qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps. Les avantages de la technique sont l'utilisation d'anticorps monoclonaux qui rend la détection spécifique et la possibilité de quantifier grâce à la réalisation d'une gamme en parallèle. L'inconvénient est que la réaction enzymatique rend cette technique dépendante de la température et de la lumière.

⇒ ***Mesure de l'anion super oxyde et du NO***

La Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) est la méthode la plus spécifique de caractérisation des radicaux libres transitoires intervenant dans une multitude de réactions chimiques parmi lesquelles figure l'oxydation. Les méthodologies utilisées ont été basées principalement sur le piégeage de spin. Des ligands organiques ont été synthétisés, caractérisés puis appliqués à la complexation du fer (II) pour développer des piégeurs de spin spécifiques de NO et du O2 -.

La production de l'anion superoxide est déterminée en présence de la solution deferoxaminechelated Krebs-Hepes contenant 1 hydroxy- 3 methoxycarbonyl 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin (CMH, Noxygen, Germany) (500µM), deferoxamine (25 µmol/L) et DETC (5 µmol/L). La production du NO est mesuré par utilisation de spin trape colloide Fe(DETC)2.

VII.6 Western blot

Les vaisseaux sont prélevés et congelés à -80°C, puis sont broyés et homogénéisés grâce à des billes de 3mm de diamètre, dans un tampon de lyse qui a la particularité de protéger les protéines phosphorylées (Phosphosafe). Ensuite les protéines sont dosées selon la méthode Bradford, qui est une méthode de dosage colorimétrique. Les lysats obtenus sont déposés dans un gel de polyacrylamide pour migration, les protéines sont séparées selon leur taille. Par la suite les protéines sont transférées sur une membrane en PVDF (polyfluorure de vinylidène). Après saturation (2 heures) dans du TBS-T [Tris 100mM pH7,4, NaCl 150mM, Tween 0,1%] en présence de lait écrémé (5%), les membranes sont incubées toute la nuit à une température de 4 degrés avec les anticorps primaires dirigés contre les protéines à doser iNOS, Akt, P-Akt, et tubuline.

Les membranes sont ensuite rincées 3 fois pendant 10 minutes dans du TBS-T et incubées à température ambiante pendant 1 heure avec les anticorps secondaires couplés à la peroxydase. La peroxydase est révélée par chimiluminescence, après rinçage dans du TBS-T (3 fois pendant 10 min), grâce à un kit de détection (ECL-Plus Chimiluminescence kit, Amersham) et détectée à l'aide du système Fuji film Las-1000. Les résultats obtenus sont normalisés par rapport à la tubuline permettant d'attester d'une même quantité de protéines.

L'analyse quantitative du phospho-Akt a été normalisée par la quantification d'Akt total sur les mêmes membranes. Les membranes ont été incubées 20 minutes à 65C°, avec du tampon de stripping (2% SDS, 62.5mM TRIS pH6.8, 100mM Betamercaptoethanol). Après stripping (deshybridation protéine-anticorps), les membranes sont lavées trois fois dans TBS-T0.1%, bloquées et re-incubées avec l'anticorps anti Akt.

VII.7 Mesure *Ex-vivo*

Enfin une dernière série d'animaux répartis dans les groupes et selon les protocoles utilisés précédemment, a été réalisée. Après anesthésie des rats, les segments d'aorte thoracique (2mm) et artères mésentériques sont isolés et installés dans un myographe. Deux tiges métalliques sont insérées dans la lumière du vaisseau. L'une d'elles est reliée à un support dont la position peut être modifiée grâce à un micromètre. L'autre tige métallique est reliée à un capteur de force (jauge de contrainte, mesure de force isométrique) relié à un amplificateur et à un système d'acquisition et de traitement des données. Chaque segment est immergé dans une cuve de 10ml contenant une solution physiologique de composition suivante : 119mM NaCl, 14,9mM NaHCO3, 4.7mM KCl, 2.5mM CaCl2, 1.2mM MgSO4 7H2O, 2,5mM CaCl2, 1,18 mM KH2PO4, 5,5 mM glucose. Le pH est de 7.4, la solution est bullée avec un mélange de 95% O2 et 5% CO2 et rincée toutes les 15 minutes. Les segments d'aorte thoracique sont étirés à une tension de 5mN, permettant le développement d'une tension suffisante pour qu'ils puissent à nouveau exercer leur activité vasomotrice. Après une période de stabilisation de 20 min, la contraction maximale des vaisseaux est mesurée en deux étapes ; dépolarisation dans un bain de KCl (100mM), contraction au KCl (100mM) + phényléphrine (10µM).

La courbe « concentration-réponse » avec un agoniste vasoconstricteur (phényléphrine) (1nM à 100µM) nous a permis de déterminer la concentration de phényléphrine nécessaire pour un niveau de contraction identique dans les différents groupes. La courbe «concentration réponse» avec un agoniste vasodilatateur (acétylcholine) est étudiée suite à une vasoconstriction stable à la phényléphrine (1µM).

Avec la myographie, nous voulons étudier la réponse aux agents pharmacologiques de l'aorte thoracique et de l'artère mésentérique et cela par une évaluation de la contraction maximale en présence de KCl + phényléphrine et de la relaxation à l'acétylcholine. L'exploration des voies de signalisation impliquées nécessite l'utilisation d'inhibiteurs.

Dans la physiopathologie du choc septique, les voies des NOS et des COX semblent être les plus impliquées dans l'atteinte de la réactivité vasculaire. De ce fait, dans notre étude nous avons testé la vasoréactivité des vaisseaux après inhibition des métabolites des NOS par un inhibiteur non spécifique (LNAME) et des COX par une inhibition non spécifique (indométhacine).

VII.8 Méthodologie statistique :

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD. Pour les différences inter groupes, une analyse de variance à une voie (ANOVA) est utilisée. Pour les différences intra groupes, une analyse de variance à deux voies est employée. Les différences de survie ont été testées avec le test du Log-Rank. En cas de résultats significatifs, une comparaison est effectuée à l'aide du test de Bonferroni. Un $p < 0.05$ est considéré comme significatif.

Résultats

VIII. RÉSULTATS

Effet comparatif de la dexaméthasone et de la protéine C activée dans le traitement du choc septique expérimental chez le rat. **Comparative effects of Recombinant Human Activated Protein C and Dexamethasone in experimental septic shock.** Bouazza, Youcef; Sennoun, Nacira; Charlène Strub, Véronique Regnault, Sebastien Gibot, Ferhat Meziani, Patrick Lacolley & Bruno Levy. Intensive Care Med. 2011 Aug 18. (Voir texte intégral en annexe).

VIII.1 Objectifs du travail

La Surviving Sepsis Campaign (SSC) recommande l'utilisation de la protéine C recombinante humaine (grade IIB) et des glucocorticoïdes (grade IIC) pour la prise en charge du sepsis sévère et du choc septique [182].

Il a été démontré que la protéine C activée améliorait la survie chez les patients adultes atteints de choc septique [4]. D'autres travaux démontrent que la protéine C activée agit directement sur les cellules endothéliales, *via* son récepteur EPCR (endothelial protein C receptor) [188] et PAR1 (protease activated receptor-1), pour exercer des effets cytoprotecteurs multiples comme la down régulation de l'expression génique de certaines cytokines pro-inflammatoires [85], une activité antiapoptotique [189], anti-oxydante et enfin une préservation de l'intégrité de la barrière endothéliale [190], [191].

Des études récentes chez l'animal [192], [193] et en clinique [194] suggèrent que la protéine C activée améliore le dysfonctionnement vasculaire et myocardique et la réactivité vasculaire aux catécholamines au cours d'un choc endotoxinique. En effet, la PCa modulerait l'état pro-inflammatoire/pro-oxydant induit par l'endotoxine, diminuerait l'interaction endothélium/leucocyte et enfin favoriserait la stabilisation de la matrice extracellulaire [187].

De même, les glucocorticoïdes améliorent la mortalité du choc chez les patients les plus graves [169]. Le cortisol augmente la tension artérielle et la sensibilité aux agents vasopresseurs tels que les catécholamines et l'angiotensine II dans le muscle vasculaire lisse.

Même si les effets des glucocorticoïdes sur le NO restent complexes et encore mal connus, il apparaît cependant que les glucocorticoïdes augmentent l'expression de la NOS endothéliale à travers la protéine PI3K ainsi que l'activation et la phosphorylation de la protéine Akt ce qui permettrait le maintien de la perfusion micro vasculaire [195].

Le cortisol a des propriétés anti-inflammatoires efficaces, y compris la réduction du nombre et l'efficience de diverses cellules immunitaires, telles que des lymphocytes T et B, des monocytes, des neutrophiles et des éosinophiles situées au niveau des sites inflammatoires. Le cortisol diminue également la production des cytokines, des chimiokines et des eicosanoides et augmente la production du MIF (macrophage migration inhibitory factor) [196].

Par conséquent la protéine C activée et les glucocorticoïdes possèdent et agissent par des voies communes (iNOS, eNOS, Akt) mais également par des voies individuelles.

Sur la base de ces travaux, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle l'utilisation de la protéine C activée et des glucocorticoïdes en association est bénéfique comparée à leur utilisation seul.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons mis au point un modèle animal de choc septique par ligature et perforation caecale pour évaluer *in vivo* les effets de la PCa et de la dexaméthasone sur les paramètres hémodynamiques (débit cardiaque et pression artérielle moyenne) ainsi que sur les marqueurs biologiques comme la lactatémie et le taux de nitrite/nitrate (NO circulant). Par ailleurs, nous avons testé l'impact en *ex vivo* de ces traitements seuls ou en association sur la réponse contractile des aortes à la phényléphrine et sur la relaxation des aortes et des artères mésentériques à l'acétylcholine.

Enfin nous avons également étudié les effets des différents traitements sur les principales voies cellulaires probablement impliquées dans ce processus. . L'objectif général de ce travail de recherche est d'améliorer et/ou d'évaluer l'intérêt des stratégies thérapeutiques utilisées dans le traitement de la dysfonction cardiovasculaire observée au cours du choc septique.

VIII.2 Résultats

MESURES HÉMODYNAMIQUES

La pression artérielle moyenne (PAM) est significativement plus basse dans le groupe CLP non traité (81±6 mmHg) comparée au groupe contrôle et Sham (114±11mmHg) ($p<0.05$), l'administration de protéine C activée ou de dexaméthasone seule ou en association permet de restaurer la pression artérielle qui est significativement augmentée par rapport au groupe péritonite (PCa: 97±12 mmHg; Dexa: 101±5 mmHg; Dexa + APC: 110±11 mmHg) ($p<0.01$). (Figure 1.A)

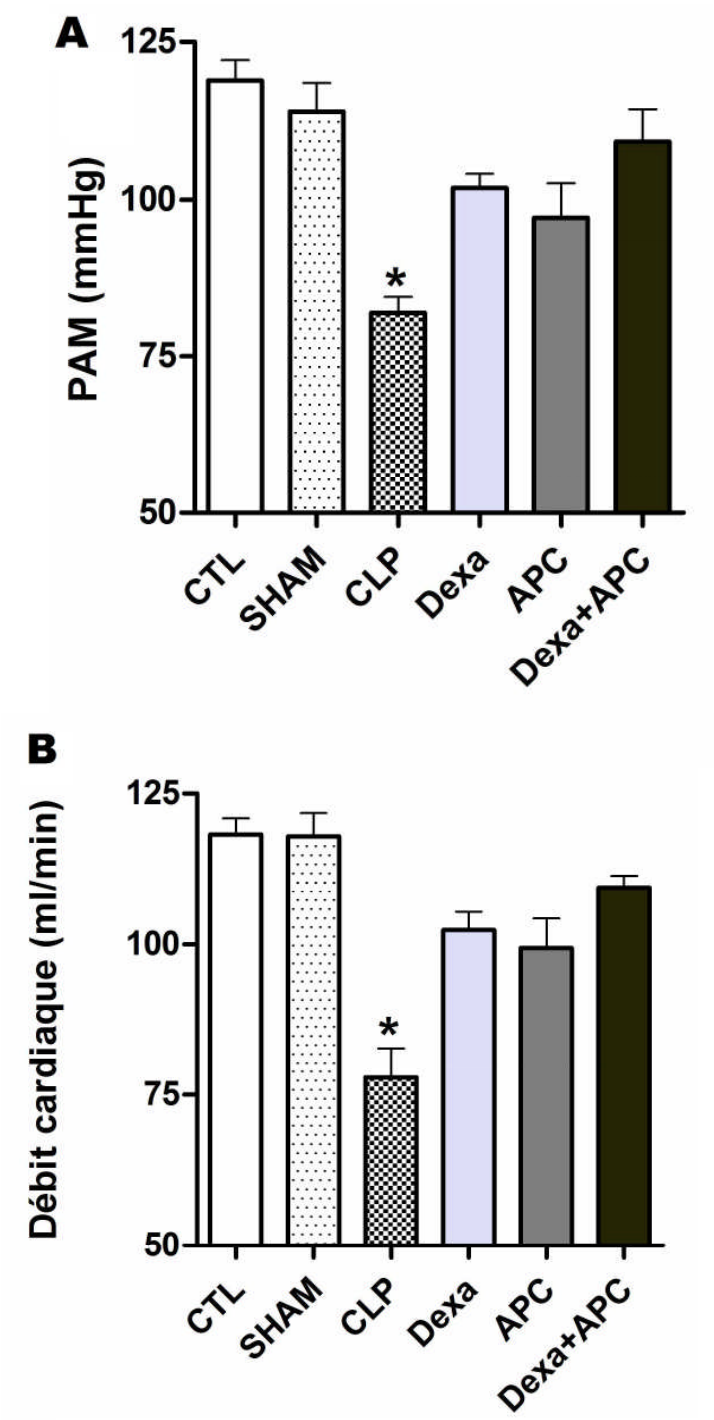


Figure1 : Valeurs hémodynamiques.

A. Pression artérielle moyenne (PAM) en mmHg
B. Débit cardiaque (Qc) en ml/min.

Les données sont en moyenne ± SD; n = 6 rats pour chaque groupe.* P < 0.05 versus tous les autres groupes.

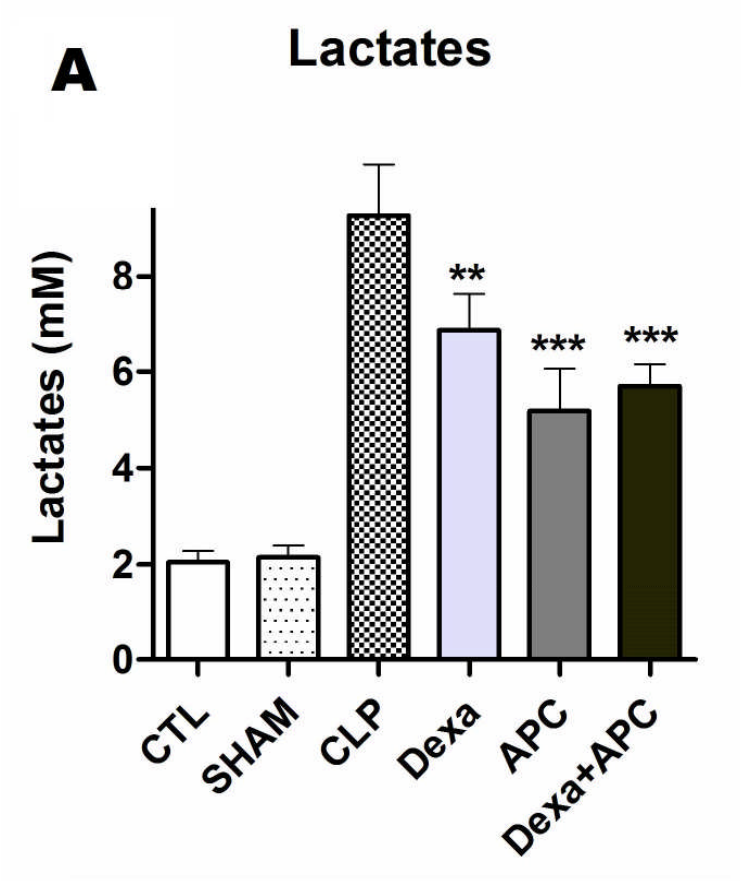
De même, comparé au groupe contrôle (118±9 ml/min), le débit cardiaque est diminué chez le groupe sepsis (78±13 ml/min) P < 0.01. Il est significativement augmenté avec tous les traitements (PCa: 99±11 ml/min; DEXA: 102±7 ml/min; PCa+DEXA : 110±5 ml/min).

MARQUEURS BIOLOGIQUES

L'acidose lactique est le principal stigmate dosable de la souffrance tissulaire durant l'état de choc quelle que soit son étiologie. Les dosages réalisés immédiatement après le sacrifice de l'animal retrouvent une augmentation majeure de la lactatémie dans le groupe CLP non traité (9±2 mmol/l, p<0,01). Dans les trois groupes traités, il n'y a pas de différence significative du taux de lactates (PCa: 5±2.3 mmol/l; DEXA: 7±2 mmol/l; PCa+DEXA : 5.7±1 mmol/l). Mais ils sont significativement diminués par rapport au groupe péritonite (Figure 2 A).

Les prélèvements sanguins effectués, pour tous les groupes, montrent que les taux de nitrite/ nitrate (Figure 2B), d'interleukine 6 (Figure 2 C) sont significativement supérieurs pour le groupe sepsis n'ayant pas de traitement comparé au groupe Sham. L'administration de dexaméthasone et/ ou de protéine C activée permet de diminuer ces différents taux de manière significative.

Le groupe CLP présente un taux de NO et d'anion superoxyde très élevé au niveau des aortes. Ces niveaux accrus ne sont que légèrement diminués par la dexaméthasone, diminués par la protéine C activée et complétement normalisés par l'asscociation des deux (Figure 2D, 2E).



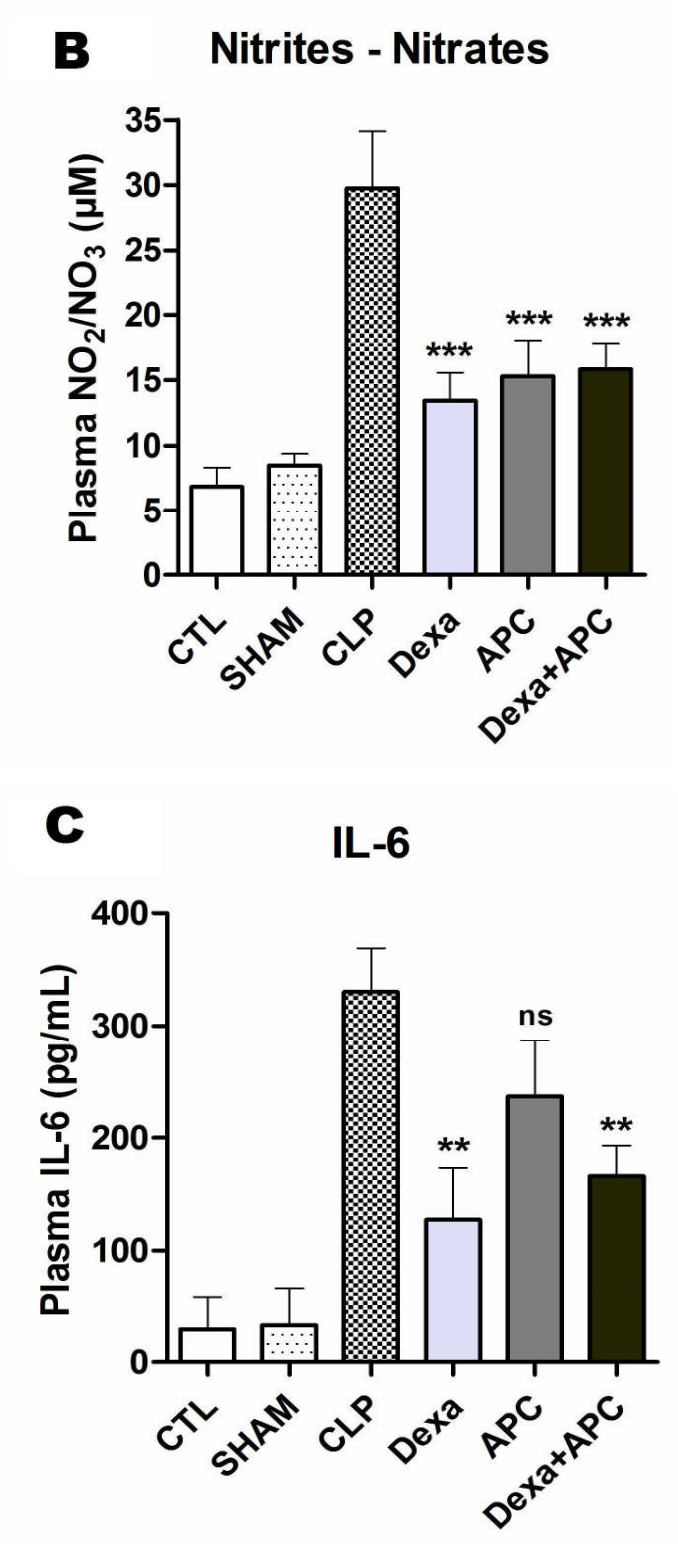


Figure 2 : Marqueurs biologiques

A : Concentration plasmatique en Lactates.

B : Concentration plasmatique en nitrite/nitrate.

C : Concentration plasmatique en Interleukine 6.

*p< 0, 05 **p<0, 01 ***p<0,001 vs CLP // n=6, moyenne ± SD.

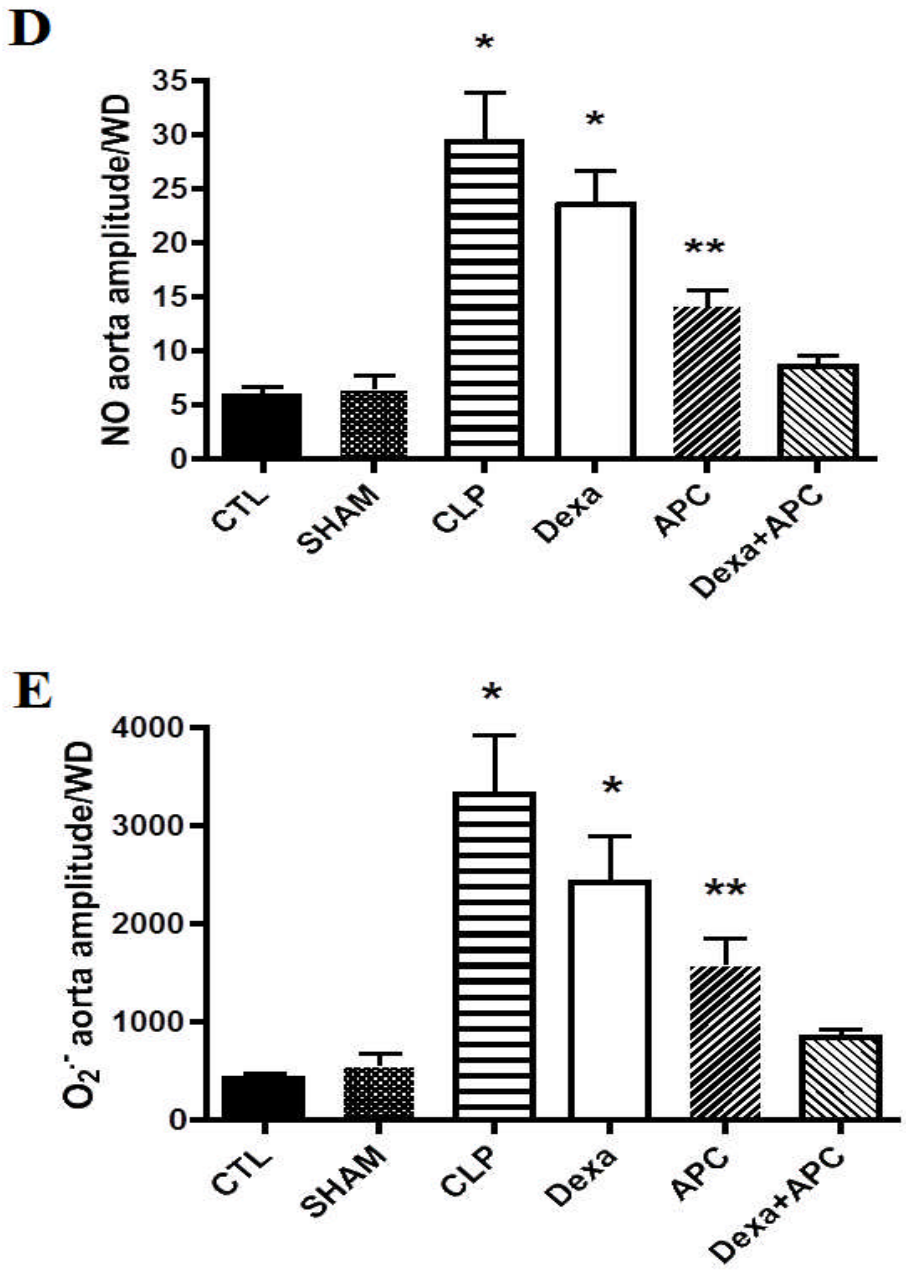


Figure 2 : Marqueurs biologiques

A : Concentration plasmatique en Lactates.

B : Concentration plasmatique en nitrite/nitrate.

C : Concentration plasmatique en Interleukine 6.

D : Concentration aortique du NO.

E : Concentration aortique de l'anion superoxyde.

*p< 0, 05 **p<0, 01 ***p<0,001 vs CLP // n=6, moyenne ± SD.

RÉACTIVITÉ VASCULAIRE

Nous avons étudié l'impact des traitements sur la réponse contractile à la phényléphrine mais aussi l'impact de ces traitements sur la relaxation à l'acétylcholine sur des anneaux issus d'aortes thoraciques et des artères mésentériques. L'exploration des voies de signalisation impliquées nécessite l'utilisation d'inhibiteurs. Dans la physiopathologie du choc septique, les voies des NOS et des COX semblent être les plus impliquées dans l'atteinte de la réactivité vasculaire. De ce fait, dans notre étude nous avons testé la vasoréactivité des vaisseaux après inhibition des métabolites des NOS par un inhibiteur non spécifique (LNAME) et des COX par une inhibition non spécifique (indométhacine ; indo).

La phényléphrine provoque une contraction dose dépendante au niveau des aortes et des artères mésentériques dans le groupe contrôle. Dans le groupe péritonite non traité la contraction est altérée que ce soit au niveau des aortes ou des artères mésentériques ($p<0.01$). Les traitements seuls ou en association restaurent la contractilité maximale des aortes et des artères mésentériques comparés au groupe contrôle ($p<0.01$) (figure 3).

De même, l'acétylcholine conduit a une relaxation dose dépendante des aortes et des artères mésentériques dans le groupe contrôle. La réponse vasculaire à l'acétylcholine est altérée dans le groupe péritonite non traité comparé aux groupes contrôle et Sham ($P < 0.05$). L'administration de protéine C activée, de dexaméthasone seuls ou en association améliorent la relaxation vasculaire des aortes et des artères mésentériques, exception faite pour la dexaméthasone qui conduit à une amélioration partielle (Figure 3).

Chez tous les groupes traités (PCa, DEXA, PCa+ dexa) l'addition de LNAME (inhibiteur non sélectif des NOS) et d'indométhacine (inhibiteur non sélectif des COX) diminue de 50% la relaxation vasculaire des aortes et artères mésentériques induite par la péritonite. Cependant chez le groupe CLP, l'incubation avec le LNAME ou l'indométhacine ne modifie en rien la réactivité vasculaire.

.

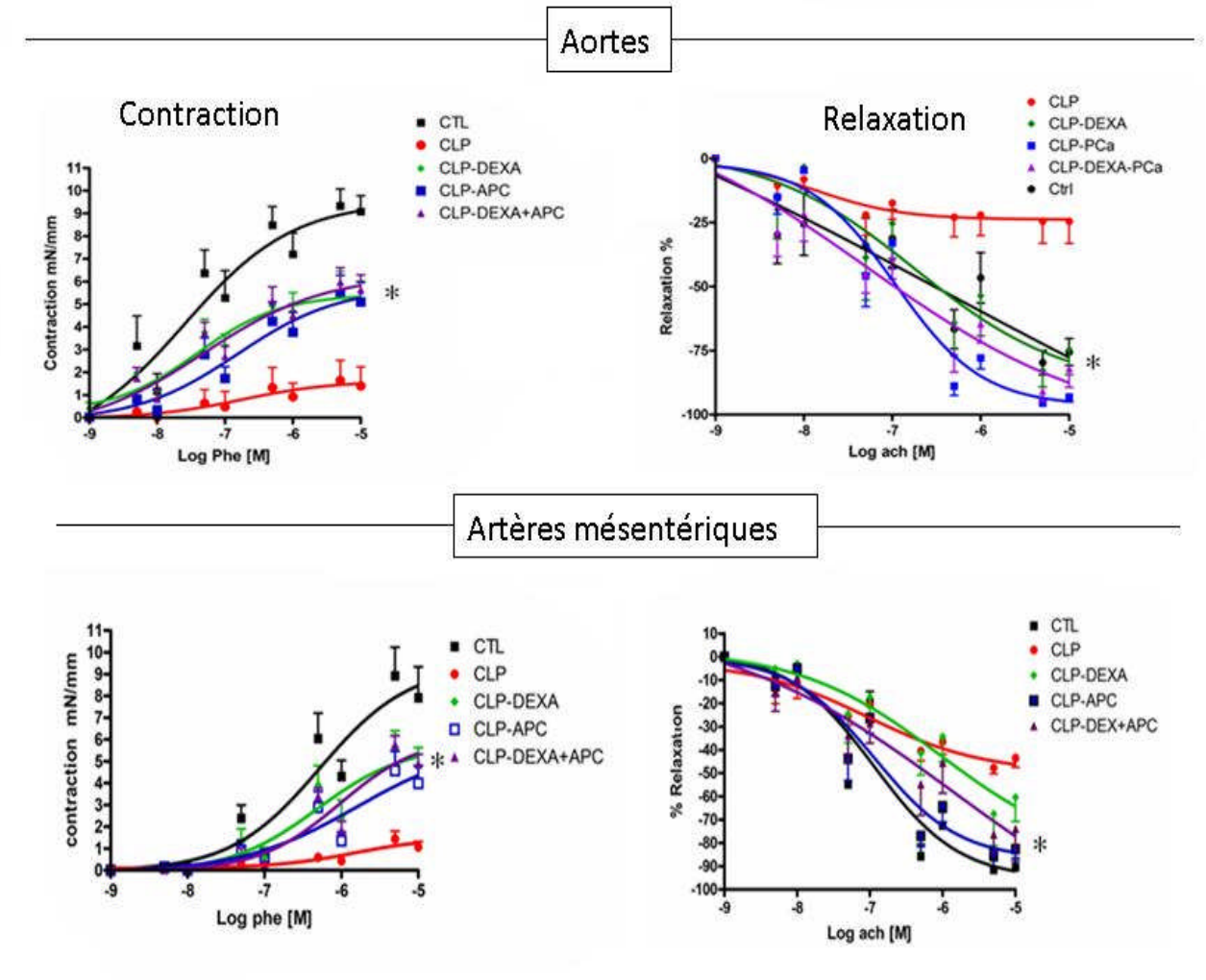


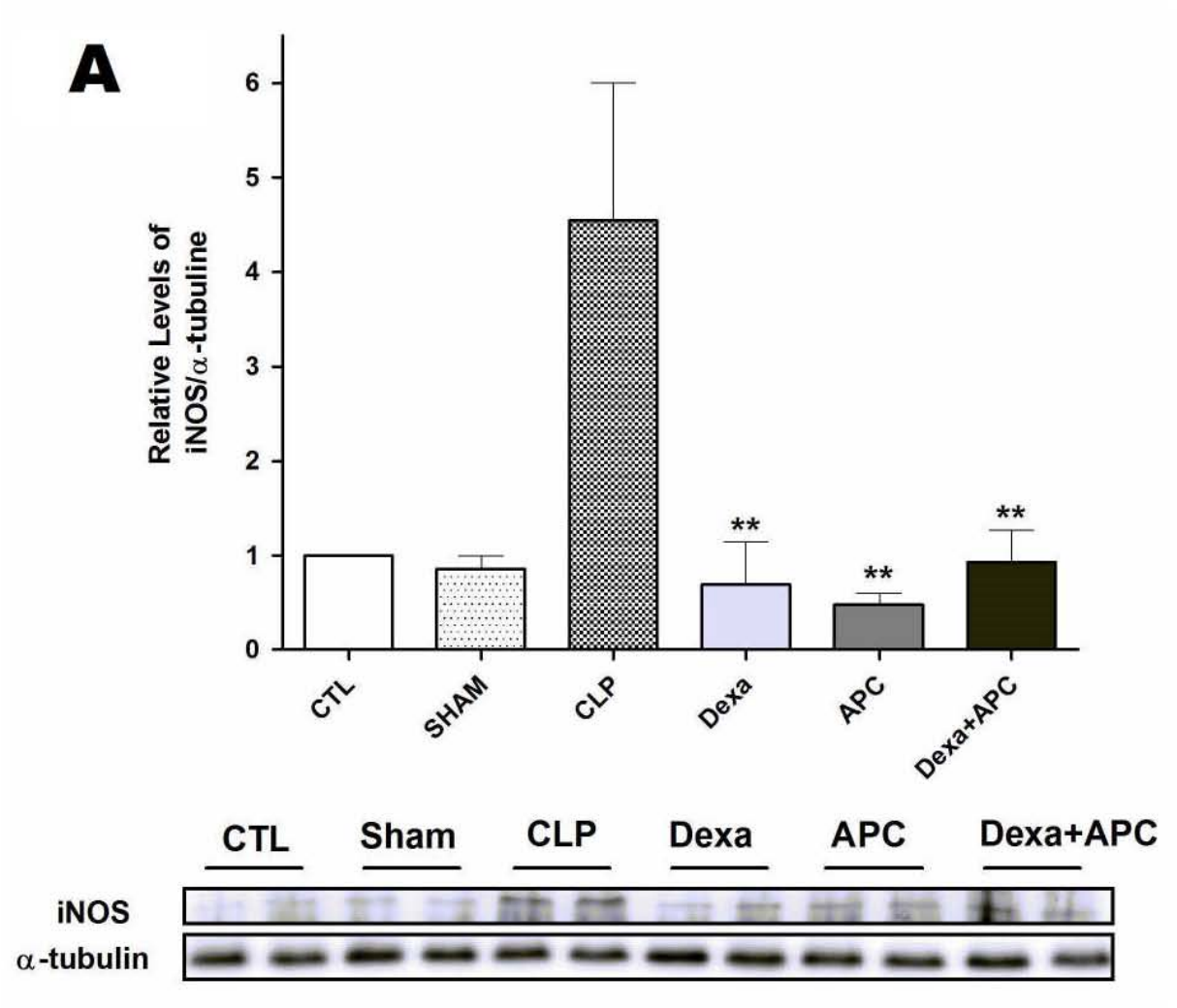
Figure 3. Etude de la vasoréactivité, impact de la phényléphrine et de l'acétylcholine sur la contraction et la relaxation des aortes et artères mésentériques. N=6 par groupe, *p<0,05 Vs CLP.

EXPRESSION PROTÉIQUE

L'expression de certaines protéines clés impliquées dans la relaxation vasculaire a été étudiée. Dans le groupe de rats péritonites (CLP), nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression de la NOS inductible comparée au groupe Sham. Cette augmentation est prévenue par l'administration de protéine C activée et/ ou de dexaméthasone seules ou en association (Figure 4A).

Enfin, les résultats obtenus montrent que la ligature et la perforation caecale (CLP) entraîne une modification d'expression ou de phosphorylation de la protéine Akt. En effet, le ratio

phospho Akt (ser 473)/Akt est diminué chez les groupe sepsis (Figure 4 B) comparé au groupe contrôle et Sham. Cette augmentation est restaurée à son niveau initial par les traitements PCa, DEXA et PCa + DEXA ($p<0,05$ vs CLP).



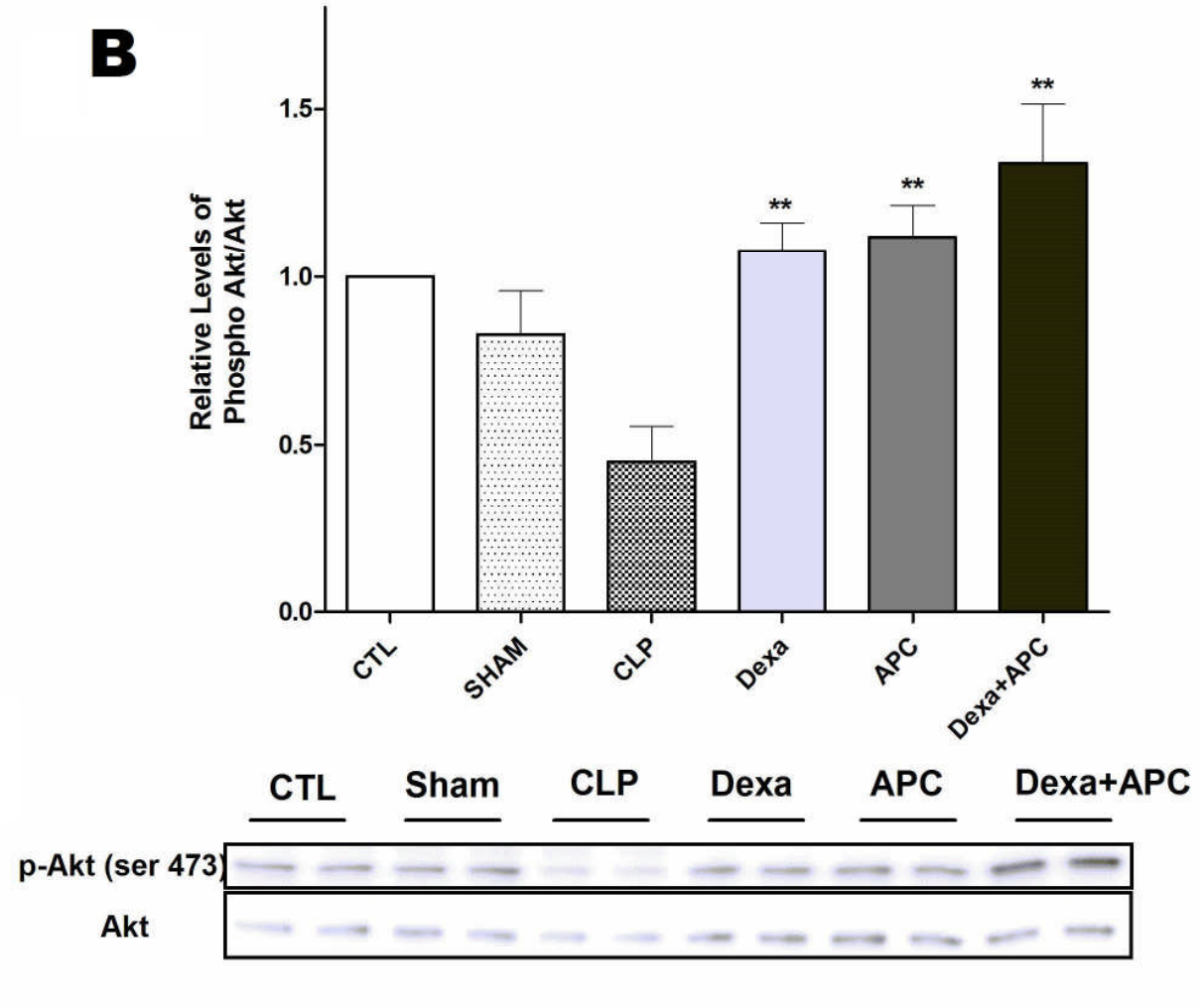


Figure 4. Expression par Western Blot des protéines iNOS, tubuline et Akt phosphorylée (P-AkT), Akt. (A : ration iNOS/Tubuline ; B : phospho-Akt/Akt).

Un dépôt de protéines (20 µg) sur gel SDS-PAGE à 12% a été effectué à partir des aortes de rats non traités (CTL et SHAM) et des rats péritonites (CLP) et des groupes traités (PCa, DEXA, PCa+DEXA). La protéine tubuline est utilisée pour normaliser les dépôts protéiques. Une diminution de la phosphorylation d'Akt est observée chez le groupe CLP et restaurée par les traitements, alors que la protéine iNOS est augmentée chez le groupe péritonite et diminuée par les traitements. (N=6 par groupe).

LA SURVIE

La mortalité parmi les rats du groupe «péritonite non traitée» est de 100%. En effet notre modèle est très sévère et létal, tous les rats décèdent précocement, au plus tard dans les vingt cinq heures après la fin de la chirurgie. La protéine C activée n'améliore pas la survie (26 heures).

En revanche, nous avons observé une amélioration du temps de survie chez le groupe traité à la dexaméthasone comparé au groupe péritonite non traité (34 heures Vs 25). La combinaison

protéine C activée et dexaméthasone améliore le temps de survie de façon significative et synergique comparée à tous les autres groupes (moyenne 42 heures) p<0,01.

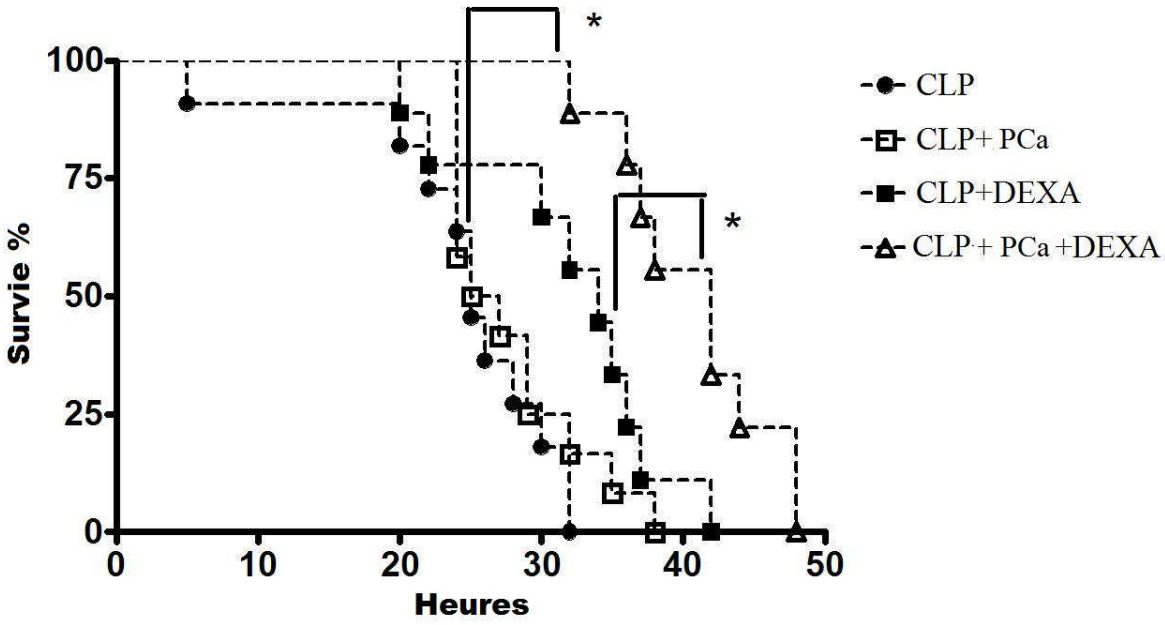


Figure 5. Courbe de survie *p<0,05 // n=15 par groupe.

Discussion

IX. DISCUSSION

Cette étude est le premier travail ayant évalué l'impact de la combinaison de la protéine C activée et des glucocorticoïdes sur les paramètres hémodynamiques et la survie dans le traitement du choc septique. Conduite sur un modèle animal de choc septique, la péritonite par ligature et perforation caecale, modèle cliniquement pertinent dans sa présentation et sa prise en charge. Nous avons montré que la protéine C activée et les glucocorticoïdes ont un effet bénéfique sur les paramètres hémodynamiques, l'oxygénation tissulaire et la vasoréactivité. Nous avons également montré que l'association des ces deux traitements améliore le temps de survie en agissant d'une manière synergique. Le mécanisme d'action de ces deux traitements est une augmentation de l'expression et de la phosphorylation de la NOS endothéliale ainsi qu'une diminution de l'expression de la NOS inductible.

Effets vasculaires

A l'instar des études précédemment publiées sur différents modèles de choc septique, nous confirmons que la protéine C activée et les glucocorticoïdes augmentent la pression artérielle moyenne et le débit cardiaque. Ces traitements inhibent l'inflammation induite par le sepsis ainsi que la production de NO et de radicaux libres [186], [187], [197], [198]. L'originalité de notre travail réside dans l'étude de l'effet de l'association de la protéine C activée et des glucocorticoïdes, il s'avère que cette association est synergique sur le temps de survie.

Le sepsis induit une réduction progressive mais importante de la phosphorylation de la NOS endothéliale [199], une altération des récepteurs de surface au niveau endothélial, ainsi qu'une modification du signal de transduction tel que le découplage du récepteur eNOS ce qui aboutit à la perte du rôle protecteur du NO [200]. Le NO est l'un des principaux facteurs de relaxation produit par eNOS, le NO d'origine endothéliale régule le tonus musculaire, l'agrégation plaquettaire et le recrutement des leucocytes [201], l'expression de la eNOS est stimulée par de multiples facteurs incluant les forces de cisaillement, VEGF, l'acétylcholine et les oestrogènes. L'activité enzymatique [94] est régulée par une cascade de phosphorylation de la voie de signalisation Akt.

Il a été montré que le choc septique induit par le modèle CLP évolue sur un mode biphasique : au stade précoce l'activité de la NOS endothéliale augmente et par la suite, la NOS inductible [146]augmente jouant un rôle de feedback négatif sur l'expression de la eNOS [202].

Nous sommes en mesure d'affirmer que la protéine C activée et les glucocorticoïdes seuls ou en association améliorent la dysfonction endothéliale, d'une part via une augmentation de la phosphorylation de la protéine Akt qui à son tour active la phosphorylation de la NOS endothéliale et d'autre part, via une diminution de l'expression de la NOS inductible.

Il est bien démontré que le sepsis altère la relaxation vasculaire à l'acétylcholine endothélium dépendante, en induisant à la fois une dysfonction de la résistance et de la conductance vasculaire [146].

La protéine C activée et les glucocorticoïdes améliorent la dysfonction vasculaire induite par la péritonite en diminuant la vasorelaxation induite par l'acétylcholine probablement par activation de la NOS endothéliale et des cyclooxygénases [120].

Cependant, en gardant à l'esprit, les données rapportées sur la dysfonction endothéliale induite par le LPS, nous pouvons faire l'hypothèse que la protéine C activée et la dexaméthasone réduisent l'expression de la NOS inductible ainsi que l'activation du NFkB, ce qui a pour effet de corriger partiellement la dysfonction endothéliale et d'améliorer la contraction vasculaire. Une étude récente du laboratoire a montré que les effets bénéfiques de la protéine C activée semblent davantage liés à ces effets cytoprotecteurs qu'à son rôle anticoagulant [187].

Enfin, l'inhibition des NOS par le LNAME et des COX par l'indométhacine a partiellement bloqué les effets bénéfiques de la protéine C activée et de la dexaméthasone sur la dysfonction endothéliale. D'autres mécanismes sont probablement impliqués dans la dysfonction vasculaire endothéliale induite par le sepsis [146].

Effets hémodynamiques

Tous les traitements se sont avérés bénéfiques sur le remplissage puisque les rats traités ont eu un débit cardiaque plus élevé que des rats en péritonite non traités. Néanmoins, malgré un remplissage conséquent, notre modèle demeure hypokinétique. Les premiers résultats d'une étude en cours dans notre laboratoire démontrent que ce modèle est associé à une défaillance vasculaire et une hypo contractilité myocardique sévère. Bien que non exploré dans notre étude, nos résultats suggèrent que la protéine C activée et les glucocorticoïdes agissent également sur la fonction myocardique [192].

Effet sur la survie

L'administration conjointe de protéine C activée et de glucocorticoïdes améliore le temps de survie comparé à leur administration seule, cependant nous n'avons trouvé aucun effet synergique de la protéine C activée et de la dexaméthasone sur les paramètres hémodynamiques et sur la réactivité vasculaire.

Particularité et limite de l'étude

Afin d'améliorer la pertinence clinique de l'étude, nous avons utilisé un modèle de sepsis poly microbien par ligature et perforation caecale défini comme le Gold standard. Pour cela nous avons apporté quelques modifications à la CLP classique, en effet dans notre protocole nous avons utilisé un modèle non-anesthésié afin d'éviter les effets des agents anesthésiques sur l'hémodynamique et le tonus vasculaire mimant un état de vasoplégie. Nous avons également eu recours à une expansion volumique et une antibiothérapie. Tous les traitements on été débuté tardivement (4 heures après la fin de la chirurgie).

La limitation majeure de notre protocole est que le modèle utilisé est hypokinetique et représente seulement 20% des patients admis en choc septique [203], cependant notre modèle présente un débit cardiaque diminué comme décrit par Rivers [106] lors du stade précoce du choc septique. D'ailleurs, notre modèle est clairement associé à dysfonctionnement vasculaire et myocardique.

Conclusion et perspectives

X. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

A ce jour aucune nouvelle thérapie n'a prouvé son efficacité pour prévenir les altérations cardio-vasculaires au cours du choc septique et les mécanismes exacts de cette pathologie restent obscurs. La Protéine C Activée et les corticoïdes sont deux thérapeutiques recommandées dans le traitement du choc septique de l'adulte. Leurs potentiels effets bénéfiques sur la dysfonction cardiovasculaire n'ont pas été étudiés lorsque ces deux traitements sont administrés ensemble.

Comme nous venons de le voir, nos résultats montrent que la protéine C activée et la dexaméthasone améliorent les paramètres hémodynamiques, la contractilité vasculaire ainsi que la dysfonction endothéliale induite par la péritonite chez le rat. Enfin nos résultats suggèrent un effet synergique de la protéine C activée et de la dexaméthasone sur le temps de survie mais nous ne sommes pas parvenus à déterminer les mécanismes cellulaires responsables de cette synergie.

Afin d'élucider les mécanismes d'action de ces deux traitements, une étude complémentaire évaluant leurs effets sur la dysfonction myocardique au cours du choc septique chez le rat en péritonite est en cours. Il s'agit d'explorer la fonction myocardique au moyen d'un cathéter de conductance (Millar). Les résultats préliminaires sont prometteurs et montrent que le traitement par PCa et/ou dexaméthasone permet une nette amélioration de la dysfonction myocardique septique, tant au niveau de la performance contractile que lors de la phase diastolique. Les paramètres de contractilité, dépendants (dP/dtmax) ou non (ESPVR, PRSW) des conditions de charge se normalisent tous sous l'effet de ces médicaments, utilisés seuls ou en association. L'évaluation de la relaxation ventriculaire gauche (dP/dtmin) met également en évidence une correction des anomalies diastoliques retrouvées dans le groupe non traité.

Nos futures pistes de travail sont : l'étude des espèces radicalaires de l'oxygène, avec un intérêt particulier pour le peroxynitrite, évaluation de la voie d'iNOS, et étude des dérivés adénylés (AMP, ADP, ATP) cardiomyocytaires.

Nos résultats suggèrent que la protéine C activée et les glucocorticoïdes devraient être réévalués en association dans le traitement du choc septique. En conséquence, ce travail contribue à lever une partie du voile sur les mécanismes de la dysfonction cardiovasculaire au cours du sepsis, et pourrait avoir un impact thérapeutique.

XI. BIBLIOGRAPHIE

[1] D. Annane, P. Aegerter, M. C. Jars-Guincestre, et B. Guidet, « Current epidemiology of septic shock: the CUB-Réa Network », *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 168, n°. 2, p. 165-172, juill. 2003.

[2] S. Lancel et al., « Ventricular myocyte caspases are directly responsible for endotoxin-induced cardiac dysfunction », *Circulation*, vol. 111, n°. 20, p. 2596-2604, mai. 2005.

[3] R. P. Dellinger et al., « Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008 », *Intensive Care Medicine*, vol. 34, n°. 1, p. 17-60, janv. 2008.

[4] G. R. Bernard et al., « Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis », *The New England Journal of Medicine*, vol. 344, n°. 10, p. 699-709, mars. 2001.

[5] R. C. Bone et al., « Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine », *Chest*, vol. 101, n°. 6, p. 1644-1655, juin. 1992.

[6] M. M. Levy et al., « 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference », *Critical Care Medicine*, vol. 31, n°. 4, p. 1250-1256, avr. 2003.

[7] C. Brun-Buisson, P. Meshaka, P. Pinton, et B. Vallet, « EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units », *Intensive Care Medicine*, vol. 30, n°. 4, p. 580-588, avr. 2004.

[8] A. F. Suffredini et al., « The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin », *The New England Journal of Medicine*, vol. 321, n°. 5, p. 280-287, août. 1989.

[9] M. M. Parker et al., « Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock », *Annals of Internal Medicine*, vol. 100, n°. 4, p. 483-490, avr. 1984.

[10] R. Moreno et al., « The use of maximum SOFA score to quantify organ dysfunction/failure in intensive care. Results of a prospective, multicentre study. Working Group on Sepsis related Problems of the ESICM », *Intensive Care Medicine*, vol. 25, n°. 7, p. 686-696, juill. 1999.

[11] A. Kumar, C. Haery, et J. E. Parrillo, « Myocardial dysfunction in septic shock », *Critical Care Clinics*, vol. 16, n°. 2, p. 251-287, avr. 2000.

[12] K. Wei et S. Kaul, « The coronary microcirculation in health and disease », *Cardiology Clinics*, vol. 22, n°. 2, p. 221-231, mai. 2004.

[13] A. B. Groeneveld, A. A. van Lambalgen, G. C. van den Bos, W. Bronsveld, J. J. Nauta, et L. G. Thijs, « Maldistribution of heterogeneous coronary blood flow during canine endotoxin shock », *Cardiovascular Research*, vol. 25, n°. 1, p. 80-88, janv. 1991.

[14] M. A. Solomon et al., « Myocardial energy metabolism and morphology in a canine model of sepsis », *The American Journal of Physiology*, vol. 266, n°. 2 Pt 2, p. H757-768, févr. 1994.

[15] W. S. Madorin, T. Rui, N. Sugimoto, O. Handa, G. Cepinskas, et P. R. Kvietys, « Cardiac myocytes activated by septic plasma promote neutrophil transendothelial

migration: role of platelet-activating factor and the chemokines LIX and KC », *Circulation Research*, vol. 94, n°. 7, p. 944-951, avr. 2004.

[16] F. Chagnon, M. Bentourkia, R. Lecomte, M. Lessard, et O. Lesur, « Endotoxin-induced heart dysfunction in rats: assessment of myocardial perfusion and permeability and the role of fluid resuscitation », *Critical Care Medicine*, vol. 34, n°. 1, p. 127-133, janv. 2006.

[17] C. J. Fernandes Júnior, M. Iervolino, R. A. Neves, E. L. Sampaio, et E. Knobel, « Interstitial myocarditis in sepsis », *The American Journal of Cardiology*, vol. 74, n°. 9, p. 958, nov. 1994.

[18] C. M. Goddard, M. F. Allard, J. C. Hogg, et K. R. Walley, « Myocardial morphometric changes related to decreased contractility after endotoxin », *The American Journal of Physiology*, vol. 270, n°. 4 Pt 2, p. H1446-1452, avr. 1996.

[19] G. Schlag, H. Redl, C. J. van Vuuren, et J. Davies, « Hyperdynamic sepsis in baboons: II. Relation of organ damage to severity of sepsis evaluated by a newly developed morphological scoring system », *Circulatory Shock*, vol. 38, n°. 4, p. 253-263, déc. 1992.

[20] M. Hersch, A. A. Gnidec, A. D. Bersten, M. Troster, F. S. Rutledge, et W. J. Sibbald, « Histologic and ultrastructural changes in nonpulmonary organs during early hyperdynamic sepsis », *Surgery*, vol. 107, n°. 4, p. 397-410, avr. 1990.

[21] L. Gotloib, A. Shostak, P. Galdi, J. Jaichenko, et R. Fudin, « Loss of microvascular negative charges accompanied by interstitial edema in septic rats' heart », *Circulatory Shock*, vol. 36, n°. 1, p. 45-56, janv. 1992.

[22] J. E. Langenfeld, G. W. Machiedo, M. Lyons, B. F. Rush, G. Dikdan, et T. W. Lysz, « Correlation between red blood cell deformability and changes in hemodynamic function », *Surgery*, vol. 116, n°. 5, p. 859-867, nov. 1994.

[23] D. M. Bers, « Cardiac excitation-contraction coupling », *Nature*, vol. 415, n°. 6868, p. 198-205, janv. 2002.

[24] H. Fauvel, P. Marchetti, C. Chopin, P. Formstecher, et R. Nevière, « Differential effects of caspase inhibitors on endotoxin-induced myocardial dysfunction and heart apoptosis », *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, vol. 280, n°. 4, p. H1608-1614, avr. 2001.

[25] R. Nevière, H. Fauvel, C. Chopin, P. Formstecher, et P. Marchetti, « Caspase inhibition prevents cardiac dysfunction and heart apoptosis in a rat model of sepsis », *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 163, n°. 1, p. 218-225, janv. 2001.

[26] T. E. McDonald, M. N. Grinman, C. M. Carthy, et K. R. Walley, « Endotoxin infusion in rats induces apoptotic and survival pathways in hearts », *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, vol. 279, n°. 5, p. H2053-2061, nov. 2000.

[27] K. L. Laugwitz et al., « Blocking caspase-activated apoptosis improves contractility in failing myocardium », *Human Gene Therapy*, vol. 12, n°. 17, p. 2051-2063, nov. 2001.

[28] A. Moretti et al., « Essential myosin light chain as a target for caspase-3 in failing myocardium », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, n°. 18, p. 11860-11865, sept. 2002.

[29] C. Communal, M. Sumandea, P. de Tombe, J. Narula, R. J. Solaro, et R. J. Hajjar, « Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, n°. 9, p. 6252-6256, avr. 2002.

[30] B. L. Schwab et al., « Cleavage of plasma membrane calcium pumps by caspases: a link between apoptosis and necrosis », *Cell Death and Differentiation*, vol. 9, n°. 8, p. 818-831, août. 2002.
[31] A. Lepple-Wienhues et al., « Stimulation of CD95 (Fas) blocks T lymphocyte calcium channels through sphingomyelinase and sphingolipids », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 96, n°. 24, p. 13795-13800, nov. 1999.
[32] S. M. Hassoun et al., « Prevention of endotoxin-induced sarcoplasmic reticulum calcium leak improves mitochondrial and myocardial dysfunction », *Critical Care Medicine*, vol. 36, n°. 9, p. 2590-2596, sept. 2008.
[33] R. Neviere et al., « Caspase-dependent protein phosphatase 2A activation contributes to endotoxin-induced cardiomyocyte contractile dysfunction », *Critical Care Medicine*, vol. 38, n°. 10, p. 2031-2036, oct. 2010.
[34] S. M. Hassoun et al., « Sphingosine impairs mitochondrial function by opening permeability transition pore », *Mitochondrion*, vol. 6, n°. 3, p. 149-154, juin. 2006.
[35] M. P. Fink, « Cytopathic hypoxia. Is oxygen use impaired in sepsis as a result of an acquired intrinsic derangement in cellular respiration? », *Critical Care Clinics*, vol. 18, n°. 1, p. 165-175, janv. 2002.
[36] D. Brealey et al., « Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock », *Lancet*, vol. 360, n°. 9328, p. 219-223, juill. 2002.
[37] D. Brealey et al., « Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure », *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, vol. 286, n°. 3, p. R491-497, mars. 2004.
[38] E. D. Crouser, « Mitochondrial dysfunction in septic shock and multiple organ dysfunction syndrome », *Mitochondrion*, vol. 4, n°. 5-6, p. 729-741, sept. 2004.
[39] E. D. Crouser, M. W. Julian, D. V. Blaho, et D. R. Pfeiffer, « Endotoxin-induced mitochondrial damage correlates with impaired respiratory activity », *Critical Care Medicine*, vol. 30, n°. 2, p. 276-284, févr. 2002.
[40] J. A. Watts, J. A. Kline, L. R. Thornton, R. M. Grattan, et S. S. Brar, « Metabolic dysfunction and depletion of mitochondria in hearts of septic rats », *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 36, n°. 1, p. 141-150, janv. 2004.
[41] F. G. Soriano et al., « Potential role of poly(adenosine 5'-diphosphate-ribose) polymerase activation in the pathogenesis of myocardial contractile dysfunction associated with human septic shock », *Critical Care Medicine*, vol. 34, n°. 4, p. 1073-1079, avr. 2006.
[42] H. B. Suliman, M. S. Carraway, K. E. Welty-Wolf, A. R. Whorton, et C. A. Piantadosi, « Lipopolysaccharide stimulates mitochondrial biogenesis via activation of nuclear respiratory factor-1 », *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, n°. 42, p. 41510-41518, oct. 2003.
[43] H. B. Suliman, K. E. Welty-Wolf, M. Carraway, L. Tatro, et C. A. Piantadosi, « Lipopolysaccharide induces oxidative cardiac mitochondrial damage and biogenesis », *Cardiovascular Research*, vol. 64, n°. 2, p. 279-288, nov. 2004.
[44] C. Batandier, E. Fontaine, C. Kériel, et X. M. Leverve, « Determination of mitochondrial reactive oxygen species: methodological aspects », *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, vol. 6, n°. 2, p. 175-187, juin. 2002.
[45] P. Ferdinandy, H. Danial, I. Ambrus, R. A. Rothery, et R. Schulz, « Peroxynitrite is a major contributor to cytokine-induced myocardial contractile failure », *Circulation Research*, vol. 87, n°. 3, p. 241-247, août. 2000.

[46] M. G. Vila-Petroff, A. Younes, J. Egan, E. G. Lakatta, et S. J. Sollott, « Activation of distinct cAMP-dependent and cGMP-dependent pathways by nitric oxide in cardiac myocytes », *Circulation Research*, vol. 84, n°. 9, p. 1020-1031, mai. 1999.
[47] R. A. Kelly, J. L. Balligand, et T. W. Smith, « Nitric oxide and cardiac function », *Circulation Research*, vol. 79, n°. 3, p. 363-380, sept. 1996.
[48] M. S. Finkel, C. V. Oddis, T. D. Jacob, S. C. Watkins, B. G. Hattler, et R. L. Simmons, « Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide », *Science (New York, N.Y.)*, vol. 257, n°. 5068, p. 387-389, juill. 1992.
[49] A. Kumar et al., « Role of nitric oxide and cGMP in human septic serum-induced depression of cardiac myocyte contractility », *The American Journal of Physiology*, vol. 276, n°. 1 Pt 2, p. R265-276, janv. 1999.
[50] K. Sugishita et al., « Cellular basis for the acute inhibitory effects of IL-6 and TNF-alpha on excitation-contraction coupling », *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 31, n°. 8, p. 1457-1467, août. 1999.
[51] D. J. Pinsky, B. Cai, X. Yang, C. Rodriguez, R. R. Sciacca, et P. J. Cannon, « The lethal effects of cytokine-induced nitric oxide on cardiac myocytes are blocked by nitric oxide synthase antagonism or transforming growth factor beta », *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 95, n°. 2, p. 677-685, févr. 1995.
[52] G. Kreymann, S. Grosser, P. Buggisch, C. Gottschall, S. Matthaei, et H. Greten, « Oxygen consumption and resting metabolic rate in sepsis, sepsis syndrome, and septic shock », *Critical Care Medicine*, vol. 21, n°. 7, p. 1012-1019, juill. 1993.
[53] A. Rudiger et M. Singer, « Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction », *Critical Care Medicine*, vol. 35, n°. 6, p. 1599-1608, juin. 2007.
[54] P. Boekstegers, S. Weidenhöfer, T. Kapsner, et K. Werdan, « Skeletal muscle partial pressure of oxygen in patients with sepsis », *Critical Care Medicine*, vol. 22, n°. 4, p. 640-650, avr. 1994.
[55] P. Boekstegers, S. Weidenhöfer, G. Pilz, et K. Werdan, « Peripheral oxygen availability within skeletal muscle in sepsis and septic shock: comparison to limited infection and cardiogenic shock », *Infection*, vol. 19, n°. 5, p. 317-323, oct. 1991.
[56] R. E. Cunnion, G. L. Schaer, M. M. Parker, C. Natanson, et J. E. Parrillo, « The coronary circulation in human septic shock », *Circulation*, vol. 73, n°. 4, p. 637-644, avr. 1986.
[57] P. Rossi, L. Tauzin, M. Weiss, J.-C. Rostain, J.-M. Sainty, et A. Boussuges, « Could hyperoxic ventilation impair oxygen delivery in septic patients? », *Clinical Physiology and Functional Imaging*, vol. 27, n°. 3, p. 180-184, mai. 2007.
[58] J. F. Dhainaut et al., « Coronary hemodynamics and myocardial metabolism of lactate, free fatty acids, glucose, and ketones in patients with septic shock », *Circulation*, vol. 75, n°. 3, p. 533-541, mars. 1987.
[59] R. J. Levy et al., « Evidence of myocardial hibernation in the septic heart », *Critical Care Medicine*, vol. 33, n°. 12, p. 2752-2756, déc. 2005.
[60] L. H. Opie, « Cellular basis for therapeutic choices in heart failure », *Circulation*, vol. 110, n°. 17, p. 2559-2561, oct. 2004.
[61] D. Annane et al., « Inappropriate sympathetic activation at onset of septic shock: a spectral analysis approach », *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 160, n°. 2, p. 458-465, août. 1999.
[62] J. K. Bocking, W. J. Sibbald, R. L. Holliday, S. Scott, et T. Viidik, « Plasma catecholamine levels and pulmonary dysfunction in sepsis », *Surgery, Gynecology & Obstetrics*, vol. 148, n°. 5, p. 715-719, mai. 1979.

[63] G. Bernardin, F. Tiger, R. Fouché, et M. Mattéi, « Continuous noninvasive measurement of aortic blood flow in critically ill patients with a new esophageal echo-Doppler system », *Journal of Critical Care*, vol. 13, n°. 4, p. 177-183, déc. 1998.
[64] M. Iwase et al., « Cardiac functional and structural alterations induced by endotoxin in rats: importance of platelet-activating factor », *Critical Care Medicine*, vol. 29, n°. 3, p. 609-617, mars. 2001.
[65] P. Y. Hahn, P. Wang, S. M. Tait, Z. F. Ba, S. S. Reich, et I. H. Chaudry, « Sustained elevation in circulating catecholamine levels during polymicrobial sepsis », *Shock (Augusta, Ga.)*, vol. 4, n°. 4, p. 269-273, oct. 1995.
[66] J. M. Hare, E. Loh, M. A. Creager, et W. S. Colucci, « Nitric oxide inhibits the positive inotropic response to beta-adrenergic stimulation in humans with left ventricular dysfunction », *Circulation*, vol. 92, n°. 8, p. 2198-2203, oct. 1995.
[67] E. Barth, P. Radermacher, C. Thiemermann, S. Weber, M. Georgieff, et G. Albuszies, « Role of inducible nitric oxide synthase in the reduced responsiveness of the myocardium to catecholamines in a hyperdynamic, murine model of septic shock », *Critical Care Medicine*, vol. 34, n°. 2, p. 307-313, févr. 2006.
[68] N. H. Ismail, E. J. Cohn, et D. L. Mollitt, « Nitric oxide synthase inhibition negates septic-induced alterations in cytoplasmic calcium homeostasis and membrane dynamics », *The American Surgeon*, vol. 63, n°. 1, p. 20-23, janv. 1997.
[69] C. Tang et M. S. Liu, « Initial externalization followed by internalization of beta-adrenergic receptors in rat heart during sepsis », *The American Journal of Physiology*, vol. 270, n°. 1 Pt 2, p. R254-263, janv. 1996.
[70] R. E. Shepherd, C. H. Lang, et K. H. McDonough, « Myocardial adrenergic responsiveness after lethal and nonlethal doses of endotoxin », *The American Journal of Physiology*, vol. 252, n°. 2 Pt 2, p. H410-416, févr. 1987.
[71] T. Gulick, M. K. Chung, S. J. Pieper, L. G. Lange, et G. F. Schreiner, « Interleukin 1 and tumor necrosis factor inhibit cardiac myocyte beta-adrenergic responsiveness », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 86, n°. 17, p. 6753-6757, sept. 1989.
[72] N. Matsuda, Y. Hattori, Y. Akaishi, Y. Suzuki, O. Kemmotsu, et S. Gando, « Impairment of cardiac beta-adrenoceptor cellular signaling by decreased expression of G(s alpha) in septic rabbits », *Anesthesiology*, vol. 93, n°. 6, p. 1465-1473, déc. 2000.
[73] M. Böhm, R. Kirchmayr, P. Gierschik, et E. Erdmann, « Increase of myocardial inhibitory G-proteins in catecholamine-refractory septic shock or in septic multiorgan failure », *The American Journal of Medicine*, vol. 98, n°. 2, p. 183-186, févr. 1995.
[74] L.-L. Wu et al., « G protein and adenylate cyclase complex-mediated signal transduction in the rat heart during sepsis », *Shock (Augusta, Ga.)*, vol. 19, n°. 6, p. 533-537, juin. 2003.
[75] N. Abi-Gerges et al., « Sequential changes in autonomic regulation of cardiac myocytes after in vivo endotoxin injection in rat », *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 160, n°. 4, p. 1196-1204, oct. 1999.
[76] J. E. Parrillo, C. Burch, J. H. Shelhamer, M. M. Parker, C. Natanson, et W. Schuette, « A circulating myocardial depressant substance in humans with septic shock. Septic shock patients with a reduced ejection fraction have a circulating factor that depresses in vitro myocardial cell performance », *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 76, n°. 4, p. 1539-1553, oct. 1985.
[77] J. M. Reilly, R. E. Cunnion, C. Burch-Whitman, M. M. Parker, J. H. Shelhamer, et J. E. Parrillo, « A circulating myocardial depressant substance is associated with cardiac

dysfunction and peripheral hypoperfusion (lactic acidemia) in patients with septic shock », *Chest*, vol. 95, n°. 5, p. 1072-1080, mai. 1989.

[78] N. Pathan, C. Sandiford, S. E. Harding, et M. Levin, « Characterization of a myocardial depressant factor in meningococcal septicemia », *Critical Care Medicine*, vol. 30, n°. 10, p. 2191-2198, oct. 2002.

[79] A. Kumar, V. Thota, L. Dee, J. Olson, E. Uretz, et J. E. Parrillo, « Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum », *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 183, n°. 3, p. 949-958, mars. 1996.

[80] B. Vallet et E. Wiel, « Endothelial cell dysfunction and coagulation », *Critical Care Medicine*, vol. 29, n°. 7, p. S36-41, juill. 2001.

[81] F. Fourrier et al., « Septic shock, multiple organ failure, and disseminated intravascular coagulation. Compared patterns of antithrombin III, protein C, and protein S deficiencies », *Chest*, vol. 101, n°. 3, p. 816-823, mars. 1992.

[82] A. C. Mavrommatis et al., « Activation of the fibrinolytic system and utilization of the coagulation inhibitors in sepsis: comparison with severe sepsis and septic shock », *Intensive Care Medicine*, vol. 27, n°. 12, p. 1853-1859, déc. 2001.

[83] E. de Jonge et al., « Tissue factor pathway inhibitor dose-dependently inhibits coagulation activation without influencing the fibrinolytic and cytokine response during human endotoxemia », *Blood*, vol. 95, n°. 4, p. 1124-1129, févr. 2000.

[84] M. Riewald, R. J. Petrovan, A. Donner, B. M. Mueller, et W. Ruf, « Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway », *Science (New York, N.Y.)*, vol. 296, n°. 5574, p. 1880-1882, juin. 2002.

[85] D. E. Joyce, L. Gelbert, A. Ciaccia, B. DeHoff, et B. W. Grinnell, « Gene expression profile of antithrombotic protein c defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis », *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, n°. 14, p. 11199-11203, avr. 2001.

[86] E. Bellissant et D. Annane, « Effect of hydrocortisone on phenylephrine--mean arterial pressure dose-response relationship in septic shock », *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, vol. 68, n°. 3, p. 293-303, sept. 2000.

[87] T. M. McKenna, « Enhanced vascular effects of cyclic GMP in septic rat aorta », *The American Journal of Physiology*, vol. 254, n°. 3 Pt 2, p. R436-442, mars. 1988.

[88] J. D. MacMicking et al., « Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase », *Cell*, vol. 81, n°. 4, p. 641-650, mai. 1995.

[89] A. López et al., « Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock », *Critical Care Medicine*, vol. 32, n°. 1, p. 21-30, janv. 2004.

[90] W. L. Smith, D. L. DeWitt, et R. M. Garavito, « Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology », *Annual Review of Biochemistry*, vol. 69, p. 145-182, 2000.

[91] M. Adib-Conquy et J.-M. Cavaillon, « Stress molecules in sepsis and systemic inflammatory response syndrome », *FEBS Letters*, vol. 581, n°. 19, p. 3723-3733, juill. 2007.

[92] M. Wanecek, E. Weitzberg, A. Rudehill, et A. Oldner, « The endothelin system in septic and endotoxin shock », *European Journal of Pharmacology*, vol. 407, n°. 1-2, p. 1-15, oct. 2000.

[93] S. Moncada et E. A. Higgs, « Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance », *European Journal of Clinical Investigation*, vol. 21, n°. 4, p. 361-374, août. 1991.

[94] D. M. Dudzinski et T. Michel, « Life history of eNOS: partners and pathways », *Cardiovascular Research*, vol. 75, n°. 2, p. 247-260, juill. 2007.
[95] E. Wiel et al., « Effect of L-arginine on endothelial injury and hemostasis in rabbit endotoxin shock », *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, vol. 89, n°. 5, p. 1811-1818, nov. 2000.
[96] E. Wiel et al., « Effects of the angiotensin-converting enzyme inhibitor perindopril on endothelial injury and hemostasis in rabbit endotoxic shock », *Intensive Care Medicine*, vol. 30, n°. 8, p. 1652-1659, août. 2004.
[97] M. Zhou, P. Wang, et I. H. Chaudry, « Endothelial nitric oxide synthase is downregulated during hyperdynamic sepsis », *Biochimica Et Biophysica Acta*, vol. 1335, n°. 1-2, p. 182-190, avr. 1997.
[98] J. Leclerc et al., « A single endotoxin injection in the rabbit causes prolonged blood vessel dysfunction and a procoagulant state », *Critical Care Medicine*, vol. 28, n°. 11, p. 3672-3678, nov. 2000.
[99] K. Bhagat, R. Moss, J. Collier, et P. Vallance, « Endothelial “stunning” following a brief exposure to endotoxin: a mechanism to link infection and infarction? », *Cardiovascular Research*, vol. 32, n°. 5, p. 822-829, nov. 1996.
[100] K. Bhagat, J. Collier, et P. Vallance, « Local venous responses to endotoxin in humans », *Circulation*, vol. 94, n°. 3, p. 490-497, août. 1996.
[101] R. A. Kloner, A. M. Hutter, J. T. Emmick, M. I. Mitchell, J. Denne, et G. Jackson, « Time course of the interaction between tadalafil and nitrates », *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 42, n°. 10, p. 1855-1860, nov. 2003.
[102] M. J. Winn, B. Vallet, N. K. Asante, S. E. Curtis, et S. M. Cain, « Effects of NG-substituted arginines on coronary vascular function after endotoxin », *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, vol. 75, n°. 1, p. 424-431, juill. 1993.
[103] S. D. Chauhan, G. Seggara, P. A. Vo, R. J. Macallister, A. J. Hobbs, et A. Ahluwalia, « Protection against lipopolysaccharide-induced endothelial dysfunction in resistance and conduit vasculature of iNOS knockout mice », *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 17, n°. 6, p. 773-775, avr. 2003.
[104] M. McMillan, B. Chernow, et B. L. Roth, « Hepatic alpha 1-adrenergic receptor alteration in a rat model of chronic sepsis », *Circulatory Shock*, vol. 19, n°. 2, p. 185-193, 1986.
[105] J. F. Buckley, M. Singer, et L. H. Clapp, « Role of KATP channels in sepsis », *Cardiovascular Research*, vol. 72, n°. 2, p. 220-230, nov. 2006.
[106] E. Rivers et al., « Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock », *The New England Journal of Medicine*, vol. 345, n°. 19, p. 1368-1377, nov. 2001.
[107] M. Leone, B. Vallet, J.-L. Teboul, J. Mateo, O. Bastien, et C. Martin, « Survey of the use of catecholamines by French physicians », *Intensive Care Medicine*, vol. 30, n°. 5, p. 984-988, mai. 2004.
[108] I. J. Kopin, « Catecholamine metabolism: basic aspects and clinical significance », *Pharmacological Reviews*, vol. 37, n°. 4, p. 333-364, déc. 1985.
[109] M. J. Breslow, J. R. Tobin, K. L. Kubos, H. Raff, et R. J. Traystman, « Effect of adrenal hypotension on elicited secretory activity in anesthetized dogs », *The American Journal of Physiology*, vol. 260, n°. 1 Pt 2, p. H21-26, janv. 1991.
[110] W. E. Clutter et P. E. Cryer, « Plasma dose-response studies with noradrenaline and adrenaline in man », *Progress in Biochemical Pharmacology*, vol. 17, p. 84-89, 1980.
[111] H. Ensinger, B. Stein, O. Jäger, A. Grünert, et F. W. Ahnefeld, « Relationship between infusion rates, plasma concentrations, and cardiovascular and metabolic effects during

the infusion of norepinephrine in healthy volunteers », *Critical Care Medicine*, vol. 20, n°. 9, p. 1250-1256, sept. 1992.
[112] J. S. Gregory, M. F. Bonfiglio, J. F. Dasta, T. E. Reilley, M. C. Townsend, et L. Flancbaum, « Experience with phenylephrine as a component of the pharmacologic support of septic shock », *Critical Care Medicine*, vol. 19, n°. 11, p. 1395-1400, nov. 1991.
[113] H. Reinelt et al., « Impact of exogenous beta-adrenergic receptor stimulation on hepatosplanchnic oxygen kinetics and metabolic activity in septic shock », *Critical Care Medicine*, vol. 27, n°. 2, p. 325-331, févr. 1999.
[114] B. Levy, « Bench-to-bedside review: Is there a place for epinephrine in septic shock? », *Critical Care (London, England)*, vol. 9, n°. 6, p. 561-565, 2005.
[115] D. Annane et al., « Norepinephrine plus dobutamine versus epinephrine alone for management of septic shock: a randomised trial », *Lancet*, vol. 370, n°. 9588, p. 676-684, août. 2007.
[116] A. R. Rezaie, « Exosite-dependent regulation of the protein C anticoagulant pathway », *Trends in Cardiovascular Medicine*, vol. 13, n°. 1, p. 8-15, janv. 2003.
[117] F. B. Taylor, G. T. Peer, M. S. Lockhart, G. Ferrell, et C. T. Esmon, « Endothelial cell protein C receptor plays an important role in protein C activation in vivo », *Blood*, vol. 97, n°. 6, p. 1685-1688, mars. 2001.
[118] S. N. Faust, R. S. Heyderman, et M. Levin, « Coagulation in severe sepsis: a central role for thrombomodulin and activated protein C », *Critical Care Medicine*, vol. 29, n°. 7, p. S62-67; discussion S67-68, juill. 2001.
[119] L. O. Mosnier, B. V. Zlokovic, et J. H. Griffin, « The cytoprotective protein C pathway », *Blood*, vol. 109, n°. 8, p. 3161-3172, avr. 2007.
[120] N. Sennoun et al., « Recombinant human activated protein C improves endotoxemia-induced endothelial dysfunction: a blood-free model in isolated mouse arteries », *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, vol. 297, n°. 1, p. H277-282, juill. 2009.
[121] D. E. Joyce et B. W. Grinnell, « Recombinant human activated protein C attenuates the inflammatory response in endothelium and monocytes by modulating nuclear factor-kappaB », *Critical Care Medicine*, vol. 30, n°. 5, p. S288-293, mai. 2002.
[122] M. Brueckmann et al., « Recombinant human activated protein C upregulates cyclooxygenase-2 expression in endothelial cells via binding to endothelial cell protein C receptor and activation of protease-activated receptor-1 », *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 93, n°. 4, p. 743-750, avr. 2005.
[123] D. J. Stearns-Kurosawa et al., « Plasma levels of endothelial protein C receptor respond to anticoagulant treatment », *Blood*, vol. 99, n°. 2, p. 526-530, janv. 2002.
[124] T. Cheng et al., « Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective », *Nature Medicine*, vol. 9, n°. 3, p. 338-342, mars. 2003.
[125] D. S. Skundric, B. Bealmear, et R. P. Lisak, « Induced upregulation of IL-1, IL-1RA and IL-1R type I gene expression by Schwann cells », *Journal of Neuroimmunology*, vol. 74, n°. 1-2, p. 9-18, avr. 1997.
[126] S. Stosić-Grujicić et M. L. Lukić, « Glucocorticoid-induced keratinocyte-derived interleukin-1 receptor antagonist(s) », *Immunology*, vol. 75, n°. 2, p. 293-298, févr. 1992.
[127] C. Gabay, M. F. Smith, D. Eidlen, et W. P. Arend, « Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra) is an acute-phase protein », *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 99, n°. 12, p. 2930-2940, juin. 1997.

[128] T. van der Poll, A. E. Barber, S. M. Coyle, et S. F. Lowry, « Hypercortisolemia increases plasma interleukin-10 concentrations during human endotoxemia--a clinical research center study », *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 81, n°. 10, p. 3604-3606, oct. 1996.
[129] A. Marchant et al., « Methylprednisolone differentially regulates IL-10 and tumour necrosis factor (TNF) production during murine endotoxaemia », *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 106, n°. 1, p. 91-96, oct. 1996.
[130] T. M. McKenna, « Prolonged exposure of rat aorta to low levels of endotoxin in vitro results in impaired contractility. Association with vascular cytokine release », *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 86, n°. 1, p. 160-168, juill. 1990.
[131] F. Buttgereit, I. Brink, B. Thiele, G. R. Burmester, F. Hiepe, et E. D. Hall, « Effects of methylprednisolone and 21-aminosteroids on mitogen-induced interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha production in human peripheral blood mononuclear cells », *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 275, n°. 2, p. 850-853, nov. 1995.
[132] S. K. Arya, F. Wong-Staal, et R. C. Gallo, « Dexamethasone-mediated inhibition of human T cell growth factor and gamma-interferon messenger RNA », *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 133, n°. 1, p. 273-276, juill. 1984.
[133] M. John et al., « Inhaled corticosteroids increase interleukin-10 but reduce macrophage inflammatory protein-1alpha, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and interferon-gamma release from alveolar macrophages in asthma », *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 157, n°. 1, p. 256-262, janv. 1998.
[134] V. Brinkmann et C. Kristofic, « Regulation by corticosteroids of Th1 and Th2 cytokine production in human CD4+ effector T cells generated from CD45RO- and CD45RO+ subsets », *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 155, n°. 7, p. 3322-3328, oct. 1995.
[135] T. Calandra et al., « MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production », *Nature*, vol. 377, n°. 6544, p. 68-71, sept. 1995.
[136] J. Wu, F. Q. Cunha, F. Y. Liew, et W. Y. Weiser, « IL-10 inhibits the synthesis of migration inhibitory factor and migration inhibitory factor-mediated macrophage activation », *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 151, n°. 8, p. 4325-4332, oct. 1993.
[137] Q. Zhu et S. Solomon, « Isolation and mode of action of rabbit corticostatic (antiadrenocorticotropin) peptides », *Endocrinology*, vol. 130, n°. 3, p. 1413-1423, mars. 1992.
[138] M. Perretti et R. J. Flower, « Modulation of IL-1-induced neutrophil migration by dexamethasone and lipocortin 1 », *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 150, n°. 3, p. 992-999, févr. 1993.
[139] J. M. Bailey, A. N. Makheja, J. Pash, et M. Verma, « Corticosteroids suppress cyclooxygenase messenger RNA levels and prostanoid synthesis in cultured vascular cells », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 157, n°. 3, p. 1159-1163, déc. 1988.
[140] M. W. Radomski, R. M. Palmer, et S. Moncada, « Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 87, n°. 24, p. 10043-10047, déc. 1990.
[141] P. J. Barnes, « Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms », *Clinical Science (London, England: 1979)*, vol. 94, n°. 6, p. 557-572, juin. 1998.
[142] M. Hochstrasser, « Protein degradation or regulation: Ub the judge », *Cell*, vol. 84, n°. 6, p. 813-815, mars. 1996.

[143] D. Annane et J.-M. Cavaillon, « Corticosteroids in sepsis: from bench to bedside? », *Shock (Augusta, Ga.)*, vol. 20, n°. 3, p. 197-207, sept. 2003.
[144] J. P. Grünfeld et L. Eloy, « Glucocorticoids modulate vascular reactivity in the rat », *Hypertension*, vol. 10, n°. 6, p. 608-618, déc. 1987.
[145] S. M. Gardiner, P. A. Kemp, J. E. March, et T. Bennett, « Regional haemodynamic responses to infusion of lipopolysaccharide in conscious rats: effects of pre- or post-treatment with glibenclamide », *British Journal of Pharmacology*, vol. 128, n°. 8, p. 1772-1778, déc. 1999.
[146] B. Levy et al., « Vascular hyporesponsiveness to vasopressors in septic shock: from bench to bedside », *Intensive Care Medicine*, vol. 36, n°. 12, p. 2019-2029, déc. 2010.
[147] A. Steiner, R. Locher, A. Sachinidis, et W. Vetter, « Cortisol-stimulated phosphoinositide metabolism in vascular smooth muscle cells: a role for glucocorticoids in blood pressure control? », *Journal of Hypertension. Supplement: Official Journal of the International Society of Hypertension*, vol. 7, n°. 6, p. S140-141, déc. 1989.
[148] P. M. Williamson, J. L. Kohlhagen, G. J. Mangos, J. A. Whitworth, et J. J. Kelly, « Acute effects of hydrocortisone on plasma nitrate/nitrite activity and forearm vasodilator responsiveness in normal human subjects », *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, vol. 32, n°. 3, p. 162-166, mars. 2005.
[149] K. Bhagat, J. Collier, et P. Vallance, « Local venous responses to endotoxin in humans », *Circulation*, vol. 94, n°. 3, p. 490-497, août. 1996.
[150] D. Annane et al., « Impaired pressor sensitivity to noradrenaline in septic shock patients with and without impaired adrenal function reserve », *British Journal of Clinical Pharmacology*, vol. 46, n°. 6, p. 589-597, déc. 1998.
[151] D. Annane et al., « Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock », *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, vol. 288, n°. 7, p. 862-871, août. 2002.
[152] P. E. Bollaert, C. Charpentier, B. Levy, M. Debouverie, G. Audibert, et A. Larcan, « Reversal of late septic shock with supraphysiologic doses of hydrocortisone », *Critical Care Medicine*, vol. 26, n°. 4, p. 645-650, avr. 1998.
[153] J. Briegel et al., « Stress doses of hydrocortisone reverse hyperdynamic septic shock: a prospective, randomized, double-blind, single-center study », *Critical Care Medicine*, vol. 27, n°. 4, p. 723-732, avr. 1999.
[154] D. Keh et al., « Immunologic and hemodynamic effects of "low-dose" hydrocortisone in septic shock: a double-blind, randomized, placebo-controlled, crossover study », *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 167, n°. 4, p. 512-520, févr. 2003.
[155] M. Oppert et al., « Low-dose hydrocortisone improves shock reversal and reduces cytokine levels in early hyperdynamic septic shock », *Critical Care Medicine*, vol. 33, n°. 11, p. 2457-2464, nov. 2005.
[156] C. M. Bamberger, A. M. Bamberger, M. de Castro, et G. P. Chrousos, « Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans », *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 95, n°. 6, p. 2435-2441, juin. 1995.
[157] I. Grad et D. Picard, « The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones », *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 275, n°. 1-2, p. 2-12, sept. 2007.
[158] M. J. Tsai et B. W. O'Malley, « Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members », *Annual Review of Biochemistry*, vol. 63, p. 451-486, 1994.

[159] N. Auphan, J. A. DiDonato, C. Rosette, A. Helmberg, et M. Karin, « Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis », *Science (New York, N.Y.)*, vol. 270, n°. 5234, p. 286-290, oct. 1995.
[160] R. I. Scheinman, P. C. Cogswell, A. K. Lofquist, et A. S. Baldwin, « Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids », *Science (New York, N.Y.)*, vol. 270, n°. 5234, p. 283-286, oct. 1995.
[161] S. Heck, K. Bender, M. Kullmann, M. Göttlicher, P. Herrlich, et A. C. Cato, « I kappaB alpha-independent downregulation of NF-kappaB activity by glucocorticoid receptor », *The EMBO Journal*, vol. 16, n°. 15, p. 4698-4707, août. 1997.
[162] A. Dostert et T. Heinzel, « Negative glucocorticoid receptor response elements and their role in glucocorticoid action », *Current Pharmaceutical Design*, vol. 10, n°. 23, p. 2807-2816, 2004.
[163] P. R. Mittelstadt et J. D. Ashwell, « Inhibition of AP-1 by the glucocorticoid-inducible protein GILZ », *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, n°. 31, p. 29603-29610, août. 2001.
[164] F. Buttgereit, K. G. Saag, M. Cutolo, J. A. P. da Silva, et J. W. J. Bijlsma, « The molecular basis for the effectiveness, toxicity, and resistance to glucocorticoids: focus on the treatment of rheumatoid arthritis », *Scandinavian Journal of Rheumatology*, vol. 34, n°. 1, p. 14-21, 2005.
[165] F. Buttgereit et A. Scheffold, « Rapid glucocorticoid effects on immune cells », *Steroids*, vol. 67, n°. 6, p. 529-534, mai. 2002.
[166] B. Bartholome et al., « Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis », *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 18, n°. 1, p. 70-80, janv. 2004.
[167] M. Löwenberg et al., « Rapid immunosuppressive effects of glucocorticoids mediated through Lck and Fyn », *Blood*, vol. 106, n°. 5, p. 1703-1710, sept. 2005.
[168] J. D. Croxtall, Q. Choudhury, et R. J. Flower, « Glucocorticoids act within minutes to inhibit recruitment of signalling factors to activated EGF receptors through a receptor-dependent, transcription-independent mechanism », *British Journal of Pharmacology*, vol. 130, n°. 2, p. 289-298, mai. 2000.
[169] D. Annane et al., « Corticosteroids in the treatment of severe sepsis and septic shock in adults: a systematic review », *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, vol. 301, n°. 22, p. 2362-2375, juin. 2009.
[170] M. Vinclair et al., « Duration of adrenal inhibition following a single dose of etomidate in critically ill patients », *Intensive Care Medicine*, vol. 34, n°. 4, p. 714-719, avr. 2008.
[171] M. Deuschle et al., « Steroid synthesis inhibition with ketoconazole and its effect upon the regulation of the hypothalamus-pituitary-adrenal system in healthy humans », *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, vol. 28, n°. 2, p. 379-383, févr. 2003.
[172] M. Jäättelä, V. Ilvesmäki, R. Voutilainen, U. H. Stenman, et E. Saksela, « Tumor necrosis factor as a potent inhibitor of adrenocorticotropin-induced cortisol production and steroidogenic P450 enzyme gene expression in cultured human fetal adrenal cells », *Endocrinology*, vol. 128, n°. 1, p. 623-629, janv. 1991.
[173] M. Jäättelä, O. Carpén, U. H. Stenman, et E. Saksela, « Regulation of ACTH-induced steroidogenesis in human fetal adrenals by rTNF-alpha », *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 68, n°. 2-3, p. R31-36, janv. 1990.

[174] R. Natarajan, S. Ploszaj, R. Horton, et J. Nadler, « Tumor necrosis factor and interleukin-1 are potent inhibitors of angiotensin-II-induced aldosterone synthesis », *Endocrinology*, vol. 125, n°. 6, p. 3084-3089, déc. 1989.
[175] H. J. van Leeuwen, E. C. J. M. Heezius, G. M. Dallinga, J. A. G. van Strijp, J. Verhoef, et K. P. M. van Kessel, « Lipoprotein metabolism in patients with severe sepsis », *Critical Care Medicine*, vol. 31, n°. 5, p. 1359-1366, mai. 2003.
[176] P. H. J. van der Voort, R. T. Gerritsen, A. J. Bakker, E. C. Boerma, M. A. Kuiper, et L. de Heide, « HDL-cholesterol level and cortisol response to synacthen in critically ill patients », *Intensive Care Medicine*, vol. 29, n°. 12, p. 2199-2203, déc. 2003.
[177] J.-Y. Chien, J.-S. Jerng, C.-J. Yu, et P.-C. Yang, « Low serum level of high-density lipoprotein cholesterol is a poor prognostic factor for severe sepsis », *Critical Care Medicine*, vol. 33, n°. 8, p. 1688-1693, août. 2005.
[178] S. Weitzman et S. Berger, « Clinical trial design in studies of corticosteroids for bacterial infections », *Annals of Internal Medicine*, vol. 81, n°. 1, p. 36-42, juill. 1974.
[179] W. Schumer, « Steroids in the treatment of clinical septic shock », *Annals of Surgery*, vol. 184, n°. 3, p. 333-341, sept. 1976.
[180] R. Lefering et E. A. Neugebauer, « Steroid controversy in sepsis and septic shock: a meta-analysis », *Critical Care Medicine*, vol. 23, n°. 7, p. 1294-1303, juill. 1995.
[181] C. L. Sprung et al., « Hydrocortisone therapy for patients with septic shock », *The New England Journal of Medicine*, vol. 358, n°. 2, p. 111-124, janv. 2008.
[182] R. P. Dellinger et al., « Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008 », *Critical Care Medicine*, vol. 36, n°. 1, p. 296-327, janv. 2008.
[183] D. Rittirsch, M. S. Huber-Lang, M. A. Flierl, et P. A. Ward, « Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture », *Nature Protocols*, vol. 4, n°. 1, p. 31-36, 2009.
[184] K. A. Wichterman, A. E. Baue, et I. H. Chaudry, « Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal », *The Journal of Surgical Research*, vol. 29, n°. 2, p. 189-201, août. 1980.
[185] E. A. Deitch, « Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned », *Shock (Augusta, Ga.)*, vol. 9, n°. 1, p. 1-11, janv. 1998.
[186] A. Mansart, P. E. Bollaert, C. Seguin, B. Levy, D. Longrois, et J. P. Mallié, « Hemodynamic effects of early versus late glucocorticosteroid administration in experimental septic shock », *Shock (Augusta, Ga.)*, vol. 19, n°. 1, p. 38-44, janv. 2003.
[187] N. Sennoun et al., « Activated protein C improves lipopolysaccharide-induced cardiovascular dysfunction by decreasing tissular inflammation and oxidative stress », *Critical Care Medicine*, vol. 37, n°. 1, p. 246-255, janv. 2009.
[188] C. T. Esmon, « The endothelial protein C receptor », *Current Opinion in Hematology*, vol. 13, n°. 5, p. 382-385, sept. 2006.
[189] P. Bilbault et al., « Influence of drotrecogin alpha (activated) infusion on the variation of Bax/Bcl-2 and Bax/Bcl-xl ratios in circulating mononuclear cells: a cohort study in septic shock patients », *Critical Care Medicine*, vol. 35, n°. 1, p. 69-75, janv. 2007.
[190] M. R. Looney et M. A. Matthay, « Bench-to-bedside review: the role of activated protein C in maintaining endothelial tight junction function and its relationship to organ injury », *Critical Care (London, England)*, vol. 10, n°. 6, p. 239, 2006.
[191] V. Regnault et B. Levy, « Recombinant activated protein C in sepsis: endothelium protection or endothelium therapy? », *Critical Care (London, England)*, vol. 11, n°. 1, p. 103, 2007.

[192] R. Favory, S. Lancel, X. Maréchal, S. Tissier, et R. Neviere, « Cardiovascular protective role for activated protein C during endotoxemia in rats », *Intensive Care Medicine*, vol. 32, n°. 6, p. 899-905, juin. 2006.
[193] H. Isobe et al., « Activated protein C prevents endotoxin-induced hypotension in rats by inhibiting excessive production of nitric oxide », *Circulation*, vol. 104, n°. 10, p. 1171-1175, sept. 2001.
[194] X. Monnet, B. Lamia, N. Anguel, C. Richard, G. Bonmarchand, et J. L. Teboul, « Rapid and beneficial hemodynamic effects of activated protein C in septic shock patients », *Intensive Care Medicine*, vol. 31, n°. 11, p. 1573-1576, nov. 2005.
[195] A. Hafezi-Moghadam et al., « Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase », *Nature Medicine*, vol. 8, n°. 5, p. 473-479, mai. 2002.
[196] H. Prigent, V. Maxime, et D. Annane, « Science review: mechanisms of impaired adrenal function in sepsis and molecular actions of glucocorticoids », *Critical Care (London, England)*, vol. 8, n°. 4, p. 243-252, août. 2004.
[197] A. Mansart, P.-E. Bollaert, B. Levy, M.-B. Nicolas, et J.-P. Mallié, « Comparative effects of dexamethasone and L-canavanine in experimental septic shock », *European Journal of Pharmacology*, vol. 475, n°. 1-3, p. 61-67, août. 2003.
[198] M. O. Maybauer et al., « Recombinant human activated protein C attenuates cardiovascular and microcirculatory dysfunction in acute lung injury and septic shock », *Critical Care (London, England)*, vol. 14, n°. 6, p. R217, 2010.
[199] N. Matsuda, Y. Hayashi, Y. Takahashi, et Y. Hattori, « Phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase is diminished in mesenteric arteries from septic rabbits depending on the altered phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway: reversal effect of fluvastatin therapy », *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 319, n°. 3, p. 1348-1354, déc. 2006.
[200] A. Cauwels, « Nitric oxide in shock », *Kidney International*, vol. 72, n°. 5, p. 557-565, sept. 2007.
[201] P. Pacher, J. S. Beckman, et L. Liaudet, « Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease », *Physiological Reviews*, vol. 87, n°. 1, p. 315-424, janv. 2007.
[202] L. Connelly, M. Madhani, et A. J. Hobbs, « Resistance to endotoxic shock in endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) knock-out mice: a pro-inflammatory role for eNOS-derived no in vivo », *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, n°. 11, p. 10040-10046, mars. 2005.
[203] A. Vieillard-Baron, S. Prin, K. Chergui, O. Dubourg, et F. Jardin, « Hemodynamic instability in sepsis: bedside assessment by Doppler echocardiography », *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 168, n°. 11, p. 1270-1276, déc. 2003.

Annexes

XII. ANNEXES

Annexe1. **Comparative effects of Recombinant Human Activated Protein C and Dexamethasone in experimental septic shock**. **Bouazza, Youcef**[1]; Sennoun, Nacira; Charlène Strub, Véronique Regnault, Sebastien Gibot, Ferhat Meziani, Patrick Lacolley & Bruno Levy. Intensive Care Med. 2011 Aug 18.

Comparative effects of recombinant human activated protein C and dexamethasone in experimental septic shock

Youcef Bouazza, Nacira Sennoun, Charlène Strub, Véronique Regnault, Sebastien Gibot, Ferhat Meziani, Patrick Lacolley & Bruno Levy

Intensive Care Medicine

ISSN 0342-4642

Intensive Care Med
DOI 10.1007/s00134-011-2327-9



Springer

Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Copyright jointly held by Springer and ESICM. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your work, please use the accepted author's version for posting to your own website or your institution's repository. You may further deposit the accepted author's version on a funder's repository at a funder's request, provided it is not made publicly available until 12 months after publication.

Springer

Author's personal copy

Intensive Care Med
DOI 10.1007/s00134-011-2327-9

EXPERIMENTAL

Youcef Bouazza
Nacira Sennoun
Charlène Strub
Véronique Regnault
Sebastien Gibot
Ferhat Meziani
Patrick Lacolley
Bruno Levy

Comparative effects of recombinant human activated protein C and dexamethasone in experimental septic shock

Received: 2 May 2011
Accepted: 11 July 2011

© Copyright jointly held by Springer and ESICM 2011

Electronic supplementary material
The online version of this article (doi:10.1007/s00134-011-2327-9) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Y. Bouazza · N. Sennoun · C. Strub · S. Gibot · B. Levy
Groupe Choc, Contrat Avenir INSERM, Faculté de Médecine, Nancy-Université, Nancy, France

B. Levy (✉)
Service de Réanimation Médicale, Hôpital Brabois, CHU Nancy, Tour Drouet 6, 54500 Vandoeuvre les Nancy, France
e-mail: b.levy@chu-nancy.fr
Tel.: +33-3-83154469
Fax: +33-3-83154084

V. Regnault · P. Lacolley
U961 Inserm, Faculté de Médecine, Nancy-Université, Nancy, France

F. Meziani
Service de réanimation médicale, Nouvel Hôpital Civil, Hôpitaux universitaires de Strasbourg. 1, place de l'hôpital, 67031 Strasbourg, France

F. Meziani
Strasbourg and Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, UMR 7213 CNRS, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 74 route du Rhin, 67401 Illkirch, France

Abstract *Purpose:* To compare the effects of recombinant human activated protein C (APC) and glucocorticoids alone and in combination in non-anesthetized resuscitated septic shock induced by cecal ligation and puncture (CLP) on (a) survival, (b) hemodynamics, and (c) vascular reactivity. The effects of treatments on major cellular pathways likely implicated were also studied. *Methods:* Four hours after CLP, rats were continuously infused with either saline (10 ml/kg/h), saline + APC, saline + dexamethasone (Dexa), or saline + APC + Dexa. Eighteen hours after CLP, arterial pressure, cardiac output, nitrite/nitrate ratio, and lactate concentrations were measured. Aortic rings and mesenteric arteries were isolated and mounted in a myograph, after which arterial contractility and endothelium-dependent relaxation were measured in the presence or absence of nitric oxide synthase (NOS) or cyclooxygenase (COX) inhibitors. Protein expression was assessed by Western blotting. Aorta NO and superoxide anion content were measured by electron paramagnetic resonance. *Results:* All treatments improved hemodynamic parameters and vascular reactivity and decreased lactate and nitrite/nitrate levels.In treated aorta and mesenteric arteries, contractility and endothelial dysfunction were improved. This effect was associated with an increase in the phosphorylated form of protein kinase B as well as an increase in COX vasodilatory pathways and a decrease in iNOS expression suggesting that these pathways are implicated in the vascular effect of the treatments. CLP was associated with a marked increase in aortic NO and superoxide anion content ($p < 0.05$), which were decreased by APC and Dexa and totally abolished by APC + Dexa ($p < 0.01$). Survival length was significantly increased by the APC–Dexa combination. *Conclusions:* Both APC and Dexa improve arterial contractility and endothelial dysfunction resulting from septic shock in rats. Moreover, their combination increased the length of survival. These findings provide important insights into the mechanisms underlying APC- and/or Dexa-induced improvements of arterial dysfunction during septic shock.

Keywords Septic shock · Glucocorticoids · Activated protein C · Nitric oxide

Published online: 18 August 2011

Author's personal copy

Introduction

Endothelial dysfunction with impaired release of endothelial nitric oxide (NO) and prostacyclin, reduction of vascular reactivity to vasoconstrictors associated with leukocytes, and platelet aggregation are all hallmarks of the pathophysiology of septic shock [1]. Moreover, amongst the most prominent features of sepsis contributing significantly to its outcome is activation of coagulation with concurrent downregulation of anticoagulant systems and fibrinolysis. Inflammation-induced coagulation in turn contributes to inflammation [2]. Several hypotheses have been proposed to explain sepsis-induced vascular failure including the presence of activated leukocytes and the effects of various pro-inflammatory cytokines. Most of the effects of pro-inflammatory cytokines have been attributed to massive production of nitric oxide (NO) and peroxynitrite [2].

International guidelines for management of severe sepsis and septic shock recommend both stress-dose steroid therapy and recombinant activated protein C (APC) in patients with septic shock [3]. Nevertheless, the benefits of both APC and corticosteroids in septic shock remain controversial. Indeed, there is only one large randomized controlled study that fully supports the use of APC and steroids in septic shock. Moreover, the Surviving Sepsis Campaign proposed only an average level of recommendation, namely grade 2B for APC and grade 2C for corticosteroids.

Recombinant human rhAPC has been demonstrated to reduce the mortality rate of adult patients with septic shock [4]. This effect was thought to be related to its anticoagulant and anti-inflammatory processes in severe sepsis. Post-PROWESS investigative areas have been associated with a myriad of cellular studies [5] demonstrating that APC, through reactions mediated by endothelial protein C receptor (EPCR) [6] and the effector receptor, protease activated receptor-1, acts directly on cells to exert multiple cytoprotective effects including (a) downregulation of pro-inflammatory gene expression [7, 8], (b) anti-apoptotic activity [9], (c) antioxidant properties, and (d) protection of endothelial barrier function [10, 11]. Recent animal [12–14] and human [15] data have suggested that APC may improve both vascular and myocardial dysfunction and vascular reactivity to catecholamines during endotoxin and/or septic challenges [16].

Similarly, glucocorticoids during septic shock improve shock reversal and mortality in the most severe patients [17]. Cortisol increases blood pressure through several mechanisms involving the kidney and vasculature [18]. In vascular smooth muscle, cortisol increases sensitivity to vasopressor agents. Although the effect of glucocorticoids on nitric oxide is complex, it appears to increase endothelial nitric oxide synthase (eNOS), through phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and protein kinase AKT activation thereby maintaining microvascular perfusion [19]. Cortisol decreases the production of cytokines, chemokines, and eicosanoids and enhances the production of macrophage migration inhibitory factor [20].

Therefore, APC and corticosteroids may act through common pathways (iNOS, eNOS, AKT) but also through well-individualized particular pathways (coagulation). We therefore hypothesized that the combination of APC + steroids would be beneficial compared with their use individually. Contrary to myocardial infarction therapy in which therapies have been tested both individually and concomitantly, there are currently no data to support the concomitant use of APC and corticosteroids despite the fact that both are recommended in sepsis bundles.

Hence, the aims of the present study were to compare the effects of APC and dexamethasone (Dexa) alone as well as in combination in resuscitated septic shock induced by cecal ligation and puncture (CLP) on (a) survival, (b) hemodynamics, and (b) vascular reactivity. We also studied the effects of treatments on the main cellular pathways likely implicated in this process.

Materials and methods

Animal preparation and monitoring

This study was approved by the Nancy Institutional Committee on Animal Care and Use. All animals were treated in compliance with the principles of laboratory animal care of the National Institutes of Health (NIH).

Shock model

Adult male Wistar rats (Depré, St Doulchard, France) weighing from 280 to 320 g were used in the study. Rats were anesthetized with isoflurane using 95% oxygen and 5% carbon dioxide as a carrier gas. A 2–3 cm ventral midline incision was performed. The cecum was ligated immediately distal to the ileocecal valve to avoid intestinal obstruction and punctured with a 21-gauge needle. The cecum was gently compressed to extrude cecal contents and returned to the abdomen after which the incision was closed with sutures. The left internal carotid artery and right external jugular vein were cannulated (tubing PE-50) under sterile conditions. These lines were tunneled subcutaneously to the back of the neck where they were attached to a swivel device. Four hours after the surgery, all rats received a continuous infusion of saline (10 ml/kg/h), analgesic (nalbuphin, 1 mg/kg), and antibiotic (imipenem, 10 mg/kg). At this point, rats were randomized to receive either APC or dexamethasone. APC (drotecogin alpha activated, Xigris®, Lilly, Indianapolis, USA)was diluted in saline and infused at 33 μg/kg/h

Author's personal copy

as previously used [16]. Dexamethasone was diluted in saline and injected intravenously at a dose of 1 mg/kg/day as previously used [21].

Experimental design

Animals were randomly divided into six groups: control, sham operated rats, CLP, CLP + Dexa, CLP + APC, and CLP + Dexa + APC.

A first group of rats was used to study the effects of septic shock and treatments on survival ($n = 15$ per group). The second group was used for hemodynamic measurements, vascular reactivity studies, and tissue analysis.

In vivo measurements

Arterial blood pressure was recorded from the carotid artery catheter. Cardiac output was measured by thermodilution using Cardiomax III (Colombus Instruments, Ohio, USA) 18 h after surgery.

Lactate concentrations were determined with an automated blood gas analyzer (ABL 700, Radiometer, Copenhagen, Denmark).

Nitrite and nitrate were measured as described previously [21] and in the electronic supplementary material (ESM).

Plasma levels of interleukin 6 (IL-6) were measured by ELISA (Quantikine ELISA kit, R&D Systems) according to the manufacturer's instructions.

Ex vivo measurements

Vascular reactivity

Vascular reactivity of aortic rings was studied on a wire myograph (Danish Myo Technology, Aarhus, Denmark) as described previously [22] and in the ESM.

Western blot analysis

Western blot analyses were performed on aorta for iNOS, alpha-tubulin, phospho-AKT, and AKT. Detailed methods are provided in the ESM.

NO and superoxide anion determination by electron paramagnetic resonance (EPR) in the aorta

NO production was measured by EPR spectroscopy analysis with the use of the spin-trap colloid $Fe(DETC)_2$ as described previously [16]. Superoxide anion production was determined by EPR analysis with deferoxamine-chelated Krebs-Hepes solution containing 1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine (CMH, Noxygen, Germany) (500 μM), deferoxamine (25 μmol/l), and DETC (5 μmol/l).

Statistical analysis

Results are expressed as mean ± SD. A repeated measures one-way analysis of variance was used to evaluate within-group differences. Difference between groups was tested using a two-way analysis of variance (repeated time measurements and treatment as independent variables). When the relevant F values were significant at the 5% level, further pairwise comparisons were performed using Dunnett's test for the effect of time and with the Bonferroni correction for the effects of treatment at specific times. The protection against CLP lethality by treatments was assessed by comparison of survival curves using the log-rank test. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. A software package was used for all statistical analyses (PRISM 4, GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Results

Effects of treatment on survival length

The median survival in the CLP group was 25 h (Fig. 1). APC did not improve survival length (median survival length 26 h). Mortality was delayed in the dexamethasone group when compared with the CLP group (median survival length 34 vs. 25 h) ($p < 0.05$). The combination Dexa–APC further improved the length of survival when compared with all groups (median survival length 42 h) ($p < 0.01$).

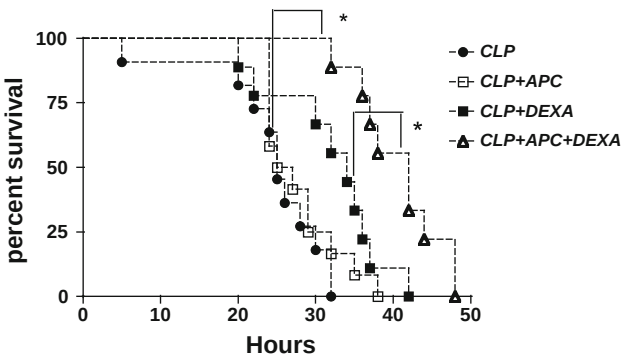


Fig. 1 Survival curves for CLP (*filled circles*), CLP + APC (*open squares*), CLP + Dexa (*filled squares*), and CLP +APC + Dexa (*triangles*). *$p < 0.05$

Author's personal copy

APC, Dexa, and their combination improve arterial pressure and cardiac output

When compared with the sham group (114 ± 11 mmHg), CLP was associated with a decrease in mean arterial pressure (MAP; 81 ± 6 mmHg) ($p < 0.05$), which was significantly increased following all treatments (APC: 97 ± 12 mmHg; Dexa: 101 ± 5 mmHg; Dexa +APC: 110 ± 11 mmHg) ($p < 0.01$) (Fig. 2).

Similarly, when compared with the sham group (118 ± 9 ml/min), cardiac output significantly decreased in the CLP group (78 ± 13 ml/min) ($p < 0.01$), which was significantly increased with all treatments (APC: 99 ± 11 ml/min; Dexa: 102 ± 7 ml/min; Dexa +APC: 110 ± 5 ml/min) ($p < 0.01$).

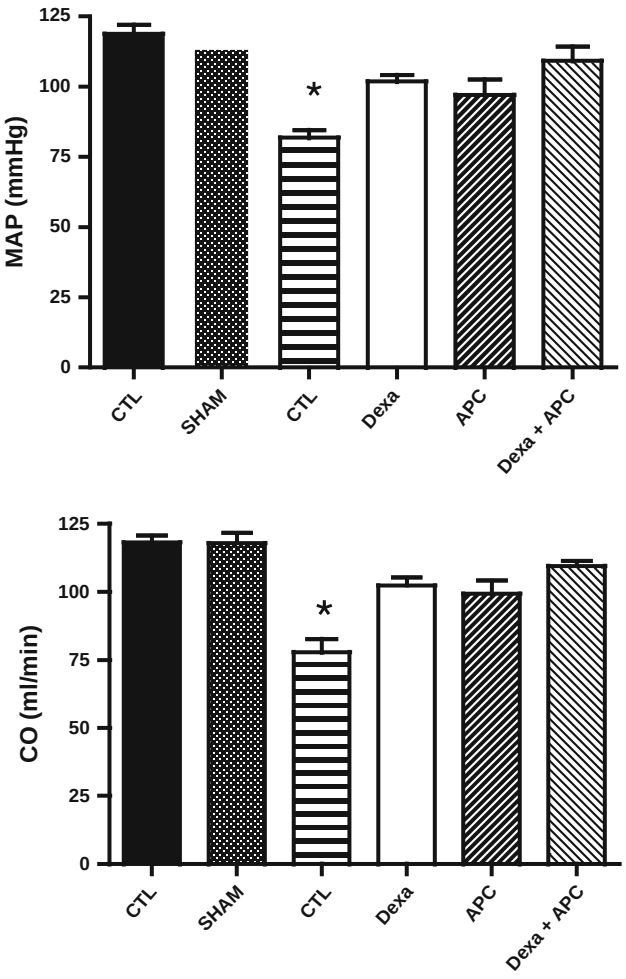


Fig. 2 Evolution of MAP and cardiac output. *$p < 0.05$ versus sham group

APC, Dexa, and their combination decrease the CLP-induced rise in lactate and nitrite/nitrate concentration

CLP was associated with a marked elevation in plasma lactate (9 ± 2 mmol/l) when compared with the sham group (2.1 ± 0.5 mmol/l) levels; this elevation was significantly decreased by all treatments (APC: 5 ± 2.3 mmol/l; Dexa: 7 ± 2 mmol/l; Dexa +APC: 5.7 ± 1 mmol/l) ($p < 0.05$) (Fig. 1, ESM). APC and the APC–Dexa combination further decreased the lactate level compared with Dexa alone ($p < 0.05$).

The nitrite/nitrate concentration increased in the CLP group (30 ± 9 μmol/l) when compared with the sham group (12 ± 4 μmol/l). All treatments significantly decreased the nitrite/nitrate ratio in septic animals (APC: 15 ± 6 μmol/l; Dexa: 14 ± 5 μmol/l; Dexa +APC: 15 ± 5 μmol/l) ($p < 0.01$).

CLP markedly increased IL-6 levels when compared with sham rats (from 37 ± 5 to 331 ± 40 pg/ml) ($p < 0.01$). These levels were significantly decreased by Dexa alone (129 ± 20 pg/ml) ($p < 0.05$) and the combination APC–Dexa (70 ± 15 pg/ml)($p < 0.05$). IL-6 levels decreased but not significantly with APC (169 ± 20 pg/ml).

APC, Dexa, and their combination improve contractile capacity and endothelial dysfunction induced by CLP

Phenylephrine (PE) caused a dose-dependent increase in tension in aortic rings and small mesenteric arteries (SMA) in control rats (Fig. 3). CLP blunted the PE-stimulated contraction in aortic rings and SMA ($p < 0.01$), whereas all of the studied drugs significantly restored the maximal contractile capacity of aortic rings and SMA to control levels ($p < 0.01$).

Acetylcholine (ACh) produced a concentration-dependent relaxation of isolated aortic rings and SMA. Compared with the control and sham groups, vascular responses to ACh were significantly decreased in aorta and SMA of CLP rats ($p < 0.05$). Conversely, the addition of all the drugs studied alone or in combination significantly blunted the endothelial dysfunction induced by CLP. The only exception was recorded with CLP–Dexa where the observed effects in SMA showed a partial improvement only.

In rats treated with APC, Dexa, and APC–Dexa, the adjunction of NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) or indomethacin diminished ACh-induced vasodilatation by 50% in the aorta ($p < 0.05$) and in SMA ($p < 0.01$). Conversely, in non-treated vessels harvested from CLP rats, neither L-NAME nor indomethacin modified this reactivity.

Author's personal copy

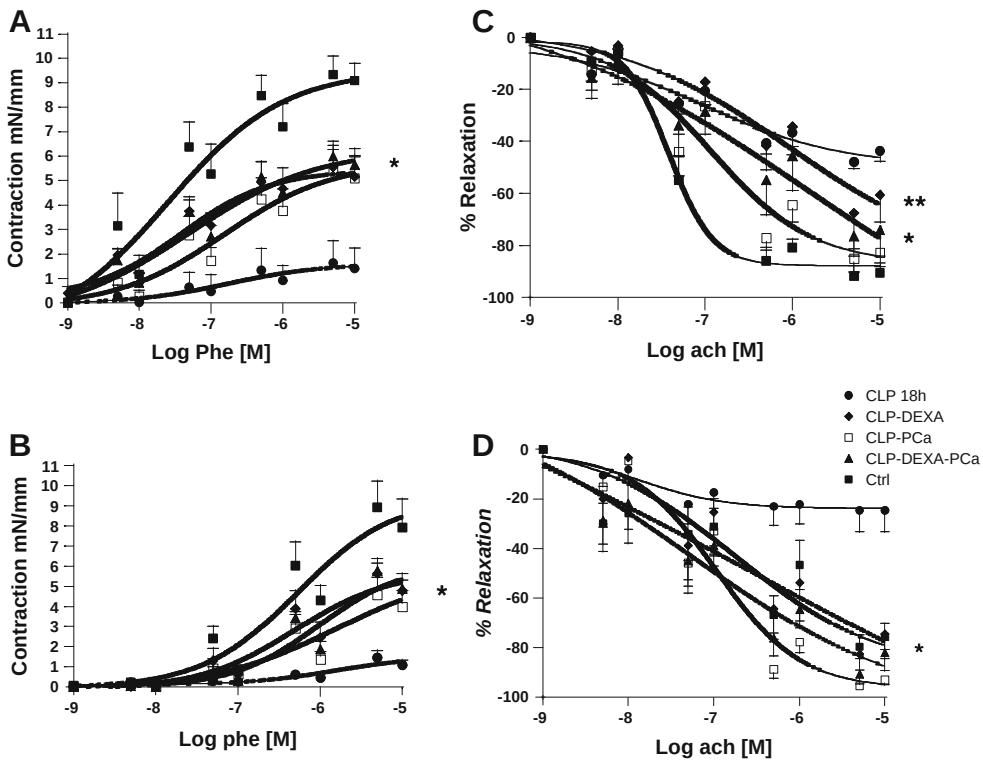


Fig. 3 Effects of treatment on PE-induced contraction in aorta (**a**) and SMA (**b**) and on dilatation to acetylcholine in aorta (**c**) and SMA (**d**). $*p < 0.05$ versus other group, $**p < 0.05$ vs other group

APC, Dexa, and their combination restore phosphorylated Akt-to-Akt ratio, while reducing CLP-induced upregulation of iNOS expression (Figs. 4, 5)

To investigate the mechanisms involved in the beneficial effect of treatments on endothelium-dependent dilation, the role of the Akt/PI3K pathway was assessed, since the decrease in activity of this pathway may be attributable to altered eNOS phosphorylation. Akt, phosphorylated Akt (Akt Ser^{473} phosphorylation) expression levels, and the phosphorylated Akt-to-Akt ratio were decreased in the aorta of CLP rats. APC, Dexa, and APC–Dexa treatment blunted these decreases. The expression of iNOS protein, as assessed by Western blotting, increased in CLP rats (compared with rats from control and sham groups). This increase in iNOS expression was significantly reduced by

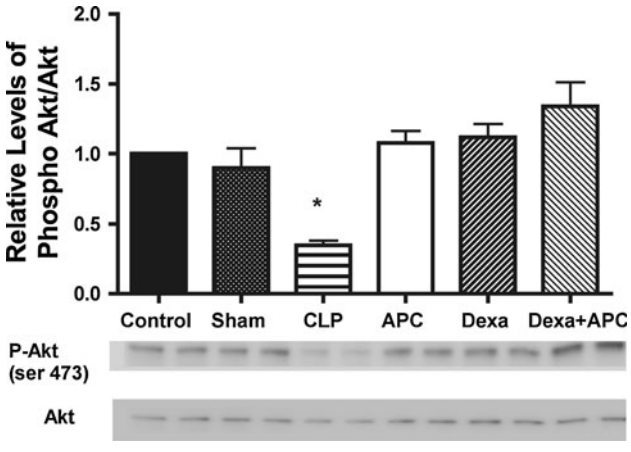


Fig. 4 Evaluation of arterial wall enzyme expression and activation. Western blot analysis of protein kinase B (Akt) and phospho-Akt, in aorta isolated from sham or CLP rats in the presence or absence of rhAPC and/or dexamethasone. Data are presented as phosphorylated Akt-to-Akt ratio. Values are expressed as means ± SE ($n = 6$ per group). $*p < 0.05$ compared with sham

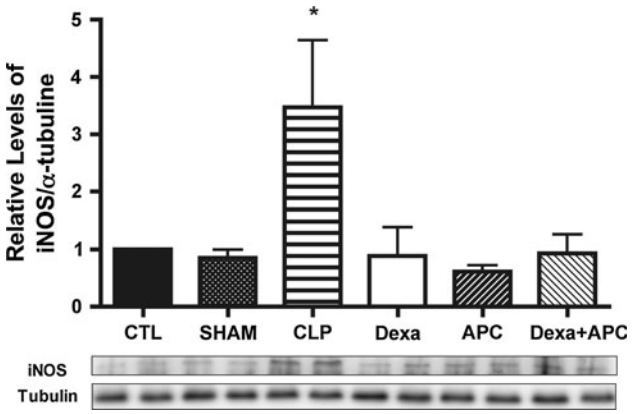


Fig. 5 Western blot analysis of iNOS protein in aorta isolated from sham or CLP rats in the presence or absence of rhAPC and/or dexamethasone. Values are expressed as means ± SE ($n = 6$ per group). $*p < 0.05$ compared with sham

Author's personal copy

the administration of Dexa, APC, and combination therapy ($p < 0.05$).

Effects of treatments on aorta NO and superoxide anion content

As previously described, CLP increased NO and superoxide anion content in the aorta. These increased levels were decreased by APC and normalized by APC + Dexa. On the other hand, aorta NO and superoxide anion content were only slightly decreased by Dexa ($p < 0.05$) (Fig. 2, ESM).

Discussion

The present study suggests that APC and glucocorticoids are beneficial in terms of hemodynamics, tissue oxygenation, and vascular reactivity in our model of experimental septic shock. Moreover, their combination further normalized the aorta NO and superoxide anion content and improved the length of survival. These effects appear to be associated with an increase in in situ activation/expression of eNOS and a reduced expression of iNOS. To our knowledge, this is the first study reporting new insights into the comparative benefits of the in vivo effect of rhAPC and/or glucocorticoids on sepsis-induced cardiovascular dysfunction and mortality in a clinically relevant model of septic shock.

Vascular effects

We and others have previously demonstrated that APC and glucocorticoids improve arterial pressure and cardiac output [16, 21, 23, 24] in different models of experimental septic shock through the modulation of sepsis-induced inflammation, NO, and reactive oxygen species (ROS) production. In the present study, we were not able to find any differences in the various cellular pathways explored since both APC and glucocorticoids display a myriad of genomic and non-genomic effects including anti-inflammatory effects, endothelium protection, and decreased ROS production [7, 20]. Nevertheless, we found that the combination APC + Dexa was able to normalize aorta and superoxide anion content. During sepsis, vascular hyporeactivity has been related mainly to NO overproduction. In this study, APC + Dexa normalized the aortic NO content and superoxide content. Although we did not evaluate peroxynitrite production at the vessel level, it is well demonstrated that when both superoxide and NO are synthesized within a few cell diameters of each other, they will combine spontaneously to form peroxynitrite by a diffusion-limited reaction. Further evidence supports the concept that the final effector mechanism of vascular failure in shock may be due to the peroxynitrite-mediated activation of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) because vascular hyporeactivity occurring in experimental models of both septic and hemorrhagic shock was ameliorated by inhibitors of PARP or its genetic deletion.

Interestingly, all of the treatments were associated with a marked improvement in sepsis-induced hyporesponsiveness to vasopressors and in sepsis-induced endothelial dysfunction. This improvement appeared to be linked to a profound modification in the NO pathway because both an increased phosphorylation of Akt and a decrease in iNOS expression were observed. Sepsis causes a progressive and profound reduction in phosphorylation of eNOS [25] Alterations in endothelial cell surface receptors and modified signal transduction pathways such as receptor–eNOS uncoupling have been shown to result in a loss of the protective role of NO [26]. Our results support such a hypothesis, because CLP-induced endothelial dysfunction is due in part to decreased eNOS activity, which is most likely associated with a decrease in Akt phosphorylation in the arterial wall. Interestingly, APC and Dexa overcome the deleterious endothelial effect of CLP. Indeed, the beneficial effect of APC and Dexa on ACh-induced relaxation could be explained by eNOS activation and COX vasorelaxant metabolites [22]. NO is one of the major endothelial relaxant factors produced by eNOS, allowing the endothelium to regulate smooth muscle tone and proliferation, leukocyte recruitment, and platelet aggregation. The expression of eNOS is increased severalfold by multiple factors, including shear stress, vascular endothelial growth factor, ACh, and estrogens [27]. Phosphorylated eNOS, via the Akt/PI3K pathway, is known to regulate enzyme activity [28]. CLP challenge involves eNOS activity in its early phase and induces a later increase in iNOS expression [29] that can exert a negative feedback on eNOS expression [30]. It is well documented that sepsis impairs endothelium-dependent relaxation to ACh, leading to endothelial dysfunction in both resistance and conductance arteries [29]. Moreover, in keeping with reported data in the field of lipopolysaccharide (LPS)-induced endothelial dysfunction [16], we can hypothesize, as others have done [31], that APC and Dexa reduce NF-kB activation and iNOS expression leading to improved endothelial dysfunction and vascular contractility. As recently demonstrated [16], at the relatively low dose used, rhAPC in rats did influence coagulation parameters. Thus the beneficial effects of APC appear to be driven by its cytoprotective properties rather than its anticoagulant effects.

Finally, NOS and COX inhibition only partially reversed the beneficial effects of APC and/or glucocorticoids on endothelial dysfunction, thus further implicating other mechanisms in sepsis-induced endothelial dysfunction.

Author's personal copy

Effects on blood flow

All treatments were also found to improve the response to volume resuscitation since treated rats had a higher cardiac output than peritonitis-only rats. Nevertheless, despite the large amount of infused fluids, our model remains hypokinetic. Recent unpublished data from our group using a cardiac conductance catheter demonstrate that this model associates both vascular failure and severe myocardial hypocontractility. Although not explored in the present study, our results suggest that APC and glucocorticoids also act on myocardial function [12].

Effects on length of survival

All of the combined actions of APC plus glucocorticoids herein led to an enhanced survival in this lethal sepsis model. Although we did not explore all of the putative pathways implicated in APC and glucocorticoid effects, our results nevertheless suggest that the combination of APC plus glucocorticoids is more efficient than treatment alone in decreasing NO and superoxide anion tissular production, two mediators intricately implicated in sepsis cardiovascular failure.

Particularities and limits of the study

Since the endotoxemia model is certainly not a true reflection of the actual clinical setting, we modified the classical CLP model (a) by using a non-anesthetized model of peritonitis in order to overcome the effects of anesthetic agents on vasculature that may mimic a vasoplegic shock state mainly by decreasing vascular responsiveness to vasopressors through activation of vascular ATP-sensitive potassium [32]; and (b) by using volume resuscitation, antibiotics, and delayed treatment (4 h after CLP induction).

One persistent limitation is that the current model is a hypokinetic model and represents only 20% of septic shock patients [33]. Nevertheless, it features the unresuscitated, low cardiac output state associated with the early phase of septic shock as demonstrated by Rivers et al. [34]. Moreover, because our study used a lethal model instead of a sublethal model, we were unable to measure the effects of treatments on actual survival. Nevertheless, our model is clearly associated with vascular and myocardial dysfunction and certainly appears to be suitable for mechanistic studies.

Finally, the choice of dexamethasone, which is fivefold more anti-inflammatory than hydrocortisone, as well as the dose delivered, should be discussed. In clinical practice, low-dose corticosteroid therapy is preferred to high doses because high dosages have been associated with an increase in the risk of death [17]. Nevertheless, when reviewing the experimental literature, all of the studies reported an improvement in survival independently of the molecule, the dose, and the presence of mineralocorticoid effect. This might be explained by the fact that the deleterious effects of high doses are generally related to superinfections which are not present in a short and lethal model of septic shock.

Conclusions

Both APC and Dexa improved arterial contractility and endothelial dysfunction resulting from septic shock in rats. Moreover, their combination increased the length of survival. These findings suggest that APC and glucocorticoids should be further re-evaluated in combination in septic shock.

Acknowledgment The authors thank Mr Pothier Pierre (Pierre Pothier Translation, Sherbrooke, Quebec, Canada) for his help in translating the manuscript. This work was supported by Inserm.

Conflict of interest None of the authors declare any conflict of interest in relation to this study.

References

1. Aird WC (2004) Endothelium as an organ system. Crit Care Med 32:S271–S279
2. Levi M, van der Poll T (2010) Inflammation and coagulation. Crit Care Med 38:S26–S34
3. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, Reinhart K, Angus DC, Brun-Buisson C, Beale R, Calandra T, Dhainaut JF, Gerlach H, Harvey M, Marini JJ, Marshall J, Ranieri M, Ramsay G, Sevransky J, Thompson BT, Townsend S, Vender JS, Zimmerman JL, Vincent JL (2008) Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. Intensive Care Med 34:17–60
4. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJ Jr (2001) Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. N Engl J Med 344:699–709
5. Mosnier LO, Zlokovic BV, Griffin JH (2007) The cytoprotective protein C pathway. Blood 109:3161–3172

Author's personal copy

6. Esmon CT (2006) The endothelial protein C receptor. Curr Opin Hematol 13:382–385
7. Joyce DE, Gelbert L, Ciaccia A, DeHoff B, Grinnell BW (2001) Gene expression profile of antithrombotic protein C defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. J Biol Chem 276:11199–11203
8. Day NP, Phu NH, Mai NT, Bethell DB, Chau TT, Loc PP, Chuong LV, Sinh DX, Solomon T, Haywood G, Hien TT, White NJ (2000) Effects of dopamine and epinephrine infusions on renal hemodynamics in severe malaria and severe sepsis. Crit Care Med 28:1353–1362
9. Bilbault P, Lavaux T, Launoy A, Gaub MP, Meyer N, Oudet P, Pottecher T, Jaeger A, Schneider F (2007) Influence of drotrecogin alpha (activated) infusion on the variation of Bax/Bcl-2 and Bax/Bcl-xl ratios in circulating mononuclear cells: a cohort study in septic shock patients. Crit Care Med 35:69–75
10. Looney MR, Matthay MA (2006) Bench-to-bedside review: the role of activated protein C in maintaining endothelial tight junction function and its relationship to organ injury. Crit Care 10:239
11. Regnault V, Levy B (2007) Recombinant activated protein C in sepsis: endothelium protection or endothelium therapy? Crit Care 11:103
12. Favory R, Lancel S, Marechal X, Tissier S, Neviere R (2006) Cardiovascular protective role for activated protein C during endotoxemia in rats. Intensive Care Med 32:899–905
13. Isobe H, Okajima K, Uchiba M, Mizutani A, Harada N, Nagasaki A, Okabe K (2001) Activated protein C prevents endotoxin-induced hypotension in rats by inhibiting excessive production of nitric oxide. Circulation 104:1171–1175
14. Gupta A, Rhodes GJ, Berg DT, Gerlitz B, Molitoris BA, Grinnell BW (2007) Activated protein C ameliorates LPS-induced acute kidney injury and downregulates renal iNOS and angiotensin 2. Am J Physiol Renal Physiol 293:F245–F254
15. Monnet X, Lamia B, Anguel N, Richard C, Bonmarchand G, Teboul JL (2005) Rapid and beneficial hemodynamic effects of activated protein C in septic shock patients. Intensive Care Med 31:1573–1576
16. Sennoun N, Meziani F, Dessebe O, Cattan V, Collin S, Montemont C, Gibot S, Asfar P, Ramaroson A, Regnault V, Slama M, Lecompte T, Lacolley P, Levy B (2009) Activated protein C improves lipopolysaccharide-induced cardiovascular dysfunction by decreasing tissular inflammation and oxidative stress. Crit Care Med 37:246–255
17. Annane D, Bellissant E, Bollaert PE, Briegel J, Confalonieri M, De Gaudio R, Keh D, Kupfer Y, Oppert M, Meduri GU (2009) Corticosteroids in the treatment of severe sepsis and septic shock in adults: a systematic review. JAMA 301:2362–2375
18. Marik PE, Pastores SM, Annane D, Meduri GU, Sprung CL, Arlt W, Keh D, Briegel J, Beishuizen A, Dimopoulou I, Tsagarakis S, Singer M, Chrousos GP, Zaloga G, Bokhari F, Vogeser M (2008) Recommendations for the diagnosis and management of corticosteroid insufficiency in critically ill adult patients: consensus statements from an international task force by the American College of Critical Care Medicine. Crit Care Med 36:1937–1949
19. Hafezi-Moghadam A, Simoncini T, Yang Z, Limbourg FP, Plumier JC, Rebsamen MC, Hsieh CM, Chui DS, Thomas KL, Prorock AJ, Laubach VE, Moskowitz MA, French BA, Ley K, Liao JK (2002) Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase. Nat Med 8:473–479
20. Prigent H, Maxime V, Annane D (2004) Science review: mechanisms of impaired adrenal function in sepsis and molecular actions of glucocorticoids. Crit Care 8:243–252
21. Mansart A, Bollaert PE, Levy B, Nicolas MB, Mallie JP (2003) Comparative effects of dexamethasone and L-canavanine in experimental septic shock. Eur J Pharmacol 475:61–67
22. Sennoun N, Baron-Menguy C, Burban M, Lecompte T, Andriantsitohaina R, Henrion D, Mercat A, Asfar P, Levy B, Meziani F (2009) Recombinant human activated protein C improves endotoxemia-induced endothelial dysfunction: a blood-free model in isolated mouse arteries. Am J Physiol Heart Circ Physiol 297:H277–H282
23. Mansart A, Bollaert PE, Seguin C, Levy B, Longrois D, Mallie JP (2003) Hemodynamic effects of early versus late glucocorticosteroid administration in experimental septic shock. Shock 19:38–44
24. Maybauer MO, Maybauer DM, Fraser JF, Szabo C, Westphal M, Kiss L, Horvath EM, Nakano Y, Herndon DN, Traber LD, Traber DL (2010) Recombinant human activated protein C attenuates cardiovascular and microcirculatory dysfunction in acute lung injury and septic shock. Crit Care 14:R217
25. Matsuda N, Hayashi Y, Takahashi Y, Hattori Y (2006) Phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase is diminished in mesenteric arteries from septic rabbits depending on the altered phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway: reversal effect of fluvastatin therapy. J Pharmacol Exp Ther 319:1348–1354
26. Cauwels A (2007) Nitric oxide in shock. Kidney Int 72:557–565
27. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. Physiol Rev 87:315–424
28. Dudzinski DM, Michel T (2007) Life history of eNOS: partners and pathways. Cardiovasc Res 75:247–260
29. Levy B, Collin S, Sennoun N, Ducrocq N, Kimmoun A, Asfar P, Perez P, Meziani F (2010) Vascular hyporesponsiveness to vasopressors in septic shock: from bench to bedside. Intensive Care Med 36:2019–2029
30. Connelly L, Madhani M, Hobbs AJ (2005) Resistance to endotoxic shock in endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) knock-out mice: a pro-inflammatory role for eNOS-derived no in vivo. J Biol Chem 280:10040–10046
31. Strunk V, Hahnenkamp K, Schneuing M, Fischer LG, Rich GF (2001) Selective iNOS inhibition prevents hypotension in septic rats while preserving endothelium-dependent vasodilation. Anesth Analg 92:681–687
32. Buckley JF, Singer M, Clapp LH (2006) Role of KATP channels in sepsis. Cardiovasc Res 72:220–230
33. Vieillard-Baron A, Prin S, Chergui K, Dubourg O, Jardin F (2003) Hemodynamic instability in sepsis: bedside assessment by Doppler echocardiography. Am J Respir Crit Care Med 168:1270–1276
34. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, Peterson E, Tomlanovich M (2001) Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. N Engl J Med 345:1368–1377

Supplementary material

Detailed methods

Vascular Reactivity.

Aortic rings and isolated small mesenteric arteries (SMA) (200–230 μm diameter) were carefully dissected and mounted on a wire myograph (Danish Myo Technology, Arhus, Denmark). The experiments were performed at 37°C in a physiological salt solution (PSS) with the following composition (mM): NaCl 119; KCl 4.7; $NaHCO_3$ 14.9; $MgSO_4.7H_2O$ 1.2; $CaCl_2$ 2.5; KH_2PO_4 1.18; glucose 5.5, continuously bubbled with 95% O_2 and 5% CO_2.

After an equilibration period (at least 20 min) under optimal passive tension, two successive contractions in response to the combination of KCl depolarization (100 mM) and phenylephrine (PE) (10 μM) (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) were used in order to test the maximal contractile capacity of the vessels. After a 20-minute washout period, concentration-response curves to PE were elicited by cumulative administration of this vasoconstrictor agonist (1nM to 100μM) in order to determine the same concentration producing an equal level of contraction in the different groups. To study endothelium-dependent relaxation, aortic rings with functional endothelium were precontracted with PE (1μM) and then exposed to increasing incremental concentrations of acetylcholine (ACh) (1nM to 100 μM; Sigma, St Louis, MO, USA). The presence of functional endothelium was confirmed with acetylcholine (1μM), which elicited a relaxation greater than 50%.

To investigate the mechanisms involved in the endothelial effect of rhAPC and DEXA, particularly with regard to the role of NO and COX-induced prostanoids, all of the above vascular experiments were consecutively conducted in the presence or absence of the NO synthase inhibitor NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME 100 μM; Sigma-Aldrich) or COX inhibitor (indomethacin 10 μM; Sigma-Aldrich). The inhibitor was added in the bath 30 min prior to the

addition of ACh. The first curve obtained with ACh was used as a control, while the effect of the inhibitor was tested on the second curve.

Western Blot Analysis.

Aortic tissue was homogenized (Tissue-Lyser II, Qiagen, Courtaboeuf, France) with beads (3 mm diameter) in lysis buffer consisting of PhosphoSafe Extraction Reagent (Novagen, Merck Biosciences, Nottingham, UK). Protein content was measured by the Bradford method using a BCA Protein Assay Kit (Pierce, ThermoScientific, Brebières, France). Protein extracts from aortic tissue (20µg) were separated by a 4 to 12% Criterion XT Bis-Tris Gel (BioRad, Marnes-la-Coquette, France) and transferred electrophoretically onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore, Saint-Quentin en Yvelines, France). Nonspecific binding sites on the membrane were blocked with 5% nonfat dry milk in tris-HCl containing 0.1% Tween 20 buffer (TBS-T) and incubated overnight at 4 C° with mouse anti-rat-iNOS (1:1000; Abcam, Paris, France), mouse anti-rat-α-tubulin (1:1000 (St. Quentin Fallavier, France), rabbit anti-rat-phospho-Akt and anti-rat-Akt (1:1000; Cell Signaling, Ozyme, Saint-Quentin en Yvelines, France). α-tubulin was used as a protein loading control.

After washings in TBS-T0.1%, the membranes were exposed to horseradish peroxidase-conjugated (HRP) IgG secondary antibody (1:2000, St. Quentin Fallavier, France) for 1 h at room temperature. Finally, membranes were washed three times with TBS-T0.1%. Acquisition and quantitative signals of bound antibody density analyses were performed by LAS-4000 imager (FSVT, Courbevoie, France) and Multi-Gauge software (LifeScience, Fujifilm, France). Quantitative analysis of phospho-Akt was normalized by the quantification of total Akt on the same membranes. After stripping, the membranes were incubated for 20 min at 65C°, submerged in stripping buffer (2% SDS, 62.5mM TRIS pH6.8, 100mM Beta-mercaptoethanol), washed three times in TBS-T0.1%, blocked and re-probed with rabbit anti-rat-Akt (1:1000; Cell Signaling, Ozyme).

After densitometric analyses, optical density values were expressed as arbitrary units (AU).

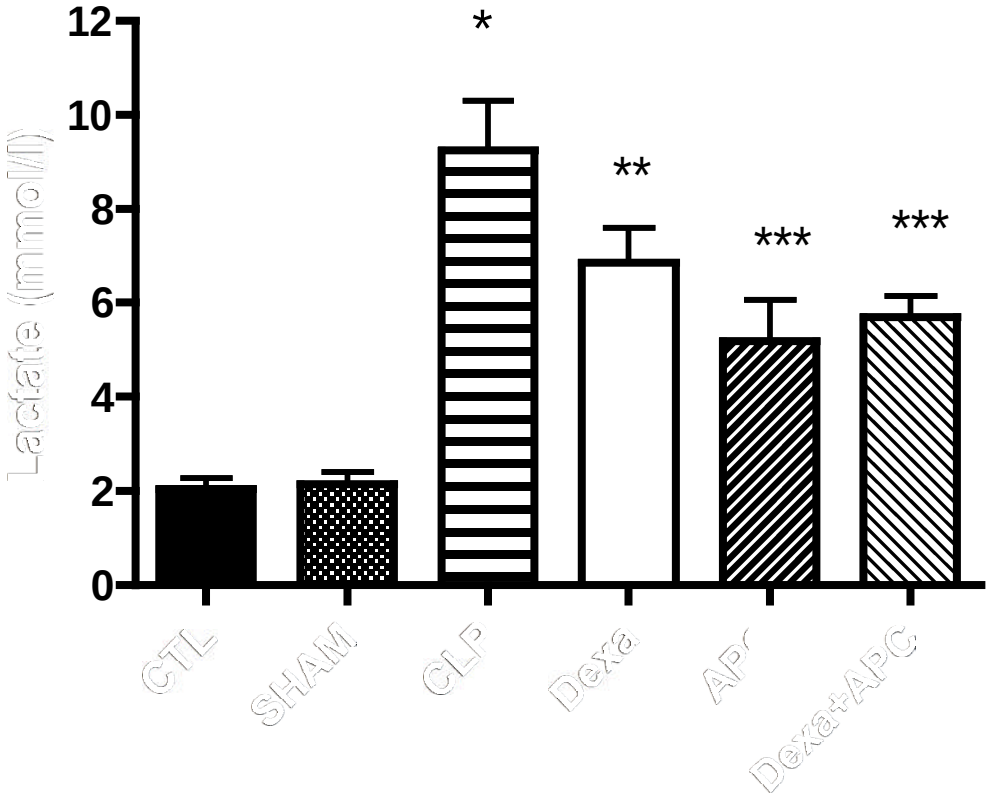
Measurement of nitrite and nitrate.

NO_2^- and NO_3^- are the primary oxidized products of NO reacting with water and therefore total concentration of NO_2^- /NO_3^- in plasma was used as an indicator of NO production in vivo. Briefly, the nitrate in the supernatant was first reduced to nitrite by incubation with nitrate-reductase (10U/mL) and NADPH (629.2 µg/mL) at room temperature for 30 minutes. Thereafter, total nitrite concentration in the samples was measured by Griess reaction following the addition of 100 µl of Griess reagent to 100µl of sample in a 96-well plate with a flat transparent bottom. The optical density at 550 nm (OD550) was measured by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) microplate reader and normalized with OD550 of standard saline solutions.

Figure 1.

Evolution of lactate and nitrite+nitrate.

* p< 0.05 vs all group; ** p < 0.05 vs all group, *** p < 0.05 vs all group


Lactate (mmol/l)
12
10
8
6
4
2
0
*
**
***
***
CTL
SHAM
CLP
Dexa
APC
Dexa+APC

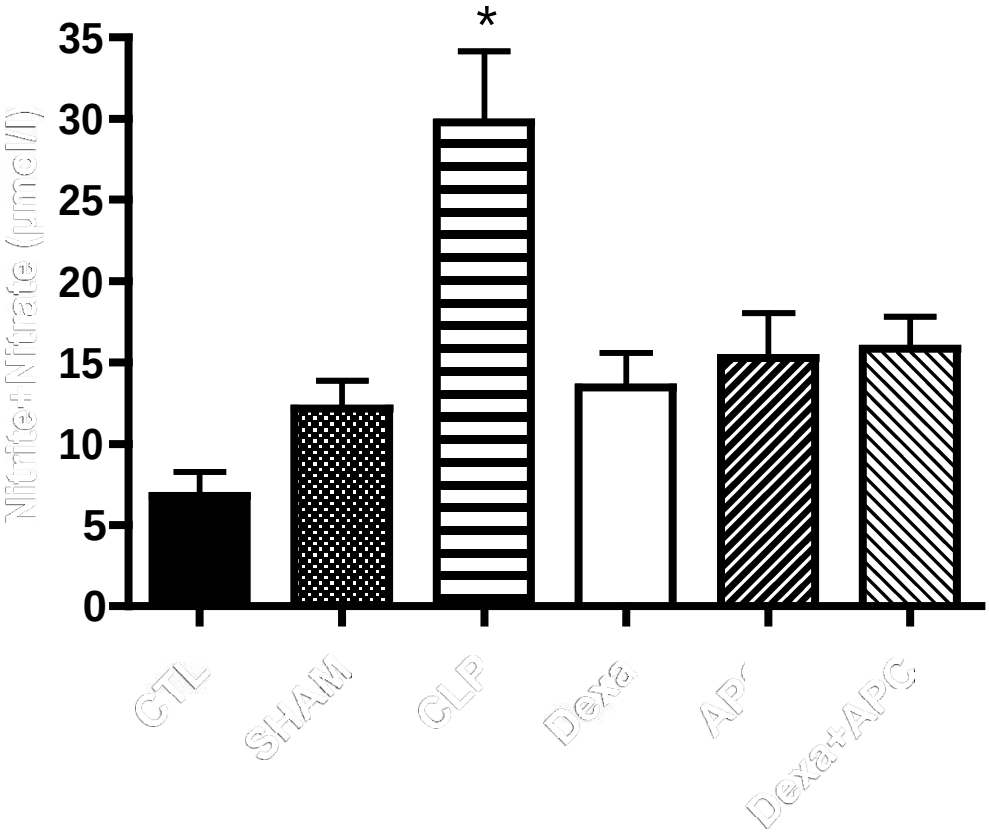
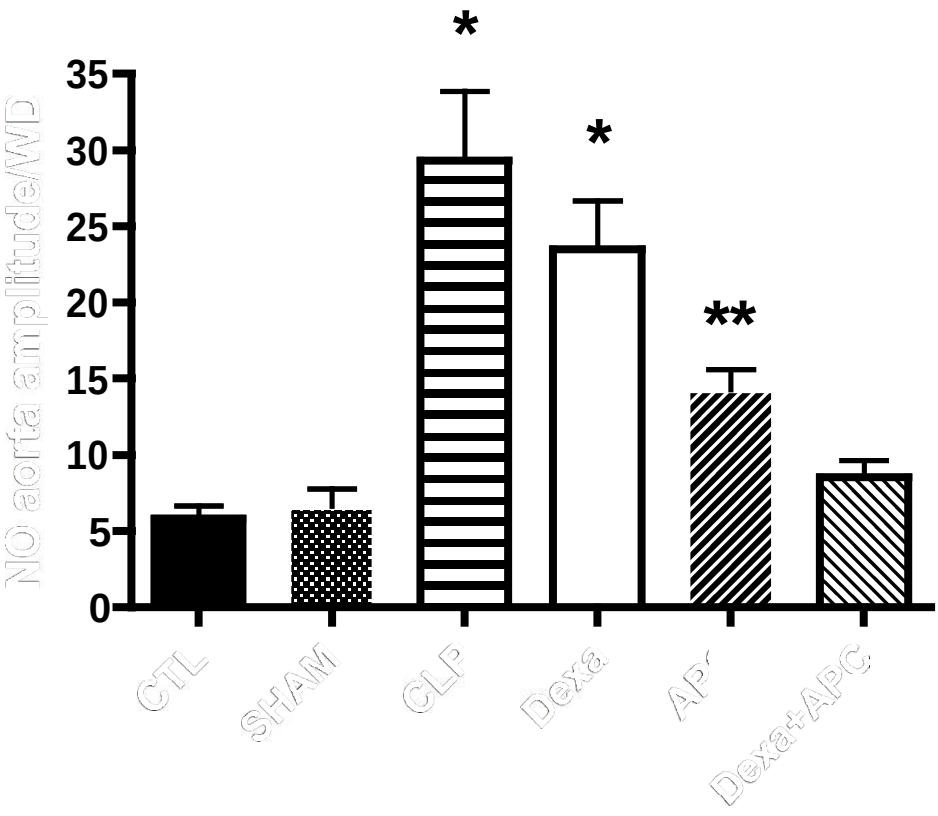
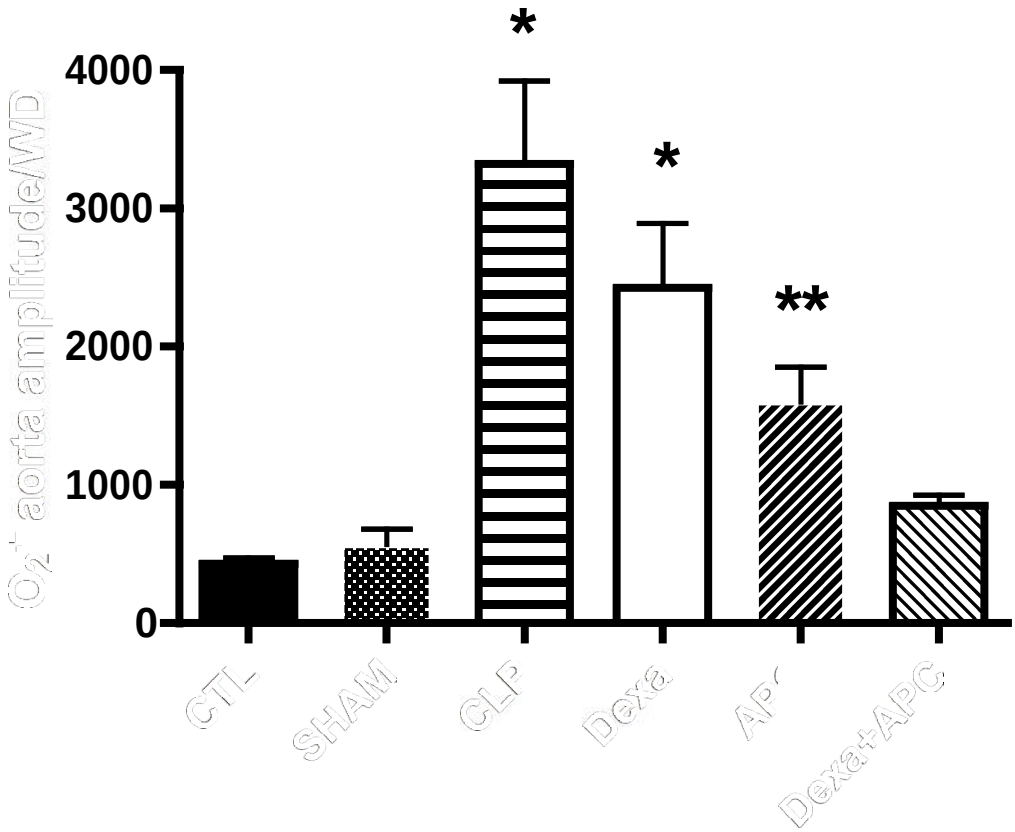

Nitrite+Nitrate (µmol/l)
35
30
25
20
15
10
5
0
*
CTL
SHAM
CLP
Dexa
APC
Dexa+APC

Figure 2

Evolution of aorta NO (top) and superoxide anion (bottom)

- $p < 0.05$ vs sham, ** $p < 0.05$ vs all group


NO aorta amplitude/WD
35
30
25
20
15
10
5
0
*
*
**
CTL
SHAM
CLP
Dexa
APC
Dexa+APC


O2- aorta amplitude/WD
4000
3000
2000
1000
0
*
*
**
CTL
SHAM
CLP
Dexa
APC
Dexa+APC

RESUME

Le choc septique est la principale cause de mortalité dans les services de réanimation. Les glucocorticoïdes (GC) et la protéine C activée (APC) sont deux traitements adjuvants recommandés au cours du choc septique. Ce travail a pour objectif d'évaluer l'impact de la combinaison d'APC et des GC sur les paramètres hémodynamiques et la survie. Le sepsis expérimental se caractérise par une hypotension artérielle avec acidose lactique et une hyporéactivité vasculaire. L'administration de Dexa et/ou d'APC permet de diminuer les taux de lactates, d'interleukines et de nitrate/nitrite. Chez les groupes traités, la contraction est améliorée ainsi que la relaxation vasculaire des aortes et des artères mésentériques. L'administration d'APC et de Dexa, seul ou en association, entraine une diminution de l'expression induite d'iNOS et la restauration de la voie Akt. La combinaison APC et Dexa améliore le temps de survie de façon synergique. Nos résultats suggèrent que l'APC et les GC devraient être réévalués en association dans le traitement du choc septique.

Mots clés : choc septique, glucocorticoïdes, protéine C activée, NO.

ABSTRACT

Sepsis remains the major cause of death in intensive care units. International guidelines for management of severe sepsis and septic shock recommend both stress-dose steroid therapy and recombinant activated protein C (APC). The aims of the present study were to compare the effects of APC and dexamethasone (Dexa) alone as well as in combination in resuscitated septic shock on survival, hemodynamics, and vascular reactivity.

Sepsis was associated with a decrease in mean arterial pressure, elevation in plasma lactate and nitrite/nitrate concentration. Administration of APC, Dexa, and their combination improve arterial pressure and decrease lactate and nitrite/nitrate concentration. Both APC and Dexa improved arterial contractility and endothelial dysfunction resulting from septic shock in rats. The expression of iNOS was significantly reduced by the administration of Dexa, APC, and combination therapy. All treatments restore the Akt pathway. Moreover, their combination increased the length of survival. These findings suggest that APC and glucocorticoids should be further re-evaluated in combination in septic shock.

Keywords: Septic shock, Glucocorticoids, Activated protein C, Nitric oxide.