



HAL
open science

Implication des canaux potassiques dans l'hyporéactivité vasculaire observée au cours des états de choc

Solène Collin

► **To cite this version:**

Solène Collin. Implication des canaux potassiques dans l'hyporéactivité vasculaire observée au cours des états de choc. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2011. Français. NNT: 2011NAN10104 . tel-01746262

HAL Id: tel-01746262

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01746262v1>

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>

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ

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

par **Solène COLLIN**

**IMPLICATION DES CANAUX POTASSIQUES DANS L'HYPOREACTIVITE
VASCULAIRE OBSERVEE AU COURS DES ETATS DE CHOC**

le 04 novembre 2011

Membres du jury :

Rapporteurs :

Monsieur le Professeur Jean-Louis TEBOUL
Monsieur le Docteur Daniel HENRION

PU-PH, EA4046, Le Kremlin-Bicêtre
DR1, UMR CNRS 6214 - INSERM U771, Angers

Examineurs :

Monsieur le Docteur Ferhat MEZIANI
Monsieur le Professeur Jean-Yves JOUZEAU
Monsieur le Professeur Bruno LEVY

HDR, PH, UMR 7213 CNRS, Strasbourg
PU-PH UMR 7561 CNRS, Nancy
PU-PH, INSERM U961, Nancy, Directeur de thèse

Travaux effectués au sein du Groupe Choc, Equipe Avenir INSERM du Pr Levy
et de l'UMR S 961 - Risque cardiovasculaire, rigidité-fibrose et hypercoagulabilité (RCV) du Pr Lacolley
Faculté de médecine de Nancy, 9 avenue de la Forêt de Haye, BP 184, 54 505 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex

Je tiens à remercier :

Monsieur le Professeur Bruno LEVY,

Qui m'a confié et suivi ce travail. Il m'a fait profiter de ses grandes et inestimables connaissances scientifiques et médicales. A travers sa confiance, ses recommandations et son dynamisme, il m'a transmis le plaisir de la recherche fondamentale. Qu'il soit assuré de mon grand respect et de ma profonde reconnaissance.

Monsieur le Professeur Jean-Louis TEBOUL,

Qui m'a fait un grand hommage et plaisir en acceptant de juger ce travail, qu'il veuille trouver ici le témoignage de mon profond respect et de toute ma considération.

Monsieur le Docteur Daniel HENRION,

Qui m'a accueillie avec gentillesse dans son laboratoire de recherche à Angers quelques jours dans le courant de l'année 2007 et m'a permis d'acquérir les bases de la technique du Western Blot.

Il me fait l'honneur de juger cette thèse, qu'il veuille trouver ici le témoignage de ma sincère gratitude et de toute ma considération.

Monsieur le Docteur Ferhat MEZIANI,

Qui m'a accueillie avec gentillesse et disponibilité au cours de mon séjour à Angers, et m'a avisée de précieux conseils scientifiques.

Il me fait l'honneur de juger cette thèse, qu'il veuille trouver ici le témoignage de mon immense gratitude et de toute ma considération.

Monsieur le Professeur Jean-Yves JOUZEAU,

Qui a toujours fait preuve à mon égard d'attention et de sympathie.

Il me fait le privilège d'accepter de juger cette thèse, je tiens à lui adresser mon profond respect et ma plus vive estime.

Qu'il me soit permis de remercier très sincèrement :

Monsieur le Docteur Patrick LACOLLEY,

Pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et m'avoir permis d'effectuer mes travaux de biologie moléculaire dans une ambiance remarquable. Qu'il soit assuré de ma grande reconnaissance.

Monsieur le Docteur Frédéric CAILOTTO,

Sans qui cette thèse ne serait pas ce qu'elle est. Je le remercie pour ses précieux conseils, aussi bien théoriques que pratiques, en biologie moléculaire. J'ai appris beaucoup de lui. Qu'il soit assuré de mon immense gratitude pour sa précieuse aide scientifique de même que son soutien moral.

Chantal,

Pour m'avoir initiée à l'expérimentation animale et aux techniques de monitoring hémodynamique, pour m'avoir aidée dans la réalisation de mes expérimentations, notamment les nombreux soirs après ma journée d'interne où nous sommes restées jusqu'à des heures très avancées de la nuit. Et surtout, je la remercie pour son amitié sincère, son soutien permanent et pour toutes les années passées ensemble et à venir.

Nacira,

Pour son concours dans l'aboutissement de cette thèse avec la réalisation des études de myographie et pour sa gentillesse permanente. Qu'elle soit assurée de toute ma sympathie et ma grande reconnaissance.

Anne-Gaëlle,

Pour avoir partagé une année de recherche à mes côtés, pour son dynamisme, sa bonne humeur, notre complicité et notre amitié.

Tous les membres du Groupe Choc avec qui j'ai eu tant de plaisir à partager ces moments de travail pendant plus de trois ans...je pense en particulier à Khodor, pour le sérieux et la gentillesse dont il fait preuve depuis son année de master à mes côtés, à Marc et Youcef, pour toutes leurs marques d'attention... et à toutes celles et ceux avec qui j'ai eu la chance de collaborer.

Qu'il me soit également permis de remercier très sincèrement les équipes pharmaceutiques et médicales m'ayant accueillie durant mon internat, et plus particulièrement :

Monsieur le Docteur Jacques MANEL,

Qui m'a accueillie au sein du centre antipoison du CHU de Nancy et m'a permis d'effectuer mes travaux de recherche en parallèle de ma fonction d'interne. Qu'il soit assuré de toute ma gratitude et ma considération.

Madame le Docteur Michèle LABRUDE,

Qui m'a offert un poste de Pharmacien Assistant Spécialiste au sein de la pharmacie centrale du CHU de Nancy depuis plus d'un an maintenant et avec qui il est agréable de travailler tous les jours depuis. Qu'elle soit assurée de ma profonde reconnaissance et de mon immense respect.

Qu'il me soit enfin permis de remercier de tout cœur,

Annick, Patrick, Frédérique, Catherine, Valérie et Jean-Paul,

Pour leur amitié, leur présence, les déjeuners, les soirées et tous les moments agréables passés et à venir ensemble.

Julien et Marie,

Pour leur amitié depuis notre rencontre au cours de mon année de master et tous les bons moments passés ensemble depuis.

Marie-Claire, Michèle et Jérôme,

Pour leur vive contribution, suite à mon accident, au cours de la rééducation de mon long fléchisseur du pouce.

Tous les amis que je n'ai pas cités, vous vous reconnaissez.

A ma Maman,

A Lionel,

A mes grands-parents,

A mon frère, Michaël, et ma jolie sœur, Séverine,

A ma petite nièce, Lou, et mon petit neveu, Tom,

A Fred,

Je dédie cette thèse.

LISTE DES PUBLICATIONS

Articles et revues :

1. **Collin S.**, Sennoun N., Dron A.G., de La Bourdonnaye M., Montemont C., Asfar P., Lacolley P., Meziani F., Levy B.
Vascular ATP-sensitive potassium channels are over-expressed and partially regulated by nitric oxide in experimental septic shock.
Intensive Care Med. 2011 May; 37(5):861-9.
2. Levy B., **Collin S.**, Sennoun N., Ducrocq N., Kimmoun A., Asfar P., Perez P., Meziani F.
Vascular hyporesponsiveness to vasopressors in septic shock: from bench to bedside.
Intensive Care Med. 2010 Dec; 36(12):2019-29.
3. Gibot S, Massin F, Alauzet C, Derive M, Montemont C, **Collin S**, Fremont S, Levy B.
Effects of the trem-1 pathway modulation during hemorrhagic shock in rats.
Shock. 2009; Dec; 32(6):633-7.
4. Sennoun N., F. Meziani, O. Desebe, V. Cattan, **S. Collin**, C. Montemont, S. Gibot, P. Asfar, A. Ramarosan, V. Regnault, M. Slama, T. Lecompte, P. Lacolley, and B. Levy.
Activated protein C improves lipopolysaccharide-induced cardiovascular dysfunction by decreasing tissular inflammation and oxidative stress.
Crit Care Med. 2009 Jan; 37(1):246-55.
5. **Collin, S.**, N. Sennoun, and B. Levy.
Cardiovascular and metabolic responses to catecholamine and sepsis prognosis: a ubiquitous phenomenon?
Crit Care. 2008; 12(2):118.
6. **Collin S**, Levy B.
Pathophysiological mechanisms of vascular dysfunction in shock state.
Reanimation. 2008; 17 (2), pp. 101-110.

Communications orales:

- ✚ **Collin S.**, Montemont C., Levy B.
Les canaux K_{ATP} vasculaires sont activés, hyperexprimés et modulés par le NO dans les états de choc expérimentaux.
Paris, Janvier 2009. Congrès de la Société de Réanimation de Langue Française (SRLF)
- ✚ **Collin S.**, Montemont C., Levy B.
Vascular K_{ATP} potassium channels are activated, overexpressed and modulated by nitric oxide in shock states. Communication orale.
Lisbonne, Septembre 2008. Congrès de la Société Européenne de Réanimation.
- ✚ **Collin S.**, Montemont C., Levy B.
Les canaux potassiques ATP-dépendants vasculaires sont activés, hyperexprimés et modulés par le NO dans les états de choc.
Nancy, Journées de la Recherche Claude Huriet. 2008.

- ✚ **Collin S.**, Montemont C., Levy B.
Hyperexpression vasculaire des canaux potassiques ATP-dépendants : un phénomène commun à différents modèles de choc expérimentaux.
Nancy, Journées de la Recherche Claude Huriet. 2007.

Communications affichées :

- ✚ **Collin S.**, Dron A.G., Montemont C., Levy B.
Sepsis, canaux potassiques vasculaires et myocardiques : inhibition des canaux K⁺ vasculaires et impact sur la dysfonction myocardique.
Paris, Janvier 2009. Congrès de la SRLF.
- ✚ **Collin S.**, Martin E., Montemont C., Poitevin G., Gibot S., Levy B.
Expression ubiquitaire des canaux potassiques vasculaires dans les états de choc expérimentaux.
Paris, Janvier 2008. Congrès de la SRLF.
- ✚ **Collin S.**, Dron A.G., Montemont C., Levy B.
Sepsis, canaux potassiques vasculaires et myocardiques : étude de l'expression myocardique et impact de l'inhibition des canaux K⁺ vasculaires sur la dysfonction myocardique.
Nancy, Journées de la Recherche Claude Huriet. 2008.
- ✚ **Collin S.**, Martin E., Montemont C., Poitevin G., Levy B.
Vascular potassium channels are overexpressed in experimental shock state.
Berlin, Novembre 2007. Congrès de la Société Européenne de Réanimation.
- ✚ **Collin S.**, Bantsimba Malanda G., Montemont C., Gibot S., Levy B.
Les canaux potassiques ATP-dépendants sont surexprimés au niveau rénal et musculaire dans les états de choc.
Paris, Janvier 2007. Congrès de la Société de Réanimation de Langue Française.

RÉSUMÉ

Titre : Implication des canaux potassiques dans l'hyporéactivité vasculaire observée au cours des états de choc

Plusieurs mécanismes ont été proposés afin d'expliquer la physiopathologie de la défaillance vasculaire observée au cours des états de choc, notamment ceux impliquant le monoxyde d'azote (NO) et les canaux potassiques (K^+). Dans la présente étude expérimentale animale, nous avons posé l'hypothèse qu'au cours de l'état de choc, outre leur activation, l'expression des canaux K^+ vasculaires est augmentée quelle que soit l'étiologie du choc, et que cette augmentation d'expression est liée au moins partiellement à la production de NO.

Nos résultats démontrent que les canaux K^+ ATP-dépendants (K_{ATP}) jouent un rôle crucial dans l'adaptation vasculaire aux états de choc septique et hémorragique, à l'inverse des canaux K^+ calcium-dépendants (BK_{Ca}). En effet, la restauration de la réactivité vasculaire suite à l'administration du PNU-37883A, inhibiteur pore-spécifique des canaux K_{ATP} vasculaires, et non de l'ibériotoxine, inhibiteur spécifique des canaux BK_{Ca} , démontre l'implication des canaux K_{ATP} dans l'hyporéactivité vasculaire à la fois de l'état de choc septique et de l'état de choc hémorragique. En outre, nous démontrons que l'expression des sous-unités Kir6.1 et SUR2B, constitutives des canaux K_{ATP} vasculaires, est augmentée de façon précoce et persistante au cours des états de choc septique et hémorragique, sans modification de l'expression de la sous-unité α des canaux BK_{Ca} . Par ailleurs, nous démontrons *in vivo* que la régulation positive des canaux K_{ATP} vasculaires est partiellement liée à l'augmentation de l'expression de la NO synthase inducible (iNOS), probablement via l'activation du facteur nucléaire NF- κ B, et est responsable de la diminution du tonus vasculaire.

Mots clés : choc septique, choc hémorragique, hyporéactivité vasculaire, canaux potassiques, monoxyde d'azote.

ABSTRACT

Subject : Involvement of potassium channels in vascular hyporeactivity observed during experimental shock states

Several mechanisms have been proposed to explain the pathophysiology of vascular failure induced by shock states, including those involving nitric oxide (NO) and potassium (K^+) channels. In this experimental study, we hypothesized that during shock state, in addition to their activation, the expression of vascular K^+ channels is increased regardless of the etiology of shock, and that this increase is at least partially linked to NO over-production.

Our results demonstrate that ATP-dependent K^+ channels (K_{ATP}), unlike the calcium-dependent K^+ channels (BK_{Ca}) play a crucial role in vascular adaptation to septic and hemorrhagic shock, due to the restoration of vascular reactivity by using PNU-37883A, a pore-specific inhibitor of vascular K_{ATP} channels, and not by using iberiotoxin, a specific inhibitor of BK_{Ca} channels. We also demonstrate that the expression of both Kir6.1 and SUR2B subunits of vascular K_{ATP} channels is increased in experimental septic and hemorrhagic shock, without modification of $BK\alpha$ subunit expression. Furthermore, we demonstrate *in vivo* that the up-regulation of vascular K_{ATP} channels is partially related to increase in expression of inducible NO synthase (iNOS), probably via nuclear factor-kappa B (NF- κ B) activation and is responsible for the reduction of vascular tone.

Key words : septic shock, hemorrhagic shock, vascular dysfunction, potassium channels, nitric oxide.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	12
LISTE DES TABLEAUX	14
LISTE DES FIGURES	15
INTRODUCTION.....	17
GENERALITES SUR LES ETATS DE CHOC	19
LE CHOC SEPTIQUE	22
1. DEFINITION.....	22
2. EPIDEMIOLOGIE ET MORTALITE	24
3. PHYSIOPATHOLOGIE DU CHOC SEPTIQUE	24
3.1. Présentation de l'antigène au système immunitaire : la cascade inflammatoire.....	25
3.1.1. La réponse inflammatoire incontrôlée (SIRS : Systemic Inflammatory Response Syndrome).....	26
3.1.2. La réponse anti-inflammatoire exagérée (CARs : Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome) ...	29
3.1.3. Le syndrome de réponse antagoniste mixte (MARS : Mixed Antagonist Response Syndrome).....	29
3.1.4. Les éléments cellulaires impliqués dans la réponse inflammatoire	29
3.2. La défaillance vasculaire	33
3.2.1. Physiologie vasculaire	33
3.2.1.1. Régulation nerveuse et humorale de la réactivité vasculaire	33
3.2.1.2. Régulation hémodynamique de la réactivité vasculaire.....	37
3.2.2. Dysfonction endothéliale.....	41
3.2.2.1. L'endothélium vasculaire.....	41
3.2.2.2. Lésions endothéliales	43
3.2.2.3. Coagulation intravasculaire disséminée (CIVD).....	43
3.2.2.4. Hyperperméabilité capillaire ou syndrome de fuite capillaire.....	44
3.2.3. Défaillance vasculaire et anomalie de la contractilité du muscle lisse vasculaire (annexe 1).....	45
3.2.3.1. Principaux mécanismes impliqués dans l'hyporéactivité vasculaire du choc septique	45
3.3. Défaillance myocardique.....	56
3.3.1. Définition.....	56
3.3.2. Mécanismes du dysfonctionnement myocardique au cours du choc septique.....	56
3.3.2.1. Implication du NO au niveau myocardique.....	56
3.3.2.2. Homéostasie calcique intracellulaire et couplage excitation-contraction	57
3.3.2.3. Anomalies de la transduction du signal bêta-adrénergique	57
3.3.2.4. Anomalies structurales et apoptotiques.....	58
3.3.2.5. Atteinte des fonctions systolique et diastolique	58
3.4. Altérations métaboliques et dysfonction d'organes.....	59
4. STRATEGIES THERAPEUTIQUES DU CHOC SEPTIQUE	60
4.1. Réanimation initiale, diagnostic et traitement de l'infection.....	61
4.1.1. Réanimation initiale au cours des 6 premières heures	61
4.1.2. Diagnostic de l'infection	63
4.1.3. Antibiothérapie	63
4.2. Traitement hémodynamique de la défaillance cardio-vasculaire	64
4.2.1. Solutés de remplissage	64
4.2.2. Agents vasopresseurs	65
4.2.2.1. Les catécholamines.....	65
4.2.2.2. La vasopressine.....	71
4.2.3. Agents inotropes	71
4.3. Autres traitements du choc septique.....	72
4.3.1. Les corticoïdes.....	72
4.3.2. La drotécogine alfa activée (Xigris®).....	73
4.4. Traitements spécifiques visant à contrôler la réponse inflammatoire	73
LE CHOC HEMORRAGIQUE.....	74
1. DEFINITION.....	74
2. EPIDEMIOLOGIE	74
3. ETIOLOGIE	74
4. PHYSIOPATHOLOGIE DU CHOC HEMORRAGIQUE.....	75
4.1. Réponse physiologique à la diminution du volume sanguin	76

4.2.	Adaptation microcirculatoire.....	79
4.3.	Adaptation du métabolisme cellulaire, conséquences de l'ischémie tissulaire.....	79
4.4.	Conséquence de l'état de choc hémorragique prolongé.....	80
5.	PRISE EN CHARGE DU CHOC HEMORRAGIQUE.....	81
5.1.	Traitement hémodynamique au cours du choc hémorragique.....	82
5.1.1.	<i>Le remplissage vasculaire.....</i>	82
5.1.2.	<i>Les catécholamines.....</i>	84
5.2.	Transfusion au cours du choc hémorragique.....	84
5.3.	Antifibrinolytiques et concentrés en facteur de la coagulation.....	85
5.4.	Traitement étiologique.....	85
LES CANAUX POTASSIQUES.....		86
1.	LES CANAUX POTASSIQUES ATP-DEPENDANTS (K_{ATP}).....	86
1.1.	Structure.....	86
1.2.	Rôles physiologiques.....	90
1.3.	Modulation de l'activité des canaux K_{ATP}	90
1.4.	Canaux K_{ATP} et implications physiopathologiques.....	92
1.4.1.	<i>Canaux K_{ap} et choc septique (tableau IV).....</i>	92
1.4.1.1.	<i>Etudes expérimentales.....</i>	92
1.4.1.2.	<i>Etudes cliniques.....</i>	96
1.4.2.	<i>Canaux K_{ATP} et choc hémorragique.....</i>	99
1.4.3.	<i>Canaux K_{ATP} et ischémie myocardique.....</i>	99
1.4.4.	<i>Canaux K_{ATP} et « syndrome des canaux potassiques ».....</i>	101
2.	LES CANAUX POTASSIQUES CALCIUM-DEPENDANTS (K_{Ca}).....	102
2.1.	Généralités.....	102
2.2.	Structure des canaux BK_{Ca}	104
2.3.	Modulation de l'activité des canaux BK_{Ca}	106
2.4.	Canaux BK_{Ca} et régulation du tonus vasculaire (figure 12).....	108
2.5.	Canaux BK_{Ca} et maladies cardiovasculaires.....	110
2.6.	Canaux BK_{Ca} et états de choc.....	111
3.	LES METHODES D'ETUDE DES CANAUX POTASSIQUES.....	113
3.1.	Electrophysiologie.....	113
3.1.1.	<i>Technique de patch-clamp.....</i>	113
3.1.2.	<i>Mesure du potentiel de membrane.....</i>	115
3.2.	Utilisation d'isotopes radioactifs.....	115
3.3.	Etude <i>in vitro</i> de la contraction du muscle lisse vasculaire.....	116
3.3.1.	<i>Myographie.....</i>	116
3.3.2.	<i>Artériographie.....</i>	116
3.4.	Biologie moléculaire.....	118
3.5.	Etude <i>in vivo</i> des conséquences fonctionnelles de l'activité des canaux potassiques vasculaires.....	118
OBJECTIFS DE LA THESE.....		119
ETUDE 1.....		120
1.	HYPOTHESE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL.....	120
2.	MATERIELS ET METHODES.....	120
2.1.	Expérimentation animale.....	120
2.2.	Etudes <i>in vivo</i>	122
2.2.1.	<i>Evaluation des effets de la noradrénaline sur la pression artérielle et le débit sanguin aortique.....</i>	122
2.2.2.	<i>Modulation pharmacologique.....</i>	122
2.3.	Etude <i>ex vivo</i>	123
2.3.1.	<i>Détermination du pH artériel et de la lactatémie.....</i>	123
2.3.2.	<i>Etude de la réactivité vasculaire par myographie.....</i>	123
2.3.3.	<i>Analyse de l'expression des ARN messagers (ARNm) des canaux potassiques vasculaires, K_{ATP} et BK_{Ca} par PCR quantitative en temps réel.....</i>	125
2.3.4.	<i>Analyse de l'expression protéique des canaux potassiques vasculaires, K_{ATP} et BK_{Ca} par Western blot.....</i>	132
2.3.5.	<i>Mesure du NO aortique et de l'anion superoxyde par résonance paramagnétique électronique (RPE).....</i>	135
2.3.6.	<i>Test de mobilité électrophorétique ou Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA).....</i>	136
2.4.	Analyses statistiques.....	137
3.	CONCEPTION DE L'ETUDE.....	137
4.	RESULTATS.....	138

4.1.	Effets de l'état de choc septique sur la mortalité, les paramètres hémodynamiques et la réactivité vasculaire <i>in vivo</i>	138
4.2.	Effets des inhibiteurs des canaux potassiques, PNU-37883A et ibériotoxine, sur les paramètres hémodynamiques	141
4.3.	Effet de l'inhibiteur 1400W sur la réactivité vasculaire	141
4.4.	Etudes <i>ex vivo</i> par myographie du modèle CLP18h.....	146
4.5.	Influence de l'état de choc septique sur l'expression des canaux K_{ATP} et BK_{Ca} au niveau de l'aorte et des SMA	146
4.6.	Effets de l'inhibition sélective de la iNOS sur la teneur de l'aorte en NO et en anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$, sur l'expression des canaux K_{ATP} et sur l'activation du facteur NF- κ B dans le modèle CLP6h	150
5.	DISCUSSION.....	154
ETUDE 2.....		158
1.	HYPOTHESE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL	158
2.	MATERIELS ET METHODES	158
2.1.	Expérimentation animale.....	158
2.2.	Etudes <i>in vivo</i>	161
2.2.1.	Evaluation des effets de la noradrénaline sur la pression artérielle et le débit sanguin aortique	161
2.2.2.	Modulation pharmacologique.....	162
2.3.	Etude <i>ex vivo</i>	162
3.	RESULTATS.....	162
3.1.	Effets de l'état de choc hémorragique sur la mortalité, les paramètres hémodynamiques et la réactivité vasculaire <i>in vivo</i>	162
3.2.	Effets des inhibiteurs des canaux potassiques, PNU-37883A et ibériotoxine, sur les paramètres hémodynamiques du modèle CH.....	164
3.3.	Influence de l'état de choc hémorragique sur l'expression des canaux K_{ATP} et BK_{Ca} au niveau de l'aorte et des SMA.....	167
4.	DISCUSSION.....	170
CONCLUSION.....		171
PERSPECTIVES		172
ANNEXES		173
BIBLIOGRAPHIE.....		177

LISTE DES ABREVIATIONS

ACTH :	<i>adrenocorticotropic hormone</i>
ADP :	adénosine diphosphate
ADN :	acide désoxyribonucléique
AMPc :	adénosine monophosphate cyclique
APACHE :	<i>Acute Physiology and Chronic Health Evaluation</i>
ARNm :	acide ribonucléique messenger
ATP :	adénosine triphosphate
BK _{Ca} :	canaux potassiques calcium-dépendants de haute conductance
CARS :	<i>Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome</i>
CIVD :	coagulation intravasculaire disséminée
CLP :	<i>cecal ligation and puncture</i>
CMLV :	cellule musculaire lisse vasculaire
DAG :	diacylglycérol
EMSA :	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
GMPc :	guanidine monophosphate cyclique
Ibtx :	ibériotoxine
IFN γ :	interféron gamma
IL :	interleukine
IP3 :	inositol trisphosphate
K _{ATP} :	canaux potassiques ATP-dépendants
Kir :	<i>potassium inwardly rectifying channel</i>
L-NNMA :	L-N ^G -monométhylarginine
LPS :	lipopolysaccharide
MLCK :	<i>Myosin Light Chain Kinase</i>
NF- κ B :	<i>Nuclear Factor kappa B</i>
NK :	<i>Natural Killer</i>
NO :	<i>nitric oxide</i> ou monoxyde d'azote
NOS :	monoxyde d'azote synthase
NOS II/ iNOS :	monoxyde d'azote synthase de type II dite inductible
O ₂ ⁻ :	anion superoxyde
PAM :	pression artérielle moyenne
PAS :	pression artérielle systolique
PCa :	protéine C activée

PKA :	protéine kinase AMP cyclique-dépendante
PKG :	protéine kinase GMP cyclique-dépendante
rhPCa :	protéine C activée recombinante humaine
PCR :	<i>polymerase chain reaction</i>
PIP2 :	phosphatidylinositol bisphosphate
PNU :	guanidine; chlorhydrate de 4-morpholinecarboximidine-N-1-adamantyl-N'-cyclohexyl
PVC :	pression veineuse centrale
RCPG :	récepteurs couplés aux protéines G
RPE/RSE :	résonance paramagnétique électronique ou résonance de spin électronique
RT :	<i>reverse transcription</i>
Ry-R :	canaux récepteurs à la ryanodine
SIRS :	<i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i>
SMA :	<i>small mesenteric arteries</i>
SUR :	<i>sulfonylureas receptor</i>
TLR :	<i>Toll-Like Receptors</i>
TNF :	<i>tumor necrosis factor</i>

LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau I : Critères diagnostiques de SIRS, sepsis et choc septique d'après Bone et coll. [15]</i>	23
<i>Tableau II : Cellules immunocompétentes et médiateurs pro- et anti-inflammatoires [27]</i>	30
<i>Tableau III : Organisation et fonctions tissu-spécifiques des canaux K_{ATP} : quelques exemples</i>	89
<i>Tableau IV : Etudes in vivo d'inhibition pharmacologique des canaux K_{ATP} dans le choc endotoxinique</i>	93
<i>Tableau V : Etudes expérimentales in vivo d'inhibition pharmacologique des canaux K_{ATP} dans le choc hémorragique</i>	100
<i>Tableau VI : Structure et rôle(s) des canaux K_{Ca} en fonction du tissu d'expression [206]</i>	103
<i>Tableau VII : Critères de design des amorces utilisées au cours de la PCR quantitative</i>	129
<i>Tableau VIII : Gènes d'intérêt, amorces spécifiques et taille de l'amplicon</i>	129
<i>Tableau IX : Composition des tampons utilisés dans le western blot</i>	134
<i>Tableau X : Anticorps utilisés au cours du Western blot</i>	134
<i>Tableau XI : Paramètres hémodynamiques et métaboliques des différents groupes d'animaux (PAM, débit aortique abdominal, pH et lactate)</i>	139
<i>Tableau XII : Paramètres hémodynamiques et métaboliques des différents groupes d'animaux en choc hémorragique (PAM, débit aortique abdominal, pH et lactate)</i>	163

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Déterminants cliniques de l'activation du système immunitaire [23].....	27
Figure 2 : Représentation schématique des événements cellulaires à l'échelon d'un vaisseau en cas d'activation de la cascade de l'inflammation lors du choc septique [23]	32
Figure 3 : Mécanismes de la contraction-relaxation de la cellule musculaire lisse vasculaire (CMLV)	34
Figure 4 : Contrôle du tonus vasculaire par la pression et le débit	40
Figure 5 : Mécanisme d'activation des canaux potassiques ATP-dépendants	51
Figure 6 : Démarche diagnostique et thérapeutique initiale devant un syndrome septique [16].....	62
Figure 7 : Biosynthèse des catécholamines endogènes.....	66
Figure 8 : Représentation schématique des processus physiopathologiques impliqués dans le choc hémorragique (d'après J. Duranteau, MAPAR 2005).....	77
Figure 9 : Structure des canaux potassiques ATP-dépendants.....	87
Figure 10 : Régulation hormonale des canaux K_{ATP} vasculaires [5].....	91
Figure 11 : Structure des canaux BK_{Ca} [206].....	105
Figure 12 : Canaux KCa et régulation du tonus vasculaire	109
Figure 13 : Représentation schématique d'un artériographe.....	117
Figure 14 : Représentation schématique d'un myographe	124
Figure 15 : Evolution de la température et des différents types de brin d'ADN au cours des 4 premiers cycles de la PCR.....	127
Figure 16 (a et b) : Exemples de courbes de fusion.....	131
Figure 17 : Réponse en terme de PAM à l'administration de noradrénaline in vivo au cours des chocs LPS, CLP6h et CLP18h après injection de 1 µg/kg de noradrénaline.	140
Figure 18 : Réponse en terme de débit aortique abdominal à l'administration de noradrénaline in vivo au cours des chocs LPS, CLP6h et CLP18h après injection de 1 µg/kg de noradrénaline.....	140
Figure 19 : Effet du PNU sur la réponse vasculaire à la noradrénaline in vivo dans les groupes CLP6h, CLP18h et LPS après injection d'un bolus de 1 µg/kg de noradrénaline.	142
Figure 20 : Effet du PNU sur le débit aortique abdominal dans les groupes CLP6h, CLP18h et LPS après injection d'un bolus de 1 µg/kg de noradrénaline.	143
Figure 21 : Evolution de la PAM (A) et du débit aortique abdominal (B) dans les groupes CLP6h, CLP18h et LPS après l'administration du PNU-37883A pendant 1h.....	144
Figure 22 : Effet de l'inhibiteur 1400W sur la PAM dans les groupes CLP6h et CLP18h.....	145
Figure 23 : Contraction des anneaux aortiques (A, B et C) et des anneaux mésentériques (SMA) (D, E et F) en réponse à la phényléphrine (phe) dans les groupes sham, CLP18h, CLP18h+ PNU, CLP18h + 1400W et CLP18h + PNU + 1400W.....	147
Figure 24 : Expression des ARNm des sous-unités Kir6.1/SUR2B (A) et $BK\alpha$ (B) au niveau de l'aorte dans les modèles CLP6h, CLP18h et LPS.....	148
Figure 25 : Expression des ARNm des sous-unités Kir6.1/SUR2B (A) et $BK\alpha$ (B) au niveau des artères mésentériques (SMA) dans les modèles CLP6h, CLP18h et LPS.	148
Figure 26 : Expression protéique des sous-unités Kir6.1/SUR2B (A) et $BK\alpha$ (B) au niveau de l'aorte dans les modèles CLP6h, CLP18h, CLP30h et LPS.	149
Figure 27 : Expression de l'ARNm de la iNOS au niveau de l'aorte et des SMA dans les modèles CLP6h, CLP18h et LPS (A) et en présence d'inhibiteurs de la voie du NO dans le modèle CLP6h (B).....	151
Figure 28 : Quantification du NO et de l'anion superoxyde au niveau de l'aorte dans les modèles CLP6h et CLP18h.	151
Figure 29 : Expression aortique des ARNm des sous-unités Kir6.1/SUR2B (A) et $BK\alpha$ (B) en présence d'inhibiteurs de la voie du NO dans le modèle CLP6h.....	152
Figure 30 : Expression protéique des sous-unités Kir6.1/SUR2B (A) et $BK\alpha$ (B) au niveau de l'aorte en présence d'inhibiteurs de la voie du NO dans le modèle CLP6h.	152
Figure 31 : Effet de l'inhibiteur 1400W de la iNOS sur l'activité du facteur NF- κ B dans le modèle CLP6h.	153
Figure 32 : Protocole du choc hémorragique réanimé avec traumatisme chirurgical [317].....	160
Figure 33 : Réponse en terme de PAM à l'administration de 1 µg/kg de noradrénaline in vivo dans les modèles CH et IR comparativement au groupe sham.....	165
Figure 34 : Réponse en terme de débit aortique abdominal à l'administration de 1µg/kg de noradrénaline in vivo dans les modèles CH et IR comparativement au groupe sham.	165
Figure 35 : Effet du PNU sur la réponse vasculaire à la noradrénaline in vivo dans le groupe CH après injection d'un bolus de 1 µg/kg de noradrénaline.	166

<i>Figure 36 : Effet du PNU in vivo sur le débit aortique abdominal dans le groupe CH après injection d'un bolus de 1 µg/kg de noradrénaline.</i>	166
<i>Figure 37 : Expression des ARNm des sous-unités Kir6.1/SUR2B (A) et BKα (B) au niveau de l'aorte dans les modèles CH et IR.</i>	168
<i>Figure 38 : Expression des ARNm des sous-unités Kir6.1/SUR2B (A) et BKα (B) au niveau des SMA dans les modèles CH et IR.</i>	168
<i>Figure 39 : Expression de l'ARNm de la iNOS au niveau de l'aorte et des SMA dans les modèles CH et IR.</i>	169
<i>Figure 40 : Expression protéique des sous-unités Kir6.1/SUR2B (A) et BKα (B) au niveau de l'aorte dans les modèles CH et IR.</i>	169

INTRODUCTION

Les états de choc sont principalement caractérisés par une insuffisance circulatoire aiguë conduisant à une hypoperfusion tissulaire et pouvant aboutir à une défaillance multiviscérale. L'hypotension constatée peut être la conséquence de trois désordres hémodynamiques principaux : l'hypovolémie, la défaillance vasculaire et la défaillance cardiaque.

La dysfonction vasculaire est caractérisée par une diminution du tonus vasoconstricteur et une hyporéactivité vasculaire avec une moindre sensibilité aux catécholamines. Il en résulte une vasodilatation inappropriée et une hypotension artérielle réfractaire pouvant conduire au décès du patient. Plusieurs mécanismes ont été proposés afin d'expliquer la physiopathologie de la défaillance vasculaire observée au cours des états de choc, notamment ceux impliquant le monoxyde d'azote (NO) et les canaux potassiques [1-3].

Le NO, produit en excès par la NO synthase inductible (iNOS), constitue l'un des principaux acteurs impliqués dans la vasoplégie et l'hyporéactivité vasculaire aux vasopresseurs. Les actions du NO sont multiples, notamment i) par le biais de seconds messagers aboutissant à la déphosphorylation des chaînes légères de myosine et ainsi à une relaxation de la cellule musculaire lisse vasculaire, ii) par combinaison avec l'anion superoxyde pour former l'ion peroxyde responsable de lésions d'oxydation tissulaires et cellulaires, iii) par activation des canaux potassiques ATP et calcium-dépendants (K_{ATP} et K_{Ca}).

Les canaux potassiques sont des protéines transmembranaires permettant le passage sélectif d'ions potassium K^+ via le pore du canal. Ils assurent le couplage entre l'excitabilité membranaire et le métabolisme énergétique de la cellule, et jouent ainsi un rôle important tant en situation normale qu'en situation pathologique [4]. De nombreux stimuli peuvent induire l'activation des canaux potassiques tels que la production excessive de NO, de peroxyde, d'anion superoxyde, la déplétion en ATP, l'hypoxie, l'acidose, et l'hyperlactatémie, stimuli présents au cours des états de choc [5-7]. L'activation des canaux potassiques induit une hyperpolarisation membranaire, une inhibition des canaux calciques voltage-dépendants s'opposant à l'entrée du calcium dans la cellule musculaire lisse vasculaire, conduisant à la relaxation cellulaire et la vasorelaxation, et finalement à l'hypotension et l'hyporéactivité vasculaire [8].

Les inhibiteurs sélectifs et non sélectifs des canaux potassiques vasculaires utilisés *in vivo* ou *ex vivo* dans les études expérimentales ont montré leur capacité à augmenter la pression artérielle ou à s'opposer à l'hyporéactivité vasculaire induite par un état de choc [5]. Ces effets pharmacologiques plaident en faveur d'une augmentation de l'activation des canaux potassiques au cours des états de choc. Toutefois, alors que l'utilisation d'inhibiteurs des canaux potassiques vasculaires demeure une option intéressante pour contrer la vasodilatation systémique, cette inhibition peut également nuire à l'adaptation microcirculatoire mise en jeu au cours des états de choc [9].

Dans la présente étude, nous avons posé l'hypothèse qu'au cours de l'état de choc septique, outre leur activation, l'expression des canaux potassiques vasculaires était augmentée, et que cette augmentation d'expression était au moins partiellement liée à la production de NO via l'activation du facteur nucléaire kappa B (NF- κ B) comme suggéré récemment dans un modèle cellulaire [10]. Par ailleurs, étant donné les nombreux mécanismes physiopathologiques communs aux états de choc, quelle qu'en soit leur étiologie, nous avons également étudié l'expression des canaux potassiques vasculaires et leur implication dans la physiopathologie de la défaillance vasculaire au cours de l'état de choc hémorragique. Nous avons ainsi choisi de travailler sur des modèles expérimentaux de choc septique et de choc hémorragique.

Ainsi, après une présentation générale consacrée aux états de choc, nous aborderons plus en détails la physiopathologie de l'état de choc septique et de l'état de choc hémorragique, puis nous exposerons l'état actuel des connaissances sur les canaux potassiques et leur rôle dans la physiopathologie de l'état de choc, enfin, nous présenterons les travaux de recherche expérimentale réalisés au cours de cette thèse et leurs résultats.

GENERALITES SUR LES ETATS DE CHOC

L'état de choc, quelle qu'en soit l'étiologie, est la conséquence d'une insuffisance circulatoire aiguë, qui altère de façon durable l'oxygénation et le métabolisme des différents tissus et organes. Il se traduit cliniquement par une tachycardie, une tachypnée, une hypotension, une oligurie, une altération de la conscience, et, parmi les anomalies biologiques, l'acidose lactique est souvent le témoin de l'hypoxie tissulaire qui en résulte [11].

Les états de choc sont habituellement classés en fonction du mécanisme hémodynamique initial. Ainsi, on reconnaît classiquement quatre grandes causes à l'origine de la constitution de l'état de choc, différenciant le choc hypovolémique, le choc cardiogénique, le choc distributif et le choc obstructif. Nous nous intéresserons aux trois premiers types de choc.

Le choc hypovolémique est la forme la plus fréquente de choc, correspondant à une insuffisance circulatoire aiguë conduisant à l'hypoxie tissulaire par stagnation. La présentation hémodynamique habituelle est celle d'un débit cardiaque abaissé malgré la tachycardie, associé à des pressions de remplissage effondrées (réduction du volume sanguin circulant) et des résistances vasculaires systémiques élevées (traduites cliniquement par une vasoconstriction cutanée). Les étiologies les plus fréquentes sont représentées par des pertes sanguines notamment dans le cadre d'un traumatisme, d'hémorragie digestive, d'hémorragies postopératoires ou d'anévrisme rompu de l'aorte. Le choc hypovolémique peut également être le résultat de pertes non hémorragiques en cas de déshydratation sévère comme lors de brûlures étendues, de diarrhées profuses, de vomissements incoercibles ou de coma prolongé.

Le choc cardiogénique, du fait d'une altération de la contraction myocardique, conduit aussi à une hypoxie tissulaire par stagnation. Sa présentation hémodynamique classique correspond à un débit cardiaque effondré avec une élévation des pressions de remplissage (œdème pulmonaire) et des résistances vasculaires systémiques (vasoconstriction cutanée). Il est le plus souvent secondaire à un infarctus myocardique étendu, mais peut aussi être dû soit à une cardiomyopathie d'autre origine, soit à une sidération myocardique transitoire (période postopératoire d'une chirurgie cardiaque, myocardite, hémorragie méningée, arrêt cardiaque récupéré...), ou à une arythmie sévère empêchant une contraction myocardique organisée.

Le choc distributif est bien différent des autres types de choc sus-décrits, du fait de la libération précoce de médiateurs de l'inflammation. Le choc septique en représente l'exemple type. Le tableau hémodynamique le plus fréquemment rencontré est celui d'un débit cardiaque normal ou élevé après correction de l'hypovolémie, avec des pressions de remplissage ventriculaire et des résistances vasculaires systémiques fortement diminuées. Cette diminution des résistances à l'éjection ventriculaire gauche permet de maintenir un volume d'éjection systolique voisin de la normale en dépit d'une atteinte fréquente de la contraction cardiaque. De plus, et à la différence des autres types de choc, la consommation d'oxygène est augmentée et l'extraction en oxygène limitée du fait de troubles de la microcirculation, expliquant qu'un débit cardiaque même augmenté dans ce type de choc n'est pas forcément adapté à la situation métabolique.

A cette classification hémodynamique s'associe cependant une réalité bien plus complexe, les états de choc associant au cours de leur évolution plusieurs mécanismes physiopathologiques. Ainsi, l'état de choc hémorragique associe les aspects de chocs distributif et hypovolémique et l'état de choc septique combine des aspects de chocs distributif, hypovolémique et cardiogénique [12].

En outre, quelle qu'en soit l'étiologie, il existe des conséquences communes à tous les états de choc. En effet, la phase initiale se caractérise par une hypoperfusion tissulaire, induisant une série de mécanismes cellulaires compensatoires visant à maintenir un équilibre entre la production d'ATP et les besoins métaboliques. Dans un premier temps, l'augmentation de l'extraction en oxygène jusqu'à un certain seuil permet de maintenir une consommation tissulaire en oxygène constante [13]. Au-delà de ce seuil critique, la cellule utilise le métabolisme anaérobie pour assurer une production minimale d'ATP, se traduisant par la formation de lactate et de protons. En dépit de ces phénomènes adaptatifs, l'association d'une diminution brutale des apports en oxygène, en glucose et d'une acidose locale expose à des lésions cellulaires. Ultérieurement, la réanimation du choc, en permettant la revascularisation des tissus hypoperfusés, s'accompagne de phénomènes d'ischémie-reperfusion qui peuvent accélérer et exacerber les lésions initiales.

Une seconde approche de la physiopathologie des états de choc est la réponse inflammatoire qui l'accompagne, voire l'initie [14]. En effet, l'hypoperfusion et le syndrome d'ischémie-reperfusion lors de la réanimation sont à l'origine d'une réponse inflammatoire systémique.

En fonction de la cause initiale et de la gravité de l'état de choc, de la réponse génétiquement programmée de l'hôte et de la rapidité de la mise en route de la réanimation, la réponse inflammatoire varie aussi bien en intensité qu'en composants intervenant dans cette cascade. Par exemple, la correction hémodynamique rapide d'un choc hypovolémique ou cardiogénique est suivie d'une réponse inflammatoire habituellement limitée ; en revanche, un traumatisme majeur ou une hypoperfusion prolongée, quelle qu'en soit la cause, provoque une réponse systémique inflammatoire importante. Enfin, une réponse inflammatoire systémique majeure peut à elle seule être à l'origine d'un état de choc. Ainsi, la réponse inflammatoire qui accompagne les états de choc peut être partiellement tenue pour responsable des anomalies du métabolisme et du fonctionnement des organes, au même titre que les anomalies hémodynamiques qui conduisent à l'hypoperfusion.

Ainsi, tout type de choc, surtout s'il est sévère et prolongé, va induire une réaction inflammatoire systémique qui ajoutera ses propres conséquences au tableau hémodynamique initial : troubles de perméabilité capillaire à l'origine de l'œdème interstitiel, aggravant l'hypovolémie et altérant la diffusion de l'oxygène, activation de la coagulation à l'origine de microthromboses vasculaires, modifications médiateurs-dépendantes des propriétés systoliques et diastoliques ventriculaires entravant l'adaptation cardiaque à la situation hémodynamique, et altérations de la microcirculation changeant la répartition du débit cardiaque non seulement entre les différentes circulations, mais aussi à l'intérieur même des tissus et organes. Lors de l'évolution, les lésions de reperfusion sont elles-mêmes sources d'une nouvelle exacerbation de la réaction inflammatoire, réalisant ainsi un véritable cercle vicieux.

LE CHOC SEPTIQUE

1. DEFINITION

En 1992, l'*American College of Chest Physicians (ACCP)* et la *Society of Critical Care Medicine (SCCM)* publient conjointement une conférence de consensus centrée sur la définition et la classification des états septiques [15]. Ces définitions ont été récemment reprises par les sociétés savantes françaises dans un texte de conférence d'experts intitulé « Prise en charge initiale des états septiques graves de l'adulte et de l'enfant » [16]. Les recommandations internationales, récemment actualisées et publiées en janvier 2008 sous le nom de « *Surviving Sepsis Campaign* », utilisent elles aussi ces définitions [17].

La classification des états septiques est basée sur l'intensité de la réponse de l'organisme à l'infection. Elle distingue le sepsis « non compliqué » du syndrome septique grave et du choc septique, correspondant chacun à une entité clinico-biologique précise.

Ainsi, le sepsis est défini comme une réponse systémique inflammatoire (ou SIRS, pour *Systemic Inflammatory Response Syndrome*) secondaire à une infection cliniquement ou biologiquement documentée. Le sepsis sévère correspond à un sepsis compliqué de la défaillance d'au moins un organe et/ou d'une hypotension artérielle et/ou de signes d'hypoperfusion. Et enfin, la persistance de l'hypotension artérielle ou de signes francs d'hypoperfusion malgré les manœuvres initiales de remplissage vasculaire au cours d'un sepsis sévère définit le choc septique (tableau I).

A chaque stade de l'infection correspond un pronostic, des données épidémiologiques propres et des mesures thérapeutiques bien définies visant à limiter la progression et la pérennisation de l'état septique.

Tableau I : Critères diagnostiques de SIRS, sepsis et choc septique d'après Bone *et coll.* [15]

SIRS	<p><u>Deux ou plus des signes suivants :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Température > 38,3°C ou < 36,0°C ; - Fréquence cardiaque > 90/min ; - Fréquence respiratoire > 20/min ou PaCO₂ < 32 mmHg ou ventilation mécanique ; - Compte leucocytaire > 12000/mm³ ou < 4000/mm³ ou > 10 % de cellules immatures.
Sepsis	<u>SIRS</u> + <u>infection</u> « cliniquement ou microbiologiquement documentée »
Sepsis sévère	<p><u>Sepsis</u> + <u>au moins un signe d'hypoperfusion ou d'une dysfonction d'organe :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Fonction circulatoire : <ul style="list-style-type: none"> • hypotension artérielle (PAS < 90 mmHg ou PAM < 60 mmHg) ; • hyperlactatémie artérielle (lactate > 2 mmol/l) ; - Fonction respiratoire : <ul style="list-style-type: none"> • hypoxémie (PaO₂/FIO₂ < 300) ; - Fonctions supérieures : <ul style="list-style-type: none"> • présence d'une encéphalopathie ou syndrome confusionnel (score Glasgow < 14) ; - Fonction rénale : <ul style="list-style-type: none"> • oligurie (débit urinaire < 0,5 ml/kg/h persistant malgré le remplissage) ; • créatinine > 177 µmol/l (20 mg/l) ; - Coagulation : <ul style="list-style-type: none"> • thrombopénie < 100 000/mm³ ; - Fonction hépatique : <ul style="list-style-type: none"> • hyperbilirubinémie > 34 µmol/l ;
Choc septique	<p><u>Sepsis sévère</u> + <u>persistance, malgré un remplissage vasculaire adapté, de :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - hypotension artérielle (PAS < 90 mmHg, PAM < 60 mmHg), - signes d'hypoperfusion (lactatémie > 4 mmol/l, oligurie, troubles de la conscience,...).

2. EPIDEMIOLOGIE ET MORTALITE

Le choc septique constitue un véritable problème de santé publique puisqu'il est la principale cause de décès dans les services de réanimation. Le choc septique représente environ 3 à 4 % des admissions en réanimation chez l'adulte et l'on estime à 30 000 le nombre de cas par an en France. La mortalité due au choc septique reste élevée et avoisine encore 50 % malgré une meilleure connaissance de sa physiopathologie et les progrès thérapeutiques effectués au cours des dernières années. La moitié de ces patients décède par défaillance multiviscérale même si une prise en charge précoce semble nettement diminuer ce pourcentage. L'autre moitié succombe de défaillance cardiovasculaire qui devient ainsi l'une des principales cibles de recherche et de développement de nouvelles thérapeutiques.

3. PHYSIOPATHOLOGIE DU CHOC SEPTIQUE

Le choc septique est la conséquence d'une insuffisance circulatoire aiguë, qui altère de façon durable l'oxygénation et le métabolisme des différents tissus et organes, en réponse à l'invasion massive de l'organisme par un agent infectieux. L'hypoxie cellulaire se traduit notamment par le développement du métabolisme anaérobie avec production et libération d'acide lactique, la production d'espèces radicalaires et l'altération de l'homéostasie cellulaire. La défaillance cardiocirculatoire que l'on observe associe une hypovolémie absolue, altérant les conditions de charge ventriculaire, une atteinte myocardique précoce et une vasodilatation périphérique avec une distribution anormale voire inadaptée des débits sanguins régionaux, entraînant une diminution de la perfusion tissulaire, une altération de la microcirculation et pouvant aboutir à une défaillance multiviscérale.

Le choc septique doit être considéré comme une succession biologique d'événements survenant extrêmement rapidement après l'introduction anormale dans l'organisme d'un composant étranger d'origine infectieuse (endotoxine, exotoxine, protéine virale, élément constitutif d'un champignon ou d'un parasite). Cette succession d'événements met en cause le système immunitaire de défense de l'organisme, les médiateurs cellulaires de ce système et les conséquences de l'action de ces médiateurs sur les différents organes, en particulier, le coeur et le système vasculaire, les poumons, le foie, les reins, le cerveau et le système digestif.

Ainsi, le « choc » du sepsis sévère correspond à une défaillance du système cardiocirculatoire secondaire à une diminution du tonus vasoconstricteur et de la contractilité myocardique avec hypovolémie.

Pour des raisons de clarté, seront successivement envisagées :

- ✓ la présentation de l'antigène au système immunitaire et la cascade inflammatoire ;
- ✓ la défaillance vasculaire ;
- ✓ et la défaillance myocardique.

3.1. PRESENTATION DE L'ANTIGENE AU SYSTEME IMMUNITAIRE : LA CASCADE INFLAMMATOIRE

L'inflammation est une réponse physiologique normale, immédiate et transitoire à toute agression compromettant l'intégrité de l'organisme. La réponse inflammatoire à l'infection est biphasique, d'abord de type pro-inflammatoire qui contribue à l'éradication du micro-organisme, puis de type anti-inflammatoire destinée à contrôler cette première réponse.

Selon la sévérité de l'infection, ces phénomènes initialement locaux peuvent dépasser les limites du site infecté pour devenir systémiques. L'apparition de cytokines dans la circulation générale assure le recrutement des cellules immunocompétentes vers le site infecté et contribue localement au contrôle de l'infection. Au cours du choc septique, la survenue d'un déséquilibre dans la balance pro et anti-inflammatoire entraîne en revanche une réaction systémique massive avec un emballement asynchrone des deux cascades, conduisant à un état dynamique de suractivation de la réponse inflammatoire (SIRS : *Systemic Inflammatory Response Syndrome*), suivi d'une réponse anti-inflammatoire exagérée (CARS : *Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome*) [1, 18-20], dont les effets peuvent devenir davantage délétères pour l'hôte que pour l'agent pathogène lui-même.

Le système immunitaire inné est la première ligne de défense contre l'infection. Ce système fait intervenir des éléments solubles (système du complément, protéine de la phase aiguë, cytokines) et des éléments cellulaires (monocytes, macrophages, polynucléaires neutrophiles, cellules folliculaires dendritiques, lymphocytes notamment *natural killers* et cellules endothéliales) qui sont directement impliqués dans la reconnaissance et la destruction de l'agent infectieux.

3.1.1. LA REPOSE INFLAMMATOIRE INCONTROLEE (SIRS : *SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE SYNDROME*)

Parmi les antigènes microbiens, regroupés sous l'acronyme anglais de PAMP (*Pathogen Associated Molecular Patterns*), susceptibles d'activer le système immunitaire, citons l'endotoxine, constituant lipopolysaccharidique de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, l'acide lipoteichoïque pour les bactéries à Gram positif, les glycolipides et les acides mycosiques pour les mycobactéries ou encore certaines lipoprotéines ou enveloppes externes pour les spirochètes [21]. Les protéines des champignons et certains constituants protéiques viraux sont également susceptibles d'activer le système immunitaire [22].

Cette activation touche, soit des lymphocytes, notamment *natural killers* (NK) susceptibles alors de sécréter de l'interféron gamma (IFN γ) et d'activer les polynucléaires neutrophiles, soit le système macrophagique responsable de la sécrétion de cytokines (figure 1). Certains antigènes sont également susceptibles d'activer directement les neutrophiles.

L'activation des macrophages a une double conséquence :

- ✓ par le biais du TNF et de l'IL-12, d'activer les lymphocytes NK;
- ✓ par le biais d'autres cytokines, de permettre l'adhésion des phagocytes aux cellules endothéliales et d'activer l'endothélium lui-même, qui exprime alors à sa surface des protéines d'adhésion susceptibles de capter les phagocytes (rôle majeur des adhésines, des intégrines, et des sélectines).

La reconnaissance de l'agent infectieux fait intervenir un ensemble de récepteurs exprimés à la surface des cellules de l'immunité innée, appelés PRR (*Pattern Recognition Receptors*), dont les *Toll-Like Receptors* (TLR) constituent le prototype [1, 21]. Les TLR sont exprimés à la surface de nombreuses cellules : celles directement impliquées dans la réponse immunitaire (polynucléaires neutrophiles, macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes B et T, cellules épithéliales), mais également celles impliquées dans la réponse systémique (cellules endothéliales, cellules musculaires lisses et cardiomyocytes).

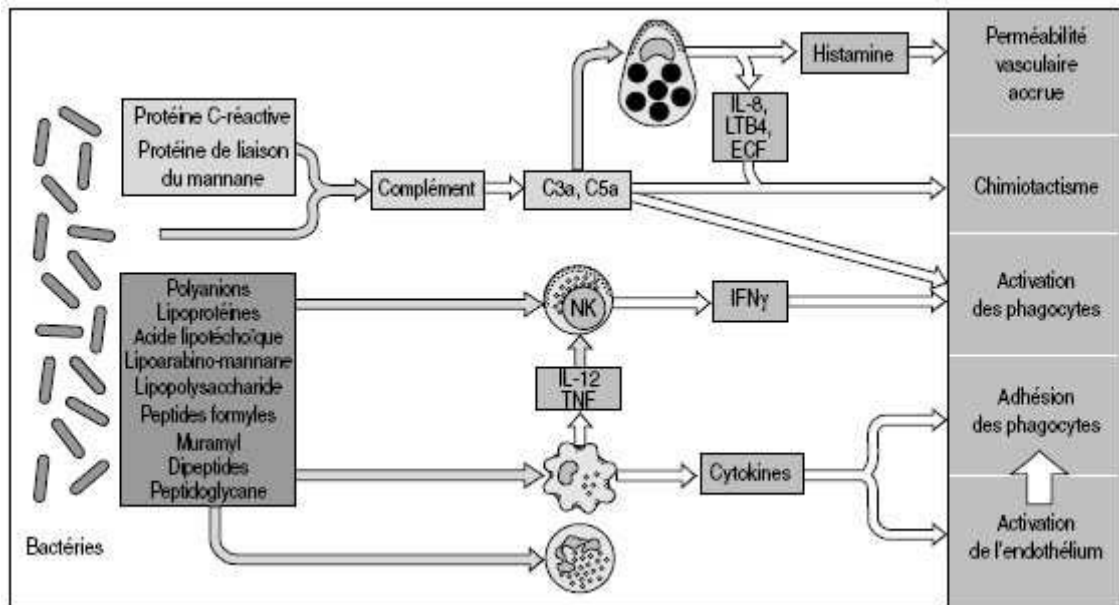


Figure 1 : Déterminants cliniques de l'activation du système immunitaire [23]

Dix TLR ont été identifiés à ce jour et sont spécifiques de leurs antigènes [24, 25]. Par exemple, le TLR4 reconnaît spécifiquement l'endotoxine des bacilles à Gram négatif.

De façon plus détaillée, l'endotoxine, ou lipopolysaccharide (LPS), libérée dans l'organisme à partir d'un foyer infectieux est immédiatement captée par des protéines plasmatiques, les LBP (*LPS Binding Protein*), puis présentée au système immunitaire et plus particulièrement aux macrophages. Le complexe ainsi formé se fixe sur le récepteur CD14 du macrophage, via le TLR4, et conduit à l'activation de ce dernier [26].

Les TLR sont ainsi le point de départ de voies de signalisation intracellulaires aboutissant à l'activation de nombreux facteurs de transcription (NF- κ B, AP-1) responsables du contrôle de l'expression de gènes codants pour les médiateurs de la réponse immunitaire tels que des cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, INF γ), des radicaux libres oxygénés, des sélectines (E-selectine, P-selectine), des molécules d'adhésion cellulaire (ELAM-1, VCAM-1, ICAM-1) ou des enzymes (monoxyde d'azote synthase inductible, cyclooxygénase II) [21].

D'une part, ces médiateurs vont être capables d'amplifier la réaction cellulaire en activant la production de leurs propres facteurs de transcription. C'est le cas du TNF α et de l'IL-1 qui vont amplifier la production du facteur NF- κ B, agissant à son tour comme un promoteur de leurs gènes. D'autre part, ils sont le point de départ de plusieurs cascades, en activant les effecteurs de la réponse immunitaire, les voies de la coagulation ou en modulant la réponse inflammatoire et l'apoptose. Le but final étant la destruction de l'agent pathogène.

De façon simultanée à l'activation cellulaire par les antigènes bactériens, les protéines de liaison du mannane ou la protéine C réactive (CRP) sont susceptibles d'activer le complément et d'exprimer ainsi, dans la circulation, la fraction C3a et C5a du complément (figure 1). Ces éléments contribuent à l'activation des phagocytes, au chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles et à l'activation des mastocytes. Ces cellules sont susceptibles de sécréter des médiateurs (IL8, LTB4, ECF) responsables eux-mêmes de l'activation des polynucléaires, de l'histamine ou des bradykinines modifiant considérablement la perméabilité vasculaire.

3.1.2. LA REPONSE ANTI-INFLAMMATOIRE EXAGEREE (CARS : *COMPENSATORY ANTI-INFLAMMATORY RESPONSE SYNDROME*)

Secondairement, l'organisme réagit en produisant des cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-10, IL-13, TGFβ) et des inhibiteurs solubles (notamment les récepteurs solubles au TNFα et à l'IL-1) dont le but premier est de contenir la réaction inflammatoire. L'emballement de cette cascade, quand il survient, entraîne un état d'immunodépression dont la persistance dans le temps expose au risque d'infections secondaires.

A cette pluie de cytokines anti-inflammatoires s'associe la mort des cellules immuno-compétentes. En effet, le compte cellulaire des lymphocytes circulants et les autopsies de patients décédés suite à un sepsis ont mis en évidence une profonde et progressive perte de cellules immunitaires par apoptose [19]. Il en résulte à terme un état d'anergie ou état de non réponse immunitaire à la présence d'un antigène, état corrélé à une surmortalité.

3.1.3. LE SYNDROME DE REPONSE ANTAGONISTE MIXTE (MARS : *MIXED ANTAGONIST RESPONSE SYNDROME*)

La pérennisation des deux états précédents, pro-inflammatoire (SIRS) et anti-inflammatoire (CARS), de façon dérégulée aboutit à une réponse mixte antagoniste non équilibrée, aux conséquences gravissimes associant défaillance cardiocirculatoire, perte de l'homéostasie cellulaire, activation de l'apoptose, dysfonction d'organe et état d'immunosuppression. L'évolution naturelle se fait vers la défaillance multiviscérale.

3.1.4. LES ELEMENTS CELLULAIRES IMPLIQUES DANS LA REPONSE INFLAMMATOIRE

Ils sont de trois types : les cellules immunocompétentes (monocytes, macrophages, cellules folliculaires dendritiques, polynucléaires neutrophiles, lymphocytes), les plaquettes et les cellules endothéliales. Ils sont à la fois le point de départ de la cascade des cytokines mais aussi sources de médiateurs secondaires impliqués dans les voies de l'inflammation, de la coagulation ou de l'apoptose (tableau II).

Tableau II : Cellules immunocompétentes et médiateurs pro- et anti-inflammatoires [27]

Activation par des produits microbiens	Médiateurs	
	pro-inflammatoires	anti-inflammatoires
Neutrophiles	TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 IF- γ NO, PAF Facteur tissulaire, prostaglandines, leucotriènes, sérotonine sélectine,	IL-4, IL-10
Monocytes/makrophages		sTNFr, IL-1Ra
Lymphocytes		TGF- β
Thrombocytes		BPI, défensine
Cellules endothéliales		sIL-2r
Système du complément	C5a, C3a	
Système de coagulation	Facteur XII	

NO: oxyde d'azote; PAF: facteur d'activation des plaquettes; IL-1 Ra: antagoniste du récepteur IL-1; sTNFr: récepteur TNF soluble; TGF- β : «transformine growth factor- β »; BPI: «bacterial/permeability-increasing protein»; sIL-2r: récepteur soluble IL-2

Comme nous l'avons vu, les cellules immunocompétentes produisent des médiateurs pro et anti-inflammatoires mais expriment aussi des intégrines, support de leur adhésion aux cellules endothéliales et du phénomène de *rolling*. Elles produisent des médiateurs bactéricides comme le BPI (*Bacterial Permeability-Increasing protein*) ou des radicaux oxygénés. Elles sont impliquées dans la reconnaissance des micro-organismes, dans la modulation de la réponse immunitaire et dans la destruction de l'agent pathogène.

Les plaquettes, activées par le PAF (*Platelet Activating Factor*), produisent de la sérotonine et des prostaglandines. Elles participent, conjointement avec l'activation des voies de la coagulation, à la formation de microthrombi intravasculaires. Elles entrent dans le développement de la coagulation intravasculaire disséminée (CIVD).

Les cellules endothéliales produisent des sélectines, du monoxyde d'azote (NO) et du facteur tissulaire (FT). Elles ont un rôle central dans la réponse à l'infection de par l'interaction étroite qu'elles entretiennent avec les autres types cellulaires, leur permettant de moduler les voies de l'inflammation, de la coagulation et de l'apoptose. Elles interviennent dans l'initiation de la cascade de la coagulation via le FT, et dans la modulation de la vasomotricité via le NO (figure 2).

Ainsi, ces différents acteurs cellulaires, via la sécrétion de cytokines, d'intégrines et de médiateurs aux effets inflammatoire, procoagulant et vasorelaxant participent certes à la destruction de l'agent pathogène, mais conduisent progressivement à la dysfonction endothéliale, l'augmentation de la perméabilité microvasculaire, l'activation des voies de la coagulation, la défaillance des systèmes anticoagulants et fibrinolytiques, la formation de microthrombi intravasculaires, l'apparition de troubles de la perfusion capillaire et d'ischémie tissulaire, laissant ainsi s'installer l'état de choc septique et la défaillance d'organe [20, 28].

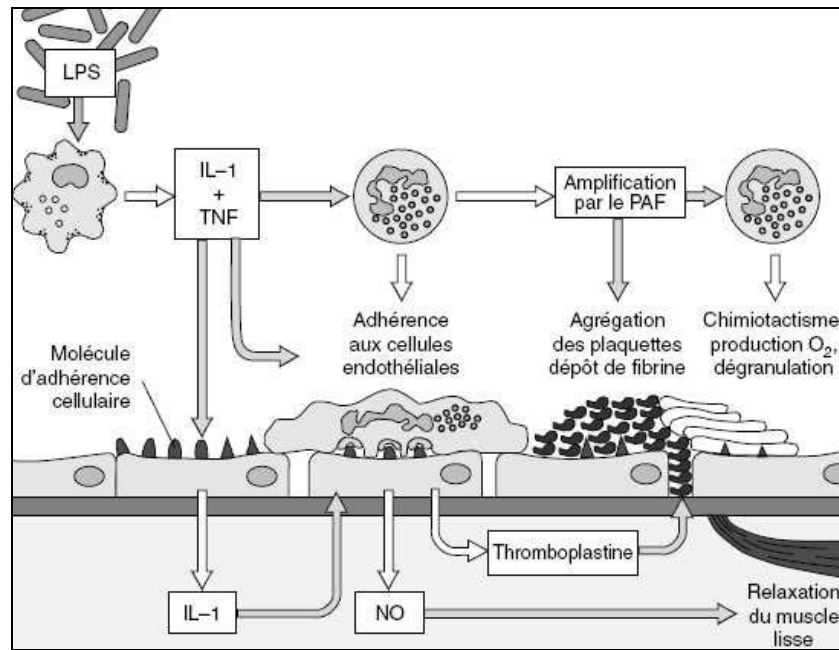


Figure 2 : Représentation schématique des évènements cellulaires à l'échelon d'un vaisseau en cas d'activation de la cascade de l'inflammation lors du choc septique [23]

3.2. LA DEFAILLANCE VASCULAIRE

3.2.1. PHYSIOLOGIE VASCULAIRE

Les artères assurent la distribution du sang dans tout l'organisme, et cela de façon active. En effet, par leur élasticité et leur contractilité, les vaisseaux régulent le débit sanguin dans les organes et l'adaptent aux besoins nutritifs locaux. On entend par vasomotricité la propriété qu'ont les vaisseaux de faire varier leur diamètre grâce à la mise en jeu d'éléments élastiques et musculaires constitutifs de leur paroi. Cette capacité d'adaptation est le résultat d'un contrôle nerveux, humoral et hémodynamique.

La classification actuelle permet de distinguer deux types d'artères en fonction de leurs différences structurales et fonctionnelles :

- ✦ Les artères de conductance ou élastiques, de gros calibre (chez l'homme de 1 à 2 cm de diamètre), très élastiques du fait de leur composition élevée en élastine (environ 40%) et dont la fonction principale est le transport du sang. L'aorte, en particulier, joue un rôle capital dans la transformation du débit pulsatile à la sortie du cœur en un débit continu dans les petites artères puis les capillaires.
- ✦ Les artères de résistance ou musculaires, sont classiquement définies comme étant des artères de diamètre inférieur à 300 μm , beaucoup moins élastiques (seulement 10% d'élastine), contenant comparativement une plus grande proportion de cellules musculaires lisses, et jouant un rôle prépondérant dans la régulation systémique de la pression artérielle pour une distribution optimale du sang dans chaque tissu.

Ces artères se divisent pour former différentes artérioles, vaisseaux impliqués dans la régulation de la pression artérielle, d'un diamètre plus petit que les artères mais avec une composition relativement semblable à celle des artères musculaires.

3.2.1.1. Régulation nerveuse et humorale de la réactivité vasculaire

Le contrôle de l'activité contractile et relaxante de la paroi vasculaire résulte de l'action sur le muscle lisse vasculaire de médiateurs d'origine nerveuse ou endocrinienne et de facteurs paracrines libérés localement (figure 3).

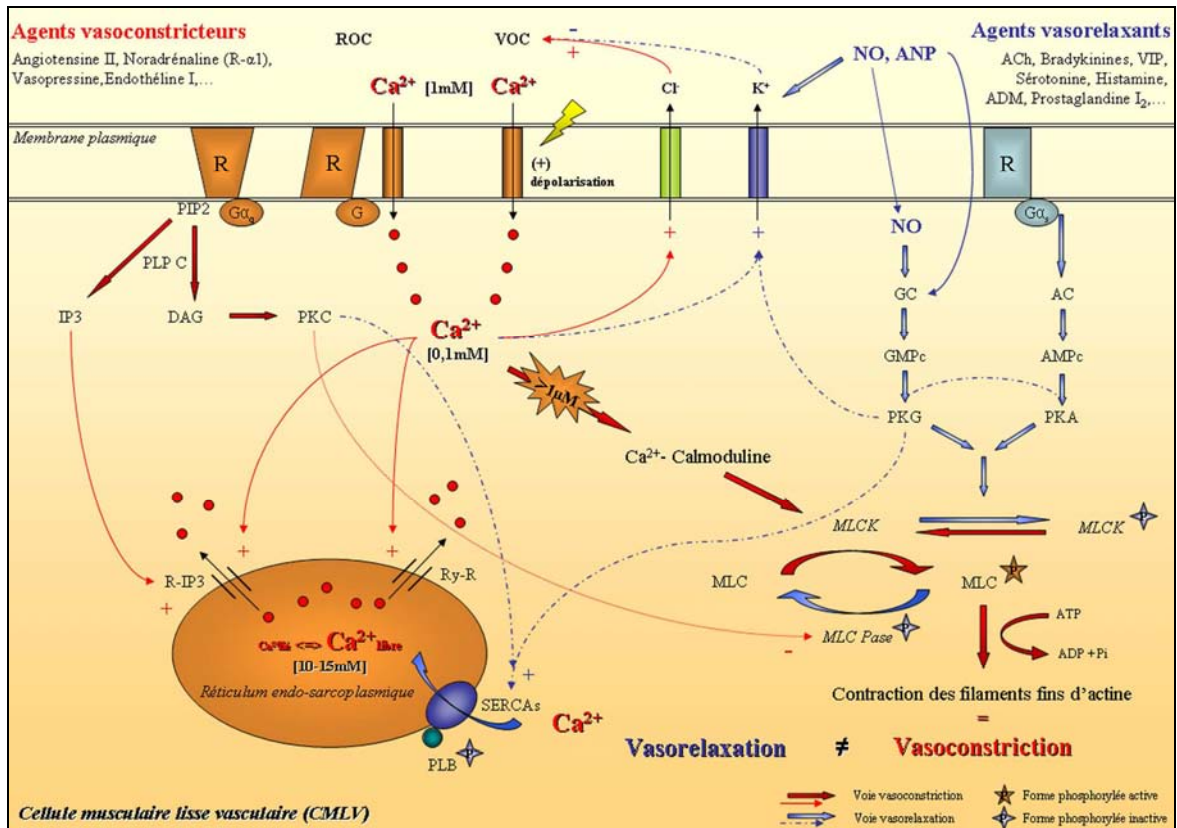


Figure 3 : Mécanismes de la contraction-relaxation de la cellule musculaire lisse vasculaire (CMLV)

AC : adénylate cyclase ; **ACh** : acétylcholine ; **ADM** : adrénomédulline ; **ADP** : adénosine diphosphate ; **AMPc** : adénosine monophosphate cyclique ; **ANP** : peptide natriurétique atrial ; **ATP** : adénosine triphosphate ; **DAG** : diacylglycerol ; **Gαq** : protéine G/sous-unité alpha de type q ; **Gαs** : protéine G/sous-unité alpha de type s ; **GC** : guanylate cyclase ; **GMPc** : guanidine monophosphate cyclique ; **IP3** : inositol trisphosphate ; **MLC** : chaîne légère de myosine (*Myosine Light Chain*) ; **MLCK** : kinase de la chaîne légère de myosine (*Myosine Light Chain Kinase*) ; **NO** : monoxyde d'azote ; **Pi** : phosphate inorganique ; **PIP2** : phosphatidylinositol bisphosphate ; **PKA** : protéine kinase AMPc-dépendante ; **PKG** : protéine kinase GMPc-dépendante ; **PKC** : protéine kinase C ; **PLB** : phospholamban ; **R** : récepteur couplé à une protéine G ; **R-IP3** : récepteur à l'IP3 ; **ROC** : canaux récepteur-dépendants (*Receptor Operated Channels*) ; **Ry-R** : récepteur à la ryanodine ; **Serca** : pompes de recaptage du calcium cytoplasmique (*Sarco Endoplasmic Reticulum Calcium ATPases*) ; **VIP** : peptide inhibiteur vasoconstriction (*Vasoactive Inhibitor Peptide*) ; **VOC** : canaux voltage-dépendants (*Voltage Operated Channels*).

⚡ La vasoconstriction

La vasoconstriction résulte de l'augmentation de calcium dans la cellule musculaire lisse vasculaire (CMLV). Deux systèmes dépendants et synergiques peuvent être mis en jeu.

D'une part, l'augmentation de calcium intracytoplasmique peut résulter de l'action de ligands neuronaux ou hormonaux tels que l'angiotensine II ou la noradrénaline via leurs récepteurs membranaires spécifiques sur la cellule musculaire lisse (récepteurs couplés à une protéine G). Une cascade enzymatique se déclenche alors mettant en jeu dans la majorité des cas la phospholipase C, laquelle hydrolyse le phosphatidylinositol bisphosphate (PIP₂) de la bicouche phospholipidique membranaire, en inositol trisphosphate (IP₃) et en diacylglycérol (DAG). L'IP₃ libéré va se fixer sur des canaux calciques réticuloplasmiques récepteurs à l'IP₃, induire leur ouverture et la libération du calcium selon son gradient de concentration vers le cytoplasme. De plus, la libération des stocks réticuloplasmiques de calcium est majorée par l'activation de canaux calciques sensibles au calcium (*calcium induced calcium release*) via les récepteurs canaux sensibles à l'IP₃ et surtout via les récepteurs canaux à la ryanodine.

D'autre part, l'augmentation de calcium intracytoplasmique peut également être due à une modification du potentiel de membrane. Le potentiel de membrane des cellules musculaires lisses varie entre -45 et -70 mV et une dépolarisation (rapprochant le potentiel de membrane de 0 mV) induit l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants et l'entrée du calcium extracellulaire dans la CMLV.

Ainsi, le calcium intracytoplasmique passant d'une concentration d'environ 0,1 µM à l'état basal à une concentration seuil supérieure à 1 µM, va se complexer à différentes molécules dont la calmoduline. Le complexe Ca²⁺-Calmoduline (une molécule de calmoduline pour quatre ions calciques) ainsi formé active alors une protéine kinase, la MLCK (*Myosin Light Chain Kinase*), responsable de la phosphorylation et ainsi de l'activation des chaînes légères de myosine. L'activité ATPasique des chaînes légères de myosine permet la contraction des filaments d'actine et ainsi la contraction du muscle lisse vasculaire.

Par ailleurs, le diacylglycérol active la protéine kinase C responsable de la phosphorylation de la phosphatase des chaînes légères de myosine, ainsi inactive. Ce mécanisme maintient l'activité ATPasique des chaînes légères de myosine et ainsi la contractilité de la CMLV.

⚡ La vasorelaxation

La relaxation de la CMLV résulte de la diminution de la concentration de calcium intracytoplasmique, soit par l'expulsion du calcium à l'extérieur de la cellule, soit par son recaptage dans le réticulum endo-sarcoplasmique. De nouveau, plusieurs mécanismes peuvent être mis en jeu.

Certains médiateurs comme le NO, le peptide natriurétique atrial, ou l'acétylcholine, la sérotonine, et l'histamine sont des agents vasorelaxants. Ces médiateurs entraînent respectivement, par l'action de la guanylate cyclase et de l'adénylate cyclase, l'augmentation de guanosine monophosphate cyclique et d'adénosine monophosphate cyclique (GMPc et AMPc). Des protéines kinases, GMPc et AMPc-dépendantes (PKG et PKA), sont alors activées et sont responsables de la phosphorylation d'un peptide, le phospholamban. Ce peptide à l'état non phosphorylé est un inhibiteur des pompes ATPases- Ca^{2+} dépendantes du réticulum sarcoplasmique, ou pompes SERCAs pour « *Sarco Endoplasmic Reticulum Calcium ATPases* » responsables du recaptage du calcium du cytoplasme vers le réticulum. La levée d'inhibition des pompes SERCAs, mécanisme qui peut être considéré comme majoritaire dans la diminution de la concentration cytoplasmique du calcium, induit une relaxation de la CMLV et une vasorelaxation.

Par ailleurs, les protéines kinases PKG et PKA sont également responsables de la phosphorylation de la MLCK, la rendant inactive. Les chaînes légères de myosine ne peuvent ainsi être activées par la MLCK ce qui contribue à la relaxation de la CMLV et à la vasorelaxation.

Enfin, la diminution du calcium intracytoplasmique peut également être due à l'efflux du calcium par stimulation des ATPases- Ca^{2+} dépendantes de la membrane plasmique, de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, ou par l'activation des canaux potassiques ATP et calcium-dépendants. En effet, après phosphorylation de ces derniers par la PKG ou activation directe par le NO, il se produit une hyperpolarisation membranaire qui inhibe l'entrée du calcium via les canaux calciques voltage-dépendants.

3.2.1.2. Régulation hémodynamique de la réactivité vasculaire

✚ La dilatation flux-dépendante

L'endothélium, interface cellulaire entre la paroi artérielle et le sang circulant, joue un rôle très important dans la transmission et la transduction d'informations du sang vers les autres composants de la paroi vasculaire. La transduction des forces hémodynamiques aboutit à une réponse physiologique rapide permettant le contrôle des débits locaux via la régulation du diamètre des vaisseaux. Quand le flux augmente, les artères se dilatent. Ce phénomène appelé dilatation flux- ou débit-dépendante est dû à la relaxation endothélium-dépendante des CMLV et permet de normaliser les contraintes de cisaillement.

Murray [29] est l'un des premiers à avoir suggéré que le flux sanguin pouvait réguler le tonus vasculaire, mais c'est Schretzenmayr [30] qui, pour la première fois, a expérimentalement démontré la notion de vasomotricité en réponse à des variations de flux sanguin. Rodbard [31, 32] a ensuite suggéré que l'endothélium était sensible à la contrainte de cisaillement générée par le sang circulant. En 1980, Furchgott et Zawadski [33] ont mis en évidence la nécessité d'un endothélium intact dans la vasodilatation induite par des agonistes. Cette dépendance a très vite été confirmée pour la dilatation flux-dépendante, tant au niveau des artères de conductance que des petites artères de résistance [34].

Les mécanismes impliqués

Le flux laminaire altère la morphologie (réorganisation du cytosquelette) et la fonction des cellules endothéliales [35]. Les mécanismes par lesquels ces cellules perçoivent et transforment ces stimuli mécaniques en signaux biochimiques intracellulaires font intervenir des éléments du cytosquelette et des protéines de la membrane plasmique sensibles aux forces de cisaillement (intégrines, canaux ioniques, protéine G), certaines pouvant être considérées comme des « mécanosenseurs potentiels ». Les intégrines, reliant la matrice extracellulaire aux sites d'adhésion focale et au cytosquelette, peuvent transmettre et moduler la tension mécanique. Les contraintes de cisaillement vont également permettre d'induire et de moduler la nature et la quantité de substances produites par l'endothélium. La transduction du flux peut impliquer la libération de substances vasodilatatrices (comme l'acétylcholine, l'ATP, la bradykinine, la substance P) stockées ou synthétisées par les cellules endothéliales, et qui

peuvent diffuser pour activer des récepteurs membranaires spécifiques sur les cellules sous-jacentes.

Lors d'une augmentation de flux, la première réponse des cellules endothéliales est de synthétiser des facteurs endothéliaux vasorelaxants (EDRF pour *endothelial-derived relaxing factors*), dont les principaux représentants sont le NO, la prostacycline (PGI₂) et l'EDHF (*endothelium-derived hyperpolarizing factor*) ; à l'opposé une baisse de flux stimule la libération de facteurs vasoconstricteurs comme l'endothéline-1 et le thromboxane.

⚡ Le tonus myogénique

Les vaisseaux sanguins répondent à une élévation de pression pariétale par une contraction et à une diminution par une dilatation. Ce comportement, appelé réponse myogénique, est inhérent au muscle lisse et indépendant d'influences neuronales, métaboliques ou hormonales. Cette réponse est très prononcée dans les artérioles mais peut être occasionnellement mise en évidence dans des artères, des veinules et des veines. Une relation inversement proportionnelle a été démontrée de manière systématique entre la taille des vaisseaux et leur capacité à développer la réponse myogénique dans différents territoires vasculaires. *In vivo*, la contraction myogénique est en permanence contrebalancée par la dilatation flux-dépendante, la réduction du diamètre augmentant la contrainte de cisaillement.

La découverte du tonus myogénique a été attribuée à Bayliss en 1902 [36], qui formula clairement l'influence de la pression intraluminale sur le tonus vasculaire. Outre quelques études qui ont tenté de confirmer les observations de Bayliss, la majorité des chercheurs ont attribué à cette régulation vasculaire locale des mécanismes chimiques ou nerveux, et ce jusqu'à ce que Folkow démontre en 1949 [37] que des préparations dénervées ont développé un tonus vasculaire dépendant de la pression, puis en 1952 [38] que l'autorégulation du flux sanguin a en partie été due à un mécanisme non neuronal et dépendant de la pression.

Dans le système vasculaire, il semble que la réponse myogénique participe à de nombreuses fonctions physiologiques. Les deux plus importantes sont l'établissement d'un tonus vasculaire basal et l'autorégulation du débit sanguin et de la pression hydrostatique du réseau capillaire. En effet, le tonus basal est un pré-requis indispensable pour le développement des processus contractiles ou dilatatoires au niveau des artères ou artérioles.

La réponse myogénique joue également un rôle primordial dans le maintien à un niveau constant du débit sanguin et de la pression hydrostatique capillaire au cours des variations de pression artérielle systémique. Des travaux sur organes isolés ont suggéré que des changements de pression artérielle ou veineuse induisent des changements de résistance artérielle qui pourraient servir à minimiser les variations de pression hydrostatique capillaire. Parallèlement, il a été démontré que le volume d'un tissu était constant pour un intervalle de pression systémique allant de 30 à 170 mmHg. Ainsi, selon l'hypothèse qu'un volume tissulaire constant reflète une pression capillaire constante, il a été conclu que la régulation de la pression hydrostatique capillaire impliquait des ajustements myogéniques du tonus vasculaire. Toutefois, la contribution des mécanismes myogéniques dans la régulation de la pression capillaire pourrait dépendre de la façon dont les variations sélectives de pression artérielle ou veineuse se font. Dans le cas d'une diminution de pression de perfusion, on note une régulation partielle de la pression capillaire dans certains tissus; une part importante de ce processus implique des facteurs autres que la réponse myogénique. En revanche, quand les pressions veineuse et artérielle sont toutes deux augmentées ou diminuées de manière identique (changements de posture), la contribution du tonus myogénique dans la régulation de la pression tissulaire est beaucoup plus importante.

Les mécanismes impliqués

Le tonus myogénique est une contraction active du muscle lisse vasculaire (figure 4). Bohr et ses collaborateurs ont suggéré pour la première fois que la réponse myogénique pouvait refléter un couplage excitation-contraction conduisant à la dépolarisation de la membrane et à l'augmentation de la perméabilité en calcium. Cette idée a été basée sur des enregistrements simultanés de tension et de potentiel membranaire, et sur la dépendance calcique du tonus myogénique dans des vaisseaux de résistance.

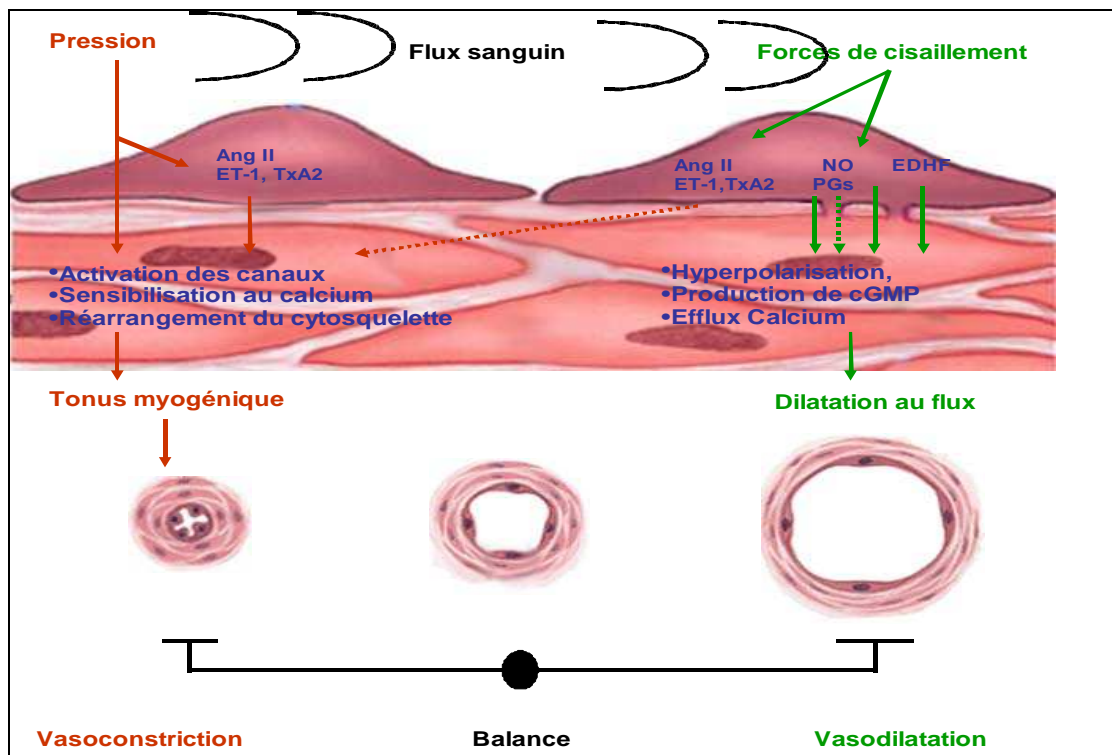


Figure 4 : Contrôle du tonus vasculaire par la pression et le débit

La défaillance vasculaire occupe une place centrale dans la physiopathologie du choc septique. Elle peut être divisée en deux grands segments :

- ✓ la dysfonction endothéliale (lésions endothéliales, troubles de la microcirculation et hyperperméabilité),
- ✓ la vasoplégie et les anomalies de contractilité du muscle lisse vasculaire.

3.2.2. DYSFONCTION ENDOTHELIALE

3.2.2.1. L'endothélium vasculaire

Au cours de la dernière décennie une meilleure connaissance de la physiopathologie du sepsis a permis de mettre en exergue le rôle fondamental que jouait l'endothélium. Initialement décrit comme étant une simple frontière entre le sang et les tissus, il apparaît maintenant clair que l'endothélium est un organe à part entière.

Physiologiquement, il constitue une interface fonctionnelle entre le flux sanguin et le sous endothélium. L'endothélium est le garant de la qualité de la macrocirculation et de la microcirculation.

L'endothélium assure quatre grandes fonctions :

- La régulation du tonus vasomoteur en synthétisant des molécules vasorelaxantes telles que le NO et la PGI-2 (prostacycline). Il est ainsi le garant d'une perfusion tissulaire adaptée au besoin métabolique.
- Le maintien de la fluidité sanguine grâce à sa surface anticoagulante et profibrinolytique via la thrombomoduline, le système de la protéine C, les activateurs du plasminogène, l'héparane sulfate qui lie l'antithrombine et l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire ou TFPI (*Tissue Factor Pathway Inhibitor*).
- La modulation de l'inflammation et de l'apoptose via la voie de signalisation intracellulaire de NF- κ B qui contrôle l'expression de nombreux gènes codant pour des cytokines, des adhésines et des protéines impliquées dans l'apoptose. Il contrôle par exemple le passage des cellules immunocompétentes au niveau tissulaire, en régulant l'expression des adhésines et des facteurs chimiotactiques.
- Enfin, il participe à l'angiogénèse.

Au cours du sepsis, les trois propriétés essentielles des cellules endothéliales que sont la thrombomodulation, la régulation de la vasomotricité et la modulation de la réaction inflammatoire, sont profondément remaniées.

➤ La thrombomodulation

Au cours du sepsis, l'endothélium perd ses propriétés anticoagulante et profibrinolytique pour devenir franchement procoagulant et antifibrinolytique. Cet effet passe par une diminution de l'expression de la thrombomoduline et des héparanes sulfates, empêchant le bon fonctionnement des trois systèmes anticoagulants que sont le système de la protéine C, l'antithrombine et le TFPI. De plus, les cellules endothéliales se mettent à produire du facteur tissulaire, des phospholipides procoagulants et de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1). Il en résulte une génération de thrombine responsable de la formation de fibrine et rapidement de microthrombi.

➤ La régulation de la vasomotricité

L'atteinte de l'endothélium se traduit également par une perte du caractère d'adaptation du tonus vasomoteur : le vaisseau septique est vasoplégique. Ceci tient notamment à l'excès de NO produit par la NO synthase inductible située au niveau de la cellule musculaire lisse. Le vaisseau n'est plus capable d'adapter son tonus aux stimuli locaux, en particulier aux modifications du débit de perfusion, de pression endoluminale ou des apports en oxygène.

➤ La modulation de la réaction inflammatoire

Au cours du sepsis, l'endothélium exprime des molécules d'adhésion et des facteurs chimiotactiques responsables du recrutement des cellules immunocompétentes, de leur adhésion et du phénomène de *rolling*. Localement, ces cellules génèrent des radicaux libres et des protéinases (élastases des polynucléaires neutrophiles) créant des lésions de l'endothélium et aboutissant finalement à l'apoptose des cellules endothéliales. Son intégrité physique et sa fonction de barrière sont atteintes. Il devient hyperperméable et favorise l'œdème interstitiel.

La conjonction d'une dysrégulation du tonus vasculaire, de la formation de microthrombi, de l'afflux cellulaire et de l'atteinte morphologique de l'endothélium concoure à modifier les conditions rhéologiques locales et à favoriser l'hypoperfusion tissulaire, voire à oblitérer la lumière vasculaire [28, 39].

3.2.2.2. Lésions endothéliales

Lors du sepsis, de nombreuses études ont mis l'accent sur une atteinte de la cellule endothéliale. Cette atteinte qualifiée de dysfonction semble participer, au même titre que les organes nobles (coeur, reins, foie, poumons), à l'apparition du syndrome de défaillance multiviscérale. De ce fait, des études cliniques se sont spécifiquement intéressées au traitement de la dysfonction endothéliale, afin d'améliorer le pronostic des patients atteints de choc septique.

L'équipe de Mutunga *et coll.* est l'une des premières à avoir montré l'existence de lésions endothéliales au cours du sepsis chez l'homme, et ce par la mise en évidence de la dissémination des cellules endothéliales dans la circulation [40]. Des échantillons sanguins ont été prélevés chez 11 volontaires sains, 9 patients contrôles ventilés en unité de soins intensifs sans sepsis, 8 patients présentant un sepsis mais sans choc et 15 patients en état de choc septique. Les cellules endothéliales étaient identifiées par immunofluorescence indirecte en utilisant des anticorps dirigés contre le facteur von Willebrand (vWF) et le récepteur du facteur de croissance de l'endothélium (EGFR). Le compte des cellules endothéliales vWF positives était significativement plus élevé chez les patients présentant un sepsis et un choc septique que chez les volontaires sains ou les patients contrôles. Le compte des cellules endothéliales EGFR positives était également plus élevé chez les patients septiques et en état de choc.

3.2.2.3. Coagulation intravasculaire disséminée (CIVD)

L'activation des cellules endothéliales par des médiateurs pro-inflammatoires produits *in situ* ou circulants, tels que les cytokines, provoque une activation de la coagulation locale pour réaliser un tableau de CIVD.

La cinétique des événements est aujourd'hui parfaitement décrite [41] : elle met en jeu l'activation du système procoagulant, le « dépassement » du système fibrinolytique et l'agrégation des plaquettes associée à un dépôt de fibrine, élément initial de la CIVD.

Son expression biologique, précoce, est plus spécifiquement représentée par la présence de complexes solubles, de produits de dégradation de la fibrine et d'une diminution de la

concentration plasmatique en antithrombine. Les organes concernés par ce phénomène sont les poumons, les muscles squelettiques, les reins, le cerveau, etc.

L'initiation de la CIVD est de deux ordres :

- d'ordre microcirculatoire, ralentissement microcirculatoire, anomalies de la distribution du flux sanguin locorégional (ouverture des shunts artérioveineux), augmentation de la viscosité sanguine favorisée par la fuite liquidienne interstitielle et diminution de la déformabilité des globules rouges, *pooling capillaire* ;
- d'ordre « biochimique », activation des facteurs de la coagulation sous l'effet des médiateurs pro-inflammatoires.

L'obstruction microvasculaire observée en *post mortem* chez certains sujets décédés de choc septique permet d'expliquer que cette CIVD contribue largement à l'hypoxie de tous les organes. Ceci est particulièrement vrai au sein des poumons et du cerveau ou visible au niveau des extrémités dans la situation particulière de la méningococcémie fulminante.

3.2.2.4. Hyperperméabilité capillaire ou syndrome de fuite capillaire

L'activation des cellules endothéliales au sein des différents tissus par les médiateurs circulants et plus particulièrement les cytokines, l'histamine et la bradykinine entraînent une modification de la jonction serrée des cellules endothéliales et la possibilité pour les petites et moyennes molécules, de passer du secteur vasculaire dans le secteur interstitiel. La traduction clinique de l'augmentation de la perméabilité capillaire est, de ce fait, une augmentation du volume interstitiel responsable de l'hypovolémie bien documentée à la phase initiale du choc septique.

Les conséquences viscérales de l'augmentation de la perméabilité capillaire et de la formation d'oedème, sont une hypoxie tissulaire, une hypoperfusion et la constitution des trombi vasculaires. L'hypo-oxygénation tissulaire caractéristique du choc septique est en partie due à cet oedème qui augmente la distance à parcourir pour la molécule d'oxygène entre le vaisseau et la cellule cible [42].

3.2.3. DEFAILLANCE VASCULAIRE ET ANOMALIE DE LA CONTRACTILITE DU MUSCLE LISSE VASCULAIRE (ANNEXE 1)

L'hyporéactivité vasculaire peut être définie par une augmentation moindre de la pression artérielle pour une même dose d'agent vasopresseur.

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 et exogènes et une activation maximale du système rénine-angiotensine. L'administration de doses majeures de catécholamines est alors nécessaire pour augmenter leur pression artérielle.

Bellissant *et coll.* ont ainsi comparé 20 patients en choc septique à 12 sujets sains. Des courbes doses-réponses 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 [43].

3.2.3.1. Principaux mécanismes impliqués dans l'hyporéactivité vasculaire du choc septique

✚ Le monoxyde d'azote

Le NO est un messager intercellulaire omniprésent chez tous les vertébrés et régulant notamment le flux sanguin, la thrombose et l'activité neurale. Il joue également un rôle dans l'immunité non spécifique. Le NO est produit physiologiquement à des concentrations picomolaires à partir de la L-arginine par une NO synthase (NOS) qui est présente de façon constitutive dans les cellules endothéliales, appelée NOS endothéliale constitutive. Le NO diffuse dans le muscle lisse vasculaire sous-jacent et induit une vasorelaxation par l'intermédiaire de la stimulation de la guanylate cyclase soluble et de l'augmentation de la concentration en GMPc qui en résulte [44].

Dans le milieu des années 80, il commençait à apparaître que les inhibiteurs des NOS étaient capables pour une large part de rétablir cette réponse contractile aux agents vasoconstricteurs [45]. Ces effets étaient maintenus dans des modèles de vaisseaux *ex vivo*, même en l'absence d'endothélium, suggérant que l'inflammation et le sepsis conduisait à l'expression d'une NOS, la NOS inductible (iNOS), au niveau du muscle lisse de la paroi vasculaire. La

production excessive de NO (concentrations nanomolaires) par la iNOS conduit à l'altération de la réponse contractile. Les auteurs ont conclu que ces résultats i) étaient en accord avec la physiopathologie, tant expérimentale que clinique, observée au cours du sepsis, ii) pouvaient expliquer la profonde vasoplégie et la réponse limitée aux stimulations qui régulent en temps normal la distribution du débit sanguin et la perfusion tissulaire. Les taux circulants élevés de nitrites/nitrates, molécules stables issues du NO, retrouvés chez les patients septiques associés à la baisse du tonus vasculaire suggéraient que le NO était clairement impliqué dans la physiopathologie du choc [46, 47].

L'ensemble de ces observations a conduit à l'utilisation d'inhibiteurs non sélectifs des NOS tels que le L-N^G-monométhylarginine (L-NMMA) chez des animaux septiques en premier lieu [48]. Le L-NMMA augmente la pression artérielle et les résistances vasculaires avec une diminution du débit cardiaque permettant la réduction des doses de vasopresseurs. Cependant, les résultats sont divergents sur l'ensemble des études animales. Les différentes explications avancées concernent les différences inter-espèces, les différents modèles de sepsis utilisés, le type et les doses d'inhibiteurs utilisés, et également le moment où les inhibiteurs sont administrés par rapport au début du sepsis. Il est important de noter que ces traitements n'ont pas amélioré la survie dans un modèle animal d'endotoxémie chronique [49]. Des études cliniques de faible effectif ont rapporté les effets bénéfiques sur l'hémodynamique de l'utilisation d'inhibiteurs des NOS, ou de la guanylate cyclase comme le bleu de méthylène. Ces traitements étaient en général associés à une augmentation de la pression artérielle systémique mais sans aucune réduction de la mortalité [50]. Malgré la possibilité d'effets secondaires importants, et l'absence d'amélioration de la survie, il a été néanmoins décidé d'entreprendre de larges études cliniques randomisées et contrôlées. Une étude de phase II (312 patients) a montré une plus grande proportion de patients avec résolution du choc à 72h dans le groupe traité par du L-NMMA que dans le groupe contrôle [50]. Malheureusement l'étude de phase III y faisant suite a été interrompue à la demande du Comité de Surveillance de l'étude, après inclusion de 797 patients au sein de 126 centres, en raison de l'émergence d'une surmortalité significative dans le groupe traité à 3 jours (15% vs 27% dans le groupe traité), à 14 jours (36% vs 52% dans le groupe traité) et à 28 jours (49% vs 59% dans le groupe traité) [51]. Il a été proposé que l'utilisation d'un inhibiteur plus spécifique de la iNOS puisse apporter un bénéfice aux patients. Quelques résultats expérimentaux positifs ont été obtenus avec des molécules telles que la S-méthylisothiourée, la L-Canavanine [52] ou l'aminoguanidine, mais aucune n'a été retenue à ce jour pour un essai clinique.

Cependant, bloquer la production de NO pourrait être à l'origine d'autres effets délétères comme :

- ✓ une altération du flux microcirculatoire ;
- ✓ une diminution de l'activité bactéricide NO-dépendante ;
- ✓ une diminution de l'activité de neutralisation des espèces dérivées de l'oxygène ;
- ✓ une diminution de la modulation de l'activation de la coagulation ;
- ✓ une augmentation de la demande en oxygène en améliorant la respiration mitochondriale dans des tissus où la perfusion, et donc la délivrance en oxygène, reste précaire, aggravant ainsi la balance demande-apport en oxygène.

Ainsi, le paradigme actuel proposant le NO et la guanylate cyclase soluble comme agents contribuant à la défaillance d'organes et à la mortalité associées au choc septique peut être contesté. En effet, bien que de nombreux travaux expérimentaux confirment cette conclusion, de récentes données ont rapporté une mortalité accrue chez des souris knock-out pour le gène de la iNOS soumises au LPS [53]. Par ailleurs, Cauwels *et coll.* [54] ont montré qu'un traitement par nitrites protégeait contre la morbidité et la mortalité du choc endotoxinique et cela de façon GCs-dépendante.

Ainsi, même si la production en excès de NO semble être un acteur majeur et central dans l'hyporéactivité vasculaire observée au cours du sepsis, l'inhibition non sélective de la iNOS a conduit à l'augmentation de la mortalité chez des patients en choc septique.

✚ Les voies de la prostacycline et de la COX-2

La prostacycline ou prostaglandine I₂ (PGI₂), produit majeur du métabolisme de l'acide arachidonique, est formée au niveau des cellules musculaires lisses de l'endothélium vasculaire via l'action enzymatique de la cyclo-oxygénase (COX) et de la prostacycline synthase. La PGI₂ agit notamment via une protéine Gs couplée au récepteur IP des prostacyclines, situé à la surface de la CMLV. La stimulation du récepteur IP par la PGI₂ conduit à l'augmentation de l'AMPC induisant une relaxation de la CMLV.

Une augmentation des taux de PGI₂ a été rapportée chez des patients en choc septique ainsi que chez des animaux traités avec du LPS ou des cytokines pro-inflammatoires [55]. Certaines données récentes suggèrent que l'isoforme inductible de la COX, la COX-2, est l'enzyme principalement responsable de l'augmentation de production de la PGI₂ dans la CMLV [56]. En outre, il a été démontré que l'inhibition de la COX-2 atténue la chute de la

pression sanguine ou améliore la dysfonction endothéliale vasculaire chez des animaux endotoxémiques. Récemment, Höcherl *et coll.* [57] ont démontré que l'inhibition sélective du récepteur IP de la PGI₂ atténuait la dysfonction cardiovasculaire induite par le LPS, sans altérer les taux de cytokines ou de métabolites du NO, évoquant ainsi un rôle spécifique de la PGI₂ et/ou de son récepteur dans le développement de la dysfonction vasculaire induite par le LPS. De même que pour les inhibiteurs de la iNOS, l'inhibition non sélective de la synthèse des prostaglandines via l'ibuprofène n'a pas amélioré le taux de mortalité chez des patients en choc septique [58].

‡ Les radicaux libres : l'ion peroxynitrite et l'anion superoxyde

Les radicaux libres sont des molécules possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe, état qui augmente considérablement leur réactivité. Parmi les espèces réactives générées à partir de l'oxygène (ERO), les radicaux hydroxyle ($\cdot\text{OH}$) et superoxyde ($\text{O}_2\cdot^-$) ainsi que l'ion peroxynitrite (ONOO^-) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) sont impliqués dans tous les phénomènes de stress oxydant.

Il est important de considérer que chaque fois que le NO et l'anion superoxyde entrent en collision, ils interagissent spontanément pour former du peroxynitrite [3], un puissant agent oxydant de molécules telles que les acides nucléiques, les lipides ou certaines protéines. Cette réaction ne nécessite pas d'enzyme. De ce fait, il est possible que la plupart des effets biologiques attribués au NO soient en réalité dus au peroxynitrite.

L'état de choc constitue une situation d'école pour former du peroxynitrite puisque du NO et du superoxyde sont produits en grande quantité et dans les mêmes tissus.

La production d'anion superoxyde résulte notamment de l'action enzymatique de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase présente dans les leucocytes et les cellules endothéliales, de la xanthine oxydase responsable de la transformation de l'hypoxanthine en xanthine, de la réduction de l'oxygène moléculaire dans les mitochondries par les cytochromes respiratoires cellulaires ou encore du découplage des NOS dans des conditions de carence en leur substrat, la L-arginine, ou en leurs cofacteurs d'activation notamment la tétrahydrobioptérine [3]. Dans plusieurs modèles de choc endotoxinique, il a été démontré que des inhibiteurs de la formation du peroxynitrite ou la suppression génique du

NADPH sont capables à la fois de diminuer la quantité de peroxy-nitrite aortique et de s'opposer à l'hyporéactivité vasculaire. Inversement, l'augmentation de la production endogène de peroxy-nitrite en induisant une déplétion des stocks endogènes de glutathion aggrave l'hyporéactivité vasculaire. De nombreuses études ont montré que l'effecteur final de l'action délétère du peroxy-nitrite sur la réactivité vasculaire est liée à l'activation des polyADP-ribose polymérase qui sont des protéines impliquées dans un grand nombre de processus cellulaires comme la réparation de l'ADN ou l'apoptose [59].

L'anion superoxyde, réduit en peroxyde d'hydrogène sous l'action enzymatique de la superoxyde dismutase (SOD), est lui aussi directement impliqué dans l'hyporéactivité vasculaire observée au cours des états de choc. Au cours de l'état de choc, il existe un déséquilibre entre la quantité d'anion superoxyde produit et la capacité de détoxification de la SOD. Ainsi, Macarthur *et coll.* ont montré sur un modèle de rats endotoxiques que l'hyporéactivité vasculaire aux catécholamines était due à leur oxydation par l'anion superoxyde en dérivés adrénochromes, les rendant inefficaces à se lier à leurs récepteurs [60]. En outre, ces auteurs ont également démontré que l'hypotension induite par l'endotoxine était totalement abolie par l'administration de M40403, un agent mimétique de la SOD [61].

Néanmoins, malgré ces résultats expérimentaux, il n'existe actuellement pas d'études ayant évalué les effets de la neutralisation du peroxy-nitrite ou de l'anion superoxyde au cours du choc septique humain.

✚ Les canaux potassiques

Les canaux potassiques, protéines transmembranaires permettant le passage sélectif d'ions potassium K^+ via le pore du canal, sont fermés à l'état physiologique et ont essentiellement un rôle régulateur et adaptateur. Ainsi, au niveau de la cellule musculaire lisse vasculaire, ils contribuent au maintien du potentiel membranaire de repos et, de cette manière, à la régulation du tonus vasculaire artériel et au flux sanguin local.

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 deux stimuli activent l'ouverture des canaux K_{ATP} , de même que l'augmentation de NO, de peroxy-nitrite et l'hypoxie [3, 5].

Dans la membrane plasmique des cellules musculaires lisses vasculaires, l'ouverture des canaux K_{ATP} permet la sortie élective d'ions K^+ hors de la cellule, ce qui entraîne une hyperpolarisation membranaire, un blocage des canaux calciques voltage-dépendants, prévenant ainsi l'entrée de calcium dans la cellule en réponse aux vasoconstricteurs (figure 5). Il en résulte une relaxation cellulaire et une vasodilatation [62, 63] contribuant à l'hypotension systémique et l'hyporéactivité vasculaire aux agents vasopresseurs observées au cours des états de choc.

Les canaux potassiques sont repris dans un chapitre indépendant où leurs structure, rôle et implication au cours de l'état de choc y sont détaillés (se référer p 86).

‡ Déficit relatif en vasopressine

La vasopressine, mieux connue sous le nom d'hormone antidiurétique, est un nonapeptide produit par les noyaux supra-optique et paraventriculaire de l'hypothalamus. Elle est synthétisée en réponse à l'hyperosmolarité et l'hypotension artérielle. De ce fait, ses taux sont très élevés dans les chocs hypovolémiques ou cardiogéniques. De façon paradoxale, Landry *et coll.* [64] ont montré, en comparant les taux de vasopressine chez des patients en choc cardiogénique avec ceux de patients en choc septique ayant les mêmes valeurs de pression artérielle, que le sepsis induit un déficit relatif en vasopressine (22,7 vs 3,1 pg/ml). La neurohypophyse d'un patient en choc septique ne contient presque plus de vasopressine, cela étant confirmé par l'absence d'hypersignal en T1 en imagerie par résonance magnétique [65].

Trois mécanismes potentiels peuvent être à l'origine de ce déficit. Puisque seulement 10 à 20% du stock de vasopressine peut être relâché lors d'un stress aigu, il est possible que la libération hormonale ne suffise pas aux besoins physiologiques. Par ailleurs, une mauvaise communication entre les barorécepteurs (cardiaques, aortiques et carotidiens) et l'hypothalamus s'avère une hypothèse explicative puisqu'une dysfonction du système nerveux autonome en choc septique a déjà été décrite.

Enfin, une inhibition de la sécrétion de vasopressine au niveau neurohypophysaire par les hautes concentrations de NO et de noradrénaline rencontrées en situation septique pourrait également contribuer au déficit relatif en vasopressine [66].

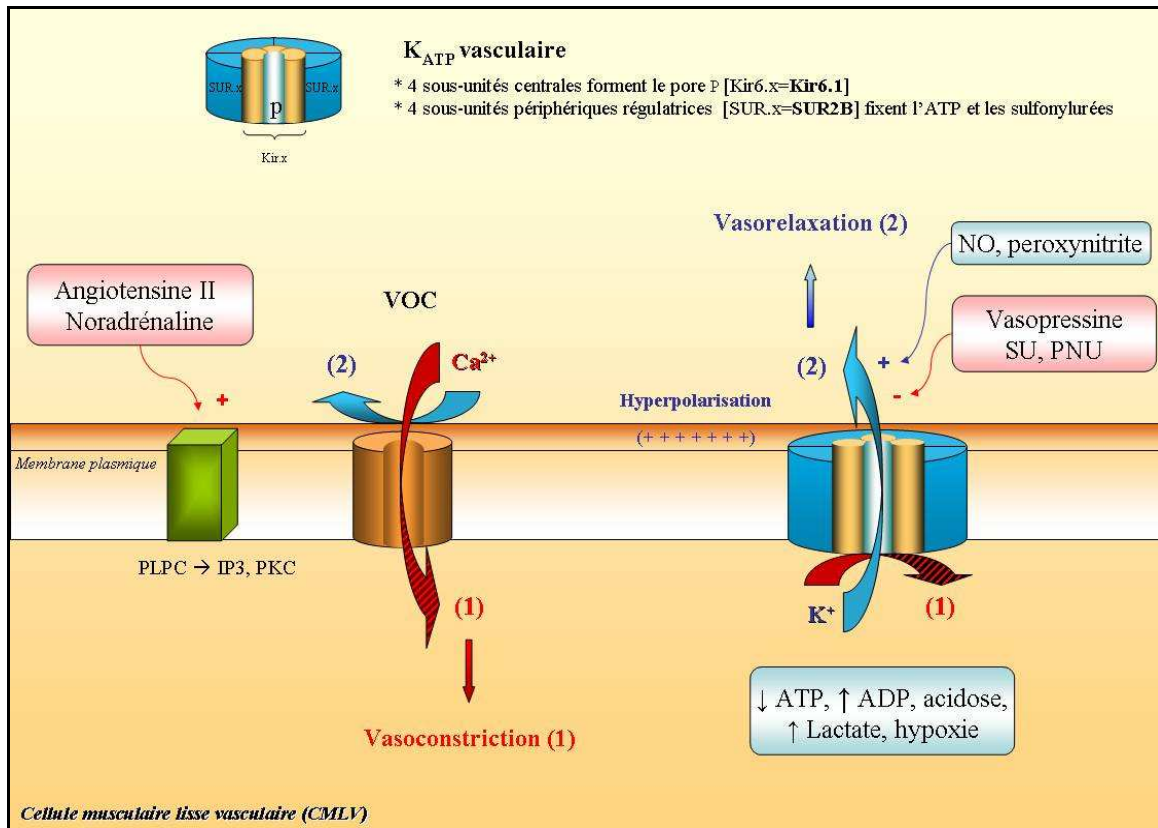


Figure 5 : Mécanisme d'activation des canaux potassiques ATP-dépendants

ATP : adénosine triphosphate ; **Ca²⁺** : ion calcique ; **IP3** : inositol trisphosphate ; **K⁺** : ion potassique ; **KATP** : canaux potassiques ATP-dépendants ; **Kir** : sous-unité centrale du canal potassique (*inwardly rectifying channel*) ; **NO** : monoxyde d'azote ; **p** : pore du canal potassique ; **PLPC** : phospholipase C ; **SUR** : sous-unité périphérique du canal potassique (*Sulfonyles Récepteur*) ; **VOC** : canaux voltage-dépendants (Voltage Operated Channels).

La vasopressine, en se liant à son récepteur V1a ou V1R situé principalement sur les cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins, induit une vasoconstriction. Ce type de récepteur se retrouve également au niveau de plusieurs organes et tissus, tels le foie, le rein, le cerveau, la rate, le myomètre, la vessie, les plaquettes et les glandes surrénales.

En pratique clinique, la vasopressine augmente la pression artérielle sans variation de la fréquence cardiaque et en général diminue l'index cardiaque. L'intérêt pour la vasopressine provient i) de son pouvoir vasoconstricteur important dans le sepsis, situation qui s'accompagne dans 50% des cas d'une déplétion endogène en vasopressine circulante, ii) de la possibilité chez les patients traités par vasopressine de sevrer les catécholamines.

Cependant, certains patients demeurent réfractaires aux doses de vasopressine utilisées. Il est probable que cette absence d'efficacité puisse être reliée à l'hyporéactivité vasculaire à la vasopressine comme l'ont démontré Leone *et coll.* [67]. Les auteurs ont étudié la réponse vasopressive des artérioles mésentériques dans un modèle animal de « *sepsis shock-like* » induit par incubation des artères avec un donneur de NO et un inhibiteur des phosphodiesterases 3. La principale observation a été que la vasoconstriction induite par la noradrénaline, la vasopressine et l'association noradrénaline/vasopressine était diminuée.

Dans un papier plus ancien, Hollenberg *et coll.* [68] ont également montré cette diminution de la réponse vasopressive à la vasopressine et avaient de même mis en évidence une réversibilité partielle de cette hyporéactivité vasculaire en inhibant le monoxyde d'azote.

Cependant, dans un modèle plus proche de la clinique utilisant une péritonite réanimée et observée après 18 heures, Barrett *et coll.* [69] ont trouvé des résultats différents puisque dans leur modèle, la vasoréactivité est diminuée pour la noradrénaline et préservée pour la vasopressine.

‡ Insuffisance cortico-surrénalienne

Le choc hémodynamique, accompagné d'une dysfonction d'organe, est à l'origine d'une des réponses systémiques de stress les plus importantes. L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS) est sollicité de façon majeure dans les états de choc. Il en résulte une sécrétion surrénalienne importante de cortisol.

Deux phénomènes tendent à induire une insuffisance surrénalienne fonctionnelle chez certains patients en état de choc, soit un épuisement surrénalien avec des taux de cortisol circulant trop faibles pour être dosés, on parle alors d'insuffisance surrénalienne absolue, soit une résistance périphérique au cortisol [70]. Ces troubles endocriniens fonctionnels sont d'autant plus importants que le choc est prolongé et sévère.

L'insuffisance surrénalienne doit être suspectée chez les patients hypotendus qui répondent mal au remplissage vasculaire et aux agents vasopresseurs, en particulier dans le cadre d'une septicémie. Dans une étude récemment publiée par Annane *et coll.* [71], la prévalence de l'insuffisance surrénalienne (déterminée par le test de référence à la métyrapone) chez des patients atteints de sepsis sévère et de choc septique s'élève à 60%. Cependant, la prévalence varie de 0 à 77% selon les études. Les données issues de l'étude Corticus [72, 73], utilisant une méthode de dosage immunologique électrochimiluminescente, ont montré qu'il y avait une grande variation interdosage du taux de cortisol sérique total. La comparaison avec la méthode de dosage de référence a révélé à la fois des sur- et des sous-estimations par rapport aux taux de cortisol réels. Cette variation interdosage rend difficile le diagnostic d'insuffisance surrénalienne.

L'effet majeur de l'insuffisance surrénalienne chez les patients en état de choc se manifeste notamment par une altération de la réponse inflammatoire systémique, avec une réponse pro-inflammatoire exagérée et prolongée [74], ainsi qu'une altération de la fonction cardiovasculaire.

L'utilisation de glucocorticoïdes chez les patients en état de choc septique est discutée dans la section « **Stratégies Thérapeutiques** » paragraphe 4.3.1.

✚ Modification du signal catécholergique

D'une manière générale, la diminution de la réponse à l'exposition d'un agoniste est appelée désensibilisation. Cette désensibilisation se produit pratiquement pour tous les récepteurs de surface lorsqu'ils sont exposés de façon continue ou répétée à un agoniste. Expérimentalement, la désensibilisation peut être définie par la nécessité d'augmenter la concentration de l'agoniste pour produire 50% de l'activité maximale.

Les agonistes peuvent également entraîner une séquestration des récepteurs, phénomène qui survient en quelques minutes et qui consiste en une internalisation du récepteur à l'intérieur de la cellule. Ce phénomène est rapidement réversible dès lors que la stimulation agoniste cesse. Lorsque l'exposition à l'agoniste est plus prolongée (plusieurs heures ou jours), on observe alors une véritable « *down regulation* » qui implique une diminution permanente du nombre de récepteurs à la surface cellulaire et leur dégradation définitive. Leur restauration nécessite alors l'expression du gène codant pour le récepteur.

La régulation des récepteurs adrénergiques au cours du sepsis a été beaucoup plus étudiée sur les β -récepteurs au niveau myocardique que sur les α -récepteurs au niveau vasculaire. En ce qui concerne les α -récepteurs, McMillan *et coll.* [75] ont observé une réduction du nombre de récepteurs α -1 hépatiques dans un modèle de sepsis chronique chez le rat. Il n'y a actuellement pas de données chez l'homme. Au total, il existe des arguments expérimentaux et cliniques concordants en faveur d'une désensibilisation des β -récepteurs et vraisemblablement des α -récepteurs au cours des états septiques. Cette désensibilisation n'a pas d'explication univoque et fait intervenir une diminution du nombre de récepteurs ("*down regulation*") et/ou un découplage entre les récepteurs et leurs messagers intracellulaires.

Il est tentant d'attribuer la désensibilisation des récepteurs à l'excès de catécholamines circulantes puisque celles-ci interviennent en premier lieu dans la régulation des récepteurs adrénergiques. L'importance relative de l'apport de catécholamines exogènes n'a pas été étudiée spécifiquement. On sait cependant sur un nombre limité de patients, que la durée et la posologie des traitements par catécholamines aggravent la désensibilisation et que celle-ci reste observée en l'absence de tout traitement exogène.

‡ L'adrénomédulline

L'adrénomédulline peut agir selon un mode d'action endocrine ou paracrine. Elle a de nombreuses propriétés parmi lesquelles une action vasodilatatrice. Son action est médiée par le biais de messagers intracellulaires : activation de son récepteur membranaire couplé à une protéine $G\alpha_s$, responsable de l'activation d'une adénylate cyclase fixée à la membrane et de l'augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc. Les cellules musculaires lisses vasculaires réagissent en se vasorelaxant, mécanisme à la fois endothélium-dépendant par la libération de NO et endothélium-indépendant par l'intermédiaire d'une protéine kinase A.

L'adrénomédulline est exprimée de façon ubiquitaire et notamment au niveau du système cardiovasculaire. Sa sécrétion est régulée par le « *shear stress* », l'endotoxine, l'angiotensine II, l'endothéline I, et aussi par l'hypoxie, l'ischémie ou l'hyperglycémie.

Les taux circulants d'adrénomédulline sont élevés dans le choc septique et ce surtout dans les premières heures. Pour certains auteurs, cette hyperproduction précoce est responsable de l'état hyperkinétique. Avec la progression du sepsis, la réponse vasculaire à l'adrénomédulline est diminuée et pourrait être responsable du passage vers la forme hypokinétique. La baisse de la réponse vasculaire à l'adrénomédulline semble liée à une diminution de son ligand, l'ABP-1 (*Adrenomedullin Binding Protein-1*), et non à une modification de l'expression génique des récepteurs à l'adrénomédulline. Le traitement par l'association adrénomédulline/ABP-1 d'animaux septiques prévient la transition vers l'état hypokinétique, améliore l'état cardiovasculaire et diminue la mortalité [76]. Parmi les effets constatés de ces traitements, on retrouve la baisse de cytokines pro-inflammatoires [77], le maintien de l'activité NOS endothéliale et la diminution de l'apoptose des cellules endothéliales vasculaires. Les effets anti-inflammatoires semblent liés à la stimulation du récepteur au facteur activé de prolifération des peroxyosomes (PPAR gamma pour « *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma* ») [78].

3.3. DÉFAILLANCE MYOCARDIQUE

3.3.1. DEFINITION

Des données actuelles suggèrent que contrairement aux données anciennes, les patients en état de choc septique après remplissage initial développent un état hyperdynamique associant un débit cardiaque élevé ou normal et des résistances vasculaires périphériques basses. Néanmoins, cette hyperkinésie masque une dysfonction myocardique quasi constante. Cette dysfonction, classiquement maximale au cours des 24 premières heures, est réversible avec retour à la normale de la fonction cardiaque habituellement en sept à dix jours lors de la guérison de l'état de choc septique.

La physiopathologie de cette dysfonction est complexe et implique des cytokines pro-inflammatoires, le NO par une action probablement indirecte et irréversible passant notamment par les anions superoxyde/peroxynitrite, une altération des récepteurs β -adrénergiques, des phénomènes apoptotiques et des anomalies calciques passant en particulier par une diminution de la sensibilité des fibres myocardiques.

3.3.2. MECANISMES DU DYSFONCTIONNEMENT MYOCARDIQUE AU COURS DU CHOC SEPTIQUE

3.3.2.1. Implication du NO au niveau myocardique

Au cours de l'état de choc septique, l'effet du NO sur le myocarde n'est pas parfaitement expliqué. Le NO aurait un effet plus marqué sur la relaxation que sur la contraction du myocarde [79]. Expérimentalement, la surproduction de NO par la iNOS pourrait contribuer à la diminution de la réponse contractile en réponse au lipopolysaccharide (LPS) [80]. Cependant, l'utilisation d'inhibiteurs de NOS n'a pas permis de restaurer la contractilité de cardiomyocytes ou de cœur isolé traité au LPS.

De plus, le NO, via la production de peroxynitrite, peut inhiber la respiration mitochondriale. Ces atteintes du métabolisme énergétique du cardiomyocyte pourraient rendre compte des altérations du rendement et de l'efficacité myocardique rencontrées au cours du sepsis. Une étude animale récente a d'ailleurs démontré l'effet bénéfique d'un inhibiteur de la formation du peroxynitrite sur la défaillance myocardique des rats endotoxémiques [81].

3.3.2.2. Homéostasie calcique intracellulaire et couplage excitation-contraction

La force de contraction ainsi que la relaxation du myocarde sont principalement déterminées par la variation de la concentration intramyocytaire de calcium. Au cours de la cardiomyopathie septique, deux principales modifications de l'homéostasie calcique peuvent survenir : des anomalies du courant calcique et une diminution de la sensibilité au calcium des myofilaments.

De nombreuses données suggèrent que l'afflux de calcium est diminué au cours du sepsis. La densité des canaux calciques de type L semble diminuée dans les cardiomyocytes d'animaux soumis à une injection d'endotoxine [82]. L'évolution de cette diminution de courant calcique est corrélée à l'intensité du dysfonctionnement myocardique *in vivo*. Le phénomène de *calcium induced-calcium release* est aussi affecté lors du sepsis. L'étude de Wu *et coll.* a montré également une diminution des canaux libérant le calcium du réticulum sarcoplasmique (canaux récepteurs à la ryanodine ou Ry-R), diminuant ainsi la quantité de calcium libéré dans le cytoplasme et donc la contraction [83]. De plus, il a aussi été mis en évidence des altérations des Ry-R ainsi que des perturbations du fonctionnement de la Ca^{2+} -ATPase du sarcolemme et de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, probablement par des modifications d'oxydo-réduction induites par le NO ou le peroxy-nitrite.

Outre les anomalies des courants calciques, des études ont rapporté que la sensibilité des myofilaments au calcium était diminuée [84]. Ce phénomène est un déterminant majeur de la dépression myocardique observée dans le choc septique.

3.3.2.3. Anomalies de la transduction du signal bêta-adrénergique

Différentes études ont montré une altération de la voie de signalisation bêta-adrénergique. Pendant que certaines études montrent une diminution du nombre de récepteurs β -adrénergiques de plus de 40 % chez les patients ayant un sepsis [85], notamment par internalisation et *down regulation* par excès de catécholamines circulantes, d'autres ont mis en évidence une modification des propriétés des β -récepteurs avec une augmentation de 60 % de l'expression des protéines inhibitrices Gi [86].

3.3.2.4. Anomalies structurales et apoptotiques

Ces anomalies conduisent à une altération de la fonction contractile par diminution du nombre de cardiomyocytes fonctionnels.

Diverses lésions (nécrose, œdèmes, dépôts de fibrine, agrégats de leucocytes) ont été observées lors de l'examen histologique du cœur d'animaux endotoxémiques, suggérant que la dysfonction contractile pourrait être directement liée à des lésions tissulaires. Dans une étude autopsique de 71 patients décédés de choc septique, Fernandes *et coll.* ont mis en évidence des lésions de myocardite interstitielle, d'œdème et plus rarement de nécrose myocytaire [87].

Les phénomènes de mort cellulaire programmée ou apoptose semblent aussi participer à la dysfonction myocardique observée au cours du sepsis. Les voies de signalisation font intervenir des protéases appelées caspases qui ont un rôle majeur dans l'initiation et le déroulement des phénomènes d'apoptose. Le TNF- α ou l'endotoxine peuvent induire l'apoptose de cardiomyocytes de rats en culture. L'inhibition pharmacologique de l'activation des caspases prévient l'apoptose et le dysfonctionnement myocardiques en cas de sepsis [88, 89].

3.3.2.5. Atteinte des fonctions systolique et diastolique

De nombreuses études animales ont démontré que la contractilité myocardique était altérée au cours du sepsis. L'association d'une diminution de la fraction d'éjection du ventricule gauche (VG) et d'une diminution des résistances vasculaires systémiques suggère fortement la présence d'une véritable dépression myocardique intrinsèque.

Jardin [90] et Parker [91] ont rapporté une diminution importante de la fonction systolique du VG à la phase initiale du choc septique. La fonction diastolique est aussi affectée au cours du sepsis. Ainsi, les altérations de la relaxation du VG sont courantes voire plus fréquentes que les altérations de la fonction systolique. De plus, chez certains patients, il existe un continuum entre une dysfonction diastolique isolée et une insuffisance ventriculaire à la fois systolique et diastolique. En effet, des études ont démontré que même en présence d'une pression artérielle normale, les patients avec sepsis avaient une altération de la fonction systolique du VG.

L'utilisation d'indices indépendants des conditions de charge a toutefois permis de démontrer l'existence d'une altération des propriétés contractiles ventriculaires au sein de modèles expérimentaux de sepsis mais aussi au cours d'études cliniques.

3.4. ALTERATIONS METABOLIQUES ET DYSFONCTION D'ORGANES

Les altérations organiques observées au cours du choc septique sont liées au processus inflammatoire et à la dysfonction cardiovasculaire qui en découle.

L'anomalie du transport en oxygène au niveau microvasculaire indique une dysfonction des mécanismes régulateurs et suggère que l'environnement cellulaire est très altéré. La sévérité de la dysfonction microvasculaire semble être l'ultime déterminant de la dysfonction d'organes.

En plus de l'altération de la perfusion microcirculatoire, l'oedème interstitiel peut contribuer au développement d'une hypoxie tissulaire par le biais de troubles de la diffusion de l'oxygène (augmentation des distances intercapillaires). A ce stade, pour 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 [92].

Le métabolisme glucidique est le plus souvent modifié par l'administration de LPS. Une phase initiale d'hyperglycémie est associée à une augmentation de la néoglucogenèse hépatique. Elle est suivie d'une hypoglycémie marquée, associée à une diminution des fonctions hépatiques, une sécrétion accrue d'insuline et une augmentation de l'utilisation périphérique de glucose [93]. Un catabolisme protéique augmenté peut jouer un rôle non négligeable dans l'apparition des défaillances multi organes [94].

Un des organes ainsi touchés est le poumon, dont l'atteinte entraîne un syndrome de détresse respiratoire, complication majeure du sepsis. D'autres organes vitaux sont touchés par la réduction de la perfusion sanguine induite par l'hypotension et les redistributions volémiques : altération du métabolisme hépatique, du flux sanguin rénal et de l'irrigation du tractus gastrointestinal.

4. STRATEGIES THERAPEUTIQUES DU CHOC SEPTIQUE

Malgré l'amélioration de nos connaissances sur la physiopathologie du sepsis au cours de ces deux dernières décennies, ces états infectieux graves représentent aujourd'hui encore une source importante de morbidité et de mortalité dans les unités de soins intensifs.

Le 2 octobre 2002 était publiée, lors du congrès de *l'European Society of Intensive Care Medicine* (ESICM), la « déclaration de Barcelone ». Faite sous l'égide de l'ESICM, de la *Society of Critical Care Medicine* (SCCM) et de *l'International Sepsis Forum* (ISF), elle rappelle le mauvais pronostic des états septiques graves et conclut que la prise en charge des patients pourrait être améliorée. L'objectif de cette déclaration est de réduire de 25 % en cinq ans la mortalité du sepsis sévère et du choc septique. Elle est le point de départ de la rédaction de recommandations publiées en 2004 [95], réactualisées en 2008, sous le nom de « *Surviving Sepsis Campaign* » et signe une volonté internationale de mettre en oeuvre les mesures nécessaires à l'amélioration du pronostic des patients atteints d'état septique grave [17].

L'état de choc septique est une urgence qui impose deux démarches simultanées : une démarche thérapeutique, initialement symptomatique pour assurer la survie immédiate, et une démarche étiologique pour adapter le traitement à la cause et définir un pronostic.

La prise en charge initiale globale, étiologique et symptomatique, repose en particulier sur l'utilisation précoce d'une antibiothérapie probabiliste appropriée associée à une réanimation volémique initiale agressive, cette dernière reposant principalement sur le remplissage vasculaire (correction de l'hypovolémie) et l'utilisation de catécholamines (correction de l'hypotension artérielle persistante).

En outre, en cas d'échec de la réanimation initiale, d'autres approches plus spécifiques ont également permis d'améliorer significativement le pronostic du choc septique, notamment par l'utilisation d'agents pharmacologiques tels que les corticoïdes à faibles doses chez les patients présentant une insuffisance surrénalienne relative (réduction absolue de 10 % de la mortalité à 28 jours) [13] et la drotrécogine alfa activée (XIGRIS®), ou protéine C activée recombinante humaine, chez les patients ayant au moins deux défaillances d'organe (réduction absolue de 6,1 % de la mortalité à 28 jours) [96].

Le traitement du choc septique repose sur les recommandations internationales parues début 2008 [17]. Chacune de ces recommandations a fait l'objet d'un large consensus d'experts internationaux de la question ; les plus fortes sont basées sur des preuves convaincantes (evidence based medicine).

Pour des raisons de clarté, les propositions thérapeutiques seront regroupées en trois volets :

- ✓ la réanimation initiale, le diagnostic de l'infection et son traitement ;
- ✓ le traitement hémodynamique de la défaillance cardiovasculaire ;
- ✓ les autres thérapeutiques du choc septique.

4.1. REANIMATION INITIALE, DIAGNOSTIC ET TRAITEMENT DE L'INFECTION

La démarche diagnostique et thérapeutique initiale devant un syndrome septique est représentée en figure 6.

4.1.1. REANIMATION INITIALE AU COURS DES 6 PREMIERES HEURES

La réanimation doit être débutée immédiatement chez tout patient ayant une hypotension artérielle ou une élévation de la lactatémie supérieure à 4 mmol/l, et cela avant même l'admission du patient en secteur de réanimation.

Les objectifs à atteindre sont :

- ✓ une pression veineuse centrale (PVC) comprise entre 8 et 12 mmHg ;
- ✓ une pression artérielle moyenne (PAM) supérieure ou égale à 65 mmHg ;
- ✓ une diurèse à 0,5 ml/kg/heure ;
- ✓ une saturation en O₂ du sang veineux (SvO₂ mesurée dans l'oreillette droite) supérieure à 70 % ou supérieure à 65 % en veineux mêlé.

Les moyens nécessaires pour obtenir ces paramètres sont traités dans le chapitre « traitement hémodynamique de la défaillance cardiovasculaire » du choc septique.

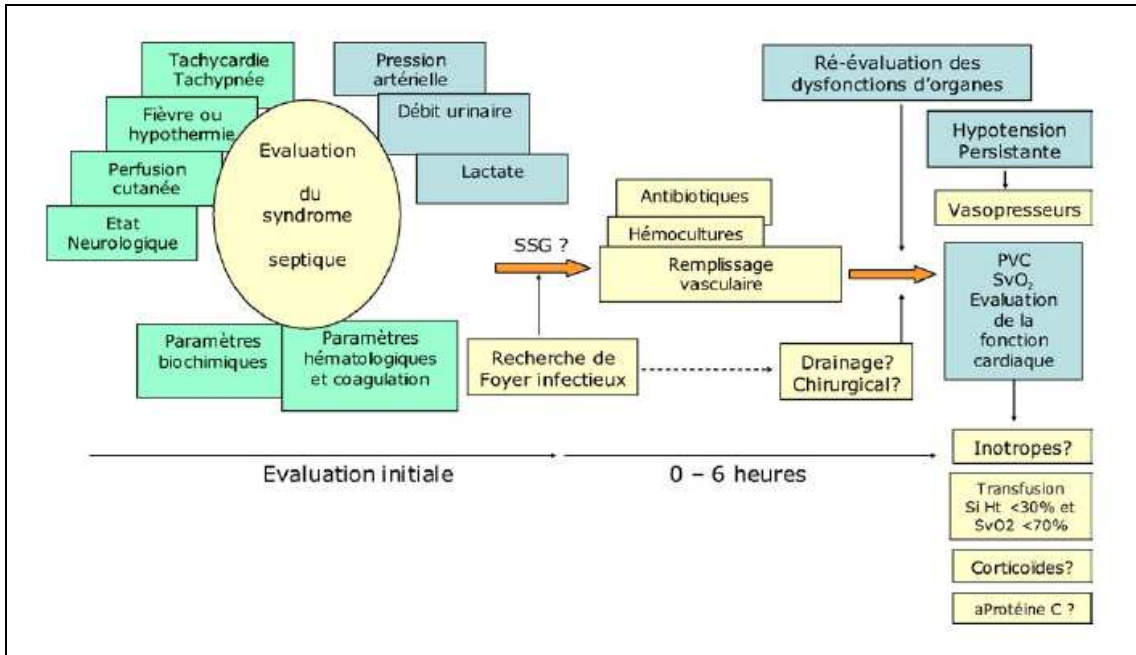


Figure 6 : Démarche diagnostique et thérapeutique initiale devant un syndrome septique [16]

4.1.2. DIAGNOSTIC DE L'INFECTION

Tous les prélèvements à visée microbiologique doivent être pratiqués avant de débiter l'antibiothérapie, et ce sans en retarder l'administration.

Il faut effectuer 2 hémocultures ou plus, dont au moins une par voie percutanée et au moins une par chacune des voies d'accès vasculaires veineuses ou artérielles et faire les prélèvements spécifiques selon la clinique ; dans la mesure du possible, les examens d'imagerie jugés nécessaires au diagnostic du foyer infectieux responsable du choc septique sont réalisés rapidement.

4.1.3. ANTIBIOTHERAPIE

L'antibiothérapie est débutée le plus tôt possible, c'est-à-dire dans la première heure du diagnostic de sepsis sévère ou de choc septique.

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, et de la pharmacodynamie des molécules utilisées et des risques d'intolérance prévisibles.

Les doses prescrites doivent être maximales d'emblée [97], parentérales, souvent avec une dose de charge initiale, en particulier pour les bêta-lactamines.

En l'absence d'orientation étiologique initiale devant un état septique grave, il sera débuté un traitement empirique par une association définie localement (le plus souvent une bêta-lactamine à large spectre active sur les staphylocoques, les streptocoques et les entérobactéries dans les infections communautaires, ou une céphalosporine active sur le pyocyanique dans les infections nosocomiales, en association avec un aminoside).

Ce traitement initial large synergique bactéricide devra être réévalué quotidiennement afin de l'adapter aux germes isolés, aux données éventuelles de pharmacocinétique, d'optimiser son efficacité et limiter sa potentielle toxicité et son coût.

La durée du traitement est habituellement comprise entre 7 et 10 jours, sauf cas particuliers (foyer infectieux initial avec durée de traitement plus longue, patients immunodéprimés,...).

L'antibiothérapie doit être interrompue si une cause non infectieuse du choc est trouvée.

4.2. TRAITEMENT HEMODYNAMIQUE DE LA DEFAILLANCE CARDIO-VASCULAIRE

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...

4.2.1. SOLUTES DE REMPLISSAGE

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. Il 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 aux niveaux pharmacocinétique et pharmacodynamique. Leurs effets sont basés sur le pouvoir osmotique pour les premiers et le pouvoir oncotique pour les seconds. L'utilisation préférentielle de l'un ou l'autre de ces produits est toujours l'objet d'une controverse, le facteur de comparaison étant leur implication dans l'évolution de l'insuffisance circulatoire aiguë [98].

Le remplissage doit être poursuivi jusqu'à l'obtention d'une PVC ≥ 8 mmHg (≥ 12 mmHg si ventilation mécanique) et d'une PAM ≥ 65 mmHg. Il doit être rapide (notion de *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.

Les cristalloïdes et les colloïdes peuvent être utilisés indifféremment. Ces derniers agissent plus rapidement et en moins grande quantité, cependant leur coût important leur fait souvent préférer les cristalloïdes.

Après l'optimisation de la volémie, la persistance d'une hypotension nécessite l'utilisation d'agents vasopresseurs.

4.2.2. AGENTS VASOPRESSEURS

4.2.2.1. Les catécholamines

Toutes les catécholamines vasopressives augmentent la pression artérielle de manière dose dépendante. L'administration de catécholamine 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 [99]. 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.

(a) 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 de deux acides aminés essentiels : la phénylalanine et la tyrosine.

La phénylalanine est hydroxylée en tyrosine par la phénylalanine hydroxylase, étape non indispensable comme le montre l'absence de troubles du métabolisme des catécholamines dans la phénylcétonurie (déficit en phénylalanine hydroxylase), à la condition d'apports normaux en tyrosine (provenant de l'alimentation).

La tyrosine est hydroxylée par la tyrosine hydroxylase en dihydroxyphénylalanine (DOPA), précurseur direct des catécholamines. Cette étape de la synthèse des catécholamines est dite limitante, la tyrosine hydroxylase étant soumise à un rétrocontrôle négatif.

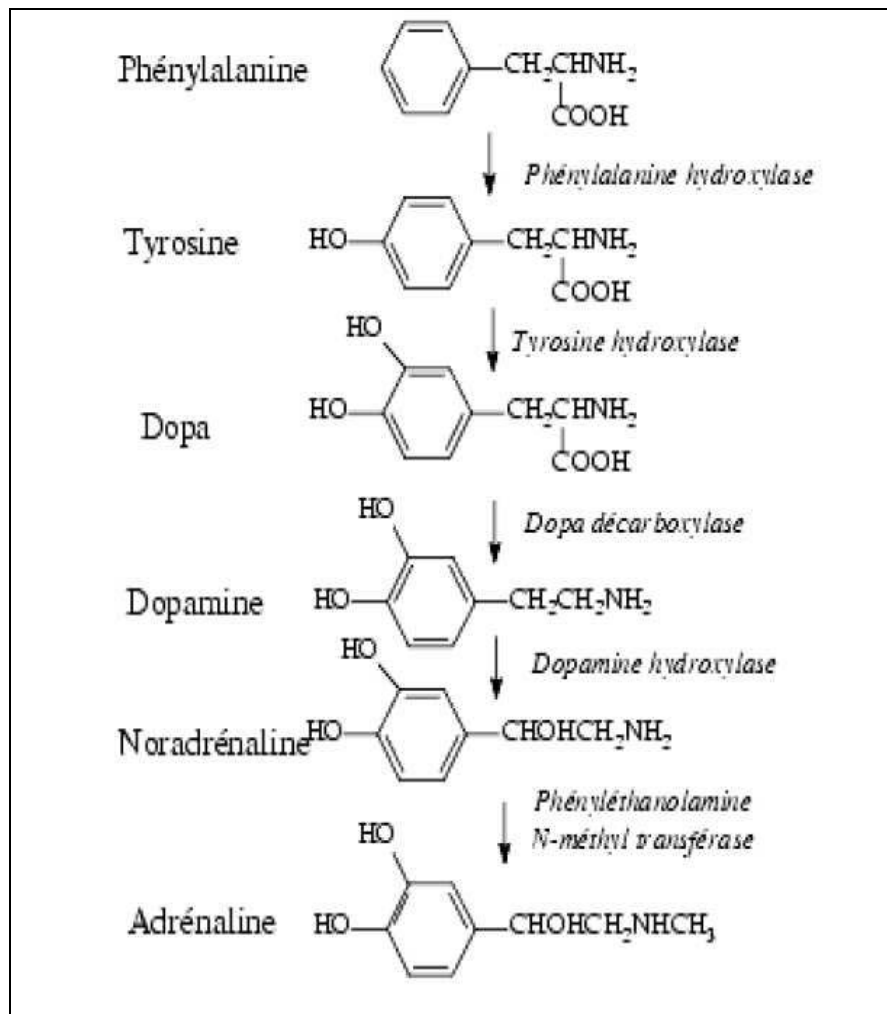


Figure 7 : Biosynthèse des catécholamines endogènes

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

Les catécholamines circulantes, qu'elles soient endogènes ou exogènes, doivent diffuser à travers l'endothélium pour se fixer à leurs récepteurs. Durant leur distribution dans l'organisme, elles peuvent être métabolisées par un captage tissulaire ubiquitaire ou un captage par les extrémités neuronales sympathiques. Le métabolisme initial des catécholamines est assuré de façon prédominante par la mono-amine oxydase (MAO) et la catéchol-O-méthyltransférase (COMT) [100].

D'une manière générale, les catécholamines ont une demi-vie très courte, ce qui impose en pratique leur perfusion continue. Il n'y a pas de modification notable de leur pharmacocinétique en cas d'insuffisance rénale ou hépatique, compte-tenu de leur métabolisme ubiquitaire. En cas d'épuration extra-rénale séquentielle ou continue, l'extraction des catécholamines est inférieure à 0.2% de la dose administrée dans le même temps [101]. On ne dispose pas de données pharmacocinétiques spécifiques chez le patient en état de choc.

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), puis d'un accroissement linéaire de l'effet en fonction du logarithme des concentrations [102]. La posologie et la concentration plasmatique sont liées par une relation linéaire [103, 104]. L'effet maximal est habituellement atteint pour des doses comprises entre 100 à 1000 fois la dose seuil, ce qui dépasse largement la gamme posologique usuelle en principe clinique. Ce type de courbe dose-réponse explique que pour des doses seuil ne différant que de 1 µg/kg/min d'un patient à l'autre, un effet pharmacodynamique identique sur la courbe dose-réponse nécessitera des posologies différant de 10 µg/kg/min. La conclusion simple est qu'il ne faut pas hésiter transitoirement à augmenter les posologies de catécholamines (50 à 100 mg/h) si le patient est vasoplégique et hyperkinétique.

(b) Classification des récepteurs adrénérgiques

Les récepteurs adrénérgiques 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) [105-107].

Les récepteurs α 1-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.

(RCPGq \rightarrow activation PLC \rightarrow PIP2 \rightarrow DAG + IP3 \rightarrow \uparrow Ca²⁺_{ic} \rightarrow vasoconstriction)

Les récepteurs α 2-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.

(RCPGi \rightarrow inhibition AC \rightarrow \downarrow AMPc \rightarrow vasoconstriction)

Les récepteurs β 1-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 β 2-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 *(RCPGs \rightarrow activation AC \rightarrow \uparrow AMPc \rightarrow vasodilatation).*

Les récepteurs dopaminergiques DA1 sont localisés principalement sur la fibre musculaire lisse des vaisseaux rénaux et splanchniques et leur stimulation entraîne une vasodilatation *(RCPGs \rightarrow activation AC \rightarrow \uparrow AMPc \rightarrow vasodilatation).*

Les récepteurs dopaminergiques DA2 sont pré-synaptiques et leur stimulation, comme celle des récepteurs α 2, entraîne une diminution de la libération synaptique de noradrénaline.

(c) Mode d'action 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 administrée de l'agent.

⚡ L'adrénaline

L'adrénaline est une hormone endogène synthétisée à partir de la noradrénaline ; elle est produite et sécrétée principalement par la surrénale en réponse au stress.

Lorsqu'elle est administrée en perfusion continue chez l'homme adulte sain, elle entraîne à doses faibles (0,02 à 0,2 $\mu\text{g/kg/min}$) une stimulation préférentielle des β -récepteurs, entraînant une diminution globale des résistances vasculaires, une augmentation de la fréquence cardiaque et de la contractilité. Il en résulte un élargissement de la pression artérielle avec augmentation modérée de la systolique et diminution de la diastolique, une diminution des résistances vasculaires pulmonaires, une augmentation du volume d'éjection systolique, du travail systolique ventriculaire gauche et du débit cardiaque.

A doses plus élevées, les résistances vasculaires systémiques vont augmenter, expliquant l'accroissement de la pression artérielle avec des effets variables sur les débits cardiaques, fonction de l'importance de l'accroissement de la postcharge.

L'adrénaline réduit le débit sanguin rénal et cutané, y compris à faibles doses. En revanche, les débits sanguins splanchnique et musculaire sont augmentés, au moins à faibles doses.

⚡ La noradrénaline

La noradrénaline est le médiateur chimique libéré par les neurones adrénergiques post-ganglionnaires ; c'est aussi le précurseur de la biosynthèse de l'adrénaline dont il diffère seulement par un groupe méthyle sur la fonction amine terminale. A la différence de l'adrénaline, la noradrénaline est quasiment dépourvue d'effet β_2 agoniste.

Chez le volontaire, à des posologies proches de 0,1 $\mu\text{g/kg/min}$, la noradrénaline augmente la pression artérielle systolique et diastolique de façon importante, essentiellement par l'intermédiaire d'un accroissement des résistances vasculaires systémiques ; le débit cardiaque peut s'accroître modérément, rester stable ou décroître. Il n'existe en général pas de tachycardie importante, en raison de la mise en jeu du baroréflexe du système vagal consécutive à l'augmentation de pression artérielle.

La noradrénaline comme l'adrénaline est un vasoconstricteur de la circulation splanchnique, rénale et pulmonaire.

‡ 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 ; à 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.

Les effets pharmacologiques de la dopamine sont complexes : traditionnellement, on lui reconnaît un effet dopaminergique à très faible doses, puis un effet β -stimulant à dose plus importante et enfin, un effet α -stimulant. En fait, l'activation d'un type de récepteur n'exclut probablement pas la persistance d'une réponse d'un autre récepteur activé pour des doses plus faibles [102]; de plus, il a été montré que les effets α et β sont largement liés à la libération de noradrénaline par les synapses effectrices.

A des doses de 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ chez le sujet normal, on observe une augmentation du débit sanguin rénal, de la diurèse et de la natriurèse. A des posologies variant entre 2 et 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$, 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 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$.

‡ La dobutamine

Contrairement aux catécholamines précédentes, la dobutamine est formée par la substitution d'une chaîne complexe sur la fonction amine du noyau catécholamine. La dobutamine est un mélange racémique de formes d'isomères dextrogyre (D) et lévogyre (L). La forme L est un agoniste α_1 alors que la forme D est essentiellement un agoniste β_1 avec un effet antagoniste α_1 . A doses usuelles, la dobutamine se comporte comme un inotrope avec un accroissement concomitant modeste de la fréquence cardiaque. La dobutamine diminue modestement ou reste sans effet sur les résistances vasculaires systémiques et pulmonaires.

4.2.2.2. La vasopressine

La vasopressine ne doit pas être administrée en première intention dans le choc septique. La vasopressine utilisée à la posologie de 0,03 unités/min peut être secondairement ajoutée à la noradrénaline avec l'espoir d'un effet supérieur à la noradrénaline seule.

Bien qu'efficace pour sevrer les vasopresseurs et améliorer la fonction rénale, le traitement par vasopressine est potentiellement dangereux en raison de la vasoconstriction intense possible. L'étude VASST [108], dans laquelle la vasopressine a été utilisée à doses substitutives (< 0.04 U/min) ne retrouve pas d'amélioration globale de la mortalité.

Par ailleurs, il est intéressant de signaler que la vasopressine est un inhibiteur des canaux potassiques ATP-dépendants [66].

Les patients de l'étude Rivers [109], qui bénéficiaient de la tactique thérapeutique dite optimisée, nécessitaient après 24 heures de traitement moins de vasopresseurs démontrant ainsi qu'un traitement précoce de la défaillance vasculaire accompagné de mesures de bon sens (antibiothérapie, monitoring), et ce probablement en diminuant les conséquences de l'hypoperfusion tissulaire, permet de diminuer l'impact du sepsis sur la défaillance vasculaire.

4.2.3. AGENTS INOTROPES

Un traitement inotrope peut être envisagé en présence d'une dysfonction systolique avérée et une situation clinique non stabilisée. Il ne s'envisagera qu'après optimisation du remplissage vasculaire et après utilisation de vasopresseurs.

La dobutamine est souvent utilisée en cas d'atteinte systolique sévère dans l'état de choc septique. Celle-ci doit être utilisée lors de l'élévation des pressions de remplissage cardiaque ou en cas de bas débit cardiaque. Son action peut être favorable bien qu'elle puisse avoir un effet vasodilatateur et qu'elle ne semble pas augmenter le débit dans le choc installé.

L'adrénaline peut également être utilisée.

Si la dobutamine et l'adrénaline restent des traitements classiques, de nouvelles molécules ont été proposées telles que le levosimendan [110].

4.3. AUTRES TRAITEMENTS DU CHOC SEPTIQUE

4.3.1. LES CORTICOÏDES

L'emploi de l'hydrocortisone est conseillé si, lors du traitement initial du choc septique, la réponse au remplissage vasculaire et aux amines vasopressives est faible. L'emploi d'hémisuccinate d'hydrocortisone est préférable à celui de la dexaméthasone.

Plusieurs études cliniques ont mis en évidence que l'administration intraveineuse de petites doses d'hydrocortisone par voie intraveineuse à des patients en état de choc permet une amélioration de leur état hémodynamique, avec une augmentation des résistances artérielles systémiques et une restauration de la sensibilité artérielle aux catécholamines [111].

L'utilisation d'un traitement par hydrocortisone permet un sevrage plus rapide des catécholamines chez les patients en choc septique sévère traités avec des doses élevées de catécholamines, en réduisant entre autres la production d'interleukine-6 [13, 112]. De plus, les corticoïdes en diminuant l'expression de NF-kB diminuent aussi la production de NO via la iNOS. Les mécanismes détaillés d'action des corticoïdes passent par des effets génomiques et non génomiques après activation de leur récepteur nucléaire [113].

Annane *et coll.* [13] ont montré un avantage en terme de survie d'un traitement par hydrocortisone chez les patients en choc septique restés hypotendus après un remplissage vasculaire et l'administration de vasopresseurs, et présentant une insuffisance surrénalienne (déterminée par une réponse inappropriée à la stimulation par l'adrénocorticotrophine ou ACTH).

Cependant, Sprung *et coll.* [72] n'ont constaté ni amélioration de la survie, ni inversion de l'état de choc suite à l'administration d'hydrocortisone chez des patients en choc septique, que ce soit dans la population globale de l'étude ou dans la population de patients non répondeurs au test à l'ACTH, bien que l'administration d'hydrocortisone ait été corrélée à une inversion du choc plus précoce chez les patients pour lesquels il y a eu résolution du choc.

Actuellement, la *Surviving Sepsis Campaign* [17] et l'*American College of Critical Care Medicine International Consensus* [74] recommandent l'administration de corticoïdes seulement dans le choc septique après échec du remplissage vasculaire et du traitement vasopresseur à restaurer la pression artérielle (grade 2C).

4.3.2. LA DROTECOGINE ALFA ACTIVEE (XIGRIS®)

La drotrécogine alfa (activée), analogue recombinant de la protéine C activée humaine (rhPCa), semble restaurer la réponse vasopressive aux catécholamines au moins expérimentalement par un effet anti-inflammatoire [114] et anti-radicalaire. En pratique clinique, les données issues de l'étude PROWESS [96] montrent dans le groupe traité une régression plus rapide de la défaillance cardiovasculaire. De façon rétrospective, Monnet *et coll.* [115] ont montré que les patients traités par rhPCa recevaient après 24h de traitement moins de catécholamines.

L'utilisation de la rhPCA peut être envisagée pour des patients ayant une défaillance multiviscérale avec un risque de décès très élevé (score de gravité APACHE II \geq 25) et en l'absence de contre-indications de ce produit.

Son utilisation sera très discutée en situation postopératoire (bénéfice non formellement établi). Il est strictement interdit d'administrer la rhPCA chez des patients ayant un risque faible de décès (APACHE II < 20) ou ne présentant qu'une défaillance viscérale. À l'heure où s'écrit ce chapitre, une deuxième étude internationale multicentrique est en cours pour mieux déterminer le rapport bénéfice/risque de l'utilisation de cette molécule.

4.4. TRAITEMENTS SPECIFIQUES VISANT À CONTROLER LA REPONSE INFLAMMATOIRE

Au cours des 15 dernières années, de nombreux essais thérapeutiques chez l'animal et chez l'homme ont eu pour but de contrôler la cascade inflammatoire du choc septique et du sepsis sévère. L'immunothérapie anti-endotoxine (HA-1A, anticorps anti-endotoxine E5), anti-cytokines pro-inflammatoires (anti-TNF, anti-IL1, etc.) a été un échec total et a représenté une grande désillusion [116-118]. Ces essais ont toutefois contribué à mieux connaître les aspects physiopathologiques du choc septique et le rôle certain, mais encore peu utilisable sous l'angle thérapeutique, de la prédisposition génétique individuelle.

LE CHOC HEMORRAGIQUE

1. DEFINITION

Le choc hémorragique est la conséquence d'une insuffisance circulatoire aiguë due à une diminution du volume sanguin circulant induisant une baisse du retour veineux, une instabilité hémodynamique et à terme une hypotension. Le choc hémorragique se caractérise ainsi par une baisse du transport en oxygène et une baisse de la perfusion tissulaire responsables d'une hypoxie tissulaire, voire d'une ischémie tissulaire, et pouvant contribuer au développement de défaillances viscérales.

2. EPIDEMIOLOGIE

Le choc hémorragique est une pathologie grave, au cours de laquelle le pronostic vital est rapidement mis en jeu et dont la précocité de la prise en charge est un facteur pronostique fondamental. Ainsi, dans une série collectée par Heckbert *et coll.* de 208 patients en état de choc hémorragique à l'arrivée dans un trauma centre nord-américain, 31% sont décédés après deux heures, 12% entre deux et 24 heures et 11% après les 24 premières heures. Seuls 46% de ces patients ont survécu [119]. Stewart *et coll.* ont analysé une série de 753 décès dans un trauma centre nord-américain, 52% des décès sont survenus dans les 12 premières heures, 74% dans les 24 premières heures et 86% dans les sept jours [120].

3. ETIOLOGIE

Les saignements d'origine digestive sont la première cause de choc hémorragique. Ils peuvent se présenter sous la forme d'une hémorragie digestive haute (hématémèse) ou basse (rectorragie ou méléna).

Une hématémèse est le signe d'une hémorragie haute, en amont de l'angle duodénojejunal. Elle sera fréquemment suivie par un méléna. Les causes les plus fréquentes des hémorragies digestives hautes sont les ulcères gastroduodénaux, la rupture de varices œsophagiennes due à

l'hypertension portale d'origine cirrhotique et les érosions gastriques aiguës, en général médicamenteuses. Un méléna est généralement le signe d'une hémorragie située en amont de l'angle colique droit. Une rectorragie est le signe d'une hémorragie basse, mais peut également apparaître en cas d'hémorragie haute très abondante. Les causes les plus fréquentes des hémorragies digestives basses sont les hémorroïdes et les tumeurs rectocoliques.

Les saignements d'origine traumatique représentent la deuxième cause de choc hémorragique. Les plaies externes comme les plaies du scalp peuvent induire des saignements importants et ne doivent pas être sous-estimés. Les traumatismes thoraciques peuvent induire des plaies du cœur, des poumons ou des gros vaisseaux et induire des saignements massifs. Les traumatismes abdominaux peuvent induire des lésions des organes pleins, comme la rate ou le foie ou des lésions des gros vaisseaux. Les fractures du pelvis peuvent conduire à des hémorragies massives et difficilement contrôlables. Un hématome rétropéritonéal doit être suspecté devant l'association d'une fracture du pelvis associée à une instabilité hémodynamique [121].

Les autres causes de choc hémorragique sont les saignements d'origine gynécologique, les ruptures d'anévrisme, les hémoptysies massives, les coagulopathies et les surdosages en anticoagulants.

4. PHYSIOPATHOLOGIE DU CHOC HEMORRAGIQUE

Le choc hémorragique se caractérise par une diminution du volume sanguin circulant induisant une baisse du retour veineux. La réponse adaptative initiale de l'organisme face au choc hémorragique consiste en une stimulation sympathique afin de redistribuer le volume sanguin restant vers les organes vitaux que sont le cerveau et le cœur. Mais cette réponse provoque une hypoperfusion des territoires vasculaires splanchniques, rénaux et musculocutanés avec une diminution des apports énergétiques vers ces territoires. Il existe alors un risque de déséquilibre entre les apports et les besoins énergétiques qui est susceptible d'induire des altérations des fonctions cellulaires et, par voie de conséquence, des altérations des fonctions d'organes.

Lors de la réanimation du choc, ces lésions ischémiques peuvent être aggravées par la production de médiateurs toxiques lors de la reperfusion des territoires ischémiques, en particulier d'espèces radicalaires de l'oxygène, et par le développement d'une réaction inflammatoire systémique secondaire aux lésions ischémiques et aux lésions tissulaires engendrées par un traumatisme. La réponse inflammatoire entraîne une hyperactivité vasculaire qui favorise à son tour la dysfonction d'organes.

Ainsi, la physiopathologie du choc hémorragique résulte des interactions complexes existant entre les réponses neuro-humorales induites par la baisse brutale du volume sanguin circulant et la réponse inflammatoire déclenchée par les lésions traumatiques et les lésions ischémiques (figure 8).

4.1. REPONSE PHYSIOLOGIQUE A LA DIMINUTION DU VOLUME SANGUIN

Le volume sanguin circulant se distribue dans les différents secteurs vasculaires de l'organisme : le réseau veineux, la microcirculation et le réseau artériel ; 70 % du volume circulant est contenu dans le système veineux dont un tiers est situé au niveau de la circulation splanchnique [122].

Face à une baisse aiguë de la volémie liée à une perte sanguine, l'organisme met en place des mécanismes compensateurs neurohumoraux pour limiter les effets de la baisse du retour veineux sur la pression artérielle et maintenir un débit sanguin au niveau des organes vitaux aux dépens d'une hypoperfusion des territoires splanchniques et musculocutanés.

Le premier mécanisme mis en jeu dans cette adaptation cardiovasculaire à l'hypovolémie est une activation du système sympathique, dont l'intensité dépend de l'importance de la perte sanguine. La réduction du retour veineux entraîne la mise en jeu des baroréflexes cardiopulmonaires et artériels. Les barorécepteurs cardiopulmonaires ainsi que les barorécepteurs aortiques et carotidiens à haute pression, respectivement sensibles au *shear stress* des parois cardiaques et à la déformation des parois vasculaires, modulent l'activité des neurones afférents vers les centres bulbaires du tractus solitaire. À l'état basal, les afférences sont activées et maintiennent sur les noyaux du tractus solitaire une action inhibitrice sympathique et activatrice parasympathique.

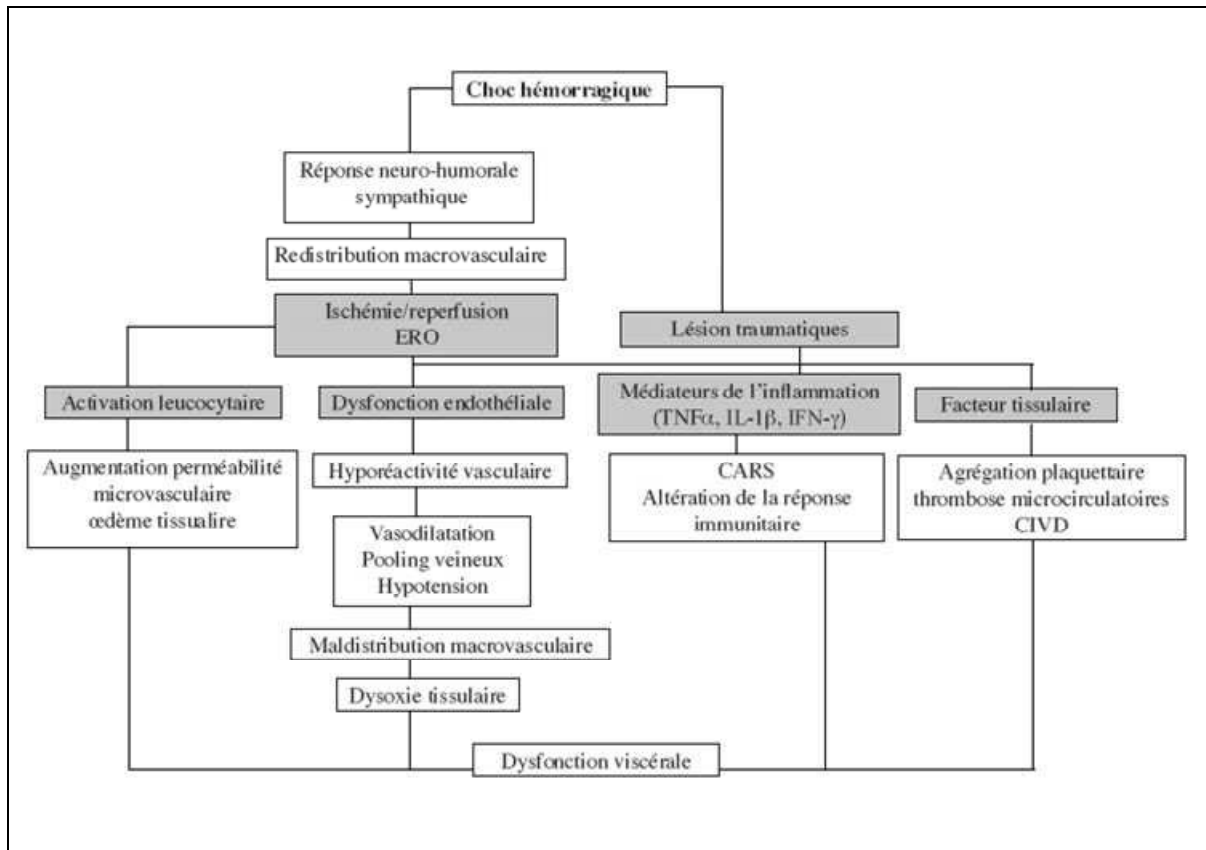


Figure 8 : Représentation schématique des processus physiopathologiques impliqués dans le choc hémorragique (d'après J. Duranteau, MAPAR 2005)

Ainsi, lors de l'inactivation de ces afférences baroréflexes liée à une baisse du *shear stress* intracardiaque ou de la pression intracarotidienne, une levée d'inhibition sympathique se produit au niveau des noyaux du tractus solitaire avec une augmentation de l'inotropisme cardiaque, une vasoconstriction artériolaire et veineuse, ainsi qu'une activation du système rénine-angiotensine-aldostérone. L'inactivation du parasympathique participe à l'augmentation de la fréquence cardiaque.

Le retour veineux s'effectue à partir des veines périphériques vers les cavités droites selon le gradient de pression qui règne entre ces deux compartiments. La pression veineuse périphérique est la pression systémique moyenne (PSM) qui correspond à la pression qui règne dans l'ensemble du réseau vasculaire lorsque le débit est nul. Cette pression motrice dépend de la volémie (contenu veineux) et de la compliance veineuse dont la composante principale est le niveau de vasoconstriction veineuse. On sépare le volume intravasculaire en volume non contraint, qui représente le volume contenu dans les veines qui n'exerce pas de mise en tension des parois, et le volume contraint, qui est le volume supplémentaire capable d'initier une tension de paroi et donc de générer une PSM. La vasoconstriction veineuse sympathique augmente la part de volume contraint au dépend du volume non contraint et augmente par ce biais la PSM. La majorité du volume non contraint se situe dans le réseau veineux et lui confère ainsi des propriétés de réserve volémique mobilisable par veinocostriction.

Finalement, l'augmentation du retour veineux, la majoration de l'inotropisme et de la fréquence cardiaque permettent de maintenir le débit cardiaque lors d'une hypovolémie induite par une spoliation sanguine. La vasoconstriction artérielle associée au maintien du débit cardiaque stabilise la pression artérielle.

La vasoconstriction induite par la stimulation sympathique s'effectue principalement dans les territoires splanchniques et musculocutanés puis rénaux alors que les circulations cérébrales et coronaires, dites nobles, sont épargnées jusqu'à un stade tardif. La vasoconstriction sympathique est également à l'origine d'un transfert de liquide depuis le secteur interstitiel vers le secteur intravasculaire. Cet effet est principalement en rapport avec une baisse de la pression hydrostatique capillaire par vasoconstriction artériolaire sympathique en amont de la circulation capillaire. Si ce phénomène est bénéfique sur le plan de la volémie, il est différé sur le plan chronologique et ne participe donc à l'augmentation du retour veineux qu'après un

certain délai estimé à une heure. Ce retard de compensation du milieu interstitiel explique l'absence d'hémodilution à la phase initiale du choc hémorragique non réanimé.

4.2. ADAPTATION MICROCIRCULATOIRE

Au niveau microcirculatoire, malgré des niveaux de pression artérielle bas, au cours de la phase initiale du choc hémorragique, la densité de capillaires perfusés ainsi que la vitesse des globules rouges dans le réseau microvasculaire apparaissent relativement bien préservées [123]. Cependant, si cette phase initiale n'est pas rapidement contrôlée une dégradation microcirculatoire sera observée avec ses conséquences en terme d'oxygénation tissulaire.

4.3. ADAPTATION DU METABOLISME CELLULAIRE, CONSEQUENCES DE L'ISCHEMIE TISSULAIRE

L'état de choc hémorragique aboutit à une baisse du transport en oxygène synonyme de diminution des apports énergétiques aux cellules. L'organisme priorise la distribution du flux sanguin vers les organes nobles que sont le cerveau et le cœur au dépend des circulations musculocutanées et splanchniques. Initialement, grâce à l'augmentation de l'extraction en oxygène par les tissus, les organes « sacrifiés » parviennent à maintenir une consommation d'oxygène constante. Toutefois, au-delà d'un seuil critique, l'extraction en oxygène ne peut être augmentée et la consommation en oxygène baisse proportionnellement au transport en oxygène et place l'organisme dans un contexte de dépendance à la délivrance en oxygène. L'apport en oxygène n'autorise plus alors le maintien du métabolisme aérobie. Les cellules font appel au métabolisme anaérobie afin de maintenir une production d'ATP compatible avec une survie cellulaire. Sans intervention thérapeutique, la majoration de la spoliation sanguine se traduira par une chute du stock d'ATP intracellulaire puis par un dysfonctionnement des pompes Na^+/K^+ , une accumulation de sodium et de calcium intracellulaires, une sortie de K^+ avec la constitution de lésions cellulaires irréversibles qui entraînent la mort cellulaire par apoptose ou par nécrose.

La traduction métabolique de la baisse d'apport en oxygène et de l'anaérobiose est la formation de lactate et de protons. Le taux de lactate à la prise en charge en milieu hospitalier des patients en état de choc hémorragique traumatique est d'ailleurs corrélé à la sévérité du choc et à la mortalité des patients [124]. La production de protons est en grande partie

tamponnée par les bicarbonates de l'organisme, entraînant ainsi une consommation et une diminution du taux de bicarbonate sanguin. Le *base excess* est le reflet de cette consommation en bicarbonate et son importance est également corrélée au pronostic des patients en état de choc hémorragique [125, 126]. Les valeurs de ces paramètres lors de la prise en charge sont des indicateurs de l'inadéquation de la perfusion tissulaire par rapport à la consommation en oxygène et donc de la dette en oxygène induite par le choc hémorragique. Le taux de lactate et le *base excess* sont intimement liés dans la mesure où le premier induit une acidose qui retentit sur le second. L'évolution de ces marqueurs métaboliques au cours de la réanimation du choc hémorragique est un bon élément pour juger de l'efficacité de la prise en charge thérapeutique et de l'évolutivité de l'hémorragie [125].

4.4. CONSEQUENCE DE L'ETAT DE CHOC HEMORRAGIQUE PROLONGE

La pérennisation de l'état de choc hémorragique peut entraîner une dysfonction d'organe dont le stade ultime est la défaillance multiviscérale. En effet, si les mécanismes cardiovasculaires adaptatifs sont efficaces à la phase aiguë du choc hémorragique et maintiennent une perfusion et des apports en oxygène adaptés aux besoins, ces derniers peuvent devenir insuffisants lors de la prolongation du choc avec l'apparition d'une souffrance tissulaire secondaire à l'inflammation systémique non contrôlée et aux phénomènes d'ischémie-reperfusion tissulaire.

L'hémorragie associée aux lésions tissulaires chez le patient polytraumatisé entraîne un SIRS [127] qui se traduit par une synthèse accrue de protéines pro-inflammatoires telles que les cytokines. En effet, précocement au cours de l'état de choc hémorragique, les taux de TNF α , d'IFN α , d'IL 1 et d'IL 6 augmentent [128, 129] dans le plasma des patients et sont corrélés avec la sévérité de l'état de choc [128]. Les effets des cytokines sont importants sur le plan local et systémique avec activation des polynucléaires qui infiltrent les tissus, notamment le foie et les poumons à l'origine de lésions viscérales [130]. Alors que de nombreuses cytokines pro-inflammatoires sont produites, l'organisme sécrète également des protéines anti-inflammatoires dont l'IL 10 et le TGF β [131, 132] qui contrebalancent les effets pro-inflammatoires susmentionnés. L'équilibre est cependant instable puisqu'il est décrit des lésions en rapport avec les molécules pro-inflammatoires [133] ainsi qu'une immunosuppression liée à l'excès de cytokines anti-inflammatoires [134, 135], favorisant ainsi les infections dans les suites de la réanimation du choc hémorragique.

Le choc hémorragique entraîne une baisse brutale et parfois profonde du transport en oxygène qui est suivie au cours de la réanimation d'un rétablissement brutal de la perfusion et de l'apport d'oxygène. Cette évolution biphasique peut être décrite comme une véritable ischémie-reperfusion dont la pathogénicité est démontrée au cours des deux phases. En effet, lors de l'ischémie, la cellule subit une privation énergétique puis, lors de la reperfusion, une production accrue de radicaux libres survient générant un stress oxydant cellulaire. Ces radicaux libres sont impliqués dans le déclenchement de voies de signalisation cellulaire potentiellement toxiques pour la cellule [136] mais peuvent aussi exercer une toxicité directe sur la cellule par des réactions de peroxydation lipidique membranaire ou en altérant directement l'ADN et les protéines [136]. Une partie des voies de signalisation stimulées par les radicaux libres contribue au phénotype inflammatoire des cellules, notamment de l'endothélium.

L'endothélium vasculaire est situé à l'interface entre le sang circulant et les tissus ce qui en fait une cible directe des phénomènes d'ischémie-reperfusion. Les fonctions de l'endothélium sont nombreuses à l'état physiologique puisqu'il est impliqué dans la régulation du tonus et de la perméabilité vasculaire et participe donc à la perfusion tissulaire. Il exerce également un rôle dans la coagulation en assurant l'équilibre pro-anticoagulant au contact du sang. L'activation endothéliale survient précocement au cours de l'ischémie-reperfusion et entraîne, entre autre, une adhésion leucocytaire sur le revêtement endothélial [137, 138]. Ce phénomène se produit principalement au niveau veineux et participe à l'obstruction capillaire en réduisant le diamètre efficace de la microcirculation. La dysfonction endothéliale générée par l'ischémie-reperfusion mène également à une fuite capillaire par augmentation de la perméabilité endothéliale. Cette fuite entraîne la formation d'oedèmes capillaires qui sont à l'origine de troubles de la diffusion de l'oxygène et majorent l'hypoxie tissulaire.

5. PRISE EN CHARGE DU CHOC HEMORRAGIQUE

L'objectif initial de la thérapeutique du choc hémorragique reste une prise en charge précoce visant à rétablir une pression de perfusion et un apport en oxygène adapté aux besoins tissulaires. Cela passe par un remplissage vasculaire dans un premier temps, par l'introduction précoce de vasopresseurs et par la restauration de la masse sanguine et de l'hémostase biologique.

Ces mesures ont pour but d'assurer un débit sanguin régional satisfaisant, de limiter le risque de dysoxie tissulaire, de freiner le saignement par une correction de l'hémostase dans l'attente d'un traitement étiologique chirurgical, radiologique ou endoscopique des lésions hémorragiques.

5.1. TRAITEMENT HEMODYNAMIQUE AU COURS DU CHOC HEMORRAGIQUE

5.1.1. LE REMPLISSAGE VASCULAIRE

Le remplissage vasculaire corrige l'hypovolémie induite par la spoliation sanguine et permet de rétablir ainsi une efficacité circulatoire et une perfusion d'organes. Cependant, tant que le saignement n'est pas contrôlé, le fait de restaurer la pression artérielle peut favoriser et entretenir le saignement. En effet, le remplissage vasculaire est à l'origine d'une hémodilution et d'une hypothermie qui peuvent avoir des conséquences néfastes sur l'hémostase. Dans une étude réalisée en 1998, Riddez *et coll.* ont mis en évidence qu'un remplissage trop abondant à la phase précoce favorisait le resaignement [139].

Deux concepts ont émergé au cours des dernières années : le concept de *low volume resuscitation* et le concept de *hypotensive resuscitation*. Le concept de *hypotensive resuscitation* a été popularisé après la publication d'une étude nord-américaine en 1994. Dans cette étude, Bickell *et coll.* ont comparé une stratégie de remplissage immédiat versus retardé chez 598 patients présentant une PAS ≤ 90 mmHg à la prise en charge et un traumatisme pénétrant du tronc. Le risque relatif de décès dans le groupe « remplissage immédiat » était de 1,26 (1,00-1,58) [140]. Le concept proposé par Bickell *et coll.* a alors été d'amener au plus vite le patient au centre de traumatologie sans réaliser d'expansion volémique. Cependant, aucune donnée dans la littérature ne permet actuellement de recommander une telle stratégie dans les traumatismes fermés, lors de temps prolongés de transport vers le centre de traumatologie et chez des patients présentant des comorbidités. Une revue de la librairie Cochrane a été incapable de trancher entre les deux attitudes [141].

L'importance et le délai du remplissage sont deux questions qui restent en suspens, mais qui sont certainement conditionnées par la capacité de réaliser rapidement une hémostase chirurgicale ou radio interventionnelle.

Quel que soit le soluté de remplissage utilisé, cristalloïde ou colloïde, les modalités d'administration restent communes. Les recommandations conjointes de la Société de réanimation de langue française et de la Société française d'anesthésie-réanimation sur le remplissage vasculaire au cours des hypovolémies préconisent « l'utilisation des cristalloïdes lorsque la perte sanguine est estimée à moins de 20% de la masse sanguine et pour un choc hémorragique patent ; avec perte estimée supérieure à 20% de la masse sanguine ou si la PAS est d'emblée inférieure à 80 mmHg, l'utilisation de colloïdes est recommandée en première intention ». Les recommandations européennes vont dans ce sens en proposant l'usage des cristalloïdes en première intention, avec la possibilité d'ajouter des colloïdes dans les limites recommandées pour chaque type de solution [142].

Concernant l'albumine, une revue de la librairie Cochrane est parue en 2004 au sujet de l'utilisation de l'albumine humaine en réanimation [143]. Les auteurs ont conclu à l'absence de bénéfice de l'utilisation d'albumine. Les auteurs se sont appuyés, notamment, sur les résultats de l'étude SAFE [144]. Dans cette étude multicentrique et randomisée portant sur près de 7000 patients parue en 2004, les auteurs ont cherché à établir que le remplissage vasculaire par albumine n'était pas délétère par rapport à un remplissage par sérum salé. Cette équivalence a bien été retrouvée, mais dans le sous-groupe (sous-groupe prédéfini) des patients traumatisés, les auteurs ont retrouvé une tendance à une augmentation de la mortalité dans le groupe albumine.

Le sérum salé hypertonique (SSH) peut être une option thérapeutique. L'attrait du SSH réside en partie dans ses propriétés pharmacologiques et dans la faible quantité qu'il est nécessaire de perfuser. Le SSH mobilise le liquide intracellulaire vers le secteur vasculaire par le biais de l'hypertonie plasmatique qu'il entraîne. Cet effet de remplissage vasculaire est obtenu avec de faibles quantités de liquide salé hypertonique de l'ordre de 4 ml/kg de solution de NaCl 7,5%. Le SSH favorise ainsi la perfusion des organes en réduisant la formation de l'œdème périvasculaire et l'adhésion des polynucléaires à l'endothélium grâce à une baisse de l'expression membranaire de protéines d'adhésion endothéliale [145]. L'effet du SSH est transitoire mais l'association de ce dernier avec un colloïde de synthèse de type hydroxyéthylamidon en prolonge significativement les effets. Cependant, son utilisation reste discutée au cours du choc hémorragique et nécessite des études complémentaires afin de définir son impact sur la mortalité et sa place dans l'arsenal thérapeutique.

5.1.2. LES CATECHOLAMINES

À la phase initiale, l'administration de catécholamines vasoconstrictrices se justifie afin de maintenir une pression de perfusion si le remplissage vasculaire ne permet pas à lui seul de restaurer la pression artérielle. De plus, une administration précoce des vasopresseurs limite les effets délétères d'une expansion volémique excessive associée à une dilution des facteurs d'hémostase.

Dans un modèle murin de choc hémorragique non contrôlé, une étude a comparé une prise en charge conventionnelle basée sur un remplissage abondant versus l'introduction précoce de noradrénaline. Les auteurs ont montré que l'introduction précoce de noradrénaline améliorait significativement la survie des souris [146].

Par ailleurs, lorsque le choc hémorragique est d'origine traumatique, il peut être associé à un traumatisme crânien sévère. Or, la prévention des lésions cérébrales ischémiques secondaires impose un contrôle strict de la pression artérielle, nécessitant fréquemment l'emploi de vasopresseurs pour assurer une pression de perfusion cérébrale satisfaisante [147].

Enfin, l'utilisation de catécholamines prend tout son sens lors du choc hémorragique prolongé. En effet, si l'état de choc hypovolémique perdure, une vasoplégie s'installe dont le traitement symptomatique, une fois le remplissage vasculaire optimisé, est la mise sous amine alpha-pressive. Alors que le tonus vasoconstricteur prédomine lors de la phase initiale de l'hypovolémie en rapport avec une stimulation sympathique, il s'installe au cours du choc prolongé une vasoplégie qui persiste malgré une restauration *ad integrum* de la volémie [148]. La priorité thérapeutique au cours d'un état de choc étant de restaurer la pression artérielle, il peut être proposé d'introduire un vasopresseur si une expansion volémique s'avère inefficace. La noradrénaline, du fait de son action alpha-adrénergique prédominante peut être recommandée.

5.2. TRANSFUSION AU COURS DU CHOC HEMORRAGIQUE

L'objectif de la transfusion de produits sanguins labiles au cours du choc hémorragique est double : la restauration d'une hémostase favorable à la coagulation biologique et la restitution d'un transport en oxygène adéquat. En effet, la vocation de la transfusion de culots globulaires est l'apport d'hémoglobine afin de maintenir un apport en oxygène suffisant aux tissus et de prévenir l'hypoperfusion d'organe. De nombreuses recommandations ont été proposées quant aux seuils d'hémoglobine à atteindre chez les patients de réanimation [149].

5.3. ANTIFIBRINOLYTIQUES ET CONCENTRES EN FACTEUR DE LA COAGULATION

Malgré la transfusion de facteurs de la coagulation contenus dans le PFC et malgré l'administration de plaquettes et de globules rouges, la coagulopathie peut rester difficile à corriger au cours du choc hémorragique et le saignement persiste parfois alors que l'hémorragie n'est plus du ressort de la chirurgie ou de l'embolisation.

Plusieurs agents hémostatiques sont utilisés dans la prévention et le traitement des hémorragies majeures. Parmi eux figurent les antifibrinolytiques tels que l'acide tranexamique (analogue de la lysine) ou l'aprotinine (inhibiteur direct de l'activité fibrinolytique de la plasmine). Le facteur VII activé a également montré une efficacité dans certaines situations hémorragiques sévères.

5.4. TRAITEMENT ETIOLOGIQUE

Le traitement des lésions hémorragiques liées au traumatisme est pluridisciplinaire et fait appel à des interventions thérapeutiques orchestrées entre les chirurgiens, les radiologues, les anesthésistes, les réanimateurs et les urgentistes. Si le remplissage vasculaire, la correction des troubles de l'hémostase ou la correction d'une anémie contribuent à la stabilisation du patient, ils ne doivent pas retarder une chirurgie d'hémostase ou une artério-embolisation qui sont seules aptes à arrêter un saignement actif. Ainsi, le bilan initial a pour vocation de cibler et de hiérarchiser les interventions thérapeutiques.

LES CANAUX POTASSIQUES

Les canaux potassiques, protéines transmembranaires permettant le passage sélectif d'ions potassium K^+ via le pore du canal, sont distribués dans une grande variété de tissus. Ils assurent le couplage entre l'excitabilité membranaire et le métabolisme énergétique de la cellule, et jouent ainsi un rôle important tant en situation normale qu'en situation pathologique.

La conformation des canaux potassiques dépend notamment du voltage ou de la liaison de certains ligands conditionnant l'ouverture ou la fermeture du canal. Leur ouverture, en induisant une sortie des ions K^+ de la cellule, entraîne une hyperpolarisation de la membrane plasmatique et une dépolarisation au niveau de la membrane mitochondriale.

Des centaines de gènes codent pour les canaux potassiques. Quatre principales classes ont été identifiées au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires : les canaux potassiques voltage-dépendants (K_v), les canaux potassiques calcium-dépendants (K_{Ca}), les canaux potassiques rectifiants entrants ou *inwardly rectifying potassium channels* (K_{ir}), et les canaux potassiques ATP-dépendants (K_{ATP}).

La régulation du tonus vasculaire est essentiellement assurée par les canaux potassiques ATP-dépendants et calcium-dépendants (K_{ATP} et les K_{Ca}).

1. LES CANAUX POTASSIQUES ATP-DEPENDANTS (K_{ATP})

1.1. STRUCTURE

Le clonage des canaux K_{ATP} a permis de détailler leur structure. Il s'agit d'un complexe membranaire octamérique associant deux types de sous-unités : quatre sous-unités centrales ($K_{ir6.x}$) appartenant à la superfamille des canaux rectifiants entrants ou *inwardly rectifying channels* formant le pore du canal, et quatre sous-unités périphériques régulatrices, les récepteurs aux sulfonylurées ou *sulfonylurea receptors* ($SUR.x$), liant les sulfonylurées et l'ATP appartenant à la famille des *ATP-binding cassette* (figure 9).

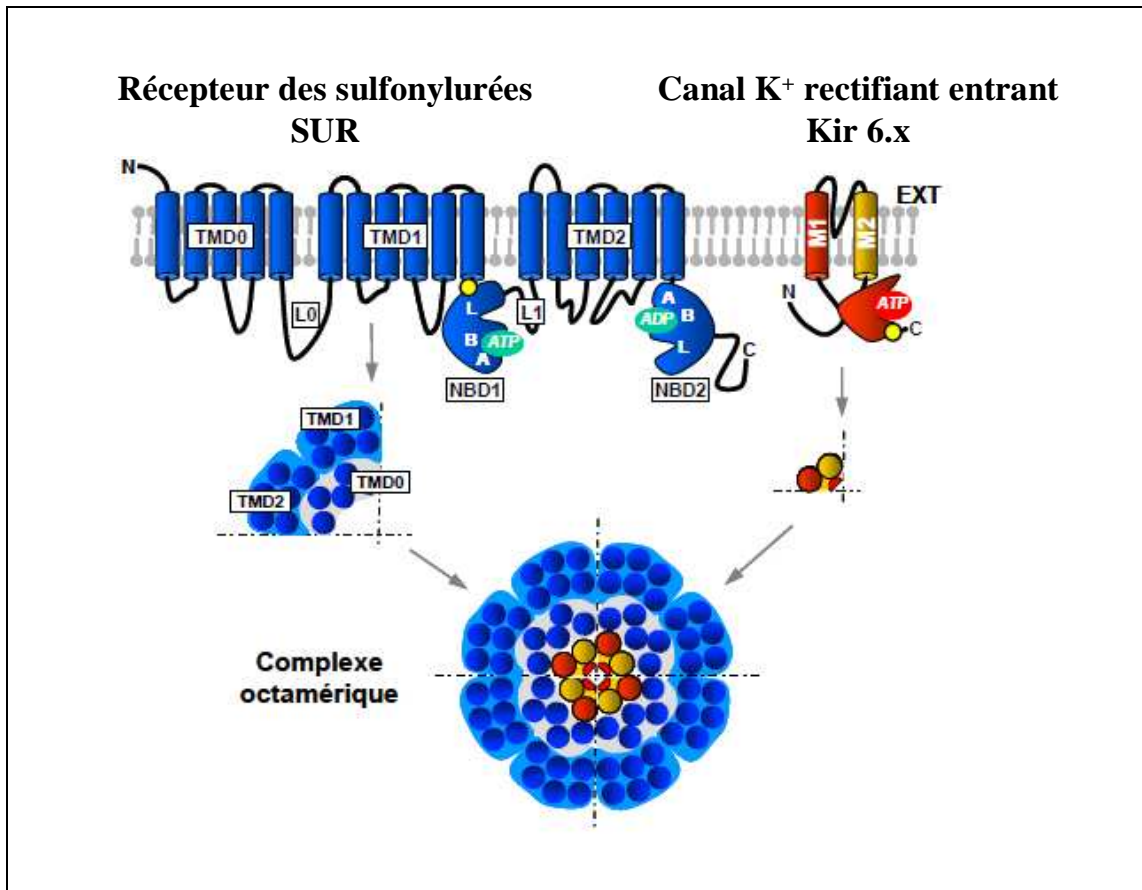


Figure 9 : Structure des canaux potassiques ATP-dépendants

Plusieurs gènes codant ces deux types de sous-unités ont été identifiés, notamment Kir6.1 et Kir6.2, SUR1 et SUR2 (SUR2A et SUR2B étant deux variants) [150].

La sous-unité Kir6.x, plus précisément Kir6.1 et Kir6.2 codées respectivement par les gènes KCNJ8 et KCNJ11, est la sous-unité composant le pore du canal K_{ATP} . Chaque sous-unité Kir6.x est constituée de deux domaines transmembranaires, M1 et M2, et de deux extrémités NH_2 et $COOH$ intracytoplasmiques. La région formant le pore du canal et lui conférant sa sélectivité au potassium se situe dans la boucle M1-M2, et l'association de 4 sous-unités Kir 6.x forme le pore d'un canal K_{ATP} .

Les sous-unités Kir6.x possèdent un site de liaison à l'ATP au niveau de la région intracytoplasmique C-terminale, et confèrent ainsi à l'ATP sa capacité d'inhibition du canal.

La sous-unité SUR est constituée de trois domaines transmembranaires, TMD0, 1 et 2, composés respectivement de 5, 6 et 6 régions transmembranaires, d'une extrémité NH_2 extracellulaire et d'une extrémité $COOH$ intracytoplasmique.

Comme les autres protéines de la famille des ABC protéines, les sous-unités SUR possèdent deux domaines de liaison aux nucléotides, NBD1 et NBD2, localisés respectivement au niveau de la boucle intracytoplasmique entre TMD1 et TMD2 et dans la région intracytoplasmique C-terminale. Les sous-unités SUR augmentent la sensibilité à l'ATP des sous-unités Kir6.x et permettent l'activation du canal K_{ATP} par l'ADP. En effet, il apparaît que l'ATP se lie au domaine NBD1 pendant que l'ADP se lie au domaine NBD2. Il a été rapporté que les domaines NBD1 et NBD2 ont une activité ATPasique et peuvent hydrolyser l'ATP en ADP, activant ainsi le canal K_{ATP} via le domaine NBD2.

Les sous-unités SUR possèdent également des sites de liaison de haute affinité pour les sulfonylurées et les activateurs de canaux potassiques ou K^+ *channel openers*.

Les canaux K_{ATP} , découverts originellement dans les cardiomyocytes au début des années 1980 [151], ont par la suite été identifiés dans les cellules pancréatiques bêta de Langherans, les neurones, les cellules musculaires lisses et squelettiques [152]. Selon le tissu considéré, la structure et le(s) rôle(s) des canaux K_{ATP} sont à différencier [5] (tableau III).

Notons que la structure des canaux K_{ATP} de la membrane mitochondriale des différents types cellulaires reste à ce jour méconnue.

Tableau III : Organisation et fonctions tissu-spécifiques des canaux K_{ATP} : quelques exemples

Tissu	Sous-unités Kir6.x/SUR.x	Fonctions
Pancréas (îlots β)	Kir6.2 / SUR1	Contrôle la sécrétion d'insuline
Myocarde	Kir6.2 / SUR2A	Protection contre l'ischémie myocardique
Muscle squelettique	Kir6.2 / SUR2A	Réduction de l'excitabilité musculaire Régule l'absorption du glucose
Muscle lisse vasculaire	Kir6.1 / SUR2B	Régulation du tonus vasculaire
Cerveau	Kir6.2/SUR1 (neurones) Kir6.2/SUR2B (substantia nigra) Kir6.1/SUR2 (astrocytes)	Activité neuronale Libération des neurotransmetteurs Sécrétion du glucagon
Rein	Kir6.2 / SUR2B	Réabsorption des électrolytes Homéostasie des ions K^+

1.2. ROLES PHYSIOLOGIQUES

A l'état physiologique, les canaux potassiques sont fermés. Ils ont essentiellement un rôle régulateur et adaptateur.

L'un des principaux rôles des canaux K_{ATP} est le contrôle de la sécrétion pancréatique d'insuline au niveau des cellules bêta de Langherans en réponse à une augmentation de la concentration de glucose sanguin.

Au niveau du myocarde, l'activation des canaux K_{ATP} protège de l'ischémie myocardique en modulant le potentiel de repos membranaire, l'amplitude et la durée du potentiel d'action ainsi que la période réfractaire réduisant l'excitabilité des myocytes.

Au niveau de la cellule musculaire lisse vasculaire, les canaux K_{ATP} contribuent au maintien du potentiel membranaire de repos et, de cette manière, à la régulation du tonus vasculaire artériel et au flux sanguin local.

1.3. MODULATION DE L'ACTIVITE DES CANAUX K_{ATP}

Les canaux K_{ATP} sont activés en cas de changement de l'état énergétique cellulaire et tirent leur nom du fait qu'ils sont bloqués physiologiquement par l'ATP intracellulaire. Dans la majorité des tissus, l'inhibition par l'ATP apparaît pour des concentrations micromolaires. A l'état physiologique, les concentrations cellulaires en ATP sont de l'ordre du millimolaire, les canaux K_{ATP} étant le plus souvent fermés. A l'inverse, les nucléotides diphosphates (NDP), tels que l'adénosine (ADP), activent ces canaux. Ainsi, le ratio ATP/NDP constitue l'un des facteurs majeurs déterminant l'activité absolue du canal [153].

Ainsi, lors d'un stress métabolique sévère, comme observé au cours d'un état de choc, la concentration en ATP diminue pendant que celle en NDP augmente, favorisant de ce fait l'activation des canaux K_{ATP} . De même, ils s'ouvrent dans des conditions d'hypoxie, d'acidose et d'hyperlactatémie, également présentes au cours d'un état de choc.

Par ailleurs, les vasodilatateurs augmentant l'AMPc via la PKA, comme le *calcitonin gene-related peptide* (CGRP), l'adénosine et la prostacycline, activent les canaux K_{ATP} , de même que les agents augmentant le GMPc via la PKG, comme le NO [63, 154].

Au contraire, les vasoconstricteurs, tels que la vasopressine, l'endothéline et l'angiotensine II, induisent la fermeture des canaux K_{ATP} via l'activation de la protéine kinase C et augmentent la synthèse d'ATP [63, 154-157] (figure 10).

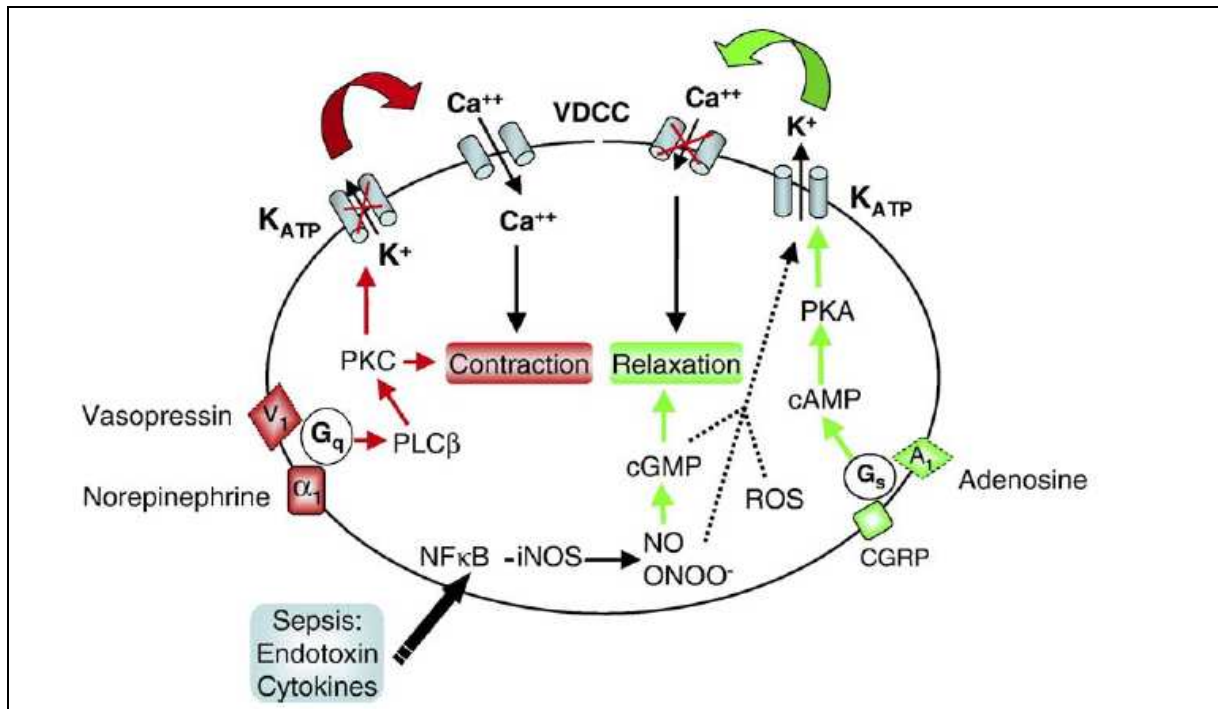


Figure 10 : Régulation hormonale des canaux K_{ATP} vasculaires [5]

D'un point de vue pharmacologique, les canaux K_{ATP} sont la cible moléculaire de médicaments antidiabétiques tels que les sulfonylurées dont le glibenclamide, le glipizide ou le tolbutamide, inhibiteurs non sélectifs qui amènent à leur fermeture par fixation sur la sous-unité SUR. Il existe également des inhibiteurs sélectifs des canaux K_{ATP} vasculaires, tels que le PNU-37883A [158]. En outre, il existe toute une gamme d'activateurs de ces canaux incluant le pinacidil, le nicorandil, le levcromakalim, le diazoxide, l'isoflurane réunis sous le terme générique de KCO (*K⁺ channel openers*).

1.4. CANAUX K_{ATP} ET IMPLICATIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES

Bien que l'origine des chocs hémorragique et septique soit fondamentalement différente, l'implication des canaux K_{ATP} , importants régulateurs de la tonicité vasculaire des muscles lisses, joue un rôle pivot dans les deux conditions. Par conséquent, l'inhibition pharmacologique des canaux K_{ATP} peut représenter une option thérapeutique permettant de stabiliser l'hémodynamique dans les états de choc caractérisés par une insuffisance vasculaire. Cette approche peut être particulièrement bénéfique dans des conditions où les agents vasopresseurs conventionnels peuvent perdre leur efficacité [62, 159].

Les canaux K_{ATP} sont également fortement impliqués dans la physiopathologie du préconditionnement ischémique et de la reperfusion. [154, 160-163].

1.4.1. CANAUX K_{ATP} ET CHOC SEPTIQUE (TABLEAU IV)

1.4.1.1. Etudes expérimentales

✚ Etudes *in vivo* :

De nombreuses études expérimentales *in vivo* ont démontré l'implication des canaux K_{ATP} dans le développement de la vasodilatation systémique et l'hyporéactivité vasculaire au cours du choc septique [62, 164-168].

Chez le rat [168], le chien [62], et le porc [167], l'injection d'un bolus de glibenclamide, sulfonylurée antagoniste des canaux K_{ATP} , s'oppose immédiatement à l'hypotension systémique induite par l'endotoxine grâce à une augmentation significative des résistances vasculaires systémiques. Une augmentation similaire des résistances vasculaires systémiques et de la pression artérielle a été rapportée après l'administration d'un bolus d'une autre sulfonylurée, le glipizide, chez des moutons rendus septiques suite à l'administration d'endotoxine [165].

Tableau IV : Etudes *in vivo* d'inhibition pharmacologique des canaux K_{ATP} dans le choc endotoxinique

Publication	Animaux/Patients	Interventions	Résultats principaux
Landry <i>et coll.</i> , 1992 [62]	15 chiens avec choc endotoxinique ou acidose lactique	post-traitement : glibenclamide , <u>bolus iv</u> , 0.15 mg/kg	↑ rapide des RVS et de la PAS pendant 20 min pas de changement du DC pas de changement glycémie
Vanelli <i>et coll.</i> , 1995 [167]	10 porcs avec choc endotoxinique	post-traitement : glibenclamide , <u>bolus iv</u> , 10 mg/kg	↑ rapide des RVS et de la PAS pendant 30 min pas de changement du DC pas de changement glycémie
Gardiner <i>et coll.</i> , 1999 [168]	90 rats avec choc endotoxinique	pré et post-traitement : glibenclamide , <u>bolus iv</u> , 20 mg/kg	↑ de la PAS ↓ du flux sanguin rénal et mésentérique
Asfar <i>et coll.</i> , 2004 [164]	8 porcs avec choc endotoxinique	post-traitement : HMR1402 , perfusion continue, 6 mg/kg/h	↑ de la PAS pendant 60 min ↓ du DC et du débit sanguin hépatique ↑ du lactate artériel et hépatique et du ratio lactate/pyruvate
Lange <i>et coll.</i> , 2006 [165]	6 moutons avec choc endotoxinique	post-traitement : glipizide , <u>bolus iv</u> , 4 mg/kg	↑ rapide des RVS et de la PAS pendant 45 min pas de changement du DC ↓ glycémie
Lange <i>et coll.</i> , 2007 [169]	14 moutons avec choc endotoxinique	post-traitement : glipizide , <u>bolus iv</u> 5 mg/kg puis <u>perfusion continue</u> 8 mg/kg/h	↑ des RVS et de la PAS pendant toute la durée de perfusion ↓ du DC et oxygénation pas de changement de la glycémie (supplémentation/glucose)
Warillow <i>et coll.</i> , 2006 [170]	10 patients en choc septique	post-traitement : glibenclamide , <u>voie entérale</u> 20 mg	Pas de ↓ significative des doses de noradrénaline requises Pas d' ↑ significative de la PAS ↓ glycémie
Morelli <i>et coll.</i> , 2007 [171]	30 patients en choc septique	post-traitement : glibenclamide , <u>voie entérale</u> 10,20 ou 30 mg	Pas de ↓ significative des doses de noradrénaline requises Pas d' ↑ significative de la PAS ↓ glycémie dose-dépendante

De même, la perfusion de HMR1402, inhibiteur des canaux K_{ATP} , a augmenté significativement la pression artérielle dans un modèle endotoxinique de porc [164].

Il est important de noter que les sulfonylurées n'ont pas eu [62, 167], ou que légèrement, d'effets hémodynamiques [165] lorsqu'elles ont été administrées à des animaux sains, suggérant que les canaux K_{ATP} auraient un rôle mineur dans la vasorégulation dans les conditions physiologiques. Cependant, dans des conditions septiques, les canaux K_{ATP} semblent jouer un rôle important dans la physiopathologie de l'hypotension artérielle.

Néanmoins, l'administration en bolus de sulfonylurées ou la perfusion continue de HMR1402 n'entraîneraient qu'une augmentation transitoire de la pression sanguine, d'une durée de 20 à 60 min [62, 164, 165, 167]. A l'inverse, l'administration en continu de glipizide restaurerait totalement l'hypotension induite par l'endotoxine chez les moutons et ce pendant la durée de perfusion de 3 heures [169]. Ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer de par la différence entre les espèces étudiées, les drogues administrées, les doses utilisées, ou la forme d'administration choisie (bolus *versus* perfusion continue).

Alors que l'inhibition des canaux K_{ATP} vasculaires peut être bénéfique pour s'opposer à la vasodilatation observée au cours du sepsis, plusieurs effets indésirables peuvent cependant survenir suite à cette inhibition.

En effet, bien que la plupart des études aient montré que les sulfonylurées augmentaient les résistances vasculaires systémiques sans affecter le débit cardiaque [62, 167], la perfusion continue d'une sulfonylurée ou de l'inhibiteur HMR1402 entraîne une réduction importante du débit cardiaque [164, 169]. Par ailleurs, l'inhibition des canaux K_{ATP} par le HMR1402 induit une hyperlactatémie artérielle et hépatique, ainsi qu'une augmentation significative du ratio lactate/pyruvate, probablement en raison d'une diminution du potentiel redox cytosolique liée à l'inhibition des canaux K_{ATP} mitochondriaux [164]. Il est ainsi important de noter que l'inhibition non sélective des canaux K_{ATP} peut également affecter les canaux potassiques mitochondriaux d'organes vitaux, ce qui pourrait interférer avec d'importants mécanismes physiologiques, comme la protection contre les lésions ischémiques et chimiques dans les neurones cérébraux ou le myocarde [172, 173].

En outre, l'inhibition des canaux K_{ATP} des cellules pancréatiques β par les sulfonylurées peut considérablement diminuer les concentrations de glucose dans le sang, induisant un potentiel risque d'hypoglycémie [165, 169]. Néanmoins, les patients en choc septique présentent généralement une hyperglycémie et une résistance à l'insuline [174], et il a été démontré que le contrôle de la glycémie sanguine avec une insulinothérapie intensive améliorerait le pronostic de patients de réanimation [175-177]. Il reste néanmoins à déterminer, par le biais de futures études, le rapport bénéfice/risque d'un contrôle de la glycémie par l'utilisation de sulfonylurées chez des patients en état de choc.

Le rôle des canaux K_{ATP} dans la régulation de la pression artérielle systémique dans les conditions physiologiques n'est pas clair. En effet, le glibenclamide a eu peu d'effet sur la pression artérielle chez les animaux sains [62, 166, 167], alors que le PNU-37883A, inhibiteur sélectif de la sous-unité Kir6.1 des canaux K_{ATP} vasculaires, a induit une augmentation significative de la pression artérielle chez le chien et le rat [158].

O'Brien *et coll.* ont récemment comparé les effets du glibenclamide à ceux du PNU-37883A dans un modèle endotoxinique de rats [178]. Les auteurs ont montré que la perfusion de PNU-37883A augmente significativement la pression artérielle alors qu'ils n'ont pas retrouvé d'effet vasopresseur pour le glibenclamide. Ce dernier a toutefois été administré en bolus rendant l'interprétation des résultats difficile.

Par ailleurs, une étude expérimentale *in vivo* a rapporté l'augmentation de l'expression protéique par 9 fois et de l'ARNm par 4 fois de la sous-unité vasculaire Kir6.1 des canaux K_{ATP} sur du diaphragme de rats endotoxiniques [179]. De façon similaire, une autre étude a rapporté une augmentation par 22 fois de l'expression de l'ARNm de la sous-unité Kir6.1 dans un modèle de colite expérimentale [180]. En outre, Kane *et coll.* ont étudié des souris knockout pour la sous-unité Kir 6.1 et ont montré que l'intégrité fonctionnelle des canaux K_{ATP} vasculaires est un facteur crucial dans la susceptibilité au sepsis [181].

D'autres études ont rapporté que SUR2 constitue un gène de susceptibilité dans l'hypertension essentielle chez l'homme [182] et que des souris invalidées pour le gène SUR2 ont développé de l'hypertension et présenté des vasospasmes coronariens [162], confirmant le rôle des canaux K_{ATP} dans la régulation de la pression artérielle.

⚡ Etudes *ex vivo/in vitro* :

L'hyporéactivité vasculaire peut également être étudiée en utilisant des modèles *ex vivo/in vitro* [166, 183-186]. Dans cette optique, des anneaux artériels sont prélevés soit à partir de vaisseaux sanguins d'animaux septiques (*ex vivo*) soit à partir d'animaux sains pour lesquels les anneaux artériels sont incubés avec l'endotoxine (*in vitro*). La contractilité des anneaux aortiques est déterminée par l'établissement de courbes dose-réponse à un vasoconstricteur $\alpha 1$ -adrénergique, tel que la phényléphrine.

L'activation anormale des canaux K_{ATP} et, dans une moindre mesure, celle des canaux BK_{Ca} , est responsable de l'augmentation de l'hyperpolarisation membranaire rapportée au niveau d'anneaux d'artère mésentérique et d'aorte de rats, anneaux prélevés et exposés à l'endotoxine jusqu'à une durée de 6 h [187-190], et donc de la diminution de la fonction contractile en réponse aux vasoconstricteurs. A ce même temps, les inhibiteurs pore-spécifiques des canaux K_{ATP} , le PNU-37883A et le baryum [158, 191], ont presque entièrement restauré la contraction à la phényléphrine [192]. L'effet de ces inhibiteurs a été moindre au bout de 20 h, suggérant l'existence de mécanismes supplémentaires responsables de l'hyporéactivité et/ou de dommages irréversibles de la fonction contractile. En outre, la vasorelaxation induite par les KCO est potentialisée dans les deux modèles endotoxiques d'hyporéactivité *in vitro* et *ex vivo* [166, 184, 187], ceci indiquant une régulation à la hausse de la fonction du canal K_{ATP} dans le muscle lisse vasculaire.

Un constat quelque peu surprenant, mais cohérent, dans un modèle *in vitro* est l'absence d'effet des inhibiteurs des sous-unités SUR, les sulfonylurées, sur l'hyporéactivité vasculaire et dans certains cas, les contractions ont même été réduites [166, 185, 192, 193]. L'hypothèse émise est que l'endotoxine altérerait la pharmacologie des canaux K_{ATP} au niveau de la sous-unité SUR induisant l'inefficacité des inhibiteurs. Précédemment, il avait été constaté que les sulfonylurées inhibaient nettement moins efficacement la relaxation vasculaire induite par la levromakaline ou un inhibiteur de la iNOS, en présence d'endotoxine [184]. En revanche, l'inhibiteur vasculaire pore-spécifique, le PNU-37883A, est resté efficace.

1.4.1.2. Etudes cliniques

En 2004, Pickkers *et coll.* [194] ont confirmé que l'activation des canaux K_{ATP} induisait une vasodilatation et réduisait la réponse vasoconstrictrice aux agents adrénérgiques. En effet, les

auteurs ont étudié les effets d'un donneur de NO, le nitroprussiate de sodium, par rapport au diazoxide, un activateur des canaux K_{ATP} , sur la réponse vasoconstrictrice à la noradrénaline au niveau de l'avant-bras de 30 volontaires sains. Dans cette étude, les deux agents ont induit une diminution de la résistance vasculaire associée à une augmentation du flux sanguin artériel au niveau de l'avant-bras. La réponse vasoconstrictrice à la noradrénaline a été significativement réduite suite à l'administration du diazoxide par rapport à l'administration du nitroprussiate. Cependant, il a été noté que le prétraitement avec des inhibiteurs non sélectifs des canaux potassiques, le tétraéthyle ammonium (TEA) et la quinine, s'est opposé à la diminution de la résistance vasculaire induite par le diazoxide.

En 2006 [170] et 2007 [171] ont été publiées les deux premières études, et seules existantes à ce jour, portant sur les effets d'inhibiteurs des canaux K_{ATP} chez des patients en choc septique.

Warrillow *et coll.* [170] ont testé les effets du glibenclamide, administré par voie entérale à la dose de 20 mg, chez 10 patients en choc septique dans une étude randomisée, en double aveugle, contrôlée contre placebo. Le glibenclamide n'a eu aucun effet sur les paramètres hémodynamiques, sur les doses de noradrénaline requises ou sur la lactatémie, mais a significativement diminué la glycémie et augmenté les besoins en glucose.

Récemment, Morelli *et coll.* [171] ont testé les effets du glibenclamide, administré par voie entérale à la dose de 10, 20, ou 30mg, chez 30 patients en choc septique dans une étude prospective, randomisée, en double aveugle. Le glibenclamide a induit une diminution de la glycémie de façon dose-dépendante, mais n'a pas eu d'effet sur les paramètres hémodynamiques ou sur les doses de noradrénaline requises.

Pour interpréter les résultats négatifs de ces deux études cliniques, plusieurs aspects doivent être pris en considération.

Premièrement, contrairement à toutes les études expérimentales, le glibenclamide a été administré par voie entérale, car aucune formulation intraveineuse n'est actuellement disponible pour une utilisation chez l'homme. Dans ce contexte, il est important de garder à l'esprit que le débit sanguin gastro-intestinal, diminué au cours du choc septique, peut être responsable de la diminution d'absorption de médicaments administrés par voie entérale. Par conséquent, la diminution d'absorption des sulfonylurées après administration entérale peut diminuer leur efficacité.

Deuxièmement, le problème sans doute le plus significatif est la dose de glibenclamide utilisée. Dans les études cliniques réalisées par Warrillow *et coll.* [170] et Morelli *et coll.* [171], les doses de glibenclamide étudiées ont été celles utilisées pour le traitement de l'hyperglycémie chez des patients atteints de diabète de type II. Comme attendu, les concentrations de glucose dans le sang ont diminué chez les patients septiques ayant reçu le glibenclamide. Toutefois, l'effet hypoglycémiant observé n'implique pas nécessairement que la concentration plasmatique du glibenclamide ait été suffisante pour inhiber les canaux K_{ATP} du système vasculaire, l'affinité du glibenclamide pour les canaux K_{ATP} vasculaires étant probablement inférieure à celle pour les canaux K_{ATP} des cellules pancréatiques β [5]. En effet, cela peut s'extrapoler à partir des études animales où les doses de sulfonyles utilisées et avérées efficaces ont été beaucoup plus élevées que les doses tolérables et utilisables en thérapeutique chez l'homme [167-169].

Par ailleurs, la sévérité du choc septique dans l'étude de Warrillow *et coll.* [170] observée n'a été que modérée avec une acidose lactique légère ou absente. Cela pourrait expliquer le manque d'effets vasopresseurs du glibenclamide, les canaux K_{ATP} étant hautement activés dans les conditions de métabolisme anaérobie.

Il est également intéressant de noter que les difficultés à déterminer le début exact de la septicémie et de l'état de choc dans la pratique clinique, et ainsi à évaluer la durée d'altération de la réponse vasculaire et d'activation des canaux K_{ATP} , peut expliquer les différences obtenues entre les résultats expérimentaux et ceux des études cliniques. En outre, la physiopathologie de l'état de choc septique et l'activation des canaux potassiques peuvent être modifiées par d'importantes co-morbidités chez les patients en choc septique.

Une autre explication possible de l'échec de l'inhibition des canaux K_{ATP} par l'utilisation de sulfonyles chez les patients septiques serait une dysfonction de la sous-unité SUR du canal K_{ATP} au cours du choc septique [192]. Il est intéressant de noter que des études expérimentales ont démontré l'efficacité des inhibiteurs pore-spécifiques du canal K_{ATP} lorsque les inhibiteurs de la sous-unité SUR sont inefficaces [184, 192]. En effet, O'Brien *et coll.* [192] ont testé la réponse contractile d'anneaux d'artères mésentériques de rats incubées en présence de LPS suite à l'action de différents inhibiteurs des canaux K_{ATP} . Dans cette étude, l'hyporéactivité vasculaire induite par le LPS a été restaurée par les inhibiteurs pore-spécifiques du canal K_{ATP} vasculaire et non par les inhibiteurs des sous-unités SUR.

Enfin, le nombre de patients inclus dans les deux études cliniques reste faible, ce qui rend les résultats négatifs difficiles à interpréter.

1.4.2. CANAUX K_{ATP} ET CHOC HEMORRAGIQUE

Des études expérimentales, bien que limitées, ont démontré que l'augmentation de l'activation des canaux K_{ATP} était également impliquée dans la physiopathologie du choc hémorragique sévère, et que l'inhibition de ces canaux via l'utilisation de sulfonylurées pouvait avoir des effets bénéfiques [159, 195-197] (tableau V). En effet, l'injection intraveineuse d'un bolus de sulfonylurées, glibenclamide ou glipizide, a rapidement permis de restaurer la pression artérielle systémique après l'induction d'un choc hémorragique expérimental chez le rat [159, 195], le porc [197], et le mouton [196]. Deux études ont même rapporté une amélioration de la survie à court terme par l'administration de sulfonylurées suite à une hémorragie sévère [159, 195].

1.4.3. CANAUX K_{ATP} ET ISCHEMIE MYOCARDIQUE

Les canaux K_{ATP} semblent jouer un rôle protecteur vis-à-vis du stress métabolique aigu et chronique. En effet, en cas d'ischémie, leur activation induit une diminution de l'influx calcique dans les cardiomyocytes et ainsi une réduction de la durée et de l'intensité du potentiel d'action. Ils ont donc un effet inotrope négatif et permettent une économie d'énergie dans une situation où cette économie est nécessaire. Ainsi des souris invalidées pour le gène de Kir6.2 sont incapables de maintenir un débit cardiaque élevé après stimulation par isoprotérénol (agoniste β_1 - et β_2 -adrénergique) et présentent des arythmies ventriculaires, voire des morts subites par hyperstimulation sympathique [198]. Lorsqu'elles sont soumises à l'exercice chronique, elles développent une hypertrophie cardiaque et une réduction du débit cardiaque.

Par ailleurs, les canaux K_{ATP} participent au phénomène d'ischémie préconditionnante. Des périodes d'ischémie brèves et intermittentes protègent le myocarde contre des lésions en cas d'ischémie prolongée, réduisant la taille de la zone infarctée, c'est le phénomène d'ischémie préconditionnante. Les souris invalidées pour le gène de Kir6.2 ne sont plus protégées par ce phénomène en cas d'ischémie importante alors qu'elles avaient été pré-exposées à de brèves ischémies et présentent une zone infarctée de grande taille [199].

Tableau V : Etudes expérimentales *in vivo* d'inhibition pharmacologique des canaux K_{ATP} dans le choc hémorragique

Publication	Animaux/Patients	Interventions	Résultats principaux
Szabo <i>et coll.</i> , 1996 [159]	43 rats - choc hémorragique	post-traitement : glibenclamide ou tolazamide , <u>bolus iv</u> 10 mg/kg et 10 mg/kg/h	↑ rapide de la PAS pendant 60 min ↑ de la survie à court terme
Salzman <i>et coll.</i> , 1997 [197]	26 porcs - choc hémorragique	post-traitement : glibenclamide , <u>bolus iv</u> , 10 mg/kg	↑ de la PAS pendant 3h, des RVS, du CO, du flux sanguin rénal et hépatique, de la PCO ₂ iléale glycémie ayant nécessité une supplémentation en glucose
Evgenov <i>et coll.</i> , 2003 [195]	115 rats - choc hémorragique	post-traitement : glipizide , <u>bolus iv</u> , 5 ou 20 mg/kg ou <u>bolus im</u> , 10 ou 40 mg/kg	↑ de la PAS dose-dépendante pendant 4 h ↑ de la survie à court terme pas de changement glycémie (2 voies d'administration)
Maybauer <i>et coll.</i> , 2004 [196]	24 moutons - choc hémorragique	post-traitement : glibenclamide , <u>bolus iv</u> , 4 mg/kg	↑ rapide de la PAS pendant 6 h et des RVS ↑ du pH iléal et du débit sanguin urinaire pas de changement glycémie

Il est vrai que la plus grande expérience clinique avec l'utilisation de sulfonyles provient de patients atteints de diabète de type II. Il est intéressant de remarquer que l'inhibition des canaux K_{ATP} myocardiques par les sulfonyles empêcherait le préconditionnement ischémique myocardique et le postconditionnement, ce qui pourrait augmenter le risque d'événements cardiaques ou même la mortalité [200, 201]. En effet, les récentes preuves cliniques suggèrent que le traitement du diabète de type II par les sulfonyles augmente le risque de décès cardiovasculaire chez les patients présentant des co-morbidités cardiovasculaires [202, 203], contrairement aux patients sans co-morbidité cardiovasculaire [204].

1.4.4. CANAUX K_{ATP} ET « SYNDROME DES CANAUX POTASSIQUES »

Récemment, Singer *et coll.* [205] ont rapporté le succès du traitement par glibenclamide de trois patients présentant le « syndrome des canaux potassiques ». Dans cette série de cas, les patients ont reçu des médicaments ayant des propriétés activatrices potentielles des canaux K_{ATP} et ont ainsi présenté de graves complications, notamment une hyperkaliémie et une hypotension due à la vasodilatation systémique. L'administration entérale de 5-10mg de glibenclamide a réduit les concentrations de K^+ plasmatique et stabilisé les paramètres hémodynamiques chez les trois patients. Il est à noter que les doses de glibenclamide utilisées chez ces trois patients ont été inférieures à celles utilisées dans les études de Warrillow *et coll.* [170] et Morelli *et coll.* [171] et qui s'étaient avérées inefficaces dans le traitement de la vasodilatation de l'état de choc septique. Cependant, il doit être pris en compte que la physiopathologie de la vasodilatation du choc septique implique différents facteurs [8] et que l'inhibition du canal K_{ATP} ne représente qu'une stratégie parmi d'autres pour rétablir la pression artérielle. Néanmoins, le développement d'une hypotension artérielle chez les patients rapportés par Singer *et coll.* [205] peut être principalement attribuée à l'activation excessive des canaux K_{ATP} par les médicaments initialement administrés.

2. LES CANAUX POTASSIQUES CALCIUM-DEPENDANTS (K_{Ca})

2.1. GENERALITES

Les canaux potassiques calcium-dépendants (K_{Ca}) ont la particularité d'être activés soit par augmentation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire, soit par dépolarisation de la membrane. Ces canaux se différencient selon leur conductance, leur dépendance au voltage, leur sensibilité aux différentes toxines et à différents degrés, en canaux dits de haute conductance (BK_{Ca} – 100 à 300 pS), de conductance intermédiaire (IK_{Ca} – 25 à 100 pS) ou de faible conductance (SK_{Ca} – 2 à 25 pS). Néanmoins, à ce jour, les quatre membres de la famille hautement conservée des canaux SK_{Ca} , les canaux SK1-SK4, incluent les canaux IK_{Ca} . En effet, les canaux IK_{Ca} sont aujourd'hui désignés comme les canaux SK4 du fait de leur haut degré de similitude avec les autres canaux SK_{Ca} .

Les canaux K_{Ca} , largement distribués dans une variété de cellules, peuvent contrôler l'afflux de Ca^{2+} ainsi qu'un certain nombre de processus physiologiques Ca^{2+} -dépendants. Ces canaux jouent un rôle dans le couplage de l'excitation-contraction et de la stimulation-sécrétion. Selon le tissu considéré, la structure et le(s) rôle(s) des canaux K_{Ca} sont à différencier [206] (tableau VI).

Les canaux BK_{Ca} sont distribués à la fois dans les cellules excitables et les cellules non excitables, notamment au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) et non vasculaires, des neurones et des glandes surrénales. Ils sont ainsi impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires comme la repolarisation membranaire, l'excitabilité neuronale, la libération de neurotransmetteurs, la sécrétion d'hormones, l'immunité innée, et la modulation de la tonicité des muscles lisses vasculaires, respiratoires, utérins, gastro-intestinaux et de la vessie.

Le profil d'expression des canaux SK_{Ca} est assez différent de celui des canaux BK_{Ca} . En effet, les canaux SK_{Ca} sont exprimés dans les neurones, l'endothélium, l'épithélium, et plusieurs types de muscles lisses mais pas dans les CMLV. Néanmoins, les canaux SK4 ou IK_{Ca} , originellement identifiés dans les érythrocytes et les lymphocytes, peuvent également être exprimés au niveau des CMLV, mais seulement lorsque les cellules musculaires lisses sont dans un état prolifératif [207].

Tableau VI : Structure et rôle(s) des canaux K_{Ca} en fonction du tissu d'expression [206]

	BK_{Ca}	SK_{Ca} : SK1-3	IK_{Ca} : SK4
Sous-unités	sous-unité α constituant le pore (4) sous-unité β périphérique (4)	sous-unité centrale (4) calmoduline (4)	sous-unité centrale (4) calmoduline (4)
Gènes	1 gène <i>Slo</i> code la sous-unité α 4 gènes codent la sous-unité β (β 1-4)	KCNN1, KCNN2, KCNN3	KCNN4
Expression	cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) cellules musculaires lisses non vasculaires neurones glandes surrénales	endothélium neurones cellules musculaires lisses non vasculaires épithélium	endothélium épithélium CMLV, <u>état prolifératif</u> lymphocytes, érythrocytes
Calcium-dépendant	oui	oui (calmoduline)	oui (calmoduline)
Voltage-dépendant	oui	non	non
Modulation	PKA, PKG (+), PKC (-)	caséine kinase II	N/A
Activateurs	NS1619, benzimidazolone NS1608 oestrogènes	riluzole chlorzoxazone NS309	riluzole chlorzoxazone NS309
Inhibiteurs	TEA paxilline ibériotoxine, charybdotoxine éthanol	apamine bicuculline dequalinium TEA	charybdotoxine clotrimazole TEA
Rôle	régulation de l'excitabilité du muscle lisse régulation du tonus vasculaire, de la pression artérielle, des fonctions érectiles et urinaires	régulation du Ca^{2+} endothélial régulation du tonus vasculaire, de la pression artérielle	régulation du Ca^{2+} endothélial régulation du tonus vasculaire, de la pression artérielle
Pathologies	hypertension dysfonction érectile incontinence urinaire ataxie	hypertension	hypertension resténose

Nous nous intéresserons particulièrement aux canaux BK_{Ca} du fait de leur expression au niveau de la CMLV et de leur implication dans la régulation du tonus vasculaire.

2.2. STRUCTURE DES CANAUX BK_{Ca}

De façon analogue aux canaux K_{ATP}, les canaux BK_{Ca} sont constitués de l'association de quatre sous-unités alpha formant le pore du canal, et de quatre sous-unités périphériques régulatrices bêta (figure 11).

La sous-unité α , codée par le gène *Slo*, est la sous-unité composant le pore du canal et se compose de 11 domaines hydrophobes (S0-S10). Chaque sous-unité α comporte 7 domaines transmembranaires (S0-S6), une région extracellulaire NH₂-terminale, et 4 domaines intracytoplasmiques (S7-S10) avec une extrémité COOH-terminale. De façon similaire à d'autres canaux voltage-dépendants (comme les canaux K_V), le domaine S4 contient plusieurs acides aminés chargés positivement et confère probablement au canal sa sensibilité au voltage. La région formant le pore se situe dans la boucle S5-S6, et l'association de 4 sous-unités α permet la formation d'un canal fonctionnel, même en l'absence des sous-unités β [208]. De récentes études suggèrent que la sous-unité α contient également une sensibilité intrinsèque à la concentration intracellulaire en Ca²⁺. Cela pourrait être conféré par un segment « Ca²⁺ bowl » composé d'acides aminés chargés négativement et situé entre les domaines S9 et S10 intracytoplasmiques de la protéine [209-211], mais aussi par un domaine régulateur de la conductance pour le potassium (RCK) également situé entre la région transmembranaire et la région intracytoplasmique terminale de la protéine [212, 213]. Néanmoins, la présence d'autres sites de liaison ou de sensibilité au Ca²⁺ a été déduite par la capacité du canal à augmenter la concentration intracellulaire en Ca²⁺ même en l'absence de l'ensemble intracellulaire incluant l'extrémité intracytoplasmique, le segment « Ca²⁺ bowl » et le domaine RCK [214].

Le gène *Slo* est le seul gène codant pour la sous-unité α , mais de nombreux variants d'épissage aux propriétés différentes ont été identifiés. Ces variants pourraient expliquer les diverses propriétés des canaux BK_{Ca} rapportées dans différents tissus, par exemple, la sensibilité au voltage, la phosphorylation par la PKA ou la PKG, ou le transport membranaire [215-217]. Cette variabilité est élargie par l'association des sous-unités α avec différents types de sous-unités β .

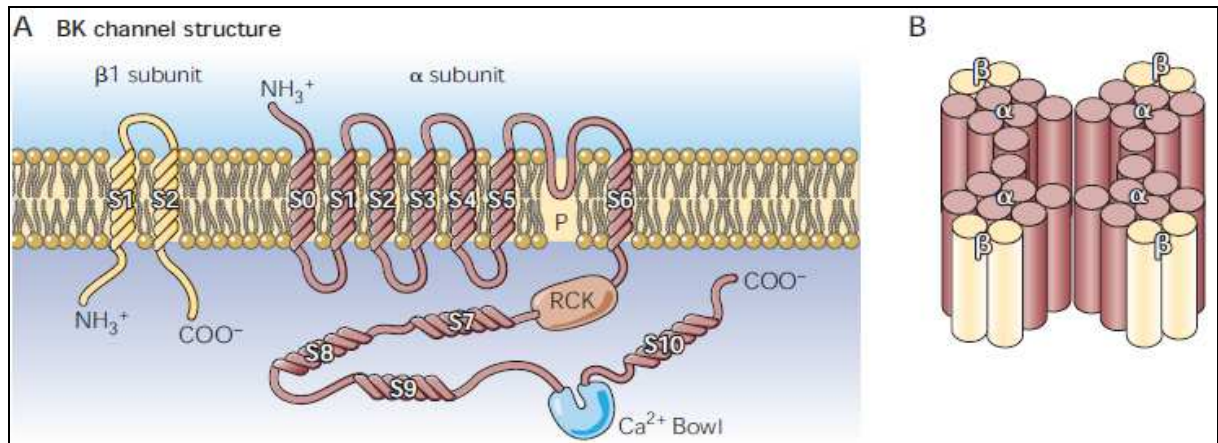


Figure 11 : Structure des canaux BK_{Ca} [206]

La sous-unité β du canal BK_{Ca} est composée de deux domaines transmembranaires avec une longue boucle extracellulaire, alors que les deux extrémités NH_2 et $COOH$ sont intracytoplasmiques. Jusqu'à présent ont été identifiés 4 gènes codant pour la sous-unité β et jusqu'à 8 protéines, chacune ayant des effets différents sur la pharmacologie et l'activation du canal [218-221]. La sous-unité β principalement présente dans les CMLV est l'isoforme $\beta 1$ [218, 222]. Cette dernière interagit avec le domaine S0 et le domaine extracellulaire NH_2 -terminal de la sous-unité α , augmentant ainsi la sensibilité du canal au voltage et au calcium [223-226].

2.3. MODULATION DE L'ACTIVITE DES CANAUX BK_{Ca}

L'activation des canaux BK_{Ca} par le potentiel de membrane n'est pas fixe et dépend plutôt de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} [227]. Cependant, dans des conditions de faible teneur en calcium, le canal BK_{Ca} se comporte comme un canal exclusivement voltage-dépendant [228, 229].

En raison d'une très grande proximité des sites de libération de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique, les canaux BK_{Ca} peuvent être exposés à des concentrations locales et transitoires relativement élevées d'ions Ca^{2+} appelées « *calcium sparks* » ($> 10\mu M$) [230], tandis que le calcium global n'est augmenté que de 2 nM [231, 232]. Les « *calcium sparks* », en vertu de l'élévation massive de la concentration de Ca^{2+} locale, ont le potentiel de moduler des processus Ca^{2+} -dépendants non sensibles à l'augmentation globale de la concentration de Ca^{2+} . Les premières études reliant la libération de Ca^{2+} locale aux courants membranaires ont été rapportées à partir d'enregistrements de courants transitoires spontanés via les canaux K_{Ca} dans les neurones de ganglions sympathiques de grenouille [233-235]. Plus tard, des courants transitoires sortants hyperpolarisants via les canaux BK_{Ca} ont été mesurés dans les CMLV et ont été appelés courants transitoires spontanés sortants ou STOC [236].

Bien que la sous-unité α détermine la sensibilité au calcium de base du canal BK_{Ca} , la sous-unité $\beta 1$ semble être responsable de la traduction des signaux calciques physiologiques pour réguler la fonction vasculaire. En effet, la suppression génique de la sous-unité $\beta 1$ conduit à une diminution de la sensibilité au calcium du canal BK_{Ca} , induisant un phénomène de découplage des canaux BK_{Ca} et des « *calcium sparks* ». Par ailleurs, la suppression de la sous-unité $\beta 1$ conduit à une dépolarisation membranaire plus importante, une élévation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} suivie d'une vasoconstriction et, finalement, à une

élévation de la pression artérielle [223, 237, 238]. Confirmant ces résultats, une mutation induisant un gain de fonction de la sous-unité $\beta 1$ s'est révélée être protectrice contre l'hypertension diastolique chez l'homme par augmentation de la sensibilité du canal BK_{Ca} au calcium et au voltage [239, 240].

D'un point de vue enzymatique, le canal BK_{Ca} peut être phosphorylé au niveau du domaine COOH-terminal de la sous-unité α par plusieurs kinases, notamment la PKA et la PKG, ainsi que la PKC [241, 242] et la tyrosine kinase [243]. La phosphorylation du canal BK_{Ca} sert à moduler sa sensibilité au calcium et au voltage.

Les vasodilatateurs endogènes agissent par augmentation de l'AMPc ou du GMPc. L'adénosine et les agonistes β -adrénergiques peuvent activer les canaux BK_{Ca} via des mécanismes AMPc-dépendants [244] et AMPc-indépendants [245]. Les canaux BK_{Ca} des CMLV peuvent également directement être activés par le NO ou par la production de GMPc [246] [247]. Dans la plupart des cas, la PKA et la PKG activent le canal BK_{Ca} en augmentant sa probabilité d'ouverture, déplaçant ainsi la courbe de sensibilité au voltage vers des valeurs de potentiels de membrane plus négatifs, mais sans affecter la conductance du canal ou sa sensibilité au voltage, cette dernière étant représentée par la pente de la courbe de sensibilité au voltage [248-251]. La PKA ou la PKG peuvent aussi indirectement activer les canaux BK_{Ca} par phosphorylation du phospholamban, ce qui augmente la libération de calcium du RS par désinhibition des pompes SERCAs, induisant des « *calcium sparks* » de fréquence et d'amplitude élevées [231, 252].

Inversement, les vasoconstricteurs, tels que l'angiotensine II et l'endothéline, mènent à l'activation de la PKC, responsable de l'inhibition du canal BK_{Ca} dans le muscle lisse [253] [254-256]. Il a également été signalé que la phosphorylation par la PKC détermine la susceptibilité du canal à être activé par la PKG ou la PKA [257]. Ceci est cohérent avec le constat que la PKC active le canal BK_{Ca} via la PKG dans les CMLV des artères pulmonaires chez le rat [209]. Par ailleurs, l'activation des tyrosine kinases Src, effecteurs de la cascade de signalisation de l'angiotensine II, stimule les canaux BK_{Ca} dans les cellules HEK293 [258], suggérant une régulation complexe des canaux BK_{Ca} par l'angiotensine II.

Ainsi, les connaissances actuelles sur la régulation enzymatique du canal BK_{Ca} suggèrent que les deux PKG et PKA activent les canaux BK_{Ca} , alors que le rôle de la PKC reste incertain.

Les canaux BK_{Ca} peuvent également être activés par des époxydes du métabolisme de l'acide arachidonique identifiés comme *endothelium-derived hyperpolarizing factors* (EDHF) dans certains systèmes [259].

D'un point de vue pharmacologique, plusieurs inhibiteurs des canaux BK_{Ca} ont été identifiés (tableau VI) notamment le TEA, inhibiteur non sélectif des canaux potassiques, certains alcaloïdes tels que la paxilline [260], des inhibiteurs plus puissants et spécifiques comme les toxines de scorpion notamment l'ibériotoxine et la charybdotoxine [261, 262]. Bien que le potentiel thérapeutique de ces composés ne soit pas établi, ils représentent des outils très utiles pour étudier la fonction des canaux BK_{Ca}, en particulier l'ibériotoxine.

Par ailleurs, il existe également des molécules activatrices des canaux BK_{Ca} [263], telles que la benzimidazolone NS-1619 [264], son effet impliquant cependant également l'inhibition des courants calciques et des canaux potassiques voltage-dépendants [265].

D'autres substances peuvent également influencer sur l'activité du canal BK_{Ca}. En effet, il a été démontré que les oestrogènes à des concentrations élevées (micromolaires) se lient aux canaux BK_{Ca}, principalement sur la sous-unité β1, et régulent directement l'expression du canal et sa fonction [266-268]. Les hémoprotéines et les espèces réactives de l'oxygène ont également été signalées comme modulateurs de l'activité des canaux BK_{Ca} [269, 270], car ils inhibent l'activité physiologique des canaux BK_{Ca} du muscle lisse vasculaire, en ciblant la sous-unité α. Enfin, il a été montré que l'éthanol inhibe les canaux BK_{Ca} dans le muscle lisse vasculaire, conduisant à une vasoconstriction excessive [271-273].

2.4. CANAUX BK_{Ca} ET REGULATION DU TONUS VASCULAIRE (FIGURE 12)

Alors que le calcium est responsable de la contraction du muscle lisse, il peut aussi, paradoxalement, activer les canaux BK_{Ca} induisant une hyperpolarisation membranaire et s'opposant ainsi à la contraction du muscle lisse [274].

En raison de leur conductance élevée, l'activation des canaux BK_{Ca} a une forte incidence sur le potentiel de membrane. Les canaux BK_{Ca} diffèrent des autres types de canaux potassiques en raison de leur grande sensibilité à la fois à la concentration en Ca²⁺ intracellulaire et au voltage. Leur rôle est d'induire une relaxation vasculaire lorsque les taux de calcium sont élevés et jouent ainsi un rôle régulateur du flux microvasculaire.

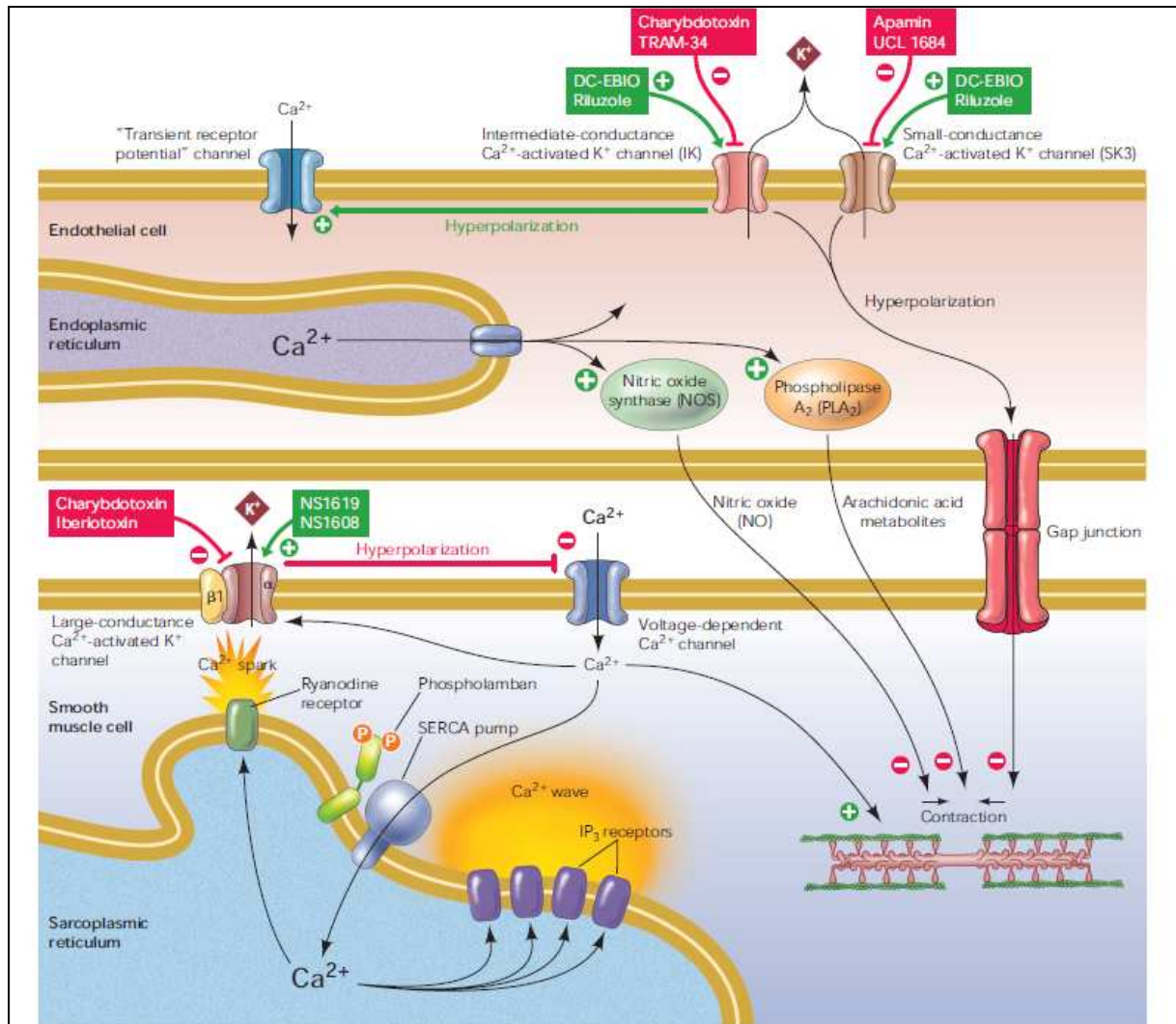


Figure 12 : Canaux KCa et régulation du tonus vasculaire

Les canaux BK_{Ca} ont été largement étudiés dans les CMLV où ils contribuent au contrôle du tonus vasculaire [223, 275].

Les artères de résistance existent physiologiquement dans un état de contraction partiel, à partir duquel elles se contractent davantage ou se dilatent, pour répondre aux besoins de perfusion des différents tissus et organes. Le stimulus physiologique majeur pour la contraction des artères de résistance est l'augmentation de la pression intravasculaire, on parle du tonus myogénique [36]. Les artères de résistance répondent à une augmentation de la pression intravasculaire par une dépolarisation membranaire graduée, une élévation de la concentration de Ca²⁺ intracellulaire via les VOC conduisant à la contraction [276]. Il existe un certain nombre de mécanismes de rétrocontrôle négatif à l'augmentation du Ca²⁺ intracellulaire dans les CMLV, notamment l'activation des canaux BK_{Ca} [277]. Par exemple, dans les CMLV des artères cérébrales, les « *calcium sparks* » activent les canaux BK_{Ca} qui, à leur tour exercent un rétrocontrôle négatif en régulant la vasoconstriction [232, 278]. L'inhibition des canaux BK_{Ca} par l'ibériotoxine induit une dépolarisation membranaire, suivie d'une élévation du Ca²⁺ intracellulaire puis d'une vasoconstriction [223, 277, 278].

2.5. CANAUX BK_{Ca} ET MALADIES CARDIOVASCULAIRES

Le rôle des canaux BK_{Ca} à la fois dans les cellules musculaires lisses et l'endothélium suggère une implication dans les maladies cardiovasculaires. En effet, la prévalence de l'hypertension augmente avec l'âge, et cela est corrélé à une réduction d'expression des canaux BK_{Ca} [225, 279]. Un certain nombre de conclusions récentes ont rapporté l'importance des canaux BK_{Ca} des CMLV dans la régulation du tonus vasculaire et de la pression artérielle. L'ablation du gène de la sous-unité β1 spécifique du canal BK_{Ca} du muscle lisse a conduit à une augmentation du tonus vasculaire, à l'hypertension et à une hypertrophie ventriculaire gauche chez des souris [237]. En 2004, Fernández-Fernández *et coll.* [239] ont rapporté que la mutation du gène de la sous-unité β1 chez l'homme, conduisant à un gain de fonction du canal BK_{Ca}, a été associée à une faible incidence d'hypertension diastolique. Par ailleurs, l'expression relative de la sous-unité β1 par rapport à celle de la sous-unité α a été rapportée diminuée chez des rats chroniquement hypertendus [280]. Conformément aux conséquences de l'ablation de la sous-unité β1, l'ablation du gène *Slo* a conduit à une augmentation de la tonicité vasculaire et à l'hypertension [281] ainsi qu'à d'autres pathologies telles que l'ataxie [282], l'incontinence urinaire [283], et la dysfonction érectile [284]. En outre, les espèces

réactives de l'oxygène ont été capables d'inhiber l'activité du canal BK_{Ca}, révélant un dysfonctionnement vasculaire impliquant le stress oxydant [269]. Ces résultats fournissent une justification solide d'une utilisation potentielle d'activateurs sélectifs des canaux BK_{Ca} dans la prévention et le traitement des maladies cardiovasculaires.

2.6. CANAUX BK_{Ca} ET ETATS DE CHOC

Il a été démontré que l'activation anormale des canaux BK_{Ca} est impliquée dans la dysfonction vasculaire des états de choc. En effet, les canaux BK_{Ca} sont activés après l'injection d'endotoxine ou l'induction d'une péritonite chez le rat [190, 285], et il a été démontré que l'inhibition des canaux BK_{Ca} permet de restaurer la réactivité vasculaire [286] et de réduire la mortalité induite par le LPS lorsqu'elle a été associée à l'inhibition non sélective de la guanylate cyclase soluble et de la iNOS par le bleu de méthylène [287]. En outre, au cours d'une étude clinique, l'inhibiteur non sélectif des canaux potassiques, le tétraéthylammonium (TEA), a totalement restauré la réactivité vasculaire à la noradrénaline chez des volontaires sains ayant reçu de l'endotoxine [288].

Certains auteurs, Clayton *et coll.* [289], ont cependant rapporté que le TEA n'a pas été efficace face à l'hypotension induite par le LPS chez des rats, et a également induit une réduction de leur survie de 50%.

Par conséquent, l'inhibition des canaux BK_{Ca} représente une cible thérapeutique potentielle pour le traitement de la dysfonction vasculaire dans le choc septique. Cependant, comme les canaux K_{ATP}, les canaux BK_{Ca} sont largement exprimés dans les tissus autres que le système vasculaire [290], et inhiber ces canaux peut avoir d'autres actions dont il faudra déterminer les conséquences dans l'état de choc.

Les deux inhibiteurs, le TEA et la paxilline (inhibiteur plus spécifique des canaux BK_{Ca}), ont empêché la libération précoce de cytokines des macrophages suite à l'administration de LPS [291, 292]. Cependant, les macrophages de souris knock-out pour le gène BK et de souris de type sauvage (WT) ont présenté des réponses identiques au LPS, suggérant que les propriétés anti-inflammatoires de ces agents ne sont pas liées à l'inhibition des canaux BK_{Ca} [293].

Des souris knock-out pour le gène de la sous-unité α ainsi que pour le gène de la sous-unité β des canaux BK_{Ca} ont été générées [238, 281]. La délétion du gène de la sous-unité α inhibe

complètement la fonction du canal, tandis que celle de la sous-unité β induit des canaux dont l'activation nécessite des concentrations de calcium beaucoup plus élevées [238]. La sous-unité β n'a pas été étudiée dans des modèles de choc septique, bien qu'elle ait été impliquée dans l'hypersensibilité des canaux BK_{Ca} au cours de l'état de choc hémorragique [294]. Toutefois, comme le NO induit la phosphorylation de la sous-unité α via la PKG ou la tyrosine kinase, et que la relaxation GMPc-dépendante est nettement atténuée chez les souris KO pour la sous-unité α , ce modèle paraît plus approprié pour l'étude de la fonction des canaux BK_{Ca} [281, 295].

Ainsi, O'Brien *et coll.* [296] ont étudié un modèle de souris KO pour le gène de la sous-unité α du canal BK_{Ca} . Les auteurs ont voulu déterminer si ce modèle était résistant à l'hypotension induite par une péritonite et s'il présentait un avantage en terme de survie par rapport aux souris WT. La différence de pression artérielle de base entre les souris WT et KO $BK\alpha^{-/-}$ a été faible (environ 5 mmHg) et similaire à celle rapportée par Sausbier *et coll.* [281]. Contrairement à ce qui était attendu, les deux groupes de souris septiques WT et KO $BK\alpha^{-/-}$ ont développé des degrés similaires d'hypotension et de dysfonction myocardique, ainsi qu'une augmentation similaire des niveaux de cytokines pro-inflammatoires, de production de NO et d'acidose métabolique. Le temps de survie a cependant été réduit chez les souris septiques KO $BK\alpha^{-/-}$ par rapport aux souris septiques WT. En outre, l'expression de l'ARNm du gène de la sous-unité $BK\alpha$ n'a pas augmenté dans les aortes provenant des souris WT septiques comparativement aux souris WT sham. Par conséquent, les auteurs concluent que l'activation des canaux BK_{Ca} n'est pas un facteur déterminant de l'hypotension chez la souris septique.

Ces résultats contredisent plusieurs études montrant l'activation de ces canaux dans divers modèles expérimentaux d'inflammation, avec une inhibition partielle ou totale de l'hyperpolarisation ou de l'hyporéactivité vasculaire [285-287]. Cependant, ces études ont utilisé un seul bolus i.v. d'endotoxine (ou de TNF α) pour reproduire un modèle d'inflammation systémique. L'induction d'une inflammation aiguë sévère dans ces modèles n'est pas représentative d'un choc septique avec inflammation systémique et où la progression de la maladie est plus graduelle.

Malgré les explications plausibles de ces différences, la perte du canal BK_{Ca} peut être compensée par la régulation à la hausse d'autres canaux potassiques ou d'autres mécanismes vasodilatateurs.

3. LES METHODES D'ETUDE DES CANAUX POTASSIQUES

Les fonctions et les propriétés des canaux potassiques vasculaires ont été étudiées grâce à plusieurs techniques. Les méthodes utilisées vont de la mesure de courants ioniques à l'investigation *in vivo* des fonctions des canaux via des expérimentations sur modèle entier [9, 170, 297], en passant par l'utilisation d'agents pharmacologiques de plus en plus sélectifs. Nous détaillerons certaines de ces techniques ci-après.

3.1. ELECTROPHYSIOLOGIE

3.1.1. TECHNIQUE DE *PATCH-CLAMP*

L'électrophysiologie, et en particulier les différentes variantes de *patch-clamp*, offre la possibilité de visualiser et d'enregistrer en temps réel l'activité électrique membranaire engendrée par les canaux ioniques au niveau d'une cellule entière ou d'un morceau de membrane de cellule [297]. La technique du *patch-clamp* peut ainsi permettre d'étudier le fonctionnement des canaux à l'échelon unitaire. Pour cela, un fragment de membrane est isolé du reste de la membrane cellulaire dans une micropipette de verre dont le diamètre de la pointe est de l'ordre de 1 μm . A l'intérieur de la micropipette est disposée une électrode qui convertit les courants ioniques en courants électriques qui peuvent être mesurés avec précision.

Il existe plusieurs configurations membranaires de *patch clamp* parmi lesquelles :

La configuration membranaire appelée « **cellule entière** » (*whole-cell*) mesure l'activité macroscopique de l'ensemble des courants de la cellule. Cette configuration est caractérisée par la rupture de la membrane obtenue par l'application d'une forte dépression à l'intérieur de la pipette. La rupture crée une voie de communication entre la pipette et le cytosol, et entraîne la diffusion progressive du milieu intrapipette dans le cytoplasme tout au long de l'enregistrement. Il est alors possible d'enregistrer des courants macroscopiques résultant de l'activité de N canaux répartis sur l'ensemble de la membrane cellulaire. Cette technique est utilisée lorsque la conductance unitaire est en dessous du seuil de détection. Elle est aussi utilisée lorsque les propriétés biophysiques du canal sont trop complexes ou que le type de question posé par l'expérimentateur est de l'ordre de la physiologie de la cellule.

La configuration membranaire « **patch-perforée** » est utile quand il est souhaitable de maintenir au maximum l'intégrité cytoplasmique de la cellule, par exemple, dans le but d'étudier les voies de signalisation cellulaire impliquant les canaux potassiques. Elle conduit, contrairement à la configuration « cellule entière », non pas à rompre mais à perforer par la création de pores artificiels le fragment contenu dans la pipette. Cela permet ainsi d'imposer un potentiel à la membrane tout en maintenant le contenu cellulaire en molécules actives. Elle est permise par l'utilisation d'antibiotiques, tels que la nystatine ou l'amphotéricine B, qui agissent sous forme de micelles et s'insèrent, sans pénétrer dans le cytosol, entre les molécules de cholestérol et d'ergostérol de la bicouche lipidique du fragment membranaire contenu dans la pipette. Elles forment alors des pores de 8 Å de diamètre qui, perméables aux petits cations monovalents (Na^+ , K^+ ...) mais pas aux cations divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+}), ne sont pas sensibles au potentiel assurant la stabilité électrique du système.

La configuration membranaire "*inside-out*" (signifiant « interne à l'extérieur »), où le fragment de membrane accolé à la pipette de mesure a sa face intracellulaire en contact avec l'extérieur de la pipette. Cette méthode est typiquement utilisée pour l'étude de canaux activés par fixation d'un ligand, comme par exemple le canal récepteur à l'ACh nicotinique ou les canaux GABA. Cette configuration est plus difficile à obtenir que celle « *outside-out* », ce qui explique que son choix se limite à cette classe de canaux.

La configuration membranaire "*outside-out*" (signifiant « externe à l'extérieur »), où le fragment de membrane accolé à la pipette de mesure a sa face intracellulaire en contact avec l'intérieur de la pipette. C'est la configuration de choix pour l'étude unitaire de tous les canaux ioniques, sauf ceux dont l'ouverture nécessite la fixation d'un ligand (voir ci-dessus).

Ces deux dernières configurations sont des patches excisés et permettent de mesurer l'activité d'un seul canal ionique.

Un inconvénient de la technique du *patch-clamp* est qu'elle nécessite des cellules isolées, qui ne peuvent être obtenues dans le muscle lisse que par digestion enzymatique, ce qui peut compromettre l'intégrité de la membrane cytoplasmique de la cellule étudiée.

3.1.2. MESURE DU POTENTIEL DE MEMBRANE

Certaines techniques, ultérieures à la technique du *patch-clamp*, permettent d'accéder au potentiel intracellulaire via l'utilisation de microélectrodes « Sharp » également en verre mais dont la pointe acérée transperce la membrane cellulaire. Ces électrodes permettent l'enregistrement du potentiel de membrane des cellules musculaires lisses au niveau de préparations tissulaires. Ces mesures de potentiel de membrane sont encore extrêmement utiles pour l'étude des effets de l'activation ou l'inhibition des canaux potassiques dans le muscle lisse vasculaire [190].

3.2. UTILISATION D'ISOTOPES RADIOACTIFS

L'efflux de radio-isotopes de potassium K^+ ou de rubidium Rb^+ fournit un indice simple mais indirect de l'activité des canaux potassiques. L'efflux sera augmenté en cas d'activation/ouverture des canaux potassiques, et diminué en cas d'inhibition/fermeture. Dans certaines études, l'efflux du radio-isotope ^{42}K a été utilisé, présentant l'avantage de refléter directement la perméabilité membranaire aux ions K^+ . Cependant, le radio-isotope ^{42}K est caractérisé par une demi-vie relativement courte, d'environ 12 h, ce qui rend les expériences techniquement difficiles [298]. Ainsi, le radio-isotope ^{86}Rb , qui a une demi-vie plus longue, a souvent été utilisé comme substitut au K^+ dans les études d'efflux, en considérant que le Rb^+ est capable de pénétrer les canaux potassiques de manière efficace. Néanmoins, bien que les résultats avec les radio-isotopes ^{86}Rb et ^{42}K sont qualitativement similaires, le Rb^+ inhibe les canaux K_{ir} et K_{ATP} , provoquant une importante sous-estimation de la modification de la perméabilité au K^+ [299-301]. Par exemple, l'ensemble des courants cellulaires de Rb^+ suite à l'activation des canaux K_{ATP} via le cromakalim au niveau des cellules musculaires lisses intestinales représente moins d'un vingtième de l'ampleur des courants K^+ [302]. Par ailleurs, l'hyperpolarisation membranaire peut également activer les canaux K_v et K_{Ca} présents dans la membrane cellulaire, affectant aussi l'efflux mesuré.

Malgré ces complications, les études d'efflux représentent une méthode utile pour évaluer la fonction des canaux potassiques dans les tissus intacts.

3.3. ETUDE *IN VITRO* DE LA CONTRACTION DU MUSCLE LISSE VASCULAIRE

3.3.1. MYOGRAPHIE

En général, l'activation des canaux potassiques induit la relaxation des muscles lisses, alors que leur inhibition en provoque la contraction. Il est possible de mesurer ces effets *in vitro* par la mesure de la contraction/relaxation d'anneaux vasculaires, soigneusement disséqués et montés sur un myographe, en présence d'activateurs ou d'inhibiteurs des canaux potassiques. La méthodologie relative à la technique de myographie est détaillée ultérieurement dans la section « **Etude 1** » paragraphe **2.3.1**.

3.3.2. ARTERIOGRAPHIE

Cette technique permet l'étude de la réactivité vasculaire à la pression et au flux de vaisseaux isolés de petit calibre, associé à un suivi vidéo en continu du diamètre vasculaire. L'analyse est réalisée à l'aide d'un artériographe (figure 13).

Deux canules de verre d'un diamètre d'environ 125 μm permettent de placer une artère de petit calibre de 100 à 300 μm de diamètre. Les artères sont préalablement disséquées et isolées sur glace, puis un segment est canulé *in vitro* dans l'artériographe. Le choix du terrain d'étude vasculaire doit être vierge de collatérales afin d'observer l'étanchéité du montage. Les ligatures sur chaque canule assurent à la fois l'étanchéité et le maintien du montage. Le débit est contrôlé par une pompe située en amont du vaisseau, la pression est mesurée en amont (P1) et en aval (P2) du vaisseau. La pression moyenne entre entrée et sortie est contrôlée par un système de contrôle de pression. Ce système permet de faire varier indépendamment la pression et le débit intraluminaux.

Après le montage de l'artère, l'artériographe est disposé sur un microscope à focale inversée équipé d'une caméra vidéo reliée à une interface d'analyse de contraste. Après étalonnage du système vidéo au moyen d'une cellule de Thomas gravée par tranches de 25 et 50 μm , le diamètre intraluminal de l'artère est enregistré. Au circuit de perfusion intraluminaire vient s'ajouter un second circuit permettant la perfusion de solution saline maintenue à 37 °C dans la cuve de l'artériographe.

Après stabilisation, les segments d'artères sont soumis à des paliers de flux pour déterminer la dilatation au flux des artères, en absence et en présence de différents agents pharmacologiques [303], tels que des inhibiteurs des canaux potassiques afin d'évaluer leur implication dans la réactivité vasculaire.

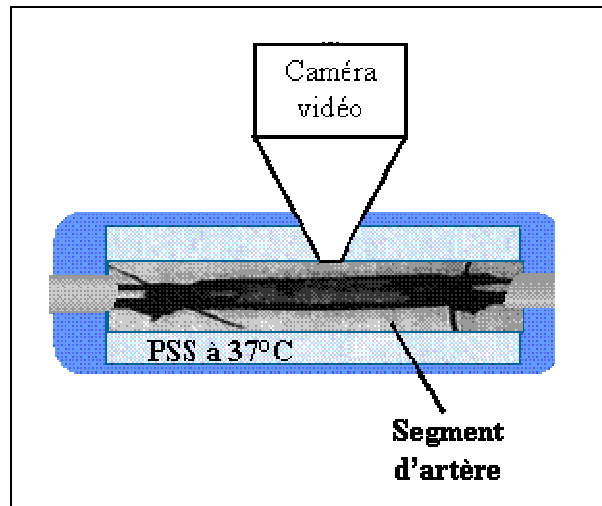
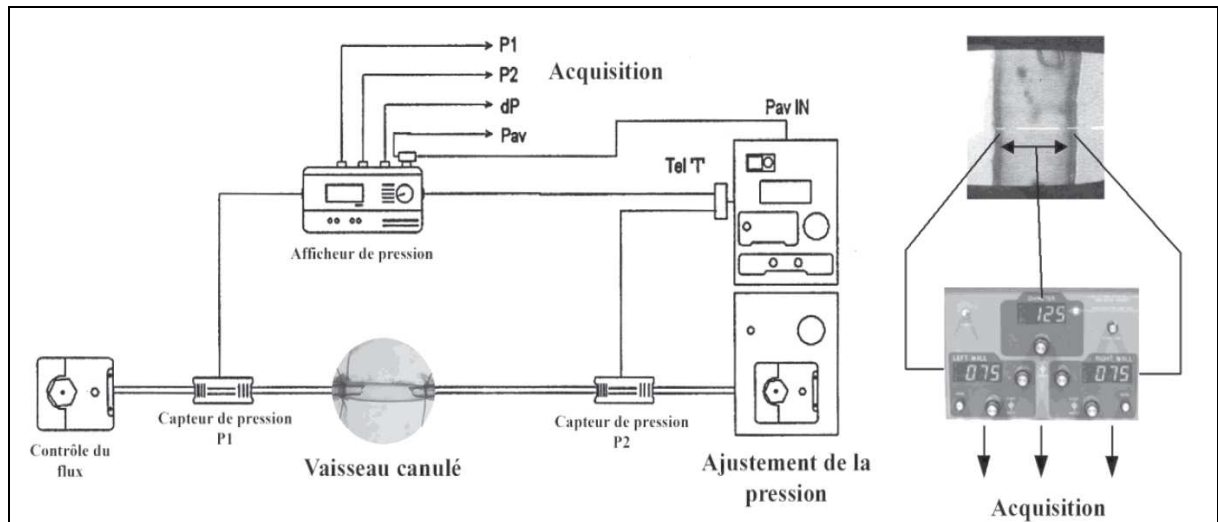


Figure 13 : Représentation schématique d'un artériographe

3.4. BIOLOGIE MOLECULAIRE

L'étude de l'expression des canaux potassiques peut être réalisée par des techniques de biologie moléculaire telles que la PCR et le Western blot.

La méthodologie relative à ces deux techniques est détaillée ultérieurement dans la section « **Etude 1** », paragraphes **2.3.2** et **2.3.3**.

3.5. ETUDE *IN VIVO* DES CONSEQUENCES FONCTIONNELLES DE L'ACTIVITE DES CANAUX POTASSIQUES VASCULAIRES

Un grand nombre de travaux ont été publiés sur l'influence de l'activité des canaux potassiques sur la réponse physiologique *in vivo* des cellules musculaires lisses, et une grande partie de ces travaux concerne les canaux potassiques vasculaires. Ces études peuvent impliquer la mesure de la pression artérielle systémique, mais également la mesure du débit sanguin, en particulier, dans les lits vasculaires d'animaux instrumentés anesthésiés [62, 164-168], ou chez l'homme ([170, 171, 194, 288]. Il est également possible d'acquérir une image optique du diamètre individuel d'artères et d'artérioles *in vivo*, dans certains lits vasculaires, notamment les circulations rénale [304], coronaire [305, 306], et cérébrale [307].

La majorité de ces études ont eu recours à l'utilisation d'inhibiteurs sélectifs des canaux potassiques afin de mettre en évidence leur implication dans la régulation du tonus vasculaire.

OBJECTIFS DE LA THESE

L'objectif général de ce travail de recherche est de déterminer l'implication des canaux potassiques vasculaires dans la physiopathologie de la dysfonction vasculaire des états de choc, quelle qu'en soit l'étiologie, et de déterminer le rôle du NO dans l'implication de ces canaux.

Une première partie du travail (Etude 1) a porté sur l'étude de l'implication des canaux potassiques ATP et calcium-dépendants dans l'hyporéactivité vasculaire au cours de modèles expérimentaux de choc septique.

Nous avons étudié deux modèles expérimentaux de choc septique chez le rat : un modèle de choc septique aigu, le choc endotoxinique par injection de lipopolysaccharide (LPS), et un modèle de choc septique subaigu, à savoir une péritonite par ligature et perforation caecale (CLP).

Une partie de ces travaux a donné suite à une publication présentée en annexe 3.

Dans une seconde partie du travail (Etude 2), nous avons cherché à établir si l'implication des canaux potassiques est un mécanisme commun aux états de choc vasoplégiques, et avons élargi l'étude au choc hémorragique.

Nous avons utilisé deux modèles expérimentaux de choc hémorragique chez le rat : un modèle de choc hémorragique aigu, non réanimé, et un modèle de choc hémorragique avec laparotomie et réanimation.

ETUDE 1

1. HYPOTHESE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL

Parmi les mécanismes incriminés dans l'hyperoréactivité vasculaire observée au cours de l'état de choc septique sont retrouvées l'hyperproduction de NO et l'hyperactivation des canaux potassiques vasculaires (canaux K_{ATP} et BK_{Ca}).

Dans la présente étude, nous avons posé l'hypothèse que l'expression des canaux potassiques vasculaires était augmentée dans l'état de choc septique, et que cette augmentation d'expression était en partie due à l'augmentation de la production de NO via l'activation du facteur nucléaire NF- κ B [10].

Ainsi, nous nous sommes intéressés à deux modèles expérimentaux de choc septique, afin d'une part (i) d'étudier les effets d'inhibiteurs des canaux K_{ATP} et BK_{Ca} sur les paramètres hémodynamiques, et d'autre part (ii) d'étudier la réactivité vasculaire *in vivo* et *ex vivo* de l'aorte (artère de compliance) et des artères mésentériques (artères de résistance) en présence ou non de ces inhibiteurs.

Puis, nous avons étudié l'influence de l'état de choc septique (i) sur l'expression des canaux potassiques vasculaires par PCR quantitative en temps réel et Western blot, (ii) sur la production de NO tissulaire et l'activation du facteur NF- κ B, (iii) cela en présence ou non d'inhibiteurs de la voie du NO.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. EXPERIMENTATION ANIMALE

Les animaux ont été traités en accord avec la réglementation française et européenne concernant l'expérimentation animale. Des rats mâles Wistar (300-320 g ; Dépré, Saint Doulchard, France) ont été hébergés dans des conditions contrôlées (pièce thermorégulée à 22°C et éclairée 12 heures sur 24) et de stress minimal. Les animaux ont eu accès libre à l'eau et à la nourriture.

Chaque rat a été anesthésié par administration intrapéritonéale de thiopental (Hospira SAS, France), puis a été trachéotomisé et ventilé. La ventilation mécanique a été maintenue avec un

volume courant de 1 ml/100 g et une fréquence de 100/min. La température rectale des rats a été continuellement relevée et maintenue à 37°C.

Modèles expérimentaux de choc septique

- *Modèle de choc septique aigu (choc endotoxinique) :*

Le choc endotoxinique a été réalisé par perfusion intraveineuse de lipopolysaccharide (LPS) (*Escherichia Coli* O127 : B8, Sigma Aldrich, St Quentin-Fallavier, France) à la dose de 10mg/kg pendant une heure, suivi d'un remplissage vasculaire par NaCl 0,9% [10 ml/100 g] (B.Braun Medical, France) pendant 4 heures.

Le groupe sham_{LPS} a été perfusé avec une solution de NaCl 0,9% à la place de la solution de LPS.

- *Modèle de choc septique subaigu (péritonite par ligature et perforation caecale ou CLP) :*

Sous anesthésie générale, réalisée par l'administration intrapéritonéale de kétamine (Panpharma Laboratoire, France) à la dose de 150 mg/kg associée si nécessaire à un bolus de 50 mg/kg, nous avons procédé à la ligature puis à la perforation du caecum des rats avant de les suturer puis de les réanimer par l'administration sous-cutanée de NaCl 0,9% [5 ml/100 g]. L'analgésie a été réalisée au moment du réveil par l'injection de 2mg/kg de nalbuphine (ampoule injectable de 20 mg/2 ml, Serb, Paris). Ce modèle a été observé à 6, 18 et 30 heures afin d'étudier les phases aiguë, intermédiaire et tardive du choc septique.

Dans le groupe sham_{CLP}, le caecum des rats a été manipulé puis réinséré dans la cavité péritonéale sans perforation ni ligature.

Pour chaque type de choc (LPS et CLP), les animaux ont été randomisés en trois sous-groupes (n=7). Dans le premier sous-groupe, l'évaluation de la réactivité vasculaire a été réalisée *in vivo* en fin d'expérimentation. Dans le deuxième sous-groupe, au terme des chocs les différents tissus et organes ont été immédiatement prélevés, congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à leur analyse en biologie moléculaire. Dans le troisième sous-groupe, l'aorte et les artères mésentériques ou *small mesenteric arteries* (SMA) ont été soigneusement prélevées puis utilisées pour l'évaluation *ex vivo* de la réactivité vasculaire.

Enfin, nous précisons que le groupe CLP 30h n'a été utilisé que pour l'étude de l'expression protéique des canaux potassiques par Western blot. Etant caractérisé par un état de choc relativement sévère avec une mortalité s'élevant à 80%, ce groupe n'a pas fait l'objet d'épreuve de réactivité vasculaire.

2.2. ETUDES *IN VIVO*

2.2.1. EVALUATION DES EFFETS DE LA NORADRENALINE SUR LA PRESSION ARTERIELLE ET LE DEBIT SANGUIN AORTIQUE

La veine jugulaire et l'artère carotidienne gauches ont été cathétérisées respectivement pour l'administration des perfusions intraveineuses et pour le suivi de la pression artérielle moyenne (PAM) grâce à une sonde de pression reliée au système d'acquisition des données IOX (EMKA Technologies, Paris, France). La mesure du débit aortique abdominal, paramètre considéré comme le reflet du débit cardiaque, a également été réalisée grâce à une sonde périvasculaire placée autour de l'aorte abdominale, sonde reliée à un doppler Transonic (TX206 fluorometer, Transonic Systems, Ithaca, USA). Après l'instrumentation, une période de repos de 30 min a été respectée afin que les paramètres hémodynamiques des rats se stabilisent.

Pour chaque groupe (n = 7), ont été enregistrées les valeurs basale et maximale de pression artérielle moyenne et de débit sanguin aortique abdominal obtenues après l'administration de 1 µg/kg en bolus de noradrénaline (ampoule de tartrate de noradrénaline, 8mg/4ml, Renaudin, France). Cette épreuve de réactivité cardiaque et vasculaire a été réalisée à H4 après l'injection de LPS et à H6 et H18 dans le modèle CLP.

2.2.2. MODULATION PHARMACOLOGIQUE

Tous les inhibiteurs pharmacologiques ont été achetés chez Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France).

Le PNU-37883A (guanidine; chlorhydrate de 4-morpholinecarboximidine-N-1-adamantyl-N'-cyclohexyl) a été dissous dans un mélange 1:1 de DMSO et administré par voie intraveineuse en bolus à la dose de 1,5 mg/kg, suivie par 1 mg/kg/h pendant 1 heure avant l'évaluation de la réponse à la noradrénaline.

L'ibériotoxine (IbTX) a été reconstituée avec de l'eau pour préparation injectable. Cet inhibiteur a été administré par voie intraveineuse selon plusieurs schémas : soit en bolus de 10 µg/kg suivi par 10 µg/kg/h pendant 1 h, soit en bolus de 1 µg/kg ou 100 µg/kg administrés 30 min avant l'évaluation de la réponse à la noradrénaline.

La dexaméthasone, l'aminoguanidine et l'inhibiteur sélectif 1400W de la iNOS ont été administrés à T0 par voie intrapéritonéale respectivement à la dose de 1 mg/kg, 100 mg/kg et 20 mg/kg.

2.3. ETUDE *EX VIVO*

2.3.1. DETERMINATION DU PH ARTERIEL ET DE LA LACTATEMIE

Au terme des expérimentations, le pH artériel et la lactatémie ont été déterminés sur l'appareil de mesure ABL 735, Radiometer, Copenhague, Danemark.

2.3.2. ETUDE DE LA REACTIVITE VASCULAIRE PAR MYOGRAPHIE

Quatre groupes de 7 rats ont été étudiés i) le groupe sham_{CLP}, ii) le groupe CLP18h iii) le groupe CLP18h + PNU-37883A et iv) le groupe CLP18h + 1400W.

Après anesthésie des rats, les segments d'aorte et d'artères mésentériques (SMA) (de 200 à 230 μm de diamètre) ont été soigneusement disséqués et montés sur un myographe (danois Myo technologie, Arhus, Danemark) selon le schéma de la figure 14.

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 à l'aide d'un micromètre. L'autre tige métallique est reliée à un capteur de force (jauge de contrainte, mesure de force isométrique) lui-même relié à un amplificateur et à un système d'acquisition et de traitement des données. Chaque segment est immergé dans une cuve de 10 ml contenant une solution physiologique (pH 7,4 ; composition : 119 mM NaCl, 14,9 mM NaHCO₃, 4,7 mM KCl, 2,5 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄ 7 H₂O, 1,18 mM KH₂PO₄, 5,5 mM glucose). La solution est bullée avec un mélange de 95% O₂ et 5% CO₂ et rincée toutes les 15 minutes.

Les anneaux aortiques et mésentériques ont été étirés à une tension de 5 mN, permettant le développement d'une tension suffisante pour qu'ils puissent à nouveau exercer leur activité vasomotrice.

Après une période de stabilisation de 20 minutes, la contraction maximale des vaisseaux a été mesurée en deux étapes : dépolarisation dans un bain de KCl (100 mM), puis contraction au KCl (100 mM) + phényléphrine (10 μM).

La courbe « concentration-réponse » à la phényléphrine a été déterminée par l'administration de cet agoniste vasoconstricteur cumulatif (1 nM à 100 μM) et a permis de déterminer la concentration de phényléphrine produisant un niveau égal de contraction dans les différents groupes.

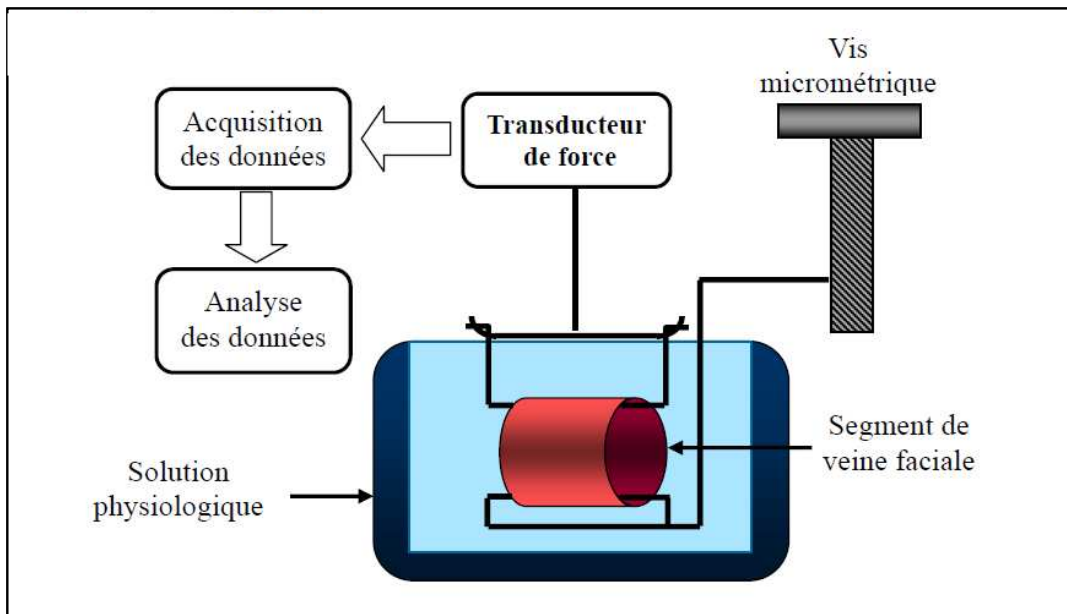


Figure 14 : Représentation schématique d'un myographe

Pour étudier le rôle du NO sur l'implication des canaux potassiques (K_{ATP} et BK_{Ca}), les expériences de réactivité vasculaire ont été menées en présence ou en l'absence de l'inhibiteur 1400W de la iNOS (100 μ M).

2.3.3. ANALYSE DE L'EXPRESSION DES ARN MESSAGERS (ARNM) DES CANAUX POTASSIQUES VASCULAIRES, K_{ATP} ET BK_{Ca} , PAR PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL

Au terme de chaque expérimentation, ont été notamment prélevées l'aorte et les SMA. Ces vaisseaux ont été immédiatement congelés dans l'azote liquide puis conservés à -80°C dans l'attente de l'analyse en biologie moléculaire.

Nous avons réalisé une réaction en chaîne par polymérase (PCR pour *Polymerase Chain Reaction*) afin d'étudier l'influence de l'état de choc septique expérimental sur l'expression des ARNm des sous-unités vasculaires des canaux K_{ATP} , soit Kir 6.1 et SUR2B, et de la sous-unité alpha des canaux BK_{Ca} , au niveau de l'aorte et des artères mésentériques. Par ailleurs, l'expression vasculaire de l'ARNm de la iNOS a également été déterminée.

Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux ont été extraits et purifiés à l'aide d'un protocole couplant une extraction par Trizol/chloroforme et une purification sur colonne (RNeasy Mini Kit, QIAGEN S.A., Saint Ulis, France). Pour chaque échantillon, le tissu a été broyé dans l'azote liquide puis homogénéisé dans 1 ml de Trizol (Euromedex, Souffelweyersheim, France). Après ajout de 200 μ l de chloroforme, homogénéisation et incubation pendant 3 minutes à température ambiante (TA), une centrifugation [12 000 g – 15 min - $+4^{\circ}\text{C}$] a permis d'isoler et de collecter les ARN restés exclusivement dans la phase aqueuse supérieure. Après ajout d'un volume égal d'éthanol 70 %, les ARN totaux ont ensuite été purifiés sur colonne, traités par de la DNase I (QIAGEN) [30 U – 15 min - TA], puis de nouveau purifiés sur colonne. Enfin, les ARN ont été élués par de l'eau RNase free.

Evaluation quantitative et qualitative des ARN extraits

La concentration en ARN totaux a été déterminée par mesure de l'absorbance à 260 nm (BioPhotometer, Eppendorf, Le Pecq, France) [on estime qu'une unité d'absorbance à 260 nm correspond à 40 μ g/ml d'ARN]. De plus, le ratio des absorbances A_{260}/A_{280} a permis de rendre compte de la pureté des échantillons et d'une éventuelle contamination par des

protéines ou par les solvants utilisés lors de l'extraction. Ce ratio doit être compris entre 1,8 et 2,0.

L'intégrité des ARN extraits a été confirmée par migration électrophorétique sur gel d'agarose à 0,8 % contenant 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium (BET, Sigma Aldrich) et distinction des trois bandes correspondantes aux ARN ribosomiaux (28S, 18S et 5,8S) après visualisation sous UV (Bio-Rad Gel Doc 1000, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France).

Transcription inverse (Reverse Transcription ou RT)

La transcription inverse a été effectuée avec le iCycler (Bio-Rad). Cette étape a permis la synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) à partir d'1 µg d'ARN total sous l'action d'une enzyme, la reverse transcriptase. Les ARN ont été préalablement dénaturés [95°C – 2 min] puis figés dans la glace. Pour chaque échantillon, le mix de RT a été préparé sur la glace avec des concentrations finales de 1 mM de dNTP (Fermentas, saint Rémy Les Chevreuse, France), 0,5 µM d'oligo(dT)₁₈, 1 U/µl de RNase inhibitor (Fermentas), 1x de Buffer (Fermentas), 10 U/µl de MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas) et de l'eau RNase free pour ajuster le volume réactionnel final de RT à 20 µl. Au cours de chaque RT, un contrôle négatif a été inclus en remplaçant la reverse transcriptase par de l'eau RNase free afin de détecter une éventuelle contamination des ARN extraits par de l'ADN génomique après réalisation de la PCR. L'ADNc a été synthétisé à 42°C pendant 90 minutes suivi de 10 minutes à 70°C de manière à inactiver la MuLV Reverse Transcriptase. Les échantillons d'ADNc ont été conservés à -20°C dans l'attente de la réalisation de la PCR quantitative en temps réel.

PCR quantitative en temps réel

Principe

La PCR est une technique d'amplification exponentielle d'un segment d'ADN d'un gène cible (amplicon) par un procédé d'extension d'amorces (figure 15). Elle consiste à utiliser deux amorces oligonucléotidiques complémentaires des extrémités 3' des deux brins d'ADN encadrant ainsi la séquence à amplifier. Sous l'action de l'ADN polymérase, chaque amorce est allongée dans le sens 5'3' d'une séquence complémentaire du brin matrice. La répétition des cycles de température aboutit à une amplification exponentielle de la séquence cible considérée.

La technique de PCR en temps réel permet de détecter les produits de PCR par fluorescence au cours de chaque cycle et en temps réel. Cette technique présente l'avantage de permettre une quantification reproductible, d'une grande sensibilité et d'être rapide.

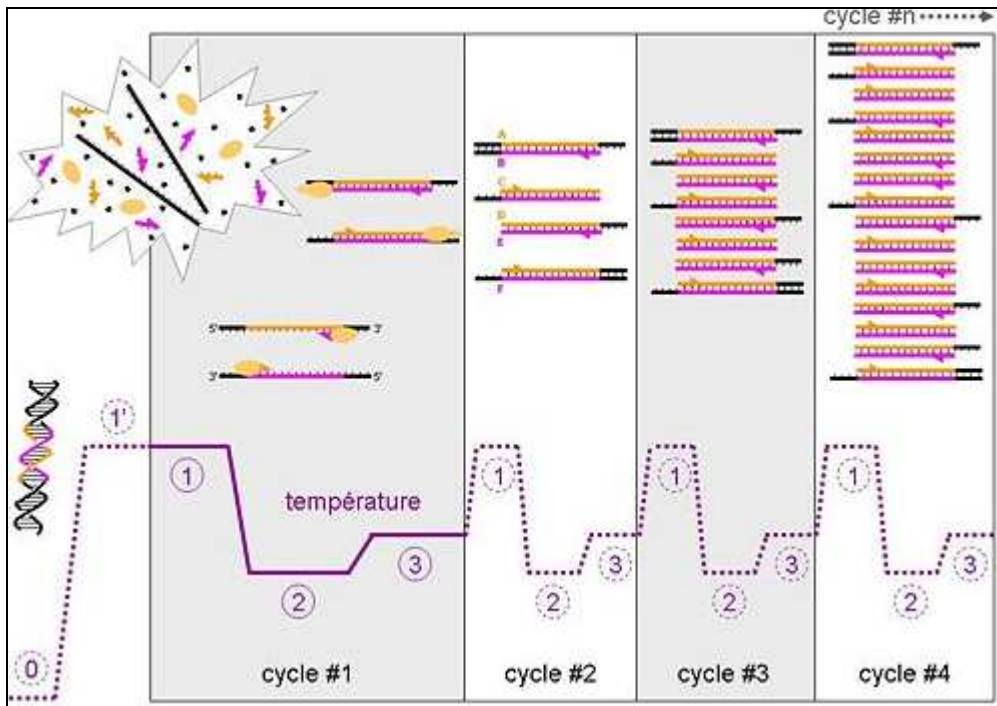


Figure 15 : Evolution de la température et des différents types de brin d'ADN au cours des 4 premiers cycles de la PCR

Choix du gène de référence

L'utilisation du gène de référence permet de normaliser les variations quantitatives (processus d'extraction non reproductible, dosage des ARN extraits, efficacité de la RT) et qualitatives (conservation des ARN) entre les échantillons.

Le gène de référence idéal devrait être exprimé à un taux constant dans toutes les cellules, taux qui ne devrait pas être modifié par les conditions expérimentales. Par ailleurs, son expression devrait se faire à un niveau proche de celui de la cible à étudier. Après avoir testé deux gènes de référence, que sont la GAPDH et la bêta-actine, nous avons choisi d'utiliser le gène de la bêta-actine, celui-ci présentant le moins de variation entre les échantillons.

Choix des amorces

La séquence des gènes à amplifier (bêta-actine, Kir6.1, SUR2B, BK α et iNOS) a été déterminée à partir de la NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Puis, chaque paire d'amorces a été dessinée à l'aide du logiciel Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) de manière à ce qu'elles soient le plus efficace et spécifique possible (tableau VII). La spécificité des amorces ainsi obtenues a été évaluée par le logiciel d'alignement de séquences BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) pour validation avant utilisation. Les couples d'amorces utilisées sont répertoriés dans le tableau VIII.

L'efficacité des amorces ainsi utilisées sur les tissus vasculaires pour les gènes de la β -actine, de la iNOS, des sous-unités Kir 6.1, SUR2B et BK α a été comprise entre 97% et 104,8%.

Protocole

Les PCR en temps réel ont été effectuées grâce au MyiQTM Single-Color Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). A 5 μ l de l'ADNc à amplifier ont été ajoutés 12,5 μ l d'iQTM SYBR[®] Green Supermix (Bio-Rad), ainsi que 10 μ M des amorces sens et antisens (Eurogentec, Angers, France) correspondant à la séquence d'intérêt et de l'eau RNase free pour ajuster le volume final total à 25 μ l. Chaque plaque de PCR a inclus un blanc pour chaque gène étudié (ADNc remplacé par de l'eau RNase free), le contrôle négatif de la RT et un étalon interne (ADNc d'aorte de rat) de manière à pallier aux variations inter-plaques.

Les conditions de PCR ont été les suivantes : une activation de la TaqPolymerase « Hot Start » à 95°C pendant 3 minutes, suivie de 40 cycles d'amplification (dénaturation à 95°C pendant 10 secondes puis hybridation et élongation des amorces à 62°C pendant 30 secondes). Puis au terme de chaque PCR, une courbe de fusion a été programmée (incrément de température par pas de 0,5°C de 60 à 95°C).

Tableau VII : Critères de design des amorces utilisées au cours de la PCR quantitative

Longueur des amorces	20-25 bases
Teneur en GC des amorces	40-60%
Tm des amorces	60-62°C
Taille de l'amplicon	50-200 paires de bases
Localisation des amorces	entre différents exons ou à la jonction exon-intron (évite la co-amplification d'ADN génomique contaminant)

Tableau VIII : Gènes d'intérêt, amorces spécifiques et taille de l'amplicon

Gène	NCBI GenBank	Amorce sens (5'-3')	Amorce antisens (5'-3')	Amplicon (pb)
Kir 6.1	D42145 / KCNJ8	GAAGAGTGGCCTGGAGTCTG	CGCAGAAGTGAATGACCTGA	58
Kir 6.2	NM_031358 / KCNJ11	CCTCCTATCTGGCTGACGAG	GTGGGCACCTTTAACGGTGTT	118
SUR2A	D83598	CGGGCCTGTTTTAGTCTTTTCTGA	TAGAAAAGAGGCCATTCTGTGCTG	90
SUR2B	AF087838	GTATGCCTGGGAGCACATT	GGTTTCAGGTTGTTGCCACT	183
BK alpha	AF083341 / KCNMA1	TCAGCAGATGCATGTTTGAT	AAGAGATTGGCAAGCATTGT	281
iNOS	NM_012611	AGGGAGTGTGTCCAGGTG	TCTGCAGGATGTCTTGAACG	81
β-actine	NM_031144	CCTCTATGCCAACACAGTGTCT	GCTCAGGAGGAGCAATGATCTTGA	128

Vérification de la taille des amplicons et de la spécificité des couples d'amorces

Dans un premier temps, la courbe de fusion établie au terme de chaque PCR a permis de contrôler la spécificité des amorces. En effet, la dérivée de cette courbe doit présenter un pic unique correspondant à la température de déshybridation des brins d'ADN, caractéristique d'un amplicon donné (figure 16).

Dans un deuxième temps, la migration des produits post-PCR sur gel d'agarose à 2 % contenant 0,5 µg/ml de BET nous a permis la vérification de la taille des amplicons obtenus et un contrôle ultime de la spécificité de nos amorces.

Quantification relative du niveau d'expression des gènes cibles

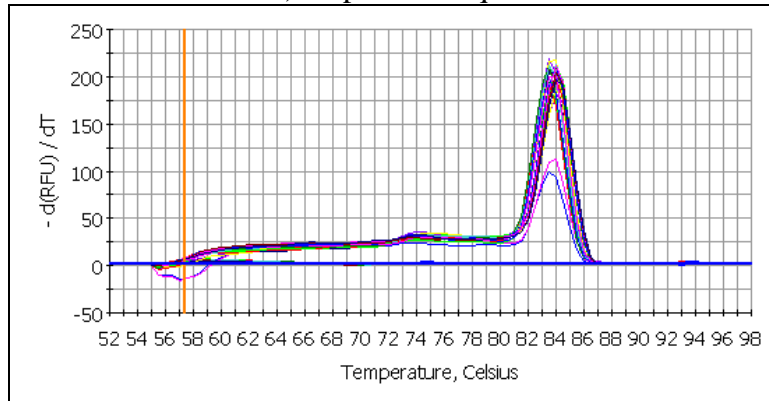
L'unité de quantification utilisée en PCR en temps réel est le Ct (Threshold cycle ou cycle seuil), correspondant au cycle de PCR pour lequel la fluorescence dépasse de manière significative le bruit de fond. Il est corrélé aux nombres de copies initiales d'ADN cible selon la formule : $X = X_0 (1+E)^{Ct}$ où X est la quantité d'ADN au cycle Ct, X_0 la quantité d'ADN initiale et E l'efficacité de la PCR. Le Ct est calculé par un logiciel intégré au thermocycleur.

L'efficacité de chaque couple d'amorces a été déterminée par l'établissement de gammes étalon (dilutions au 10^{ème} d'un ADNc d'aorte de rat, gammes en 6 points passés en duplicate), et doit être comprise entre 95 et 105 %. Cette efficacité est considérée comme reproductible. Les éventuelles variations inter-plaques ont été corrigées grâce à l'étalon interne.

La quantification utilisée est dite relative car elle exprime le niveau d'expression des gènes cibles chez les rats septiques par rapport à celui chez les rats contrôles et est normalisée par l'expression du gène de référence (bêta-actine) dans ces différents groupes. L'efficacité des amorces des gènes cibles n'étant pas la même que celle du gène de référence, nous avons quantifié par la méthode de Pfaffl, grâce au logiciel Bio-Rad, selon la formule :

$$\text{Ratio normalisé} = E_{(\text{gène cible})}^{\Delta Ct(\text{contrôle-choc})} / E_{(\text{gène de référence})}^{\Delta Ct(\text{contrôle-choc})}$$

a) amplicon unique



b) plusieurs amplicons co-amplifiés

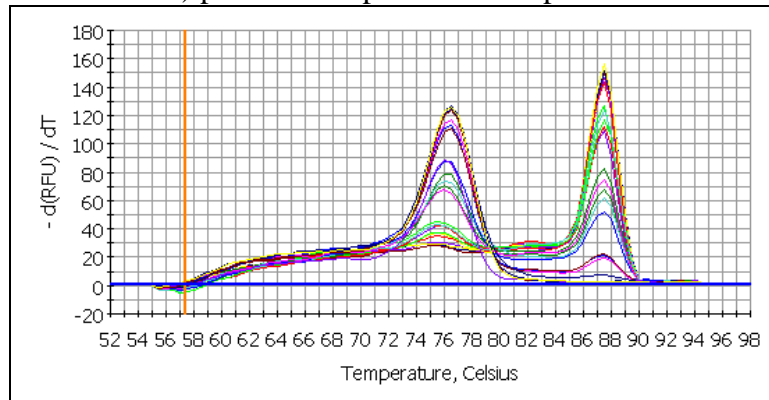


Figure 16 (a et b) : Exemples de courbes de fusion

2.3.4. ANALYSE DE L'EXPRESSION PROTEIQUE DES CANAUX POTASSIQUES VASCULAIRES, K_{ATP} ET BK_{Ca} , PAR WESTERN BLOT

Nous avons étudié l'influence de l'état de choc septique expérimental sur l'expression protéique des sous-unités vasculaires des canaux K_{ATP} , soit Kir 6.1 et SUR2B, et de la sous-unité alpha des canaux BK_{Ca} , au niveau de l'aorte et des artères mésentériques.

Extraction des protéines

Les vaisseaux congelés ont été broyés dans l'azote liquide puis homogénéisés dans 200 μ l de solution de lyse des protéines (Cell Lysis Buffer, Cell Signaling Technology, USA) contenant un comprimé d'inhibiteurs de protéases (complete Mini-EDTA free, Roche diagnostics, Meylan, France). Les échantillons ont ensuite été centrifugés [12 000g – 15 min - +4°C] et les surnageants collectés. Les protéines extraites ont été dosées grâce au kit DC protein assay (Bio-Rad), puis préparées à la concentration voulue dans le bleu de migration [25 μ l de bleu XTSB + 5 μ l d'agent réducteur + eau qsp 100 μ l] (Bio-Rad). Les protéines ont été conservées à -80°C.

Western Blot

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

Après chauffage préalable [95°C - 5min], les protéines de chaque échantillon ont été séparées en fonction de leur taille par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécylsulfate (Criterion XT Bis-Tris Gel, 4-12%, Bio-Rad). Pour chaque gel, ont été déposés le marqueur de poids moléculaire (Page Ruler PreStained Protein Ladder Plus, Fermentas), et 15 μ g de protéines issues de l'aorte et des SMA par puits. L'électrophorèse s'est déroulée à 150 V le temps nécessaire à la migration des protéines (Criterion Cell, Bio-Rad).

Transfert sur membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF)

Afin de rendre les protéines accessibles à la détection par anticorps, celles-ci ont été transférées sur une membrane de PVDF (Millipore, Saint Quentin-en-Yvelines France), préalablement activée par du méthanol. Le transfert a été réalisé en milieu liquide (tableau IX) à 80V pendant 90 minutes (Criterion Blotter, Bio-Rad). L'efficacité du transfert a été vérifiée par coloration de la membrane au rouge Ponceau (Sigma Aldrich).

Blocage ou saturation

Le blocage des sites d'interactions non spécifiques entre la membrane et les anticorps a été réalisé par incubation de la membrane avec une solution de lait écrémé (Régilait) dilué à 5% dans du TBS-T 0,1% (tableau IX) pendant 1h30 à température ambiante.

Détection des protéines

Les anticorps ont été dilués dans du lait écrémé dilué à 5% dans du TBS-T 0,1%. Les conditions d'utilisation des anticorps sont indiquées dans le tableau IV.

Selon la masse moléculaire de la protéine d'intérêt (tableau X), l'incubation de l'anticorps primaire a eu lieu sur la membrane supérieure (SUR 2B, BK α) ou sur la membrane inférieure (tubuline, Kir6.1) [+4°C - sur la nuit]. Après lavage par du TBS-T 0,1% [5x5min], les membranes ont été incubées avec les anticorps secondaires spécifiques conjugués avec la horseradish peroxydase (HRP) [1 heure – TA]. Après lavage par du TBS-T 0,1% [5x5min], ces membranes ont pu être révélées (se reporter au paragraphe suivant).

Par la suite, la partie inférieure des membranes a été strippée [20 minutes - 37°C] avec du RestoreTM Western Blot Stripping Buffer (Thermofisher Scientific, Illkirch, France) et la tubuline, protéine de référence, a été détectée de la même manière que décrit précédemment afin de normaliser les éventuelles variations quantitatives de protéines chargées dans chaque puits.

Révélation par chimiluminescence

Nous avons procédé à la détection des protéines par incubation des membranes [5 min – TA] avec du SuperSignal West Femto (pour Kir6.1, SUR2B et BK α) et Pico (pour la tubuline) Maximum Sensivity Substrates (Thermofisher Scientific). Les membranes ont été scannées par une caméra CDD (Las-4000, Fujifilm, Clichy, France) et les images chimiluminescentes obtenues ont été numérisées.

Quantification

Chaque bande a été analysée par densitométrie grâce au logiciel MultiGauge 4.0 (Fujifilm). La quantité relative de chaque protéine cible a ainsi été déterminée par rapport à celle de la tubuline, protéine exprimée en théorie de manière constante dans les tissus.

Tableau IX : Composition des tampons utilisés dans le western blot

Tampon de transfert 10X		Tampon de transfert 1X		TBS-T 0,1%	
Tris-base 15,6 mM	19,3 g	Tampon de transfert 10X	100 ml	Tris-Base 0.1 M	12,1 g
Glycine 120 mM	90 g	Méthanol 20 %	200 ml	NaCl 0.15 M	8,76 g
H2O	qsp 1 l	H2O	qsp 1 l	Tween 0,1 %	1 ml
pH	8,3			H2O	qsp 1 l
				pH	7,6

Tableau X : Anticorps utilisés au cours du Western blot

Anticorps primaire	PM protéine cible	Facteur de dilution	Anticorps secondaire/HRP	Facteur de dilution
Anti-SUR2B (BNJ-40) rabbit	130 kDa	1/2 000	Polyclonal donkey anti-rabbit IgG (GE Healthcare)	1/10 000
Anti-BKalpha mouse IgG1 monoclonal, clone 32 (BD Biosciences)	125 kDa	1/500	Polyclonal sheep anti-mouse IgG (GE Healthcare)	1/1 000
Anti-Kir6.1 chicken	48 kDa	1/10 000	Rabbit anti-chicken IgY (Millipore)	1/1 000
Anti- α -tubulin mouse IgG1 monoclonal, clone B-5-1-2 (Sigma-Aldrich)	55 kDa	1/4 000	Polyclonal sheep anti-mouse IgG (GE Healthcare)	1/4 000

L'anticorps primaire anti-Kir6.1 a été gracieusement fourni par le Professeur William A. Coetzee (NYU School of Medicine, New York, USA). L'anticorps primaire anti-SUR2B a été gracieusement fourni par le Professeur Nian-Qing Shi (University of Wisconsin, Madison, USA).

2.3.5. MESURE DU NO AORTIQUE ET DE L'ANION SUPEROXYDE PAR RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE (RPE)

Grâce à sa spécificité et sa grande sensibilité, la résonance paramagnétique électronique (RPE), ou résonance de spin électronique (RSE), est l'une des seules techniques qui permet la détection, l'identification et la quantification des espèces paramagnétiques, parmi lesquelles figurent les radicaux libres intervenant dans une multitude de réactions chimiques telles que l'oxydation. La RPE est une technique spectroscopique basée sur la mesure et l'interprétation de phénomènes de transitions de niveaux énergétiques des électrons soumis à un champ magnétique.

La plupart des espèces radicalaires ont une demi-vie trop courte (de la microseconde à la nanoseconde) pour pouvoir être détectées directement et nécessitent une stabilisation préalable à leur étude en RPE. La technique du *spin trapping*, ou capture de spin, permet de stabiliser le radical libre à l'aide d'un piègeur moléculaire, appelé *spin trap*. La réaction de piégeage produit un nouveau composé paramagnétique, résultant de la liaison covalente du *spin trap* avec le radical libre concerné, plus stable et d'une durée de vie considérablement augmentée. Ce composé, lui aussi radicalaire, appelé *spin adduct* ou *adduit*, est détectable en spectroscopie RPE.

Des ligands organiques ont été synthétisés, caractérisés puis appliqués à la complexation du fer(II) pour développer des piègeurs de spin spécifiques du NO et de l'anion superoxyde O_2^- .

Ainsi, nous avons utilisé le complexe de diéthylthiocarbamate ferreux $Fe(DETC)_2$ pour déterminer la quantité de NO produit au niveau des échantillons aortiques. Ce dernier, en réagissant quantitativement avec le NO pour former un complexe paramagnétique, présente un signal caractéristique en spectroscopie RPE. L'intensité du signal RPE est proportionnelle à la quantité d'espèce paramagnétique $Fe(DETC)_2$ -NO présente dans l'échantillon, et donc proportionnelle à la quantité de NO produit. Le complexe $Fe(DETC)_2$ étant insoluble dans l'eau pure, la solution de $Fe(DETC)_2$ a été réalisée en présence de BSA.

Ainsi, les échantillons aortiques ont été incubés pendant 30 minutes dans un tampon Krebs-HEPES contenant de la BSA (20,5 g/L), du $CaCl_2$ (3 mM) et de la L-arginine (0,8 mM). Le NaDETC (3,6 mg) et le sulfate ferreux heptahydraté $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (2,25 mg) ont été dissous séparément dans 10 ml de tampon Krebs-HEPES glacé sous bullage d'azote gazeux, puis leur

mélange a permis d'obtenir une solution colloïdale jaune pâle-brun opalescente de Fe(DETC)₂ (0,4 mM). La solution de Fe(DETC)₂ a immédiatement été ajoutée aux échantillons aortiques, suivie d'une incubation pendant 45 min à 37°C. Les échantillons ont ensuite été immédiatement congelés dans l'azote liquide. Le spectre RPE des échantillons a été enregistré à 77 K (puissance micro-ondes 10 mW, modulation d'amplitude 1 mT et de fréquence 100 kHz, temps de balayage 60 s, nombre de scans 5) en utilisant un vase Dewar. Les niveaux de NO ont été exprimés en amplitude du signal par rapport au poids sec de l'échantillon (Amplitude / Wd).

La production d'anion superoxyde a été mesurée de façon analogue par spectroscopie RPE en utilisant le *spin trap* 1-hydroxy-3-méthoxycarbonyl-2,2,5,5-tétraméthyl-pyrrolidine (CMH, Noxygen, Allemagne).

Les échantillons aortiques ont été incubés dans une solution de Krebs-HEPES contenant de la 1-hydroxy-3-méthoxycarbonyl-2,2,5,5-tétraméthylpyrrolidine (CMH, Noxygen, Allemagne) (500 µM), de la déféroxamine (25 µM) et du DETC (5 µM) à température constante (37°C) pendant 1 heure. La réaction a été stoppée en plaçant les échantillons dans la glace. Les échantillons ont ensuite été congelés dans l'azote liquide et analysés dans un vase Dewar par spectroscopie RPE. Le spectre RPE des échantillons a été enregistré à 77 K (puissance micro-ondes 1 mW, modulation d'amplitude 0,5 mT et de fréquence 100 kHz, temps de balayage 60 s, nombre de scans 60). Les résultats ont été exprimés en amplitude du signal par rapport au poids sec de tissu (Amplitude / Wd).

2.3.6. TEST DE MOBILITE ELECTROPHORETIQUE OU *ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY (EMSA)*

L'EMSA est une technique de biologie moléculaire qui permet l'analyse quantitative de protéines qui se fixent à l'ADN telles que les facteurs de transcription. En effet, la mobilité électrophorétique d'un fragment d'ADN est réduite lorsqu'il est complexé à une protéine, ce qui provoque un changement de position de la bande du fragment.

L'étude du facteur de transcription NF-κB a été réalisée à partir d'extraits protéiques aortiques mis en présence d'une séquence oligonucléotidique double brin [sens 5'-AGT TGA GGG GAC TTT AGG CCC C-3'; antisens 3'-TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G-5'] à laquelle se lie spécifiquement le facteur NF-κB (Promega, Madison, WI). Les oligonucléotides ont été biotinylés en 3' (Biotin end-labeling kit, Pierce, Rockford, IL), et l'ensemble des extraits protéiques aortiques ont été soumis au test de mobilité

électrophorétique (EMSA) en utilisant un kit de chimiluminescence non radioactif EMSA selon les recommandations du fabricant (Lightshift chemiluminescent EMSA kit, Pierce). L'extrait nucléaire d'antigène Epstein-Barr a servi de contrôle interne. L'intensité des bandes a été analysée au moyen d'un scanner de réflexion et du *Quantity One Quantification Software* (Bio-Rad). Les expériences ont été effectuées en duplicate.

2.4. ANALYSES STATISTIQUES

Les valeurs numériques obtenues pour chaque groupe ont été caractérisées par leur moyenne assortie de leur déviation standard (S.D.). Les données ont été analysées en utilisant, le cas échéant, l'analyse de variance à un facteur, ou *one-way ANOVA*, l'analyse de variance pour mesures répétées ou l'analyse de variance à deux facteurs, ou *two-way ANOVA* (le temps et le traitement étant considérés comme des variables indépendantes). Lorsque l'analyse de variance n'a pas permis de conclure que les moyennes des groupes étaient identiques, d'autres comparaisons par paires ont été réalisées en utilisant le test de Dunnett, pour l'effet du temps, et la correction de Bonferroni, pour les effets du traitement à des moments précis. Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives lorsque le pourcentage de signification $p < 0,05$. Toutes les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel GraphPadPrism 4 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3. CONCEPTION DE L'ETUDE

Dans un premier temps, nous nous sommes assuré que les deux modèles étudiés (LPS et CLP), présentaient bien un état de choc associé à une diminution de la réponse vasculaire (en matière de PAM) et cardiaque (en matière de débit aortique) à la noradrénaline.

Pour comprendre le rôle des canaux potassiques, K_{ATP} et BK_{Ca} , sur les paramètres hémodynamiques et l'hyporéactivité vasculaire aux catécholamines dans l'état de choc septique, nous avons utilisé le PNU-37883A, un inhibiteur sélectif des canaux K_{ATP} vasculaires pore-spécifique, et l'ibériotoxine, un inhibiteur sélectif des canaux BK_{Ca} , et nous avons étudié leurs effets hémodynamiques dans chacun des groupes. La réactivité vasculaire a été étudiée *in vivo* en réponse à la noradrénaline dans chacun des groupes (1^{ers} sous-groupes), et *ex vivo* en réponse à la phényléphrine par myographie dans le groupe CLP18h (3^{ème} sous-groupe).

Par ailleurs, nous avons étudié l'influence de l'état de choc septique sur l'expression vasculaire des canaux potassiques par PCR quantitative en temps réel et Western blot au niveau de l'aorte et des artères mésentériques (2^{èmes} sous-groupes). En raison de leur petite taille et de la faible quantité disponible, seule l'analyse en PCR quantitative a été réalisée sur les artères mésentériques.

Enfin, pour élucider le rôle du NO dans l'expression des canaux potassiques au cours du choc septique, trois inhibiteurs pharmacologiques, la dexaméthasone, l'aminoguanidine et le 1400W, ont été utilisés afin d'inhiber la production de NO, à la suite de quoi l'expression vasculaire des canaux potassiques, la teneur en NO de l'aorte, et l'activation de la voie NF- κ B ont été étudiées.

4. RESULTATS

4.1. EFFETS DE L'ETAT DE CHOC SEPTIQUE SUR LA MORTALITE, LES PARAMETRES HEMODYNAMIQUES ET LA REACTIVITE VASCULAIRE *IN VIVO*

La mortalité des groupes LPS, CLP6h, CLP18h et CLP30h a été respectivement de 0, 0, 10 et 80%.

Les groupes sham_{LPS} et sham_{CLP}, auxquels sont comparés les groupes LPS et CLP, présentent des caractéristiques hémodynamiques identiques et ont ainsi été réunis en un groupe sham unique dans les tableaux et figures qui seront présentés.

Comme décrit dans le tableau XI, comparativement au groupe sham, les groupes LPS, CLP6h et CLP18h ont été caractérisés par une diminution de la PAM et du débit sanguin aortique ainsi que par une acidose lactique ($p < 0,05$).

Comparativement au groupe sham, l'augmentation de la PAM en réponse à l'injection d'un bolus de 1 μ g/kg de noradrénaline a été significativement diminuée dans les 3 groupes ($p < 0,05$) (figure 17).

Par ailleurs, l'augmentation du débit aortique abdominal induite par l'injection d'un bolus de 1 μ g/kg de noradrénaline a été significativement diminuée dans les groupes CLP18h et LPS ($p < 0,05$) (figure 18). Le groupe CLP6h semble également présenter une moindre augmentation du débit aortique abdominal suite à l'administration de noradrénaline *in vivo* mais sans que cela ne soit néanmoins significatif.

L'ensemble de ces données nous a permis de valider nos modèles expérimentaux comme modèles de choc septique.

Tableau XI : Paramètres hémodynamiques et métaboliques des différents groupes d'animaux (PAM, débit aortique abdominal, pH et lactate)

	Sham (n=7)	LPS (n=7)	CLP6h (n=7)	CLP18h (n=7)
PAM (mmHg)	135 ± 10	101 ± 23*	83 ± 14*	79 ± 24*
Débit aortique abdominal (ml/min)	38 ± 8	23 ± 7*	17 ± 5*	13 ± 5*
pH	7.40 ± 0.06	7.31 ± 0.05*	7.30 ± 0.08*	7.29 ± 0.08*
Lactate (mM)	1.1 ± 0.1	5.8 ± 3.0*	2.6 ± 1.0*	5.8 ± 2.3*

* $p < 0.05$ vs groupe sham

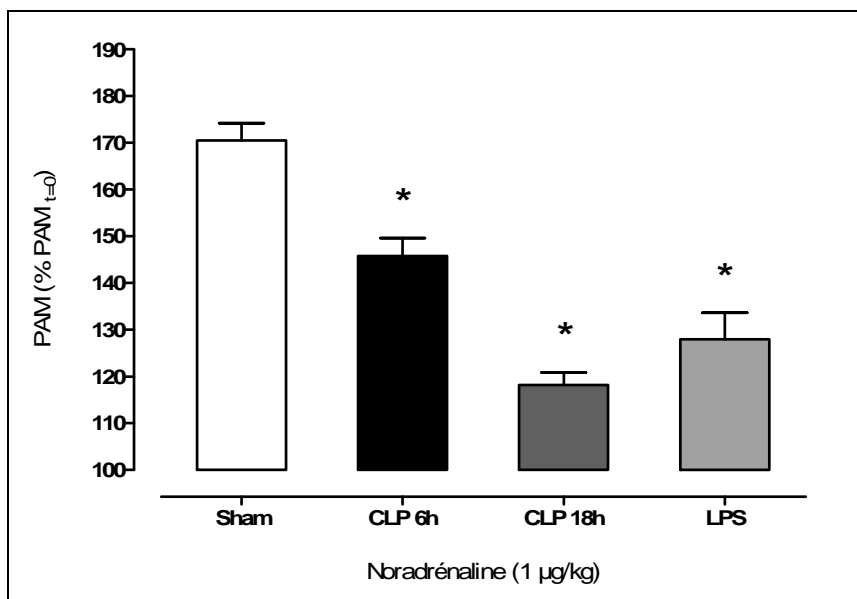


Figure 17 : Réponse en terme de PAM à l'administration de noradrénaline *in vivo* au cours des chocs LPS, CLP6h et CLP18h après injection de 1 µg/kg de noradrénaline.

Valeurs maximales de PAM exprimées en pourcentage de la PAM de base (PAM_{t=0}) avant l'administration de la noradrénaline.

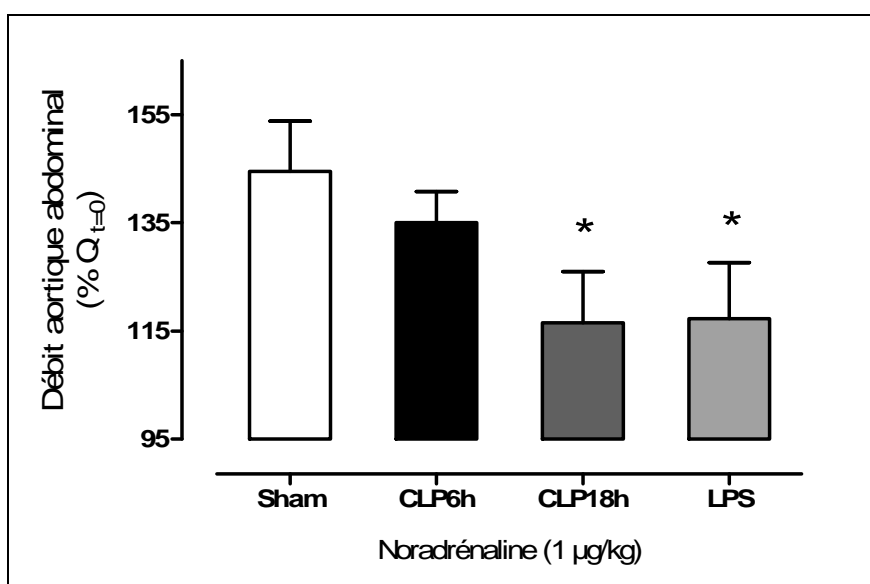


Figure 18 : Réponse en terme de débit aortique abdominal à l'administration de noradrénaline *in vivo* au cours des chocs LPS, CLP6h et CLP18h après injection de 1 µg/kg de noradrénaline.

Valeurs maximales de débit aortique abdominal exprimées en pourcentage du débit aortique abdominal de base (Q_{t=0}) avant l'administration de la noradrénaline.

Valeurs exprimées en moyenne ± écart type (n=7 par groupe)

*p<0,05 vs groupe sham

4.2. EFFETS DES INHIBITEURS DES CANAUX POTASSIQUES, PNU-37883A ET IBERIOTOXINE, SUR LES PARAMETRES HEMODYNAMIQUES

Modulation pharmacologique par le PNU-37883A

Le DMSO, utilisé pour dissoudre le PNU, n'a pas eu d'effet sur les paramètres hémodynamiques du groupe sham. L'administration intraveineuse de PNU-37883A, inhibiteur vasculaire des canaux K_{ATP} , n'a pas modifié la PAM, le débit sanguin aortique ou la réactivité vasculaire dans les groupes sham.

La moindre augmentation de la PAM en réponse à la noradrénaline induite par l'état de choc septique (figure 17) a partiellement été restaurée par l'utilisation du PNU-37883A dans tous les groupes CLP6h, CLP18h et LPS ($p < 0,05$) (figure 19).

Par ailleurs, la moindre augmentation du débit aortique abdominal en réponse à la noradrénaline induite par l'état de choc septique (groupes CLP18h et LPS – figure 18) a été restaurée par l'utilisation du PNU-37883A dans le groupe LPS ($p < 0,05$) (figure 20C), et a été augmentée dans le groupe CLP18h sans que cela ne soit néanmoins significatif (figure 20B).

De plus, la perfusion du PNU-37883A pendant 1h avant l'épreuve de réactivité vasculaire a induit une augmentation significative de la PAM dans tous les groupes (figure 21A) et une augmentation significative du débit sanguin aortique dans le groupe CLP18h alors que ce dernier est resté inchangé dans les groupes LPS et CLP6h (figure 21B).

Il est également important de noter que l'augmentation de la pression artérielle et du débit aortique suite à l'administration de PNU a été associée à une diminution du lactate dans nos deux modèles CLP6h (2.2 ± 0.7 vs 2.6 ± 1.0) et CLP18h (2.9 ± 2.0 vs 5.8 ± 2.3), suggérant un effet bénéfique sur la perfusion tissulaire.

Modulation pharmacologique par l'ibériotoxine

En revanche, dans chacun des groupes, l'ibériotoxine (IbTX), inhibiteur spécifique des canaux BK_{Ca} , est restée sans effet sur la réponse pressive à la noradrénaline, quels que soient la dose ou le schéma d'administration utilisés.

4.3. EFFET DE L'INHIBITEUR 1400W SUR LA REACTIVITE VASCULAIRE

L'administration de l'inhibiteur 1400W de la iNOS a partiellement restauré la réactivité vasculaire *in vivo* en réponse à la noradrénaline dans les groupes LPS, CLP6h et CLP18h (figure 22).

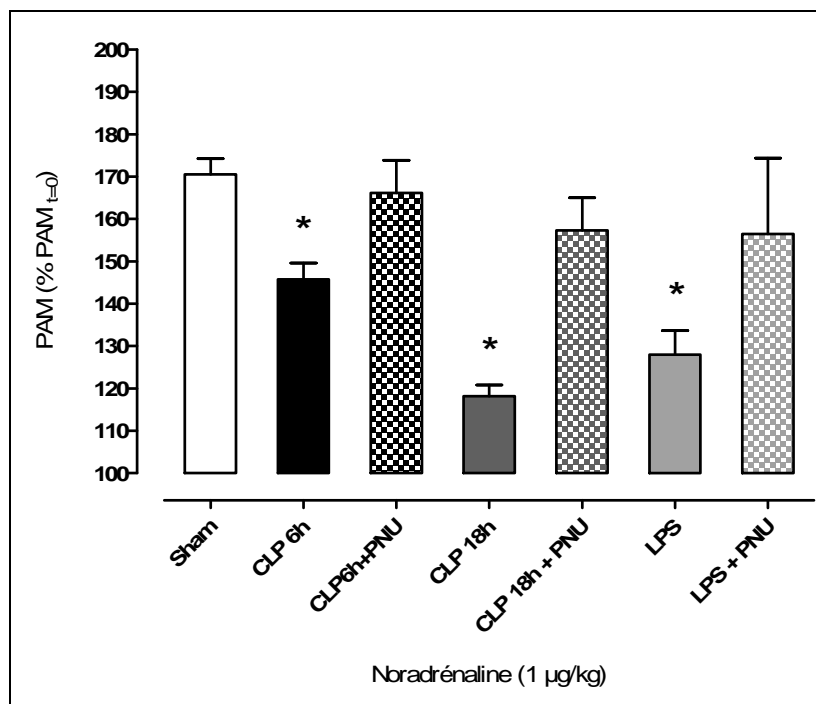


Figure 19 : Effet du PNU sur la réponse vasculaire à la noradrénaline *in vivo* dans les groupes CLP6h, CLP18h et LPS après injection d'un bolus de 1 µg/kg de noradrénaline.

Valeurs maximales de PAM exprimées en pourcentage de la PAM de base (PAM_{t=0}) avant l'administration de la noradrénaline.

Valeurs exprimées en moyenne ± écart type (n=7 par groupe)

** p < 0,05 vs groupe sham*

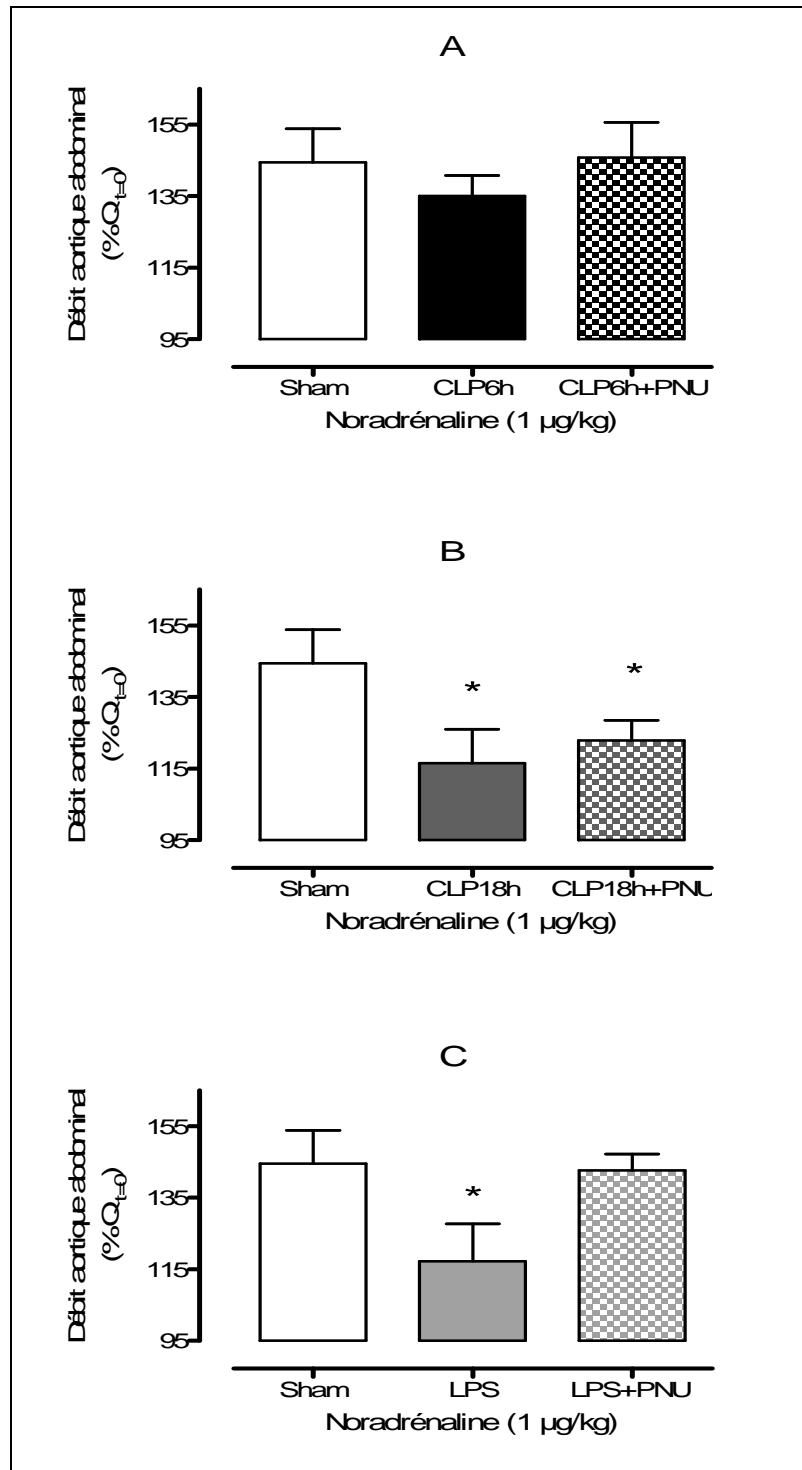


Figure 20 : Effet du PNU sur le débit aortique abdominal dans les groupes CLP6h, CLP18h et LPS après injection d'un bolus de 1 µg/kg de noradrénaline.

Valeurs maximales de débit aortique abdominal exprimées en pourcentage du débit aortique abdominal de base ($Q_{t=0}$) avant l'administration de la noradrénaline.

Valeurs exprimées en moyenne \pm écart type ($n=7$ par groupe)

* $p < 0,05$ vs groupe sham

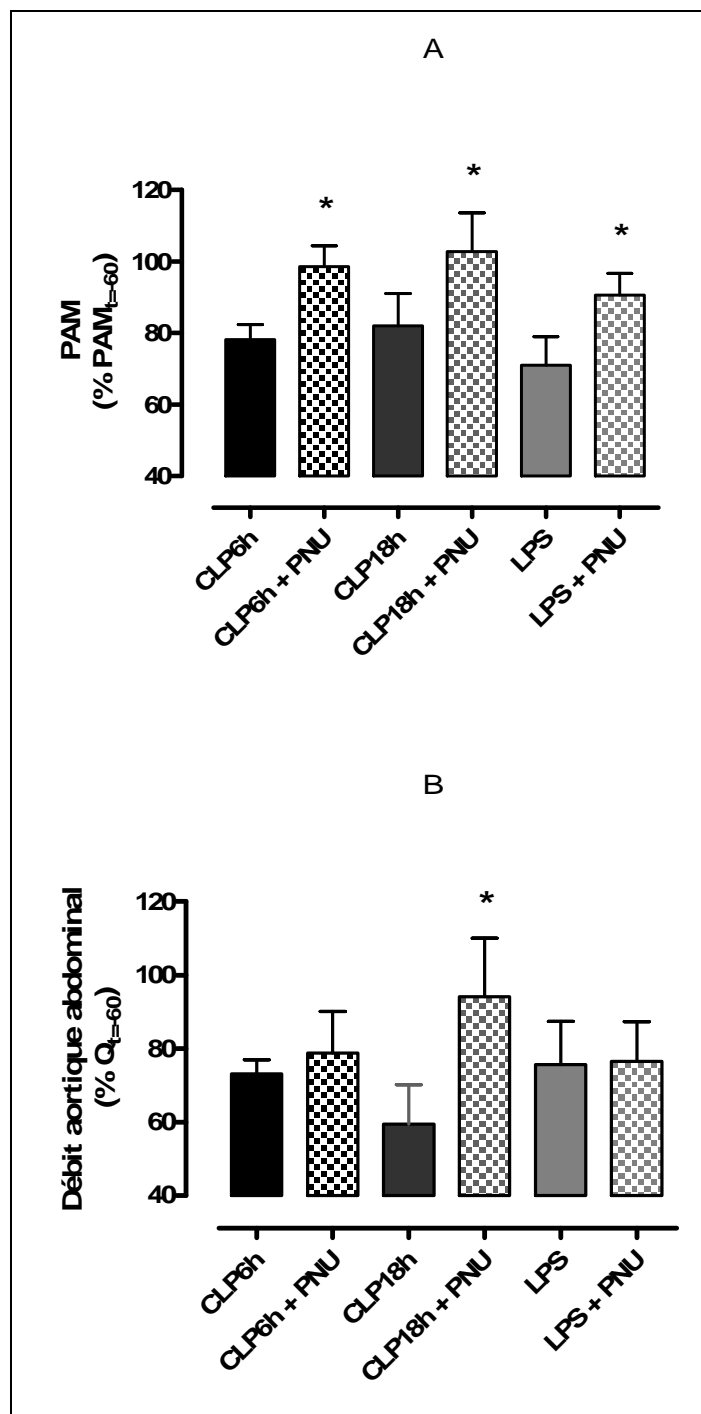


Figure 21 : Evolution de la PAM (A) et du débit aortique abdominal (B) dans les groupes CLP6h, CLP18h et LPS après l'administration du PNU-37883A pendant 1h.

Valeurs de PAM et de débit aortique abdominal exprimées en pourcentage de la PAM_{t=60} et du Q_{t=60}, avant l'administration du PNU-37883A.

Valeurs exprimées en moyenne \pm écart type (n=7 par groupe)

*p<0,05 vs groupe sans PNU

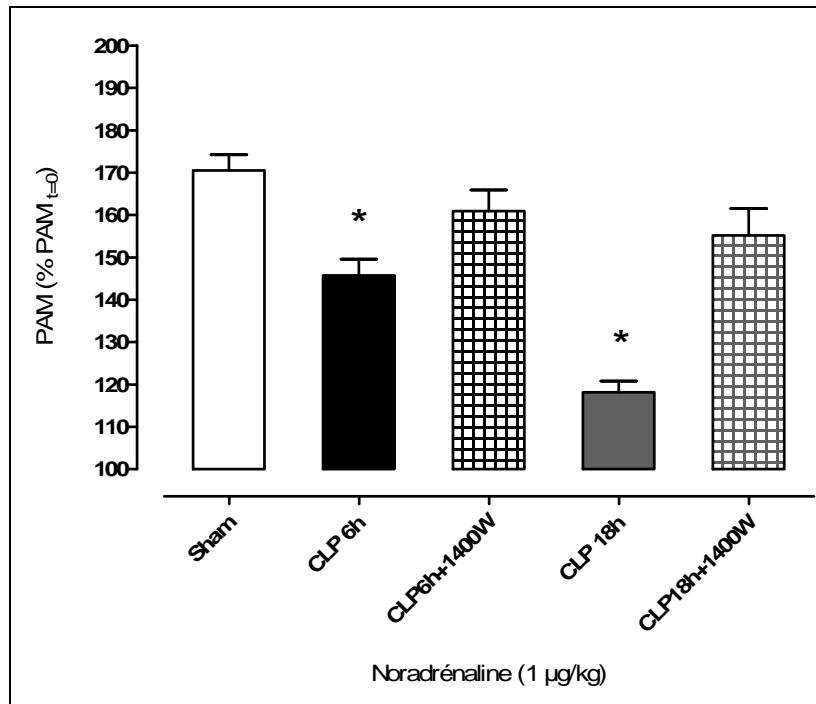


Figure 22 : Effet de l'inhibiteur 1400W sur la PAM dans les groupes CLP6h et CLP18h

Valeurs maximales de PAM exprimées en pourcentage de la PAM de base (PAM_{t=0}) avant l'administration de la noradrénaline.

Valeurs exprimées en moyenne \pm écart type (n=7 par groupe)

* $p < 0,05$ vs groupe sham

4.4. ETUDE *EX VIVO* PAR MYOGRAPHIE DU MODELE CLP18H

Les données *ex vivo* obtenues à partir du groupe CLP18h ont confirmé la diminution de la réactivité vasculaire observée *in vivo*, le groupe ayant présenté une diminution de la contraction à la fois des anneaux aortiques et des SMA en réponse à la phényléphrine (figure 23).

L'hyporéactivité vasculaire à la phényléphrine observée a été partiellement atténuée par le PNU-37883A, tant au niveau des anneaux aortiques que des SMA (figure 23, graphes A et D) alors que l'IbTX n'a pas eu d'effet (données non présentées).

L'inhibiteur sélectif 1400W de la iNOS a également partiellement restauré la contraction des anneaux aortiques et des SMA induite par la phényléphrine (figure 23, graphes B et E).

La combinaison du PNU-37883A et de l'inhibiteur 1400W a bloqué la diminution de la contraction phényléphrine-dépendante observée *ex vivo* au niveau des anneaux aortiques et des SMA (figure 23, graphes C et F).

4.5. INFLUENCE DE L'ETAT DE CHOC SEPTIQUE SUR L'EXPRESSION DES CANAUX K_{ATP} ET BK_{Ca} AU NIVEAU DE L'AOORTE ET DES SMA

Étude de l'expression des ARNm au niveau aortique et mésentérique

L'expression de l'ARNm des sous-unités Kir6.1 et SUR2B des canaux K_{ATP} vasculaires est significativement augmentée dans les groupes CLP6h, CLP18h et LPS ($p < 0,05$), cela aussi bien au niveau aortique (figure 24A) que mésentérique (figure 25A).

En revanche, l'expression de l'ARNm de la sous-unité α du canal BK_{Ca} n'est augmentée significativement qu'au niveau mésentérique dans le groupe CLP6h ($2,3 \pm 0,3$) ($p < 0,05$) (figures 24B et 25B).

Étude de l'expression protéique au niveau aortique

En raison de la faible quantité de tissus concernant les artères mésentériques, celles-ci n'ont été utilisées que pour les études d'expression d'ARNm.

Au niveau aortique, l'expression de la protéine des sous-unités Kir6.1 et SUR2B a été augmentée dans les groupes CLP6h ($5,5 \pm 0,8$ et $7,0 \pm 1,0$), CLP18h ($4,7 \pm 0,5$ et $7,5 \pm 1,0$), CLP30h ($2,0 \pm 0,3$ et $2,6 \pm 0,4$) et LPS ($4,5 \pm 1,4$ et $2,7 \pm 0,9$) ($p < 0,05$ vs groupe sham) (figure 26A). L'expression protéique de la sous-unité α des BK_{Ca} a légèrement été augmentée, sans que cela ne soit néanmoins significatif (Sham $1 \pm 0,3$ vs CLP6h $1,5 \pm 0,6$) (figure 26B).

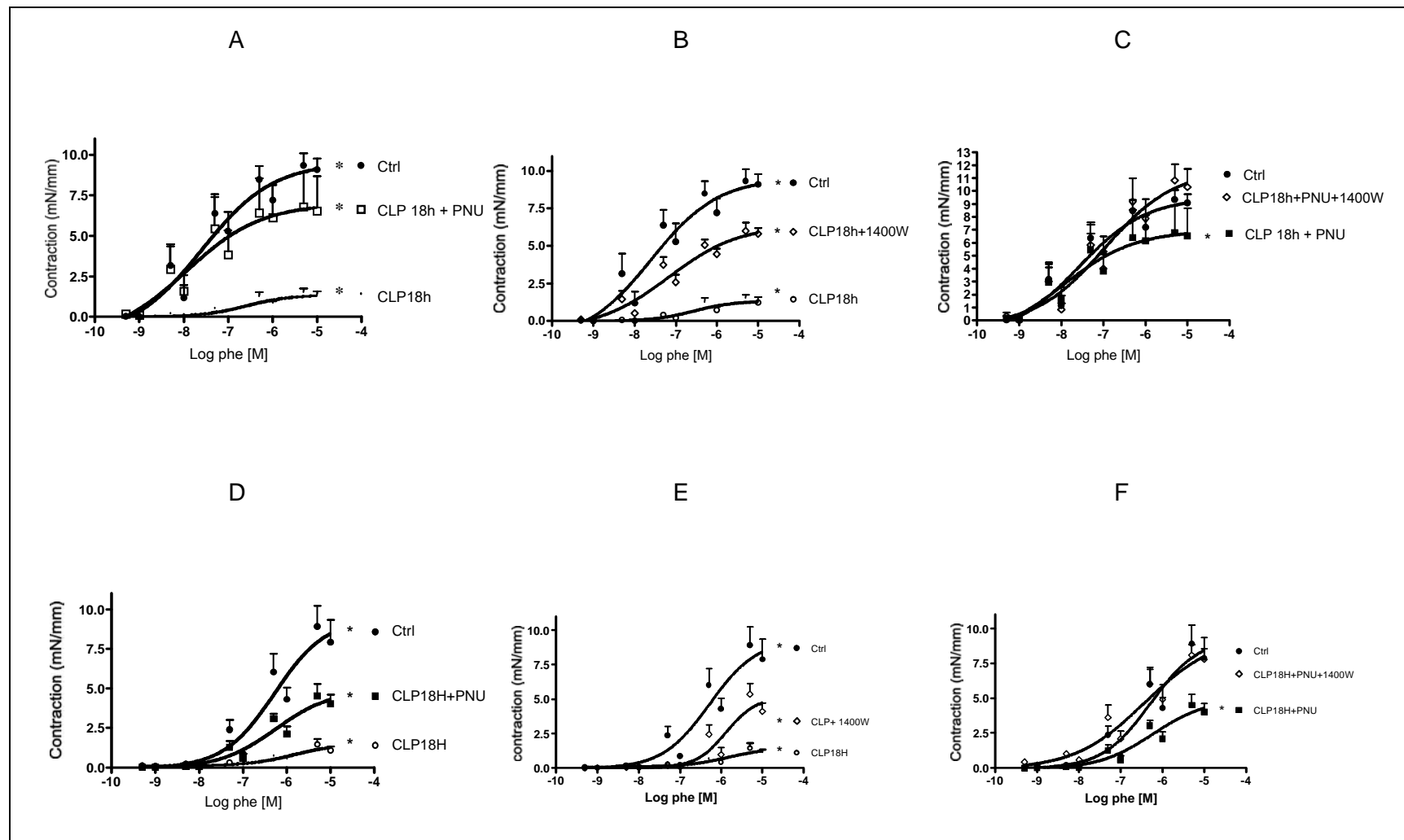


Figure 23 : Contraction des anneaux aortiques (A, B et C) et des anneaux mésentériques (SMA) (D, E et F) en réponse à la phényléphrine (phe) dans les groupes sham, CLP18h, CLP18h+ PNU, CLP18h + 1400W et CLP18h + PNU + 1400W

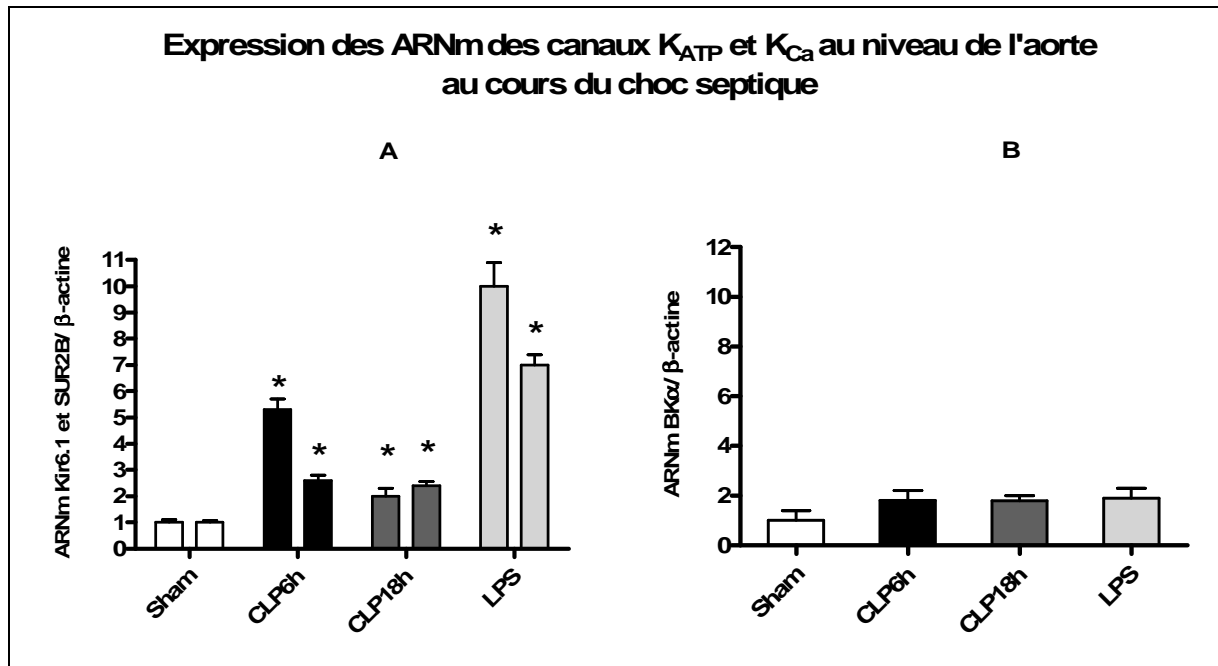


Figure 24 : Expression des ARNm des sous-unités Kir6.1/SUR2B (A) et BK α (B) au niveau de l'aorte dans les modèles CLP6h, CLP18h et LPS.

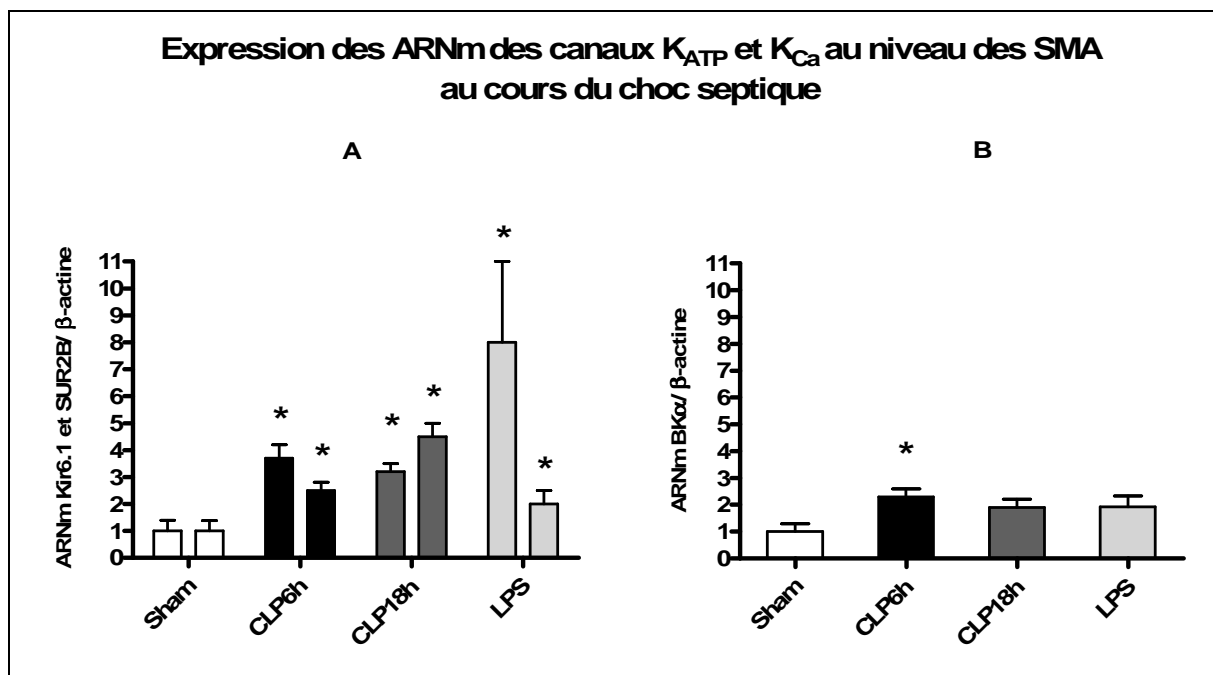


Figure 25 : Expression des ARNm des sous-unités Kir6.1/SUR2B (A) et BK α (B) au niveau des artères mésentériques (SMA) dans les modèles CLP6h, CLP18h et LPS.

Valeurs exprimées en moyenne \pm écart type (n=7 par groupe)

* $p < 0,05$ vs groupe sham

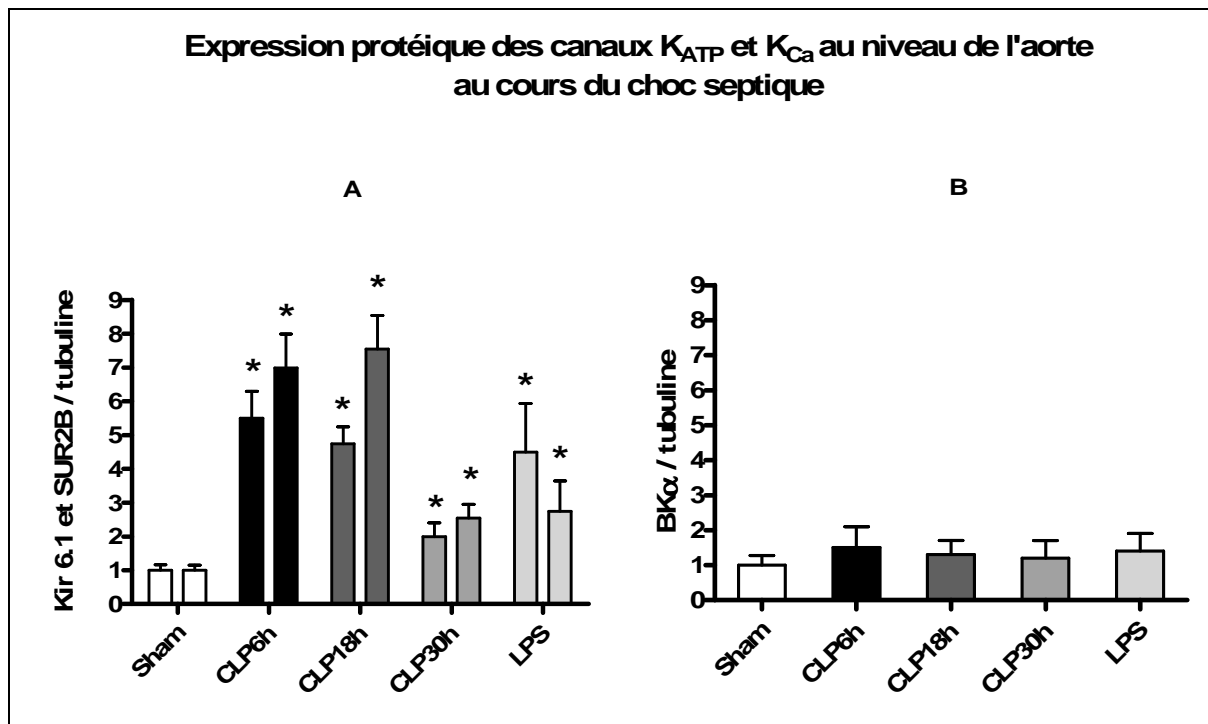


Figure 26 : Expression protéique des sous-unités Kir6.1/SUR2B (A) et BK α (B) au niveau de l'aorte dans les modèles CLP6h, CLP18h, CLP30h et LPS.

Valeurs exprimées en moyenne \pm écart type (n=7 par groupe)

* $p < 0,05$ vs groupe sham

4.6. EFFETS DE L'INHIBITION SELECTIVE DE LA iNOS SUR LA TENEUR DE L'AORTE EN NO ET EN ANION SUPEROXYDE O_2^- , SUR L'EXPRESSION DES CANAUX K_{ATP} ET SUR L'ACTIVATION DU FACTEUR NF- κ B DANS LE MODELE CLP6H

Tous les modèles de choc ont été associés à une augmentation de l'ARNm de la iNOS, aussi bien au niveau aortique que mésentérique (figure 27A).

L'analyse en RPE de l'aorte a montré une augmentation de la teneur en NO et en anion superoxyde O_2^- dans le modèle CLP6h ($p < 0,05$) (figure 28). En outre, 18h après l'induction de la péritonite, la teneur en NO aortique a diminué jusqu'à un niveau analogue à celui observé chez les animaux sham (figure 28A), alors que la teneur en anion superoxyde O_2^- est restée augmentée (figure 28B).

Comme attendu, l'inhibition de la iNOS par l'inhibiteur 1400W a induit, d'une part, la diminution significative de l'expression de son ARNm au cours du choc septique, aussi bien au niveau aortique que mésentérique (figure 27B), et d'autre part, l'abolition de l'augmentation de la teneur aortique en NO et en anion superoxyde O_2^- dans le modèle CLP6h (figure 28A et B).

Par ailleurs, l'inhibition de la iNOS par le 1400W a été associée à une régulation négative de l'expression des ARNm et des protéines des sous-unités Kir6.1 et SUR2B (figures 29 et 30A) des canaux K_{ATP} aortiques dans le modèle CLP6h. Il n'y a pas eu d'influence du 1400W sur l'expression de l'ARNm ou de la protéine de la sous-unité $BK\alpha$ (figures 29 et 30B).

Dans la phase ultérieure du choc septique (modèle CLP18h), l'augmentation marquée et persistante de l'expression protéique des sous-unités Kir6.1 et SUR2B du canal K_{ATP} au niveau aortique (figure 26A) a été observée malgré une diminution significative de l'expression de l'ARNm de la iNOS (figure 27A) et de la teneur en NO dans l'aorte (figure 28A).

Enfin, nous avons évalué l'effet de l'inhibiteur 1400W sur l'activité du facteur NF- κ B dans le modèle CLP6h par le test de mobilité électrophorétique (EMSA). Au cours du choc septique, il a été observé une augmentation significative de l'activité du facteur NF- κ B, augmentation diminuée par l'inhibiteur 1400W de la iNOS (figure 31).

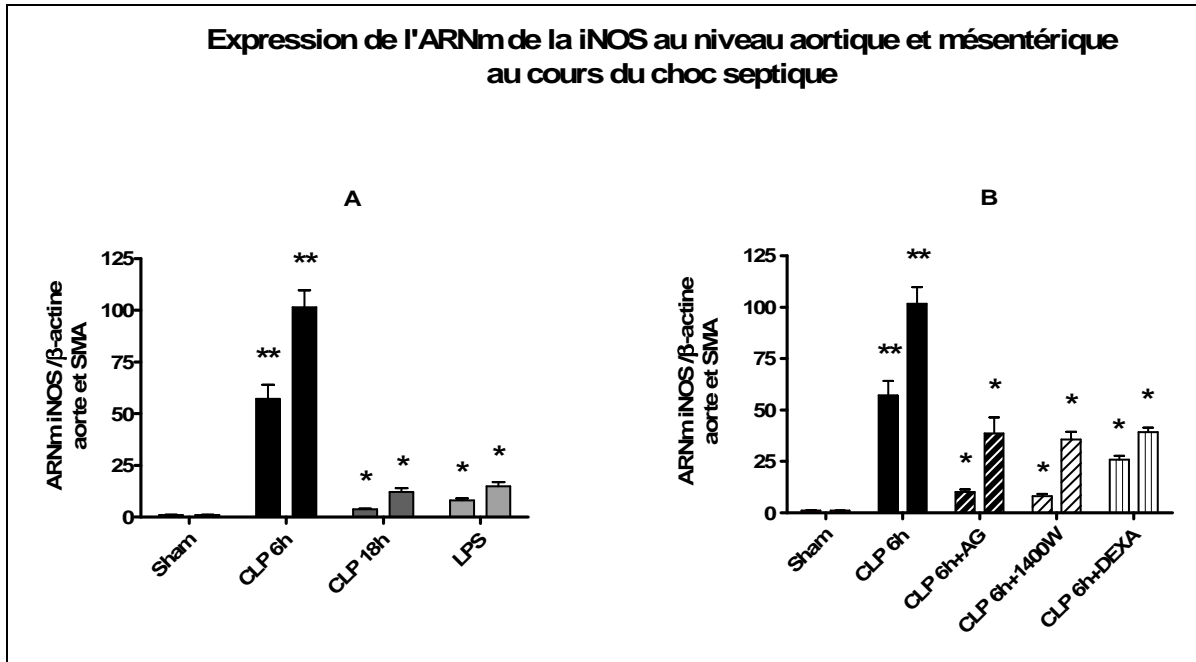


Figure 27 : Expression de l'ARNm de la iNOS au niveau de l'aorte et des SMA dans les modèles CLP6h, CLP18h et LPS (A) et en présence d'inhibiteurs de la voie du NO dans le modèle CLP6h (B).

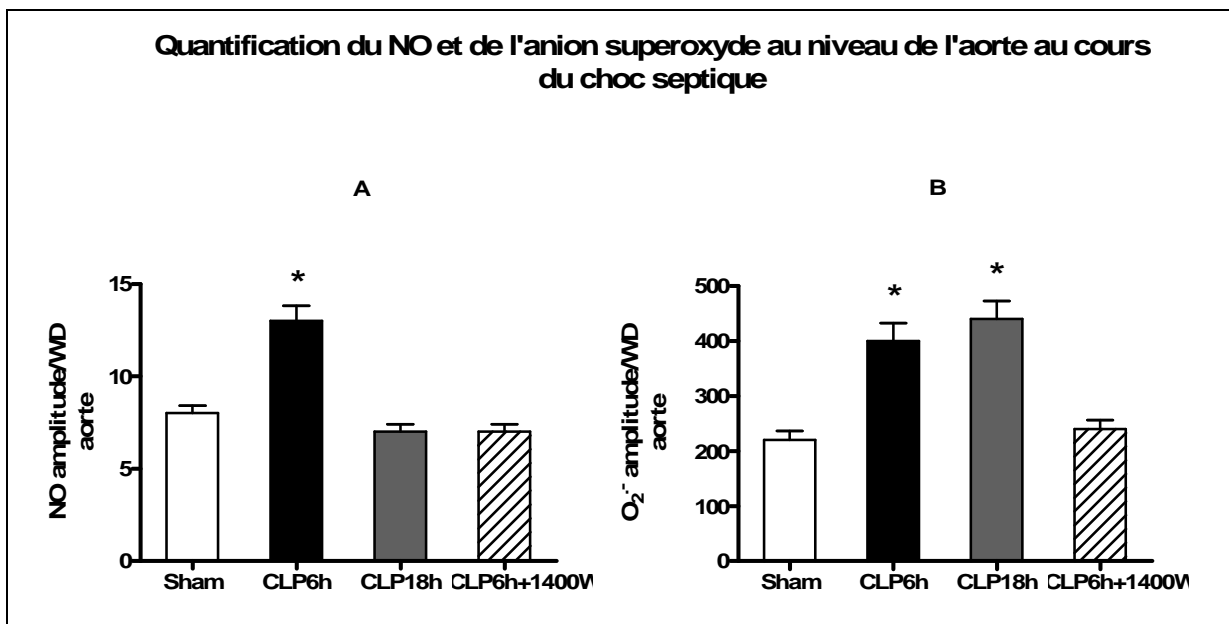


Figure 28 : Quantification du NO et de l'anion superoxyde au niveau de l'aorte dans les modèles CLP6h et CLP18h.

Valeurs exprimées en moyenne \pm écart type (n=7 par groupe)

* $p < 0,05$ vs groupe sham

** $p < 0,05$ vs autres groupes

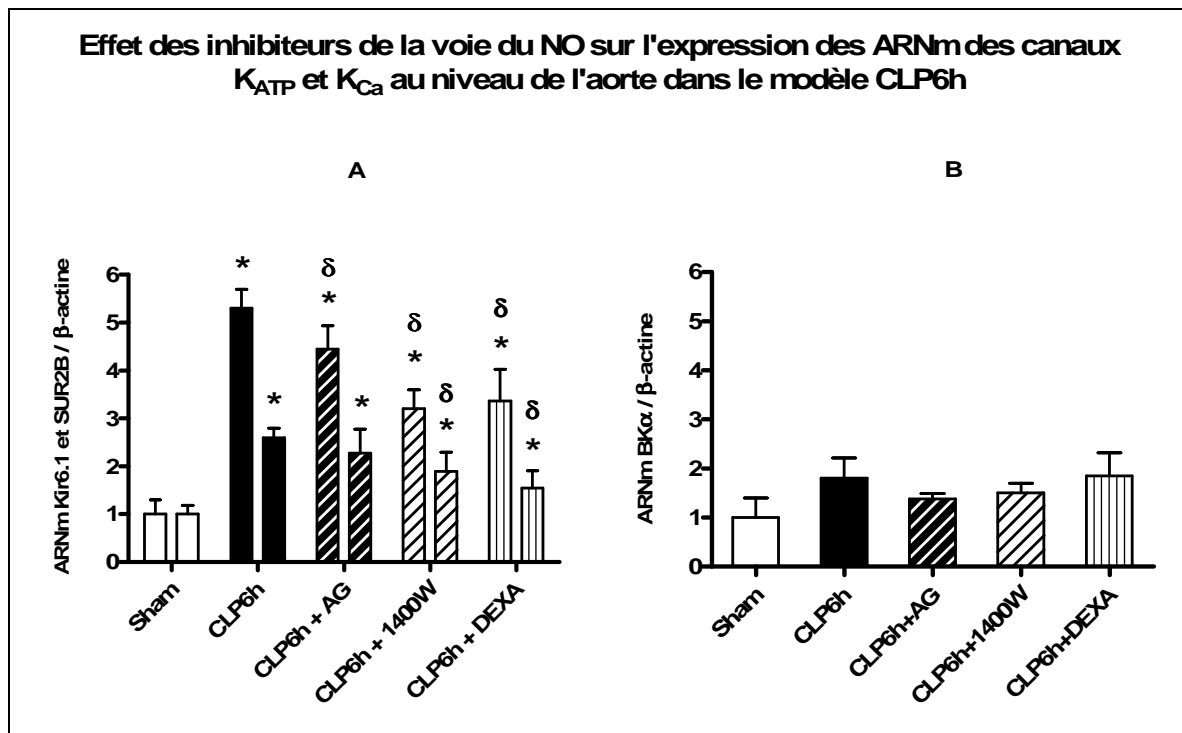


Figure 29 : Expression aortique des ARNm des sous-unités Kir6.1/SUR2B (A) et BK α (B) en présence d'inhibiteurs de la voie du NO dans le modèle CLP6h.

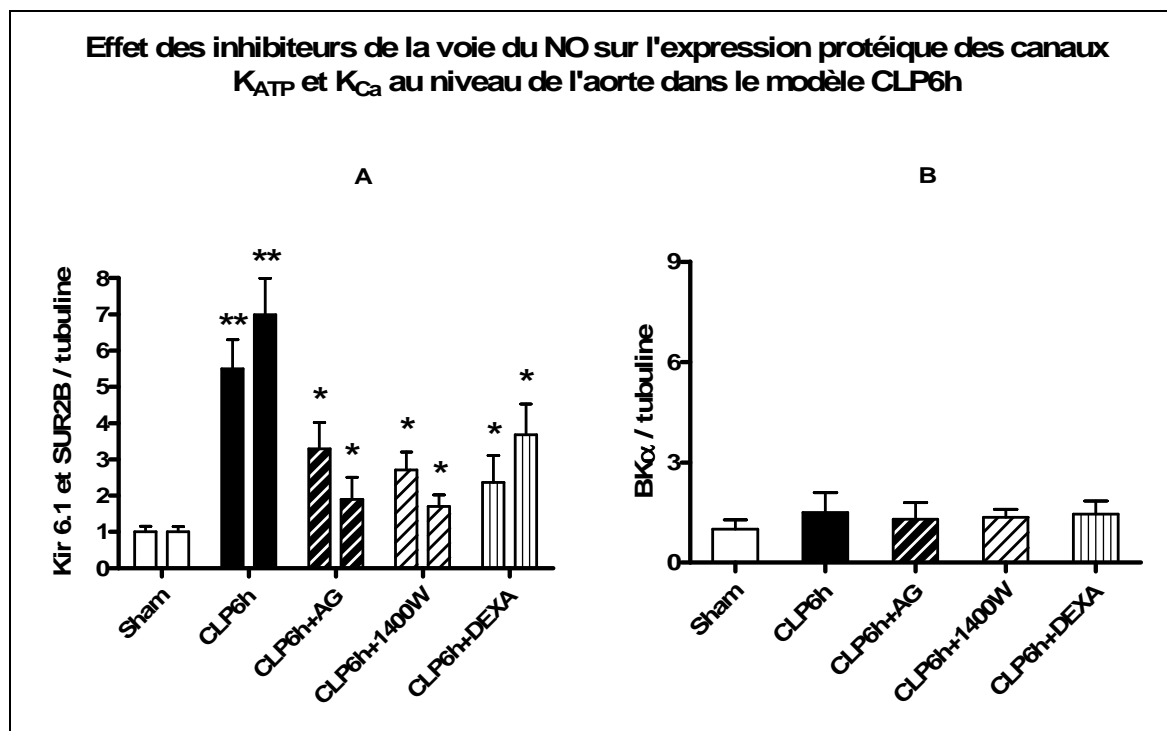


Figure 30 : Expression protéique des sous-unités Kir6.1/SUR2B (A) et BK α (B) au niveau de l'aorte en présence d'inhibiteurs de la voie du NO dans le modèle CLP6h.

Valeurs exprimées en moyenne \pm écart type (n=7 par groupe)

* $p < 0,05$ vs groupe sham

** $p < 0,05$ vs autres groupes

δ $p < 0,05$ vs groupe CLP6h

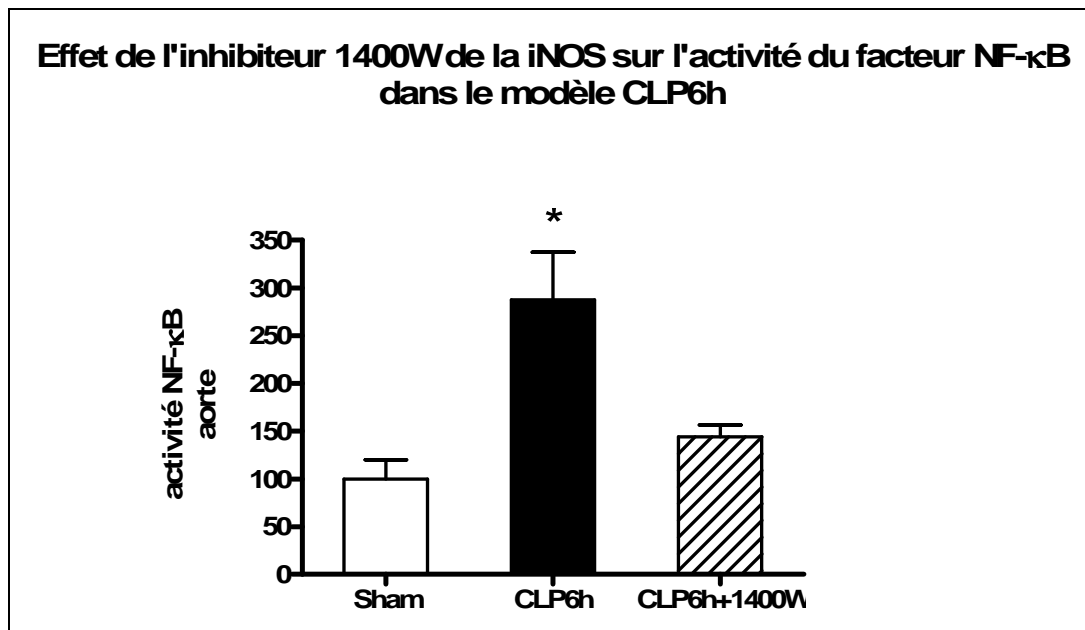


Figure 31 : Effet de l'inhibiteur 1400W de la iNOS sur l'activité du facteur NF- κ B dans le modèle CLP6h.

Valeurs exprimées en moyenne \pm écart type (n=7 par groupe)
** $p < 0,05$ vs groupe sham*

5. DISCUSSION

L'inhibition sélective des canaux K_{ATP} vasculaires améliore l'hémodynamique et la réactivité vasculaire.

Dans la présente étude, nous avons étudié indirectement l'activité des canaux potassiques (K_{ATP} et BK_{Ca}) en évaluant les conséquences de leur inhibition sélective sur la contraction des muscles lisses et la pression artérielle. Cette méthode a l'avantage d'explorer la fonction des canaux potassiques dans le système vivant, en complément des études *in vitro* / *ex vivo* à ce jour publiées [63].

Nous avons utilisé le PNU-37883A pour démontrer l'implication des canaux K_{ATP} vasculaires [308]. Il a été démontré que seuls les inhibiteurs pore-spécifiques, à l'inverse des inhibiteurs des récepteurs aux sulfonyles, sont capables d'inverser les effets de l'endotoxine [170, 184, 193]. Dans le choc endotoxique réanimé, *O'Brien et al* [178], ont constaté que le PNU-37883A augmentait la pression artérielle, mais n'améliorait ni le débit sanguin des organes vitaux, ni la microcirculation ou l'acidose métabolique. Dans la présente étude, le PNU-37883A a non seulement augmenté la PAM de base mais a également amélioré l'hyporéactivité aux vasopresseurs induite par le sepsis à la fois *in vivo* et *ex vivo*. Fait intéressant, le PNU-37883A n'a pas exercé d'effet dans le groupe témoin de notre étude, alors qu'il a augmenté la pression artérielle dans l'étude d'*O'Brien*. Cette différence pourrait s'expliquer par l'utilisation de l'isoflurane comme anesthésique dans cette dernière étude qui active les canaux K_{ATP} et par conséquent peut exacerber les effets du PNU-37883A [178]. En outre, le débit sanguin aortique de base et la réponse à la noradrénaline ont été soit inchangés, soit améliorés dans la présente étude. Cet effet peut être expliqué dans ce contexte de diminution du flux sanguin aortique par l'absence de vasoconstriction systémique majeure et par une augmentation du remplissage cardiaque due à une augmentation de la sensibilité à la noradrénaline. Cette augmentation de la sensibilité à la noradrénaline induit à son tour une répartition du sang veineux vers les compartiments vitaux en particulier dans la région splanchnique.

Il est également important de noter que l'augmentation à la fois de la pression artérielle et du débit sanguin aortique a été associée à une diminution significative du lactate, suggérant un effet bénéfique sur la perfusion tissulaire.

Inversement, l'ibérotisine, un inhibiteur sélectif des canaux BK_{Ca}, n'a pas modifié les paramètres étudiés. Une telle conclusion obtenue par perfusion *in vivo* est en net contraste avec les données précédemment publiées principalement obtenues dans les études *in vitro* de bain d'organe [188, 190, 288, 309] et en LPS-choc induit [287]. Ainsi, les canaux BK_{Ca} exercent des effets inhibiteurs radicalement différents *in vitro* et *in vivo*, ce qui suggère que les effets de l'activation des canaux BK_{Ca} au cours du choc septique sont soit masqués par les effets compensatoires ou sont d'une importance physiopathologique limitée.

L'expression des canaux K_{ATP} vasculaires est augmentée et partiellement modulée par le NO via l'activation du facteur NF-κB.

La restauration de la vasoréactivité avec le PNU-37883A démontre clairement l'implication des canaux K_{ATP} dans l'hyporéactivité vasculaire observée au cours du choc septique. Cette hyporéactivité vasculaire-canaux potassiques dépendante peut être due à une augmentation du nombre de canaux activés, mais aussi à une augmentation numérique des canaux liée au phénomène d'activation génique. *Shi et al.* [10] ont récemment découvert que le LPS augmentait la transcription des gènes Kir6.1 et SUR2B d'anneaux artériels mésentériques exposés au LPS. Dans cette étude, nous démontrons pour la première fois que l'expression des canaux K_{ATP} vasculaires est régulée au cours de l'état de choc. L'expression des canaux K_{ATP} vasculaires est précoce au cours de l'état de choc septique et persiste jusqu'à 30 heures. Cette dernière constatation est importante puisque *Crane et Aguilar-Bryan* ont démontré que le nombre de molécules SUR existantes détermine le nombre de canaux fonctionnels pouvant être formés [310].

En outre, grâce à l'utilisation de l'inhibiteur sélectif 1400W de la iNOS dans le modèle CLP6h, nous avons constaté que la normalisation de la teneur en NO et anion superoxyde dans l'aorte a été corrélée à une diminution de l'expression des sous-unités protéiques Kir6.1/SUR2B. Cette diminution a également été associée à une amélioration significative de la réactivité vasculaire. Ainsi, dans la phase précoce du choc septique, la régulation positive des canaux K_{ATP} vasculaires est partiellement liée à l'augmentation de production de NO et est responsable de la diminution du tonus vasculaire. La persistance de l'hyporéactivité vasculaire et la régulation positive des canaux K_{ATP} vasculaires à 18 heures, en dépit d'une diminution marquée de la production de NO, suggèrent que d'autres mécanismes induisent une insuffisance énergétique probablement via la génération de peroxy-nitrite, les cassures de l'ADN et l'activation de la poly-ADP ribosyltransférase [286, 311].

Ainsi, comme il a été démontré (i) que le LPS régule positivement l'expression des sous-unités Kir6.1/SUR2B des canaux K_{ATP} vasculaires et améliore l'activité des canaux K_{ATP} vasculaires via NF- κ B et (ii) que l'activation iNOS-dépendante de NF- κ B a également été observée *in vivo* dans le foie et les poumons de souris dans un modèle de choc hémorragique réanimé [312], nous avons donc mesuré les effets de l'inhibition de la iNOS sur l'activité de NF- κ B [313]. Nous avons constaté que l'augmentation de l'activité de NF- κ B observée dans le modèle CLP6h a été diminuée avec l'inhibiteur sélectif 1400W de la iNOS. Ainsi, au cours du choc septique, nous démontrons *in vivo* que la régulation positive des canaux K_{ATP} vasculaires est partiellement liée à l'augmentation de l'expression de la iNOS, probablement via l'activation du facteur nucléaire NF- κ B.

Limites.

L'augmentation d'expression des sous-unités des canaux K_{ATP} vasculaires observée est difficilement assimilable à l'augmentation du nombre de canaux fonctionnels. Néanmoins, de nombreux auteurs ont rapporté une relation étroite entre l'augmentation d'expression des protéines et l'augmentation d'activité des canaux mesurée par la technique de *patch-clamp* [314, 315]. De plus, dans un modèle cellulaire, *Shi et al.* ont démontré que l'augmentation de l'ensemble des courants K_{ATP} cellulaires induite par le LPS est due à une augmentation de l'expression des canaux de surface [10].

La sélectivité du PNU-37883A pour les canaux K_{ATP} vasculaires peut être discutée. Le PNU-37883A inhibe les canaux K_{ATP} dans le muscle lisse vasculaire à des concentrations sous-micromolaires alors qu'il n'a pas d'effet inhibiteur sur les canaux K_{ATP} pancréatiques, cardiaques ou squelettiques, même à forte concentration ($\geq 10 \mu\text{M}$) [150]. Ainsi, il est généralement admis que le PNU-37883A est un inhibiteur sélectif des canaux K_{ATP} musculaires lisses vasculaires. Néanmoins, le PNU-37883A peut également agir sur d'autres tissus contenant la sous-unité Kir 6.1 et n'est donc pas entièrement vasculaire-sélectif [150].

À ce jour, deux études [170, 171] ont évalué les effets du glibenclamide, un inhibiteur non sélectif des canaux K_{ATP} , versus placebo administré à des patients en choc septique. Ces études sont restées décevantes car n'ont montré aucune réduction significative de la dose requise de vasoconstricteurs, ni aucune amélioration significative de la pression artérielle chez les patients traités avec le glibenclamide.

Une partie de cette étude a fait l'objet de la publication d'un article présenté en annexe 1. Cet article expose les résultats concernant les groupes CLP6h et CLP18h \pm 1400W et PNU.

ETUDE 2

1. HYPOTHESE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL

Dans la présente étude, nous avons posé l'hypothèse que l'expression des canaux potassiques vasculaires était augmentée dans l'état de choc quelle qu'en soit son étiologie.

Ainsi, nous nous sommes intéressés à deux modèles expérimentaux de choc hémorragique, afin d'une part (i) d'étudier les effets *in vivo* d'inhibiteurs des canaux K_{ATP} et BK_{Ca} sur les paramètres hémodynamiques et sur la réactivité vasculaire, et d'autre part (ii) d'étudier l'influence de l'état de choc hémorragique sur l'expression des canaux potassiques vasculaires par PCR quantitative en temps réel et Western blot.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. EXPERIMENTATION ANIMALE

Les animaux ont été traités en accord avec la réglementation française et européenne concernant l'expérimentation animale.

Des rats mâles Wistar (300-320 g ; Dépré, Saint Doulchard, France) ont été hébergés dans des conditions contrôlées (pièce thermorégulée à 22°C et éclairée 12 heures sur 24) et de stress minimal. Les animaux ont eu accès libre à l'eau et à la nourriture.

Modèles expérimentaux de choc hémorragique

- *Modèle de choc hémorragique aigu (CH) :*

Il s'agit d'un modèle contrôlé de Wiggers [316], caractérisé par une saignée pratiquée au travers d'un cathéter intravasculaire et dont l'ampleur est guidée par la recherche d'une hypotension artérielle prolongée.

Chaque rat a été anesthésié par l'administration intrapéritonéale de thiopental (Hospira SAS, France) à la posologie de 62,5 mg/kg, puis a été trachéotomisé et ventilé. La ventilation mécanique a été maintenue avec un volume courant de 1 ml/100 g et une fréquence de 100/min.

L'artère carotidienne gauche a été cathétérisée pour réaliser la spoliation sanguine et pour le suivi de la PAM grâce à une sonde de pression reliée au système d'acquisition des données

IOX (EMKA Technologies, Paris, France). La spoliation sanguine a été réalisée sur 5 minutes jusqu'à l'obtention d'une PAM de 60 mmHg. La PAM a été maintenue aux environs de 60mmHg par prélèvement et réinjection de sang le cas échéant.

La température rectale des rats a été continuellement relevée et maintenue à 37°C (Homeothermic blanket control unit, HARVARD, United Kingdom).

Le groupe sham_{CH} a été instrumenté de la même façon sans spoliation sanguine.

- *Modèle d'ischémie-reperfusion par choc hémorragique et traumatisme chirurgical (IR) :*

Ce modèle a été mis au point au cours d'un travail de master [317], le but ayant été d'obtenir un modèle de choc hémorragique ayant une pertinence clinique, c'est-à-dire se rapprochant des conditions rencontrées chez un patient polytraumatisé. Il s'agit également d'un modèle de choc contrôlé, mais associé à un protocole d'ischémie – reperfusion avec agression chirurgicale chez le rat (figure 32).

Chaque rat a été anesthésié par administration intrapéritonéale de kétamine (Panpharma, Fougères, France) à la posologie de 90mg/kg et de xylazine (ROMPUN R 2%, solution injectable 25ml, KP042FU, Bayer Health Care, Puteaux, France) à la posologie de 10mg/kg. L'anesthésie a ensuite été entretenue par injection intrapéritonéale d'un tiers de la dose initiale de kétamine toutes les 30 minutes.

L'artère fémorale a été cathétérisée pour réaliser la spoliation sanguine et pour le suivi de la pression artérielle moyenne (PAM) grâce à une sonde de pression reliée au système d'acquisition des données IOX (EMKA Technologies, Paris, France).

La veine fémorale a été cathétérisée pour permettre la réanimation par perfusion de NaCl 0,9% et réinjection du sang initialement prélevé. La perfusion de NaCl 0,9% a été maintenue à 0,3 ml/heure pour éviter l'obstruction du cathéter.

La spoliation sanguine a ainsi été réalisée par le cathéter artériel en prélevant le volume sanguin nécessaire pour atteindre une PAM de 60 mmHg en 5 minutes environ. La seringue de prélèvement a été héparinisée (4ml de sang prélevé avec 0,5 ml d'héparine, soit 16 UI, selon le protocole de Yamamoto *et coll.* [318]) pour éviter que le sang ne coagule avant la réanimation par réinjection. Le sang prélevé a été maintenu à 37°C.

Le traumatisme a été réalisé par laparotomie juste après l'induction du choc hémorragique.

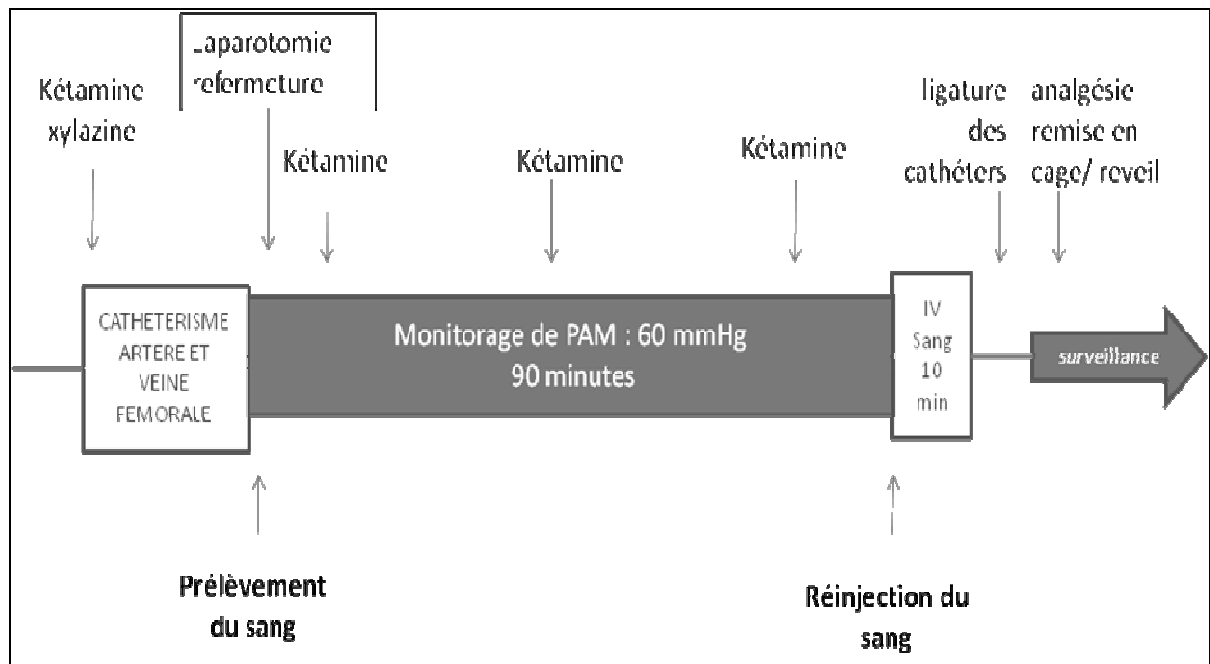


Figure 32 : Protocole du choc hémorragique réanimé avec traumatisme chirurgical [317]

Après une période de choc hémorragique de 90 minutes, au cours duquel la PAM a été maintenue entre 55 et 65 mmHg par prélèvement ou réinjection de sang artériel le cas échéant, le sang a été réinjecté dans sa totalité par le cathéter veineux sur une période de 10 minutes.

Les deux cathéters fémoraux ont été ligaturés, les tissus musculaires et cutanés suturés.

L'analgésie a été réalisée au moment du réveil par l'injection de 2mg/kg de nalbuphine (ampoule injectable de 20 mg/2 ml, Serb, Paris) en intramusculaire [319].

La température rectale des rats a été continuellement relevée et maintenue à 37°C (Homeothermic blanket control unit, HARVARD, United Kingdom).

Le groupe sham_{IR} a été instrumenté de la même façon sans spoliation sanguine.

Pour chaque type de choc (CH et IR), les animaux ont été randomisés en deux sous-groupes (n=7). Dans le premier sous-groupe, l'évaluation de la réactivité vasculaire a été réalisée *in vivo* en fin d'expérimentation (à H4 pour le groupe CH et à H18 pour le groupe IR). Dans le deuxième sous-groupe, au terme des chocs les différents tissus et organes ont été immédiatement prélevés, congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à leur analyse en biologie moléculaire.

2.2. ETUDES *IN VIVO*

2.2.1. EVALUATION DES EFFETS DE LA NORADRENALINE SUR LA PRESSION ARTERIELLE ET LE DEBIT SANGUIN AORTIQUE

La veine jugulaire et l'artère carotidienne gauches ont été cathétérisées respectivement pour l'administration des perfusions intraveineuses et pour le suivi de la pression artérielle moyenne (PAM) grâce à une sonde de pression reliée au système d'acquisition des données IOX (EMKA Technologies, Paris, France). La mesure du débit aortique abdominal, paramètre considéré comme le reflet du débit cardiaque, a également été réalisée grâce à une sonde périovasculaire placée autour de l'aorte abdominale, sonde reliée à un doppler Transonic (TX206 fluorometer, Transonic Systems, Ithaca, USA). Après l'instrumentation, une période de repos de 30 min a été respectée afin que les paramètres hémodynamiques des rats se stabilisent.

Pour chaque groupe (n = 7), ont été enregistrées les valeurs basale et maximale de PAM et de débit sanguin aortique abdominal obtenues après l'administration de 1 µg/kg en bolus de noradrénaline (tartrate de noradrénaline, Renaudin, France - concentration de 8mg/4ml). Cette épreuve de réactivité cardiaque et vasculaire a été réalisée à H4 après le début du choc CH et à H18 après le début du choc IR.

2.2.2. MODULATION PHARMACOLOGIQUE

La modulation pharmacologique par le PNU et l'ibériotoxine a été uniquement réalisée sur le modèle de choc hémorragique non réanimé (CH), comme décrit dans la section « **Etude 1** », paragraphe 2.2.

2.3. ETUDE EX VIVO

Au terme des expérimentations, le pH artériel et la lactatémie ont été déterminés sur l'appareil de mesure ABL 735, Radiometer, Copenhague, Danemark.

L'analyse de l'expression des ARNm et des protéines des canaux potassiques vasculaires, K_{ATP} et BK_{Ca} , a été réalisée respectivement par PCR quantitative en temps réel et Western blot selon la méthodologie détaillée dans la section « **Etude 1** », paragraphes 2.3.2 et 2.3.3.

3. RESULTATS

3.1. EFFETS DE L'ETAT DE CHOC HEMORRAGIQUE SUR LA MORTALITE, LES PARAMETRES HEMODYNAMIQUES ET LA REACTIVITE VASCULAIRE IN VIVO

La mortalité du groupe IR a été de 41%.

Les groupes sham_{CH} et sham_{IR} auxquels sont comparés respectivement les groupes CH et IR, présentent des caractéristiques hémodynamiques identiques et ont été réunis en un groupe sham unique sur les graphiques des figures qui seront présentées.

Comme décrit dans le tableau XII, comparativement au groupe sham, les groupes CH et IR ont été caractérisés par une diminution de la PAM et du débit sanguin aortique ainsi que par une acidose lactique (p<0,05).

Tableau XII : Paramètres hémodynamiques et métaboliques des différents groupes d'animaux en choc hémorragique (PAM, débit aortique abdominal, pH et lactate)

	Sham (n=7)	CH 4h (n=7)	IR 18h (n=7)
PAM (mmHg)	157 ± 8	60 ± 15*	89 ± 26*
Débit aortique abdominal (ml/min)	34 ± 3	19 ± 4*	20 ± 3*
pH	7.43 ± 0.06	7.1 ± 0.1*	7.28 ± 0.1*
Lactate (mM)	1.2 ± 0.3	13.7 ± 3.4*	5.1 ± 3.2*

*p<0.05 vs groupe sham

Comparativement au groupe sham, l'augmentation de la PAM en réponse à l'injection d'un bolus de 1 µg/kg de noradrénaline *in vivo* a été significativement diminuée dans les deux groupes CH et IR ($p < 0,05$) (figure 33).

Par ailleurs, l'augmentation du débit aortique abdominal induite par l'injection d'un bolus de 1 µg/kg de noradrénaline dans le groupe sham a été significativement diminuée dans le groupe CH ($p < 0,05$) (figure 34). Le groupe IR semble également présenter une moindre augmentation du débit aortique abdominal suite à l'administration de noradrénaline *in vivo* mais sans que cela ne soit néanmoins significatif (figure 34).

L'ensemble de ces données nous a permis de valider nos modèles expérimentaux comme modèles de choc hémorragique.

3.2. EFFETS DES INHIBITEURS DES CANAUX POTASSIQUES, PNU-37883A ET IBERIOTOXINE, SUR LES PARAMETRES HEMODYNAMIQUES DU MODELE CH

Modulation pharmacologique par le PNU-37883A

Le DMSO, utilisé pour dissoudre le PNU, n'a pas eu d'effet sur les paramètres hémodynamiques du groupe sham.

L'administration intraveineuse de PNU-37883A, inhibiteur vasculaire des canaux K_{ATP} , n'a pas modifié la PAM, le débit sanguin aortique ou la réactivité vasculaire dans le groupe sham.

La moindre augmentation de la PAM en réponse à la noradrénaline observée au cours du choc hémorragique (figure 33) a été restaurée par l'utilisation du PNU-37883A dans le groupe CH ($p < 0,05$) (figure 35).

Par ailleurs, la moindre augmentation du débit aortique abdominal en réponse à la noradrénaline induite par l'état de choc hémorragique (figure 34) a également été restaurée par l'utilisation du PNU-37883A dans le groupe CH ($p < 0,05$) (figure 36).

Modulation pharmacologique par l'ibériotoxine

En revanche, l'ibériotoxine (IbTX), inhibiteur spécifique des canaux BK_{Ca} , est restée sans effet sur la réponse pressive à la noradrénaline.

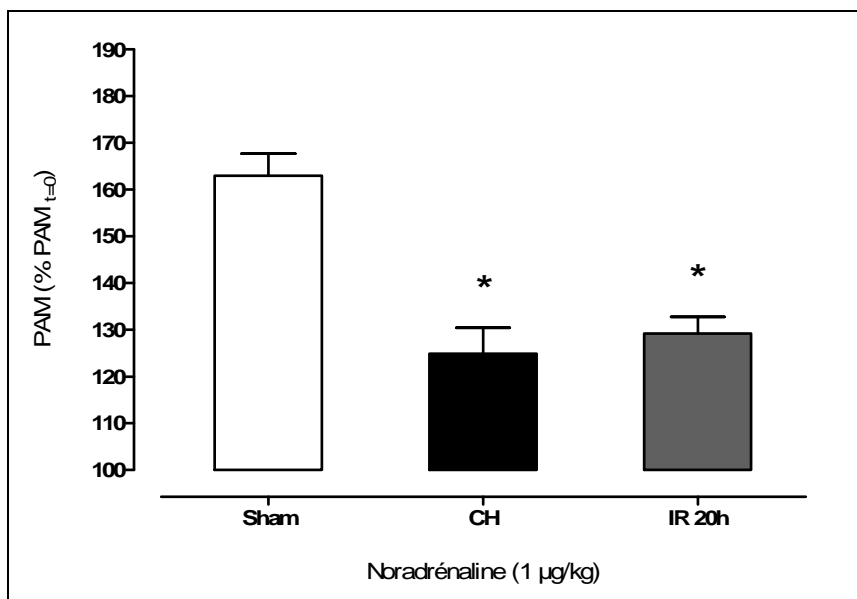


Figure 33 : Réponse en terme de PAM à l’administration de 1 µg/kg de noradrénaline *in vivo* dans les modèles CH et IR comparativement au groupe sham.

Valeurs maximales de PAM exprimées en pourcentage de la PAM de base (PAM_{t=0}) avant l’administration de la noradrénaline.

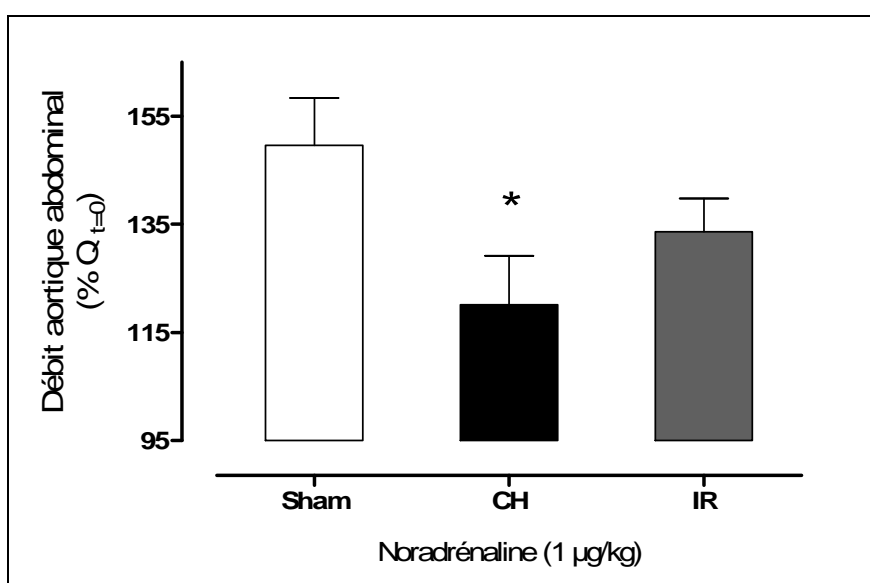


Figure 34 : Réponse en terme de débit aortique abdominal à l’administration de 1µg/kg de noradrénaline *in vivo* dans les modèles CH et IR comparativement au groupe sham.

Valeurs maximales de débit aortique abdominal exprimées en pourcentage du débit aortique abdominal de base (Q_{t=0}) avant l’administration de la noradrénaline.

Valeurs exprimées en moyenne ± écart type (n=7 par groupe)

* p<0,05 vs groupe sham

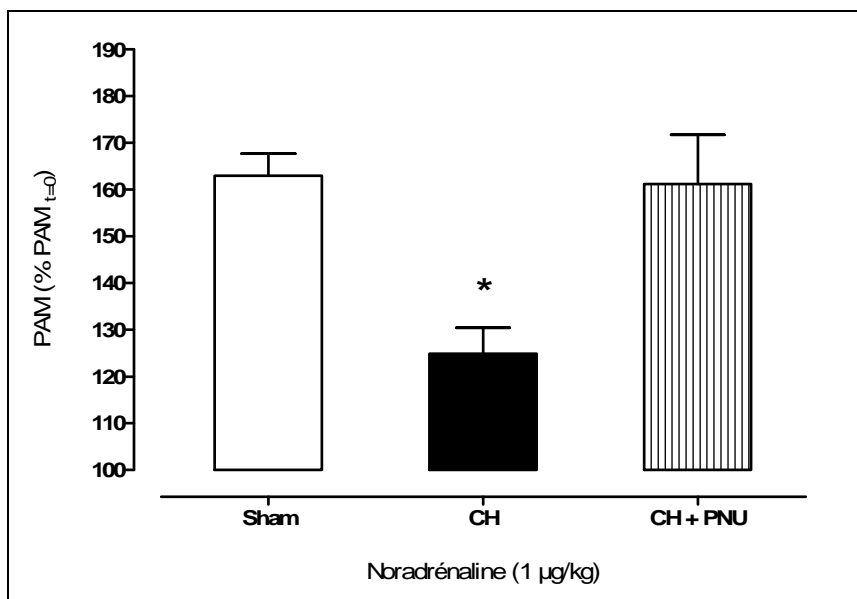


Figure 35 : Effet du PNU sur la réponse vasculaire à la noradrénaline *in vivo* dans le groupe CH après injection d'un bolus de 1 µg/kg de noradrénaline.

Valeurs maximales de PAM exprimées en pourcentage de la PAM de base (PAM t=0) avant l'administration de la noradrénaline.

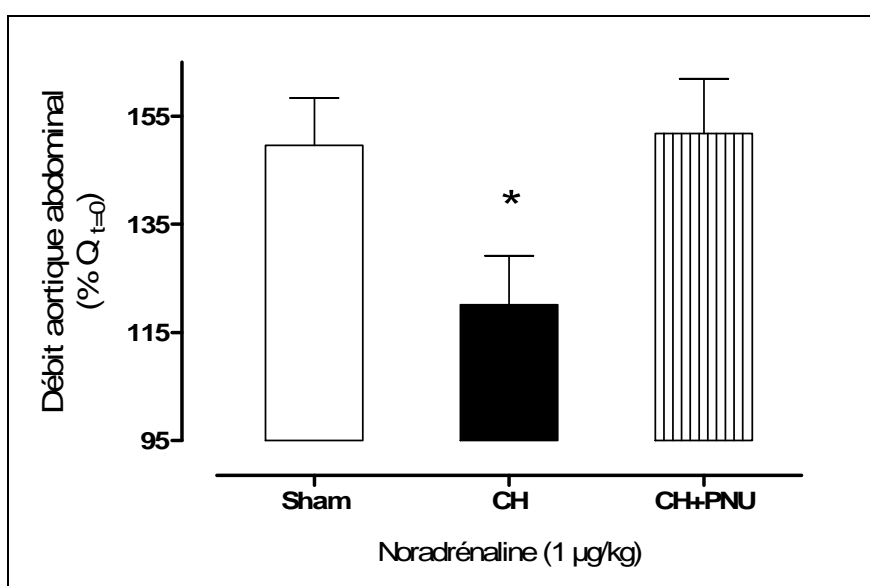


Figure 36 : Effet du PNU *in vivo* sur le débit aortique abdominal dans le groupe CH après injection d'un bolus de 1 µg/kg de noradrénaline.

Valeurs maximales de débit aortique abdominal exprimées en pourcentage du débit aortique abdominal de base (Q t=0) avant l'administration de la noradrénaline.

Valeurs exprimées en moyenne ± écart type (n=7 par groupe) à
 * p<0,05 vs groupe sham

3.3. INFLUENCE DE L'ETAT DE CHOC HEMORRAGIQUE SUR L'EXPRESSION DES CANAUX K_{ATP} ET BK_{Ca} AU NIVEAU DE L'AORTE ET DES SMA

Étude de l'expression des ARNm au niveau aortique et mésentérique

L'expression de l'ARNm des sous-unités Kir6.1 et SUR2B des canaux K_{ATP} vasculaires est significativement augmentée dans les groupes CH et IR ($p < 0,05$), cela aussi bien au niveau aortique (figure 37A) que mésentérique (figure 38A).

En revanche, l'expression de l'ARNm de la sous-unité α des canaux BK_{Ca} n'est augmentée significativement que dans le groupe IR, au niveau aortique ($2,85 \pm 0,26$; $p < 0,05$) (figure 37B) et mésentérique ($2,54 \pm 0,52$; $p < 0,05$) (figure 38B).

Par ailleurs, les deux modèles de choc CH et IR ont été associés à une augmentation significative de l'ARNm de la iNOS, au niveau aortique et mésentérique (figure 39).

Étude de l'expression protéique au niveau aortique dans le modèle CH

En raison de la faible quantité de tissus concernant les artères mésentériques, les études d'expression protéique n'ont été réalisées que sur les échantillons aortiques.

Par ailleurs, les échantillons aortiques du modèle IR n'ont pas été disponibles à cette étude d'expression protéique.

Au niveau aortique, l'expression de la protéine des sous-unités Kir6.1 et SUR2B a été augmentée dans le groupe CH ($3,5 \pm 0,4$ et $2,5 \pm 0,7$; $p < 0,05$) (figure 40A). L'expression protéique de la sous-unité α des BK_{Ca} a légèrement été augmentée, sans que cela ne soit néanmoins significatif ($1,9 \pm 0,71$) (figure 40B).

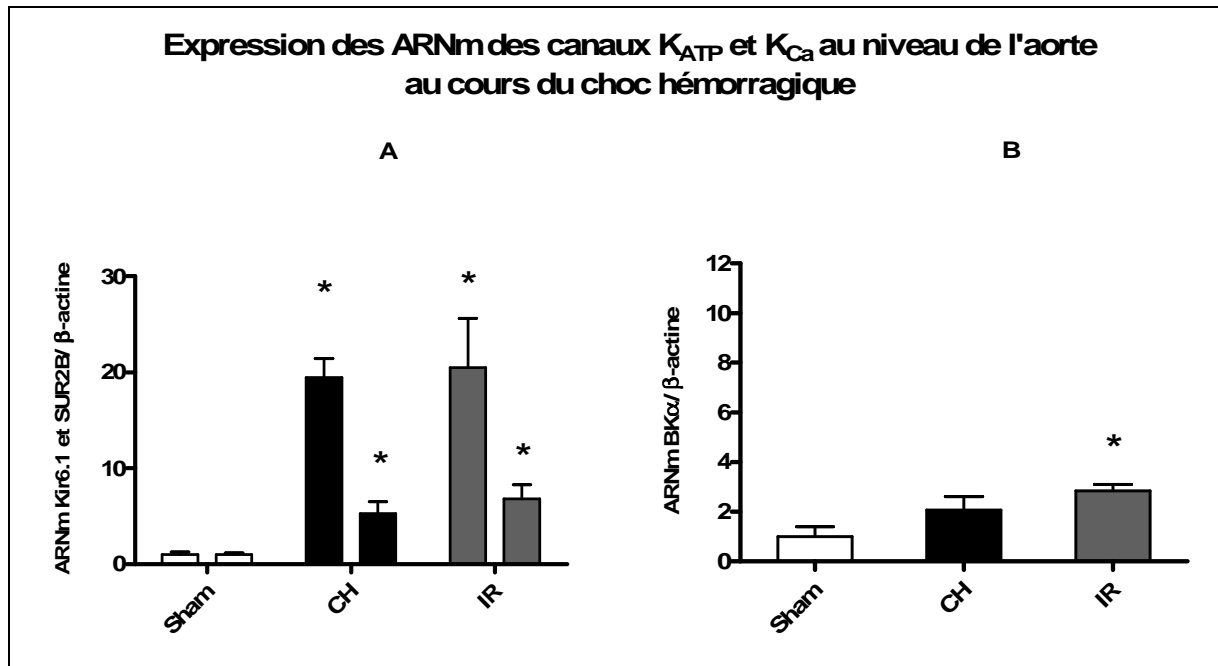


Figure 37 : Expression des ARNm des sous-unités Kir6.1/SUR2B (A) et BK α (B) au niveau de l'aorte dans les modèles CH et IR.

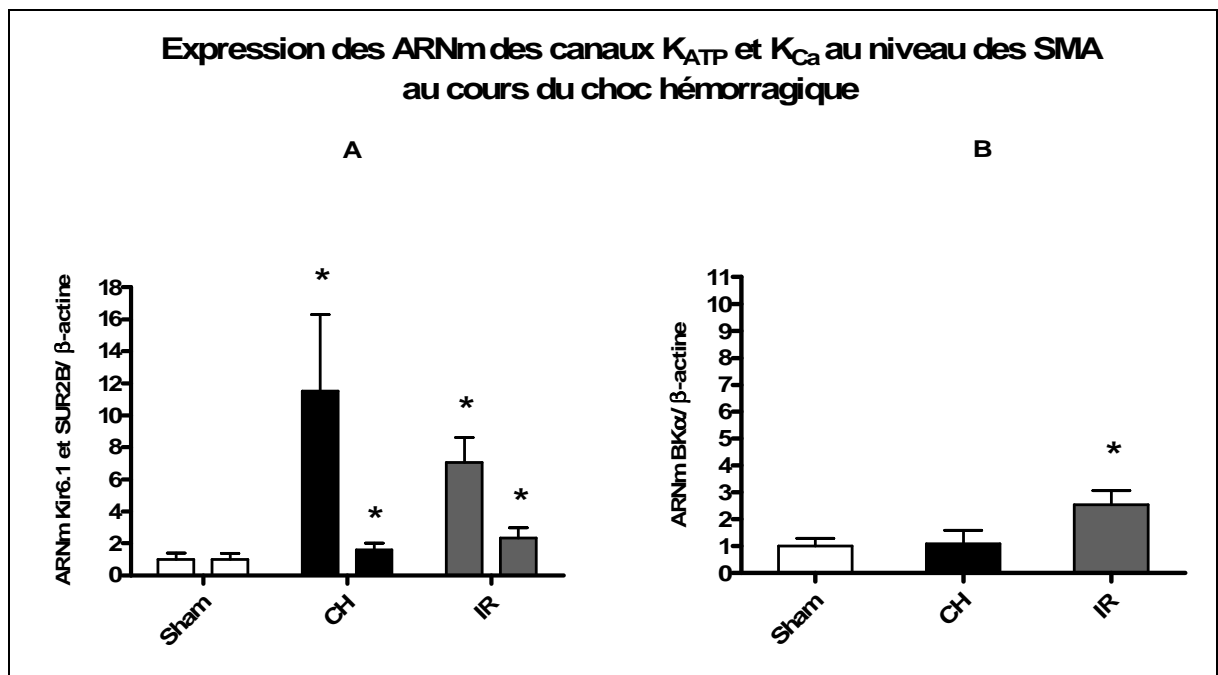


Figure 38 : Expression des ARNm des sous-unités Kir6.1/SUR2B (A) et BK α (B) au niveau des SMA dans les modèles CH et IR.

Valeurs exprimées en moyenne \pm écart type (n=7 par groupe)
 * $p < 0,05$ vs groupe sham

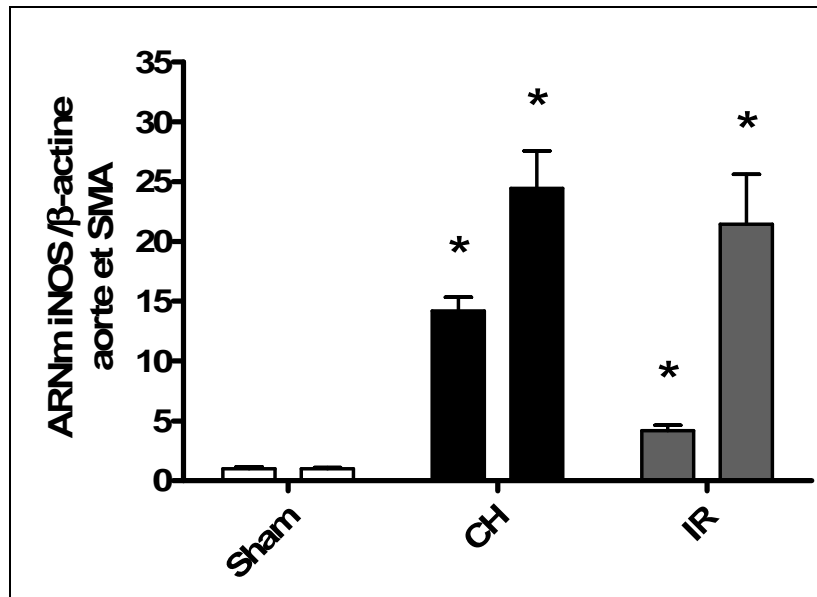


Figure 39 : Expression de l'ARNm de la iNOS au niveau de l'aorte et des SMA dans les modèles CH et IR.

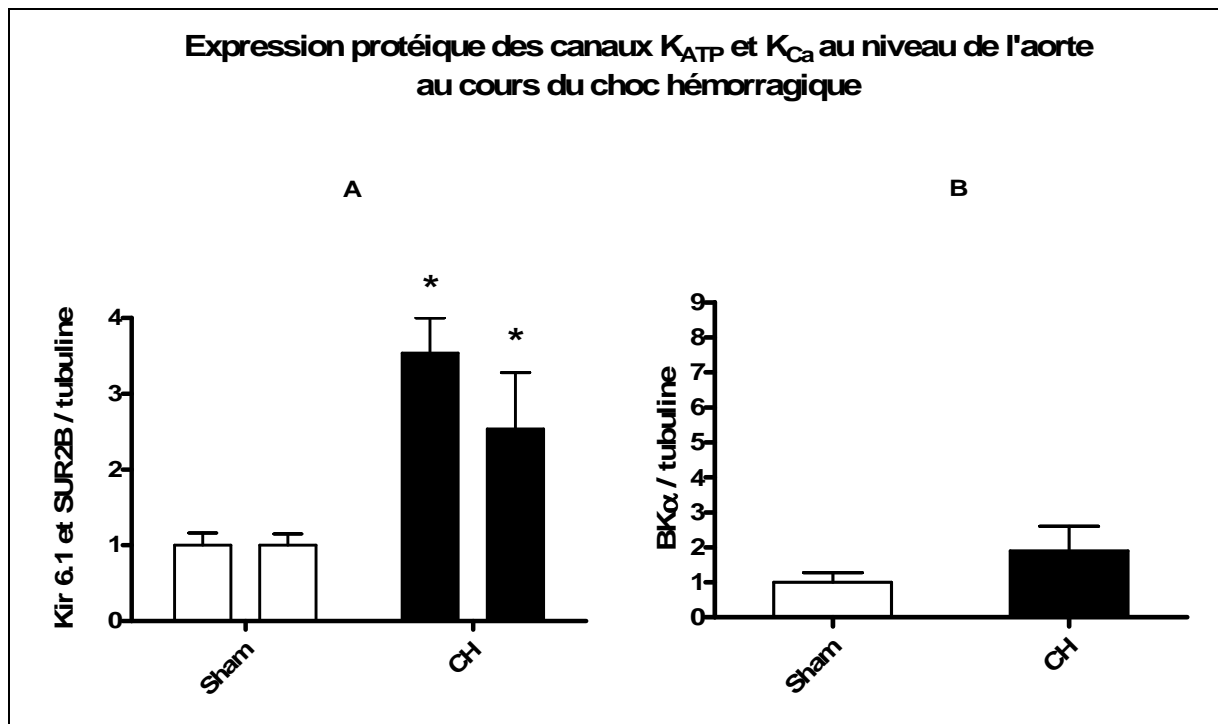


Figure 40 : Expression protéique des sous-unités Kir6.1/SUR2B (A) et BKα (B) au niveau de l'aorte dans les modèles CH et IR.

Valeurs exprimées en moyenne \pm écart type (n=7 par groupe)

* $p < 0,05$ vs groupe sham

4. DISCUSSION

L'inhibition sélective des canaux K_{ATP} vasculaires améliore la réactivité vasculaire.

Les résultats de cette seconde étude démontrent que les canaux K_{ATP} sont également impliqués dans l'adaptation vasculaire à l'état de choc hémorragique.

De façon similaire à l'étude 1 relative à l'état de choc septique, le PNU-37883A, inhibiteur sélectif des canaux K_{ATP} vasculaires, a permis de restaurer la réactivité vasculaire dans notre modèle expérimental de choc hémorragique non réanimé (CH). De plus, l'expression des sous-unités Kir 6.1 et SUR2B constitutives des canaux K_{ATP} vasculaires a également été augmentée dans nos deux modèles expérimentaux de choc hémorragique (CH et IR).

L'ibériotoxine, inhibiteur sélectif des canaux BK_{Ca} , n'a pas modifié les paramètres étudiés au cours du modèle expérimental de choc hémorragique non réanimé (CH), modèle dont l'expression de la sous-unité α des canaux BK_{Ca} n'a d'ailleurs pas été modifiée comparativement au groupe sham.

Notons que l'expression de la sous-unité α des canaux BK_{Ca} dans le modèle expérimental de choc hémorragique avec ischémie-reperfusion et agression chirurgicale (IR) a été augmentée significativement au niveau aortique et mésentérique. Malheureusement, nous n'avons pas étudié les effets de l'ibériotoxine sur l'hyporéactivité vasculaire dans ce modèle, ce qui ne nous permet pas de conclure quant au rôle des canaux BK_{Ca} dans l'état de choc hémorragique prolongé et réanimé.

CONCLUSION

Au cours de leur évolution, les états de choc associent plusieurs mécanismes physiopathologiques complexes et communs quelle que soit l'étiologie du choc. Ainsi, les états de choc vasoplégiques, tels que le choc septique et le choc hémorragique, présentent tous deux une dysfonction vasculaire majeure à l'origine d'une hypotension artérielle réfractaire.

L'un des mécanismes physiopathologiques de la dysfonction vasculaire commun à l'état de choc septique et à l'état de choc hémorragique est l'implication des canaux K_{ATP} vasculaires.

En effet, nous démontrons que les canaux K_{ATP} vasculaires sont activés au cours de ces états de choc vasoplégiques du fait de la restauration de la réactivité vasculaire *in vivo* avec le PNU-37883A, inhibiteur sélectif des canaux K_{ATP} vasculaires. Fait intéressant, le PNU-37883A n'a pas exercé d'effet dans les groupes sham de notre étude, ce qui confirme que les canaux K_{ATP} vasculaires ne sont pas ou peu activés à l'état physiologique.

Nous démontrons également pour la première fois *in vivo* que l'expression des sous-unités Kir6.1 et SUR2B constitutives des canaux K_{ATP} vasculaires est augmentée au cours des états de choc septique et hémorragique. En outre, nous démontrons au cours de cette étude que la régulation positive *in vivo* de l'expression des canaux K_{ATP} vasculaires est partiellement liée à l'augmentation de l'expression de la iNOS, probablement via l'activation du facteur nucléaire NF- κ B. Cependant, ces travaux suggèrent que d'autres mécanismes sont à l'origine de la régulation positive des canaux K_{ATP} notamment dans la phase tardive du choc.

Par conséquent, l'inhibition des canaux K_{ATP} vasculaires représente une cible thérapeutique potentielle pour le traitement de la dysfonction vasculaire dans les états de choc vasoplégiques. Cependant, ces canaux étant largement exprimés dans les tissus autres que le système vasculaire, les inhiber peut avoir d'autres actions dont il faudra déterminer les conséquences dans l'état de choc.

En effet, la recherche clinique sur l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques s'est révélée décevante à ce jour. Il apparaît complexe voire dangereux d'inhiber une molécule distribuée de façon ubiquitaire dans l'organisme, même si dans nos modèles expérimentaux, l'inhibition par le PNU-37883A a semblé bénéfique.

PERSPECTIVES

Pour élucider le rôle du NO dans l'activation et l'augmentation d'expression des canaux K_{ATP} , et ainsi dans leur implication dans l'hyporéactivité vasculaire observée au cours des états de choc vasoplégiques, il serait intéressant d'étudier des souris knockout pour le gène de la iNOS soumises à un état de choc septique, modèle maîtrisé au sein du laboratoire.

Ainsi, nous pourrions étudier l'expression des sous-unités Kir6.1 et SUR2B des canaux K_{ATP} en comparaison avec des souris sauvages C57BL6 au cours du choc septique expérimental. Nous pourrions également déterminer si l'inhibition sélective des canaux K_{ATP} par le PNU-37883A influencerait sur la réactivité vasculaire de ces souris KO pour le gène de la iNOS soumises à un état de choc septique.

ANNEXES

<i>Annexe 1 : Physiopathologie de l'hyporéactivité vasculaire au cours des états de choc.....</i>	<i>174</i>
<i>Annexe 2 : Vascular hyporesponsiveness to vasopressors in septic shock: from bench to bedside.....</i>	<i>175</i>
<i>Annexe 3 : Vascular ATP-sensitive potassium channels are over-expressed and partially regulated by nitric oxide in experimental septic shock.....</i>	<i>176</i>

Annexe 1 : Physiopathologie de l'hyporéactivité vasculaire au cours des états de choc.

Réanimation. 2008; 17(2):101-110

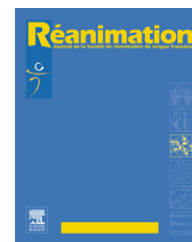
Collin S., Levy B.



Disponible en ligne sur www.sciencedirect.com



journal homepage: <http://france.elsevier.com/direct/REURG/>



NOTE PHYSIOLOGIQUE

Physiopathologie de l'hyporéactivité vasculaire au cours des états de choc

Pathophysiological mechanisms of vascular hyporesponsiveness in shock states

S. Collin^a, B. Levy^{a,b,*}

^a *Groupe Choc, Contrat Avenir Inserm-2006, faculté de médecine, université de Nancy, 9, avenue de la Forêt-de-Haye, B.P. 184, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy cedex, France*

^b *Service de réanimation médicale, Tour Drouet, 6^e étage, hôpitaux de Brabois, CHU de Nancy, rue du Morvan, 54511 Vandœuvre-lès-Nancy, France*

MOTS CLÉS

États de choc ;
Vasoplégie ;
Monoxyde d'azote ;
Canaux potassiques

Résumé Les états de choc sont principalement caractérisés par une insuffisance circulatoire aiguë, conduisant à une hypoperfusion tissulaire et pouvant aboutir à une défaillance multiviscérale. L'hypotension constatée peut être la conséquence de trois désordres hémodynamiques principaux : l'hypovolémie, la défaillance vasculaire et la défaillance cardiaque.

La défaillance vasculaire est caractérisée par une diminution du tonus vasoconstricteur et une hyporéactivité vasculaire avec une moindre sensibilité aux catécholamines. Il en résulte une vasodilatation inappropriée et une hypotension artérielle réfractaire pouvant conduire au décès du patient.

Plusieurs mécanismes ont été proposés afin d'expliquer la physiopathologie de la défaillance vasculaire observée au cours des états de choc. Le monoxyde d'azote (NO), produit en excès par la NO synthase inductible (NOSi), constitue l'un des principaux acteurs impliqués dans la vasoplégie et l'hyporéactivité vasculaire aux vasopresseurs. Les actions du NO sont multiples, notamment par le biais des seconds messagers (guanylate cyclase, GMPc et protéine kinase G) aboutissant à la déphosphorylation des chaînes légères de myosine et ainsi à une relaxation de la cellule musculaire lisse vasculaire, par combinaison avec l'anion superoxyde pour former l'ion peroxyde responsable de lésions d'oxydation tissulaires et cellulaires et par activation des canaux potassiques ATP et calcium-dépendants (K_{ATP} et K_{Ca}) soit directement par nitrosylation, soit par la voie du GMPc. Les canaux potassiques, dont l'implication est aujourd'hui également bien démontrée, peuvent de même être activés par diverses situations pathologiques, telles que la déplétion en ATP, l'hypoxie, l'acidose et l'hyperlactatémie, situations présentes au cours des états de choc. L'hyperpolarisation membranaire résultante s'oppose à l'entrée du calcium dans la cellule musculaire lisse vasculaire et contribue à la vasorelaxation et à l'hyporéactivité vasculaire. La vasopressine est une hormone vasoconstrictrice capable d'inhiber les canaux potassiques et les effets du NO, ainsi que de potentialiser

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : b.levy@chu-nancy.fr (B. Levy).

les effets vasoconstricteurs des vasopresseurs. Au cours du choc septique, il existe un déficit relatif en vasopressine. Sont également retrouvés au cours des états de choc une dysfonction et une désensibilisation des récepteurs alpha-adrénergiques (augmentation des taux circulants de catécholamines avec désensibilisation et découplage entre le récepteur et son(s) messager(s) intracellulaire(s), *down regulation* et diminution du nombre de récepteurs par internalisation), une inactivation des catécholamines par oxydation sous forme d'adrénochromes, ainsi que des taux élevés d'adrénomédulline, hormone vasorelaxante.

Les possibilités thérapeutiques spécifiques sont limitées. Les fortes doses de catécholamines vasoconstrictrices, la vasopressine, les glucocorticoïdes, la protéine C activée et le traitement du sepsis ont montré une efficacité partielle.

© 2007 Société de réanimation de langue française. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

KEYWORDS

Shock states;
Vasoplegia;
Nitric oxide;
Potassium channels

Summary Shock state is commonly characterized by an acute circulatory failure with tissue hypoperfusion which can potentially lead to multiple organ failure. The observed hypotension may be the consequence of three main hemodynamic disorders: hypovolemia, vascular failure and cardiac failure. Vascular dysfunction is characterized by a decrease in both vasoconstrictor tone and sensitivity to vasopressor agents. The consequences are an inappropriate vasodilatation and a refractory arterial hypotension which can lead to patient death.

Several mechanisms have been proposed to explain the pathophysiology of vascular failure induced by shock states. Nitric oxide (NO), which is produced in excess by inducible nitric oxide synthase (iNOS), is one of the crucial components implicated in vasoplegia and vascular hyporeactivity. NO may cause vasodilatation, notably via the GMPc pathway, by interacting with superoxide to produce peroxynitrite (peroxynitrite interacts with lipids, DNA and proteins via direct or indirect radical-mediated mechanisms) and by activating ATP-sensitive potassium (K_{ATP}) channels and calcium-activated potassium (K_{Ca}) channels. Potassium channels have a role in coupling membrane excitability with metabolism. They are also activated by peroxynitrite, a fall in ATP, acidosis, hypoxia and lactate, all of which are commonly present in shock. Experimental and clinical data have demonstrated that the induced hyperpolarisation is partially responsible for the hypovasoactivity observed during shock states. Vasopressin is a vasoconstricting hormone which can inhibit potassium channels as well as NO effects and can potentialize the effects of vasopressor drugs. However, during septic shock, plasma vasopressin concentration is inappropriately low. In addition, shock state is characterized by an alphareceptor dysfunction and desensitization (uncoupling, down regulation), an inactivation of catecholamines by oxidation and by high concentrations of adrenomedullin, a potent vasodilatory agent. While there are currently no specific therapeutic approaches, high doses of catecholamines, vasopressin, glucocorticoids, activated protein C and sepsis treatment have nevertheless demonstrated a partial efficiency in reversing sepsis-induced hypotension.

© 2007 Société de réanimation de langue française. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Introduction

Les états de choc sont principalement caractérisés par une insuffisance circulatoire aiguë, conduisant à une hypoperfusion tissulaire et pouvant aboutir à une défaillance multiviscérale. L'hypotension constatée peut être la conséquence de trois désordres hémodynamiques principaux :

- l'hypovolémie ;
- la défaillance vasculaire ;
- la défaillance cardiaque.

La défaillance vasculaire est caractérisée par une diminution du tonus vasoconstricteur et une hyporéactivité vasculaire avec une moindre sensibilité aux agents vasopresseurs. Il en résulte une vasodilatation et une hypotension artérielle réfractaire pouvant conduire au décès du patient.

Définition clinique de l'hyporéactivité vasculaire

L'hyporéactivité vasculaire peut être définie par une augmentation moindre de la pression artérielle pour une même dose d'agent vasopresseur. Cette hyporéactivité peut être observée expérimentalement en chambre d'organe en exposant des segments de vaisseaux isolés, avec ou sans endothélium, à des agents vasopresseurs ou en pratique clinique par l'établissement de courbes doses-réponses à un agoniste alpha-adrénergique, le plus souvent. Cette dernière technique intégrant également les autres mécanismes régulateurs (adaptation cardiaque, baroréflexe).

La persistance de l'hypotension artérielle est clairement associée, de façon significative et indépendante, à la mortalité. L'importance de l'hyporéactivité vasculaire est appréciée cliniquement par la posologie de vasopresseurs

nécessaire au maintien de la pression artérielle moyenne et par l'importance de la chute de la pression artérielle diastolique traduisant la vasoplégie. En l'absence d'hypovolémie ou de défaillance myocardique sévère, l'index cardiaque est logiquement élevé.

Physiologie : contraction de la cellule musculaire lisse vasculaire (Fig. 1)

La vasoconstriction résulte de l'augmentation de calcium dans la cellule musculaire lisse vasculaire (CMLV). Deux systèmes dépendants et synergiques peuvent être mis en jeu. D'une part, l'augmentation de calcium intracytoplasmique peut résulter de l'action de ligands neuronaux ou hormonaux, tels que l'angiotensine II ou la noradrénaline via leurs récepteurs membranaires spécifiques sur la cellule

musculaire lisse (récepteurs couplés à une protéine G). Une cascade enzymatique se déclenche alors, mettant en jeu dans la majorité des cas la phospholipase C, laquelle hydrolyse le phosphatidylinositol bisphosphate de la bicouche phospholipidique membranaire, en inositol trisphosphate (IP3) et en diacylglycérol. L'IP3 libéré va se fixer sur des canaux calciques réticuloplasmiques récepteurs à l'IP3, induire leur ouverture et la libération du calcium selon son gradient de concentration vers le cytoplasme. De plus, la libération des stocks réticuloplasmiques de calcium est majorée par l'activation de canaux calciques sensibles au calcium (*calcium-induced calcium release*) via les récepteurs canaux sensibles à l'IP3 et surtout, via les récepteurs canaux à la ryanodine.

D'autre part, l'augmentation de calcium intracytoplasmique peut également être due à une modification du potentiel de membrane. Le potentiel de membrane des

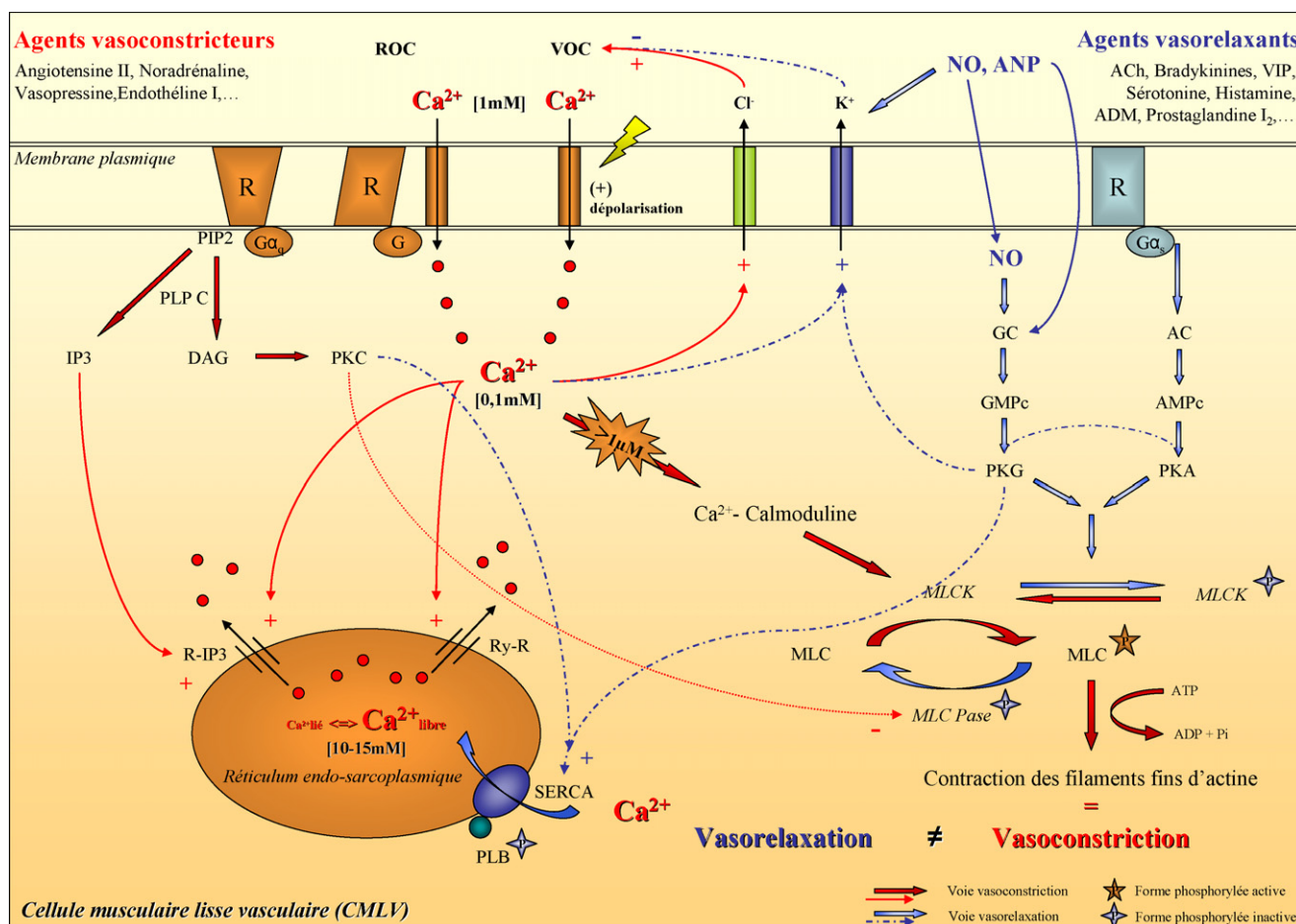


Figure 1 Mécanismes de la contraction de la cellule musculaire lisse vasculaire (CMLV).

AC : adénylate cyclase ; ACh : acétylcholine ; ADM : adrénomédulline ; ADP : adénosine diphosphate ; AMPc : adénosine monophosphate cyclique ; ANP : peptide natriurétique atrial ; ATP : adénosine triphosphate ; DAG : diacylglycerol ; G α_q : protéine G/sous-unité alpha de type q ; G α_s : protéine G/sous-unité alpha de type s ; GC : guanylate cyclase ; GMPc : guanidine monophosphate cyclique ; IP3 : inositol trisphosphate ; MLC : chaîne légère de myosine (*Myosine Light Chain*) ; MLCK : kinase de la chaîne légère de myosine (*Myosine Light Chain Kinase*) ; NO : monoxyde d'azote ; Pi : phosphate inorganique ; PIP2 : phosphatidylinositol bisphosphate ; PKA : protéine kinase A ; PKG : protéine kinase G ; PKC : protéine kinase C ; PLB : phospholamban ; R : récepteur couplé à une protéine G ; R-IP3 : récepteur à l'IP3, ROC : canaux récepteur-dépendants (*Receptor Operated Channels*) ; Ry-R : récepteur à la ryanodine ; SERca : pompes de recapture du calcium cytoplasmique (*Sarco Endoplasmic Reticulum Calcium ATPases*) ; VIP : peptide inhibiteur vasoconstriction (*Vasoactive Inhibitor Peptide*) ; VOC : canaux voltage-dépendants (*Voltage Operated Channels*).

cellules musculaires lisses varie entre -45 et -70 mV et une dépolarisation (rapprochant le potentiel de membrane de 0 mV) induit l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants et l'entrée du calcium extracellulaire dans la CMLV.

Ainsi, le calcium intracytoplasmique, passant d'une concentration d'environ $0,1 \mu\text{M}$ à l'état basal à une concentration seuil supérieure à $1 \mu\text{M}$, va se complexer à différentes molécules dont la calmoduline. Le complexe Ca^{2+} -Calmoduline (une molécule de calmoduline pour quatre ions calciques) ainsi formé, active alors une protéine kinase, la *Myosin Light Chain Kinase* (MLCK), responsable de la phosphorylation et ainsi de l'activation des chaînes légères de myosine (*Myosin Light Chain* [MLC]). L'activité ATPasique des chaînes légères de myosine permet la contraction des filaments d'actine et ainsi la contraction du muscle lisse vasculaire.

Par ailleurs, le diacylglycérol active la protéine kinase C, responsable de la phosphorylation de la phosphatase des chaînes légères de myosine, ainsi inactive. Ce mécanisme maintient l'activité ATPasique des chaînes légères de myosine et ainsi la contractilité de la CMLV.

Physiologie : relaxation de la cellule musculaire lisse vasculaire

La relaxation de la CMLV résulte de la diminution de la concentration de calcium intracytoplasmique soit par l'expulsion du calcium à l'extérieur de la cellule, soit par son recaptage dans le réticulum endosarcoplasmique. De nouveau, plusieurs mécanismes peuvent être mis en jeu.

Certains médiateurs comme le NO, le peptide natriurétique atrial ou l'acétylcholine, la sérotonine et l'histamine, sont des agents vasorelaxants. Ces médiateurs entraînent respectivement, par l'action de la guanylate cyclase et de l'adénylate cyclase, l'augmentation de guanosine monophosphate cyclique et d'adénosine monophosphate cyclique (GMPc et AMPc). Des protéines kinases sont alors activées (PKG et PKA) et sont responsables de la phosphorylation d'un peptide, le phospholamban. Ce peptide à l'état non phosphorylé est un inhibiteur des pompes ATPases- Ca^{2+} dépendantes du réticulum sarcoplasmique ou *Sarco Endoplasmic Reticulum Calcium ATPases* (Serca) responsables du recaptage du calcium du cytoplasme vers le réticulum. La levée d'inhibition des pompes Serca, mécanisme qui peut être considéré comme majoritaire dans la diminution de la concentration cytoplasmique du calcium, induit une relaxation de la CMLV et une vasorelaxation.

Par ailleurs, les protéines kinases PKG et PKA sont également responsables de la phosphorylation de la MLCK, la rendant inactive. Les chaînes légères de myosine ne peuvent ainsi être activées par la MLCK, ce qui contribue à la relaxation de la CMLV et à la vasorelaxation.

Enfin, la diminution du calcium intracytoplasmique peut également être due à l'efflux du calcium par stimulation des ATPases- Ca^{2+} dépendantes de la membrane plasmique, de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ou par l'activation des canaux potassiques ATP et calcium-dépendants. En effet, après phosphorylation de ces derniers par la PKG ou activa-

tion directe par le NO, il se produit une hyperpolarisation membranaire qui inhibe l'entrée du calcium via les canaux calciques voltage-dépendants.

Preuves cliniques de l'hyporéactivité vasculaire dans les états de choc

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 et exogènes et une activation maximale du système rénine-angiotensine. L'administration de doses majeures de catécholamines est alors nécessaire pour augmenter leur pression artérielle. Sur un plan expérimental, Bellissant et Annane [1] ont comparé 20 patients en choc septique à 12 sujets sains. Des courbes doses-réponses 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.

Les mécanismes en cause

Le monoxyde d'azote (NO)

Le NO est un messager intercellulaire omniprésent chez tous les vertébrés et régulant notamment le flux sanguin, la thrombose et l'activité neurale. Il joue également un rôle dans l'immunité non spécifique. Le NO est produit physiologiquement à des concentrations picomolaires à partir de la L-arginine par une NO synthase (NOS) qui est présente de façon constitutive dans les cellules endothéliales, appelée NOS endothéliale constitutive. Le NO diffuse dans le muscle lisse vasculaire sous-jacent et induit une vasorelaxation par l'intermédiaire de la stimulation de la guanylate cyclase soluble et de l'augmentation de la concentration en GMPc qui en résulte [2] (Cf. précédemment § 4.).

Dans le milieu des années 1980, il commençait à apparaître que les inhibiteurs des NOS étaient capables, pour une large part, de rétablir cette réponse contractile aux agents vasoconstricteurs [3,4]. Ces effets étaient maintenus dans des modèles de vaisseaux *ex vivo*, même en l'absence d'endothélium, suggérant que l'inflammation et le sepsis conduisaient à l'expression d'une NOS, la NOS inductible (NOSi), au niveau du muscle lisse de la paroi vasculaire. La production excessive de NO (concentrations nanomolaires) par la NOSi conduit à l'altération de la réponse contractile. Les auteurs ont conclu que ces résultats

- étaient en accord avec la physiopathologie, tant expérimentale que clinique, observée au cours du sepsis ;
- pouvaient expliquer la profonde vasoplégie et la réponse limitée aux stimulations qui régulent, en temps normal, la distribution du débit sanguin et la perfusion tissulaire.

Les taux circulants élevés de nitrites/nitrates, molécules stables issues du NO, retrouvés chez les patients septiques associés à la baisse du tonus vasculaire suggéraient que le NO était clairement impliqué dans la physiopathologie du choc [5,6].

D'autres effets délétères de la surproduction de NO ont été considérés dans la physiopathologie du sepsis sévère. En effet, le NO peut interagir avec le radical anion superoxyde et être à l'origine de la production de peroxy-nitrite [7], un puissant agent oxydant des molécules telles que les acides nucléiques, les lipides ou certaines protéines. Le NO peut également altérer la respiration mitochondriale et activer la polyADP-ribose synthétase aboutissant à une réduction de la glycolyse, du transport des électrons et de la production d'ATP. Enfin, le NO active les canaux potassiques ATP et calcium-dépendants [7].

L'ensemble de ces observations a conduit à l'utilisation d'inhibiteurs non sélectifs des NOS tels que le L-N^G-monométhylarginine (L-NMMA) chez des animaux septiques en premier lieu [8,9]. Le L-NMMA augmente la pression artérielle et les résistances vasculaires avec une diminution du débit cardiaque, permettant la réduction des doses de vasopresseurs. Cependant, les résultats sont divergents sur l'ensemble des études animales. Les différentes explications avancées concernent les différences interspèces, les différents modèles de sepsis utilisés, le type et les doses d'inhibiteurs utilisés et également le moment où les inhibiteurs sont administrés par rapport au début du sepsis. Il est important de noter que ces traitements n'ont pas amélioré la survie dans un modèle animal d'endotoxémie chronique [9]. Des études cliniques de faible effectif ont rapporté les effets bénéfiques sur l'hémodynamique de l'utilisation d'inhibiteurs des NOS ou de la guanilate cyclase comme le bleu de méthylène. Ces traitements étaient en général associés à une augmentation de la pression artérielle systémique mais sans aucune réduction de la mortalité [5,10]. Malgré la possibilité d'effets secondaires importants, et l'absence d'amélioration de la survie, il a été néanmoins décidé d'entreprendre de larges études cliniques randomisées et contrôlées. Une étude de phase II (312 patients) a montré une plus grande proportion de patients avec résolution du choc à 72 heures dans le groupe traité par du L-NMMA que dans le groupe témoin [10]. Malheureusement, l'étude de phase III, y faisant suite, a été interrompue à la demande du comité de Surveillance de l'étude, après inclusion de 797 patients au sein de 126 centres, en raison de l'émergence d'une surmortalité significative dans le groupe traité à trois jours (15% versus 27% dans le groupe traité), à 14 jours (36% versus 52% dans le groupe traité) et à 28 jours (49% versus 59% dans le groupe traité) [11]. Il a été proposé que l'utilisation d'un inhibiteur plus spécifique de la NOSi puisse apporter un bénéfice aux patients. Quelques résultats expérimentaux positifs ont été obtenus avec des molécules telles que la S-méthylisothiouree, la L-Canavanine [12] ou l'aminoguanidine, mais aucune n'a été retenue à ce jour pour un essai clinique. Cependant, bloquer la production de NO pourrait être à l'origine d'autres effets délétères comme les suivants :

- une altération du flux microcirculatoire ;
- une diminution de l'activité bactéricide NO-dépendante ;
- une diminution de l'activité de neutralisation des espèces dérivées de l'oxygène ;
- une diminution de la modulation de l'activation de la coagulation ;

- une augmentation de la demande en oxygène en améliorant la respiration mitochondriale dans des tissus où la perfusion, et donc la délivrance en oxygène, reste précaire, aggravant ainsi la balance demande-apport en oxygène.

L'ion peroxy-nitrite

Il est important de considérer que, chaque fois que le NO et l'anion superoxyde entrent en collision, ils interagissent spontanément pour former du peroxy-nitrite [7]. Cette réaction ne nécessite pas d'enzyme. De ce fait, il est possible que la plupart des effets biologiques attribués au NO soient liés au peroxy-nitrite.

L'état de choc constitue une situation d'école pour former du peroxy-nitrite puisque le NO et le superoxyde sont produits en grande quantité et dans les mêmes tissus. Dans plusieurs modèles de choc endotoxinique, il a été démontré que des inhibiteurs de la formation du peroxy-nitrite étaient capables à la fois de diminuer la quantité de peroxy-nitrite aortique et de reverser l'hyporéactivité vasculaire. De même, l'augmentation de la production endogène de peroxy-nitrite en induisant une déplétion des stocks endogènes de glutathion aggrave l'hyporéactivité vasculaire. De nombreux travaux montrent que l'effecteur final de l'action délétère du peroxy-nitrite sur la réactivité vasculaire est liée à l'activation des polyADP-ribose polymérase (PARP) qui sont des protéines impliquées dans un grand nombre de processus cellulaires comme la réparation de l'ADN ou l'apoptose, cela étant démontré par l'utilisation d'inhibiteurs des PARP ou par l'utilisation de souris modifiées par délétion du gène [13]. Par ailleurs, le peroxy-nitrite peut altérer le signal catécholergique. Il peut dénaturer les catécholamines par un phénomène d'oxydation et produire des dérivés adrénochromes, les rendant inefficaces à se lier à leurs récepteurs [14].

Les canaux potassiques (ATP-dépendants et calcium-dépendants)

Les canaux potassiques ATP-dépendants (K_{ATP}) et calcium-dépendants (K_{Ca} , notamment les BK_{Ca} dits de haute conductance) sont distribués dans une grande variété de tissus. Ils assurent le couplage entre l'excitabilité membranaire et le métabolisme énergétique de la cellule et jouent ainsi un rôle important tant en situation normale qu'en situation pathologique.

Le clonage des canaux K_{ATP} a permis de détailler leur structure. Il s'agit d'un complexe membranaire octamérique associant deux types de sous-unités : quatre sous-unités centrales (*Kir6.x*) appartenant à la superfamille des « *inwardly rectifying channel* » formant le pore du canal et quatre sous-unités périphériques régulatrices (*SUR.x*) liant les sulfonyles et l'ATP appartenant à la famille des ATP-binding cassette. Plusieurs gènes codant ces deux types de sous-unités ont été identifiés, notamment *Kir6.1* et *Kir6.2*, *SUR1* et *SUR2* (*SUR2A* et *SUR2B* étant deux variants) [15]. Selon le tissu considéré, la structure et le(s) rôle(s) des canaux K_{ATP} sont à différencier [16] (Tableau 1).

De façon analogue, les canaux BK_{Ca} sont constitués de l'association de quatre sous-unités alpha, formant le pore

Tableau 1 Structure et fonctions des canaux K_{ATP} tissu-spécifiques : quelques exemples.

Tissu	Sous-unités $Kir6.x/SUR.x$	Fonctions
Pancréas (îlots β)	$Kir6.2/SUR1$	Sécrétion d'insuline
Myocarde et muscle squelettique	$Kir6.2/SUR2A$	Protection de l'ischémie myocardique Réduction de l'excitabilité musculaire
Muscle lisse vasculaire	$Kir6.1/SUR2B$	Régulation du tonus vasculaire
Rein	$Kir6.2/SUR2B$	Réabsorption des électrolytes Homéostasie des ions K^+

du canal, et de quatre sous-unités périphériques régulatrices bêta.

La mise en jeu des canaux K_{ATP} serait l'un des mécanismes communs à différents états de choc : choc septique, choc hémorragique, choc avec ischémie–reperfusion. En effet, diverses situations pathologiques, telles que l'augmentation de NO et de peroxy-nitrite, la déplétion en ATP, l'hypoxie, l'acidose, l'hyperlactatémie, présentes au cours des états de choc peuvent activer les canaux K_{ATP} vasculaires et induire une hyperpolarisation membranaire et, de ce fait, une relaxation cellulaire et une vasorelaxation (Fig. 2).

Preuves expérimentales de l'implication des canaux K_{ATP}
Landry et Oliver ont démontré dans des modèles expérimentaux, choc endotoxinique et modèle hypoxique avec acidose lactique, que l'injection de glibenclamide (sulfonylée antagoniste des canaux K_{ATP}) améliorerait la pression artérielle et la sensibilité aux catécholamines, lesquelles sont très largement diminuées au cours de ces chocs [17]. Plusieurs études expérimentales de choc endotoxinique ont, depuis, confirmé ces données [16]. D'autres travaux ont ensuite mis en évidence une diminution de la fonction contractile en réponse aux vasoconstricteurs d'artères de rats incubées

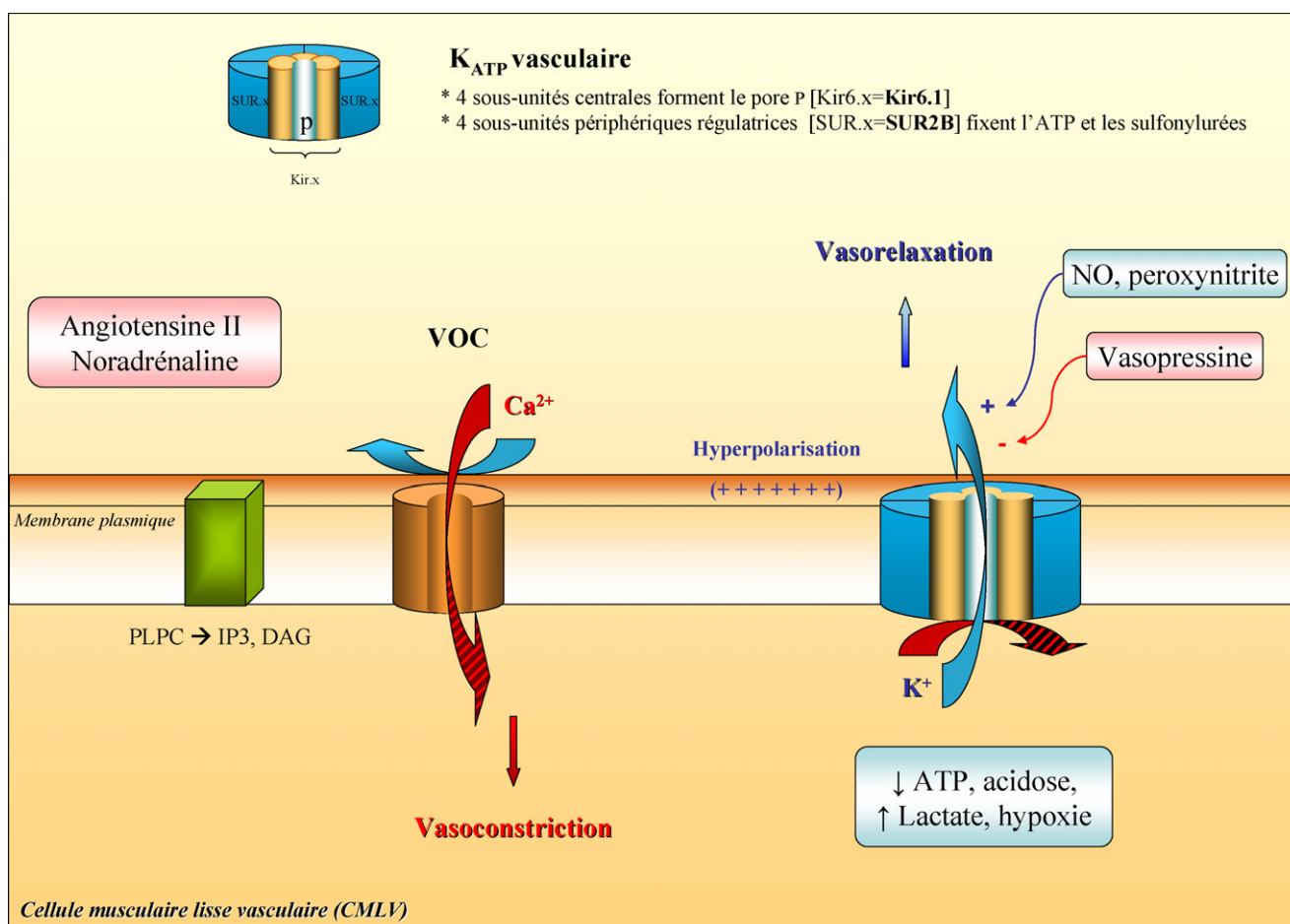


Figure 2 Mécanisme d'activation des canaux potassiques ATP-dépendants.

ATP : adénosine triphosphate ; Ca^{2+} : ion calcique ; IP3 : inositol triphosphate ; K^+ : ion potassique ; K_{ATP} : canaux potassiques ATP-dépendants ; Kir : sous-unité centrale du canal potassique (*inwardly rectifying channel*) ; NO : monoxyde d'azote ; p : pore du canal potassique ; PLPC : phospholipase C ; SUR : sous-unité périphérique du canal potassique (*Sulfonylurées Récepteur*) ; VOC : canaux voltage-dépendants (*Voltage Operated Channels*).

en présence d'endotoxine, hypocontractilité partiellement restaurée en présence de glibenclamide [16]. Par ailleurs, une étude expérimentale *in vivo* a démontré l'augmentation de l'expression des canaux K_{ATP} sur du diaphragme de rats endotoxiques. Ces auteurs ont, notamment, montré que le sepsis augmentait par neuf fois l'expression protéique des canaux K_{ATP} de type *Kir6.1* (sous-unité vasculaire) [18].

Études cliniques de l'implication des canaux K_{ATP}

Deux études ont, à ce jour, étudié les effets de l'administration du glibenclamide versus placebo chez des patients en choc septique. L'étude de Warillow et al. [19], menée sur un petit effectif de dix patients en choc septique, n'a montré aucune réduction significative des doses de vasoconstricteurs requis ainsi qu'aucune amélioration significative de la pression artérielle chez les patients traités par glibenclamide. L'étude de Morelli et al., [20] menée sur 30 patients en choc septique, rapporte des résultats analogues. Plusieurs hypothèses ont été évoquées afin d'expliquer l'inefficacité de la sulfonylurée à restaurer la pression artérielle chez les patients en choc septique et en particulier les suivants :

- la possibilité que le sepsis induise un changement de conformation des sous-unités SUR, cibles des sulfonylurées, rendant inefficaces ces dernières ;
- l'efficacité supérieure des inhibiteurs des sous-unités *Kir6.x* « pore-spécifique » retrouvée dans certains modèles expérimentaux ;
- le fait que les doses utilisées dans les modèles expérimentaux sont supérieures à celles tolérables et utilisables en thérapeutique chez l'homme.

Implication des canaux BK_{Ca}

Les canaux potassiques activés par le calcium, dits BK_{Ca} , sont de loin les canaux potassiques vasculaires les plus abondants. Leur rôle est d'induire une relaxation vasculaire lorsque les taux de calcium sont élevés et jouent ainsi un rôle régulateur du flux microvasculaire. Ces canaux sont, en partie, activés par le NO et le peroxy-nitrite et sont donc impliqués dans la vasoplégie observée au cours des états de choc. Expérimentalement, chez l'animal [21] comme chez l'homme [22], leur inhibition permet d'améliorer la réponse aux vasoconstricteurs.

À l'heure actuelle, les perspectives thérapeutiques restent décevantes quant à l'utilisation d'inhibiteurs des canaux potassiques chez l'homme, compte tenu du caractère ubiquitaire de ces canaux et de leurs différentes implications physiopathologiques.

Déficit relatif en vasopressine

La vasopressine (VAP), mieux connue sous le nom d'hormone antidiurétique, est un nonapeptide produit par les noyaux supraoptique et paraventriculaire de l'hypothalamus. La vasopressine est synthétisée en réponse à l'hyperosmolarité et à l'hypotension artérielle. De ce fait, ses taux sont très élevés dans les chocs hypovolémiques ou cardiogéniques. De façon paradoxale, Landry et al. [23] ont montré, en comparant les taux de VAP chez des patients en choc cardiogénique avec ceux de patients en choc septique sévère ayant les mêmes valeurs de pression artérielle, que le sepsis

induit un déficit relatif en VAP (22,7 versus 3,1 pg/mL). La neurohypophyse d'un patient en choc septique ne contient pratiquement plus de VAP, comme le confirme l'absence d'hypersignal en T1, en imagerie par résonance magnétique [24].

Trois mécanismes potentiels peuvent être à l'origine de ce déficit. Puisque seulement 10 à 20% du stock de VAP peut être relâché lors d'un stress aigu, il est possible que la libération hormonale ne suffise pas aux besoins physiologiques. Par ailleurs, une mauvaise communication entre les barorécepteurs (cardiaques, aortiques et carotidiens) et l'hypothalamus s'avère une hypothèse explicative puisqu'une dysfonction du système nerveux autonome en choc septique a déjà été décrite. Enfin, une inhibition de la sécrétion de VAP au niveau neurohypophysaire par les hautes concentrations de NO et de noradrénaline rencontrées en situation septique pourrait également contribuer au déficit relatif en VAP [25].

La VAP, en se liant à son récepteur V1a ou V1R situé principalement sur les cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins, induit une vasoconstriction. Ce type de récepteur se retrouve également au niveau de plusieurs organes et tissus, tels le foie, le rein, le cerveau, la rate, le myomètre, la vessie, les plaquettes et les glandes surrénales. En pratique clinique, la vasopressine augmente la pression artérielle sans variation de la fréquence cardiaque et, en général, diminue l'index cardiaque. L'intérêt pour la vasopressine provient des suivants :

- de son pouvoir vasoconstricteur important dans le sepsis, situation qui s'accompagne dans 50% des cas d'une déplétion endogène en vasopressine circulante ;
- de la possibilité chez les patients traités par VAP de sevrer les catécholamines.

Cependant, certains patients demeurent réfractaires aux doses de VAP utilisées. Il est probable que cette absence d'efficacité puisse être reliée à l'hyporéactivité vasculaire à la vasopressine comme l'ont démontré Leone et Boyle [26]. Les auteurs ont étudié la réponse vasopressive des artérioles mésentériques dans un modèle animal de *sepsis shock-like* induit par incubation des artères avec un donneur de NO et un inhibiteur des phosphodiesterases 3. La principale observation a été que la vasoconstriction induite par la noradrénaline, la vasopressine et l'association noradrénaline-vasopressine était diminuée. Dans un papier plus ancien, Hollenberg et al. [27] avaient également montré cette diminution de la réponse vasopressive à la vasopressine et avaient, de même, mis en évidence une réversibilité partielle de cette hyporéactivité vasculaire en inhibant le NO. Cependant, dans un modèle plus proche de la clinique utilisant une péritonite réanimée et observée après 18 heures, Barrett et al. [28] ont trouvé des résultats différents puisque, dans leur modèle, la vasoréactivité est diminuée pour la noradrénaline et préservée pour la vasopressine.

Modifications du signal catécholergique

D'une manière générale, la diminution de la réponse à l'exposition d'un agoniste est appelée désensibilisation.

Cette désensibilisation se produit pratiquement pour tous les récepteurs de surface lorsqu'ils sont exposés de façon continue ou répétée à un agoniste. Expérimentalement, la désensibilisation peut être définie par la nécessité d'augmenter la concentration de l'agoniste pour produire 50% de l'activité maximale. Les agonistes peuvent également entraîner une séquestration des récepteurs, phénomène qui survient en quelques minutes et qui consiste en une internalisation du récepteur à l'intérieur de la cellule. Ce phénomène est rapidement réversible dès lors que la stimulation agoniste cesse. Lorsque l'exposition à l'agoniste est plus prolongée (plusieurs heures ou jours), on observe alors une véritable *down regulation* qui implique une diminution permanente du nombre de récepteurs à la surface cellulaire et leur dégradation définitive. Leur restauration nécessite alors l'expression du gène codant pour le récepteur.

La régulation des récepteurs adrénérgiques au cours du sepsis a été beaucoup plus étudiée sur les bêtarécepteurs au niveau myocardique que sur les alpharécepteurs au niveau vasculaire. En ce qui concerne les alpharécepteurs, McMillan et al. [29] ont observé une réduction du nombre de récepteurs alpha-1 hépatiques dans un modèle de sepsis chronique chez le rat. Il n'y a actuellement pas de données chez l'homme. Au total, il existe des arguments expérimentaux et cliniques concordants en faveur d'une désensibilisation des bêtarécepteurs et, vraisemblablement, des alpharécepteurs au cours des états septiques. Cette désensibilisation n'a pas d'explication univoque et fait intervenir une diminution du nombre de récepteurs (*down regulation*) et/ou un découplage entre les récepteurs et leurs messagers intracellulaires. Il est tentant d'attribuer la désensibilisation des récepteurs à l'excès de catécholamines circulantes puisque celles-ci interviennent en premier lieu dans la régulation des récepteurs adrénérgiques. L'importance relative de l'apport de catécholamines exogènes n'a pas été étudiée spécifiquement. On sait, cependant, sur un nombre limité de patients, que la durée et la posologie des traitements par catécholamines aggravent la désensibilisation et que celle-ci reste observée en l'absence de tout traitement exogène.

L'adrénomédulline (ADM)

L'ADM peut agir selon un mode d'action endocrine ou paracrine. L'ADM a de nombreuses propriétés parmi lesquelles une action vasodilatatrice. Son action est médiée par le biais des messagers intracellulaires: activation de son récepteur membranaire couplé à une protéine G_{α_s} , responsable de l'activation d'une adénylate cyclase fixée à la membrane et de l'augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc. Les cellules musculaires lisses vasculaires réagissent en se vasorelaxant, mécanisme à la fois endothélium-dépendant par la libération de NO et endothélium-indépendant par l'intermédiaire d'une protéine kinase A.

L'ADM est exprimée de façon ubiquitaire et se trouve dans une large variété de tissus, incluant le système cardiovasculaire. Sa sécrétion au niveau cardiovasculaire est régulée par le *shear stress*, l'endotoxine, l'angiotensine II, l'endothéline I et aussi par l'hypoxie,

l'ischémie ou l'hyperglycémie. Les taux circulants d'ADM sont élevés dans le choc septique et ce, surtout dans les premières heures. Pour certains auteurs, cette hyperproduction précoce est responsable de l'état hyperkinétique. Avec la progression du sepsis, la réponse vasculaire à l'adrénomédulline est diminuée et pourrait être responsable du passage vers la forme hypokinétique. La baisse de la réponse vasculaire à l'ADM semble liée à une diminution de son ligand, l'*adrenomedullin binding protein-1* (ABP-1) et non à une modification de l'expression génique des récepteurs à l'ADM. Le traitement par l'association ADM/ABP-1 d'animaux septiques prévient la transition vers l'état hypokinétique, améliore l'état cardiovasculaire et diminue la mortalité [30]. Parmi les effets constatés de ces traitements, on retrouve la baisse de cytokines pro-inflammatoires [31], le maintien de l'activité NOS endothéliale et la diminution de l'apoptose des cellules endothéliales vasculaires. Les effets anti-inflammatoires semblent liés à la stimulation du récepteur au facteur activé de prolifération des peroxyosomes (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma* [PPAR gamma]) [32].

La vasodilatation est un phénomène ubiquitaire

Bien que décrite initialement pour le choc septique, il est maintenant évident que la plupart des mécanismes expliquant ou associés à l'hyporéactivité vasculaire soient également communs au choc hémorragique (inflammation, NO, canaux potassiques et canaux calciques, adrénomédulline, radicaux libres) et au choc cardiogénique évolué ou précoce. En effet, quelque soit l'étiologie, les chocs partagent un évènement commun qui est la baisse de la perfusion tissulaire qui limite la délivrance des substrats essentiels aux cellules. En particulier, la réaction inflammatoire, bien que variable en intensité, est retrouvée dans tous les types de choc.

Thérapeutiques

Catécholamines

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), puis d'un accroissement linéaire de l'effet en fonction du logarithme des concentrations [33,34]. L'effet maximal est habituellement atteint pour des doses comprises entre 100 à 1000 fois la dose seuil, ce qui dépasse largement la gamme posologique usuelle en principe clinique. Ce type de courbe dose-réponse explique que pour des doses seuil ne différant que de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ par minute d'un patient à l'autre, un effet pharmacodynamique identique sur la courbe dose-réponse nécessitera des posologies différant de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ par minute. La conclusion simple est qu'il ne faut pas hésiter transitoirement à augmenter les posologies de catécholamines (50 à 100 mg/h) si le patient est vasoplégique et hyperkinétique.

Hydrocortisone

L'utilisation d'un traitement par hydrocortisone permet un sevrage plus rapide des catécholamines chez les patients en choc septique sévère, en diminuant, par exemple, la production d'interleukine-6 [35,36]. De plus, les corticoïdes, en diminuant l'expression de *NF-κB*, diminuent aussi la production de NO via la NOSi. Les mécanismes détaillés d'action des corticoïdes passent par des effets génomiques et non génomiques après activation de leur récepteur nucléaire [37]. Les effets des glucocorticoïdes ont également été retrouvés dans des chocs non infectieux comme la défaillance vasculaire post-chirurgie cardiaque [38].

Protéine C activée (PCa)

La PCa semble restaurer la réponse vasopressive aux catécholamines au moins expérimentalement par un effet anti-inflammatoire [39,40] et antiradicalaire. En pratique clinique, les données issues de l'étude Prowess [41] montrent, dans le groupe traité, une régression plus rapide de la défaillance cardiovasculaire. De façon rétrospective, Monnet et al. [42] ont montré que les patients traités par PCa recevaient après 24 heures de traitement moins de catécholamines.

Vasopressine

Bien qu'efficace pour sevrer les vasopresseurs et améliorer la fonction rénale, le traitement par vasopressine est potentiellement dangereux en raison de la vasoconstriction intense possible. L'étude Vast, encore non publiée, dans laquelle la vasopressine a été utilisée à doses substitutives (<0,04 U par minute) ne retrouve pas d'amélioration globale de la mortalité.

Par ailleurs, il est intéressant de signaler que la vasopressine est un inhibiteur des canaux potassiques ATP-dépendants [25].

Conclusion : les bonnes pratiques cliniques

Les patients de l'étude de Rivers et al. [43], qui bénéficiaient de la tactique thérapeutique dite optimisée, nécessitaient, après 24 heures de traitement, moins de vasopresseurs démontrant ainsi qu'un traitement précoce de la défaillance vasculaire accompagné de mesures de bon sens (antibiothérapie, monitoring) et ce, probablement en diminuant les conséquences de l'hypoperfusion tissulaire, permet de diminuer l'impact du sepsis sur la défaillance vasculaire.

Références

- [1] Bellissant E, Annane D. Effect of hydrocortisone on phenylephrine—mean arterial pressure dose—response relationship in septic shock. *Clin Pharmacol Ther* 2000;68:293–303.
- [2] Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109–42.
- [3] Julou-Schaeffer G, Gray GA, Fleming I, Schott C, Parratt JR, Stoclet JC. Loss of vascular responsiveness induced by endotoxin involves L-arginine pathway. *Am J Physiol* 1990;259:H1038–43.
- [4] McKenna TM. Enhanced vascular effects of cyclic GMP in septic rat aorta. *Am J Physiol* 1988;254:R436–42.
- [5] Cobb JP, Danner RL. Nitric oxide and septic shock. *JAMA* 1996;275:1192–6.
- [6] Mebazaa A, De Keulenaer GW, Paqueron X, Andries LJ, Ratajczak P, Lanone S, et al. Activation of cardiac endothelium as a compensatory component in endotoxin-induced cardiomyopathy: role of endothelin, prostaglandins and nitric oxide. *Circulation* 2001;104:3137–44.
- [7] Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007;87:315–424.
- [8] Walker TA, Curtis SE, King-VanVlack CE, Chapler CK, Vallet B, Cain SM. Effects of nitric oxide synthase inhibition on regional hemodynamics and oxygen transport in endotoxic dogs. *Shock* 1995;4:415–20.
- [9] Vincent JL, Zhang H, Szabo C, Preiser JC. Effects of nitric oxide in septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1781–5.
- [10] Grover R, Zaccardelli D, Colice G, Guntupalli K, Watson D, Vincent JL. An open-label dose escalation study of the nitric oxide synthase inhibitor, N(G)-methyl-L-arginine hydrochloride (546C88), in patients with septic shock. Glaxo Wellcome International Septic Shock Study Group. *Crit Care Med* 1999;27:913–22.
- [11] Lopez A, Lorente JA, Steingrub J, Bakker J, McLuckie A, Willatts S, 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. *Crit Care Med* 2004;32:21–30.
- [12] Levy B, Valtier M, de Chillou C, Bollaert PE, Cane D, Mallie JP. Beneficial effects of L-canavanine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, on lactate metabolism and muscle high energy phosphates during endotoxic shock in rats. *Shock* 1999;11:98–103.
- [13] Pacher P, Szabo C. Role of poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) in cardiovascular diseases: the therapeutic potential of PARP inhibitors. *Cardiovasc Drug Rev* 2007;25:235–60.
- [14] Macarthur H, Westfall TC, Riley DP, Misko TP, Salvemini D. Inactivation of catecholamines by superoxide gives new insights on the pathogenesis of septic shock. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:9753–8.
- [15] Teramoto N. Physiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels in smooth muscle. *J Physiol* 2006;572:617–24.
- [16] Buckley JF, Singer M, Clapp LH. Role of KATP channels in sepsis. *Cardiovasc Res* 2006;72:220–30.
- [17] Landry DW, Oliver JA. The ATP-sensitive K⁺ channel mediates hypotension in endotoxemia and hypoxic lactic acidosis in dog. *J Clin Invest* 1992;89:2071–4.
- [18] Czaika G, Gingras Y, Zhu E, Comtois AS. Induction of the ATP-sensitive potassium (uK(ATP)-1) channel by endotoxemia. *Muscle Nerve* 2000;23:967–9.
- [19] Warrillow S, Egi M, Bellomo R. Randomized, double-blind, placebo-controlled crossover pilot study of a potassium channel blocker in patients with septic shock. *Crit Care Med* 2006;34:980–5.
- [20] Morelli A, Lange M, Ertmer C, Broeking K, Van Aken H, Orecchioni A, et al. Glibenclamide dose response in patients with septic shock: effects on norepinephrine requirements, cardiopulmonary performance, and global oxygen transport. *Shock* 2007;28(5):530–5.
- [21] Cauwels A, Brouckaert P. Critical role for small and large conductance calcium-dependent potassium channels in endotoxemia and Tnf toxicity. *Shock* 2007. Publish ahead of print.
- [22] Pickkers P, Dorresteijn MJ, Bouw MP, van der Hoeven JG, Smits P. In vivo evidence for nitric oxide-mediated calcium-activated potassium-channel activation during human endotoxemia. *Circulation* 2006;114:414–21.

- [23] Landry DW, Levin HR, Gallant EM, Ashton Jr RC, Seo S, D'Alessandro D, et al. Vasopressin deficiency contributes to the vasodilation of septic shock. *Circulation* 1997;95:1122–5.
- [24] Sharshar T, Carlier R, Blanchard A, Feydy A, Gray F, Paillard M, et al. Depletion of neurohypophyseal content of vasopressin in septic shock. *Crit Care Med* 2002;30:497–500.
- [25] Holmes CL, Patel BM, Russell JA, Walley KR. Physiology of vasopressin relevant to management of septic shock. *Chest* 2001;120:989–1002.
- [26] Leone M, Boyle WA. Decreased vasopressin responsiveness in vasodilatory septic shock-like conditions. *Crit Care Med* 2006;34:1126–30.
- [27] Hollenberg SM, Tangora JJ, Piotrowski MJ, Easington C, Parrillo JE. Impaired microvascular vasoconstrictive responses to vasopressin in septic rats. *Crit Care Med* 1997;25:869–73.
- [28] Barrett LK, Orié NN, Taylor V, Stidwill RP, Clapp LH, Singer M. Differential effects of vasopressin and norepinephrine on vascular reactivity in a long-term rodent model of sepsis. *Crit Care Med* 2007;35:2337–43.
- [29] McMillan M, Chernow B, Roth BL. Hepatic alpha 1-adrenergic receptor alteration in a rat model of chronic sepsis. *Circ Shock* 1986;19:185–93.
- [30] Fowler DE, Wang P. The cardiovascular response in sepsis: proposed mechanisms of the beneficial effect of adrenomedullin and its binding protein (review). *Int J Mol Med* 2002;9:443–9.
- [31] Gonzalez-Rey E, Chorny A, Varela N, Robledo G, Delgado M. Urocortin and adrenomedullin prevent lethal endotoxemia by down-regulating the inflammatory response. *Am J Pathol* 2006;168:1921–30.
- [32] Miksa M, Wu R, Cui X, Dong W, Das P, Simms HH, et al. Vasoactive hormone adrenomedullin and its binding protein: anti-inflammatory effects by up-regulating peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *J Immunol* 2007;179:6263–72.
- [33] Breslow MJ, Ligier B. Hyperadrenergic states. *Crit Care Med* 1991;19:1566–79.
- [34] Clutter WE, Bier DM, Shah SD, Cryer PE. Epinephrine plasma metabolic clearance rates and physiologic thresholds for metabolic and hemodynamic actions in man. *J Clin Invest* 1980;66:94–101.
- [35] Annane D, Sebille V, Charpentier C, Bollaert PE, Francois B, Korach JM, et al. Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. *JAMA* 2002;288:862–71.
- [36] Oppert M, Schindler R, Husung C, Offermann K, Graf KJ, Boenisch O, et al. Low-dose hydrocortisone improves shock reversal and reduces cytokine levels in early hyperdynamic septic shock. *Crit Care Med* 2005;33:2457–64.
- [37] Prigent H, Maxime V, Annane D. Science review: mechanisms of impaired adrenal function in sepsis and molecular actions of glucocorticoids. *Crit Care* 2004;8:243–52.
- [38] Kilger E, Weis F, Briegel J, Frey L, Goetz AE, Reuter D, et al. Stress doses of hydrocortisone reduce severe systemic inflammatory response syndrome and improve early outcome in a risk group of patients after cardiac surgery. *Crit Care Med* 2003;31:1068–74.
- [39] Isobe H, Okajima K, Uchiba M, Mizutani A, Harada N, Nagasaki A, et al. Activated protein C prevents endotoxin-induced hypotension in rats by inhibiting excessive production of nitric oxide. *Circulation* 2001;104:1171–5.
- [40] Regnault V, Levy B. Recombinant activated protein C in sepsis: endothelium protection or endothelium therapy? *Crit Care* 2007;11:103.
- [41] Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001;344:699–709.
- [42] Monnet X, Lamia B, Anguel N, Richard C, Bonmarchand G, Teboul JL. Rapid and beneficial hemodynamic effects of activated protein C in septic shock patients. *Intensive Care Med* 2005;31:1573–6.
- [43] Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, et al. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2001;345:1368–77.

Annexe 2 : Vascular hyporesponsiveness to vasopressors in septic shock: from bench to bedside.

Intensive Care Med. 2010 Dec; 36(12):2019-29

Levy B., **Collin S.**, Sennoun N., Ducrocq N., Kimmoun A., Asfar P., Perez P., Meziani F.

B. Levy
S. Collin
N. Sennoun
N. Ducrocq
A. Kimmoun
P. Asfar
P. Perez
F. Meziani

Vascular hyporesponsiveness to vasopressors in septic shock: from bench to bedside

Received: 8 April 2010
Accepted: 24 August 2010
Published online: 23 September 2010
© Copyright jointly held by Springer and ESICM 2010

B. Levy (✉) · S. Collin · N. Sennoun · N. Ducrocq · A. Kimmoun · P. Perez
Groupe Choc, Contrat Avenir INSERM 2006, Faculté de Médecine, Nancy Université, 9 Avenue de la Forêt de Haye, BP 184, Vandœuvre-lès-Nancy Cedex 54505, France
e-mail: b.levy@chu-nancy.fr
Tel.: +33-3-83154084
Fax: +33-3-83154220

B. Levy · N. Ducrocq · A. Kimmoun
Service de Réanimation Médicale, Institut du Coeur et des Vaisseaux, Hôpitaux de Brabois, CHU de Nancy, Rue du Morvan, Vandœuvre-lès-Nancy 54511, France

P. Asfar
Laboratoire HIFIH UPRES EA 3859, Université d'Angers, Angers, France

F. Meziani
Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, UMR 7213 CNRS, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, Illkirch, Strasbourg, France

Abstract Purpose: To delineate some of the characteristics of septic vascular hypotension, to assess the most commonly cited and reported underlying mechanisms of vascular hyporesponsiveness to vasoconstrictors in sepsis, and to briefly outline current therapeutic strategies and possible future approaches. **Methods:** Source data were obtained from a PubMed search of the medical literature with the following MeSH terms: Muscle, smooth, vascular/physiopathology; hypotension/etiology; shock/physiopathology; vasodilation/physiology; shock/therapy; vasoconstrictor agents. **Results:** Nitric oxide (NO) and peroxynitrite are crucial components implicated in vasoplegia and vascular hyporeactivity. Vascular ATP-sensitive and calcium-activated potassium channels are activated during shock and participate in hypotension. In addition, shock state is characterized by inappropriately low plasma glucocorticoid and vasopressin concentrations, a dysfunction and desensitization of alpha-receptors,

and an inactivation of catecholamines by oxidation. Numerous other mechanisms have been individualized in animal models, the great majority of which involve NO: MEK1/2–ERK1/2 pathway, H₂S, hyperglycemia, and cytoskeleton dysregulation associated with decreased actin expression. **Conclusions:** Many therapeutic approaches have proven their efficiency in animal models, especially therapies directed against one particular compound, but have otherwise failed when used in human shock. Nevertheless, high doses of catecholamines, vasopressin and terlipressin, hydrocortisone, activated protein C, and non-specific shock treatment have demonstrated a partial efficiency in reversing sepsis-induced hypotension.

Keywords Septic shock · Vasopressor · Nitric oxide · Potassium channels · Catecholamine

Introduction

Septic shock is the primary cause of death in critical care units [1]. Shock states are primarily characterized by acute circulatory failure leading to tissue hypoperfusion, and potentially resulting in multi-organ failure. Observed hypotension can be the consequence of three major

hemodynamic disorders: hypovolemia, vascular failure, and heart failure [2]. Vascular dysfunction [3] is characterized by: (1) microvascular dysfunction, (2) endothelial dysfunction, and (3) a decrease in vasoconstrictor tone as well as vascular hyporesponsiveness along with a lesser sensitivity to vasopressor agents such as catecholamine but also vasopressin, angiotensin II,

and serotonin [4]. The outcome of the last of these characteristics is vasopressor-refractory arterial hypotension which can ultimately lead to patient death. The purpose of the present review is to assess the most commonly cited and reported underlying mechanisms of decreased responsiveness to vasoconstrictors in sepsis, to summarize their relevance and clinical applicability, and to briefly outline current therapeutic strategies and possible future approaches. This review is not intended to be all-inclusive.

Definition(s) of vascular hyporesponsiveness to vasopressor agents

Vascular hyporeactivity to vasopressor agents is defined by a decreased effect of a vasopressor agent when compared to the normal response due to failure of vascular smooth muscle to constrict [4]. Vascular hyporeactivity can most often be observed either experimentally in organ chambers by exposing segments of isolated vessels to vasopressor agents, or in clinical practice by establishing dose–response curves to a pure alpha-adrenergic agonist such as phenylephrine. In this case, vascular hyporesponsiveness is defined by a smaller increase in arterial blood pressure (in patients) for a similar dose of vasopressor agent (healthy volunteers) [5]. This latter technique also incorporates other regulatory mechanisms, such as cardiac adaptation and baroreflex.

Hypotension associated with vascular hyporeactivity is clearly related, both significantly and independently, to mortality [6]. The extent of this vascular hyporesponsiveness can be assessed clinically by the measure of vasopressor dosage necessary to maintain mean arterial blood pressure [7] and by the drop in diastolic blood pressure reflecting vasoplegia [8, 9].

Physiology

Vasoconstriction is the result of increased intracellular calcium in vascular smooth muscle cells (VSMCs) and involves two mutually dependent and synergistic processes. On the one hand, the increase in intracytoplasmic calcium can result from the action of neural or hormonal ligands such as angiotensin II or norepinephrine via their specific membrane receptors on the VSMC (G protein-coupled receptors). Alternatively, the increase in intracytoplasmic calcium can also be generated by a change in membrane potential. The normal membrane potential of smooth muscle cells varies between -45 and -70 mV. A depolarization of the membrane (to a potential approaching 0 mV) induces the opening of voltage-gated calcium channels and thus the influx of extracellular calcium into the VSMC.

Relaxation of the VSMC results from the decrease in the concentration of cytoplasmic calcium, either by expulsion of calcium to the extracellular space or by its reuptake into the sarcoplasmic reticulum. Again, several mechanisms may be involved.

Certain mediators such as nitric oxide, the atrial natriuretic peptide, as well as acetylcholine, serotonin, and histamine are known vasorelaxant agents. These mediators bring about an increase in cyclic guanosine monophosphate and cyclic adenosine monophosphate (cGMP and cAMP) through the action of guanylate cyclase and adenylyl cyclase respectively.

Clinical evidence of vascular hyporesponsiveness in septic shock

Clinical evidence has confirmed vascular hyporesponsiveness in septic shock, since volume-resuscitated septic shock patients remain hypotensive despite elevated levels of endogenous and exogenous catecholamines [10] and a maximum activation of the renin-angiotensin system. Administration of large doses of catecholamines is hence necessary to increase arterial pressure. In an experimental study, Bellissant and Annane [5] compared 20 patients with septic shock with 12 healthy subjects. Dose–response curves to phenylephrine, a pure alpha-adrenergic agonist, were established and ultimately showed a decreased response to alpha-adrenergic stimulation in the septic shock patients.

Mechanisms involved

Vascular hyporesponsiveness to vasopressor during sepsis is probably multifactorial. Nevertheless, it is important to identify individual contributing factors and mechanisms in order to select meaningful therapeutic targets. As a consequence, a vast array of mechanisms, pathways, and disruptions in cellular homeostasis have been examined in septic vessels [11] (Figs. 1, 2, 3).

Nitric oxide

Nitric oxide (NO) is an omnipresent intercellular messenger found in all vertebrates, notably regulating blood flow, coagulation, and neural activity. Physiologically, NO is produced in picomolar concentrations from L-arginine by nitric oxide synthase (NOS), an enzyme constitutively present in endothelial cells and termed endothelial constitutive NOS (eNOS). According to a few recent studies, a mitochondrial isoform of NOS (mtNOS) may also represent a significant source of NO during

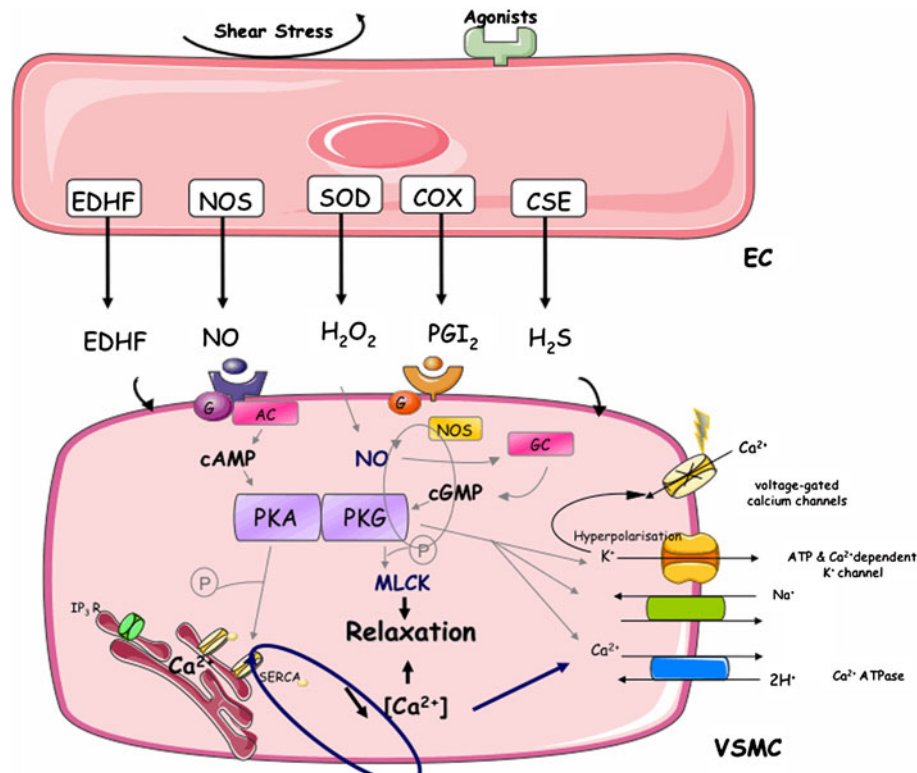


Fig. 1 Endothelium-dependent relaxation. Multiplicity of mechanisms leading to endothelium relaxation such as shear stress and vasorelaxant agonists; ECs synthesize and release various vasorelaxation factors that can diffuse towards the VSMCs and produce relaxation. *EC* endothelial cell, *VSMC* vascular smooth muscle cell, *EDHF* endothelium-derived hyperpolarizing factor, *NOS* nitric oxide synthase, *SOD* superoxide dismutases, *COX* cyclooxygenase, *CSE* cystathionine γ -lyase, *NO* nitric oxide, *H₂O₂* hydrogen

peroxide, *PGI₂* prostacyclin, *H₂S* hydrogen sulfide; *G* protein, *AC* adenylyl cyclase, *NO* nitric oxide, *GC* guanylate cyclase, *cAMP* cyclic adenosine monophosphate, *cGMP* cyclic guanosine monophosphate, *PKA* protein kinase A, *PKG* protein kinase G, *MLCK* myosin light-chain kinase, *SERCA* sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases, *ATP* adenosine triphosphate, *IP₃R* inositol-1,4,5-trisphosphate-receptor, *P* phosphate

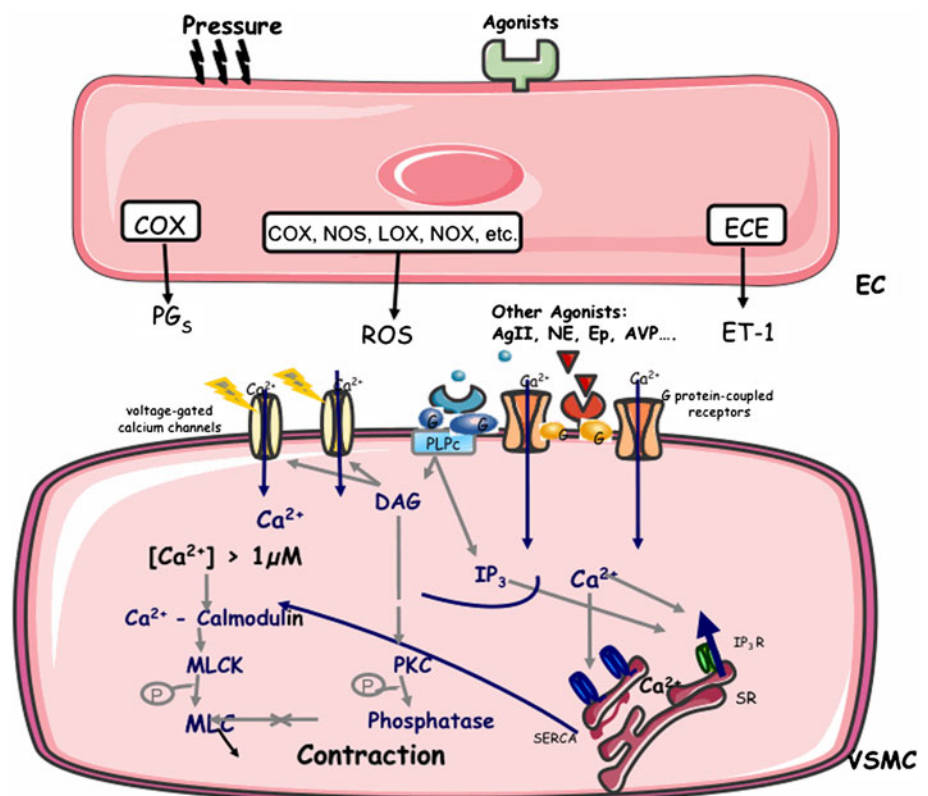
circulatory shock [12]. A non-enzymatic source of NO has also been described related to the reduction of nitrites under acidic and reducing conditions, as can occur in ischemic tissues [13]. NO diffuses into the underlying vascular smooth muscle and induces vasorelaxation via stimulation of soluble guanylate cyclase and resulting increase in cGMP concentration [14].

In the mid-1980s, it became apparent that inhibitors of NOS were able to restore, to a large extent, this contractile response to vasoconstrictor agents [15]. These effects were maintained in vessel models *ex vivo*, even in the absence of endothelium, thereby suggesting that inflammation and sepsis lead to the expression of an inducible NOS (iNOS) in vessel wall smooth muscle. Excessive production of NO (nanomolar concentrations) by iNOS hence resulted in an altered contractile response. Authors thus concluded that the results (1) were consistent with the pathophysiology observed, both experimental and clinical, during sepsis, and (2) may explain the profound vasoplegia and limited response to stimuli that normally regulate blood flow and tissue perfusion. High circulating levels of nitrites/nitrates

(stable molecules generated from NO) found in patients with septic shock and associated with decreased vascular tone suggested that NO was clearly implicated in the pathophysiology of septic shock [16].

The above observations led to the initial use of non-selective inhibitors of NOS such as *N^G*-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) in LPS models [17]. L-NAME increases blood pressure and vascular resistance along with a decrease in cardiac output. It is important to note, however, that these treatments did not improve survival in an animal model of endotoxemia [18]. Unfortunately, a phase III study was halted due to the emergence of a significant over-mortality in the treated group [19]. It was proposed that the use of a more selective inhibitor of iNOS would provide greater benefit to the patients. Some positive experimental results have since been reported with specific molecules such as *S*-methylisothiourea, L-canavanine [20], and aminoguanidine, but none have been tested to date in clinical trials. However, blocking the production of NO may cause other deleterious effects [21] such as:

Fig. 2 Mechanisms of contractions. Under certain conditions, the endothelial cells, when activated by neurohumoral mediators or subjected to pressure, release a vasoconstrictor substance(s), which diffuses to the underlying vascular smooth muscle and initiates its contraction. *EC* endothelial cell, *VSMC* vascular smooth muscle cell, *COX* cyclooxygenase, *LOX* lipoxygenase, *NOX* NADPH oxidase, *NOS* nitric oxide synthase, *ECE* endothelin-converting enzyme, *PG_s* prostaglandins, *ROS* reactive oxygen species, *ET-1* endothelin-1, *AgII* angiotensin II, *NE* norepinephrine, *Ep* epinephrine, *PLPc* phospholipase C, *DAG* diacylglycerol, *IP₃* inositol trisphosphate, *PKC* protein kinase C, *IP₃R* inositol-1,4,5-trisphosphate-receptor, *PKC* protein kinase C, *MLCK* myosin light-chain kinase, *SERCA* sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases



- Altered microcirculatory flow
- A decrease in NO-dependent bactericidal activity
- A decrease in neutralizing activity of oxygen-derived species
- A decrease in the modulation of blood coagulation
- An increase in oxygen demand by improving mitochondrial respiration in tissues in which perfusion, and hence oxygen delivery, remains precarious, thereby exacerbating the oxygen supply/demand balance

Thus, the current paradigm that NO and soluble guanylate cyclase (sGC) contribute to organ damage and death associated with septic shock may be challenged. For example, Cauwels et al. [22] recently demonstrated that nitrite treatment protects against morbidity and mortality in lipopolysaccharide (LPS)-induced shock in a soluble guanylate cyclase-dependent manner.

To summarize, excess production of NO seems to be a major and central actor in sepsis-induced vascular hyporeactivity. Nevertheless, inhibition through non-selective iNOS inhibitor increased mortality in septic shock.

Prostacyclin and COX-2 pathways

Prostacyclin (PGI₂) is a major product of arachidonic acid metabolism formed in the vascular endothelium by the action of the enzymes cyclooxygenase (COX) and prostacyclin synthase (PGIS). PGI₂ mediates its effects through

a G_s protein-coupled receptor (IP), which is located on VSMCs. Stimulation of IP by PGI₂ leads to an increase in cAMP, which likely mediates relaxation of VSMCs. Increased levels of PGI₂ have been reported to occur in patients under septic shock and in animals treated with LPS or proinflammatory cytokines [23]. Recent evidence suggests that the inducible isoform of COX, COX-2, is the enzyme mainly responsible for the increased production of PGI₂ in VSMCs [24]. In keeping with this observation, it has been shown that inhibition of COX-2 attenuates the fall in blood pressure or improves vascular endothelial dysfunction in endotoxemic animals. Recently, Höcherl et al. [25] demonstrated that the selective inhibition of the receptor for prostacyclin attenuated the cardiovascular dysfunction induced by LPS without altering cytokine levels or NOx products, thus evoking a specific role for prostacyclin and/or the receptor for prostacyclin in the development of LPS-induced vascular failure.

Similarly to iNOS inhibitors, the non-selective inhibition of prostaglandin synthesis with ibuprofen failed to improve mortality in septic shock [26].

Free radicals: the peroxynitrite ion and superoxide anion

Free radicals are molecules or portions thereof which possess one or more unpaired electrons in their outer orbital, a state

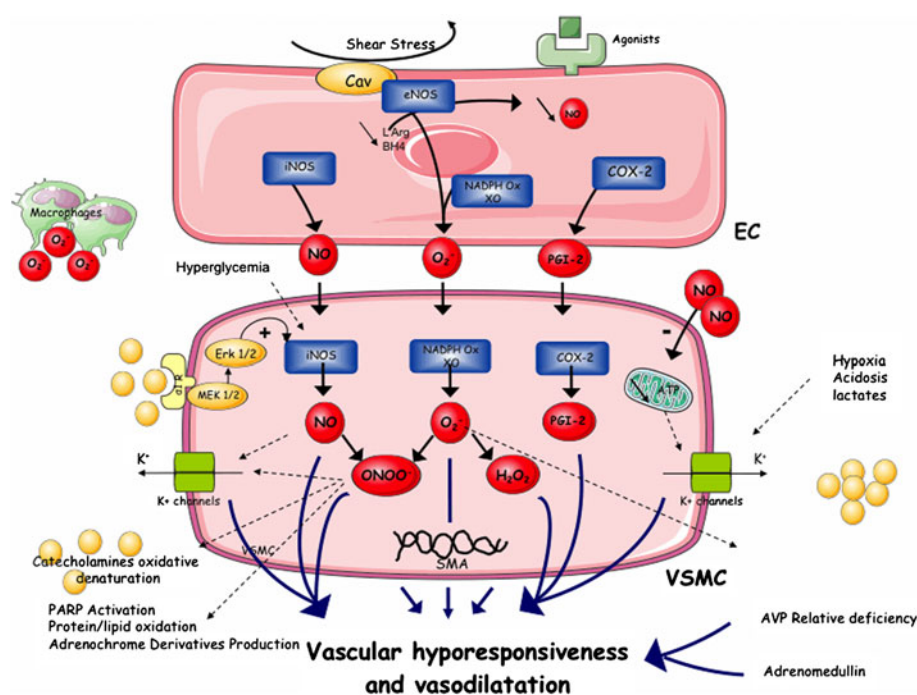


Fig. 3 Mechanisms of vascular dysfunction in sepsis. When the infectious agent invades the bloodstream, systemic activation of inflammation leads to cytokine release and endothelial activation and dysfunction. Multiple cascades of intracellular signaling reactions are initiated and induce vascular hypo-responsiveness and vasodilatation. A functional impairment of ECs and VSMCs contributes to endothelial and vascular dysfunction. Both cells synthesize and release various factors of oxidative stress and vasodilatation, which subsequently react with many products, receptors, and channels to induce their oxidation. EC endothelial

cell, VSMC vascular smooth muscle cell, eNOS endothelial nitric oxide synthase, BH4 5,6,7,8-tetrahydrobiopterine, Cav caveolin-1, L-Arg L-arginine, iNOS inducible nitric oxide synthase, COX-2 cyclooxygenase-2, NADPH Ox oxy nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, XO xanthine oxidase O₂⁻ superoxide anions, PGI-2 prostacyclin, NO nitric oxide, ONOO⁻ peroxynitrite, H₂O₂ hydrogen peroxide, Erk extracellular signal-regulated kinases, MEK 1/2 mitogen-activated protein kinases 1/2, Erk 1/2 extracellular signal-regulated kinases 1/2, AVP arginin vasopressin

that greatly increases their reactivity. The best-known reactive species generated from oxygen include superoxide anion, hydroxyl radical, and peroxynitrite.

It should be emphasized that every time NO and superoxide anion molecules collide, they spontaneously interact to form peroxynitrite [27]. This reaction does not require any enzymatic intervention. As a result, it is possible that the majority of the biological effects attributed to NO are rather due to peroxynitrite.

A state of shock constitutes a propitious environment for the production of peroxynitrite since NO and superoxide are both produced in large quantities and in the same tissues. The upregulated production of superoxide arises from the reactions catalyzed by NADPH oxidase present in leukocytes and endothelial cells, by the conversion of xanthine dehydrogenase into xanthine oxidase, by the partial reduction of molecular oxygen within mitochondria, and finally by the uncoupling of NOS in conditions of L-arginine or tetrahydrobiopterin deficiency [27]. Formation of peroxynitrite has been demonstrated by using LPS as the inducer of shock with a time course similar to that of iNOS expression in muscle and aorta [28]. In endotoxic and hemorrhagic shock models, it has

been shown that inhibitors of peroxynitrite formation and genetic suppression of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) are able to reduce the amount of aortic peroxynitrite and reverse vascular hypo-responsiveness. Conversely, the increase in endogenous production of peroxynitrite by inducing a depletion of endogenous glutathione stores aggravates vascular hypo-reactivity. Numerous studies have shown that the final effector of the deleterious effect of peroxynitrite on vascular responsiveness is linked to the activation of poly (ADP-ribose) polymerases (PARP), which are proteins involved in many cellular processes such as DNA repair and apoptosis [13].

Superoxide anion per se has also been implicated in vascular hyporeactivity. Superoxide is enzymatically reduced to hydrogen peroxide in the presence of superoxide dismutase (SOD). However, in many disease states such as shock, there is an imbalance between the amount of superoxide formed and the ability of SOD enzyme to remove the former, hence leading to superoxide-driven damage. Macarthur et al. [29] have published experimental evidence suggesting that hyporeactivity to exogenous norepinephrine results from its deactivation by

superoxide. Furthermore, these authors have also shown that endotoxin-induced hypotension is completely abolished by the administration of M40403, a synthetic and selective (for superoxide) low molecular weight mimic of SOD [30]. Nevertheless, despite these intriguing experimental results, there are currently no studies that have assessed the effects of neutralizing peroxynitrite or superoxide during human septic shock.

ATP-sensitive potassium channels

ATP-sensitive (K_{ATP}) potassium channels are distributed in a wide variety of tissues. Potassium (K^+) channels are membrane-spanning proteins that selectively allow movement of K^+ ions across cells through a water-filled permeation pathway (pore). A gating mechanism switches the channel between open and closed conformations. Normally, channel opening at the plasma membrane promotes K^+ loss from the cell, resulting in membrane hyperpolarization. These channels ensure the coupling between membrane excitability and energy metabolism of the cell, thus playing a primary role in both normal and pathological situations. Excessive activation of K^+ channels leads to membrane hyperpolarization and inhibition of voltage-sensitive calcium channels, inducing cell relaxation, vasodilation, and finally leading to hypotension and vascular hyporeactivity.

Various pathological situations such as increased NO and peroxynitrite production, ATP depletion, hypoxia, acidosis, and hyperlactatemia present during shock states can activate vascular K_{ATP} channels and induce membrane hyperpolarization, thereby inducing cellular relaxation and vasorelaxation [11].

Experimental evidence for the involvement of K_{ATP} channels was first established by Landry and Oliver [31] who demonstrated in an experimental model of endotoxic shock and hypoxic lactic acidosis that the injection of glibenclamide (a sulfonylurea inhibitor of K_{ATP} channels) restored arterial pressure and responsiveness to catecholamines, both of which are largely reduced during these types of shock. Several experimental studies [32] of endotoxic shock have since confirmed these data, while subsequent studies have highlighted a decrease in contractile function in response to vasoconstrictors in rat arteries incubated in the presence of endotoxin. This hypocontractility is in turn partly restored in the presence of glibenclamide [32].

To date, two studies [33, 34] have studied the effects of glibenclamide versus placebo administration in patients with septic shock. Both studies showed no significant reduction in vasoconstrictor dose requirements or any significant improvement in arterial blood pressure in patients treated with glibenclamide. At the present time, the therapeutic perspectives for the use of potassium channel inhibitors in humans remain disappointing given

the ubiquitous nature of these channels and their diverse pathophysiological implications.

Involvement of BK_{Ca} channels

The large-conductance calcium-activated potassium (BK_{Ca}) channels are by far the most abundant of the vascular potassium channels. Their role is to induce vascular relaxation when calcium levels are elevated and thus play a regulatory role in microvascular flow. These channels are activated in part by NO and by peroxynitrite and are therefore involved in vasoplegia observed during shock states. Experimentally, their inhibition enables one to improve vasoconstrictor response in both animal [35] and human sepsis [36]. There are currently no human data.

Critical illness-related corticosteroid insufficiency

Critical illness-related corticosteroid insufficiency (CIRCI) is caused by adrenal insufficiency together with tissue corticosteroid resistance and is characterized by an exaggerated and protracted proinflammatory response [37]. CIRCI should be suspected in hypotensive patients who respond poorly to fluids and vasopressor agents, particularly in the setting of sepsis. In a study recently published by Annane et al. [38], the prevalence of adrenal insufficiency (as determined by metyrapone testing) in patients with severe sepsis and septic shock was reported to be 60%. Nevertheless, using an electrochemiluminescence immunoassay, data stemming from the Corticus Study [39, 40] demonstrated that there was a high inter-assay variation of total serum cortisol. Comparisons with a reference method revealed both over- and underestimations of true cortisol levels. These inter-assay variations in samples of patients with septic shock complicate the diagnosis of corticosteroid insufficiency.

The major effect of adrenal insufficiency in the critically ill patient is manifested through alterations in systemic inflammatory response and cardiovascular function. The use of glucocorticoids in septic shock is discussed in section "Therapeutics".

Modifications of catecholamine signaling

The regulation of adrenergic receptors during sepsis has been studied at greater length for myocardial beta-receptors than for vascular alpha-receptors. At the heart level, Wu et al. [41] demonstrated that alpha-1 adrenergic receptors in the rat heart were externalized from light vesicles to the sarcolemma during the early hypercardiodynamic phase as opposed to being internalized from surface membranes to intracellular compartments during

the late hypocardiodynamic phase of sepsis. The liver is the most studied organ, albeit with the difficulty in correlating the observed modifications with those presumably occurring at the vessel level. For example, McMillan et al. [42] observed a reduction in the number of hepatic alpha-1 adrenergic receptors in a rat model of chronic sepsis. Conversely, Hwang et al. [43] noted that alpha-1 adrenergic receptors in human liver plasma membranes undergo dynamic changes during the development of sepsis; that is, receptor number increased in mild sepsis, returned to normal levels in moderate sepsis, and finally decreased in severe sepsis. This desensitization has no univocal explanation and involves a decrease in the number of receptors (downregulation) and/or an uncoupling of receptors and their intracellular messengers.

The use of beta-blockers in septic shock has been investigated in normotensive rodent models but not in human septic shock [44].

Hyperglycemia and insulin

As part of the stress response, shock patients become hyperglycemic. Clearly, hyperglycemia is associated with adverse outcome and normalizing blood glucose by intensive insulin therapy improves mortality and morbidity. Pacheco et al. [45] demonstrated in healthy rats that high glucose increases iNOS induction and subsequent NO production by activating the protein kinase C-beta II. Glycemic control may affect regional NO bioavailability by changing NOS activity, NOS transcription, NOS substrate availability, or the endogenous NOS inhibitor asymmetric dimethylarginine (ADMA) levels [46].

Although promising in animal models [47], intensive insulin therapy did not improve in-hospital mortality in patients treated with hydrocortisone for septic shock [48].

Vasodilation is heterogeneous

During shock state and especially in sepsis, there are marked differences in vasopressor responses according to the vessel under investigation. Resistance arteries such as those present in the mesenteric vascular bed play a major role in blood pressure maintenance. On the other hand, conductance arteries such as the aorta only make a small contribution to systemic vascular resistance. The majority of *in vitro* investigations into mechanisms of vascular hyporeactivity have used rodent aortic tissues [15]. In contrast, inducing hyporeactivity in smaller rodent blood vessels has proven to be difficult [49]. Moreover, in septic shock patients, Stoclet et al. [50] found that contractile responses of small omental arteries from septic patients

were not significantly altered *ex vivo*. This observation is certainly intriguing since the arteries were removed from patients whose peripheral resistance and blood pressure were dramatically reduced. Moreover, contraction experiments performed in the presence of either L-NAME or indomethacin unmasked enhanced responses to low concentrations of NE in arteries from septic patients. The mechanisms of this hyperactivity are unknown but highlight the potential opposite behavior between resistive and conductive arteries during sepsis.

From a clinical standpoint, we must keep in mind that arterial pressure during shock is measured in a conductive artery. Thus, the titration of vasopressor may be inadequate in increasing arterial pressure more than is needed for the microcirculation. This latter point is illustrated by the fact that the use of an NO donor such as nitroglycerin in hemodynamically resuscitated septic patients can open the microcirculation and thereby perfuse weak microcirculatory units [51].

Therapeutics

Catecholamines

After volume resuscitation, the use of catecholamine is considered to be the cornerstone of septic shock hemodynamic treatment [52]. Currently, dopamine and above all norepinephrine are the most used agents without any differences in terms of mortality [53]. It is generally considered that vasopressor agents must be titrated to increase mean arterial pressure to about 65–70 mmHg [54]. The pharmacodynamic effects of catecholamines are characterized by the existence of a concentration threshold at which the expected effect is observable (in the order of 100 pg/ml for adrenalin and 1,000 pg/ml for norepinephrine), followed by a linear increase in effect as a function of the logarithm of concentrations [55]. The maximum effect is usually achieved at doses ranging from 100 to 1,000 times the threshold dose, which largely surpasses the standard dosage range used in clinical practice. This type of dose–response curve explains why for threshold doses that differ by only 1 µg/kg/min from one patient to another, an identical pharmacodynamic effect on the dose–response curve will require dosages that differ by 10 µg/kg/min [56]. The obvious conclusion is therefore not to hesitate in transiently increasing the dosage of catecholamines if the patient is vasoplegic and hyperkinetic (although this remains experimental) or to use alternative therapies [57]. In this particular case, which is associated with a dramatic prognosis, other agents such as vasopressin or terlipressin [58], methylene blue [59], high volume hemofiltration [60], or plasmapheresis [61] have demonstrated their efficiency in case report studies or small series.

Vasopressin and terlipressin for catecholamine-resistant septic shock

Vasopressin (AVP), better known as antidiuretic hormone, is a nonapeptide produced by the supraoptic and paraventricular nuclei of the hypothalamus. AVP is synthesized in response to hyperosmolarity and arterial hypotension. As a result, its levels are extremely high in cardiogenic or hypovolemic shock. Paradoxically, in a study by Landry et al. [62] in which AVP levels in patients with cardiogenic shock were compared with that of patients with severe septic shock with both having similar arterial pressure values, sepsis was shown to induce a relative deficiency in AVP (22.7 vs. 3.1 pg/ml). Indeed, the neurohypophysis of a patient in septic shock is virtually depleted in AVP, as confirmed by the absence of T1-weighted hypersignal in magnetic resonance imaging [63]. AVP, by binding to its V1a or V1R receptor, located primarily on blood vessel smooth muscle cells, induces vasoconstriction. In clinical practice, vasopressin increases arterial blood pressure without any change in heart rate while generally decreasing cardiac index. However, some patients remain refractory to the doses of AVP used. It is probable that this lack of effectiveness is likely linked to a decreased vascular responsiveness to vasopressin as previously demonstrated [64]. Although effective in the weaning of vasopressors and for improving renal function, vasopressin treatment is potentially dangerous because of possible intense vasoconstriction if the obtained arterial pressure is too high. The VASST study [65], in which vasopressin was used in substitutive doses (less than 0.04 U/min), showed no overall improvement in mortality. However, in a post hoc study, patients with less severe septic shock (i.e., less than 15 µg/min of norepinephrine) at arginine vasopressin initiation had a lower 28-day mortality rate compared with norepinephrine-only infusion (26.5 vs. 35.7%; $P = 0.05$).

Terlipressin (TP) is a synthetic analogue of AVP characterized by greater selectivity for the V₁ receptor than AVP [66]. The elimination half-life of TP is longer than that of AVP (50 vs. 6 min). Bolus administration of TP has been associated with several adverse effects in both preclinical and clinical studies such as reduction in cardiac index or coronary vasoconstriction [58]. The adverse effects after intermittent TP bolus injections are probably due to excessive systemic and regional vasoconstriction. Consequently, it has been suggested that administration of lower TP boluses at shorter intervals or continuous infusion of TP may be equally effective in restoring systemic blood pressure, thereby avoiding the risk of uncontrolled vasoconstriction [67]. TP use has been demonstrated to be efficient in cases of catecholamine-resistant septic shock [68]. Nevertheless, based on current knowledge, it remains unclear whether AVP or TP should be preferred in the treatment of vasodilatory shock states unresponsive to conventional vasopressor agents.

Activated protein C

Recombinant human activated protein C (APC) has been demonstrated to reduce the mortality rate of adult patients with septic shock [69]. Initially, this effect was thought to be related to a reduction in coagulation and, to a lesser extent, to a reduction in inflammatory response to sepsis. Indeed, data from the PROWESS study demonstrated that the use of APC was associated with a quicker reduction in cardiovascular failure. Post-PROWESS investigative areas have been associated with a myriad of cellular studies [70] demonstrating that APC, through reactions mediated by the endothelial protein C receptor (EPCR) [71] and the effector receptor (protease activated receptor-1), acts directly on cells to exert multiple cytoprotective effects including: (a) downregulation of proinflammatory gene expression [72]; (b) anti-apoptotic activity [73]; (c) antioxidant properties; and (d) protection of endothelial barrier function [74]. Recent animal [75] and human [76] data have suggested that APC may improve both vascular and myocardial dysfunction and vascular reactivity to catecholamines during endotoxin and/or septic challenges. Nevertheless, despite a high recommendation level [52], the use of APC remains controversial. A multicenter study is currently investigating the effects of APC in a more severe (catecholamine dependent) and homogeneous group of septic shock patients.

Hydrocortisone

Hydrocortisone is widely used in patients with septic shock. Annane et al. [77] found a survival benefit only in patients who remained hypotensive after fluid and vasopressor resuscitation and whose plasma cortisol levels did not rise appropriately after the administration of corticotropin. On the other hand, Sprung et al. [39] found that hydrocortisone did not improve survival or reversal of shock in patients with septic shock, either overall or in patients who did not respond to corticotropin, although hydrocortisone hastened the reversal of shock in patients in whom shock was ultimately reversed. Clearly, hydrocortisone [5] treatment allows for a more rapid weaning of catecholamines in patients with severe septic shock treated with high doses of catecholamine, by reducing among others the production of interleukin-6 [77]. Furthermore, by decreasing the expression of NF-κB, corticoids also decrease the production of NO via iNOS. The detailed mechanisms of action of corticosteroids involve genomic as well as non-genomic effects after activation of their nuclear receptor [78]. Beneficial effects of glucocorticoids have also been found in non-infectious shock states such as vascular failure in post-cardiac surgical patients [79]. Currently, both the Surviving Sepsis Campaign [52] and the American College of Critical Care Medicine International Consensus [37] recommend

giving stress-dose steroid therapy only in septic shock after blood pressure is identified to be poorly responsive to fluid and vasopressor therapy (grade 2C).

Conclusions

As previously described, the pathophysiology of shock-induced vascular hyporeactivity to vasopressor agents involves many mechanisms and a number of cellular pathways. Indeed, despite this vast amount of scientific knowledge, there is currently no “vascular-directed therapy” that has proven its efficiency in human septic shock. Indeed, many of the therapeutic approaches that have proved their efficiency in animal models and especially therapies directed against a particular compound have failed when used in human shock.

The most obvious conclusion is that preventing or decreasing the global cellular consequences of septic shock may prevent the overproduction of the involved mediators. For example, manipulating innate immunity with a peptide derived from the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) has been shown to improve hemodynamics and mortality in various forms of shock [80].

Another example stems from the Rivers study [81], in which patients who benefited from a goal-directed therapeutic approach required less vasopressor therapy after 24 h of treatment, hence demonstrating that early treatment of vascular failure accompanied by sound commonsense practices (antibiotic therapy, monitoring) enables one to reduce the impact of sepsis on vascular failure, likely by reducing the consequences of tissue hypoperfusion.

References

- Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR (2001) Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 29:1303–1310
- Merx MW, Weber C (2007) Sepsis and the heart. *Circulation* 116:793–802
- Matsuda N, Hattori Y (2007) Vascular biology in sepsis: pathophysiological and therapeutic significance of vascular dysfunction. *J Smooth Muscle Res* 43:117–137
- Umans JG, Wylam ME, Samsel RW, Edwards J, Schumacker PT (1993) Effects of endotoxin in vivo on endothelial and smooth-muscle function in rabbit and rat aorta. *Am Rev Respir Dis* 148:1638–1645
- Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM (2005) Septic shock. *Lancet* 365:63–78
- Bernardin G, Pradier C, Tiger F, Deloffre P, Mattei M (1996) Blood pressure and arterial lactate level are early indicators of short-term survival in human septic shock. *Intensive Care Med* 22:17–25
- Abid O, Akca S, Haji-Michael P, Vincent JL (2000) Strong vasopressor support may be futile in the intensive care unit patient with multiple organ failure. *Crit Care Med* 28:947–949
- Lamia B, Chemla D, Richard C, Teboul JL (2005) Clinical review: interpretation of arterial pressure wave in shock states. *Crit Care* 9:601–606
- Benchechrone S, Karpati PC, Berton C, Nathan C, Mateo J, Chaara M, Riche F, Laisne MJ, Payen D, Mebazaa A (2008) Diastolic arterial blood pressure: a reliable early predictor of survival in human septic shock. *J Trauma* 64:1188–1195
- Benedict CR, Rose JA (1992) Arterial norepinephrine changes in patients with septic shock. *Circ Shock* 38:165–172
- Landry DW, Oliver JA (2001) The pathogenesis of vasodilatory shock. *N Engl J Med* 345:588–595
- Alvarez S, Boveris A (2004) Mitochondrial nitric oxide metabolism in rat muscle during endotoxemia. *Free Radic Biol Med* 37:1472–1478
- Lundberg JO, Weitzberg E (2005) NO generation from nitrite and its role in vascular control. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:915–922
- Rees DD, Monkhouse JE, Cambridge D, Moncada S (1998) Nitric oxide and the haemodynamic profile of endotoxin shock in the conscious mouse. *Br J Pharmacol* 124:540–546
- Julou-Schaeffer G, Gray GA, Fleming I, Schott C, Parratt JR, Stoclet JC (1990) Loss of vascular responsiveness induced by endotoxin involves L-arginine pathway. *Am J Physiol* 259:H1038–H1043
- Boyle WA 3rd, Parvathaneni LS, Bourlier V, Sauter C, Laubach VE, Cobb JP (2000) iNOS gene expression modulates microvascular responsiveness in endotoxin-challenged mice. *Circ Res* 87:E18–E24
- Walker TA, Curtis SE, King-VanVlack CE, Chapler CK, Vallet B, Cain SM (1995) Effects of nitric oxide synthase inhibition on regional hemodynamics and oxygen transport in endotoxic dogs. *Shock* 4:415–420
- Vincent JL, Zhang H, Szabo C, Preiser JC (2000) Effects of nitric oxide in septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 161:1781–1785
- Lopez A, Lorente JA, Steingrub J, Bakker J, McLuckie A, Willatts S, Brockway M, Anzueto A, Holzappel L, Breen D, Silverman MS, Takala J, Donaldson J, Arneson C, Grove G, Grossman S, Grover R (2004) Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock. *Crit Care Med* 32:21–30
- Levy B, Valtier M, de Chillou C, Bollaert PE, Cane D, Mallie JP (1999) Beneficial effects of L-canavanine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, on lactate metabolism and muscle high energy phosphates during endotoxic shock in rats. *Shock* 11:98–103
- Cauwels A (2007) Nitric oxide in shock. *Kidney Int* 72:557–565
- Cauwels A, Buys ES, Thoonen R, Geary L, Delanghe J, Shiva S, Brouckaert P (2009) Nitrite protects against morbidity and mortality associated with TNF- or LPS-induced shock in a soluble guanylate cyclase-dependent manner. *J Exp Med* 206:2915–2924

23. Wang P, Zhou M, Cioffi WG, Bland KI, Ba ZF, Chaudry IH (2000) Is prostacyclin responsible for producing the hyperdynamic response during early sepsis? *Crit Care Med* 28:1534–1539
24. Schildknecht S, Bachschmid M, Baumann A, Ullrich V (2004) COX-2 inhibitors selectively block prostacyclin synthesis in endotoxin-exposed vascular smooth muscle cells. *FASEB J* 18:757–759
25. Höcherl K, Schmidt C, Kurt B, Bucher M (2008) Activation of the PGI₂/IP system contributes to the development of circulatory failure in a rat model of endotoxic shock. *Hypertension* 52:330–335
26. Bernard GR, Wheeler AP, Russell JA, Schein R, Sumner WR, Steinberg KP, Fulkerson WJ, Wright PE, Christman BW, Dupont WD, Higgins SB, Swindell BB (1997) The effects of ibuprofen on the physiology and survival of patients with sepsis. The Ibuprofen in Sepsis Study Group. *N Engl J Med* 336:912–918
27. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87:315–424
28. Szabo C, Salzman AL, Ischiropoulos H (1995) Endotoxin triggers the expression of an inducible isoform of nitric oxide synthase and the formation of peroxynitrite in the rat aorta in vivo. *FEBS Lett* 363:235–238
29. Macarthur H, Westfall TC, Riley DP, Misko TP, Salvemini D (2000) Inactivation of catecholamines by superoxide gives new insights on the pathogenesis of septic shock. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:9753–9758
30. Salvemini D, Wang ZQ, Zweier JL, Samouilov A, Macarthur H, Misko TP, Currie MG, Cuzzocrea S, Sikorski JA, Riley DP (1999) A nonpeptidyl mimic of superoxide dismutase with therapeutic activity in rats. *Science* 286:304–306
31. Landry DW, Oliver JA (1992) The ATP-sensitive K⁺ channel mediates hypotension in endotoxemia and hypoxic lactic acidosis in dog. *J Clin Invest* 89:2071–2074
32. Buckley JF, Singer M, Clapp LH (2006) Role of KATP channels in sepsis. *Cardiovasc Res* 72:220–230
33. Warrillow S, Egi M, Bellomo R (2006) Randomized, double-blind, placebo-controlled crossover pilot study of a potassium channel blocker in patients with septic shock. *Crit Care Med* 34:980–985
34. Morelli A, Lange M, Ertmer C, Broeking K, Van Aken H, Orecchioni A, Rocco M, Bachetoni A, Traber DL, Landoni G, Pietropaoli P, Westphal M (2007) Glibenclamide dose response in patients with septic shock: effects on norepinephrine requirements, cardiopulmonary performance, and global oxygen transport. *Shock* 28:530–535
35. Cauwels A, Brouckaert P (2008) Critical role for small and large conductance calcium-dependent potassium channels in endotoxemia and TNF toxicity. *Shock* 29:577–582
36. Pickkers P, Dorresteijn MJ, Bouw MP, van der Hoeven JG, Smits P (2006) In vivo evidence for nitric oxide-mediated calcium-activated potassium-channel activation during human endotoxemia. *Circulation* 114:414–421
37. 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
38. Annane D, Maxime V, Ibrahim F, Alvarez JC, Abe E, Boudou P (2006) Diagnosis of adrenal insufficiency in severe sepsis and septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 174:1319–1326
39. Sprung CL, Annane D, Keh D, Moreno R, Singer M, Freivogel K, Weiss YG, Benbenishty J, Kalenka A, Forst H, Laterre PF, Reinhart K, Cuthbertson BH, Payen D, Briegel J (2008) Hydrocortisone therapy for patients with septic shock. *N Engl J Med* 358:111–124
40. Briegel J, Sprung CL, Annane D, Singer M, Keh D, Moreno R, Mohnle P, Weiss Y, Avidan A, Brunkhorst FM, Fiedler F, Vogeser M (2009) Multicenter comparison of cortisol as measured by different methods in samples of patients with septic shock. *Intensive Care Med* 35:2151–2156
41. Wu LL, Tang C, Liu MS (1997) Hyper- and hypocardiodynamic states are associated with externalization and internalization, respectively, of alpha-adrenergic receptors in rat heart during sepsis. *Shock* 7:318–323
42. McMillan M, Chernow B, Roth BL (1986) Hepatic alpha 1-adrenergic receptor alteration in a rat model of chronic sepsis. *Circ Shock* 19:185–193
43. Hwang TL, Lau YT, Huang SF, Chen MF, Liu MS (1994) Changes of alpha 1-adrenergic receptors in human liver during intraabdominal sepsis. *Hepatology* 20:638–642
44. de Montmollin E, Aboab J, Mansart A, Annane D (2009) Bench-to bedside review: β -adrenergic modulation in sepsis. *Crit Care* 13:230
45. Pacheco ME, Beltran A, Redondo J, Manso AM, Alonso MJ, Salaces M (2006) High glucose enhances inducible nitric oxide synthase expression. Role of protein kinase C- β II. *Eur J Pharmacol* 538:115–123
46. Ellger B, Richir MC, van Leeuwen PA, Debaveye Y, Langouche L, Vanhorebeek I, Teerlink T, Van den Berghe G (2008) Glycemic control modulates arginine and asymmetrical-dimethylarginine levels during critical illness by preserving dimethylarginine-dimethylaminohydrolase activity. *Endocrinology* 149:3148–3157
47. Holger JS, Dries DJ, Barringer KW, Peake BJ, Flottesmesch TJ, Marini JJ (2010) Cardiovascular and metabolic effects of high-dose insulin in a porcine septic shock model. *Acad Emerg Med* 17:429–435
48. Annane D, Cariou A, Maxime V, Azoulay E, D'Honneur G, Timsit JF, Cohen Y, Wolf M, Fartoukh M, Adrie C, Santre C, Bollaert PE, Mathonet A, Amathieu R, Tabah A, Clec'h C, Mayaux J, Lejeune J, Chevret S (2010) Corticosteroid treatment and intensive insulin therapy for septic shock in adults: a randomized controlled trial. *JAMA* 303:341–348
49. Mitchell JA, Kohlhaas KL, Sorrentino R, Warner TD, Murad F, Vane JR (1993) Induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the rat mesentery: lack of effect on action of vasoconstrictors. *Br J Pharmacol* 109:265–270
50. Stoclet JC, Martinez MC, Ohlmann P, Chasserot S, Schott C, Kleschyov AL, Schneider F, Andriantsitohaina R (1999) Induction of nitric oxide synthase and dual effects of nitric oxide and cyclooxygenase products in regulation of arterial contraction in human septic shock. *Circulation* 100:107–112
51. Spronk PE, Ince C, Gardien MJ, Mathura KR, Oudemans-van Straaten HM, Zandstra DF (2002) Nitroglycerin in septic shock after intravascular volume resuscitation. *Lancet* 360:1395–1396

52. 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
53. De Backer D, Biston P, Devriendt J, Madl C, Chochrad D, Aldecoa C, Brasseur A, Defrance P, Gottignies P, Vincent JL (2010) Comparison of dopamine and norepinephrine in the treatment of shock. *N Engl J Med* 362:779–789
54. LeDoux D, Astiz ME, Carpati CM, Rackow EC (2000) Effects of perfusion pressure on tissue perfusion in septic shock. *Crit Care Med* 28:2729–2732
55. Breslow MJ, Ligier B (1991) Hyperadrenergic states. *Crit Care Med* 19:1566–1579
56. Insel PA (1996) Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Adrenergic receptors—evolving concepts and clinical implications. *N Engl J Med* 334:580–585
57. Katsaragakis S, Kapralou A, Theodorou D, Markogiannakis H, Larentzakis A, Stamou KM, Drimousis P, Bramis I (2006) Refractory septic shock: efficacy and safety of very high doses of norepinephrine. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 28:307–313
58. Lange M, Ertmer C, Westphal M (2008) Vasopressin vs. terlipressin in the treatment of cardiovascular failure in sepsis. *Intensive Care Med* 34:821–832
59. Kirov MY, Evgenov OV, Evgenov NV, Egorina EM, Sovershaev MA, Sveinbjornsson B, Nedashkovsky EV, Bjertnaes LJ (2001) Infusion of methylene blue in human septic shock: a pilot, randomized, controlled study. *Crit Care Med* 29:1860–1867
60. Honore PM, Matson JR (2002) Short-term high-volume hemofiltration in sepsis: perhaps the right way is to start with. *Crit Care Med* 30:1673–1674
61. Ataman K, Jehmlich M, Kock S, Neumann S, Leischik M, Filipovic Z, Hopf HB (2002) Short-term cardiovascular effects of plasmapheresis in norepinephrine-refractory septic shock. *Intensive Care Med* 28:1164–1167
62. Landry DW, Levin HR, Gallant EM, Ashton RC Jr, Seo S, D'Alessandro D, Oz MC, Oliver JA (1997) Vasopressin deficiency contributes to the vasodilation of septic shock. *Circulation* 95:1122–1125
63. Sharshar T, Carlier R, Blanchard A, Feydy A, Gray F, Paillard M, Raphael JC, Gajdos P, Annane D (2002) Depletion of neurohypophyseal content of vasopressin in septic shock. *Crit Care Med* 30:497–500
64. Leone M, Boyle WA (2006) Decreased vasopressin responsiveness in vasodilatory septic shock-like conditions. *Crit Care Med* 34:1126–1130
65. Russell JA, Walley KR, Singer J, Gordon AC, Hebert PC, Cooper DJ, Holmes CL, Mehta S, Granton JT, Storms MM, Cook DJ, Presneill JJ, Ayers D (2008) Vasopressin versus norepinephrine infusion in patients with septic shock. *N Engl J Med* 358:877–887
66. Westphal M, Traber DL (2005) Low-dose terlipressin for hemodynamic support in sepsis and systemic inflammatory response syndrome: art for (he)art's sake or state of the art? *Crit Care Med* 33:455–457
67. Broking K, Lange M, Morelli A, Ertmer C, Aken HV, Luecke M, Rehberg S, Bowering N, Bone HG, Traber DL, Westphal M (2008) Employing dobutamine as a useful agent to reverse the terlipressin-linked impairments in cardiopulmonary hemodynamics and global oxygen transport in healthy and endotoxemic sheep. *Shock* 29:71–77
68. Lange M, Morelli A, Ertmer C, Broking K, Rehberg S, Van Aken H, Traber DL, Westphal M (2007) Role of adenosine triphosphate-sensitive potassium channel inhibition in shock states: physiology and clinical implications. *Shock* 28:394–400
69. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helderbrand 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
70. Mosnier LO, Zlokovic BV, Griffin JH (2007) The cytoprotective protein C pathway. *Blood* 109:3161–3172
71. Esmon CT (2006) The endothelial protein C receptor. *Curr Opin Hematol* 13:382–385
72. 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
73. 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
74. Nacira S, Meziani F, Dessebe O, Cattan V, Collin S, Montemont C, Gibot S, Asfar P, Ramarosan 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
75. 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
76. 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
77. Annane D, Sebille V, Charpentier C, Bollaert PE, Francois B, Korach JM, Capellier G, Cohen Y, Azoulay E, Troche G, Chaumet-Riffaut P, Bellissant E (2002) Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. *JAMA* 288:862–871
78. Prigent H, Maxime V, Annane D (2004) Clinical review: corticotherapy in sepsis. *Crit Care* 8:122–129
79. Kilger E, Weis F, Briegel J, Frey L, Goetz AE, Reuter D, Nagy A, Schuetz A, Lamm P, Knoll A, Peter K (2003) Stress doses of hydrocortisone reduce severe systemic inflammatory response syndrome and improve early outcome in a risk group of patients after cardiac surgery. *Crit Care Med* 31:1068–1074
80. Gibot S, Massin F, Alauzet C, Montemont C, Lozniewski A, Bollaert PE, Levy B (2008) Effects of the TREM-1 pathway modulation during mesenteric ischemia-reperfusion in rats. *Crit Care Med* 36:504–510
81. 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

Annexe 3 : Vascular ATP-sensitive potassium channels are over-expressed and partially regulated by nitric oxide in experimental septic shock.

Intensive Care Med. 2011 May; 37(5):861-9

Collin S., Sennoun N., Dron A.G., de La Bourdonnaye M., Montemont C., Asfar P., Lacolley P., Meziani F., Levy B.

Solène Collin
Nacira Sennoun
Anne-Gaëlle Dron
Mathilde de la Bourdonnaye
Chantal Montemont
Pierre Asfar
Patrick Lacolley
Ferhat Meziani
Bruno Levy

Vascular ATP-sensitive potassium channels are over-expressed and partially regulated by nitric oxide in experimental septic shock

Received: 29 March 2010
Accepted: 8 February 2011

© Copyright jointly held by Springer and ESICM 2011

Electronic supplementary material

The online version of this article (doi:10.1007/s00134-011-2169-5) contains supplementary material, which is available to authorized users.

S. Collin · N. Sennoun · A.-G. Dron · C. Montemont · B. Levy (✉)
Groupe CHOC, Equipe Avenir Inserm, Faculté de Médecine, Université de Nancy, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France
e-mail: b.levy@chu-nancy.fr
Tel.: +33-3-83154469
Fax: +33-3-83154420

P. Lacolley
Inserm U961, Faculté de Médecine, Université de Nancy, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

P. Asfar
Laboratoire HIF1H UPRES EA 3859, Université d'Angers, Angers, France

M. de la Bourdonnaye · F. Meziani
Inserm 771, CNRS UMR 6214, Faculté de Médecine, Université d'Angers, Angers, France

Abstract *Purpose:* To study the activation and expression of vascular (aorta and small mesenteric arteries) potassium channels during septic shock with or without modulation of the NO pathway. *Methods:* Septic shock was induced in rats by peritonitis. Selective inhibitors of vascular K_{ATP} (PNU-37883A) or BK_{Ca} [iberiotoxin (IbTX)] channels were used to demonstrate their involvement in vascular hyporeactivity. Vascular response to phenylephrine was measured on aorta and small mesenteric arteries mounted on a wire myograph. Vascular expression of potassium channels was studied by PCR and Western blot, in the presence or absence of 1400W, an inducible NO synthase (iNOS) inhibitor. Aortic activation of the transcriptional factor nuclear factor-kappaB (NF- κ B) was assessed by electrophoretic mobility shift assay. *Results:* Arterial pressure as well as in vivo and ex vivo

vascular reactivity were reduced by sepsis and improved by PNU-37883A but not by IbTX. Sepsis was associated with an up-regulation of mRNA and protein expression of vascular K_{ATP} channels, while expression of vascular BK_{Ca} channels remained unchanged. Selective iNOS inhibition blunted the sepsis-induced increase in aortic NO, decreased NF- κ B activation, and down-regulated vascular K_{ATP} channel expression. *Conclusions:* Vascular K_{ATP} but not BK_{Ca} channels are activated, over-expressed, and partially regulated by NO via NF- κ B activation during septic shock. Their selective inhibition restores arterial pressure and vascular reactivity and decreases lactate concentration. The present data suggest that selective vascular K_{ATP} channel inhibitors offer potential therapeutic perspectives for septic shock.

Keywords Septic shock · Cardiovascular failure · Potassium channels · Nitric oxide · Inhibitors

Introduction

Several mechanisms have been proposed to explain vascular dysfunction induced by sepsis, of which the over-production of nitric oxide (NO) and the activation of vascular potassium channels (K^+ channels) appear to be

the principal contributors [1–3]. K^+ channels are transmembrane proteins that selectively mediate the flow of K^+ across the cell membrane and consequently ensure the coupling between the membrane potential of the cell and its metabolism [4]. K_{ATP} channels consist of four pore-forming Kir6.x subunits and four sulfonylurea receptors.

It is generally thought that vascular smooth muscle channel structure combines Kir6.1/SUR2B subunits [5].

A number of factors likely trigger increased channel activation in sepsis, including excess NO, peroxynitrite, superoxide anion, hypoxia, low ATP/ADP ratio levels, and acidosis [6–8]. Excessive activation of K⁺ channels leads to membrane hyperpolarization and inhibition of voltage-sensitive calcium channels, inducing cell relaxation and vasodilation and finally leading to hypotension and vascular hyporeactivity [9]. Selective and nonselective inhibitors of vascular K⁺ channels used in vivo or in ex vivo experimental studies have been shown to increase arterial pressure or to reverse shock-induced vascular hyporeactivity [6]. These pharmacological effects argue in favor of increased activation of K⁺ channels during shock states.

Thus, while the use of channel inhibitors remains an attractive option to counteract systemic vasodilation, it may also act as a double-edged sword in impairing microcirculatory adaptation to shock [10]. Indeed, recent studies indicate that functional integrity of vascular K_{ATP} channels is a crucial factor in sepsis susceptibility [11].

In the present study, we hypothesized that expression of vascular K⁺ channels is increased during septic shock and that this over-expression is at least partially linked to NO over-production via nuclear factor-kappaB (NF-κB) activation as recently suggested in a cellular model [12].

Materials and methods

Animal preparation and monitoring

This study was approved by the Nancy Institutional Committee on Animal Care and Use. All animals ($n = 170$) were treated in compliance with the principles of laboratory animal care of the NIH. Male Wistar rats (300–320 g) were anesthetized with thiopental sodium (30 mg/kg i.p.) after which they underwent tracheotomy and were subsequently ventilated. Both the right jugular vein and carotid artery were cannulated. Arterial blood pressure was monitored by a pressure transducer and an amplifier-recorder system (IOX EMKA Technologies, Paris, France). Abdominal aortic blood flow (a surrogate of cardiac output) was measured with appropriately sized perivascular probes connected to an ultrasonic flowmeter (T206, Transonic Systems, Ithaca, NY, USA). Data acquisition and analysis were recorded using a computerized data acquisition system (IOX, EMKA, France).

Shock models

Peritonitis was induced by cecal ligation and puncture (CLP) [13] and observed after 6, 18, or 30 h (CLP6h, CLP18h, and CLP30h groups, respectively). These

classical time points were chosen in order to assess the influence of sepsis in early, intermediate, and late phases of experimental septic shock. All animals were resuscitated with 5 ml/100 g body weight of normal saline administered subcutaneously after completion of surgery and every 8 h thereafter.

In the sham-operated peritonitis group, the cecum was exposed, manipulated, and returned to the peritoneal cavity without being punctured.

Animals were subdivided into three groups ($n = 7$) in which hemodynamic parameters were continuously recorded. Rats (300–320 g) were anesthetized with thiopental sodium (30 mg/kg i.p.), and supplementary doses were given when necessary. In the first group, experiments were followed by evaluation of vascular reactivity. In the second group, aorta and small mesenteric vessels were carefully removed, snap frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C . In the third group, aorta and small mesenteric vessels were carefully removed and used for ex vivo evaluation of vascular reactivity. The CLP30h group was only used for Western blot studies and therefore not monitored.

In vivo measurements

Evaluation of norepinephrine effects on arterial pressure and aortic blood flow

For each group ($n = 7$), basal and maximum mean arterial pressure and aortic blood flow values, obtained after administration of a 1 μg/kg bolus of norepinephrine, were recorded.

Pharmacological modulation

All drugs were purchased from Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France).

PNU-37883A (guanidine; 4-morpholinecarboximide-*N*-1-adamantyl-*N'*-cyclohexyl hydrochloride) was dissolved in a 1:1 mixture of DMSO and intravenously administered as a 1.5 mg/kg bolus followed by 1 mg/kg/h over 1 h. Iberiotoxin (IbTX) was administered intravenously as a bolus (10 μg/kg) followed by 10 μg/kg/h over 1 h or as 1 μg/kg or 100 μg/kg bolus administered 30 min prior to the evaluation of norepinephrine response. The inducible NO synthase inhibitor 1400W (20 mg/kg) was administered intraperitoneally at T_0 .

Ex vivo measurements

Three groups of seven rats were studied: (1) sham operated, (2) peritonitis observed after 18 h, and (3) peritonitis 18 h plus PNU-37883A.

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, Aarhus, Denmark) as previously described [14]. After a 20-min washout period, concentration–response curves to phenylephrine (PE) were elicited by cumulative administration of this vasoconstrictor agonist (1 nM to 100 μM) to determine the same concentration producing an equal level of contraction in the different groups. To investigate the role of NO in the presence or absence of K_{ATP} inhibition, all of the above vascular experiments were conducted in the presence or absence of the iNOS inhibitor 1400W (10 μM).

In vitro measurements

Arterial pH and lactate concentrations were determined with an automated blood gas analyzer (ABL 700, Radiometer, Copenhagen, Denmark).

Real-time PCR analysis

Real-time quantitative PCR was performed using the MyiQTM Single-Color Real-Time PCR Detection System with iQTM SYBR[®] Green Supermix (Bio-Rad).

Primer sets for subsequent PCR amplification were designed by Primer3 software (Scientific and Educational Software, NC, USA) [Table 1, Electronic supplementary material (ESM)]. Each PCR mixture contained 20 μl of iQTM SYBR[®] Green Supermix (Bio-Rad) including 10 μM of sense and antisense specific primers corresponding to the sequence of interest and 5 μl of cDNA sample in a total reaction volume of 25 μl . Samples were run in triplicate. Each run included positive standards and negative reaction controls. Results were compared with a gene-specific standard curve and normalized to expression of the housekeeping gene β -actin in the same sample.

Western blotting

Protein content was determined using a Bio-Rad DC protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The extracted proteins were separated by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis, transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane, and analyzed with potassium channel subunit-specific primary antibodies (Table 2, ESM) [15, 16].

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

NO production was measured by ESR spectroscopy analysis with the use of the spin-trap colloid Fe(DETC)₂ as described previously [17]. Superoxide anion production was determined by EPR analysis.

NF- κ B activity was measured with electrophoretic mobility shift assay (ESM).

Study design

To understand the role of vascular K_{ATP} and BK_{Ca} channels on hemodynamics and vascular reactivity, PNU-37883A (a specific pore inhibitor of vascular K_{ATP} channels) and IbTX (a specific inhibitor of BK_{Ca} channels) were investigated for their effects in all rat groups.

Real-time quantitative PCR and Western blotting were thereafter performed using aorta and SMA to evaluate iNOS mRNA and protein expression of vascular K_{ATP} channel subunits (Kir6.1/SUR2B) and the BK_{Ca} channels subunit. Due to the small sample size, only real-time quantitative PCR was performed on SMA.

Lastly, to elucidate the involvement of NO in the expression of aortic K_{ATP} channels and BK_{Ca} channels, the selective iNOS inhibitor 1400W was used to blunt aortic NO increase after which vascular K^+ channel expression and NF- κ B activation were studied.

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm 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 (with 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. 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 CLP on mortality, hemodynamics, and vascular reactivity

Mortality at 6, 18, and 30 h after CLP was respectively 0, 10, and 80%.

Table 1 Characteristics of shock models

	Sham (n = 7)	CLP6h (n = 7)	CLP6h + PNU (n = 7)	CLP18h (n = 7)	CLP18h + PNU (n = 7)
MAP (mmHg)	135 ± 10	83 ± 14*	137 ± 9	79 ± 24*	138 ± 9
Abdominal aortic blood flow (ml/min)	38 ± 8	17 ± 5*	33 ± 5	13 ± 5*	36 ± 9
pH	7.40 ± 0.06	7.30 ± 0.08*	7.36 ± 0.04	7.34 ± 0.08*	7.37 ± 0.06
Lactate (mM)	1.1 ± 0.1	2.6 ± 1.0*	2.2 ± 0.7 **	5.8 ± 2.3*	2.9 ± 2.0 **

CLP Cecal ligation and puncture, PNU PNU-37883A, MAP mean arterial pressure

* $p < 0.05$ versus sham, ** $p < 0.05$ versus other groups

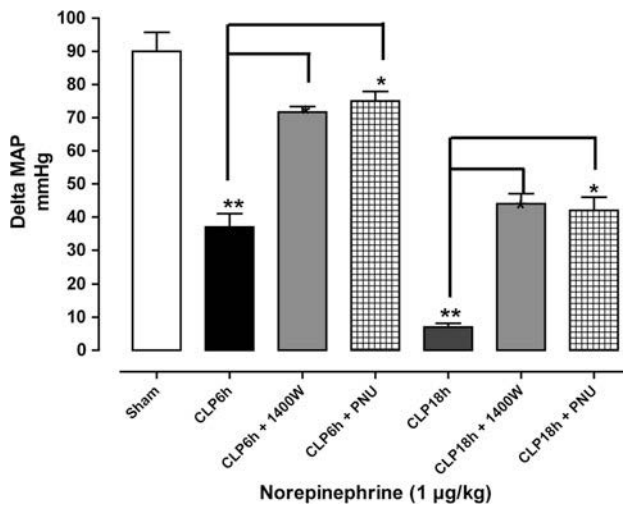


Fig. 1 Plots represent the maximum increase in mean arterial pressure (MAP) obtained after administration of a bolus of 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of norepinephrine. CLP6h and CLP18h represent rats with peritonitis observed after 6 h and 18 h, CLP6h or CLP 18 h + 1400W indicate rats with peritonitis observed after 6 h and 18 h and treated intraperitoneally with 20 mg/kg of 1400W, and CLP6h or CLP18h + PNU indicates rats with peritonitis observed after 6 or 18 h and treated with a 1-h infusion of PNU-37883A (1.5 mg/kg bolus followed by 1 mg/kg/h). Values are mean \pm SD ($n = 7$ per group). * $p < 0.05$ versus sham group, ** $p < 0.05$ versus other groups

As described in Table 1, compared to the sham group, the CLP6h and CLP18h groups were associated with a decrease in MAP and aortic blood flow as well as with lactic acidosis ($p < 0.05$).

Compared to the sham group, the increase in arterial pressure induced by a bolus of 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of norepinephrine was significantly blunted ($p < 0.01$) after CLP (Fig. 1). Ex vivo data confirmed the decrease in vasopressor responsiveness since CLP animals also exhibited blunted phenylephrine-stimulated contraction in aortic rings and SMA (Fig. 2).

Effects of inhibitors on in vivo and ex vivo vascular reactivity

DMSO used to dissolve PNU had no effects when used at the same doses as in the sham group.

In vivo experiments

Intravenous administration of the vascular K_{ATP} inhibitor PNU-37883A did not modify MAP, aortic blood flow, or vascular reactivity in the sham groups (data not shown). Sepsis-induced vascular hyporeactivity to norepinephrine was partially restored by the use of PNU-37883A in all groups (Fig. 1) but not by the BK_{CA} channel inhibitor IbTX (data not shown). The use of PNU-37883A not only restored the vascular response to exogenous norepinephrine but also significantly increased MAP in all groups (Fig. 1, ESM). During PNU-37883A infusion, aortic blood flow in the CLP6h group did not change but was restored in the CLP18h group (Fig. 1, ESM). The maximum increase in aortic blood flow obtained after norepinephrine injection was higher in the PNU-treated groups (Fig. 2, ESM).

Ex vivo measurements

Peritonitis-induced vascular hyporeactivity to phenylephrine was partially blunted by PNU-37883A both at the aortic and SMA level (Fig. 2), whereas IbTX had no effect (data not shown).

Administration of the iNOS inhibitor 1400W in the CLP6h and CLP18h groups partially restored in vivo vasoreactivity to norepinephrine (Fig. 1). In the ex vivo model, 1400W partially restored phenylephrine-stimulated contraction in aortic rings and SMA. The combination of PNU37883A and 1400W blunted the peritonitis-induced decrease in PE-stimulated contraction in both aortic rings and SMA (Fig. 2).

Effects of CLP on aortic and mesenteric K_{ATP} channel expression

Aortic and mesenteric mRNA expression studies As shown in Table 2, Kir6.1 aortic/mesenteric and SUR2B aortic/mesenteric mRNA increased in both the CLP6h and CLP18h groups ($p < 0.05$). Conversely, mesenteric $\text{BK}\alpha$ subunit mRNA increased significantly in the CLP6h but not in the CLP18h group (approximately 1.8- to 2-fold).

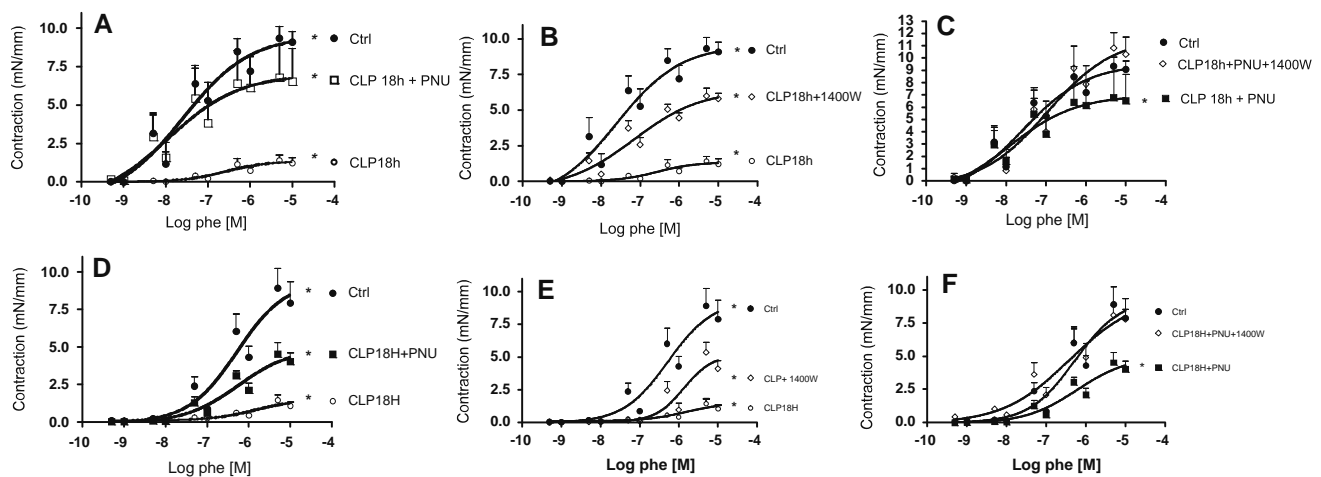


Fig. 2 Concentration-effect curves of aorta (a–c) and small mesenteric arteries (d–f) in sham group, CLP18h group, CLP18h group + PNU, CLP18h + 1400W, and CLP18h + 1400W + PNU; $n = 5$ for each group, exposed to phenylephrine (Phe). * $p < 0.05$ versus other groups

Table 2 mRNA expression of Kir6.1, SUR2B, and BK alpha normalized to the level expression of sham rats ($n = 7$ in each group)

	CLP6h	CLP6h + 1400W	CLP18h	CLP18h + 1400W
Kir 6.1				
Aorta	$5.3 \pm 0.4^{**}$	$3.2 \pm 0.4^*$	$2 \pm 0.8^{**}$	$2.5 \pm 0.3^*$
Mesenteric	$3.7 \pm 0.5^{**}$	$2.4 \pm 0.3^*$	$3.2 \pm 0.3^{**}$	$4.4 \pm 0.2^*$
SUR2B				
Aorta	$2.6 \pm 0.2^*$	1.9 ± 0.4	$2.4 \pm 0.2^*$	1.9 ± 0.1
Mesenteric	$2.5 \pm 0.3^*$	1.5 ± 0.5	$4.5 \pm 0.5^*$	1.2 ± 0.2
BK alpha				
Aorta	1.8 ± 0.4	1.5 ± 0.2	1.8 ± 0.2	1.5 ± 0.2
Mesenteric	$2.3 \pm 0.3^*$	1.3 ± 0.2	1.9 ± 0.3	1.1 ± 0.2

CLP6h and CLP18h represent rats with peritonitis observed after 6 and 18 h; CLP6h + 1400W and CLP18h + 1400W represent rats with peritonitis observed after 6 and 18 h and treated intraperitoneally with 20 mg/kg of 1400W

* $p < 0.05$ versus sham, ** $p < 0.05$ versus other groups

Aortic protein expression studies Only mesenteric arteries were used for mRNA studies. At the aortic level, both Kir6.1 and SUR2B mRNA increased in the CLP6h (5.5 ± 0.8 and 7.0 ± 1), CLP18h (4.7 ± 0.5 and 7.5 ± 1), and CLP30h (2.0 ± 0.3 and 2.6 ± 0.4) groups ($p < 0.05$ vs. sham) (Fig. 3). Protein expression of the BK α subunit slightly increased, although not significantly (Fig. 3, ESM).

Effects of selective iNOS inhibition on aortic NO content, K_{ATP} expression, and NF- κ B activation

All of the shock models were associated with an increase in iNOS mRNA (Fig. 4, ESM). In the present study using EPR, CLP6h was associated with a marked increase in aortic NO content ($p < 0.05$), which was totally abolished by addition of 1400W (Fig. 5a, ESM). Eighteen hours after septic insult, aortic NO content was identical to levels observed in sham animals (Fig. 5a, ESM). iNOS

inhibition with 1400W was associated with a down-regulation of mRNA and protein expression of vascular K_{ATP} channels (Table 1; Fig. 3). In the later phase of septic shock (18 h), a marked and persistent increase in vascular K_{ATP} channel expression was observed despite a marked decrease in iNOS mRNA and NO content in the aorta (Table 1, Fig. 3; Fig. 5, ESM).

Lastly, we assessed the effect of 1400W on CLP-induced NF- κ B activation using EMSA. CLP induced a marked increase in NF- κ B activity whereas the selective iNOS inhibitor 1400W blunted this effect (Fig. 4).

Superoxide anion remained elevated in the aorta from 6 to 18 h in CLP animals (Fig. 5b, ESM) whereas this increase was blunted by 1400W (Fig. 5b, ESM).

Discussion

In the present study, we demonstrate for the first time in vivo that vascular potassium channels are not only

Fig. 3 Western blots revealing Kir6.1 (*left*) and SUR2B (*right*) expression in aorta lysates. Plots show the densitometric intensities for each condition, normalized against tubulin expression and presented in arbitrary units ($n = 7$ in each group). *CLP6h*, *CLP18h*, and *CLP30h* represent rats with peritonitis observed after 6, 18 and 30 h; *CLP6h* or *CLP18h + 1400W* represent rats with peritonitis observed after 6 h and 18 h and treated intraperitoneally with 20 mg/kg of 1400W. Values are mean \pm SD ($n = 7$ per group). * $p < 0.05$, ** $p < 0.05$ versus other groups

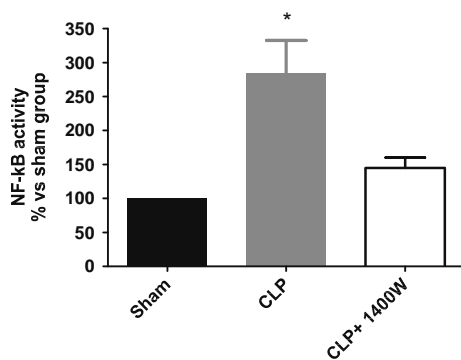
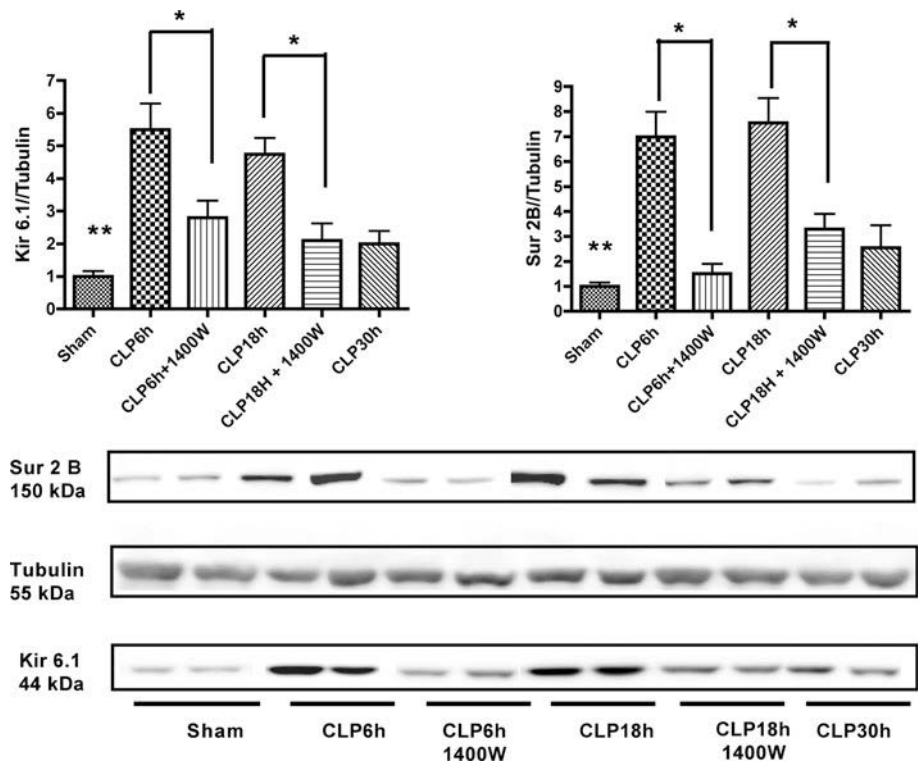


Fig. 4 1400W attenuated the nuclear factor (NF)- κ B activation in aorta. Aorta protein extracts were submitted to electrophoretic mobility shift assay for NF- κ B activation determination (in duplicate). 1400W decreased the hepatic NF- κ B activation induced by CLP. $n = 5$ for each group; * $p = 0.001$ versus sham group

activated but also over-expressed during experimental septic shock.

Selective inhibition of vascular K_{ATP} channels improves hemodynamics and vascular reactivity

In the present study, we indirectly assessed potassium channel activity by measuring the functional consequences of selective K^+ channel inhibition on smooth muscle contraction and arterial pressure changes. This method has the advantage of providing a wealth of

information regarding K^+ channel function in the intact system, in addition to often directing further in vitro/ex vivo experiments [18].

We used PNU-37883A to demonstrate K_{ATP} involvement [19]. It has been demonstrated that only inhibitors binding to the pore [20] and not the sulfonylurea receptor are able to reverse the effects of endotoxin [20–22]. In resuscitated endotoxic shock, O'Brien et al. [23] found that PNU increased arterial pressure but did not improve vital organ blood flow, microcirculation, or metabolic acidosis. In the present study, PNU not only increased MAP near baseline but also improved sepsis-induced vasopressor hyporesponsiveness both in vivo and ex vivo. Interestingly, PNU did not exert any effect in the sham group in our study, whereas it increased arterial pressure in the O'Brien study. This discrepancy could be explained by the use of isoflurane as an anesthetic in the latter study, which preferentially opens the K_{ATP} channels and consequently may exacerbate the effects of PNU [23].

Conversely, IbTX, a selective inhibitor of BK_{Ca} channels, did not alter any of the studied parameters. Such a finding obtained by in vivo infusion is in sharp contrast to previously published data primarily obtained in organ bath studies [24–27] and in LPS-induced shock [28]. Thus, BK_{Ca} channels inhibitors exert drastically different effects in vitro and in vivo, suggesting that the effects of activating BK_{Ca} channels during septic shock are either masked by compensatory effects or are of limited physiopathological importance.

ATP potassium channel expression is up-regulated and partially modulated by NO via NF- κ B activation

The restoration of vasoreactivity with PNU-37883A clearly demonstrates the involvement of K_{ATP} channels in sepsis-induced vascular hyporeactivity. Potassium channel-associated vascular hyporeactivity can be due to an increase in the number of open channels but also to an increase in channel number due to gene activation. Shi et al. [12] recently found that LPS raised Kir6.1 and SUR2B transcripts in healthy mesenteric arterial rings exposed to LPS. In this study, we demonstrate for the first time that vascular K_{ATP} expression is regulated during shock state. This phenomenon occurs early during shock state, peaking at about 12 h (not shown) and persisting until 30 h. Kir6.1 and SUR2b subunits are also increased in a concomitant manner; this latter finding is important since Crane and Aguilar-Bryan [29] demonstrated that it is the number of existing SUR molecules that determines how many functioning channels can be formed [29].

In addition, through the use of the selective iNOS inhibitor 1400W, we found that the normalization of tissue NO content and superoxide in the CLP6h model was paralleled by a decrease in Kir6.1/SUR2B protein expression. This decrease was also associated with a marked improvement in vascular reactivity. Thus, in the early phase of sepsis, K_{ATP} channel up-regulation is partially linked to NO over-production and is responsible for decreased vascular tone. The persistence of vascular hyporeactivity and K_{ATP} channel up-regulation at 18 h, despite a marked decrease in NO production, suggests that other mechanisms such as NO-induced hyporesponsiveness involve an energetic failure due to peroxynitrite generation, DNA breaks, and poly-ADP ribosyltransferase activation [30, 31]. Since it has been demonstrated that (1) LPS up-regulates Kir6.1/SUR2B channel expression and enhances vascular K_{ATP} channel activity via NF- κ B-dependent K_{ATP} channel up-regulation and (2) that NO (NOS2)-dependent activation of NF- κ B has also been observed in vivo in the liver and lungs of mice that had been resuscitated from hemorrhagic shock [32], we therefore measured the effects of iNOS inhibition on NF- κ B activity [33]. We found that the rise in NF- κ B activity induced by CLP was decreased by the selective iNOS inhibitor 1400W. Thus, during CLP, NF- κ B likely leads to K_{ATP} up-regulation. Moreover, this up-regulation is partially linked to iNOS induction.

Limitations

Whether the observed increase in subunit expression is in fact equivalent to increased channel density is difficult to predict. Nevertheless, many authors have reported a close relationship between an increase in protein expression levels and increased activity levels measured by the patch-clamp technique [34, 35]. Moreover, in a cellular model, Shi et al. [12] demonstrated that LPS-induced augmentation of whole cell K_{ATP} currents is due to an increase in surface expression.

The selectivity of PNU-37883A for vascular K_{ATP} channels should be discussed. PNU-37883A inhibits K_{ATP} in vascular smooth muscle at submicromolar concentrations, whereas it has no inhibitory effect on pancreatic, cardiac, or skeletal K_{ATP} channels, even at high concentrations ($\geq 10 \mu\text{M}$) [36]. Thus, it is generally thought that PNU-37883A is a selective inhibitor of vascular smooth muscle K_{ATP} channels. Nevertheless, PNU may also act on other tissues containing the Kir6.1 subunit and thus is not entirely vascular selective [36]. To date, two studies [22, 37] have assessed the effects of glibenclamide, a nonselective inhibitor of K_{ATP} versus placebo administration in patients with septic shock. These studies showed no significant reduction in vasoconstrictor dose requirements nor any significant improvement in arterial blood pressure in patients treated with glibenclamide.

Conclusions

Our results demonstrate that ATP-dependent potassium channels play a critical role in vascular adaptation to shock. To our knowledge, we provide herein the first in vivo evidence of a link among NF- κ B, NO, and vascular K_{ATP} channel expression. Of importance is the fact that K_{ATP} channels are activated and over-expressed in the early stages as well as in the late phase of sepsis, thereby adding a potentially new therapeutic target in the treatment of septic shock.

Acknowledgments The authors thank W.A. Coetzee and N.Q. Shi for critical reading of the article and for providing antibodies. This work was supported by Inserm and by a grant from the French Society of Intensive Care (SRLF).

References

1. Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM (2005) Septic shock. *Lancet* 365:63–78
2. Cohen J (2002) The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420:885–891
3. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87:315–424
4. Nichols CG (2006) K_{ATP} channels as molecular sensors of cellular metabolism. *Nature* 440:470–476

5. Suzuki M, Li RA, Miki T, Uemura H, Sakamoto N, Ohmoto-Sekine Y, Tamagawa M, Ogura T, Seino S, Marban E, Nakaya H (2001) Functional roles of cardiac and vascular ATP-sensitive potassium channels clarified by Kir6.2-knockout mice. *Circ Res* 88:570–577
6. Buckley JF, Singer M, Clapp LH (2006) Role of KATP channels in sepsis. *Cardiovasc Res* 72:220–230
7. Gutterman DD, Miura H, Liu Y (2005) Redox modulation of vascular tone: focus of potassium channel mechanisms of dilation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:671–678
8. Ohashi M, Faraci F, Heistad D (2005) Peroxynitrite hyperpolarizes smooth muscle and relaxes internal carotid artery in rabbit via ATP-sensitive K⁺ channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289:H2244–H2250
9. Landry DW, Oliver JA (2001) The pathogenesis of vasodilatory shock. *N Engl J Med* 345:588–595
10. Lange M, Morelli A, Ertmer C, Broking K, Rehberg S, Van Aken H, Traber DL, Westphal M (2007) Role of adenosine triphosphate-sensitive potassium channel inhibition in shock states: physiology and clinical implications. *Shock* 28:394–400
11. Kane GC, Lam CF, O’Cochlain F, Hodgson DM, Reyes S, Liu XK, Miki T, Seino S, Katusic ZS, Terzic A (2006) Gene knockout of the KCNJ8-encoded Kir6.1K(ATP) channel imparts fatal susceptibility to endotoxemia. *FASEB J* 20:2271–2280
12. Shi W, Cui N, Wu Z, Yang Y, Zhang S, Gai H, Zhu D, Jiang C (2009) Lipopolysaccharides up-regulate Kir6.1/SUR2B channel expression and enhance vascular KATP channel activity via NF-kappaB-dependent signaling. *J Biol Chem* 285:3021–3029
13. Levy B, Desebbe O, Montemont C, Gibot S (2008) Increased aerobic glycolysis through beta2 stimulation is a common mechanism involved in lactate formation during shock states. *Shock* 30:417–421
14. 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
15. Pu JL, Ye B, Kroboth SL, McNally EM, Makielski JC, Shi NQ (2008) Cardiac sulfonylurea receptor short form-based channels confer a glibenclamide-insensitive KATP activity. *J Mol Cell Cardiol* 44:188–200
16. Morrissey A, Rosner E, Lanning J, Parachuru L, Dhar Chowdhury P, Han S, Lopez G, Tong X, Yoshida H, Nakamura TY, Artman M, Giblin JP, Tinker A, Coetzee WA (2005) Immunolocalization of KATP channel subunits in mouse and rat cardiac myocytes and the coronary vasculature. *BMC Physiol* 5:1
17. Nacira S, Meziani F, Dessebe O, Cattani V, Collin S, Montemont C, Gibot S, Asfar P, Ramarosan 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
18. Quayle JM, Nelson MT, Standen NB (1997) ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol Rev* 77:1165–1232
19. Wellman GC, Barrett-Jolley R, Koppel H, Everitt D, Quayle JM (1999) Inhibition of vascular K(ATP) channels by U-37883A: a comparison with cardiac and skeletal muscle. *Br J Pharmacol* 128:909–916
20. Wilson AJ, Clapp LH (2002) The molecular site of action of K(ATP) channel inhibitors determines their ability to inhibit iNOS-mediated relaxation in rat aorta. *Cardiovasc Res* 56:154–163
21. Preiser JC, Zhang H, Debelle F, Fesler P, Kafi SA, Naeije R, Vincent JL (2003) Hemodynamic effects of glibenclamide during endotoxemia: contrasting findings in vitro versus in vivo. *Shock* 19:223–228
22. Warrillow S, Egi M, Bellomo R (2006) Randomized, double-blind, placebo-controlled crossover pilot study of a potassium channel blocker in patients with septic shock. *Crit Care Med* 34:980–985
23. O’Brien A, Stidwill RP, Clapp LH, Singer M (2008) Variable effects of inhibiting iNOS and closing the vascular ATP-sensitive potassium channel (via its pore-forming and sulfonylurea receptor subunits) in endotoxic shock. *Shock* 31:535–541
24. Pickkers P, Dorresteijn MJ, Bouw MP, van der Hoeven JG, Smits P (2006) In vivo evidence for nitric oxide-mediated calcium-activated potassium-channel activation during human endotoxemia. *Circulation* 114:414–421
25. Taguchi H, Heistad DD, Chu Y, Rios CD, Ooboshi H, Faraci FM (1996) Vascular expression of inducible nitric oxide synthase is associated with activation of Ca²⁺-dependent K⁺ channels. *J Pharmacol Exp Ther* 279:1514–1519
26. Chen SJ, Wu CC, Yang SN, Lin CI, Yen MH (2000) Hyperpolarization contributes to vascular hyporeactivity in rats with lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. *Life Sci* 68:659–668
27. Kuo JH, Chen SJ, Shih CC, Lue WM, Wu CC (2008) Abnormal activation of potassium channels in aortic smooth muscle of rats with peritonitis-induced septic shock. *Shock* 32:74–79
28. Cauwels A, Brouckaert P (2008) Critical role for small and large conductance calcium-dependent potassium channels in endotoxemia and TNF toxicity. *Shock* 29:577–582
29. Crane A, Aguilar-Bryan L (2004) Assembly, maturation, and turnover of K(ATP) channel subunits. *J Biol Chem* 279:9080–9090
30. da Silva-Santos JE, Terluk MR, Assreuy J (2002) Differential involvement of guanylate cyclase and potassium channels in nitric oxide-induced hyporesponsiveness to phenylephrine in endotoxemic rats. *Shock* 17:70–76
31. 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
32. Hierholzer C, Harbrecht B, Menezes JM, Kane J, MacMicking J, Nathan CF, Peitzman AB, Billiar TR, Tweardy DJ (1998) Essential role of induced nitric oxide in the initiation of the inflammatory response after hemorrhagic shock. *J Exp Med* 187:917–928
33. Bogdan C (2001) Nitric oxide and the regulation of gene expression. *Trends Cell Biol* 11:66–75
34. Park SH, Ramachandran S, Kwon SH, Cha SD, Seo EW, Bae I, Cho C, Song DK (2008) Upregulation of ATP-sensitive potassium channels for estrogen-mediated cell proliferation in human uterine leiomyoma cells. *Gynecol Endocrinol* 24:250–256

-
35. Philip-Couderc P, Tavares NI, Roatti A, Lerch R, Montessuit C, Baertschi AJ (2008) Forkhead transcription factors coordinate expression of myocardial KATP channel subunits and energy metabolism. *Circ Res* 102:e20–e35
36. Teramoto N (2006) Pharmacological profile of U-37883A, a channel blocker of smooth muscle-type ATP-sensitive K channels. *Cardiovasc Drug Rev* 24:25–32
37. Morelli A, Lange M, Ertmer C, Broeking K, Van Aken H, Orecchioni A, Rocco M, Bachetoni A, Traber DL, Landoni G, Pietropaoli P, Westphal M (2007) Glibenclamide dose response in patients with septic shock: effects on norepinephrine requirements, cardiopulmonary performance, and global oxygen transport. *Shock* 28:530–535

BIBLIOGRAPHIE

1. Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM: **Septic shock**. *Lancet* 2005, **365**(9453):63-78.
2. Cohen J: **The immunopathogenesis of sepsis**. *Nature* 2002, **420**(6917):885-891.
3. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L: **Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease**. *Physiol Rev* 2007, **87**(1):315-424.
4. Nichols CG: **KATP channels as molecular sensors of cellular metabolism**. *Nature* 2006, **440**(7083):470-476.
5. Buckley JF, Singer M, Clapp LH: **Role of KATP channels in sepsis**. *Cardiovasc Res* 2006, **72**(2):220-230.
6. Gutterman DD, Miura H, Liu Y: **Redox modulation of vascular tone: focus of potassium channel mechanisms of dilation**. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005, **25**(4):671-678.
7. Ohashi M, Faraci F, Heistad D: **Peroxyntirite hyperpolarizes smooth muscle and relaxes internal carotid artery in rabbit via ATP-sensitive K⁺ channels**. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005, **289**(5):H2244-2250.
8. Landry DW, Oliver JA: **The pathogenesis of vasodilatory shock**. *N Engl J Med* 2001, **345**(8):588-595.
9. Lange M, Morelli A, Ertmer C, Broking K, Rehberg S, Van Aken H, Traber DL, Westphal M: **Role of adenosine triphosphate-sensitive potassium channel inhibition in shock states: physiology and clinical implications**. *Shock* 2007, **28**(4):394-400.
10. Shi W, Cui N, Wu Z, Yang Y, Zhang S, Gai H, Zhu D, Jiang C: **Lipopolysaccharides up-regulate Kir6.1/SUR2B channel expression and enhance vascular KATP channel activity via NF-kappaB-dependent signaling**. *J Biol Chem* 2010, **285**(5):3021-3029.
11. Thijs LG, Groeneveld AB: **The circulatory effect of septic shock**. *Vincent JL, Thijs LG eds Springer-Verlag, Berlin* 1987:161-178.
12. Abraham E: **Why immunomodulatory therapies have not worked in sepsis**. *Intensive Care Med* 1999, **25**(6):556-566.
13. Annane D, Sebille V, Charpentier C, Bollaert PE, Francois B, Korach JM, Capellier G, Cohen Y, Azoulay E, Troche G *et al*: **Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock**. *Jama* 2002, **288**(7):862-871.
14. Giannoudis PV: **Current concepts of the inflammatory response after major trauma: an update**. *Injury* 2003, **34**(6):397-404.
15. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ: **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* 1992, **101**(6):1644-1655.
16. **Prise en charge initiale des états septiques graves de l'adulte et de l'enfant**. *Réanimation* 2007, **16**(Supplement 1):S1-S21.
17. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, Reinhart K, Angus DC, Brun-Buisson C, Beale R *et al*: **Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008**. *Crit Care Med* 2008, **36**(1):296-327.

18. Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA: **Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process.** *Chest* 1997, **112**(1):235-243.
19. Hotchkiss RS, Karl IE: **The pathophysiology and treatment of sepsis.** *N Engl J Med* 2003, **348**(2):138-150.
20. Sessler CN, Perry JC, Varney KL: **Management of severe sepsis and septic shock.** *Curr Opin Crit Care* 2004, **10**(5):354-363.
21. Bochud PY, Calandra T: **Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment.** *Bmj* 2003, **326**(7383):262-266.
22. Roitt IM, Brostoff J, Male DK: **Immunité antibactérienne et antifongique.** *Immunologie clinique 4e ed, DeBoeck Université, Bruxelles* 1997:223-235.
23. Ulevitch RJ, Tobias PS: **Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system.** *Curr Opin Immunol* 1999, **11**(1):19-22.
24. Medzhitov R: **Toll-like receptors and innate immunity.** *Nat Rev Immunol* 2001, **1**(2):135-145.
25. Janeway CA, Jr., Medzhitov R: **Innate immune recognition.** *Annu Rev Immunol* 2002, **20**:197-216.
26. Henneke P, Golenbock DT: **Innate immune recognition of lipopolysaccharide by endothelial cells.** *Crit Care Med* 2002, **30**(5 Suppl):S207-213.
27. Trampuz A, Zimmerli W: **Pathogenèse et traitement de la septicémie.** *Forum Med Suisse* 2003, **35**(8):811-818.
28. Leone M, Bourgoin A, Antonini F, Albanese J, Martin C: **[Which therapeutic prospects in the septic syndrome?].** *Ann Fr Anesth Reanim* 2003, **22**(9):798-808.
29. Murray CD: **The Physiological Principle of Minimum Work: I. The Vascular System and the Cost of Blood Volume.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1926, **12**(3):207-214.
30. Schretzenmayr: **Über kreislaufregulatorische Vorgänge an den grossen Arterien bei der Muskelarbeit.** *Plugers Arch* 1933, **232**:743-748.
31. Rodbard S: **Negative feedback mechanisms in the architecture and function of the connective and cardiovascular tissues.** *Perspect Biol Med* 1970, **13**(4):507-527.
32. Rodbard S: **Vascular caliber.** *Cardiology* 1975, **60**(1):4-49.
33. Furchgott RF, Zawadzki JV: **The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.** *Nature* 1980, **288**(5789):373-376.
34. Davies PF: **Flow-mediated endothelial mechanotransduction.** *Physiol Rev* 1995, **75**(3):519-560.
35. Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone MA, Jr., Luster AD, Luscinskas FW, Rosenzweig A: **MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions.** *Nature* 1999, **398**(6729):718-723.
36. Bayliss WM: **On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure.** *J Physiol* 1902, **28**(3):220-231.
37. Folkow B: **Intravascular pressure as a factor regulating the tone of the small vessels.** *Acta Physiol Scand* 1949, **17**(4):289-310.
38. Folkow B: **A study of the factors influencing the tone of denervated blood vessels perfused at various pressures.** *Acta Physiol Scand* 1952, **27**(2-3):99-117.
39. Vallet B, Tavernier B: **Physiopathologie du choc septique.** *Conférences d'actualisation de la SFAR* 1999:691-703.
40. Mutunga M, Fulton B, Bullock R, Batchelor A, Gascoigne A, Gillespie JI, Baudouin SV: **Circulating endothelial cells in patients with septic shock.** *Am J Respir Crit Care Med* 2001, **163**(1):195-200.

41. ten Cate H, Brandjes DP, Wolters HJ, van Deventer SJ: **Disseminated intravascular coagulation: pathophysiology, diagnosis, and treatment.** *New Horiz* 1993, **1**(2):312-323.
42. Vallet B, Lund N, Curtis SE, Kelly D, Cain SM: **Gut and muscle tissue PO₂ in endotoxemic dogs during shock and resuscitation.** *J Appl Physiol* 1994, **76**(2):793-800.
43. Bellissant E, Annane D: **Effect of hydrocortisone on phenylephrine--mean arterial pressure dose-response relationship in septic shock.** *Clin Pharmacol Ther* 2000, **68**(3):293-303.
44. Moncada S, Higgs EA: **Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance.** *Eur J Clin Invest* 1991, **21**(4):361-374.
45. McKenna TM: **Enhanced vascular effects of cyclic GMP in septic rat aorta.** *Am J Physiol* 1988, **254**(3 Pt 2):R436-442.
46. Cobb JP, Danner RL: **Nitric oxide and septic shock.** *Jama* 1996, **275**(15):1192-1196.
47. Mebazaa A, De Keulenaer GW, Paqueron X, Andries LJ, Ratajczak P, Lanone S, Frelin C, Longrois D, Payen D, Brutsaert DL *et al*: **Activation of cardiac endothelium as a compensatory component in endotoxin-induced cardiomyopathy: role of endothelin, prostaglandins, and nitric oxide.** *Circulation* 2001, **104**(25):3137-3144.
48. Walker TA, Curtis SE, King-VanVlack CE, Chapler CK, Vallet B, Cain SM: **Effects of nitric oxide synthase inhibition on regional hemodynamics and oxygen transport in endotoxic dogs.** *Shock* 1995, **4**(6):415-420.
49. Vincent JL, Zhang H, Szabo C, Preiser JC: **Effects of nitric oxide in septic shock.** *Am J Respir Crit Care Med* 2000, **161**(6):1781-1785.
50. Grover R, Zaccardelli D, Colice G, Guntupalli K, Watson D, Vincent JL: **An open-label dose escalation study of the nitric oxide synthase inhibitor, N(G)-methyl-L-arginine hydrochloride (546C88), in patients with septic shock. Glaxo Wellcome International Septic Shock Study Group.** *Crit Care Med* 1999, **27**(5):913-922.
51. Lopez A, Lorente JA, Steingrub J, Bakker J, McLuckie A, Willatts S, Brockway M, Anzueto A, Holzapfel L, Breen D *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.** *Crit Care Med* 2004, **32**(1):21-30.
52. Levy B, Valtier M, de Chillou C, Bollaert PE, Cane D, Mallie JP: **Beneficial effects of L-canavanine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, on lactate metabolism and muscle high energy phosphates during endotoxic shock in rats.** *Shock* 1999, **11**(2):98-103.
53. Ni J, McLoughlin RM, Brodovitch A, Moulin P, Brouckaert P, Casadei B, Feron O, Topley N, Balligand JL, Devuyst O: **Nitric oxide synthase isoforms play distinct roles during acute peritonitis.** *Nephrol Dial Transplant* 2010, **25**(1):86-96.
54. Cauwels A, Buys ES, Thoonen R, Geary L, Delanghe J, Shiva S, Brouckaert P: **Nitrite protects against morbidity and mortality associated with TNF- or LPS-induced shock in a soluble guanylate cyclase-dependent manner.** *J Exp Med* 2009, **206**(13):2915-2924.
55. Wang P, Zhou M, Cioffi WG, Bland KI, Ba ZF, Chaudry IH: **Is prostacyclin responsible for producing the hyperdynamic response during early sepsis?** *Crit Care Med* 2000, **28**(5):1534-1539.
56. Schildknecht S, Bachschmid M, Baumann A, Ullrich V: **COX-2 inhibitors selectively block prostacyclin synthesis in endotoxin-exposed vascular smooth muscle cells.** *FASEB J* 2004, **18**(6):757-759.

57. Hocherl K, Schmidt C, Kurt B, Bucher M: **Activation of the PGI(2)/IP system contributes to the development of circulatory failure in a rat model of endotoxic shock.** *Hypertension* 2008, **52**(2):330-335.
58. Bernard GR, Wheeler AP, Russell JA, Schein R, Summer WR, Steinberg KP, Fulkerson WJ, Wright PE, Christman BW, Dupont WD *et al*: **The effects of ibuprofen on the physiology and survival of patients with sepsis. The Ibuprofen in Sepsis Study Group.** *N Engl J Med* 1997, **336**(13):912-918.
59. Lundberg JO, Weitzberg E: **NO generation from nitrite and its role in vascular control.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005, **25**(5):915-922.
60. Macarthur H, Westfall TC, Riley DP, Misko TP, Salvemini D: **Inactivation of catecholamines by superoxide gives new insights on the pathogenesis of septic shock.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**(17):9753-9758.
61. Salvemini D, Wang ZQ, Zweier JL, Samouilov A, Macarthur H, Misko TP, Currie MG, Cuzzocrea S, Sikorski JA, Riley DP: **A nonpeptidyl mimic of superoxide dismutase with therapeutic activity in rats.** *Science* 1999, **286**(5438):304-306.
62. Landry DW, Oliver JA: **The ATP-sensitive K⁺ channel mediates hypotension in endotoxemia and hypoxic lactic acidosis in dog.** *J Clin Invest* 1992, **89**(6):2071-2074.
63. Quayle JM, Nelson MT, Standen NB: **ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle.** *Physiol Rev* 1997, **77**(4):1165-1232.
64. Landry DW, Levin HR, Gallant EM, Ashton RC, Jr., Seo S, D'Alessandro D, Oz MC, Oliver JA: **Vasopressin deficiency contributes to the vasodilation of septic shock.** *Circulation* 1997, **95**(5):1122-1125.
65. Sharshar T, Carlier R, Blanchard A, Feydy A, Gray F, Paillard M, Raphael JC, Gajdos P, Annane D: **Depletion of neurohypophyseal content of vasopressin in septic shock.** *Crit Care Med* 2002, **30**(3):497-500.
66. Holmes CL, Patel BM, Russell JA, Walley KR: **Physiology of vasopressin relevant to management of septic shock.** *Chest* 2001, **120**(3):989-1002.
67. Leone M, Boyle WA: **Decreased vasopressin responsiveness in vasodilatory septic shock-like conditions.** *Crit Care Med* 2006, **34**(4):1126-1130.
68. Hollenberg SM, Tangora JJ, Piotrowski MJ, Easington C, Parrillo JE: **Impaired microvascular vasoconstrictive responses to vasopressin in septic rats.** *Crit Care Med* 1997, **25**(5):869-873.
69. Barrett LK, Orié NN, Taylor V, Stidwill RP, Clapp LH, Singer M: **Differential effects of vasopressin and norepinephrine on vascular reactivity in a long-term rodent model of sepsis.** *Crit Care Med* 2007, **35**(10):2337-2343.
70. Bollaert PE, Charpentier C, Levy B, Debouverie M, Audibert G, Larcan A: **Reversal of late septic shock with supraphysiologic doses of hydrocortisone.** *Crit Care Med* 1998, **26**(4):645-650.
71. Annane D, Maxime V, Ibrahim F, Alvarez JC, Abe E, Boudou P: **Diagnosis of adrenal insufficiency in severe sepsis and septic shock.** *Am J Respir Crit Care Med* 2006, **174**(12):1319-1326.
72. Sprung CL, Annane D, Keh D, Moreno R, Singer M, Freivogel K, Weiss YG, Benbenishty J, Kalenka A, Forst H *et al*: **Hydrocortisone therapy for patients with septic shock.** *N Engl J Med* 2008, **358**(2):111-124.
73. Briegel J, Sprung CL, Annane D, Singer M, Keh D, Moreno R, Mohnle P, Weiss Y, Avidan A, Brunkhorst FM *et al*: **Multicenter comparison of cortisol as measured by different methods in samples of patients with septic shock.** *Intensive Care Med* 2009, **35**(12):2151-2156.

74. Marik PE, Pastores SM, Annane D, Meduri GU, Sprung CL, Arlt W, Keh D, Briegel J, Beishuizen A, Dimopoulou I *et al*: **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* 2008, **36**(6):1937-1949.
75. McMillan M, Chernow B, Roth BL: **Hepatic alpha 1-adrenergic receptor alteration in a rat model of chronic sepsis.** *Circ Shock* 1986, **19**(2):185-193.
76. Fowler DE, Wang P: **The cardiovascular response in sepsis: proposed mechanisms of the beneficial effect of adrenomedullin and its binding protein (review).** *Int J Mol Med* 2002, **9**(5):443-449.
77. Gonzalez-Rey E, Chorny A, Varela N, Robledo G, Delgado M: **Urocortin and adrenomedullin prevent lethal endotoxemia by down-regulating the inflammatory response.** *Am J Pathol* 2006, **168**(6):1921-1930.
78. Miksa M, Wu R, Cui X, Dong W, Das P, Simms HH, Ravikumar TS, Wang P: **Vasoactive hormone adrenomedullin and its binding protein: anti-inflammatory effects by up-regulating peroxisome proliferator-activated receptor-gamma.** *J Immunol* 2007, **179**(9):6263-6272.
79. Paulus WJ, Vantrimpont PJ, Shah AM: **Paracrine coronary endothelial control of left ventricular function in humans.** *Circulation* 1995, **92**(8):2119-2126.
80. Brady AJ, Poole-Wilson PA, Harding SE, Warren JB: **Nitric oxide production within cardiac myocytes reduces their contractility in endotoxemia.** *Am J Physiol* 1992, **263**(6 Pt 2):H1963-1966.
81. Lancel S, Tissier S, Mordon S, Marechal X, Depontieu F, Scherpereel A, Chopin C, Nevriere R: **Peroxynitrite decomposition catalysts prevent myocardial dysfunction and inflammation in endotoxemic rats.** *J Am Coll Cardiol* 2004, **43**(12):2348-2358.
82. Lew WY, Yasuda S, Yuan T, Hammond HK: **Endotoxin-induced cardiac depression is associated with decreased cardiac dihydropyridine receptors in rabbits.** *J Mol Cell Cardiol* 1996, **28**(6):1367-1371.
83. Wu LL, Liu MS: **Heart sarcolemmal Ca²⁺ transport in endotoxin shock: I. Impairment of ATP-dependent Ca²⁺ transport.** *Mol Cell Biochem* 1992, **112**(2):125-133.
84. Mansart A, Bollaert PE, Giummelly P, Capdeville-Atkinson C, Atkinson J: **Effects of dexamethasone and L-canavanine on the intracellular calcium-contraction relation of the rat tail artery during septic shock.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006, **291**(3):H1177-1182.
85. Bernardin G, Strosberg AD, Bernard A, Mattei M, Marullo S: **Beta-adrenergic receptor-dependent and -independent stimulation of adenylyl cyclase is impaired during severe sepsis in humans.** *Intensive Care Med* 1998, **24**(12):1315-1322.
86. Reithmann C, Hallstrom S, Pilz G, Kapsner T, Schlag G, Werdan K: **Desensitization of rat cardiomyocyte adenylyl cyclase stimulation by plasma of noradrenaline-treated patients with septic shock.** *Circ Shock* 1993, **41**(1):48-59.
87. Fernandes Junior CJ, Iervolino M, Neves RA, Sampaio EL, Knobel E: **Interstitial myocarditis in sepsis.** *Am J Cardiol* 1994, **74**(9):958.
88. Gibot S, Levy B, Nevriere R, Cariou A, Lesur O: **[Myocardial dysfunction and septic shock].** *Med Sci (Paris)* 2004, **20**(12):1115-1118.
89. Nevriere R, Fauvel H, Chopin C, Formstecher P, Marchetti P: **Caspase inhibition prevents cardiac dysfunction and heart apoptosis in a rat model of sepsis.** *Am J Respir Crit Care Med* 2001, **163**(1):218-225.

90. Jardin F, Bourdarias JP: **Cardiac dysfunction in sepsis.** *Intensive Care Med* 1998, **24**(9):990-992.
91. Parker MM, Shelhamer JH, Natanson C, Alling DW, Parrillo JE: **Serial cardiovascular variables in survivors and nonsurvivors of human septic shock: heart rate as an early predictor of prognosis.** *Crit Care Med* 1987, **15**(10):923-929.
92. Duranteau J, Richard C: **Bénéfices attendus du remplissage vasculaire.** *Réanimation* 2004, **13**(4):268-272.
93. Hinshaw LB, Beller BK, Archer LT, Benjamin B: **Hypoglycemic response of blood to live Escherichia coli organisms and endotoxin.** *J Surg Res* 1976, **21**(3):141-150.
94. Fleck A: **Computer models for metabolic studies on plasma proteins.** *Ann Clin Biochem* 1985, **22** (Pt 1):33-49.
95. Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, Gerlach H, Calandra T, Cohen J, Gea-Banacloche J, Keh D, Marshall JC, Parker MM *et al*: **Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock.** *Crit Care Med* 2004, **32**(3):858-873.
96. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW *et al*: **Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis.** *N Engl J Med* 2001, **344**(10):699-709.
97. Bochud PY, Bonten M, Marchetti O, Calandra T: **Antimicrobial therapy for patients with severe sepsis and septic shock: an evidence-based review.** *Crit Care Med* 2004, **32**(11 Suppl):S495-512.
98. Sibbald WJ: **An alternative pathway for preclinical research in fluid management.** *Crit Care* 2000, **4** Suppl 2:S8-S15.
99. Leone M, Vallet B, Teboul JL, Mateo J, Bastien O, Martin C: **Survey of the use of catecholamines by French physicians.** *Intensive Care Med* 2004, **30**(5):984-988.
100. Kopin IJ: **Catecholamine metabolism: basic aspects and clinical significance.** *Pharmacol Rev* 1985, **37**(4):333-364.
101. Bellomo R, McGrath B, Boyce N: **In vivo catecholamine extraction during continuous hemodiafiltration in inotrope-dependent patients.** *ASAIO Trans* 1991, **37**(3):M324-325.
102. Breslow MJ, Ligier B: **Hyperadrenergic states.** *Crit Care Med* 1991, **19**(12):1566-1579.
103. Clutter WE, Bier DM, Shah SD, Cryer PE: **Epinephrine plasma metabolic clearance rates and physiologic thresholds for metabolic and hemodynamic actions in man.** *J Clin Invest* 1980, **66**(1):94-101.
104. Ensinger H, Stein B, Jager O, Grunert A, Ahnefeld FW: **Relationship between infusion rates, plasma concentrations, and cardiovascular and metabolic effects during the infusion of norepinephrine in healthy volunteers.** *Crit Care Med* 1992, **20**(9):1250-1256.
105. Barnes PJ: **Beta-adrenergic receptors and their regulation.** *Am J Respir Crit Care Med* 1995, **152**(3):838-860.
106. Lefkowitz RJ, Caron MG: **The adrenergic receptors.** *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 1990, **24**:1-8.
107. Ruffolo RR, Jr., Hieble JP: **Alpha-adrenoceptors.** *Pharmacol Ther* 1994, **61**(1-2):1-64.
108. Russell JA, Walley KR, Singer J, Gordon AC, Hebert PC, Cooper DJ, Holmes CL, Mehta S, Granton JT, Storms MM *et al*: **Vasopressin versus norepinephrine infusion in patients with septic shock.** *N Engl J Med* 2008, **358**(9):877-887.

109. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, Peterson E, Tomlanovich M: **Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock.** *N Engl J Med* 2001, **345**(19):1368-1377.
110. Morelli A, De Castro S, Teboul JL, Singer M, Rocco M, Conti G, De Luca L, Di Angelantonio E, Orecchioni A, Pandian NG *et al*: **Effects of levosimendan on systemic and regional hemodynamics in septic myocardial depression.** *Intensive Care Med* 2005, **31**(5):638-644.
111. Schmidt HB, Werdan K, Muller-Werdan U: **Autonomic dysfunction in the ICU patient.** *Curr Opin Crit Care* 2001, **7**(5):314-322.
112. Oppert M, Schindler R, Husung C, Offermann K, Graf KJ, Boenisch O, Barckow D, Frei U, Eckardt KU: **Low-dose hydrocortisone improves shock reversal and reduces cytokine levels in early hyperdynamic septic shock.** *Crit Care Med* 2005, **33**(11):2457-2464.
113. Prigent H, Maxime V, Annane D: **Science review: mechanisms of impaired adrenal function in sepsis and molecular actions of glucocorticoids.** *Crit Care* 2004, **8**(4):243-252.
114. Isobe H, Okajima K, Uchiba M, Mizutani A, Harada N, Nagasaki A, Okabe K: **Activated protein C prevents endotoxin-induced hypotension in rats by inhibiting excessive production of nitric oxide.** *Circulation* 2001, **104**(10):1171-1175.
115. Monnet X, Lamia B, Anguel N, Richard C, Bonmarchand G, Teboul JL: **Rapid and beneficial hemodynamic effects of activated protein C in septic shock patients.** *Intensive Care Med* 2005, **31**(11):1573-1576.
116. Natanson C, Esposito CJ, Banks SM: **The sirens' songs of confirmatory sepsis trials: selection bias and sampling error.** *Crit Care Med* 1998, **26**(12):1927-1931.
117. Verhoef J, Hustinx WM, Frasa H, Hoepelman AI: **Issues in the adjunct therapy of severe sepsis.** *J Antimicrob Chemother* 1996, **38**(2):167-182.
118. Zeni F, Freeman B, Natanson C: **Anti-inflammatory therapies to treat sepsis and septic shock: a reassessment.** *Crit Care Med* 1997, **25**(7):1095-1100.
119. Heckbert SR, Vedder NB, Hoffman W, Winn RK, Hudson LD, Jurkovich GJ, Copass MK, Harlan JM, Rice CL, Maier RV: **Outcome after hemorrhagic shock in trauma patients.** *J Trauma* 1998, **45**(3):545-549.
120. Stewart RM, Myers JG, Dent DL, Ermis P, Gray GA, Villarreal R, Blow O, Woods B, McFarland M, Garavaglia J *et al*: **Seven hundred fifty-three consecutive deaths in a level I trauma center: the argument for injury prevention.** *J Trauma* 2003, **54**(1):66-70; discussion 70-61.
121. Geeraerts T, Chhor V, Cheisson G, Martin L, Bessoud B, Ozanne A, Duranteau J: **Clinical review: initial management of blunt pelvic trauma patients with haemodynamic instability.** *Crit Care* 2007, **11**(1):204.
122. Isbister JP: **Physiology and pathophysiology of blood volume regulation.** *Transfus Sci* 1997, **18**(3):409-423.
123. Nakajima Y, Baudry N, Duranteau J, Vicaut E: **Microcirculation in intestinal villi: a comparison between hemorrhagic and endotoxin shock.** *Am J Respir Crit Care Med* 2001, **164**(8 Pt 1):1526-1530.
124. Cerovic O, Golubovic V, Spec-Marn A, Kremzar B, Vidmar G: **Relationship between injury severity and lactate levels in severely injured patients.** *Intensive Care Med* 2003, **29**(8):1300-1305.
125. Rixen D, Raum M, Bouillon B, Lefering R, Neugebauer E: **Base deficit development and its prognostic significance in posttrauma critical illness: an analysis by the trauma registry of the Deutsche Gesellschaft fur unfallchirurgie.** *Shock* 2001, **15**(2):83-89.

126. Davis JW, Kaups KL: **Base deficit in the elderly: a marker of severe injury and death.** *J Trauma* 1998, **45**(5):873-877.
127. Malone DL, Kuhls D, Napolitano LM, McCarter R, Scalea T: **Back to basics: validation of the admission systemic inflammatory response syndrome score in predicting outcome in trauma.** *J Trauma* 2001, **51**(3):458-463.
128. Martin C, Boisson C, Haccoun M, Thomachot L, Mege JL: **Patterns of cytokine evolution (tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6) after septic shock, hemorrhagic shock, and severe trauma.** *Crit Care Med* 1997, **25**(11):1813-1819.
129. Lozano FS, Lopez-Novoa JM, Rodriguez JM, Barros MB, Garcia-Criado FJ, Nicolas JL, Parreno A, Revilla J, Gomez-Alonso A: **Exogenous nitric oxide modulates the systemic inflammatory response and improves kidney function after risk-situation abdominal aortic surgery.** *J Vasc Surg* 2005, **42**(1):129-139.
130. Meng ZH, Dyer K, Billiar TR, Tweardy DJ: **Distinct effects of systemic infusion of G-CSF vs. IL-6 on lung and liver inflammation and injury in hemorrhagic shock.** *Shock* 2000, **14**(1):41-48.
131. Hensler T, Sauerland S, Bouillon B, Raum M, Rixen D, Helling HJ, Andermahr J, Neugebauer EA: **Association between injury pattern of patients with multiple injuries and circulating levels of soluble tumor necrosis factor receptors, interleukin-6 and interleukin-10, and polymorphonuclear neutrophil elastase.** *J Trauma* 2002, **52**(5):962-970.
132. Miller-Graziano CL, Szabo G, Griffey K, Mehta B, Kodys K, Catalano D: **Role of elevated monocyte transforming growth factor beta (TGF beta) production in posttrauma immunosuppression.** *J Clin Immunol* 1991, **11**(2):95-102.
133. Yang S, Hu S, Hsieh YC, Choudhry MA, Rue LW, 3rd, Bland KI, Chaudry IH: **Mechanism of IL-6-mediated cardiac dysfunction following trauma-hemorrhage.** *J Mol Cell Cardiol* 2006, **40**(4):570-579.
134. Abraham E, Freitas AA: **Hemorrhage produces abnormalities in lymphocyte function and lymphokine generation.** *J Immunol* 1989, **142**(3):899-906.
135. Chaudry IH, Ayala A, Ertel W, Stephan RN: **Hemorrhage and resuscitation: immunological aspects.** *Am J Physiol* 1990, **259**(4 Pt 2):R663-678.
136. Xu L, Zhao Y, Qin Y, Xu Q: **A novel model of acute liver injury in mice induced by T cell-mediated immune response to lactosylated bovine serum albumin.** *Clin Exp Immunol* 2006, **144**(1):125-133.
137. Childs EW, Udobi KF, Wood JG, Hunter FA, Smalley DM, Cheung LY: **In vivo visualization of reactive oxidants and leukocyte-endothelial adherence following hemorrhagic shock.** *Shock* 2002, **18**(5):423-427.
138. Roesner JP, Vagts DA, Iber T, Eipel C, Vollmar B, Noldge-Schomburg GF: **Protective effects of PARP inhibition on liver microcirculation and function after haemorrhagic shock and resuscitation in male rats.** *Intensive Care Med* 2006, **32**(10):1649-1657.
139. Riddez L, Johnson L, Hahn RG: **Central and regional hemodynamics during crystalloid fluid therapy after uncontrolled intra-abdominal bleeding.** *J Trauma* 1998, **44**(3):433-439.
140. Bickell WH, Wall MJ, Jr., Pepe PE, Martin RR, Ginger VF, Allen MK, Mattox KL: **Immediate versus delayed fluid resuscitation for hypotensive patients with penetrating torso injuries.** *N Engl J Med* 1994, **331**(17):1105-1109.
141. Kwan I, Bunn F, Roberts I: **Timing and volume of fluid administration for patients with bleeding.** *Cochrane Database Syst Rev* 2003(3):CD002245.

142. Spahn DR, Cerny V, Coats TJ, Duranteau J, Fernandez-Mondejar E, Gordini G, Stahel PF, Hunt BJ, Komadina R, Neugebauer E *et al*: **Management of bleeding following major trauma: a European guideline.** *Crit Care* 2007, **11**(1):R17.
143. Alderson P, Bunn F, Lefebvre C, Li WP, Li L, Roberts I, Schierhout G: **Human albumin solution for resuscitation and volume expansion in critically ill patients.** *Cochrane Database Syst Rev* 2004(4):CD001208.
144. Finfer S, Norton R, Bellomo R, Boyce N, French J, Myburgh J: **The SAFE study: saline vs. albumin for fluid resuscitation in the critically ill.** *Vox Sang* 2004, **87 Suppl 2**:123-131.
145. Gurfinkel V, Poggetti RS, Fontes B, da Costa Ferreira Novo F, Birolini D: **Hypertonic saline improves tissue oxygenation and reduces systemic and pulmonary inflammatory response caused by hemorrhagic shock.** *J Trauma* 2003, **54**(6):1137-1145.
146. Poloujadoff MP, Borron SW, Amathieu R, Favret F, Camara MS, Lapostolle F, Vicaut E, Adnet F: **Improved survival after resuscitation with norepinephrine in a murine model of uncontrolled hemorrhagic shock.** *Anesthesiology* 2007, **107**(4):591-596.
147. Chesnut RM, Marshall LF, Klauber MR, Blunt BA, Baldwin N, Eisenberg HM, Jane JA, Marmarou A, Foulkes MA: **The role of secondary brain injury in determining outcome from severe head injury.** *J Trauma* 1993, **34**(2):216-222.
148. Dalibon N, Schlumberger S, Saada M, Fischler M, Riou B: **Haemodynamic assessment of hypovolaemia under general anaesthesia in pigs submitted to graded haemorrhage and retransfusion.** *Br J Anaesth* 1999, **82**(1):97-103.
149. Hebert PC, Wells G, Blajchman MA, Marshall J, Martin C, Pagliarello G, Tweeddale M, Schweitzer I, Yetisir E: **A multicenter, randomized, controlled clinical trial of transfusion requirements in critical care. Transfusion Requirements in Critical Care Investigators, Canadian Critical Care Trials Group.** *N Engl J Med* 1999, **340**(6):409-417.
150. Teramoto N: **Physiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels in smooth muscle.** *J Physiol* 2006, **572**(Pt 3):617-624.
151. Noma A: **ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle.** *Nature* 1983, **305**(5930):147-148.
152. Ashcroft SJ, Ashcroft FM: **Properties and functions of ATP-sensitive K-channels.** *Cell Signal* 1990, **2**(3):197-214.
153. Bryan J, Aguilar-Bryan L: **Sulfonylurea receptors: ABC transporters that regulate ATP-sensitive K(+) channels.** *Biochim Biophys Acta* 1999, **1461**(2):285-303.
154. Rodrigo GC, Standen NB: **ATP-sensitive potassium channels.** *Curr Pharm Des* 2005, **11**(15):1915-1940.
155. Wakatsuki T, Nakaya Y, Inoue I: **Vasopressin modulates K(+)-channel activities of cultured smooth muscle cells from porcine coronary artery.** *Am J Physiol* 1992, **263**(2 Pt 2):H491-496.
156. Tsuchiya K, Horie M, Watanuki M, Albrecht CA, Obayashi K, Fujiwara H, Sasayama S: **Functional compartmentalization of ATP is involved in angiotensin II-mediated closure of cardiac ATP-sensitive K⁺ channels.** *Circulation* 1997, **96**(9):3129-3135.
157. Tsuchiya M, Tsuchiya K, Maruyama R, Takemura G, Minatoguchi S, Fujiwara H: **Vasopressin inhibits sarcolemmal ATP-sensitive K⁺ channels via V1 receptors activation in the guinea pig heart.** *Circ J* 2002, **66**(3):277-282.
158. Humphrey S: **Pharmacology of the K-ATP channel blocking morpholinoguanidine PNU-37883A.** *Cardiovasc Drug Rev* 1999, **17**:295-328.

159. Szabo C, Salzman AL: **Inhibition of ATP-activated potassium channels exerts pressor effects and improves survival in a rat model of severe hemorrhagic shock.** *Shock* 1996, **5**(6):391-394.
160. Kloner RA, Speakman MT, Przyklenk K: **Ischemic preconditioning: a plea for rationally targeted clinical trials.** *Cardiovasc Res* 2002, **55**(3):526-533.
161. Zhao ZQ, Vinten-Johansen J: **Postconditioning: reduction of reperfusion-induced injury.** *Cardiovasc Res* 2006, **70**(2):200-211.
162. Seino S, Miki T: **Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels.** *Prog Biophys Mol Biol* 2003, **81**(2):133-176.
163. Hanley PJ, Daut J: **K(ATP) channels and preconditioning: a re-examination of the role of mitochondrial K(ATP) channels and an overview of alternative mechanisms.** *J Mol Cell Cardiol* 2005, **39**(1):17-50.
164. Asfar P, Ivanyi Z, Bracht H, Hauser B, Pittner A, Vassilev D, Nalos M, Leverve XM, Bruckner UB, Radermacher P *et al*: **HMR1402, a potassium ATP channel blocker during hyperdynamic porcine endotoxemia: effects on hepato-splanchnic oxygen exchange and metabolism.** *Intensive Care Med* 2004, **30**(5):957-964.
165. Lange M, Szabo C, Van Aken H, Williams W, Traber DL, Daudel F, Broking K, Salzman AL, Bone HG, Westphal M: **Short-term effects of glipizide (an adenosine triphosphate-sensitive potassium channel inhibitor) on cardiopulmonary hemodynamics and global oxygen transport in healthy and endotoxemic sheep.** *Shock* 2006, **26**(5):516-521.
166. Sorrentino R, d'Emmanuele di Villa Bianca R, Lippolis L, Sorrentino L, Autore G, Pinto A: **Involvement of ATP-sensitive potassium channels in a model of a delayed vascular hyporeactivity induced by lipopolysaccharide in rats.** *Br J Pharmacol* 1999, **127**(6):1447-1453.
167. Vanelli G, Hussain SN, Aguggini G: **Glibenclamide, a blocker of ATP-sensitive potassium channels, reverses endotoxin-induced hypotension in pig.** *Exp Physiol* 1995, **80**(1):167-170.
168. Gardiner SM, Kemp PA, March JE, Bennett T: **Regional haemodynamic responses to infusion of lipopolysaccharide in conscious rats: effects of pre- or post-treatment with glibenclamide.** *Br J Pharmacol* 1999, **128**(8):1772-1778.
169. Lange M, Williams W, Bone HG, Van Aken H, Broking K, Morelli A, Hucklenbruch C, Daudel F, Ertmer C, Stubbe H *et al*: **Continuously infused glipizide reverses the hyperdynamic circulation in ovine endotoxemia.** *Shock* 2007, **27**(6):701-706.
170. Warrillow S, Egi M, Bellomo R: **Randomized, double-blind, placebo-controlled crossover pilot study of a potassium channel blocker in patients with septic shock.** *Crit Care Med* 2006, **34**(4):980-985.
171. Morelli A, Lange M, Ertmer C, Broeking K, Van Aken H, Orecchioni A, Rocco M, Bachetoni A, Traber DL, Landoni G *et al*: **Glibenclamide dose response in patients with septic shock: effects on norepinephrine requirements, cardiopulmonary performance, and global oxygen transport.** *Shock* 2007, **28**(5):530-535.
172. Domoki F, Perciaccante JV, Veltkamp R, Bari F, Busija DW: **Mitochondrial potassium channel opener diazoxide preserves neuronal-vascular function after cerebral ischemia in newborn pigs.** *Stroke* 1999, **30**(12):2713-2718; discussion 2718-2719.
173. Sato T, Nishida H, Miyazaki M, Nakaya H: **Effects of sulfonylureas on mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels in cardiac myocytes: implications for sulfonylurea controversy.** *Diabetes Metab Res Rev* 2006, **22**(5):341-347.

174. Tsiotou AG, Sakorafas GH, Anagnostopoulos G, Bramis J: **Septic shock; current pathogenetic concepts from a clinical perspective.** *Med Sci Monit* 2005, **11**(3):RA76-85.
175. van den Berghe G, Wouters P, Weekers F, Verwaest C, Bruyninckx F, Schetz M, Vlasselaers D, Ferdinande P, Lauwers P, Bouillon R: **Intensive insulin therapy in the critically ill patients.** *N Engl J Med* 2001, **345**(19):1359-1367.
176. Van den Berghe G, Schoonheydt K, Becx P, Bruyninckx F, Wouters PJ: **Insulin therapy protects the central and peripheral nervous system of intensive care patients.** *Neurology* 2005, **64**(8):1348-1353.
177. Van den Berghe G, Wilmer A, Hermans G, Meersseman W, Wouters PJ, Milants I, Van Wijngaerden E, Bobbaers H, Bouillon R: **Intensive insulin therapy in the medical ICU.** *N Engl J Med* 2006, **354**(5):449-461.
178. O'Brien A, Stidwill RP, Clapp LH, Singer M: **Variable effects of inhibiting iNOS and closing the vascular ATP-sensitive potassium channel (via its pore-forming and sulfonylurea receptor subunits) in endotoxic shock.** *Shock* 2009, **31**(5):535-541.
179. Czaika G, Gingras Y, Zhu E, Comtois AS: **Induction of the ATP-sensitive potassium (uK(ATP)-1) channel by endotoxemia.** *Muscle Nerve* 2000, **23**(6):967-969.
180. Jin X, Malykhina AP, Lupu F, Akbarali HI: **Altered gene expression and increased bursting activity of colonic smooth muscle ATP-sensitive K⁺ channels in experimental colitis.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004, **287**(1):G274-285.
181. Kane GC, Lam CF, O'Coilain F, Hodgson DM, Reyes S, Liu XK, Miki T, Seino S, Katusic ZS, Terzic A: **Gene knockout of the KCNJ8-encoded Kir6.1 K(ATP) channel imparts fatal susceptibility to endotoxemia.** *FASEB J* 2006, **20**(13):2271-2280.
182. Sato N, Nakayama T, Asai S, Soma M: **A haplotype in the human Sur2 gene is associated with essential hypertension.** *J Hum Hypertens* 2006, **20**(1):87-90.
183. Clapp LH, Tinker A: **Potassium channels in the vasculature.** *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1998, **7**(1):91-98.
184. Wilson AJ, Clapp LH: **The molecular site of action of K(ATP) channel inhibitors determines their ability to inhibit iNOS-mediated relaxation in rat aorta.** *Cardiovasc Res* 2002, **56**(1):154-163.
185. Wu CC, Thiemermann C, Vane JR: **Glibenclamide-induced inhibition of the expression of inducible nitric oxide synthase in cultured macrophages and in the anaesthetized rat.** *Br J Pharmacol* 1995, **114**(6):1273-1281.
186. O'Brien AJ, Wilson AJ, Sibbald R, Singer M, Clapp LH: **Temporal variation in endotoxin-induced vascular hyporeactivity in a rat mesenteric artery organ culture model.** *Br J Pharmacol* 2001, **133**(3):351-360.
187. Chen SJ, Wu CC, Yang SN, Lin CI, Yen MH: **Abnormal activation of K(+) channels in aortic smooth muscle of rats with endotoxic shock: electrophysiological and functional evidence.** *Br J Pharmacol* 2000, **131**(2):213-222.
188. Chen SJ, Wu CC, Yang SN, Lin CI, Yen MH: **Hyperpolarization contributes to vascular hyporeactivity in rats with lipopolysaccharide-induced endotoxic shock.** *Life Sci* 2000, **68**(6):659-668.
189. Wu CC, Chen SJ, Garland CJ: **NO and KATP channels underlie endotoxin-induced smooth muscle hyperpolarization in rat mesenteric resistance arteries.** *Br J Pharmacol* 2004, **142**(3):479-484.

190. Kuo JH, Chen SJ, Shih CC, Lue WM, Wu CC: **Abnormal activation of potassium channels in aortic smooth muscle of rats with peritonitis-induced septic shock.** *Shock* 2009, **32**(1):74-79.
191. Cui Y, Tinker A, Clapp LH: **Different molecular sites of action for the KATP channel inhibitors, PNU-99963 and PNU-37883A.** *Br J Pharmacol* 2003, **139**(1):122-128.
192. O'Brien AJ, Thakur G, Buckley JF, Singer M, Clapp LH: **The pore-forming subunit of the K(ATP) channel is an important molecular target for LPS-induced vascular hyporeactivity in vitro.** *Br J Pharmacol* 2005, **144**(3):367-375.
193. Preiser JC, Zhang H, Debelle F, Fesler P, Kafi SA, Naeije R, Vincent JL: **Hemodynamic effects of glibenclamide during endotoxemia: contrasting findings in vitro versus in vivo.** *Shock* 2003, **19**(3):223-228.
194. Pickkers P, Jansen Van Rosendaal AJ, Van Der Hoeven JG, Smits P: **Activation of the ATP-dependent potassium channel attenuates norepinephrine-induced vasoconstriction in the human forearm.** *Shock* 2004, **22**(4):320-325.
195. Evgenov OV, Pacher P, Williams W, Evgenov NV, Mabley JG, Cicila J, Siko ZB, Salzman AL, Szabo C: **Parenteral administration of glipizide sodium salt, an inhibitor of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels, prolongs short-term survival after severe controlled hemorrhage in rats.** *Crit Care Med* 2003, **31**(10):2429-2436.
196. Maybauer DM, Salsbury JR, Westphal M, Maybauer MO, Salzman AL, Szabo C, Westphal-Varghese BB, Traber LD, Traber DL: **The ATP-sensitive potassium-channel inhibitor glibenclamide improves outcome in an ovine model of hemorrhagic shock.** *Shock* 2004, **22**(4):387-391.
197. Salzman AL, Vromen A, Denenberg A, Szabo C: **K(ATP)-channel inhibition improves hemodynamics and cellular energetics in hemorrhagic shock.** *Am J Physiol* 1997, **272**(2 Pt 2):H688-694.
198. Zingman LV, Hodgson DM, Bast PH, Kane GC, Perez-Terzic C, Gumina RJ, Pucar D, Bienengraeber M, Dzeja PP, Miki T *et al*: **Kir6.2 is required for adaptation to stress.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**(20):13278-13283.
199. Gross GJ, Peart JN: **KATP channels and myocardial preconditioning: an update.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003, **285**(3):H921-930.
200. Yang XM, Proctor JB, Cui L, Krieg T, Downey JM, Cohen MV: **Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways.** *J Am Coll Cardiol* 2004, **44**(5):1103-1110.
201. Yellon DM, Downey JM: **Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology.** *Physiol Rev* 2003, **83**(4):1113-1151.
202. Garratt A: **Is the Scope of Practice endangered by lack of vision?** *Nurs Stand* 1999, **13**(28):40-42.
203. Simpson SH, Majumdar SR, Tsuyuki RT, Eurich DT, Johnson JA: **Dose-response relation between sulfonylurea drugs and mortality in type 2 diabetes mellitus: a population-based cohort study.** *CMAJ* 2006, **174**(2):169-174.
204. **Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group.** *Lancet* 1998, **352**(9131):837-853.
205. Singer M, Coluzzi F, O'Brien A, Clapp LH: **Reversal of life-threatening, drug-related potassium-channel syndrome by glibenclamide.** *Lancet* 2005, **365**(9474):1873-1875.

206. Ledoux J, Werner ME, Brayden JE, Nelson MT: **Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone.** *Physiology (Bethesda)* 2006, **21**:69-78.
207. Neylon CB, Lang RJ, Fu Y, Bobik A, Reinhart PH: **Molecular cloning and characterization of the intermediate-conductance Ca(2+)-activated K(+) channel in vascular smooth muscle: relationship between K(Ca) channel diversity and smooth muscle cell function.** *Circ Res* 1999, **85**(9):e33-43.
208. Toro L, Wallner M, Meera P, Tanaka Y: **Maxi-K(Ca), a Unique Member of the Voltage-Gated K Channel Superfamily.** *News Physiol Sci* 1998, **13**:112-117.
209. Barman SA, Zhu S, White RE: **PKC activates BKCa channels in rat pulmonary arterial smooth muscle via cGMP-dependent protein kinase.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004, **286**(6):L1275-1281.
210. Schreiber M, Salkoff L: **A novel calcium-sensing domain in the BK channel.** *Biophys J* 1997, **73**(3):1355-1363.
211. Schreiber M, Yuan A, Salkoff L: **Transplantable sites confer calcium sensitivity to BK channels.** *Nat Neurosci* 1999, **2**(5):416-421.
212. Krishnamoorthy G, Shi J, Sept D, Cui J: **The NH2 terminus of RCK1 domain regulates Ca2+-dependent BK(Ca) channel gating.** *J Gen Physiol* 2005, **126**(3):227-241.
213. Xia XM, Zeng X, Lingle CJ: **Multiple regulatory sites in large-conductance calcium-activated potassium channels.** *Nature* 2002, **418**(6900):880-884.
214. Piskorowski R, Aldrich RW: **Calcium activation of BK(Ca) potassium channels lacking the calcium bowl and RCK domains.** *Nature* 2002, **420**(6915):499-502.
215. Chen L, Tian L, MacDonald SH, McClafferty H, Hammond MS, Huibant JM, Ruth P, Knaus HG, Shipston MJ: **Functionally diverse complement of large conductance calcium- and voltage-activated potassium channel (BK) alpha-subunits generated from a single site of splicing.** *J Biol Chem* 2005, **280**(39):33599-33609.
216. Tian L, Hammond MS, Florance H, Antoni FA, Shipston MJ: **Alternative splicing determines sensitivity of murine calcium-activated potassium channels to glucocorticoids.** *J Physiol* 2001, **537**(Pt 1):57-68.
217. Zarei MM, Zhu N, Alioua A, Eghbali M, Stefani E, Toro L: **A novel MaxiK splice variant exhibits dominant-negative properties for surface expression.** *J Biol Chem* 2001, **276**(19):16232-16239.
218. Knaus HG, Eberhart A, Glossmann H, Munujos P, Kaczorowski GJ, Garcia ML: **Pharmacology and structure of high conductance calcium-activated potassium channels.** *Cell Signal* 1994, **6**(8):861-870.
219. Uebele VN, Lagrutta A, Wade T, Figueroa DJ, Liu Y, McKenna E, Austin CP, Bennett PB, Swanson R: **Cloning and functional expression of two families of beta-subunits of the large conductance calcium-activated K+ channel.** *J Biol Chem* 2000, **275**(30):23211-23218.
220. Xia XM, Ding JP, Lingle CJ: **Molecular basis for the inactivation of Ca2+- and voltage-dependent BK channels in adrenal chromaffin cells and rat insulinoma tumor cells.** *J Neurosci* 1999, **19**(13):5255-5264.
221. Xia XM, Ding JP, Zeng XH, Duan KL, Lingle CJ: **Rectification and rapid activation at low Ca2+ of Ca2+-activated, voltage-dependent BK currents: consequences of rapid inactivation by a novel beta subunit.** *J Neurosci* 2000, **20**(13):4890-4903.
222. Tanaka Y, Meera P, Song M, Knaus HG, Toro L: **Molecular constituents of maxi KCa channels in human coronary smooth muscle: predominant alpha + beta subunit complexes.** *J Physiol* 1997, **502** (Pt 3):545-557.

223. Brenner R, Perez GJ, Bonev AD, Eckman DM, Kosek JC, Wiler SW, Patterson AJ, Nelson MT, Aldrich RW: **Vasoregulation by the beta1 subunit of the calcium-activated potassium channel.** *Nature* 2000, **407**(6806):870-876.
224. Knaus HG, Schwarzer C, Koch RO, Eberhart A, Kaczorowski GJ, Glossmann H, Wunder F, Pongs O, Garcia ML, Sperk G: **Distribution of high-conductance Ca(2+)-activated K+ channels in rat brain: targeting to axons and nerve terminals.** *J Neurosci* 1996, **16**(3):955-963.
225. Nishimaru K, Eghbali M, Lu R, Marijic J, Stefani E, Toro L: **Functional and molecular evidence of MaxiK channel beta1 subunit decrease with coronary artery ageing in the rat.** *J Physiol* 2004, **559**(Pt 3):849-862.
226. Petkov GV, Bonev AD, Heppner TJ, Brenner R, Aldrich RW, Nelson MT: **Beta1-subunit of the Ca2+-activated K+ channel regulates contractile activity of mouse urinary bladder smooth muscle.** *J Physiol* 2001, **537**(Pt 2):443-452.
227. McManus OB: **Calcium-activated potassium channels: regulation by calcium.** *J Bioenerg Biomembr* 1991, **23**(4):537-560.
228. Horrigan FT, Cui J, Aldrich RW: **Allosteric voltage gating of potassium channels I. Mslo ionic currents in the absence of Ca(2+).** *J Gen Physiol* 1999, **114**(2):277-304.
229. Talukder G, Aldrich RW: **Complex voltage-dependent behavior of single unliganded calcium-sensitive potassium channels.** *Biophys J* 2000, **78**(2):761-772.
230. Perez GJ, Bonev AD, Patlak JB, Nelson MT: **Functional coupling of ryanodine receptors to KCa channels in smooth muscle cells from rat cerebral arteries.** *J Gen Physiol* 1999, **113**(2):229-238.
231. Jaggar JH, Stevenson AS, Nelson MT: **Voltage dependence of Ca2+ sparks in intact cerebral arteries.** *Am J Physiol* 1998, **274**(6 Pt 1):C1755-1761.
232. Nelson MT, Cheng H, Rubart M, Santana LF, Bonev AD, Knot HJ, Lederer WJ: **Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks.** *Science* 1995, **270**(5236):633-637.
233. Brown DA, Constanti A, Adams PR: **Ca-activated potassium current in vertebrate sympathetic neurons.** *Cell Calcium* 1983, **4**(5-6):407-420.
234. Mathers DA, Barker JL: **Spontaneous hyperpolarizations at the membrane of cultured mouse dorsal root ganglion cells.** *Brain Res* 1981, **211**(2):451-455.
235. Mathers DA, Barker JL: **Spontaneous voltage and current fluctuations in tissue cultured mouse dorsal root ganglion cells.** *Brain Res* 1984, **293**(1):35-47.
236. Benham CD, Bolton TB: **Spontaneous transient outward currents in single visceral and vascular smooth muscle cells of the rabbit.** *J Physiol* 1986, **381**:385-406.
237. Lohn M, Lauterbach B, Haller H, Pongs O, Luft FC, Gollasch M: **beta(1)-Subunit of BK channels regulates arterial wall[Ca(2+)] and diameter in mouse cerebral arteries.** *J Appl Physiol* 2001, **91**(3):1350-1354.
238. Pluger S, Faulhaber J, Furstenu M, Lohn M, Waldschutz R, Gollasch M, Haller H, Luft FC, Ehmke H, Pongs O: **Mice with disrupted BK channel beta1 subunit gene feature abnormal Ca(2+) spark/STOC coupling and elevated blood pressure.** *Circ Res* 2000, **87**(11):E53-60.
239. Fernandez-Fernandez JM, Tomas M, Vazquez E, Orio P, Latorre R, Senti M, Marrugat J, Valverde MA: **Gain-of-function mutation in the KCNMB1 potassium channel subunit is associated with low prevalence of diastolic hypertension.** *J Clin Invest* 2004, **113**(7):1032-1039.
240. Nelson MT, Bonev AD: **The beta1 subunit of the Ca2+-sensitive K+ channel protects against hypertension.** *J Clin Invest* 2004, **113**(7):955-957.

241. Kume H, Takai A, Tokuno H, Tomita T: **Regulation of Ca²⁺-dependent K⁺-channel activity in tracheal myocytes by phosphorylation.** *Nature* 1989, **341**(6238):152-154.
242. Schubert R, Nelson MT: **Protein kinases: tuners of the BKCa channel in smooth muscle.** *Trends Pharmacol Sci* 2001, **22**(10):505-512.
243. Wang J, Zhou Y, Wen H, Levitan IB: **Simultaneous binding of two protein kinases to a calcium-dependent potassium channel.** *J Neurosci* 1999, **19**(10):RC4.
244. Lu R, Alioua A, Kumar Y, Eghbali M, Stefani E, Toro L: **MaxiK channel partners: physiological impact.** *J Physiol* 2006, **570**(Pt 1):65-72.
245. Matsushita M, Tanaka Y, Koike K: **Studies on the mechanisms underlying beta-adrenoceptor-mediated relaxation of rat abdominal aorta.** *J Smooth Muscle Res* 2006, **42**(6):217-225.
246. Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA: **Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle.** *Nature* 1994, **368**(6474):850-853.
247. Fukao M, Mason HS, Britton FC, Kenyon JL, Horowitz B, Keef KD: **Cyclic GMP-dependent protein kinase activates cloned BKCa channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072.** *J Biol Chem* 1999, **274**(16):10927-10935.
248. Alioua A, Huggins JP, Rousseau E: **PKG-I alpha phosphorylates the alpha-subunit and upregulates reconstituted GKCa channels from tracheal smooth muscle.** *Am J Physiol* 1995, **268**(6 Pt 1):L1057-1063.
249. Minami K, Fukuzawa K, Nakaya Y, Zeng XR, Inoue I: **Mechanism of activation of the Ca(2+)-activated K⁺ channel by cyclic AMP in cultured porcine coronary artery smooth muscle cells.** *Life Sci* 1993, **53**(14):1129-1135.
250. Perez G, Toro L: **Differential modulation of large-conductance KCa channels by PKA in pregnant and nonpregnant myometrium.** *Am J Physiol* 1994, **266**(5 Pt 1):C1459-1463.
251. Robertson BE, Schubert R, Hescheler J, Nelson MT: **cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth muscle cells.** *Am J Physiol* 1993, **265**(1 Pt 1):C299-303.
252. Wellman GC, Santana LF, Bonev AD, Nelson MT: **Role of phospholamban in the modulation of arterial Ca(2+) sparks and Ca(2+)-activated K(+) channels by cAMP.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2001, **281**(3):C1029-1037.
253. Barman SA, Zhu S, White RE: **Protein kinase C inhibits BKCa channel activity in pulmonary arterial smooth muscle.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004, **286**(1):L149-155.
254. Minami K, Fukuzawa K, Nakaya Y: **Protein kinase C inhibits the Ca(2+)-activated K⁺ channel of cultured porcine coronary artery smooth muscle cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 1993, **190**(1):263-269.
255. Schubert R, Noack T, Serebryakov VN: **Protein kinase C reduces the KCa current of rat tail artery smooth muscle cells.** *Am J Physiol* 1999, **276**(3 Pt 1):C648-658.
256. Taguchi K, Kaneko K, Kubo T: **Protein kinase C modulates Ca²⁺-activated K⁺ channels in cultured rat mesenteric artery smooth muscle cells.** *Biol Pharm Bull* 2000, **23**(12):1450-1454.
257. Zhou Y, Dong Q, Louahed J, Dragwa C, Savio D, Huang M, Weiss C, Tomer Y, McLane MP, Nicolaides NC *et al*: **Characterization of a calcium-activated chloride channel as a shared target of Th2 cytokine pathways and its potential involvement in asthma.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001, **25**(4):486-491.

258. Ling S, Woronuk G, Sy L, Lev S, Braun AP: **Enhanced activity of a large conductance, calcium-sensitive K⁺ channel in the presence of Src tyrosine kinase.** *J Biol Chem* 2000, **275**(39):30683-30689.
259. Feletou M, Vanhoutte PM: **Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now?** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006, **26**(6):1215-1225.
260. Li G, Cheung DW: **Effects of paxilline on K⁺ channels in rat mesenteric arterial cells.** *Eur J Pharmacol* 1999, **372**(1):103-107.
261. Galvez A, Gimenez-Gallego G, Reuben JP, Roy-Contancin L, Feigenbaum P, Kaczorowski GJ, Garcia ML: **Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus*.** *J Biol Chem* 1990, **265**(19):11083-11090.
262. Gribkoff VK, Starrett JE, Jr., Dworetzky SI: **The pharmacology and molecular biology of large-conductance calcium-activated (BK) potassium channels.** *Adv Pharmacol* 1997, **37**:319-348.
263. Gribkoff VK, Lum-Ragan JT, Boissard CG, Post-Munson DJ, Meanwell NA, Starrett JE, Jr., Kozlowski ES, Romine JL, Trojnacki JT, McKay MC *et al*: **Effects of channel modulators on cloned large-conductance calcium-activated potassium channels.** *Mol Pharmacol* 1996, **50**(1):206-217.
264. Olesen SP, Munch E, Moldt P, Drejer J: **Selective activation of Ca(2⁺)-dependent K⁺ channels by novel benzimidazolone.** *Eur J Pharmacol* 1994, **251**(1):53-59.
265. Holland M, Langton PD, Standen NB, Boyle JP: **Effects of the BKCa channel activator, NS1619, on rat cerebral artery smooth muscle.** *Br J Pharmacol* 1996, **117**(1):119-129.
266. Dick GM, Sanders KM: **(Xeno)estrogen sensitivity of smooth muscle BK channels conferred by the regulatory beta1 subunit: a study of beta1 knockout mice.** *J Biol Chem* 2001, **276**(48):44835-44840.
267. Korovkina VP, Brainard AM, Ismail P, Schmidt TJ, England SK: **Estradiol binding to maxi-K channels induces their down-regulation via proteasomal degradation.** *J Biol Chem* 2004, **279**(2):1217-1223.
268. Valverde MA, Rojas P, Amigo J, Cosmelli D, Orio P, Bahamonde MI, Mann GE, Vergara C, Latorre R: **Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the beta subunit.** *Science* 1999, **285**(5435):1929-1931.
269. Tang XD, Garcia ML, Heinemann SH, Hoshi T: **Reactive oxygen species impair Slo1 BK channel function by altering cysteine-mediated calcium sensing.** *Nat Struct Mol Biol* 2004, **11**(2):171-178.
270. Tang XD, Xu R, Reynolds MF, Garcia ML, Heinemann SH, Hoshi T: **Haem can bind to and inhibit mammalian calcium-dependent Slo1 BK channels.** *Nature* 2003, **425**(6957):531-535.
271. Dopico AM: **Ethanol sensitivity of BK(Ca) channels from arterial smooth muscle does not require the presence of the beta 1-subunit.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2003, **284**(6):C1468-1480.
272. Liu P, Xi Q, Ahmed A, Jaggar JH, Dopico AM: **Essential role for smooth muscle BK channels in alcohol-induced cerebrovascular constriction.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**(52):18217-18222.
273. Walters FS, Covarrubias M, Ellingson JS: **Potent inhibition of the aortic smooth muscle maxi-K channel by clinical doses of ethanol.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2000, **279**(4):C1107-1115.

274. Young RC, Schumann R, Zhang P: **Intracellular calcium gradients in cultured human uterine smooth muscle: a functionally important subplasmalemmal space.** *Cell Calcium* 2001, **29**(3):183-189.
275. Nelson MT, Brayden JE: **Regulation of arterial tone by calcium-dependent K⁺ channels and ATP-sensitive K⁺ channels.** *Cardiovasc Drugs Ther* 1993, **7 Suppl 3**:605-610.
276. Nelson MT, Patlak JB, Worley JF, Standen NB: **Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone.** *Am J Physiol* 1990, **259**(1 Pt 1):C3-18.
277. Brayden JE, Nelson MT: **Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels.** *Science* 1992, **256**(5056):532-535.
278. Knot HJ, Nelson MT: **Regulation of arterial diameter and wall [Ca²⁺] in cerebral arteries of rat by membrane potential and intravascular pressure.** *J Physiol* 1998, **508 (Pt 1)**:199-209.
279. Marrelli SP, Eckmann MS, Hunte MS: **Role of endothelial intermediate conductance K_{Ca} channels in cerebral EDHF-mediated dilations.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003, **285**(4):H1590-1599.
280. Amberg GC, Santana LF: **Downregulation of the BK channel beta1 subunit in genetic hypertension.** *Circ Res* 2003, **93**(10):965-971.
281. Sausbier M, Arntz C, Bucurenciu I, Zhao H, Zhou XB, Sausbier U, Feil S, Kamm S, Essin K, Sailer CA *et al*: **Elevated blood pressure linked to primary hyperaldosteronism and impaired vasodilation in BK channel-deficient mice.** *Circulation* 2005, **112**(1):60-68.
282. Sausbier M, Hu H, Arntz C, Feil S, Kamm S, Adelsberger H, Sausbier U, Sailer CA, Feil R, Hofmann F *et al*: **Cerebellar ataxia and Purkinje cell dysfunction caused by Ca²⁺-activated K⁺ channel deficiency.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**(25):9474-9478.
283. Meredith AL, Thorneloe KS, Werner ME, Nelson MT, Aldrich RW: **Overactive bladder and incontinence in the absence of the BK large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel.** *J Biol Chem* 2004, **279**(35):36746-36752.
284. Werner ME, Zvara P, Meredith AL, Aldrich RW, Nelson MT: **Erectile dysfunction in mice lacking the large-conductance calcium-activated potassium (BK) channel.** *J Physiol* 2005, **567**(Pt 2):545-556.
285. Yakubovich N, Eldstrom JR, Mathers DA: **Lipopolysaccharide can activate BK channels of arterial smooth muscle in the absence of iNOS expression.** *Biochim Biophys Acta* 2001, **1514**(2):239-252.
286. da Silva-Santos JE, Terluk MR, Assreuy J: **Differential involvement of guanylate cyclase and potassium channels in nitric oxide-induced hyporesponsiveness to phenylephrine in endotoxemic rats.** *Shock* 2002, **17**(1):70-76.
287. Cauwels A, Brouckaert P: **Critical role for small and large conductance calcium-dependent potassium channels in endotoxemia and TNF toxicity.** *Shock* 2008, **29**(5):577-582.
288. Pickkers P, Dorresteijn MJ, Bouw MP, van der Hoeven JG, Smits P: **In vivo evidence for nitric oxide-mediated calcium-activated potassium-channel activation during human endotoxemia.** *Circulation* 2006, **114**(5):414-421.
289. Clayton NP, LeDuc BW, Kelly LJ: **Effect of potassium channel and cytochrome P450 inhibition on transient hypotension and survival during lipopolysaccharide-induced endotoxic shock in the rat.** *Pharmacology* 2005, **73**(3):113-120.

290. Ghatta S, Nimmagadda D, Xu X, O'Rourke ST: **Large-conductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications.** *Pharmacol Ther* 2006, **110**(1):103-116.
291. Papavlassopoulos M, Stamme C, Thon L, Adam D, Hillemann D, Seydel U, Schromm AB: **MaxiK blockade selectively inhibits the lipopolysaccharide-induced I kappa B-alpha /NF-kappa B signaling pathway in macrophages.** *J Immunol* 2006, **177**(6):4086-4093.
292. Scheel O, Papavlassopoulos M, Blunck R, Gebert A, Hartung T, Zahringer U, Seydel U, Schromm AB: **Cell activation by ligands of the toll-like receptor and interleukin-1 receptor family depends on the function of the large-conductance potassium channel MaxiK in human macrophages.** *Infect Immun* 2006, **74**(7):4354-4356.
293. Essin K, Gollasch M, Rolle S, Weissgerber P, Sausbier M, Bohn E, Autenrieth IB, Ruth P, Luft FC, Nauseef WM *et al*: **BK channels in innate immune functions of neutrophils and macrophages.** *Blood* 2009, **113**(6):1326-1331.
294. Zhao G, Zhao Y, Pan B, Liu J, Huang X, Zhang X, Cao C, Hou N, Wu C, Zhao KS *et al*: **Hypersensitivity of BKCa to Ca²⁺ sparks underlies hyporeactivity of arterial smooth muscle in shock.** *Circ Res* 2007, **101**(5):493-502.
295. Zhou R, Liu LM, Hu DY: **Effect of nitric oxide-induced tyrosine phosphorylation of calcium-activated potassium channel alpha subunit on vascular hyporesponsiveness in rats.** *Chin J Traumatol* 2005, **8**(4):209-215.
296. O'Brien AJ, Terala D, Orié NN, Davies NA, Zolfaghari P, Singer M, Clapp LH: **BK large conductance Ca(2)+-activated K+ channel-deficient mice are not resistant to hypotension and display reduced survival benefit following polymicrobial sepsis.** *Shock* 2011, **35**(5):485-491.
297. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ: **Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches.** *Pflugers Arch* 1981, **391**(2):85-100.
298. McPherson GA, Angus JA: **Characterization of responses to cromakalim and pinacidil in smooth and cardiac muscle by use of selective antagonists.** *Br J Pharmacol* 1990, **100**(2):201-206.
299. Ashcroft FM, Kakei M, Kelly RP: **Rubidium and sodium permeability of the ATP-sensitive K+ channel in single rat pancreatic beta-cells.** *J Physiol* 1989, **408**:413-429.
300. Spruce AE, Standen NB, Stanfield PR: **Studies of the unitary properties of adenosine-5'-triphosphate-regulated potassium channels of frog skeletal muscle.** *J Physiol* 1987, **382**:213-236.
301. Standen NB, Stanfield PR: **Rubidium block and rubidium permeability of the inward rectifier of frog skeletal muscle fibres.** *J Physiol* 1980, **304**:415-435.
302. McHugh D, Beech DJ: **Inhibition of delayed rectifier K(+)-current by levcromakalim in single intestinal smooth muscle cells: effects of cations and dependence on K(+)-flux.** *Br J Pharmacol* 1995, **114**(2):391-399.
303. Henrion D: **Moyen d'étude des artères de résistance** *Livre Biologie et pathologie du coeur et des vaisseaux* 2002, **37**(0):419-426.
304. Loutzenhiser RD, Parker MJ: **Hypoxia inhibits myogenic reactivity of renal afferent arterioles by activating ATP-sensitive K+ channels.** *Circ Res* 1994, **74**(5):861-869.
305. Akai K, Wang Y, Sato K, Sekiguchi N, Sugimura A, Kumagai T, Komaru T, Kanatsuka H, Shirato K: **Vasodilatory effect of nicorandil on coronary arterial**

- microvessels: its dependency on vessel size and the involvement of the ATP-sensitive potassium channels.** *J Cardiovasc Pharmacol* 1995, **26**(4):541-547.
306. Komaru T, Lamping KG, Eastham CL, Dellsperger KC: **Role of ATP-sensitive potassium channels in coronary microvascular autoregulatory responses.** *Circ Res* 1991, **69**(4):1146-1151.
307. Taguchi H, Heistad DD, Kitazono T, Faraci FM: **ATP-sensitive K⁺ channels mediate dilatation of cerebral arterioles during hypoxia.** *Circ Res* 1994, **74**(5):1005-1008.
308. Wellman GC, Barrett-Jolley R, Koppel H, Everitt D, Quayle JM: **Inhibition of vascular K(ATP) channels by U-37883A: a comparison with cardiac and skeletal muscle.** *Br J Pharmacol* 1999, **128**(4):909-916.
309. Taguchi H, Heistad DD, Chu Y, Rios CD, Ooboshi H, Faraci FM: **Vascular expression of inducible nitric oxide synthase is associated with activation of Ca(++)-dependent K⁺ channels.** *J Pharmacol Exp Ther* 1996, **279**(3):1514-1519.
310. Crane A, Aguilar-Bryan L: **Assembly, maturation, and turnover of K(ATP) channel subunits.** *J Biol Chem* 2004, **279**(10):9080-9090.
311. Levy B, Collin S, Sennoun N, Ducrocq N, Kimmoun A, Asfar P, Perez P, Meziani F: **Vascular hyporesponsiveness to vasopressors in septic shock: from bench to bedside.** *Intensive Care Med* 2010, **36**(12):2019-2029.
312. Hierholzer C, Harbrecht B, Menezes JM, Kane J, MacMicking J, Nathan CF, Peitzman AB, Billiar TR, Tweardy DJ: **Essential role of induced nitric oxide in the initiation of the inflammatory response after hemorrhagic shock.** *J Exp Med* 1998, **187**(6):917-928.
313. Bogdan C: **Nitric oxide and the regulation of gene expression.** *Trends Cell Biol* 2001, **11**(2):66-75.
314. Park SH, Ramachandran S, Kwon SH, Cha SD, Seo EW, Bae I, Cho C, Song DK: **Upregulation of ATP-sensitive potassium channels for estrogen-mediated cell proliferation in human uterine leiomyoma cells.** *Gynecol Endocrinol* 2008, **24**(5):250-256.
315. Philip-Couderc P, Tavares NI, Roatti A, Lerch R, Montessuit C, Baertschi AJ: **Forkhead transcription factors coordinate expression of myocardial KATP channel subunits and energy metabolism.** *Circ Res* 2008, **102**(2):e20-35.
316. Wiggers C: **Experimental hemorrhagic shock, Physiology of shock.** *New York: Commonwealth Fund* 1950:121-146.
317. Martin E: **Mise au point et caractérisation d'un modèle d'ischémie reperfusion par choc hémorragique chez le rat.** *Master recherche.* Nancy: Université Henri Poincaré; 2008.
318. Yamamoto N, Unno N, Mitsuoka H, Uchiyama T, Saito T, Konno H: **Peritoneal lavage with oxygenated perfluorochemical improves hemodynamics, intestinal injury, and survival in a rat model of severe hemorrhagic shock and resuscitation.** *Shock* 2005, **24**(2):171-176.
319. Chu KS, Wang JJ, Hu OY, Ho ST, Chen YW: **The antinociceptive effect of nalbuphine and its long-acting esters in rats.** *Anesth Analg* 2003, **97**(3):806-809.