



**HAL**  
open science

# Dysfonction cardiovasculaire au cours du choc septique : Amélioration des stratégies thérapeutiques

Nacira Sennoun

► **To cite this version:**

Nacira Sennoun. Dysfonction cardiovasculaire au cours du choc septique : Amélioration des stratégies thérapeutiques. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2008. Français. NNT : 2008NAN10056 . tel-01748418

**HAL Id: tel-01748418**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748418v1>**

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](mailto: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.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

École Doctorale : Biologie, Santé, Environnement

N° attribué par la bibliothèque :

**THÈSE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY1**

**Discipline : Ingénierie Cellulaire et Tissulaire**

Présentée et soutenue publiquement

par

**Nacira SENNOUN**

Le 22 octobre 2008

*Titre :*

**Dysfonction cardiovasculaire au cours du choc septique.  
Amélioration des stratégies thérapeutiques**

Directeur de thèse :  
Professeur Bruno LEVY

**JURY**

Professeur Bruno LEVY

Professeur Fabienne TAMION

Professeur Jean-Louis TEBOUL

Professeur Thomas LECOMPTE

Professeur Pierre-Edouard BOLLAERT

Docteur Ferhat MEZIANI

Docteur Daniel HENRION

Directeur de thèse

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Examineur

## REMERCIEMENTS

Alors que la rédaction de ce manuscrit s'achève, j'adresse ma profonde reconnaissance à tous ceux ou celles qui ont permis de concrétiser ce travail.

Je remercie très chaleureusement le Professeur Bruno Levy, Directeur du Laboratoire Groupe Choc Contrat Avenir INSERM, pour m'avoir initiée à la recherche cardiovasculaire et pour avoir dirigé ma thèse. Pour m'avoir soutenue et encouragée au cours de toutes ces années de thèse, pour la confiance qu'il m'a accordée tout au long de ce travail, pour ses précieux conseils, son esprit de synthèse et sa gentillesse, je tiens à lui exprimer ma plus profonde gratitude et le remercier infiniment pour avoir pris de son temps si précieux pour la correction de ce mémoire.

Mes remerciements s'adressent également :

Au Professeur Jean-Louis Teboul, HDR Réanimation Médicale, Hôpital de Paris et au Docteur Fabienne Tamion, HDR INSERM U644, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de mon mémoire, ainsi qu'au Professeur Pierre-Edouard BOLLAERT, HDR Réanimation Médicale, Hôpital de Nancy, qui a accepté de faire partie du jury de cette thèse.

Au Docteur Patrick Lacolley, directeur de recherche INSERM U684, pour m'avoir permis d'accéder à ses installations, pour ses remarques et conseils au cours des diverses présentations, ainsi que pour son soutien financier.

A l'ensemble du laboratoire INSERM U684 et plus particulièrement Valérie Cattan, pour sa contribution dans mes travaux effectués dans l'unité et pour le temps qu'elle m'a consacrée pour m'initier aux techniques biochimiques.

Au Professeur Thomas Lecompte, directeur de recherche INSERM U734, pour avoir accepté la collaboration avec notre laboratoire, et la réalisation des expériences de notre projet de recherche au sein de son laboratoire. Et merci aussi d'avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse.

A Véronique Regnault et Jean-Pierre Max, INSERM U 734, pour leur gentillesse et leur contribution dans mes travaux de recherche.

Un grand merci à tous mes collègues et amis du Laboratoire Groupe Choc :

Je tiens à remercier plus particulièrement Chantal Montemont, technicienne du laboratoire, pour m'avoir initiée aux expériences hémodynamiques, pour son amitié, sa sympathie et pour toutes ces années passées ensemble. Je remercie également Eliane Vauthier, technicienne du laboratoire, pour sa gentillesse et ses précieux conseils. Je n'oublie pas Youssef pour son aide et son soutien, ainsi que

Marc, Solène, Anne-Gaëlle, Olivier, Sébastien et Damien pour leur gentillesse.

Un grand merci à toute l'équipe d'Angers.

Je remercie en premier lieu le Docteur Daniel Henrion, directeur de recherche UMR CNRS-INSERM 6214-771, Faculté de Médecine d'Angers, pour m'avoir soutenue dans la finalisation du travail sur la protéine C activée, et pour m'avoir aidée dans l'installation des systèmes de mesure de vasoréactivité *in vitro* dans notre laboratoire. Je le remercie aussi pour sa participation en tant que membre de ce jury.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements au Docteur Ferhat Meziani, HDR Réanimation Médicale, Hôpital d'Angers, pour avoir accepté de m'encadrer au cours de mon séjour au laboratoire d'Angers, pour la confiance qu'il m'a accordée, pour avoir dirigé et suivi mes travaux réalisés dans l'unité, pour m'avoir soutenue dans la rédaction de l'article et de la thèse, et enfin pour avoir accepté de juger l'ensemble de mes travaux.

Je remercie sincèrement les Docteurs Ramarason Andriantsitohaina et Carmen Martinez, directeurs de recherche, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser certaines de mes expériences dans leur laboratoire, et de participer à la vie de leur laboratoire.

Je remercie aussi tous mes amis du laboratoire d'Angers et particulièrement, Martina pour tous les bons moments passés ensemble, pour ses encouragements et son agréable compagnie. Céline, pour m'avoir initiée aux techniques de mesure de vasoréactivité *in vitro* et au western blot, pour sa contribution et son investissement dans l'étude réalisée dans le laboratoire, pour son aide précieuse lors de la rédaction de ce manuscrit et surtout pour sa disponibilité et sa compréhension. Odile, que j'ai connue alors doctorante, pour ses bons conseils, ses encouragements et son aide sur le plan personnel.

A tous mes amis, Nathalia, Adriana, Adda, Rose et Ionel, vous êtes bien plus que de simples collègues pour moi. Je vous remercie pour votre aide précieuse, votre complicité et votre soutien. Je remercie plus particulièrement Tanegmart pour son soutien sur le plan personnel et professionnel et surtout pour son aide au cours de la rédaction de ce manuscrit.

**A toutes mes sœurs et mon frère**, j'ai beaucoup de chance de vous avoir, je vous remercie pour tous les sacrifices que vous avez faits pour moi. Vous avez toujours cru en moi, vous m'avez soutenue dans les moments difficiles, et vous m'avez appris à être patiente et persévérante. Le résultat est là. Ce n'est pas fini vous allez avoir encore du travail.

A tous ceux qui me sont chers et que je n'aie pas cité, vous vous reconnaîtrez.

Je remercie aussi la Région de Nancy pour son soutien financier au cours de ces années de thèse.

*A mes parents pour ces longues années de soutien inconditionnel, pour leur confiance permanente et l'acceptation de mes choix parfois ambitieux. Ils m'ont offert la possibilité de réaliser mon rêve. Ils ont toujours témoigné de la plus grande des patiences et de la plus grande des compréhensions. Malgré toutes les difficultés rencontrées au cours de ces longues années d'études, ils m'ont toujours facilité ce parcours, au prix de nombreux efforts. Il me sera impossible de leur rendre tout ce qu'ils m'ont offert. Rien n'aurait été possible sans eux, cette réussite est donc un peu la mienne, mais surtout la leur.  
Aucun remerciement ne serait suffisant.*

# TABLE DES MATIERES

<b>Liste des abréviations</b>	8
<b>Liste des figures</b>	10
<b>Introduction</b>	11
<b>I. Le choc septique</b>	13
<b>II. Physiopathologie du choc septique</b>	14
1. Mode d'action de l'endotoxine	14
2. Réponse inflammatoire systémique	15
2.1 TLR-4 récepteur au LPS	15
- Voie de signalisation NF- $\kappa$ B	17
• Cytokines proinflammatoires	17
• Les cyclooxygénases	18
• Radicaux libres oxygénés	19
• Le monoxyde d'azote	20
3. Réponse spécifique de la paroi vasculaire au LPS	21
4. Réponse spécifique des cellules myocardiques au LPS	22
<b>III. Défaillance cardiovasculaire au cours du choc septique</b>	24
1. Défaillance vasculaire	24
1.1 Dysfonction endothéliale	24
1. 1. 1 Inflammation, coagulation, et sepsis	24
1. 1. 2 Perméabilité vasculaire	26
1.2 Atteinte du tonus vasculaire	26
1. 2.1 Défaillance de la relaxation dépendante de l'endothélium	27
1. 2. 2 Implication des canaux potassiques	28

1. 2. 3 Déficit en vasopressine	28
1. 2. 4 Insuffisance cortisonique	28
1. 2. 5 Dysautonomie	29
1. 2. 6 Atteinte du signal catécholergique	29
1.3 Trouble de l'oxygénation tissulaire	30
<b>2. Défaillance myocardique</b>	<b>31</b>
2. 1 Anomalies structurales et ischémie	32
2. 2 Anomalies de la transduction du signal bêta-adrénergique	33
2. 3 Anomalies fonctionnelles	34
2. 4 Hémostasie calcique et couplage excitation–contraction	34
2. 5 Atteinte de la fonction systolique et diastolique	35
<b>3. Atteinte de la fonction hémodynamique cardiovasculaire</b>	<b>35</b>
<b>4. Altérations métaboliques et dysfonction d'organes</b>	<b>37</b>
<b>IV. Traitements utilisés dans le cas du choc septique</b>	<b>37</b>
1. Traitement hémodynamique de la défaillance cardiovasculaire	38
1.1 Expansion volémique	38
1. 1. 1 Principe d'évaluation de l'apport liquidien	40
1.2 Correction de l'hypotension par administration des catécholamines	40
1. 2. 1 Définition des catécholamines	40
1. 2. 2 Pharmacologie des principales catécholamines	41
1. 2. 3 Mode d'action des catécholamines	42
1. 2. 4 Les récepteurs adrénergiques	42
1. 2. 5 Effets cardiovasculaires des catécholamines	43
1. 2. 6 Effets hémodynamiques des catécholamines dans le choc septique	46
2. Traitement par la Protéine C activée	47
2. 1. Pharmacologie de la PC	47



2. 2. Système de la protéine C activée dans le sepsis	48
2. 3. Protéine C recombinante humaine activée (PCRhA) comme traitement dans le sepsis	49
2. 3. 1 Effet cytoprotecteur du système de la protéine C	49
2. 3. 2 Effet anti-inflammatoire	50
2. 3. 3 Activité antiapoptotique	51
2. 3. 4 Protection de la barrière endothéliale	51
2. 3. 5 Autres effets cellulaires	51
2. 3. 6 Effet sur la dysfonction cardiovasculaire du choc septique	52
2. 4. Activité anticoagulante/activité cytoprotectrice de la Protéine C activée	53
<b>V. Objectifs de la thèse</b>	<b>55</b>
<b>VI. Résultats des travaux (sous forme d'articles):</b>	
<b><u>Etude 1:</u></b>	
Article 1 : Résumé de l'article	56
<b><u>Etude 2:</u></b>	
Article 2 : Résumé de l'article	62
<b><u>Etude 3:</u></b>	
Article 3 : Résumé de l'article	70
<b>VII. Conclusion générale et perspectives</b>	<b>75</b>
<b>VIII. Références bibliographiques</b>	<b>77</b>
<b>IX. Annexes</b>	
Annexe 1 : Principes des techniques des mesures hémodynamiques <i>in vivo</i> .	87
Annexe 2 : Principes des techniques de mesures biochimiques	89
Annexe 3 : Rappel sur la réactivité vasculaire en <i>in vitro</i> et les techniques d'étude	91
Annexe 4 : Publications originales et publications non développées dans la thèse	102

## LISTE DES ABREVIATIONS

ACCP : American College of Chest Physicians	FC : Fréquence Cardiaque
ACH : Acétylcholine	FT : Facteur Tissulaire
ACTH : A dreno Cortico Tropic Hormone	GMPC : Guanosine 3'-5' Monophosphate Cyclique
ADN : Acide DésoxyriboNucléique	JNK : c-Jun N-terminal Kinase
ADRESS : Administration of Drotrecogin Alfa (Activated) in Early Stage Severe Sepsis	HSS : axe Hypothalamo hypophysosrenalien
AGE : Advanced Glycation End products	HTA : Hypertension Arterielle
AMPc : Adénosine 3'-5' Monophosphate Cyclique	HUVECs : Cellules Endothéliales Humaines de Veines de Cordon Ombilical
AOPP : Advanced oxidation protein products	ICAM : Inter Cellular Adhesion Molecule
AP-1: Activator Protein 1	IFN $\gamma$ : Interféron Gamma
ARNm : Acide Ribo Nucléique Messenger	IkBa : Inhibitor kappa B
ATP : Adénosine Tri Phosphate	IL 1 : Interleukine-1
Bark : B Adreno Receptor Kinase	IL 6 : Interleukine-6
BAX : Bcl2 associated x protein	IL 8 : Interleukine-8
Bcl 2 : B cell lymphoma 2	Indo : Indométhacine
Ca <sup>2+</sup> : Calcium	iNOS : NO Synthase Inductible
CD14 : Cluster of Differentiation 14	k-ATP : Canal Potassique sensible à l'ATP
CIVD : Coagulation Intra Vasculaire Dissiminée	KO : Knock Out
CMH : Complexes Majeur d'Histocompatibilité	LBP : LPS Binding Protein
CML : Cellule Musculaire Lisse	LDL : Low Density Lipoproteins
cNOS : No Synthase Constitutive	LIF : Leukeinici Inhibitory Factor
COMT : Catéchol-O-Méthyl Transférase	L-NAME : N <sup>G</sup> -nitro-L- Arginine methyl ester
COX : Cyclo Oxygénase	LOX : Lipo-Oxygénases
CpG : Cytosine-Phosphate-Guanine	LPO : Péroxydation Lipidique
CREB : cAMP response element-binding	LPS : Lipo Poly Saccharide
DA : Débit aortique	LT : Leucotriéne
DLF : Dilatation flux dépendante	MAO : Mono-Amine Oxydase
DM : Débit Désentérique	MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase
E : Endothelium	MBF : Mean Blood Flow
EDH : Endothelium Dependent Hyperpolarisation	MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein-1
EGF : Epidermal Growth Factor	M-CSF : Mononuclear phagocyte Colony-Stimulating Factor
EMEA : European Medicines Agency	MMP2 : MetalloProteinase 2
eNOS : NO-Synthase Endothéliale	mNOS : NO Synthase mitochondriale
EPCR : Endothelial Cell Protein C Receptor	NA : Noradrenaline
ERK : Extracellular Signal Regulated Kinase	Na <sup>+2</sup> : Sodium
F1 : Factor 1	

NaCl : Chlorure de Sodium  
 NE : Norépinephrine  
 NF-κB : Facteur Nucléaire kappa B  
 NO : Monoxyde d'azote  
 NOO<sup>-</sup> : Peroxynitrite  
 nNOS : NO synthase neuronal  
 t-PA : Activateur Tissulaire du Plasminogène  
 TM : ThromboModuline  
 TAT : Thrombine-Antithrombine  
 S1P : Sphingosine 1 Phosphate  
 PAD : Pression Artérielle Diastolique  
 PAF : Platelet Activating Factor  
 PAM : Pression Artérielle Moyenne  
 PAMP : Pathogen Associated Molecular Patterns  
 PAR-1 : Protease Activated Receptor 1  
 PAS : Pression Artérielle Systolique  
 PCa : Protéine C Activée  
 PCArh : Protéine C Activée Recombinante Humaine  
 PE : Phosphatidyl Ethanolamine  
 PG : Prostaglandines  
 PGE<sub>2</sub> : Prostaglandines E 2  
 PGF<sub>2</sub> : Prostaglandines F2  
 PGI<sub>2</sub> : Prostacycline  
 PKA : Protéines Kinase A  
 PLA2 : Phospholipase A<sub>2</sub>  
 PNN : PolyNucléaires Neutrophiles  
 PO<sub>2</sub> : Pression en oxygène  
 PP : Pression Artérielle Pulsée  
 PRR : Pathogen Recognition Receptors  
 PROWESS : Recombinant human PROtein C Worldwide  
 Evaluation in Severe Sepsis study group  
 P38 : Protein 38  
 RLO : Radicaux Libres Oxygénés  
 RNS : Espèces Réactives Nitrogène  
 ROS : Espèces Réactives de l'Oxygène  
 SCCM : Société de Critical Care Medicine  
 SIRS : Syndrome Inflammatoire de Réponse Systémique  
 SPHK-1 : Sphingosine Kinase-1  
 STAT : Signal transduction and Activator of Transcription  
 TFPI : Tissue Factor Pathway Inhibitor  
 TLR : Toll Like Receptor  
 TNFα : Tumour Necrosis Factor α  
 TX : Thromboxane  
 VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor  
 NOS : NO synthase  
 VG : Ventricule Gauche  
 O<sup>-2</sup> : Anion superoxyde  
 ONOO<sup>-</sup> : Peroxynitrite

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1 :</b> Paroi d'une bactérie à Gram négatif	14
<b>Figure 2 :</b> Voie de signalisation cellulaire résultant de la stimulation des récepteurs Toll Like-4	17
<b>Figure 3 :</b> Biosynthèse des prostaglandines et des thromboxanes	18
<b>Figure 4 :</b> NO et contrôle de l'homéostasie vasculaire	21
<b>Figure 5 :</b> Stimulation de la voie de signalisation NF-kB au cours du sepsis	23
<b>Figure 6 :</b> Interaction entre inflammation, coagulation, fibrinolyse et activité anticoagulante.	26
<b>Figure 7 :</b> Défaillance de la relaxation endothélium dépendante	27
<b>Figure 8 :</b> Mécanismes impliqués dans la physiopathologie du choc septique	31
<b>Figure 9 :</b> Mécanisme de la dysfonction myocardique au cours du choc septique.	32
<b>Figure 10 :</b> Atteinte de la voie de signalisation $\beta$ -adrénergique au cours du choc septique	33
<b>Figure 11 :</b> Impact du remplissage vasculaire sur les changements cardiovasculaires associés au choc septique	39
<b>Figure 12 :</b> Biosynthèse de catécholamines endogènes	41
<b>Figure 13 :</b> Activation de la PCa (A) et activité anticoagulante (B)	48
<b>Figure 14 :</b> Structure de la PCa	48
<b>Figure 15 :</b> Activité cytoprotectrice de la PCa	50
<b>Figure 16 :</b> Activité anticoagulante / Activité cytoprotectrice de la PCa	53
<b>Figure 17 :</b> Contrôle du tonus myogénique par la pression et le débit	95
<b>Figure 18 :</b> Représentation schématique d'un myographe	96
<b>Figure 19 :</b> Représentation schématique d'un artériographe	97

**INTRODUCTION  
BIBLIOGRAPHIQUE**

# Introduction

Le choc septique est une insuffisance circulatoire en réponse à une infection, conséquence à la fois de la libération de toxines microbiennes et de la relation hôte-pathogène. Au niveau cellulaire, la physiopathologie reste complexe avec l'activation de différents systèmes dont l'altération du métabolisme, la production d'espèces radicalaires et l'altération de l'homéostasie cellulaire. La défaillance cardio-circulatoire que l'on observe associe une hypovolémie absolue, altérant les conditions de charge ventriculaire, une atteinte myocardique précoce et une vasodilatation périphérique avec une maldistribution des débits sanguins régionaux entraînant une diminution de la perfusion tissulaire et une altération de la micro-circulation. Tout ceci perturbe l'adéquation entre demande et apports locaux d'oxygène. Malgré l'amélioration de nos connaissances sur la physiopathologie du sepsis, ces états infectieux graves représentent aujourd'hui encore une source importante de morbidité et de mortalité dans les unités de soins intensifs.

Dans ce travail de recherche, nous rappelons la complexité de la physiopathologie du choc septique, et nous abordons les différents traitements symptomatiques de la dysfonction cardiovasculaire. Jusqu'à présent, aucun agent et aucune stratégie de traitement n'ont permis d'observer une efficacité suffisante pour qu'ils soient employés de façon systématique dans le traitement d'un sepsis. Le traitement symptomatique de la défaillance cardiocirculatoire repose principalement sur le remplissage vasculaire (correction de l'hypovolémie) et l'utilisation de catécholamines (correction de l'hypotension persistante). L'échec de ces deux traitements nécessite un recours aux agents pharmacologiques tel que les corticoïdes (anti-inflammatoires) ou l'administration de la protéine C activée (anti-coagulante).

Le but de ce travail de recherche était d'améliorer la thérapeutique du choc septique. Pour cela nous avons développé deux hypothèses :

- Amélioration de la stratégie thérapeutique « remplissage vasculaire puis catécholamines » par une administration précoce de catécholamines.

Les effets systémiques des deux traitements (remplissage vasculaire et catécholamines) semblent bien connus, par contre une correction de l'hypovolémie en même temps qu'une correction de l'hypotension (avant de commencer notre étude) n'a pas été étudiée.

L'introduction précoce des catécholamines vasoconstrictrices a été proposée dans le choc hémorragique afin de mobiliser le volume séquestré dans le territoire veineux. Dans ce contexte nous avons étudié les effets bénéfiques de l'administration précoce de noradrénaline (c'est-à-dire en même temps que le remplissage vasculaire) par rapport à son administration retardée (c'est-à-dire après le remplissage vasculaire) dans un modèle animal de choc septique

par une réanimation hémodynamique de rats soumis à l'injection d'endotoxine. Il est probable que l'effet bénéfique de la noradrénaline puisse être dû à un effet de réduction de la capacité veineuse transférant une partie du sang veineux du compartiment non atteint vers le compartiment veineux atteint et donc rendant plus efficace en terme de retour veineux l'effet du remplissage vasculaire.

- Amélioration du traitement à la Protéine C activée par une meilleure compréhension de son mécanisme d'action au niveau systémique.

Au cours de l'étude PROWESS, il a été montré que l'administration de la Protéine C activée chez des patients septiques est associée à une amélioration de la survie avec une résolution plus rapide des défaillances cardiovasculaires et semble légèrement favoriser la survenue d'hémorragies graves. Pour améliorer l'utilisation de cette thérapeutique, il est nécessaire de bien clarifier les mécanismes à l'origine de ses effets bénéfiques. Malgré les nombreuses études cliniques et fondamentales sur les mécanismes d'action de la protéine C activée, les mécanismes à l'origine de son succès ne sont toujours pas clairs. L'importance des effets cytoprotecteurs et des effets anti-coagulants de la PCa dans l'amélioration de la dysfonction cardiovasculaire représente à l'heure actuelle un sujet de débat ; dans ce contexte, deux modèles animaux sont utilisés.

Dans notre premier modèle de rat endotoxinique, l'administration de PCa se fait *in vivo* et en continu. L'impact de la PCa sur la dysfonction cardiovasculaire est démontré par une étude hémodynamique suivie d'une exploration des différentes voies de signalisations impliquées dans la physiopathologie du choc septique.

Dans le second modèle de souris endotoxinique, les artères isolées sont incubées dans de la PCa. Ce modèle nous a permis de démontrer l'impact de la PCa sur la paroi vasculaire en s'affranchissant de ses effets anti-coagulants.

## **I. Le choc septique :**

Le choc septique est une des premières causes d'admission et de décès en réanimation, avec une mortalité qui reste très élevée, avoisinant aujourd'hui encore les 50% malgré les progrès thérapeutiques [1]. L'American College of Chest Physicians (ACCP) et la Société de Critical Care Medicine (SCCM) ont mis en place la "Conférence de Consensus" en 1991. L'objectif de cette dernière était de fournir un cadre conceptuel et pratique pour mieux définir la réponse inflammatoire systémique et la réponse infectieuse.

Les définitions générales présentées au cours de cette conférence sont largement répandues dans la pratique clinique et ont servi de base aux critères d'inclusion pour de nombreuses épreuves cliniques et interventions thérapeutiques [2]. En terme de définition, les niveaux suivant de gravité des états septiques sont actuellement reconnus [3].

### ***Infection:***

L'infection se définit comme un processus pathologique provoqué par l'invasion d'un tissu, d'un liquide ou d'une cavité normalement stérile par des micro-organismes pathogènes ou potentiellement pathogènes.

### ***Syndrome inflammatoire de réponse systémique : SIRS***

Syndrome de réponse systémique à une inflammation, devient sepsis lorsque l'étiologie infectieuse est prouvée ou fort probable. Syndrome de réponse systémique à une inflammation, devient sepsis lorsque l'étiologie infectieuse est prouvée ou fort probable

### ***Sepsis:***

Le sepsis est une dysfonction ou une hypoperfusion d'au moins un organe induite par une infection : par exemple PAS < 95 mmHg ou lactates > 4 mmol/l.

### ***Sepsis sévère :***

La définition du sepsis sévère reste inchangé et se rapporte au sepsis compliqué de défaillance d'un ou de plusieurs organes.

### ***Choc septique :***

Le choc septique est un sepsis grave avec hypotension non corrigée par le remplissage.



## II. Physiopathologie du choc septique :

De nombreux composants bactériens sont connus pour leur implication dans le choc septique. Il s'agit par exemple des peptidoglycanes, des porines, des lipopeptides, des lipoprotéines, des pili, de la flagelline, de l'ADN riche en motifs cytosine-phosphate-guanine (CpG) non méthylés, ou des toxines bactériennes (endotoxine ou exotoxines). Les bactéries à Gram négatif sont à l'origine de 25 à 30% des cas de choc septique, contre 30 à 50% pour les bactéries Gram positif et 3 à 6% pour les champignons. L'importance des virus et des parasites dans cette pathologie est moindre : 2 à 4% et 1 à 3% respectivement.

Un des composés bactériens le plus étudié et le plus puissant est l'endotoxine ou le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries à Gram négatif [4]. Le LPS est une endotoxine constitutive de la paroi des bacilles Gram-négatif (Figure 1). Le lipide A est la partie la plus immunogène du LPS. Elle confère les propriétés hydrophobes à la molécule. Au contraire, l'antigène O et le noyau oligosaccharidique sont hydrophiles [5].

L'endotoxine est connue pour jouer un rôle prépondérant dans l'apparition et le développement d'un état de choc lors d'infections par des bactéries G<sup>-</sup>. Elle est couramment utilisée dans les modèles expérimentaux de choc septique, son injection reproduisant l'ensemble des signes cliniques et les conséquences biologiques observés au cours de ce type de choc: fièvre, hypotension, lésions tissulaires et défaillances d'organes [6, 7].

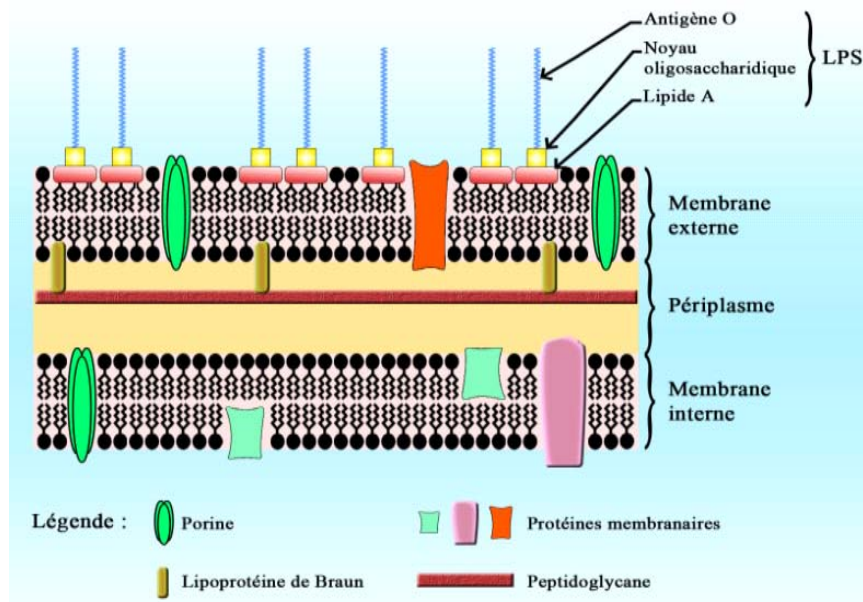


Figure 1 : Paroi d'une bactérie à gramme négatif

### 1. Mode d'action de l'endotoxine :

Les effets du LPS dépendent de sa fixation sur un récepteur qui reconnaît le lipide A : la molécule CD14. C'est une glycoprotéine de 53kD exprimée à la surface des monocytes, macrophages et polynucléaires neutrophiles, ou présente sous forme soluble dans le plasma

[5]. Son expression à la surface des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses a été mise en évidence dans l'aorte et les petites artères de résistance de rat [8] . De plus, la possibilité d'une action directe du LPS sur le myocarde est relancée par une série d'études récentes montrant la présence à la surface des cardiomyocytes de récepteurs au LPS [9, 10].

Le LPS exerce son effet de manière directe en se liant à son récepteur cellulaire ou de manière indirecte en activant des molécules circulantes. Il est par conséquent classiquement admis, au vu de leur délai d'apparition, que ces anomalies ne résultent pas de l'effet instantané direct de l'endotoxine elle-même (à moins qu'elle ne soit en quantité extrêmement importante), mais plutôt d'un effet indirect via l'apparition secondaire de cytokines pro-inflammatoires [11].

En réponse à l'endotoxine, les monocytes, les macrophages et les cellules endothéliales produisent des cytokines dont l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8 et le TNF- $\alpha$ . De plus, ces cellules produisent des dérivés oxygénés ( $O_2^-$ , NO,  $NOO^-$ ...) ainsi que des métabolites de l'acide arachidonique (prostaglandines, thromboxanes, leucotriènes) et du Platelet Activating Factor (PAF) [12]. Produit en quantité modérée, l'ensemble de ces molécules a un effet bénéfique mais lorsque leur production est excessive il en résulte des altérations tissulaires, une hypotension, une coagulation intra vasculaire et une hyperthermie. L'ensemble de ces phénomènes peut conduire à une défaillance multiviscérale incluant la défaillance cardiovasculaire.

## **2. Réponse inflammatoire systémique :**

La réponse inflammatoire est initiée par la reconnaissance des pathogènes par les phagocytes (neutrophiles, monocytes et macrophages). Ces cellules reconnaissent des motifs moléculaires spécifiques des pathogènes, indispensables à leur survie où à leur virulence, permettant au système immunitaire de les distinguer du «soi». Ces motifs moléculaires portent le nom de Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMP). La reconnaissance des PAMP est portée par les récepteurs appelés Pathogen Recognition Receptors (PRR). Les Toll Like Receptor (TLR) font partie de ces PRR. Ils sont exprimés à la surface de très nombreuses cellules : celles, bien sûr, directement impliquées dans la réponse immunitaire (monocytes, macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes B et T, cellules épithéliales), mais également celles directement impliquées dans la réponse systémique (cellules endothéliales, cellules musculaire lisse et cardiomyocytes) [13].

### **2.1 TLR-4, récepteur au LPS:**

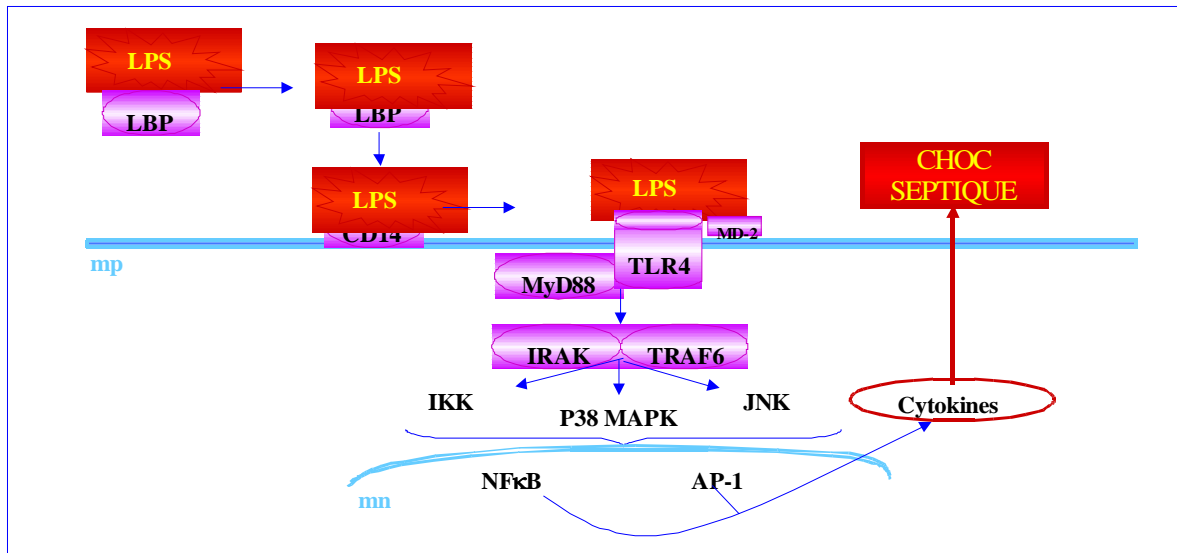
Le récepteur de l'endotoxine est un complexe de protéine associant TLR-4, MD-2 et CD14. Le TLR-4 était connu comme le récepteur du LPS des bacilles à Gram négatif, et comme

étant l'élément central d'une réponse immunitaire efficace contre ces micro-organismes. L'expression des TLR n'est pas restreinte aux cellules phagocytaires. Les cellules non myéloïdes participent notamment à la réponse immunitaire innée, comme les cellules endothéliales et épithéliales, expriment un certain nombre de ces récepteurs.

Le transfert du LPS sur le CD14 s'effectue par le biais de la LPS Binding Protein (LBP) capable de monomériser le LPS à partir d'agrégats de molécules LPS. Après la liaison du LPS au CD14, les cellules sont activées et le LPS est internalisé dans les cellules afin d'être détoxifié, puis éliminé.

Après avoir identifié les récepteurs TLRs et la plupart de leurs ligands, les chercheurs se sont intéressés aux voies de signalisation déclenchées par la rencontre de ces deux partenaires, en particulier celles responsables de la synthèse des médiateurs de l'inflammation. Il a été ainsi montré que les TLRs activaient de nombreux facteurs transcriptionnels (NF- $\kappa$ B, AP-1, CREB, STAT) et les principales kinases de stress [14].

Dans les monocytes/macrophages, la voie des « Mitogen Activated Protein Kinase » (MAPK) est également activée par le LPS. Cette voie de signalisation intracellulaire inclut les voies des kinases « Extracellular signal-Regulated Kinase » (ERK), « c-Jun N-terminal kinase » (JNK) et p38. Cette activation cellulaire mène à la libération de médiateurs biologiques (cytokines, chémokines, etc...) qui vont initier la réaction inflammatoire (figure 2). Une telle réaction est essentielle pour activer le système de défense qui peut ainsi neutraliser et détruire les bactéries et les molécules bactériennes comme le LPS et procéder à la cicatrisation des tissus. Cependant, la production de ces médiateurs proinflammatoires doit être étroitement contrôlée et doit rester locale. En effet, une surproduction de médiateurs inflammatoires dans la circulation sanguine pourrait entraîner une réaction inflammatoire systémique, un phénomène typique du choc induit par l'endotoxine. Les causes d'un tel dérèglement restent pour le moment inconnues, mais pourraient impliquer des composantes génétiques, biochimiques, physiologiques et environnementales qui prédisposeraient certaines personnes à ce type de choc [15].



**Figure 2 :** Voie de signalisation cellulaire résultant de la stimulation des récepteurs Toll Like-4

### 2.1.1 Voie de signalisation NF-kB :

Une des voies de signalisation activée par le LPS, est celle aboutissant à l'activation du facteur de transcription NF-kB. Il s'ensuit une activation d'une série de gènes encodant pour des médiateurs de l'inflammation, de la coagulation et du stress oxydant.

Le complexe NF-kB est généralement abondant sous forme cytoplasmique : c'est un hétérodimère inactif composé des sous unités p50 (NF-kB1) et p65 (relA) et de l'inhibiteur Ikb $\alpha$  qui agit en masquant les signaux de localisation nucléaire des sous unités p50/p65.

Le stimulus activateur (LPS, cytokines, stress oxydant...) libère l'hétérodimère p50/p65 par phosphorylation, ubiquitination et dégradation des protéines inhibitrices Ikb. L'hétérodimère p50/p65 peut alors pénétrer dans le noyau, se fixer à l'ADN sur son élément régulateur spécifique (kB) et activer les gènes cibles qui le contiennent. De ce fait il participe à l'activation de nombreux gènes cellulaires impliqués dans les réponses immunitaires, notamment innées et inflammatoires, tels que ceux codants pour les cytokines proinflammatoires et leurs récepteurs, les cyclooxygénases (COX), les radicaux libres oxygénés, les espèces réactives nitrogénées (RNS), les chémokines et les molécules d'adhésion [12].

- **Cytokines pro-inflammatoires :**

Les monocytes/macrophages sont la source majeure des cytokines proinflammatoires. La bactérie ou les produits qui en dérivent ont la capacité d'induire la synthèse d'IL-1 et de TNF- $\alpha$ . Ces derniers jouent un rôle essentiel dans l'orchestration de l'inflammation, et une fois produites, elles contribuent à entretenir leurs propres productions et sont à l'origine de la

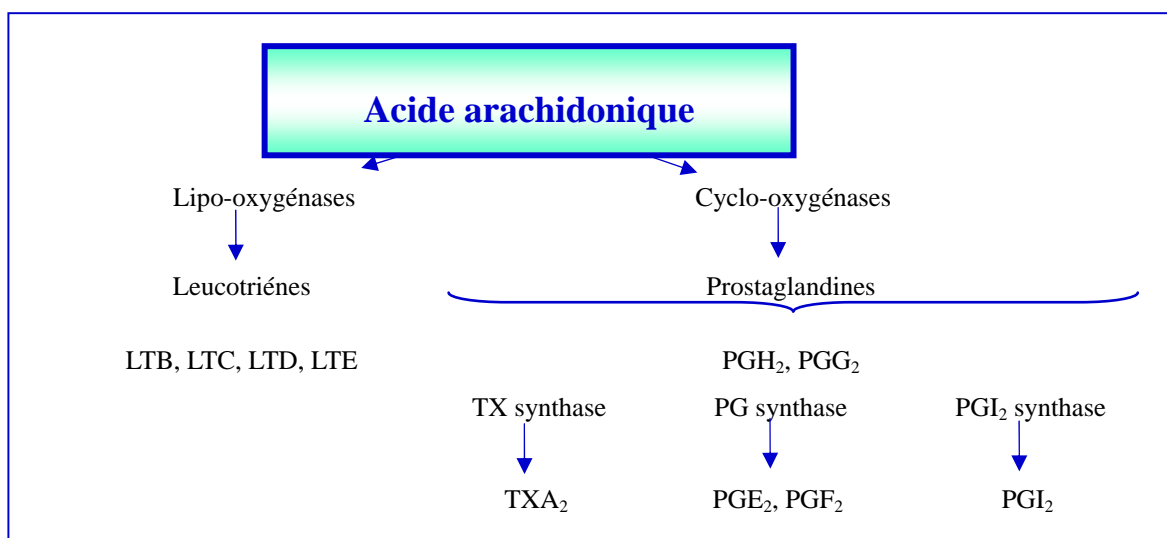
libération d'un grand nombre d'autres cytokines. Sous leur action, les différents types cellulaires produisent des médiateurs lipidiques, des enzymes protéolytiques, des radicaux libres, des chémokines, autant de facteurs directement impliqués dans l'entretien du processus inflammatoire [5].

De plus les effets inflammatoires et délétères des cytokines peuvent résulter de leur action en synergie avec le LPS. Dans les modèles expérimentaux de chocs induits par E.coli, les taux de la majorité des cytokines pro-inflammatoires mesurées (TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IFN $\gamma$ , LIF et IL-10) étaient plus élevés dans le cas de dose létale.

Les cytokines libérées dans un environnement de cellules riches en récepteurs de haute affinité, sont efficacement capturées par ces cellules. Au cours du sepsis les mesures de cytokines associées aux cellules révèlent la présence de quantités très importantes de cytokines. L'IL-1 et le TNF $\alpha$  sont responsables de nombreux effets systémiques : hypotension, hypoglycémie. Ils possèdent aussi des activités cytotoxiques vis-à-vis de l'endothélium vasculaire, ils favorisent l'expression du facteur tissulaire et accroissent l'expression des molécules d'adhésion [16-18].

- **Les cyclooxygénases (enzyme de la voie de l'acide arachidonique) :**

Les cytokines proinflammatoires induisent la synthèse des phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). L'action de la PLA<sub>2</sub> (figure 3) sur les phospholipides membranaires libère l'acide arachidonique dont la destinée est double : permettre la synthèse des leucotriènes d'une part et des prostaglandines et thromboxanes d'autre part; ces deux voies sont régulées par l'action catalytique des lipo-oxygénases (LOX) et des cyclooxygénases (COX). Respectivement, ces enzymes ont été impliquées dans la production d'espèces réactives de l'oxygène [19].



**Figure 3 :** Biosynthèse des prostaglandines et des thromboxanes

La voie des cyclooxygénases conduit à la formation des PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> et du TX. Leur biosynthèse n'est pas uniforme dans tous les tissus : celle du TX prédomine dans les plaquettes alors que celle des PGI<sub>2</sub> est prédominante dans l'endothélium. Ainsi, le TX a un effet vasoconstricteur et pro-agrégant plaquettaire. Par ailleurs, Moncada *et al* [20] ont démontré que l'endothélium était une source majeure de PGI<sub>2</sub> dont la synthèse est stimulée par les bradykinines. Au niveau des vaisseaux, la PGI<sub>2</sub> provoque une vasodilatation et est anti-agrégante alors que la PGF<sub>2</sub> est vasoconstrictrice.

Deux isoformes des COXs ont été identifiées : COX 1, constitutive, et COX 2, inductible.

Les COX-2 sont produits dans certains tissus en réponse à des stimuli tels que les cytokines et les facteurs de croissance [19]. Les médiateurs lipidiques générés via les COX-2 agissent à travers un récepteur spécifique couplé à la protéine G, favorisent l'inflammation, altèrent le tonus vasomoteur et augmentent le tonus sanguin et la perméabilité vasculaire. Les souris déficientes PLA<sub>2</sub>, ou COX2, ou 5-Lipooxygénase, sont plus résistantes à l'endotoxine [15].

- **Radicaux libres oxygénés (RLO) :**

Les RLO jouent un rôle physiologique au sein de l'organisme, pouvant intervenir dans la modulation dans l'activité de certains facteurs de transcription ou dans le processus de phagocytose [21]. Cependant, lorsque les systèmes de défenses anti-radicalaires physiologiques sont dépassés, soit en raison d'une exagération de la production radicalaire, soit en raison d'une diminution des défenses comme il est observé dans le cas de choc septique, la neutralisation des radicaux libres se fait aux dépens de l'intégrité cellulaire.

Les radicaux libre réagissent avec des constituants cellulaires (acide nucléique, protéines, acides gras) et peuvent altérer leurs structures et leurs fonctions [22]. Ainsi de nombreuses activités enzymatiques sont perturbées, la perméabilité et la fluidité membranaires sont modifiées, Les structures et les fonctions membranaires sont altérées. L'ensemble de ces événements entraîne le développement d'altérations cellulaires qui peuvent aboutir à des perturbations de fonctionnement de certains organes [22]. Il est à noter que les RLO, dont le peroxyde d'hydrogène, sont capables d'activer le NF-κB en entraînant la dégradation de son inhibiteur [23].

Les polynucléaires constituent une source importante de RLO car ils possèdent de fortes concentrations en oxydases. Ses réactions radicalaires peuvent être limitées au phagosome, et participer aux phénomènes de bactériolyse et de cytololyse. Cependant le contenu des phagosomes peut être libéré dans le milieu extérieur par exocytose, ce qui induit des dommages tissulaires au cours d'un phénomène d'inflammation. La libération concomitante d'enzymes telles que les élastases ou les collagénases se révèlent être toxiques pour la matrice extracellulaire et participent également à l'apparition de ces lésions [24]. De plus les

PNN peuvent générer de l'acide hypochloreux qui est un composé oxydant très puissant [25].

- **Le monoxyde d'azote (NO) :**

Le NO est synthétisé à partir de l'un des atomes de l'azote terminal du groupement guanidine de la L-arginine [26] par voie enzymatique faisant intervenir les NOS, en présence d'oxygène et de cofacteurs. A ce jour 4 isoformes de NOS sont identifiées :

- La forme constitutive (cNOS) calcium dépendante est responsable de la synthèse de petites quantités de NO, retrouvées au niveau endothélial (eNOS), neuronal (nNOS) et mitochondrial (mNOS).

- La forme inductible (iNOS) est présente au niveau de nombreux types cellulaires. L'apparition de cette isoforme calcium indépendante nécessite un certain délai (3 à 6h) mais elle est capable de produire de grande quantité de NO après stimulation par des médiateurs immuno-inflammatoires. Cette isoforme a été identifiée, entre autre au niveau des macrophages et des cellules vasculaires [23].

Le NO possède des propriétés physiologiques variées, bénéfiques ou délétères, et ce paradoxe suscite encore de nombreux travaux de recherche. Les effets vasculaires du NO sont médiés par la GMPc responsable d'une vasodilatation. La GMPc induit l'activation de la phosphatase de la chaîne légère de la myosine. Cette enzyme va déphosphoryler la myosine, permettre le relâchement de l'appareil contractile de la cellule musculaire lisse et ainsi entraîner la vasodilatation. Les effets du NO sont multiples et sont le résultat de sa capacité à traverser les membranes cellulaires rapidement et sans modification. Une fois produit, il diffuse hors de la cellule endothéliale vers les cellules musculaires lisses, les macromolécules et les cellules du sang circulant [27].

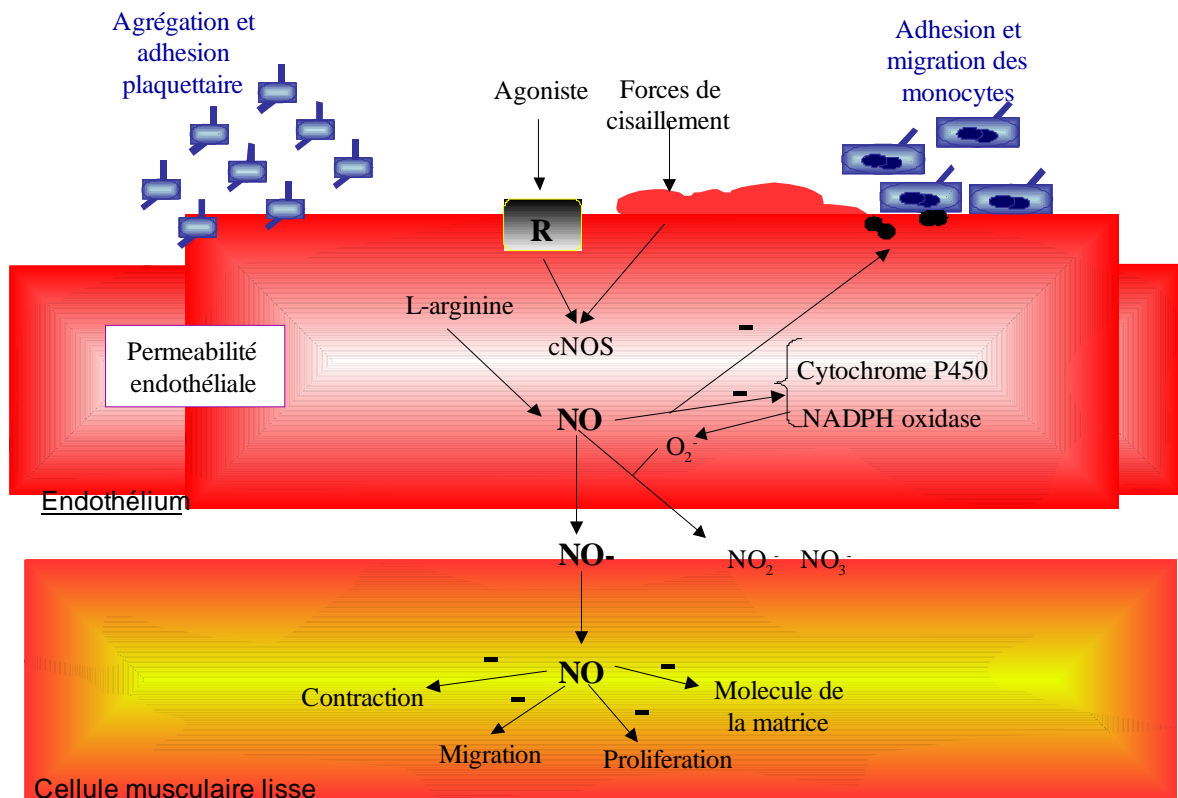
Le NO module de manière indirecte l'expression de nombreux gènes tels que ceux codant pour le facteur de croissance des macrophages (M-CSF) et des cellules endothéliales (VEGF), les cytokines (telle que l'IL8), les molécules d'adhésion (telles que ICAM-1, VCAM-1 ou la E-selectine), les médiateurs de l'inflammation ou les métallo-protéinases de la matrice.

Le NO inhibe l'activation, l'adhésion et l'agrégation des plaquettes à l'endothélium. Il inhibe l'adhésion des leucocytes et la migration trans-endothéliale des monocytes, l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL) et la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. Il inhibe la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses, limitant ainsi l'épaississement de la média [28]. Au niveau cardiovasculaire le NO augmente la survie des cellules endothéliales en inhibant l'activité des caspases. Il semble par conséquent favoriser l'angiogénèse en inhibant l'apoptose [29]. Le rôle du NO dans l'homéostasie vasculaire est représenté sur la figure 4.

Cependant, il peut avoir des effets cytotoxiques, notamment par la formation de peroxy-nitrite, qui résulte de la réaction du NO avec l'anion superoxyde, et des réactions qui en découlent (formation de radical hydroxyle). Cette toxicité pourrait intervenir en particulier au niveau de l'endothélium, au niveau duquel ces deux composés sont susceptible d'être produits, ce phénomène étant d'autant plus marqué que les quantités produites sont importantes [30].

Des preuves de l'implication centrale de la NO synthase inducible nous ont été rapportées par des études réalisées sur des animaux transgéniques. En effet, les souris KO NOS-/- résistent particulièrement bien au choc toxi-infectieux et ne présentent notamment que très peu d'hypotension artérielle [31]

En expérimentation animale ou chez des patients en choc septique, l'administration d'inhibiteurs des NOS, permet de restaurer des valeurs normales de pression artérielle en cas de choc septique. Malheureusement, l'absence de spécificité de ces agents pour la forme enzymatique inducible est grevée d'une hypoperfusion des organes cibles par excès de vasoconstriction et est associée à une surmortalité [32].



**Figure 4:** NO et contrôle de l'homéostasie vasculaire

### 3. Réponse spécifique de la paroi vasculaire au LPS :

Les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses sont aussi capables de sécréter des cytokines après exposition au LPS, ou par auto-induction en réponse au TNF, à l'IL-1 et



à l'IL-6. La production d'origine musculaire est plus marquée que celle d'origine endothéliale. La paroi vasculaire pourrait ainsi amplifier, soutenir et propager la réponse inflammatoire locale suite à une stimulation systémique [33]. Ainsi, les cytokines formées (IL-1 et TNF- $\alpha$ ) stimulent la synthèse par les cellules endothéliales de molécules d'adhérence leucocytaires qui appartiennent à deux familles : les « sélectines », incluant la E-sélectine et la P-Selectine, et des éléments de la superfamille des immunoglobulines comprenant ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, VCAM-1 et PECAM. Ces molécules endothéliales interagissent de façon spécifique avec les ligands de la famille des intégrines leucocytaires [34]. ICAM-1 favorise l'adhérence endothéliale des cellules mononuclées, alors que VCAM lie les lymphocytes et les monocytes [35]. D'autre part les cytokines proinflammatoires stimulent les cellules endothéliales pour produire différents agents vasoactifs. L'IL-1 induit la production de prostaglandines (PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>) et de PAF à action vasodilatatrice. L'IL1 et le TNF- $\alpha$  peuvent stimuler la synthèse de NO par induction de la production de la iNOS.

L'IL1 et le TNF- $\alpha$  augmentent la sécrétion par les cellules musculaires lisses d'eicosanoides (PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, PAF), de collagène de type I et III, de la chimiokine MCP-1 et modulent l'expression des complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH). D'un point de vue fonctionnel, les cytokines proinflammatoires sont capables d'induire une dépression des capacités contractiles des cellules musculaires lisses. L'IL-1 et le TNF $\alpha$  ont été identifiés *in vitro* comme de puissants inhibiteurs de la contraction vasculaire par un mécanisme indépendant de l'endothélium [8]. Les contractions induites par la dépolarisation au potassium sont également déprimées, indiquant que les effets des cytokines sur le muscle lisse vasculaire ne sont pas limités à la vasoconstriction liée à une liaison agoniste-récepteur. L'ensemble de ces effets, dépression contractile et vasodilatation peut être rapportée à l'induction de la iNOS dans les cellules musculaires lisses en culture, au LPS, à l'IL-1 et à l'IFN $\gamma$  [8].

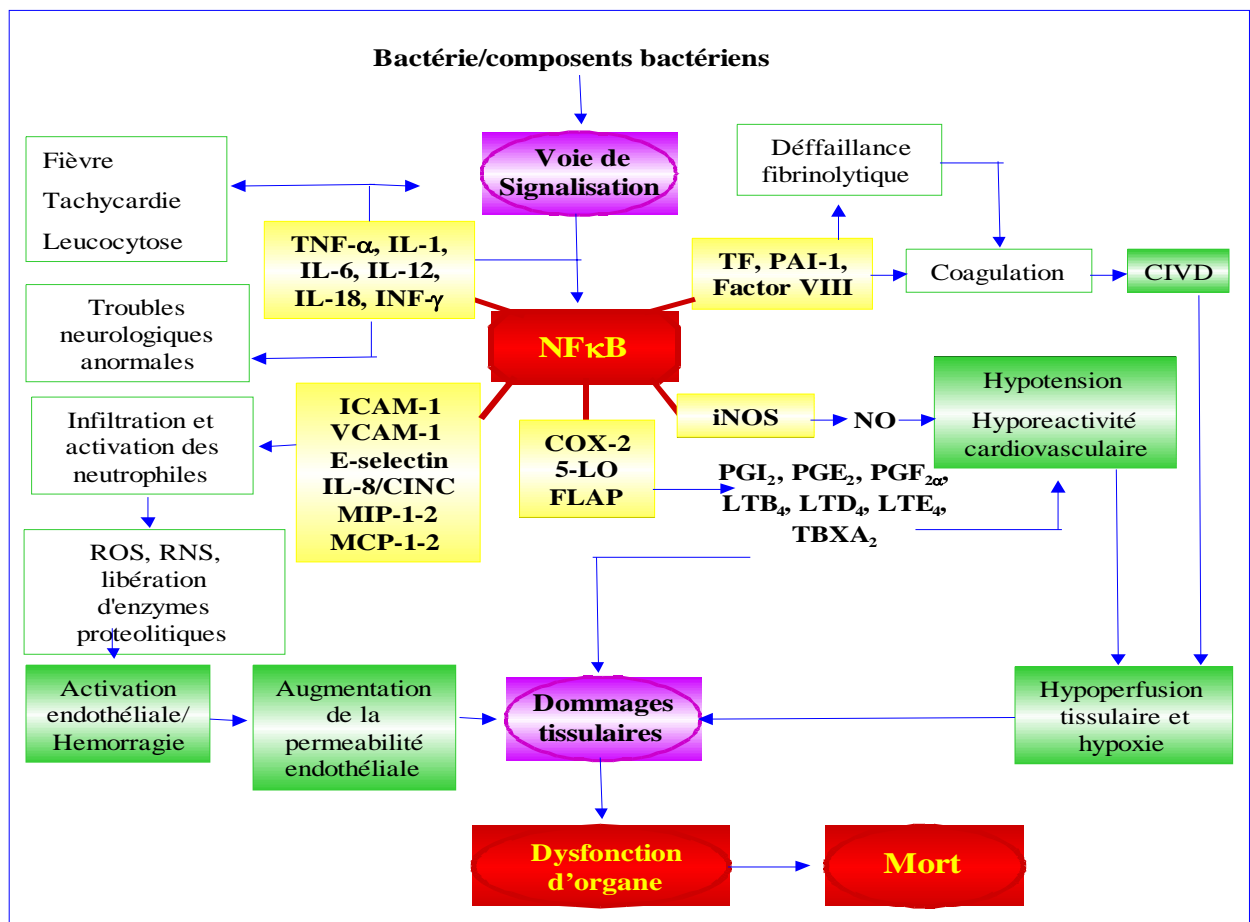
#### **4. Réponse spécifique des cellules myocardiques au LPS :**

Récemment une action directe du LPS sur le myocarde a été suggérée. En effet, la présence de récepteur Toll-4 (TLR-4), qui est considéré comme le récepteur du LPS, a été décrite à la surface des cardiomyocytes. La voie de TLR-4 est en partie responsable de l'induction de la synthèse de médiateurs pro-inflammatoires dans le coeur au cours du choc septique [36].

Le processus infectieux lui-même, en activant les leucocytes, les macrophages et les cellules endothéliales qui libèrent alors des espèces radicalaires de l'oxygène, peut induire des phénomènes d'ischémie reperfusion, la sécrétion de cytokines, comme le TNF- $\alpha$ , par les cellules de l'inflammation. Le TNF- $\alpha$  est connu pour augmenter la perméabilité membranaire des cellules endothéliales et pourrait augmenter aussi celles des cardiomyocytes.

En effet les cytokines agissent directement sur les myocytes cardiaques en se fixant sur des récepteurs membranaires et activent ainsi des voies de signalisation cellulaire. Les cytokines ainsi pouvant entraîner une baisse de la contractilité cardiaque en stimulant la voie du NO [37, 38]. Les cytokines peuvent aussi activer le complexe transcriptionnel NF-κB qui induit notamment l'expression de nombreux gènes comme celui de la NOS ou ceux de plusieurs cytokines dont celui du TNFα [39].

*En résumé* l'activation cellulaire par l'endotoxine engendre une stimulation de la voie de transcription PI-κB/NF-κB. Cette dernière va déclencher la synthèse de plusieurs enzymes et protéines qui sont à l'origine des signes biologiques et cliniques du choc septique; hypotension, hyporéactivité cardiovasculaire, hypoperfusion tissulaire, hypoxie, augmentation de la perméabilité endothéliale, coagulation et thrombose. Tous ces phénomènes vont induire une dysfonction d'organes et le décès (figure 5).



**Figure 5 :** Stimulation de la voie de signalisation NF-κB au cours du sepsis.

### **III. Défaillance cardiovasculaire au cours du choc septique :**

La défaillance cardiovasculaire survient dans 40% des cas de sepsis, et fait passer la mortalité de 20% - 30% dans le sepsis sans dysfonction cardiovasculaire à 40% - 70% dans le choc septique [40]. Cette dysfonction se traduit par une vasoplégie et un débit cardiaque élevé qui peut évoluer vers une défaillance cardiaque associant dysfonction systolique et diastolique.

L'hypotension persistante peut être la conséquence de trois désordres hémodynamiques principaux :

- La défaillance vasculaire.
- La défaillance cardiaque.
- L'insuffisance circulatoire aigue

#### **1. La défaillance vasculaire :**

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. Au cours du choc septique, différents facteurs circulants ont été proposés comme générateurs de la dysfonction vasculaire et des anomalies fonctionnelles qui en découlent au cours du choc septique : la dysfonction endothéliale serait le point de départ. Son activation peut être due à des molécules pro inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-8...) et au stress oxydant, qui vont générer, comme les leucocytes, des produits qui lèsent cet endothélium [41].

##### **1. 1. Dysfonction endothéliale :**

L'atteinte endothéliale entame gravement l'adaptation vasculaire et la perfusion tissulaire au cours du sepsis [42]. La coagulation intra vasculaire disséminée (CIVD), l'œdème endothélial, le décollement intra vasculaire des cellules endothéliales, l'augmentation de la perméabilité vasculaire, l'adhésion plaquettaire et leucocytaire sont autant de facteurs susceptibles de diminuer la lumière vasculaire [43] .

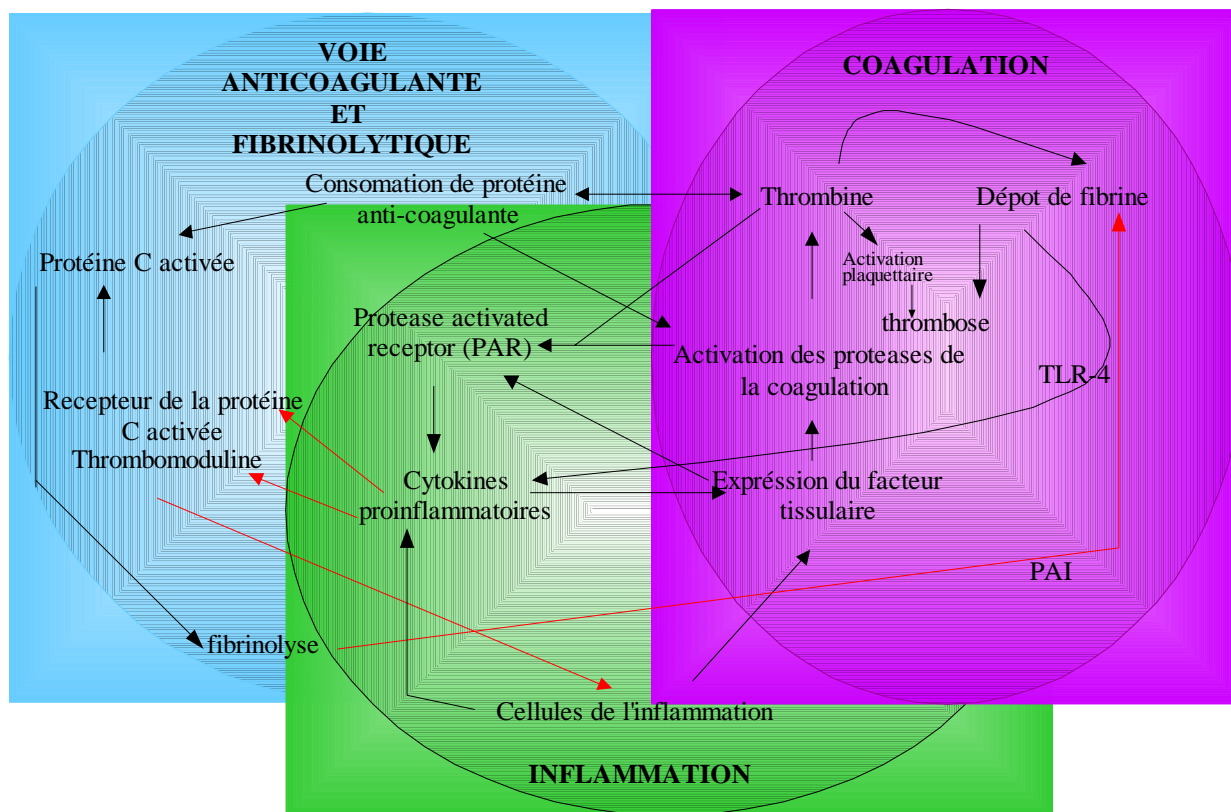
##### **1. 1. 1 Inflammation, coagulation et sepsis :**

L'interaction complexe entre réaction inflammatoire et coagulation est au centre de la physiopathologie du sepsis. Elle se développe dès les premières phases de la réponse de l'organisme à l'agression d'un pathogène [44]. La coagulation est l'aboutissement d'une cascade de réactions protéolytiques entraînant l'activation en chaîne de facteurs plasmatiques de la coagulation, circulant sous forme de précurseurs inactifs (zymogènes). L'activation de la cascade de coagulation au cours du choc septique (comme illustré sur la figure 6) est secondaire à la mise en jeu du facteur tissulaire (FT) en présence de cytokines proinflammatoires. Le FT exprimé à la

surface des cellules endothéliales ou monocytaires se lie au facteur VII activé. Il en résulte un complexe FT-VIIa qui active la thrombinogénése, par le biais des facteurs de la voie commune de la coagulation V et VIII. Ainsi la thrombine transforme le fibrinogène en monomères de fibrine. Ces monomères se polymérisent et forment un thrombus. Les plaquettes, les facteurs de coagulation et le fibrinogène sont activés et consommés dans la formation de ce thrombus. Les anticoagulants naturels (antithrombine III, protéines C et S,  $\alpha$ 1-protéinase inhibiteur, TFPI) sont également consommés au cours du choc septique (plus développé dans le chapitre traitement), leur diminution peut rendre compte de l'extension du processus thrombotique. Par ailleurs, la fibrinolyse physiologique secondaire à la mise en jeu de l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA), mécanisme endogène de lutte de l'organisme contre la formation de microthrombose, pourrait être diminuée et contribuer à la coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) du choc septique [45].

Cependant, la modulation de l'inflammation par la coagulation, se fait suite à l'activation des Protease-Activated Receptors (PAR) par les protéases de la coagulation. Ces récepteurs sont présents dans les cellules endothéliales, les cellules mononuclées, les plaquettes, les fibroblastes, et les cellules musculaires lisses. Ils sont caractérisés par un mécanisme d'activation irréversible qui s'effectue par un clivage de leur extrémité N-terminale extracellulaire par les sérine-protéases, différent d'un mécanisme classique de liaison ligand-récepteur. Les PAR représentent une sous-famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à des protéines G, et comptent actuellement quatre membres : PAR-1, PAR-2, PAR-3, et PAR-4.

PAR-1, PAR-3 et PAR-4, sont principalement activés par la thrombine, peuvent stimuler la production de plusieurs cytokines. PAR-1 et PAR-2 sont activés par le complexe FT-FVIIa et le FXa. L'activation de PAR-2 présent sur les macrophages par le complexe FT-FVIIa, induit une up-régulation de la réponse inflammatoire (production des ROS, expression des complexes d'histocompatibilité de classe II et expression des molécules d'adhésion cellulaire), une infiltration leucocytaire et l'expression des cytokines proinflammatoires (TNF $\alpha$  et IL-1 $\beta$ ) [46].



**Figure 6 :** Interaction entre inflammation, coagulation, fibrinolyse et activité anticoagulante [46] (→ stimulation, → inhibition).

### 1.1.2 Perméabilité vasculaire :

Dans un vaisseau normal l'endothélium est une barrière semi-perméable qui forme une couche continue, et joue un rôle dans l'intégrité et le contrôle de la paroi vasculaire. Durant le sepsis l'endothélium devient perméable et perd sa fonction de barrière. La perte de fluide dans l'espace extravasculaire mène à une formation d'œdème dans plusieurs organes ; les poumons, le rein et le cerveau des patients septiques [47].

### 1. 2 Atteinte du tonus vasculaire :

Le tonus vasculaire artériolaire dépend d'un équilibre délicat entre vasoconstricteurs (catécholamines, angiotensine, thromboxane, etc.) et vasodilatateurs (prostacycline, peptides atriaux natriurétiques, adénosine, NO, etc.). La modification du tonus vasculaire au cours du sepsis résulte donc d'un déséquilibre entre ces deux forces [31]. Plusieurs molécules sont impliquées dans cette altération. Leur sécrétion est modifiée en grande partie suite à une dysfonction d'organe (insuffisance surrénalienne, atteinte du système nerveux centrale, atteinte rénale.....).

### 1.2.1 Défaillance de la relaxation dépendante de l'endothélium :

L'endothélium produit des molécules vasoactives qui régulent le tonus artériolaire et contribue au contrôle de la pression. On retrouve des produits vasodilatateurs comme le monoxyde d'azote (NO) et la prostacycline (PGI<sub>2</sub>), ainsi que des vasoconstricteurs comme l'endothéline, le thromboxane A<sub>2</sub> et le Platelet Activating Factor (PAF) [48]. La défaillance de la relaxation endothélium dépendante a bien été démontrée dans des vaisseaux d'animaux endotoxiniques. Cette défaillance observée peut être le résultat de plusieurs mécanismes : altération des récepteurs de surface endothéliaux, modification de la voie de transduction des récepteurs, découplage de la eNOS, et altération de la fonction et de l'expression de la eNOS par les peroxy-nitrites (figure 7). Ces changements dans la voie de signalisation de la eNOS, suggèrent une diminution de la production de NO par la eNOS. La diminution de la synthèse endothéliale des molécules vasorelaxantes NO et PGI<sub>2</sub> contribue également aux anomalies de perfusion, même si l'induction des enzymes NO synthase (iNOS) et Cyclooxygénase-2 (COX-2) permet au moins théoriquement, de relayer secondairement le défaut de production initial de NO et de PGI<sub>2</sub> [49, 50]. La production musculaire lisse de ces molécules est multipliée par un facteur 1 000 par rapport au niveau de production endothéliale.

En effet, le caractère d'adaptation du tonus vasomoteur est perdu avec l'atteinte endothéliale : le vaisseau septique est en vasoplégie à cause notamment de l'excès de NO produit. Le vaisseau n'est donc plus capable d'adapter son tonus aux stimuli locaux, en particulier aux modifications du débit de perfusion, de la pression endoluminale, ou des apports en oxygène [43].

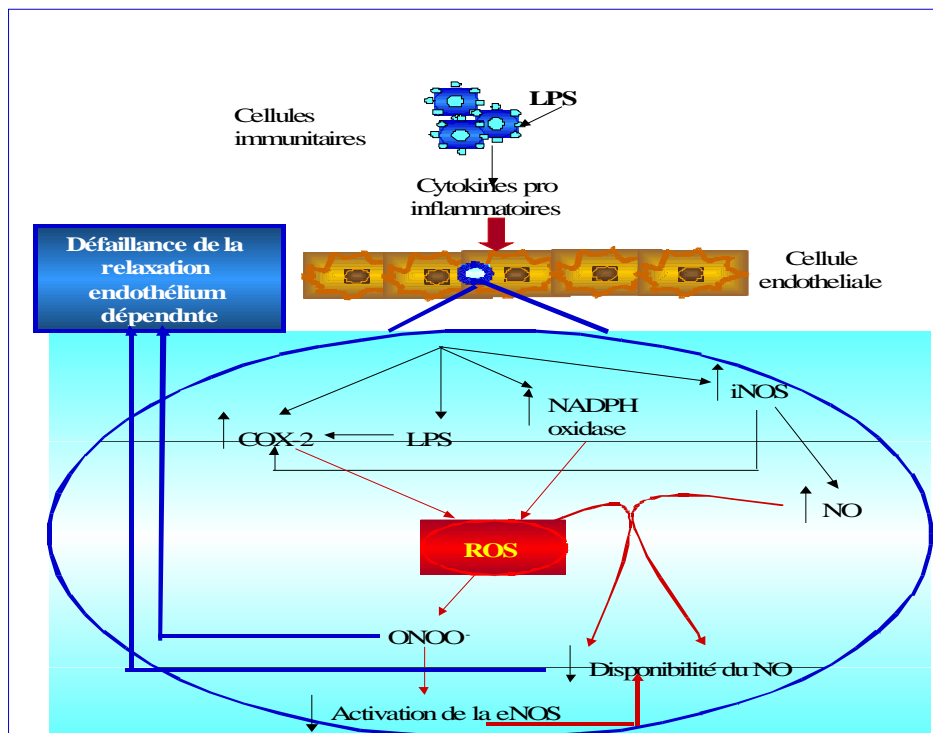


Figure 7: Défaillance de la relaxation endothélium dépendante.

### **1.2.2 Implication des canaux potassiques :**

Longtemps non reconnus en raison de leur absence d'activité en situation physiologique, les canaux potassiques sensibles à l'ATP (canal  $K^+$ ATP) semblent jouer un rôle important dans le phénomène de réponse vasoconstrictrice aux catécholamines et à l'angiotensine II [51]. La stimulation de la cellule musculaire lisse vasculaire par un agoniste  $\alpha$ -adrénergique, par exemple, entraîne une entrée massive de calcium à l'intérieur de la cellule, ce qui a pour effet de stimuler des enzymes phosphorylantes de la myosine et donc de déclencher la contraction de la cellule. En situation de crise énergétique comme dans le choc septique ou l'ischémie tissulaire, on observe une déplétion des stocks intracellulaires d'ATP et une acidose lactique en raison de la mise en place des voies métaboliques anaérobies. Ces deux stimuli activent l'ouverture des canaux  $K^+$ ATP, habituellement fermés, qui ont pour effet de laisser échapper du potassium dans l'espace péri cellulaire. Ceci entraîne une hyperpolarisation de la cellule, une fermeture des canaux calciques et bloque l'effet vasoconstricteur des amines. C'est ainsi que l'on explique actuellement le rôle du canal  $K^+$ ATP dans le phénomène de résistance aux catécholamines observé au cours du choc [51]. L'administration expérimentale d'agents pharmacologiques inhibant l'ouverture des  $K^+$ ATP, comme les sulfonylurées par exemple, a pour effet d'abolir ce phénomène de résistance aux catécholamines.

### **1.2.3 Déficit en vasopressine :**

La vasopressine, en conditions et à dose physiologique est une hormone hypophysaire impliquée dans la régulation fine de la réabsorption rénale d'eau. Sa sécrétion est régulée par des afférences provenant d'osmo- et de baro-récepteurs. En cas de choc septique avec baisse importante de la pression artérielle, la stimulation baro-réflexe est maximale et les taux plasmatiques de vasopressine assez élevés pour que la vasopressine exerce un rôle vasoconstricteur contre-régulateur, bénéfique dans la phase initiale du choc. Des études ont montré que les animaux supportaient très mal le choc lorsqu'on bloquait la vasopressine, résultat contesté par certains auteurs [52]. De plus, la vasopressine inactiverait les canaux  $K^+$ ATP et donc restaurerait la sensibilité vasculaire aux catécholamines. L'utilité de la vasopressine et de ses dérivés pharmacologiques dans le traitement de patients avec choc vasoplégique est actuellement en cours d'investigation [53, 54].

### **1.2.4 Insuffisance cortisonique :**

Comme indiqué ci-dessus, 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 importante de cortisol d'origine surrénalienne. Deux phénomènes tendent à induire une insuffisance surrénalienne fonctionnelle chez ces malades :

- 1) un épuisement surrénalien avec une impossibilité de répondre (suffisamment) à une stimulation exogène par l'Adreno Cortico Tropic Hormone (ACTH)
- 2) une résistance périphérique au cortisol [55].

Ces troubles endocriniens fonctionnels sont d'autant plus importants que le choc est prolongé et sévère. Un petit pourcentage de malades en choc septique montre des taux de cortisol circulant trop faibles pour être dosés : on parle alors d'insuffisance surrénalienne absolue. Des études cliniques récentes ont mis en évidence que l'administration intraveineuse de petites doses d'hydrocortisone par voie intraveineuse à des malades profondément choqués permet une amélioration de leur état hémodynamique, avec une augmentation des résistances artérielles systémiques et une restauration de la sensibilité artérielle aux catécholamines [56]. Les mécanismes moléculaires à la base de la restauration d'une sensibilité de la musculature lisse artériolaire aux catécholamines restent encore obscurs. Il semble toutefois que cette cortico-déficience, relative ou absolue, joue un rôle important dans le phénomène de résistance aux amines vasopressives tel que rencontré dans le choc septique.

### **1.2.5 Dysautonomie :**

Les états de chocs et les traitements de réanimation ont une influence majeure sur le fonctionnement du système nerveux central et autonome. Il est bien connu que la fonction du système sympathique peut être déficiente dans ces conditions [1, 55, 57]. La participation du système parasympathique est moins connue. Ce dernier joue un rôle toutefois prépondérant dans les phénomènes de vasoréactivité lors du choc septique, lors d'une sédation profonde induite par le thérapeute ou dans les comas. Si le rôle de la voie vagale afférente dans la stimulation de l'axe HHS et des réponses systémiques anti-inflammatoires a été relativement bien étudié [58], le rôle des afférences vagues dans la genèse du choc septique vient d'être récemment révélé. Il a pu être démontré que la dénervation expérimentale du nerf vague entraînait une nette aggravation du choc infectieux [59]. A l'opposé, la stimulation vagale électrophysique ou chimique permet de prévenir en grande partie le choc induit par l'endotoxine [59][60]. L'acétylcholine, en plus de ses effets sur la vasoréactivité, semble également avoir un rôle anti-inflammatoire important [61].

### **1.2.6 Atteinte du signal catécholergique :**

Les vasoconstricteurs sont utilisés cliniquement pour améliorer la pression sanguine ou réduire localement le flux sanguin. Les catécholamines, substances endogènes synthétisées par l'organisme, possèdent essentiellement une action vasoconstrictrice agissant *via* les récepteurs  $\alpha$ -



et  $\beta$ -adrénergiques, localisés dans le cœur et les vaisseaux.

La diminution du tonus vasoconstricteur observée au cours du choc septique est aussi la conséquence d'une diminution de la réponse vasoconstrictrice des fibres musculaires lisses aux agonistes  $\alpha$ -adrénergiques, malgré une augmentation de la synthèse des catécholamines endogènes. La survenue de plusieurs modifications liées aux agents adrénérergiques et à leurs récepteurs pourrait être impliquée dans cette physiopathologie.

1. Une "down-regulation" des récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques est observée et repose sur :

- une internalisation de la surface membranaire des cellules en petites vésicules.
- une réduction de l'influx calcique induit par les récepteurs, qui mène à une atteinte de la réponse contractile aux catécholamines [62].

Les catécholamines sont chimiquement modifiées au cours du sepsis et perdent de ce fait une partie de leur bioactivité. La grande génération du NO et des RLO peuvent directement nitrater et oxyder les catécholamines, les rendant ainsi inefficaces [63, 64]. Le dérivé 6-nitronorepinephrine s'est avéré moins efficace à induire des contractions, comparé à la norépinephrine [65]. L'administration de la superoxyde dismutase (anti-oxydant) augmente la pression et améliore la réponse aux catécholamines exogènes administrées, et est accompagnée par une diminution du taux de produits de catécholamines oxydés. De même, les inhibiteurs de NO augmentent la réponse contractile à la norépinephrine dans les artères isolées. Szabo et al. [66], ont montré que l'inhibition de la NOS augmente la vasoconstriction adrénérergique chez des rats septiques mais pas chez des rats sains. Cette étude souligne le rôle de la iNOS, qui est activée en conditions septiques. De même, le blocage spécifique de la iNOS peut être suffisant pour restaurer la réponse vasculaire aux catécholamines durant le sepsis [67].

### **3. Trouble de l'oxygénation tissulaire :**

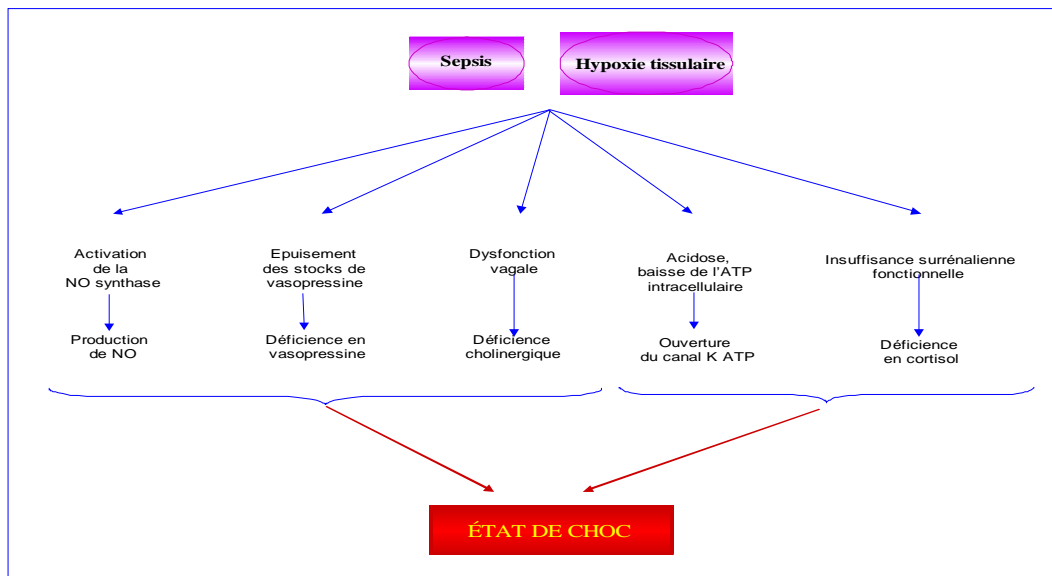
Au cours du choc septique il y a une hétérogénéité structurale et fonctionnelle de la dysfonction vasculaire, responsable d'une inadéquation entre demande et apport local en oxygène.

Le développement de microthrombie et l'obstruction de la lumière vasculaire sont à l'origine d'une réduction de la pression de perfusion microcirculatoire [68], ceci met en évidence une mauvaise distribution du flux de globules rouges au niveau capillaire.

L'hétérogénéité de la diminution de la réponse vasculaire périphérique aux agonistes  $\alpha$ -adrénergiques est responsable d'une anomalie de distribution du débit sanguin aux niveaux macrocirculatoire (altération de la régulation de la distribution de l'oxygène entre les organes) et microcirculatoire (altération de la régulation de la distribution de l'oxygène au sein même des

organes). Ces anomalies de distribution se traduisent par une diminution de l'extraction périphérique de l'oxygène au niveau des organes et contribuent à la dette tissulaire en oxygène et à l'hyperlactatémie [69][70]. De plus, les altérations microcirculatoires sont responsables d'altérations métaboliques tissulaires [71, 72].

Tous ces mécanismes (figure 8) interviennent de façon directe ou indirecte dans le mécanisme physiopathologique des états de choc septique.

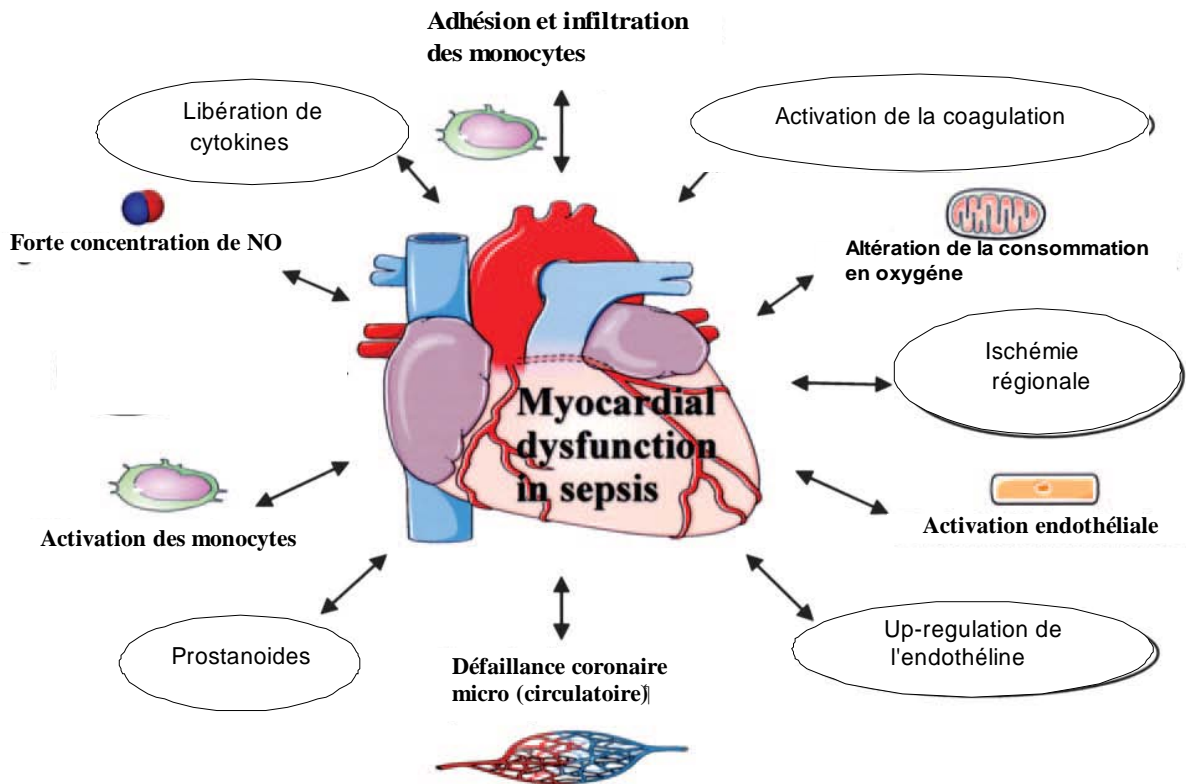


**Figure 8 :** Mécanismes impliqués dans la physiopathologie du choc septique

## 2. Défaillance myocardique :

Les anomalies circulatoires constatées au cours du choc septique rendent difficile la mise en évidence d'une dysfonction myocardique autonome et indépendante des conditions de charges. De plus, il existe une dysfonction micro-vasculaire qui pourrait entraîner une oxygénation tissulaire insuffisante et des foyers de micro-nécroses au niveau cardiaque. Enfin, des épisodes d'hypotension prolongés, une diminution de la perfusion coronarienne et une diminution du transport myocardique en oxygène peuvent survenir au cours du sepsis, ce qui peut favoriser et aggraver ces lésions ischémiques, surtout en cas d'anomalies microvasculaires.

En résumé, la dysfonction cardiaque se traduit par des anomalies structurales et fonctionnelles du cœur (figure 9), en plus de la dysfonction vasculaire (cité précédemment) présente dans les vaisseaux qui irriguent le cœur.



**Figure 9 :** Mécanisme de la dysfonction myocardique au cours du choc septique

### 2.1. Anomalies structurales et ischémie :

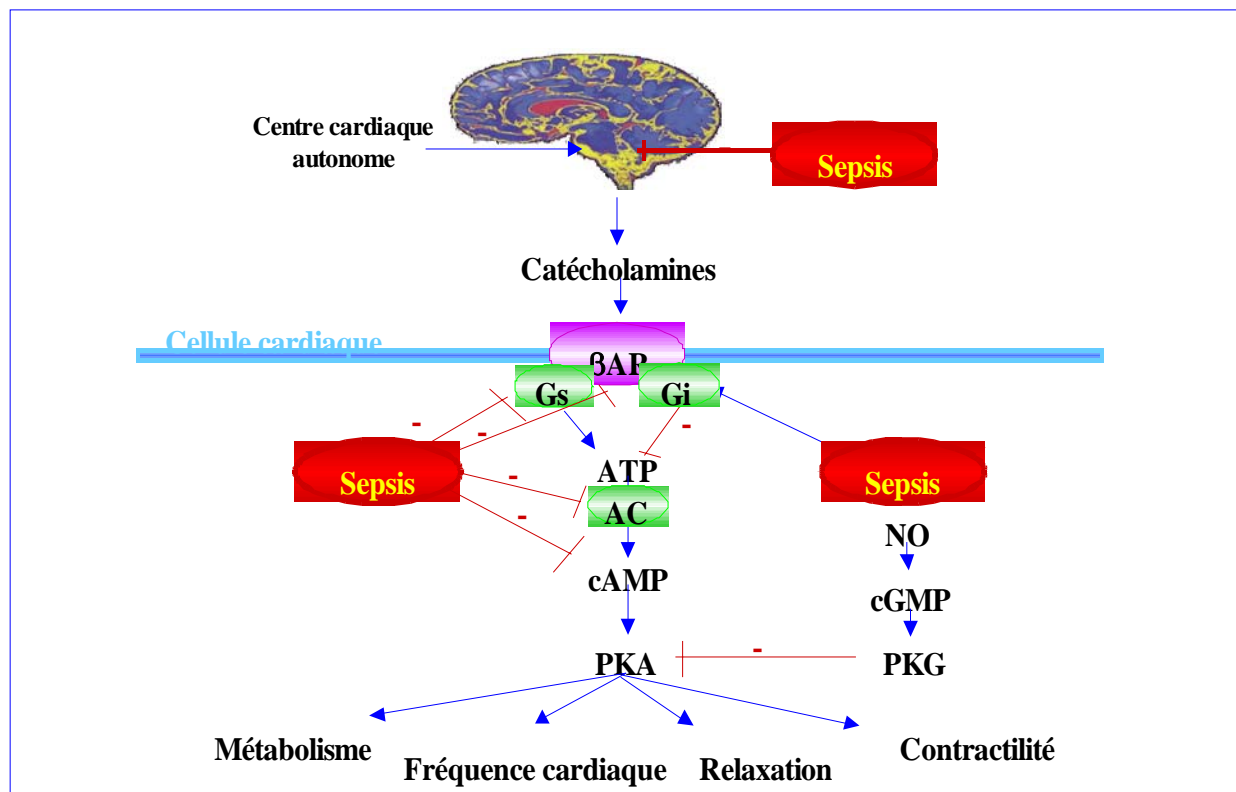
Des anomalies structurales ont souvent été retrouvées à l'examen anatomopathologique de tissus cardiaques prélevés sur différents modèles d'animaux septiques avec ou sans choc, mais également sur des prélèvements d'autopsies de patients décédés de choc septique. Les lésions les plus fréquemment mises en évidence sont une nécrose myocytaire, un œdème capillaire, interstitiel, ou cellulaire, des altérations myofibrillaires ou mitochondriales, des dépôts de fibrine intravasculaires, ou encore des agrégats leucocytaires intracapillaires. Ces lésions, par diminution du nombre de cardiomyocytes fonctionnels, pourraient conduire à une altération de la contractilité, mais également à des modifications de fonction diastolique. Il semble toutefois que la présence de ces dommages histologiques ne soit pas nécessaire à l'expression d'une dysfonction contractile [73, 74]. Ainsi, Piper [75], dans un modèle de péritonite chez le rat, retrouve une dysfonction myocardique *ex vivo*, sans substratum associé. Toutefois, aucune corrélation entre l'atteinte structurale et l'intensité de l'atteinte fonctionnelle n'a été rapportée.

De plus, les anomalies de perfusion tissulaire (en rapport avec la dysfonction endothéliale, l'œdème interstitiel, l'agrégation leuco-plaquettaire [76]), impliquées dans la genèse des défaillances d'organe, pourraient être également à l'origine de phénomènes ischémiques localisés et d'atteintes de la microcirculation myocardique [77]. De plus, des cytokines comme le  $\text{TNF-}\alpha$ , connu pour augmenter la perméabilité membranaire des cellules endothéliales, pourrait

augmenter aussi celles des cardiomyocytes, permettant la libération de macromolécules ou de fragments dégradés *in situ* en cas d'hypoxie [78].

## 2.2. Anomalies de la transduction du signal bêta-adrénergique :

Après stimulation adrénérge du centre cardiaque autonome (figure 10), les catécholamines sont libérées et vont stimuler les récepteurs adrénérge (RA) au niveau des cardiomyocytes. Ces récepteurs sont couplés à l'adénylate cyclase (AC) lequel transforme l'ATP en l'AMPc. Après stimulation de la protéine G cardiaque, stimulatrice (Gs), cet effet modifie le signal de transmission en amont de la membrane cellulaire. L'AMPc active la protéine kinase A (PKA), lequel phosphoryle des enzymes clés qui stimulent le métabolisme, la contraction et la relaxation des cardiomyocytes et influencent le rendement cardiaque. Le sepsis induit des perturbations à différents niveaux de la cascade de signalisation en partie via le NO, Cyclic Guanosine Monophosphate (cGMP), et Protein Kinase G (PKG) [79].



**Figure 10** : Atteinte de la voie de signalisation β-adrénergique au cours du choc septique.

Le choc septique est marqué par une stimulation sympathique globalement élevée et soutenue. Plusieurs études animales et humaines ont montré que la concentration des catécholamines était augmentée au cours du sepsis, et que le turnover de noradrénaline dans le cœur était également majoré après injection d'endotoxine [80]. Cependant, une diminution de la réponse du cœur aux catécholamines a pu être retrouvée sur plusieurs modèles animaux.

Le groupe de Tang [81, 82] a pu montrer sur un modèle de sepsis expérimental une modification biphasique du nombre total de récepteurs adrénergiques ( $\alpha$  et  $\beta$ ). A la phase initiale marquée par une augmentation du nombre de ces récepteurs fait suite une phase de diminution de ceux-ci par internalisation. Le caractère biphasique des modifications des propriétés des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques lors du sepsis est également confirmé par Abi-Gerges et al [83].

Enfin, *in vivo*, des réflexes cardiovasculaires, des réflexes respiratoires, l'interdépendance ventriculaire et les interactions cardiorespiratoires compliquent encore la régulation de la performance cardiaque. L'effet final de ces altérations sur la fonction systolique, mais surtout sur la relaxation et le remplissage ventriculaire est mal connu.

### **2. 3. Anomalies fonctionnelles :**

Si les anomalies de structure sont fréquemment présentes au cours du choc septique, elles ne sont ni nécessaires, ni spécifiques, et il semble par conséquent que la dysfonction myocardique septique soit plus la conséquence d'une diminution du nombre de cardiomyocytes fonctionnels que d'une mort cellulaire étendue.

Des anomalies portant sur la respiration mitochondriale pourraient intervenir dans la dysfonction myocardique septique. Le NO, via la production de péroxynitrite pourrait jouer un rôle. Le péroxynitrite puissant agent oxydant qui aurait plusieurs cibles (chaîne respiratoire mitochondriale, membrane cellulaire lipidique, protéine, ADN) [78] peut bloquer de manière irréversible les complexes I, II et III [84]. Une étude animale récente tend à aller dans le même sens en démontrant un effet bénéfique d'un inhibiteur de la formation du ONOO<sup>-</sup> sur la défaillance myocardique des rats endotoxéniques [85]. Ainsi, ces atteintes des différents acteurs du métabolisme énergétique du cardiomyocyte pourraient rendre compte des altérations du rendement et de l'efficacité myocardique rencontrés au cours du sepsis.

Cependant, la perfusion intracoronaire de donneur de NO entraîne *in vitro* une diminution de la contractilité et une amélioration de la fonction diastolique en particulier la relaxation. L'atteinte systolique engendrée par le NO serait due à une activation de la guanylate cyclase soluble avec augmentation du GMPc. Le GMPc aurait un effet inotrope négatif.

### **2.5. Hémostasie calcique et couplage excitation–contraction :**

Dans le sepsis et l'état de choc septique, on retrouve une altération des mouvements calciques et une diminution de la sensibilité des myofilaments au calcium. Le calcium intracytoplasmique conditionne la *contractilité* des fibres myocardiques. Les mouvements calciques sont régulés par les canaux calciques surtout de type L pour la contraction, et par la pompe calcique ATP

dépendante sarcoplasmique, l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  jouant un rôle passif. Dans différents modèles de sepsis, il a été démontré une diminution des canaux calciques de type L en lien avec une diminution de la fonction myocardique et une diminution du transport du calcium par les pompes calciques et l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . À côté de ces altérations du flux calcique, des arguments plaident pour une diminution de la sensibilité des myofilaments au calcium sur différents modèles animaux [86].

## **2. 6. Atteinte de la fonction systolique et diastolique :**

De nombreuses études expérimentales animales ont clairement 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 (RVS) suggère fortement la présence d'une véritable dépression myocardique intrinsèque.

Jardin [87] et Parker [88] 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 (évaluée par la confrontation entre la fraction d'éjection et la post-charge ventriculaire gauche).

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. Atteinte de la fonction hémodynamique cardiovasculaire :**

La dysfonction cardiovasculaire a pour conséquence une insuffisance circulatoire aiguë qui est caractérisée par des altérations microcirculatoires et macrocirculatoires. L'atteinte macrocirculatoire est en grande partie due à l'impact de la microcirculation sur la macrocirculation et est marquée par une vasodilatation artérielle et veineuse importante, résultant de la dysfonction vasculaire comme cité dans le tableau ci-dessous.

### Altérations microcirculatoires

- Perméabilité capillaire et extravasation
- Activation de la coagulation
- Altération de la vasomotricité artériolaire
- Hyporéactivité vasculaire aux vasoconstricteurs
- Troubles de l'extraction d'O<sub>2</sub>

### Altérations macrocirculatoires

- Hypovolémie relative et absolue
- Vasoplégie (résistances vasculaires systémiques)
- Hypotension
- Dysfonction myocardique
- Altération de la distribution des débits régionaux

La pression artérielle étant essentiellement générée par le tonus artériolaire, une faillite de ce dernier entraîne classiquement une hypotension artérielle systolo-diastolique. La baisse du débit cardiaque et des résistances vasculaires à l'effet vasoconstricteur des catécholamines et de l'angiotensine II contribue indirectement à la baisse de la pression artérielle [89].

L'hypovolémie (baisse du volume sanguin efficace) est d'abord absolue par augmentation de la perméabilité microvasculaire (fuite plasmatique), par des pertes hydrosodées (digestives et cutanées) et par des hémorragies (digestives). L'hypovolémie est ensuite relative, secondaire à une modification du tonus vasculaire dont la résultante est le plus souvent une vasoplégie.

La diminution de la masse sanguine circulante au cours de l'hypovolémie entraîne une baisse du retour veineux. Cette baisse du retour veineux est responsable d'une baisse du débit cardiaque, elle-même responsable d'une hypotension artérielle [47].

Lors de la période d'hypovolémie la vasoconstriction induite par la stimulation sympathique touche préférentiellement les circulations musculocutanée, splanchnique et rénale. Elle permet une redistribution du débit cardiaque et du transport artériel en oxygène vers les circulations dites protégées que sont les circulations coronarienne et cérébrale, pour assurer leurs besoins métaboliques. Cette vasoconstriction s'exerce sur les fibres musculaires lisses artérielles et veineuses. La vasoconstriction veineuse conduit à une mobilisation du volume sanguin contenu dans ces circulations et contribue ainsi au maintien du retour veineux.

Les  $\alpha 1$  adrénorécepteurs sont responsables de la vasoconstriction artérielle ; la vasoconstriction veineuse est le résultat d'une activation conjointe des  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ -adrénorécepteurs.

La vasoconstriction sympathique favorise également les mouvements liquidiens transcapillaires, par le biais d'une diminution de la pression hydrostatique capillaire qui favorise un passage liquidien de l'interstitium vers le capillaire. Ainsi, ces mouvements transcapillaires participent à la reconstitution du retour veineux et du volume plasmatique [89].

#### **4. Altérations métaboliques 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'œdème 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 [89].

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[90]. Un catabolisme protéique augmenté peut jouer un rôle non négligeable dans l'apparition des défaillances multi organes [91].

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 gastro-intestinal.

#### **VI. Traitements utilisés dans le cas de choc septique :**

Le premier objectif du traitement du choc septique est la détermination de l'agent infectieux. Son élimination se fera par l'administration des médicaments appropriés ou à l'aide d'une intervention chirurgicale qui vise le drainage du site d'infection. Selon l'état du patient, le



traitement peut comprendre l'administration de liquides ou de médicaments visant l'augmentation de la tension artérielle, l'utilisation de la ventilation mécanique pour faciliter la respiration ou encore la dialyse pour pallier l'insuffisance rénale.

On a montré récemment que les stéroïdes pouvaient être très utiles dans le traitement du choc septique. Cependant, des recherches ont mis en évidence de nouveaux produits comme la protéine C activée qui peuvent augmenter les chances de survie lors d'un sepsis.

Jusqu'à tout récemment, aucun agent et aucune stratégie de traitement n'ont permis d'observer une efficacité suffisante pour qu'ils soient employés de façon systématique dans le traitement du sepsis. Jusqu'à l'avènement de la PCa, aucun agent et aucune stratégie de traitement ne s'était montré efficace pour améliorer le pronostic du choc septique [92].

Dans ce contexte, notre travail de recherche a eu pour objectif d'améliorer les stratégies thérapeutiques utilisées en clinique dans le traitement de la dysfonction cardiovasculaire observé au cours du choc septique. De ce fait, nous avons développé dans cette partie de généralité bibliographique seulement les traitements utilisés dans nos études.

## **1. Traitement hémodynamique de la défaillance cardiovasculaire :**

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

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.....

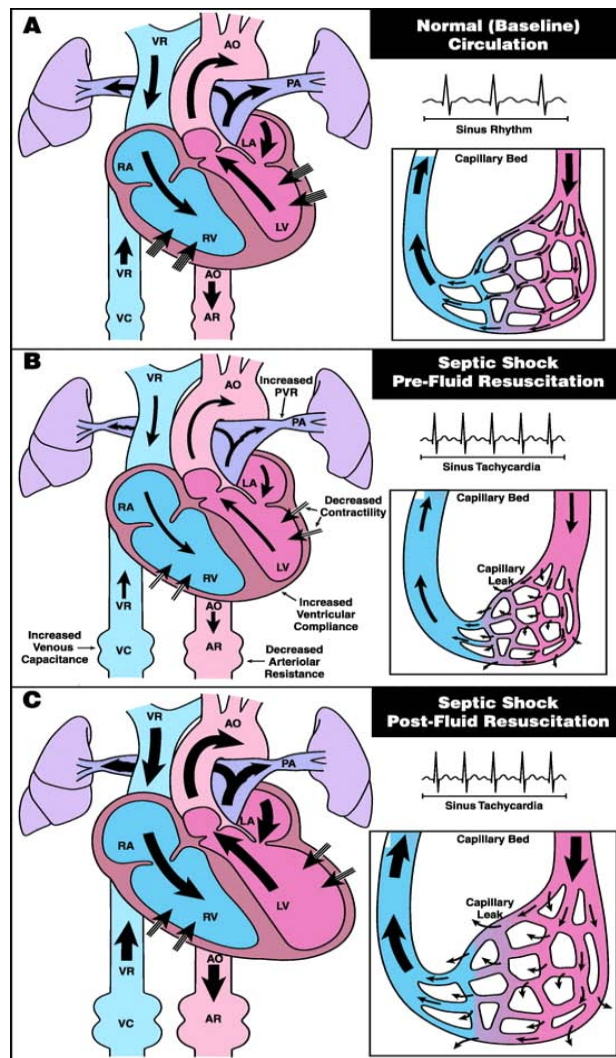
### **1. 1. Expansion volémique :**

Une des premières actions thérapeutiques dans le sepsis est la mise en oeuvre 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. De plus, le sepsis et le choc septique sont associés à des dysfonctions d'organes résultants à la fois de besoins métaboliques accrus et d'anomalies locales de perfusion. Ces dysfonctions peuvent être améliorées par l'augmentation du transport d'oxygène vers les tissus, augmentation obtenue par une expansion volémique et/ou par administration d'agents inotropes. Il conviendra donc d'adapter le contenu au contenant (voir figure 11) [89].

L'épreuve de remplissage nécessite la perfusion rapide d'une quantité prédéterminée de colloïdes

ou de cristalloïdes (250 à 1 000 ml de cristalloïdes en 5 à 15 min chez l'homme)

Les effets hémodynamiques du remplissage vasculaire sont influencés par les volumes administrés, le débit d'administration du soluté, et l'administration concomitante d'amines vasoactives.



**Figure 11** : Impact du remplissage vasculaire sur les changements cardiovasculaires associés au choc septique. **A)** Circulation systémique basale. **B)** Circulation systémique au cours du choc septique et avant le remplissage vasculaire : le retour sanguin au niveau du ventricule gauche est réduit due aux fuites capillaires, à l'augmentation de la capacitance veineuse (VC), et à l'augmentation de la résistance vasculaire pulmonaire. Le volume systolique est compromis par diminution de la contractilité du ventricule gauche et droit. **C)** Le remplissage vasculaire compense les fuites capillaires, augmente la capacitance veineuse et augmente les résistances vasculaires pulmonaires par une re-stabilisation adéquate du retour sanguin au ventricule gauche.

VR, retour veineux; RA, atrium droit; LA, atrium gauche; LV, ventricule gauche; AO, aorte [93].

### **1.1.1. Principe d'évaluation de l'apport liquidien :**

Pour être considéré comme prédictif de l'efficacité d'un remplissage vasculaire, un critère hémodynamique doit permettre de répondre à une première question : le remplissage vasculaire envisagé a-t-il une probabilité raisonnable d'augmenter le volume d'éjection ventriculaire gauche et le débit cardiaque ? Et de combien ?

L'analyse des variations en fonction du cycle respiratoire des courbes de pression artérielle chez des patients ventilés et sous sédation (absence de respiration spontanée) procure un bon reflet de la volémie. Les variations respiratoires de la pression artérielle pulsée ( $\Delta PP$ ) calculés selon la formule  $\Delta PP = (PP_{max} - PP_{min}) / ((PP_{max} + PP_{min}) / 2)$  ont été proposées comme indice prédictif de réponse au remplissage vasculaire. La pression artérielle pulsée ( $PP = PAS - PAD$ ) dépend de la différence de volume sanguin présent dans une artère entre la systole et la diastole et de la compliance de cette artère.

La PP est directement proportionnelle au volume d'éjection du ventricule gauche et inversement proportionnelle à la compliance du système artériel. En faisant l'hypothèse que la compliance artérielle varie peu avec la ventilation, les variations respiratoires de la PP doivent refléter les variations respiratoires du volume d'éjection systolique ventriculaire gauche comme cela a été montré par Jardin et al [87]. Une variation de la pression pulsée supérieure à 13% permet de prédire une réponse favorable définis comme des patients qui augmenteraient leur débit cardiaque de plus de 15% en réponse à l'expansion volémique avec une sensibilité et une spécificité de 94 et 96% [94].

## **1. 2. Correction de l'hypotension par administration de catécholamines :**

Après l'optimisation de la volémie, la persistance d'une hypotension nécessite l'utilisation des agents vasopresseurs. 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 (dopamine, noradrénaline, adrénaline, et la 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 [95] . 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.

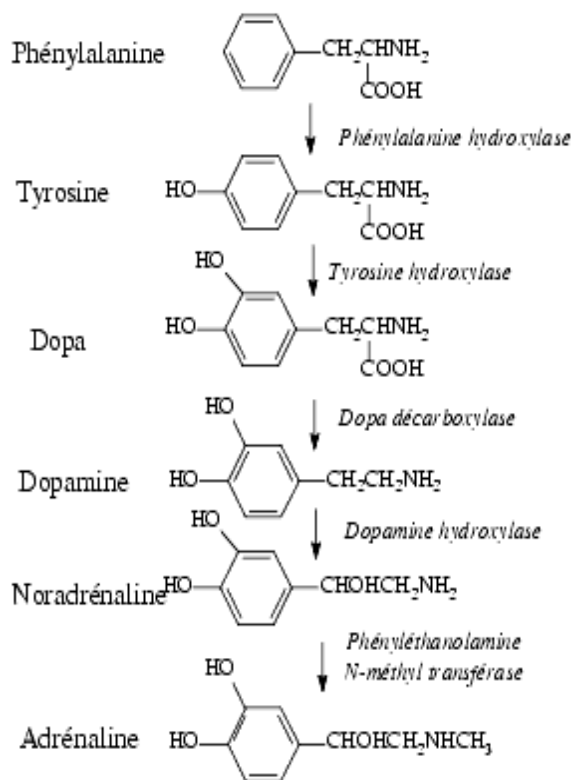
### **1.2.1. Définition des catécholamines :**

Les catécholamines sont des agents cardio-vasoactifs utilisés dans le traitement des défaillances cardio-circulatoires, soit parce qu'elles augmentent le volume d'éjection systolique, soit parce

qu'elles augmentent les résistances vasculaires systémiques ayant dans tous les cas pour objectif la restauration d'une pression artérielle systémique compatible avec une perfusion tissulaire satisfaisante. Les médicaments cardio-vasoactifs sont classés selon leurs modes d'action en inotropes si leur action principale est l'amélioration de la performance ventriculaire, et en vasoconstricteurs si leur action principale est une augmentation des résistances vasculaires périphériques.

### 1.2.2. Pharmacologie des principales catécholamines:

Les catécholamines endogènes sont synthétisées dans l'organisme à partir d'un précurseur commun : la L-tyrosine, acide aminé qui provient de l'alimentation, est présente dans le sang. La synthèse des catécholamines commence par l'hydroxylation de la L-tyrosine en L-DOPA par la tyrosine hydroxylase. Cette étape est une étape limitante de la synthèse des catécholamines, cette enzyme cytoplasmique étant régulée par de nombreux facteurs dont le produit de synthèse terminal (noradrénaline ou adrénaline) varie selon les neurones ("feed back" négatif). La structure des catécholamines est principalement caractérisée par un noyau benzène, d'une chaîne latérale éthylamine et possédant en plus des radicaux "OH" substitués dans les positions 3 et 4 du cycle aromatique. Cette particularité est en partie responsable de l'importance de leurs effets agonistes  $\alpha$  et  $\beta$ ) (figure12).



**Figure 12:** Biosynthèse des catécholamines endogènes

D'une manière générale, les catécholamines ont une  $\frac{1}{2}$  vie très courte, ce qui impose en pratique une perfusion continue. Qu'elles soient endogènes ou administrées comme médicament, elles diffusent à travers l'endothélium pour se fixer aux récepteurs. Durant leur distribution dans l'organisme, elles peuvent être métabolisées par un captage tissulaire ubiquitaire (uptake-2) ou un captage par les extrémités neuronales sympathiques (uptake-1). Le métabolisme initial des catécholamines est assuré de façon prédominante par la mono-amine oxydase (MAO) et la catéchol-O-méthyltransférase (COMT) [96].

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 100pg/ml pour l'adrénaline et 1000 pg/ml pour la noradrénaline chez l'homme), puis d'un accroissement linéaire de l'effet en fonction du logarithme des concentrations [97]. La posologie et la concentration plasmatique sont liées par une relation linéaire [68, 98]. L'effet maximal est habituellement atteint pour des doses comprises entre 100 et 1000 fois la dose seuil chez l'homme contre 10 à 20 fois pour les rats.

### **1.2.3. Mode d'action des catécholamines :**

Les catécholamines sont des agonistes des récepteurs membranaires du système adrénergique. Dans le système cardiovasculaire, trois types de récepteurs sont impliqués : les récepteurs alpha, bêta et dopaminergiques (DA). Les catécholamines stimulent de façon plus ou moins préférentielle un ou plusieurs de ces types de récepteurs.

#### **- Les récepteurs adrénergiques :**

Les récepteurs adrénergiques (ou adrénorécepteurs) sont une classe de récepteurs couplés aux protéines G, cible des catécholamines. Les récepteurs adrénergiques se lient de préférence à leurs ligands endogènes, c'est à dire adrénaline et noradrénaline, on distingue plusieurs types de récepteurs selon leur structure et leurs ligands :

- *Les récepteurs  $\alpha$ -1* sont localisés sur la fibre musculaire lisse en regard d'une terminaison nerveuse noradrénergique (récepteurs post-synaptiques). Leur stimulation entraîne une vasoconstriction.

- *Les récepteurs  $\alpha$ -2* sont localisés, soit en position présynaptique et leur stimulation entraîne une diminution de la libération de la noradrénaline dans la fente synaptique, soit sur la fibre musculaire lisse en dehors d'une terminaison nerveuse noradrénergique et leur stimulation entraîne une vasoconstriction. Ces derniers récepteurs sont stimulés physiologiquement par l'adrénaline circulante d'origine surrénalienne.

-*Les récepteurs  $\beta$ 1* sont localisés principalement sur la fibre myocardique (récepteurs

postsynaptiques) et leur stimulation entraîne principalement une augmentation de la force de contraction et de la fréquence cardiaque.

- *Les récepteurs  $\beta_2$*  sont localisés, soit sur la fibre musculaire lisse vasculaire (récepteurs postsynaptiques) et leur stimulation entraîne une vasodilatation, soit en position pré-synaptique et leur stimulation entraîne une augmentation de la libération de la noradrénaline dans la fente synaptique.

- *Les récepteurs  $\beta_3$ -adrénergiques* jouent un rôle important dans la relaxation des fibres musculaires lisses de l'utérus. Durant plusieurs années ils ont également été présentés comme acteurs majeurs dans la stimulation de la lipolyse des cellules adipeuses.

- *Les récepteurs  $DA_1$*  : sont localisés principalement sur la fibre musculaire lisse des vaisseaux rénaux et splanchniques et leur stimulation entraîne une vasodilatation.

- *Les récepteurs  $DA_2$*  sont présynaptiques et leur stimulation, comme celle des récepteurs  $\alpha_2$ , entraîne une diminution de la libération de la noradrénaline dans la fente synaptique.

*Après liaison des catécholamines à leurs récepteurs, ils exercent des effets cardiovasculaires différents selon la dose libérée et l'organe cible.*

#### **1.2.4. Effets cardiovasculaires des catécholamines :**

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

- **L'adrénaline :**

C'est une hormone naturelle sympathomimétique de référence. Elle est synthétisée et sécrétée par la médullosurrénale en réponse au stress, sa demi-vie est brève en raison de la rapidité de son élimination par le métabolisme essentiellement hépatique, mais aussi par l'importance de son recaptage neuronal. C'est une catécholamine bêta et alpha adrénergique d'action directe. Son action est complexe du fait d'une part de l'inhomogénéité de la répartition des récepteurs et d'autre part des effets doses dépendant sur les récepteurs. L'adrénaline a une action essentiellement cardiaque inotrope bêta1 et alpha 1. Ces effets au niveau cardiaque et vasculaire sont différents.

- *Cardiaques* : L'adrénaline est un puissant agent inotrope positif essentiellement par action sur les récepteurs bêta 1 du myocarde. Il y a aussi une action inotrope positive par action sur les récepteurs alpha 1. Elle a aussi un effet chronotrope positif, c'est à dire tachycardisant. Cet effet

chronotrope est contrecarré quand on emploie de fortes posologies d'adrénaline car l'action vasopressive entraîne une augmentation du tonus cholinergique dont l'effet bradycardisant neutralise l'effet chronotrope positif. Elle a un effet dromotrope positif, elle augmente la vitesse de conduction au niveau du faisceau de His. Elle a un effet bathmotrope positif, elle a un effet arythmogène. Les deux récepteurs alpha et bêta sont impliqués. Elle augmente nettement le travail cardiaque.

- *Vasculaires* : L'effet sur la pression artérielle systémique est dose dépendant. A faible dose l'effet bêta prédomine entraînant une hypotension. Puis dès que les posologies augmentent, l'effet alpha devient prédominant entraînant une augmentation de la pression artérielle. Sur les veines l'effet vasopresseur domine, il donne une veinoconstriction.

- *Métabolisme* : L'adrénaline élève la glycémie par inhibition de l'insulinosécrétion.

- **La noradrénaline :**

C'est une catécholamine naturelle très proche chimiquement de l'adrénaline. Libérée par les neurones adrénergiques post ganglionaires. Son catabolisme est strictement comparable à celui de l'adrénaline. La demi-vie est de 4 minutes. Son effet prédominant est la stimulation des récepteurs alpha. Elle agit également sur le récepteur bêta. Elle possède des effets sur le cœur, les vaisseaux et le métabolisme.

- *Cardiaques* : Les effets sont liés essentiellement à l'activation des récepteurs bêta<sub>1</sub>. Ils sont rapidement masqués par l'effet dominant alpha sur les vaisseaux. L'effet inotrope positif existe mais n'a pas de traduction en terme d'augmentation du débit cardiaque. L'effet chronotrope se traduit le plus souvent par une bradycardie réflexe à l'hypertension artérielle. Sans augmentation du débit cardiaque elle permet une augmentation de la post-charge. L'effet dromotrope négatif peut donner des troubles de la conduction.

- *Vasculaires* : La noradrénaline entraîne une vasoconstriction intense intéressant l'ensemble du système artériel et veineux. Cet effet est dose dépendant.

- *Métaboliques* : Les effets métaboliques de la noradrénaline sont beaucoup moins marqués que ceux de l'adrénaline : l'hyperglycémie est peu importante.

- **La dopamine :**

La dopamine est une catécholamine naturelle. C'est un neurotransmetteur physiologique au niveau du système nerveux central. Elle a un triple métabolisme. Au cours de perfusion de dopamine les taux sériques sont atteints au bout de 5 minutes. La demi-vie est d'une minute. Ses effets sont dose dépendant. Elle stimule les récepteurs alpha, bêta et delta.

Les effets dopaminergiques n'existent que pour des doses comprises entre 2 g et 5 µg/Kg/min.

L'effet bêta apparaît à partir de 2,5 µg/Kg/min et semble croissant jusqu'à des doses de 30 µg/Kg/min. Les effets alpha débutent pour des doses comprises entre 12 et 15 µg/Kg/min et l'effet presseur devient alors dose dépendant jusqu'à 30 µg/Kg/min.

- *Cardiaques* : L'effet inotrope positif de la dopamine est moins marqué que celui de l'adrénaline et de la dobutamine. L'effet inotrope est dose dépendant. Il apparaît à partir de 2 µg/Kg/min et va croître jusqu'à 30 µg/Kg/min. L'effet chronotrope apparaît à partir de 12 µg/Kg/min. L'effet tachycardisant va croître jusqu'à 30 µg/Kg/min.

La dopamine est la moins arythmogène des catécholamines : son effet bathmotrope positif est faible

- *Vasculaires* : À des doses inférieures à 5 µg/Kg/min elle entraîne une vasodilatation de l'ensemble de la circulation rénale. Elle augmente directement la natriurèse. Elle augmente le débit sanguin splanchnique. La stimulation des récepteurs alpha débute pour des doses comprises entre 12 et 15 µg/Kg/min et l'effet presseur devient alors dose dépendant.

- **La dobutamine :**

Le chlorhydrate de dobutamine est une catécholamine de synthèse. L'effet dominant est une stimulation des récepteurs bêta1. Elle a de plus une action stimulante sur les récepteurs bêta2. Elle a une action agoniste et antagoniste sur les récepteurs alpha. Mais la somme des effets bêta2, alpha agonistes et alpha antagoniste laisse une place prépondérante à une résultante vasodilatatrice.

- *Cardiaques* : Les effets cardiaques sont le fait de la stimulation des récepteurs  $\beta$  1. Il existe cependant une activation des récepteurs  $\alpha$ 1 qui est responsable d'un effet inotrope positif. L'effet inotrope positif de la dobutamine est du à l'action sur les récepteurs  $\beta$  1 et  $\alpha$ . L'avantage de la dobutamine repose sur son action inotrope positive puissante sans effet chronotrope majeur. L'épuisement de l'effet inotrope positif de la dobutamine relève du mécanisme de la down régulation : c'est à dire de la désensibilisation des récepteurs  $\beta$ . L'effet chronotrope positif est un effet tachycardisant dose dépendant qui n'est marqué qu'en cas d'hypovolémie.

- *Vasculaires* : Les effets vasculaires sur les récepteurs bêta2 induisent une vasodilatation et sont dose dépendant. Entre 4 et 8 µg/Kg/min il existe un effet alpha agoniste responsable d'une vasoconstriction. Donc à ces doses les effets alpha et bêta se neutralisent et il n'existe aucune modification du tonus vasomoteur. En revanche dès 15 µg/Kg/min l'effet  $\beta$ 2- vasodilatateur devient prépondérant.

*Au cours du choc septique on assiste à une modification des taux de catécholamines libérés avec une atteinte de la voie catécholaminergique ainsi que la réponse contractile des cellules*



*cardiaque et vasculaires. Cela implique une demande plus importante en catécholamines exogène et une modification des effets hémodynamiques selon la dose et la localisation.*

### **1.2.5. Effets hémodynamiques des catécholamines dans le choc septique :**

Toutes les amines pressives augmentent la pression artérielle de manière dose dépendante. Cependant plusieurs études ont montré que la dopamine est moins puissante [99, 100]. De fait la dopamine administrée seule jusqu'à une dose maximale de 25 µg/kg/min est souvent incapable de corriger la pression artérielle de sorte que l'adjonction d'une autre amine pressive est nécessaire. Une étude multicentrique récente portant sur 110 patients a montré que 60% des patients requéraient l'adjonction de norépinéphrine lorsque la dopamine était utilisée comme premier agent vasopresseur [101]. Seules quelques études ont comparé chez un petit collectif de patients les effets de la dopamine et de la noradrénaline. La dopamine était capable d'obtenir le niveau prédéfini de pression artérielle chez 1/3 des patients étudiés par Martin et coll [99]. Mais chez tous les patients étudiés par Marik et Mohedin [102] et par Ruokonen [103] et coll. Ces différences reflètent largement la différence de sévérité des patients étudiés, les doses de noradrénaline étant également plus élevées chez Martin et coll [99].

Les avantages théoriques de la dopamine et de l'adrénaline sur la noradrénaline et la phényléphrine résident principalement dans une meilleure préservation du débit cardiaque grâce à stimulation bêta adrénergique. Qu'en est-il en réalité ? Plusieurs études ont montré que la différence de débit cardiaque obtenue avec la dopamine et la noradrénaline est assez variable : dans certaines études elle était forte [104, 105] mais faible voire même inexistante dans d'autres [100, 102]. Par contre, plusieurs études ont montré que l'utilisation d'adrénaline est associée à un débit cardiaque plus élevé que celle de dopamine et noradrénaline. Contre toute attente, les effets de la phényléphrine ne semblent pas différer de ceux de la noradrénaline, deux études ayant comparé les effets de ces 2 agents n'ont en effet pas pu montrer de différence de débit cardiaque avec ces 2 agents [106, 107].

De même, une tachycardie voire une tachyarythmie est plus souvent attendue avec la dopamine et l'adrénaline qu'avec la noradrénaline et la phényléphrine. L'incidence exacte des tachyarythmies reste difficile à déterminer, mais celles-ci sont facilitées par des désordres ioniques sous-jacents et surtout par l'hypovolémie.

Les effets des amines pressives sur les circulations régionales ont fait l'objet de nombreuses publications. Il faut dissocier l'effet de ces agents sur la circulation splanchnique et sur la circulation rénale, ces deux circulations pouvant se comporter différemment. Différents facteurs vont affecter la réponse à ces agents et rendent parfois difficile la comparaison des diverses études. Parmi ces facteurs retenons, le niveau de pression artérielle avant et après traitement (une

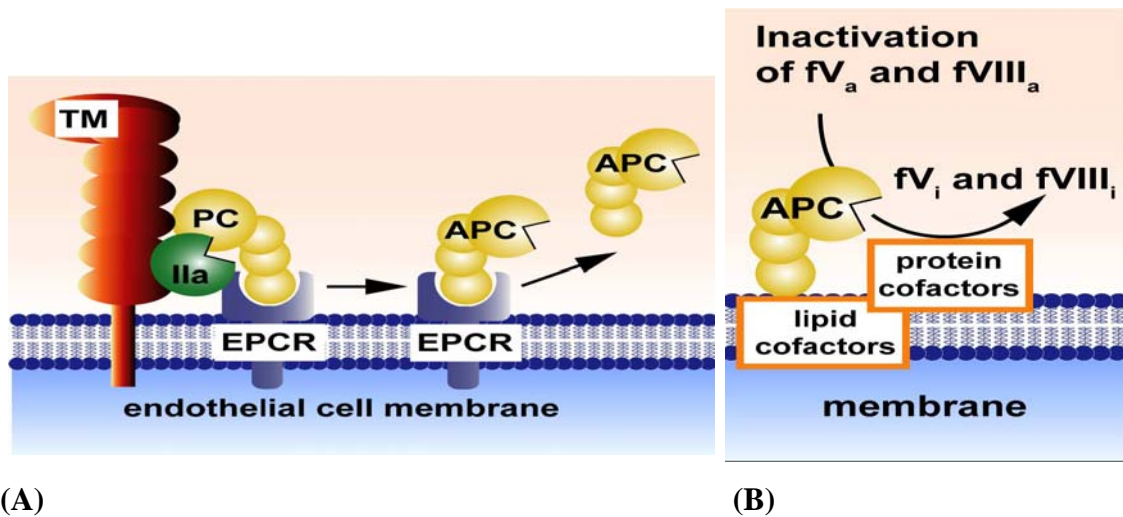
augmentation de pression artérielle de 20 mmHg n'aura pas les mêmes conséquences si la pression artérielle avant traitement est de 45 ou de 65 mmHg), le niveau de réanimation liquidienne et, pour les modèles animaux, le modèle (endotoxine versus infection), les agents anesthésiques et l'espèce animale. Enfin toutes ces amines ont des effets métaboliques non négligeables. L'adrénaline augmente fortement le métabolisme cellulaire et est associée à une augmentation des taux de lactate, la dopamine a des effets endocriniens et tous ces agents sont immunosuppresseurs. Cependant, l'impact de ces effets sur l'évolution du patient reste indéterminé.

## **2. Traitement par Protéine C activée**

Récemment, il a été démontré que plusieurs inhibiteurs de la coagulation sont capables non seulement d'améliorer les troubles de la coagulation, mais aussi de diminuer l'inflammation et de réduire la mortalité de différents modèles d'infections sévères. Parmi ces substances ayant fait l'objet d'essais cliniques au cours du sepsis, dont l'antithrombine III et l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (Tissue Factor Pathway Inhibitor), la protéine C activée apparaît comme la thérapeutique la plus pertinente dans la protection de l'hôte contre la CIVD au cours du sepsis.

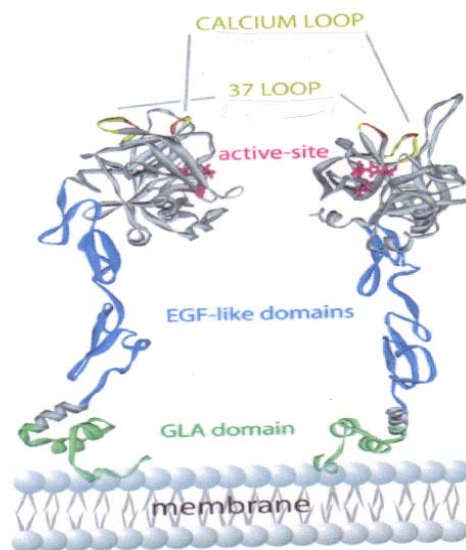
### **2. 1. Pharmacologie de la protéine C :**

La PC est une glycoprotéine synthétisée par le foie sous la dépendance de la vitamine K et à l'état de zymogène inactif. Elle circule dans le plasma sous cette forme avec une demi-vie de 8h. Physiologiquement, la thrombine formée lors de l'activation de la coagulation peut limiter sa propre génération en activant un des systèmes anticoagulants naturels «le système de la PC». La thrombine acquiert ses propriétés anticoagulantes après fixation à un récepteur présent à la surface des cellules endothéliales, la thrombomoduline (TM), le complexe thrombine/TM activant la forme zymogène de la protéine C en protéine C activée (PCa). La PCa forme avec la protéine S un complexe anticoagulant qui inactive par protéolyse les facteur Va (proaccéléline) et VIIIa (antihémophilique A) indispensables au bon fonctionnement et l'amplification de la cascade de la coagulation, et limite ainsi la génération de thrombine (figure 13) [108]. *In vivo*, la liaison de la PC à son récepteur, Endothelial cell protein C receptor (EPCR), facilite son activation par le complexe thrombine/TM [109].



**Figure 13 :** Activation de la PCa (A) et activité anticoagulante (B)

La forme activée de la protéine C est composée de plusieurs domaines, comprenant la sérine protéase domaine (Loop), 2 epidermal growth domaine (EGF) et le Gla domaine. Le Gla domaine est constitué de 45 résidus d'acides aminés, parmi-eux 9 résidus d'acides glutamiques sont modifiés par une post-traduction en des résidus carboxyglutamiques (Gla). Le résidu Gla facilite la liaison des ions calciques et de ce fait la transition structurale (figure 14).



**Figure 14 :** Structure de la PCa

## 2.2. Système de la PC activée dans le sepsis:

L'activation intense de la coagulation observée au cours du sepsis peut entraîner la consommation de certaines de ces protéines capables d'inhiber la coagulation [110]. Les déficits acquis de ces systèmes inhibiteurs de la coagulation qui en découlent, participent au déséquilibre de la balance hémostatique [108]. Au cours du sepsis, on assiste à une atteinte du système de la PCa par altération de l'endothélium, une diminution des taux membranaires de

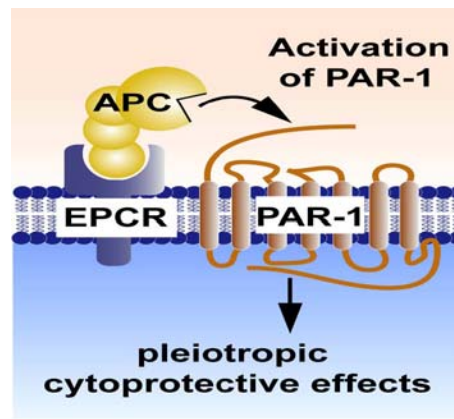
thrombomoduline, ainsi qu'une "down régulation" de l'EPCR qui conduisent à un déséquilibre entre la PC et sa forme activée, entraînant un microenvironnement proinflammatoire et prothrombotique. Les concentrations plasmatiques de PC s'abaisse rapidement ce qui s'accompagne d'une moindre inhibition de la génération de thrombine.

### **2. 3. Protéine C recombinante humaine activée (PCRhA) comme traitement dans le sepsis :**

La drotrécogin alfa activée, analogue recombinant de la protéine C activée endogène est obtenue à partir de cultures cellulaires de mammifères dans lesquelles le gène humain de protéine C avait été inséré [111]. L'administration de PCRhA a été envisagée au cours du sepsis avec l'objectif de réduire l'extension de la coagulopathie et de réduire la réaction inflammatoire. A ce jour, seule l'étude PROWESS, utilisant de la protéine C recombinante humaine activée, a montré qu'un traitement modulant les voies de coagulation procurait un avantage en terme de survie dans le sepsis [112] à la dose de 24 µg/kg/h pour une durée de 96 heures. La mortalité du groupe placebo (30,8 %) était significativement plus élevée que le groupe PCRhA (24,7 %) donnant une réduction relative de mortalité de 19,4 %. Une diminution de la concentration des D-dimères et de l'IL-6 a également été observée dans le groupe traité. Les résultats de l'étude PROWESS sont confirmées par l'étude ENHANCE [113]. À la suite de ces travaux, plusieurs études complémentaires cliniques et fondamentales avaient comme objectif d'éclaircir le mécanisme par lequel la PCa améliorerait la survie dans le choc septique. A la lumière de ces publications, il a été rapporté que la PCa outre son rôle crucial dans le maintien de l'équilibre hémostatique, posséderait des effets cellulaires cytoprotecteurs très marqués.

#### **2.3.1. Effet cytoprotecteur :**

Même si l'on sait depuis longtemps que la PCa est capable de se lier à des protéines membranaires (EPCR et TM), ce n'est que récemment que son mécanisme d'action cellulaire a été élucidé : il semble en effet qu'une fois liée à l'EPCR, la PCa devienne capable de cliver le Protease Activated Receptor 1 (PAR1) présent à la surface de certaines cellules et conduise ainsi à l'activation de différentes voies de signalisation intracellulaires [114], ceci aboutit à un effet cytoprotecteur (figure 15). Cet effet cytoprotecteur inclut : une altération de l'expression génique ; une activité anti-inflammatoire ; une activité anti-apoptotique ; et une protection de la fonction endothéliale [114]. Par ce mécanisme cytoprotecteur la PCa limite la synthèse des cytokines proinflammatoires ; des radicaux libres oxygénés ; et diminue la perméabilité endothéliale au cours du sepsis.



**Figure 15 :** Activité cytoprotectrice de la PCa

### **2.3.2. Effets anti-inflammatoires :**

La PCa se trouve en particulier impliquée dans les processus inflammatoires par différents mécanismes. Elle réduirait l'inflammation, par diminution de la génération de thrombine d'une part, [115-118]-[118, 119] mais aussi par des mécanismes directs via sa fixation au récepteur EPCR et le clivage du récepteur PAR-1 [120-125].

Murakami et al ont montré, dans un modèle endotoxinique chez le rat que l'administration préalable de la PCa prévenait la survenue du pic de TNF- $\alpha$  circulant. Les mêmes constatations ont été rapportées sur de nombreux modèles cellulaires et animaux [126-129] ou l'on observe une inhibition de la synthèse de différentes cytokines inflammatoires (IL1, IL6, IL8). White et al [130] ont exploré les voies de signalisation pouvant être impliqué dans ce processus, ils ont observé une inhibition de la translocation nucléaire du NF- $\kappa$ B sur une lignée de monocytes après incubation dans un milieu riche en PCa, avec comme conséquence directe une diminution de la production de TNF $\alpha$  après exposition au LPS. En plus de l'inhibition des cytokines proinflammatoire, la PCa interviendrait dans l'interaction leucocytes endothélium par modulation de l'expression des protéines d'adhésion endothéliales et leucocytaires (ICAM-1, VCAM, Selectin E ..... ) [127, 131], cela a été démontré dans un modèle d'hamster, la perfusion de PCa diminue significativement les propriétés d'adhésion des leucocytes sur les artérioles et les veinules, et ce indépendamment de son effet anti-coagulant qui est minime aux concentrations utilisées chez les rongeurs. Sturn et al [132] ont directement mesuré l'action cellulaire de la PCa sur les leucocytes par fluorimétrie et ils ont démontré qu'elle bloquait leur chimiotactisme et leur mécanisme de migration par action sur leurs récepteurs.

Sur lignée cellulaire endothéliale, la PCa diminue l'adhésion leucocytaire médiée par E-sélectine [120, 133]. Elle augmente significativement l'expression de la COX2 et le relargage de prostaglandine [120, 134], ainsi que la synthèse endothéliale d'une chémokine, la fractalkine, qui module l'interaction endothelioleucocytaire [121, 135].

### **2.3.3. Activité antiapoptotique :**

En plus des effets anti-inflammatoires de la PCa, cette dernière serait douée d'une activité anti-apoptotique mise en évidence *in vitro* puis *in vivo*. Elle a en effet été impliquée dans l'inhibition de l'apoptose sur un modèle de cellules endothéliales dans un premier temps, puis *in vivo* sur un modèle d'ischémie cérébrale murin. Cet effet nécessite la présence du site actif de l'enzyme puisqu'une PC mutée au niveau de son site actif en est dépourvue. Enfin, comme pour ses effets anti-inflammatoires, il semble que la PCa doit se fixer à l'EPCR puis cliver le PAR-1 pour induire un effet antiapoptotique [118]. La réduction de l'activité apoptotique est associée à une réduction de la mortalité dans le sepsis.

La PCa pour son action antiapoptotique agit à plusieurs niveaux de la voie de signalisation, incluant la dégradation de l'ADN, l'activation des caspases-3, et la translocation de la phosphatidylsérine. En ce moment, la voie de la PCa impliqué dans l'inhibition de l'apoptose n'est pas encore bien déterminée. Durant le stress hypoxique des cellules endothéliales cérébrales, la PCa réduit la up-régulation des Bax et maintient le niveau protecteur de la protéine Bcl-2, la thérapie de stimulation de la voie apoptotique intrinsèque.

### **2.3.4. Protection de la barrière endothéliale:**

Chez l'animal endotoxémique, les études en microscopie intravital ont montré que la PCa à basse dose atténuait l'adhésion leucocytaire à l'endothélium, prévenait la diminution de la densité capillaire fonctionnelle et empêchait la diminution de la vitesse érythrocytaire [135]. Cependant, à haute dose, ces effets s'accompagnaient d'une extravasation des globules rouges compatible avec un saignement vasculaire. La PCa agit également sur la perméabilité de la barrière endothéliale, entravant ainsi la migration transendothéliale des leucocytes. La PCa diminue ainsi les troubles de perméabilité induits par la thrombine via l'activation de sphingosine kinase cellulaire et la génération de sphingosine phosphate [136]. Feistritzer [137] et Finigan [136] ont rapporté que la protection de la barrière endothéliale par la PCa passe par les récepteurs EPCR et PAR-1, l'activation de PAR-1 par la PCa stimule les sphingosine Kinase-1 (SphK-1) pour former sphingosine 1 phosphate (S1P). S1P directement ou via leurs récepteurs contribue à la protection de la barrière endothéliale par réduction de la perméabilité endothéliale et une stabilisation du cytosquelette [114].

### **2.3.5. Autres effets cellulaires :**

En plus de son action anti-inflammatoire et antiapoptotique, la PCa interviendrait aussi dans le cycle cellulaire [131], la prolifération, la différenciation [126, 138] et l'angiogénèse [131].

La PCa peut induire la prolifération des cellules endothéliales et leur angiogénèse *in vitro* et *in vivo* via leur récepteur EPCR et PAR-1. La PCa stimule la prolifération et la migration des kératinocytes et peut contribuer à la dégradation de la matrice extracellulaire par activation des gelatinases matrix metalloproteinase 2 (MMP-2). Comme elle peut favoriser la migration et la prolifération des cellules endothéliales via une up régulation des cytokines endothéliales (IL-6 et IL-8) ou les chémokines MCP-1. Dans certaines conditions La PCa peut augmenter l'expression de la MCP-1, aussi bien au niveau de l'ARN et des protéines, par la suppression de la NOS et la stabilisation de l'ARNm.

L'effet antioxydant de la PCa a été rapporté par Yamaji K 2005 [139], l'incubation des macrophages murines avec une dose de la PCa de 10-50µg/ml réduit la génération des métabolites ROS induit par le LPS, elle possède un effet inhibiteur sur la peroxidation lipidique ainsi que sur la formation du AGE (advanced Glycation end-products).

### **2.3.6. Effet sur la dysfonction cardiovasculaire du choc septique:**

L'effet cardiovasculaire bénéfique de la PCa a été observé dans l'étude PROWESS chez des patients septiques. Cependant un meilleur maintien de la pression artérielle à été observé dans des modèles endotoxiniques animaux et humain traités à la PCa [119, 140]. Chez des patients en choc septique la PCa améliore rapidement le statu hémodynamique avec une baisse de la demande en norépinephrine administré pour le maintien de la pression artérielle [141]. Au niveau microcirculatoire la PCa peut aussi améliorer la densité capillaire chez des hamsters endotoxiniques [120]. Isobe et al [119] en utilisant des doses supra pharmacologique (100µg/kg IV), administrée à des rats endotoxiniques, ils ont observés une réversion de l'hypotension par diminution des taux de nitrate/nitrite dans le plasma. La PCa inhibe l'activité de la iNOS par diminution de l'expression de son l'ARNm dans un modèle endotoxinique.

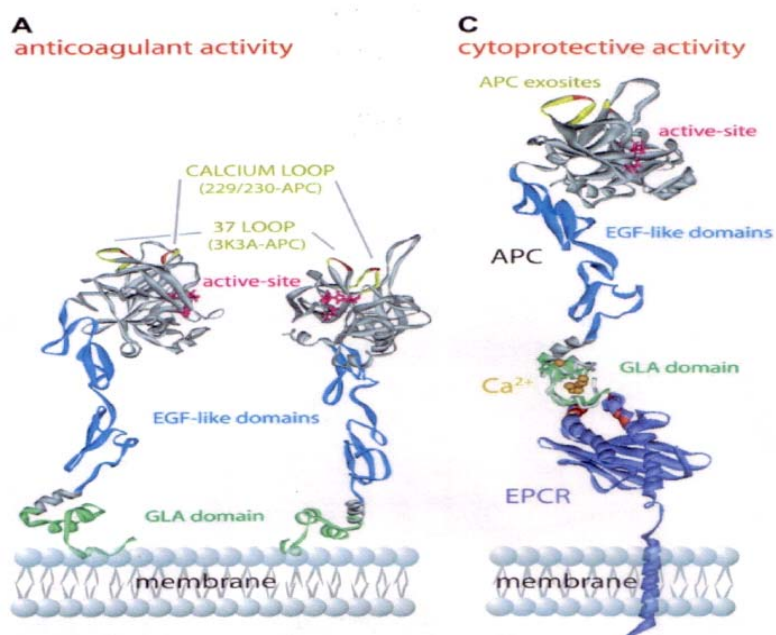
En utilisant des doses importantes de la PCa murine (240µg/kg/h), Favory et al [142] ont démontré que le traitement à la PCa améliore la fonction cardiovasculaire chez des rats traités au LPS. La fonction myocardique était évaluée sur une préparation de coeur isolée, plus spécifiquement la PCa prévient l'hypotension, le déficit de la perfusion microvasculaire et la dépression de la performance systolique. De plus, ils ont observée une diminution de la réponse inflammatoire avec une baisse de l'activité des leucocytes, du niveau de MIF, TNF- $\alpha$  et nitrate nitrite. Murakami K, 1996 [123], a observé une baisse de l'hémorragie vasculaire au niveau pulmonaire chez des rats endotoxiniques traités à la PCa. Mizutani a [143] suggéré que la PCa pourrait avoir un effet protecteur sur l'ischémie reperfusion rénale, non pas par inhibition de la coagulation mais plutôt par inhibition de l'activité leucocytaire. Gupta et al a récemment démontré que la PCa inhibait l'adrénomoduline qui est un peptide à effet vasodilatateur, pro-

oxydant, hypoxique et angiogénique, et qu'en partie par cet effet la PCa reverse l'hypotension induite par le LPS.

#### 2. 4. Activité anticoagulante/activité cytoprotectrice de la Protéine C activée :

L'importance des effets cytoprotecteurs de la PCa observé au niveau cellulaire versus les effets bénéfiques anticoagulants reste un sujet de débat.

Mosnier et Kerschen, [144, 145] ont démontré que la PCa exerce son effet cytoprotecteur et anticoagulant par deux mécanismes différents et indépendants. Pour acquérir son activité anticoagulante extracellulaire, la PCa [146] se lie aux phospholipides anioniques exposés à la surface des cellules endothéliales et des plaquettes activées [146], de ce fait elle inactive le facteur Va et VIIIa de la coagulation (figure 16 a). Pour son action cytoprotectrice, la PCa se lie aux récepteurs EPCR par le Gla domaine et en présence de  $Ca^{+2}$ , elle change de conformation et ainsi permet le clivage du récepteur PAR-1 et stimule les voies de signalisation intracellulaires à l'origine des effets cytoprotecteurs (figure 16 c).



**Figure 16 :** Activité anticoagulante (A) / Activité cytoprotectrice (C)

L'effet anticoagulant de la PCa augmente les risques d'hémorragie chez certains patients septiques, cela impose une limitation de la dose de la PCa administré en thérapeutique. Des études expérimentales sur l'évaluation des anticoagulants naturels tels que l'anti-thrombine et TFPI suggèrent que l'activité anti-coagulante de la PCa, qui est à l'origine des complications



hémorragiques, n'est pas forcément responsable de son efficacité en thérapeutique. Pour soulever ce débat, Mosnier et al [114], via l'ingénierie génétique a pu altérer sélectivement l'activité anticoagulante de la PCa de souris et obtenir ainsi deux types de la PCa mutantes avec très faible activité anticoagulante et aux propriétés cytoprotectrices préservées.

Kerschen AJ [144] a notamment étudié l'efficacité d'une forme de PCa mutée au niveau de son site d'activité anti-coagulante. Le traitement des souris par cette PCa modifiée diminue de façon identique la mortalité après injection de LPS en comparaison avec la PCa native.

## **V. OBJECTIFS DE LA THESE**

## **V. Objectifs de la thèse :**

L'objectif général de ce travail de recherche est d'améliorer et/ou d'évaluer l'intérêt des stratégies thérapeutiques utilisées dans le traitement de la dysfonction cardiovasculaire observée au cours du choc septique.

**Une première partie du travail (Étude 1)** a porté sur l'amélioration de la stratégie thérapeutique « administration du remplissage vasculaire puis des catécholamines », et cela par une administration précoce des catécholamines dans un modèle de choc endotoxinique chez le rat. Nous nous sommes attachés plus particulièrement à évaluer l'impact de cette nouvelle stratégie thérapeutique sur les paramètres hémodynamiques et de perfusion tissulaire.

**Dans une seconde partie du travail (Étude 2, 3)**, nous avons caractérisé les effets bénéfiques cardiovasculaires de l'administration de la PCa dans deux modèles différents de choc endotoxinique.

**Dans l'étude 2**, nous avons utilisé un modèle *in vivo* de choc endotoxinique chez le rat. Nous avons plus particulièrement cherché à mettre en évidence :

- L'impact de l'administration de la protéine C activée sur les paramètres hémodynamiques cardiovasculaires.
- Le mécanisme d'action et les voies de signalisation impliquées dans l'amélioration des paramètres hémodynamiques par la PCa.

**Dans l'étude 3**, nous avons caractérisé les effets protecteurs vasculaires de la PCa dans un modèle *in vitro* de choc endotoxinique chez la souris ; pour cela nous avons évalué l'effet artériel *ex vivo* de la PCa:

- L'impact sur la vasomotricité des artères isolées par des techniques d'artériographie et de myographie.
- Les voies de signalisation impliquées.

*Ces travaux ont donné suite à des publications (acceptées, soumises et en cours de soumission) dans des revues scientifiques; elles sont représentées à la fin de la thèse avec un résumé intégré dans le texte.*

## **VI. RESULTATS DES TRAVAUX**

## **Etude 1 :**

**But de l'étude :** Utilisation précoce des catécholamines dans le choc septique : Evaluation expérimentale d'une nouvelle approche thérapeutique ?

**Article 1: Sennoun N, Montemont C, Gibot S, Lacolley P, Levy B.** «Comparative effects of early versus delayed use of norepinephrine in resuscitated endotoxic shock». *Critical Care Medicine* 2007; 35(7): 1736-40.

### **Résumé de l'article:**

Le choc septique est caractérisé par une inefficacité de la délivrance et de l'extraction tissulaire en oxygénation. Cela implique une interaction complexe entre vasodilatation, hypovolémie absolue et relative, dysfonction myocardique, et altération de la distribution des débits.

L'un des objectifs primordiaux du traitement du choc septique est de maintenir la pression artérielle systémique, et de restaurer une pression de perfusion tissulaire adéquate. Rivers et al [147] ont testé l'hypothèse que l'optimisation hémodynamique précoce pouvait améliorer le pronostic du choc septique. L'objectif était d'obtenir une optimisation de la saturation veineuse en oxygène (qui intègre la saturation en oxygène, le débit cardiaque, la consommation en oxygène et l'hémoglobine), impliquant de ce fait une optimisation du transport et de la consommation en oxygène. Cependant l'amélioration du transport en oxygène était essentiellement attribuée à l'expansion volémique, et était associée à une amélioration de la survie. Ainsi, une expansion volémique précoce est une étape cruciale dans la réanimation du choc septique. Néanmoins un 1/3 de ces patients étaient aussi traités avec des vasopresseurs pour maintenir la pression artérielle. La thérapeutique actuelle (au moment du début du projet) [148] était de faire une ou plusieurs expansion volémique suivie (s) d'une thérapie aux vasopresseurs.

L'introduction précoce des catécholamines vasoconstrictrices a été proposée dans le choc hémorragique [149] afin de mobiliser le volume séquestré dans le territoire veineux (splanchnique essentiellement). L'utilisation précoce de vasopresseurs comme la norépinephrine (NE), peut être préconisée comme catécholamine de choix, grâce à leurs effets  $\alpha$ -vasoconstricteurs. Cet effet bénéfique s'expliquerait en partie par leur capacité à déplacer le débit veineux du compartiment non atteint au compartiment atteint [150, 151] mais aussi par la préservation de la perfusion des organes en restaurant la PAM. L'augmentation du retour veineux va induire une amélioration de la précharge au niveau cardiaque et de ce fait limiter les périodes prolongées d'hypotension observées au cours du choc septique. Par ailleurs, La vasoconstriction artérielle induite par la NE peut préserver la circulation centrale mais aux dépens de la

circulation périphérique.

L'objectif de cette présente étude est d'évaluer les changements de l'hémodynamique, l'oxygénation tissulaire, et la perfusion tissulaire par une comparaison de la thérapie traditionnelle (remplissage puis catécholamines) avec la thérapie alternative (remplissage et catécholamines) dans un modèle de choc endotoxinique hyperkinétique.

### **Choix du modèle :**

L'utilisation de modèles animaux, se voulant les plus pertinents cliniquement, permet d'analyser de larges échantillons, de maîtriser les variables confondantes, et ce à des coûts acceptables.

Malheureusement, l'expérience montre une grande variabilité de réponses hémodynamiques en fonction du modèle utilisé. Les petits animaux présentent l'avantage de la facilité de manipulation, permettent des études de survie, et la mise au point de modèles transgéniques pour l'analyse de voies physiopathologiques complexes.

Le choix du modèle, la chronologie des mesures, et les méthodes d'évaluation de la fonction cardiovasculaire sont par conséquent des facteurs indépendants de la pertinence des résultats de l'étude.

Les différentes techniques d'induction de sepsis à disposition sont :

- l'inoculation systémique ou localisée de bactéries,
- l'injection de lipopolysaccharides (LPS) ou de cytokines,
- la réalisation de sepsis intra-abdominal par ligature-ponction caecale
- la culture cellulaire ou tissulaire.

L'injection de LPS (endotoxine) chez l'homme reproduit les modifications cardiovasculaires du sepsis. Injecté chez l'animal par voie intraveineuse ou intra péritonéale, le LPS produit des altérations hémodynamiques dose dépendantes : de faibles doses provoquent une réponse hyperdynamique, alors que de fortes doses provoquent un tableau hypodynamique possiblement létal. Le LPS déclenche une dépression cardiovasculaire rapide chez de nombreuses espèces animales ; son injection à des volontaires sains permet de reproduire un profil hémodynamique typique du choc septique dans un délai de 3 à 5h.

Parmi les nombreux modèles expérimentaux de choc septique, le modèle endotoxinique chez des rats Wistars est souvent employé. L'utilisation d'une dose de 15mg/kg en IV de LPS est capable d'induire une défaillance hémodynamique identique à celle observée chez l'homme.

Dans notre étude nous avons utilisé chez des rats Wistars sédatisés, curarisés, un modèle de choc endotoxinique (LPS 15 mg/kg) avec un remplissage de base de 6 ml/h.

### **Validation du $\Delta$ PP :**

L'indice prédictif du remplissage vasculaire  $\Delta$ PP est couramment utilisé en thérapeutique des patients en état de choc. Cela dit, en recherche fondamentale aucune étude n'avait utilisé cette thérapeutique chez l'animal septique. De ce fait l'utilisation de la thérapeutique du remplissage vasculaire chez le rat nécessite la validation de l'indice prédictif «  $\Delta$ PP ». Nous avons donc cherché à valider le  $\Delta$ PP chez les rats Wistar avant de commencer notre étude.

La pression pulsée (PP) est calculée comme la différence entre la systole et la diastole de la pression artérielle. Les PP minimale et maximale sont déterminées dans chaque cycle respiratoire. Le pourcentage de variation de la pression pulsée est ensuite calculé [152, 153].

Par définition était considéré comme répondeur, les rats présentant une augmentation du débit aortique  $> 15\%$  suite au remplissage.

### **Stratégie thérapeutique :**

Le remplissage vasculaire 10 ml/kg/15min commençait lorsque la PAM ou le débit aortique atteignaient 80% de leur valeur basale ; le  $\Delta$ PP était mesuré avant et après le remplissage, le remplissage vasculaire était répété lorsque le  $\Delta$ PP restait  $>13\%$  avec une persistance de la baisse de la PAM ou du débit aortique.

### **Choix des catécholamines (norépinéphrine ; NE) :**

L'effet recherché dans notre étude est un effet  $\alpha$ -adrénergique prédominant afin de restaurer la pression artérielle grâce à une vasoconstriction artérielle et à une augmentation du retour veineux secondaire à une vasoconstriction veineuse. Pour cette raison, la NE paraît être une catécholamine de choix dans cette indication [89].

**Un contrôle hémodynamique (HD)** s'avère nécessaire pour une évaluation précise de l'état cardiovasculaire. Nous avons mesuré :

- la pression artérielle au niveau de la carotide
- la fréquence cardiaque
- le débit aortique
- le débit mésentérique : un indice de la distribution des débits au niveau régional.
- des signes d'hypoperfusion périphériques :
  - PO<sub>2</sub> au niveau du foie et du muscle lisse squelettique.
  - flux sanguin au niveau du muscle.
  - dosage des lactates dans le sang

Le principe des techniques de mesure hémodynamiques est développé dans l'annexe 1.

L'enregistrement des paramètres hémodynamique se fait en continu de T0 à T240 min.

Pour pouvoir comparer et évaluer les effets hémodynamiques de la nouvelle stratégie thérapeutique « remplissage et catécholamines précoces », nous avons étudié les effets hémodynamiques des différents traitements utilisés en plus de l'association des deux traitements:

Groupe 1 : endotoxine (Endo)

Groupe 2 : endotoxine + remplissage (Endo+FI)

Groupe 3 : endotoxine + catécholamines (Endo+NE)

Groupe 4 : endotoxine + remplissage puis catécholamines (Endo+FI/NE)

Groupe 5 : endotoxine + remplissage et catécholamines précoces (Endo+FI+NE)

Le groupe endotoxinique non traité représente le groupe contrôle ; les différents traitements sont introduits dès que la PAM ou le débit aortique atteignent 80% de leur valeur basale.

L'expansion volémique est effectuée en fonction du  $\Delta PP$  :

- $\Delta PP > 13\%$  avec une baisse persistante du débit aortique ou de la PAM ; effectuer un remplissage de 10ml/kg/15min.
- $\Delta PP < 13\%$  ; arrêter le remplissage.

La norépinephrine est administrée quand la PAM reste basse (une baisse de 20% /basale) en dépit d'un  $\Delta PP$  normal ( $< 13\%$ ). Des concentrations croissantes ou décroissantes de NE sont administrées en fonction de la PAM, pour maintenir la PAM à  $\pm 10\%$  de sa valeur basale. Les concentrations administrées varient entre 0,5 et 6  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ . Dans le groupe recevant des catécholamines tardivement ; la NE est administrée dès que l'on observe une chute persistante de la PAM en dépit d'un  $\Delta PP < 13\%$ .

## **Résultats :**

### **Validation du $\Delta PP$ :**

Le seuil du  $\Delta PP$  est de 13%. Nous obtenons une discrimination entre répondeurs et non répondeurs avec une sensibilité de 94% et une spécificité de 100%.

### **Résultats hémodynamiques présentés sous forme de tableau :**

La variation des paramètres hémodynamiques du groupe endotoxinique est comparée à la valeur basale (100 %). (– Stable, ↑ augmentation, ↓ baisse) ; les variations des paramètres hémodynamiques des différents groupes utilisés dans cette étude sont comparées par rapport au groupe endotoxinique (Endo).

Seuls les résultats significatifs sont présentés dans le tableau ci-dessous:



Groupe/variables HD	Endo	Endo/FI	Endo/NE	Endo/FI/NE	Endo/FI+NE
T0 - TFI (min)		25 ± 7		19,13 ±	23 ± 4
T0 - TNE (min)			24 ± 5	90 ±10	23 ± 4
Apport en FI (ml)		28 ± 6		27 ± 4	19 ± 3
Apport moyen en NE (µg/kg/min)			4,5 ±1,1	4,1 ± 1,0	3,8 ± 0,8
ΔPP	↑	↓	–	↓	↓↓
PAM (mmHg)	↓	↑	↑	↑↑	↑↑
FC (bat/min)	–	–	↓	–	–
DA (ml/min)	↓	↑	–	↑	↑
DM (ml/min)	↓	–	–	↑	↑
PO2 muscle (mmHg)	↓	–	–	–	–
PO2 foie (mmHg)	↓	–	–	↑	↑
Lactate à T240 (mmol/L)	5,9 ±2,3	4,7± 4,5	7,2 ±2,8	5,4± 2,0	3,7± 2,0
Survie (min)	270± 40	300± 55	250± 60	325 ±54	341± 45

T0-TFI, heure de l'apport en Fluide à partir du T0 ; T0-TNE, heure de l'apport en NE à partir du T0 ; PAM, pression artérielle moyenne ; FC, fréquence cardiaque ; DA, débit aortique ; DM, débit mésentérique ; PO2 muscle, pression en oxygène musculaire ; PO2 foie, pression en oxygène hépatique.

## Discussion :

Cette présente étude révèle que l'administration précoce de NE dans un modèle de choc endotoxinique ventilé et curarisé, est associé à une baisse de l'apport en expansion volémique sans effet délétère ou avec des effets bénéfiques sur l'hémodynamique systémique, régionale et la perfusion tissulaire.

- **Validation du  $\Delta PP$**  : l'utilisation de l'indice prédictif du remplissage ( $\Delta PP$ ) chez les rats anesthésiés en présence de ventilation mécanique est théoriquement possible. Le ratio  $F_c$ /Fréquence respiratoire est pratiquement identique chez les rats (400/100) et chez l'homme (100/18), les rats sont paralysés avec du curare pour éviter la ventilation spontanée. Dans ces conditions et comme observé dans le choc septique humain, la variation de la pression pulsée avec un seuil de 13% chez les rats endotoxiques est validée.

## **2. Effet du traitement sur l'hémodynamique systémique :**

Notre modèle de choc endotoxique est caractérisé par une dysfonction cardiovasculaire et une atteinte de l'oxygénation tissulaire, cela se traduit par : une chute de la pression artérielle, du débit aortique et mésentérique, de la pression en oxygène au niveau hépatique et musculaire, et une augmentation du taux de lactate sanguin.

Dans nos groupes traités, nous avons observé que le remplissage vasculaire maintenait la pression artérielle à son niveau basal pendant 90min, au-delà, une chute de la pression est observée. Dans ce même groupe, l'expansion volémique maintient le débit aortique tout au long de l'expérience.

Le remplissage vasculaire seul n'est pas assez suffisant pour restaurer la PAM en dépit d'une normalisation du débit aortique, ceci est probablement dû à l'atteinte du tonus vasculaire observé au cours du choc septique. Cela nécessite l'administration de catécholamine vasoconstrictrice pour normaliser la PAM. La PAM était maintenue dans les groupes traités aux catécholamines sans effet négatif sur le débit aortique.

Bourgoin et al [154] ont démontré dans un modèle de choc septique humain que l'amélioration de la PAM par la NE chez des patients traités au remplissage induisait une amélioration du débit cardiaque. Il est admis que la perfusion des organes dépend de la PAM et du débit aortique.

Selon nos résultats, l'amélioration du débit aortique par l'expansion volémique ne suffit pas pour corriger le débit mésentérique.

Il faut noter aussi que l'utilisation précoce de NE est associée à une redistribution du débit sanguin aortique vers le compartiment mésentérique.

## **3. L'effet des traitements sur l'oxygénation tissulaire :**

Dans les différents groupes traités, nous observons une baisse progressive en  $PO_2$  musculaire. Niinikoski et al [155] ont montré qu'au cours du choc septique il existe une forte baisse du flux sanguin musculaire, cette baisse persiste même après traitement au remplissage et aux vasopresseurs. On pourrait expliquer cela par une modification de la redistribution des débits ; du muscle vers les organes vitaux.

La PO<sub>2</sub> hépatique dépend du flux sanguin hépatique (via le débit artériel) et du débit portal, elle diminue avec la PAM dans le groupe traité au remplissage tandis qu'elle reste stable dans les groupes traités aux catécholamines.

#### **4. Administration tardive ou précoce de NE :**

Nouira et al [149] dans un modèle de choc hémorragique ont montrés que l'utilisation de NE comme traitement pourrait normaliser le  $\Delta$ PP et réduire significativement sa valeur en masquant le déficit intravasculaire, probablement par un transfert du débit du compartiment non atteint vers le compartiment atteint. Dans le groupe traité à la NE précocement, nos données confirment la baisse du  $\Delta$ PP en dépit d'une expansion volémique moindre et avec une absence d'effet néfaste sur le plan hémodynamique et sur la perfusion tissulaire (baisse des lactates) [156]. L'utilisation précoce de NE est associée à une diminution de la demande en remplissage sans effets délétères sur la circulation systémique et la perfusion splanchnique.

Néanmoins, dans ce modèle aigue de choc septique, nous n'avons pas pu démontrer la différence en PO<sub>2</sub> entre les différents groupes. En pratique clinique il est bien établi qu'il existe un rapport direct entre la surcharge en fluide et la mortalité.

#### **Conclusion :**

L'utilisation de NE est associé à une amélioration de la PAM, un maintient du débit aortique et mésentérique et une meilleure oxygénation tissulaire comparé au traitement avec le remplissage seul. L'utilisation précoce de NE avec une expansion volémique est associé à une redistribution du débit sanguin en faveur du compartiment mésentérique, et une baisse des taux de lactate.

Ainsi, l'utilisation précoce de NE préserve probablement la fonction des organes avec une baisse de l'apport en remplissage vasculaire.

En clinique un apport important en remplissage vasculaire se manifeste par une augmentation du volume du secteur interstitiel, une dilution des protéines plasmatiques et de ce fait la constitution de plusieurs œdèmes. La gravité est liée à l'existence d'un œdème pulmonaire qui peut gêner la respiration et diminuer l'apport en oxygène. La baisse de l'apport en volume qui est associée à l'administration précoce des catécholamines pourrait limiter l'apparition des œdèmes et améliorer l'utilisation de cette thérapeutique dans le choc septique.

*Dans l'algorithme thérapeutique du sepsis, après l'expansion volémique et les vasopresseurs, il est recommandé d'utiliser des thérapeutiques telles que les glucocorticoïdes ou la Protéine C activée.*

## **Etude 2:**

**But de l'étude :** Comprendre les différents mécanismes d'action de la PCa, permettant l'amélioration de l'hémodynamique et de la microcirculation au cours du choc septique, dans le but d'améliorer l'utilisation de cette thérapeutique dans le traitement du sepsis.

**Article 2 :** Sennoun N, Mezziani F, Dessebe O, Cattan V, Collin S, Montemont C, Gibot S, Asfar P, Regnault V, Lecompte T, Ramaroson A, Lacolley, Levy B. «Activated protein C improves LPS-induced cardiovascular dysfunction by decreasing tissular inflammation and oxidative stress». Article sous presse Critical Care Medicine.

### **Résumé de l'article :**

Sur la base de l'essai PROWESS, la European Medicines Agency (EMA) a accordé en 2002 une autorisation de mise sur le marché de la protéine C activée ou drotrécogine alfa, dont le nom de spécialité en France est Xigris®, pour le traitement des patients adultes présentant un sepsis sévère avec plusieurs défaillances d'organe en complément à une prise en charge conventionnelle optimale.

Le traitement à la PCa est associé à des variations des principales cytokines de l'inflammation, radicaux libres oxygénés, facteurs de coagulation, protéines apoptotiques..... Des liens sont clairement montrés entre la dysfonction cardiovasculaire et l'administration de la PCa [142] sans que l'ensemble des mécanismes impliqués soit parfaitement bien compris. Plusieurs questions restent sans réponse; Le succès qu'a connu cette thérapeutique dans les études expérimentales humaines et fondamentales, soulève des interrogations concernant le mécanisme moléculaire à l'origine des effets protecteurs observés *in vivo*. Parmi elles, l'activité anti-coagulante de la PCa est elle en partie responsable de son succès en thérapeutique? Parmi les effets cytoprotecteurs de la PCa, quels sont les effets responsables de l'amélioration de la survie dans le choc septique? Parmi les différentes actions de la PCa, quels sont les effets indispensables et quels sont les effets délétères? Les différentes interrogations appellent à des travaux supplémentaires pour clarifier les propriétés de l'agent.

Dans le but d'améliorer l'utilisation de la PCa dans le traitement du sepsis, nous avons cherché à clarifier les différents mécanismes d'action de la PCa impliqués dans l'amélioration de l'hémodynamique et de la microcirculation au cours du choc septique.

### **Modèle expérimental:**

Les rats Wistar sont anesthésiés, ventilés et curarisés. Pour pouvoir les maintenir pendant au moins quatre heures, le temps d'expression de la majorité des protéines, nous avons utilisé un modèle de choc endotoxinique moins létal que celui de notre première étude. Ce modèle expérimental présente une dysfonction cardiovasculaire induite par injection d'une dose de 10mg/kg de LPS, et est déterminée grâce à des mesures hémodynamiques.

Nous avons utilisés 3 groupes de rats.

- Groupe contrôle : reçoit un remplissage vasculaire de base au NaCl (1 ml bolus puis 6ml/h) pendant 4h en continu.
- Groupe endotoxine : reçoit une dose d'endotoxine de 10mg/kg dilué dans 1 ml de NaCl pendant 20min et un remplissage vasculaire (6ml/h) au NaCl pendant 3h.
- Groupe endotoxine traité à la PCa : reçoit une dose de 10mg/kg pendant 20min de LPS, et 33 $\mu$ g/k/h de PCa en continu pendant 4h.

L'apport en volume de T0 à T240 est identique dans les trois groupes étudiés ; 6 ml/h.

### **Dose de PCa administrée:**

La disponibilité de la rhAPC (Xigris) sur le marché facilite sa procuration, de ce fait nous avons utilisé la PCa recombinante humaine dans notre étude. De plus l'activité anticoagulante de la PCa est espèce spécifique, par contre ses effets cytoprotecteurs ne sont pas espèces spécifiques. L'utilisation de la PCa humaine dans le traitement du choc endotoxinique chez le rat diminue ses effets anti-coagulants.

Dans notre étude nous avons cherché à nous rapprocher de la dose utilisée en clinique (24 $\mu$ g/kg/h) et à limiter l'action anticoagulante de la PCa. Plusieurs doses de PCa ont été testées. La concentration 33 $\mu$ g/k/h a montré son efficacité sur le plan hémodynamique par amélioration de la dysfonction cardiovasculaire. D'après la littérature l'activité anticoagulante de la PCa est corrélée avec la dose administrée, à de faibles concentrations la PCa exerce une faible activité anti-coagulante tout en conservant son activité cytoprotectrice.

### **Mesures hémodynamiques:**

Les différents paramètres hémodynamiques sont mesurés en continu pour déterminer l'impact de la PCa sur la fonction cardiovasculaire (les mêmes paramètres que ceux étudiés dans la première étude).

**Résultats sous forme de tableau :** (– Stable, ↑ augmentation, ↓ baisse)

L'évolution des paramètres hémodynamiques (T0-T120) et des différents dosages (T240) du groupe endotoxinique (Endo) sont comparées à la réponse du groupe contrôle, et la réponse du groupe endotoxinique traité à la PCa (Endo+PCa) est comparée à la réponse du groupe Endo. Dans le tableau nous n'avons représentés que les résultats significatifs.

<b>Dysfonction vasculaire : Circulation systémique</b>			
Groupe / variables	Contrôle	Endo	Endo + PCa
PAM (mmHg)	–	↓	↑
Courbe dose réponse PAM/dose PE	–	↓	↑

<b>Dysfonction vasculaire : Circulation régionale et perfusion tissulaire</b>			
Groupe / variables	Contrôle	Endo	Endo + PCa
DM (ml/min)	–	↓	–
PO2 <sub>(foie)</sub> (mmHg)	–	↓	↑
PO2 <sub>(muscle)</sub> (mmHg)	–	↓	↑
Flux sanguin <sub>(muscle)</sub>	–	↓	↑
Lactate (mmol/L)	–	↑	↓
Lactate/ pyruvate	–	↑	↓

<b>Dysfonction cardiaque</b>			
Groupe / variable	Contrôle	Endo	Endo + PCa
FC (bat/min)	–	↓	↑
DA (ml/min)	–	↓	↑
Courbe dose réponse DA/dose PE	–	↓	↑
ATP <sub>(cœur)</sub> (mmol/mg) poids humide	–	↓	↑
Charge en énergie % (cœur)	–	↓	↑

PAM, pression artérielle moyenne ; FC, fréquence cardiaque ; DA, débit aortique ; DM, débit mésentérique ; PO2 muscle, pression en oxygène musculaire ; PO2 foie, pression en oxygène hépatique.

Les mesures hémodynamiques montrent une amélioration de la dysfonction cardiovasculaire après traitement à la PCa. Cet effet bénéfique s'exprime par une amélioration de la PAM, du débit aortique, de la perfusion tissulaire et de la vasoréactivité à la phényléphrine (PE). Au niveau du cœur, la PCa augmente le taux d'ATP et la charge en énergie, cet effet est probablement exprimé sur le plan fonctionnel par une amélioration de la fonction cardiaque.

### **Etude des mécanismes d'action de la PCa impliqués dans l'amélioration de la fonction cardiovasculaire:**

Pour comprendre le mécanisme par lequel la PCa a amélioré la dysfonction cardiovasculaire ; nous nous sommes intéressés aux protéines et aux molécules pouvant être à l'origine de cette dysfonction. Il est connu que la transcription de NF-kB stimule la synthèse de la iNOS qui libère le NO vasodilatateur, en partie responsable de l'hypotension persistante au cours du sepsis.

Au niveau cardiaque, Cuenca et al [157] ont démontré récemment un lien entre le recrutement important des monocytes/ macrophages et l'augmentation de l'activité des métalloprotéinases-9, favorisant la dégradation de la matrice extracellulaire. Il est aussi apporté par la littérature que le MMP-9 est une protéine proinflammatoire, cette protéine est activée par la présence de forte concentration de NO, COX2 ou des peroxy-nitrites.

Par des techniques adaptées, nous avons explorés au niveau du cœur et de l'aorte une des voies de signalisation la plus impliquée dans le développement du sepsis ; la voie du NF-kB par mesure du facteur de transcription NF-kB et de son inhibiteur PI-kB. Comme cité dans la partie généralité bibliographique, l'activation de NF-kB est à l'origine d'une dysfonction cardiovasculaire par l'aggravation de l'inflammation, de la coagulation et du stress oxydant.

Dans ce contexte, nous avons évalués l'impact de la PCa sur ; l'inflammation par mesure du TNF- $\alpha$ , COX-2, MMP-9; le stress oxydatif par mesure de l'O<sub>2</sub><sup>-</sup>, ONOO<sup>-</sup>, LPO, MPO et protéines Carbonyl ; la coagulation par la mesure du complexe thrombine antithrombine (TAT), concentration en fibrinogène et en PCa dans le plasma.

**Analyse biochimique :** (principes des techniques est développé dans l'annexe 2)

Western blotting : NF-kB, PI-kB, iNOS, COX-2, nitrotyrosine.

Elisa: MPO, TNF- $\alpha$

Enzymographie: MMP-9 activity

Résonance paramagnétique électronique (RPE): NO, O<sub>2</sub><sup>-</sup>.

### **Résultats sous forme de tableau :**

Mesure des différents paramètres à T240, dosage de TNF $\alpha$  à T120.

<b>Inflammation</b>			
Groupe / variable	Contrôle	Endo	Endo + PCa
TNF- $\alpha$ (plasma) (pg/ml)	–	↑	↓
COX-2 (aorte, cœur)	–	↑	↓
MMP-9 et sa forme activit (aorte, cœur)	–	↑	↓

<b>Stress oxydant</b>			
Groupe / variable	Contrôle	Endo	Endo + PCa
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> (aorte, cœur)	–	↑	↓
ONOO <sup>-</sup> (cœur)	–	↑	↓
LPO (plasma) $\mu$ M	–	↑	↓
activité MPO (cœur) (UI/mg tissue)	–	↑	↓
Protéines Carbonyls (plasma) (mM/mg prot)	–	↑	↓

<b>Coagulation</b>			
Groupe / variable	Contrôle	Endo	Endo + PCa
TAT $\mu$ g (plasma)	–	↑	↑
Fibrinogen g/l (plasma)	–	↓	↓
Cc APC ng/ml (plasma)	–	↓	↑

<b>Voie de signalisation du NO inductible</b>			
Groupe / variable	Contrôle	Endo	Endo + PCa
iNOS (cœur, aorte)	–	↑	↓
NO (sang, cœur, aorte)	–	↑	↓

<b>Voie de signalisation du NF-<math>\kappa</math>B</b>			
Groupe / variable	Contrôle	Endo	Endo + PCa
NF- $\kappa$ B p65 (cœur)	–	↑	↓
PI- $\kappa$ B (cœur)	–	↑	↓



## **Discussion :**

L'effet bénéfique de la PCa sur le cœur et les vaisseaux a été démontré dans plusieurs études *in vitro* et *in vivo* à des doses supra pharmacologiques. Le mécanisme par lequel la PCa exerce son effet protecteur sur la fonction cardiovasculaire à ce jour n'est pas assez clair.

Le choc septique est caractérisé par une perturbation de l'homéostasie cardiovasculaire, affectant tous les composants de la circulation sanguine ; les éléments figurés du sang, les cellules musculaires lisses, l'endothélium, les cellules cardiaques. Cette perturbation passe par des voies de signalisation assez complexes et fait intervenir plusieurs enzymes et molécules. Les protéines et molécules produites vont interagir entre elles et avec les composants du système cardiovasculaire pour déclencher une inflammation, une coagulation et un stress oxydatif à l'origine de la dysfonction cardiovasculaire.

L'hyporéactivité vasculaire observée au cours du choc septique est principalement en relation avec une forte production du NO [66, 158]. L'effet vasculaire de la PCa a été montré dans notre étude par une amélioration de la pression artérielle et de la réactivité vasculaire aux catécholamines, cette prévention est en relation avec la baisse de iNOS et de la production du NO. La PCa agit directement sur la production du NO et O<sub>2</sub><sup>-</sup>, la baisse des formes péroxinitreux par la PCa confirme bien cette action directe.

Favory et al [142] sur une préparation de cœur isolé montre une réduction de la performance ventriculaire induite par l'endotoxine corrigé suite à l'administration de la PCa. Notre présente étude confirme ces résultats, sur le plan hémodynamique la fonction myocardique est améliorée en présence de PCa suivie d'une amélioration de la charge en énergie. Cet effet bénéfique se traduit au niveau moléculaire par une baisse de l'expression de NF-kB, NO, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, nitrotyrosine et de l'infiltration leucocytaire au niveau cardiaque.

L'infiltration leucocytaire est aussi associée à une production importante des métalloprotéinases qui dégrade la matrice extracellulaire. Lalu et al [159] ont récemment montré que l'inhibition des MMP-9 améliorerait l'hyporéactivité vasculaire induite par le LPS. De plus il a été montré dans un modèle de choc endotoxinique que l'activité des MMP-9 était bien corrélée avec le niveau de la PAM. Cependant les MMP-9 sont activées par des protéines de l'inflammation et du stress oxydant, et dans notre modèle nous avons démontré que la PCa diminuait la production du TNF- $\alpha$ , COX-2, NO, ONOO<sup>-</sup>. De ce fait l'inhibition de l'activité des MMP-9 par la PCa observé dans nos résultats, pourrait être due à une action directe de la PCa sur l'activité des MMP-9 et/ou via une baisse de la production des molécules pro inflammatoires et prooxydantes.

Une baisse de la peroxydation lipidique induite par le LPS en présence de la PCa a été rapportée par Yamaji K [139] sur une culture de macrophages *in vitro*. Cet effet antioxydant de la PCa est observé dans notre modèle par une baisse de l'oxydation cellulaire incluant l'oxydation lipidique

et protéique (LPO, MPO, protéines carbonyles)

La majorité des études évaluant l'effet bénéfique de la PCa dans le sepsis utilise des doses supra-pharmacologiques, il est rapporté aussi que l'effet anti-coagulant de la PCa est en relation directe avec sa concentration. Dans notre étude nous nous sommes plus rapproché de la thérapeutique clinique en utilisant une faible dose de PCa. Effectivement, la réduction du taux de fibrinogène et l'augmentation du taux TAT par le LPS n'ont pas été corrigées par l'administration de la PCa. Il est évident que dans notre modèle de choc endotoxinique la PCa pourrait ne pas avoir d'action anti-coagulante ou plutôt avoir une très faible action anti-coagulante non détectable.

### **Conclusion :**

Cette présente étude suggère que la PCa offre un potentiel thérapeutique dans la dysfonction cardiovasculaire. Cet effet cytoprotecteur sur le système cardiovasculaire est indépendant de son effet anticoagulant.

*Dans notre précédente étude nous avons démontrés que la PCa améliore la fonction cardiovasculaire in vivo par modulation de l'activité proinflammatoire, prooxydante, diminution de l'adhésion cellulaire, et par stabilisation de la matrice extracellulaire. Ces effets bénéfiques peuvent être corrélés avec l'activité anticoagulante (très faible dans notre modèle) ou l'activité non-anticoagulante de la PCa.*

*La PCa améliorerait la dysfonction vasculaire au cours du sepsis via deux mécanismes ; par son action directe sur les cellules du système vasculaire (cellule musculaire lisse, cellule endothéliale) démontrée par des études in vitro, et via une action indirecte par inhibition des métabolites produits par les cellules du système immunitaire démontré par des études in vivo. Pour différencier cette action propre de la PCa sur la paroi vasculaire nous avons évalué son action sur des artères isolées in vitro (Etude 3).*

## **Etude 3:**

**But de l'étude :** évaluer l'impact de la protéine C activée sur la réactivité vasculaire des vaisseaux isolés en s'affranchissant de son action anticoagulante et de l'interaction avec les éléments circulants du sang.

**Article 3 :** Sennoun N, Baron-Menguy C, Burban M, Lecompte T, Andriantsitohaina R, Henrion D, Mercat A, P Asfar, Levy, B Meziani F. «Recombinant human activated protein C improves endotoxemia-induced endothelial dysfunction: A blood free model in isolated mouse arteries». Submitted in American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology.

### **Résumé de l'article :**

Dans le but de différencier et d'évaluer l'impact direct de la PCa sur la paroi vasculaire, nous avons étudié son effet sur la vasoréactivité des artères isolés (artères mésentériques et artères aortiques) issues de souris ayant reçues du LPS. Grâce à cette méthode on s'affranchit de l'effet de la PCa sur les éléments figurés du sang (monocytes, macrophages, plaquettes....) et même de son action anti-coagulante.

### **Choix de l'espèce et du modèle expérimental:**

Il existe plusieurs modèles d'animaux sur lesquels ont été évalués les effets de la PCa. Il a ainsi été montré que l'activité de la rhPCA varie selon les espèces dans l'ordre suivant: humain > primate > canin > lapin > hamster > souris > rat. Une spécificité similaire a été notée *in vitro* avec la drotrecogine alfa activée. La spécificité de rhAPC chez la souris est plus importante que chez le rat, de ce fait nous avons utilisé dans notre étude des souris Swiss de 30-40g.

Un modèle de choc endotoxinique chez la souris est développé dans le laboratoire « Biologie Neurovasculaire Intégrée INSERM 771 ; CNRS UMR 6214 ». Les signes cliniques observés dans le cas de choc septique se développent après 10h d'injection de 50mg/kg de LPS en intrapéritonéale.

### **Dose de la PCa:**

Les vaisseaux contrôles et les vaisseaux septiques (les artères mésentériques et aortiques) sont incubés dans un milieu de culture, avec une concentration de PCa identique à celle retrouvée dans le sang des patients septique (50 ng /ml) traités sous PCa.

La période d'incubation des vaisseaux est de 12h, selon les données de la littérature, la PCa

incubée avec des cellules isolées *in vitro* pendant 12h, conserve ses effets cytoprotecteurs.

### Mesure de la vasoréactivité des vaisseaux en *in vitro* : (voir annexe 3)

Par la technique d'artériographie nous avons évalué la dilatation au flux (DLF) des artères mésentériques.

Avec la myographie nous avons étudié la réponse aux agents pharmacologiques de l'aorte thoracique et cela par une évaluation de la contraction (Ct) maximale en présence de KCl+ phényléphrine et de la relaxation (Rl) à l'acétylcholine.

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

### Résultats sous forme de tableau :

Impact de la PCa sur des vaisseaux provenant des souris contrôles (Ctrl) et LPS (LPS):

La réponse fonctionnelle du vaisseau contrôle représente la valeur normale –, la réponse des vaisseaux LPS est comparée à la réponse du vaisseau contrôle, et la réponse du vaisseau LPS incubé dans de la PCa (LPS+PCa) est comparée à la réponse du vaisseau (LPS). Après incubation des vaisseaux (LPS+rhAPC) avec des inhibiteurs (indo, L-NAME), la réponse du vaisseau est comparée à sa réponse en absence d'inhibiteur.

1. Contraction à la phényléphrine en présence de KCl:

Groupe/réponse	Ctrl	LPS	LPS+PCa
Contraction max KCl+ phenyl (mN)	–	↓	↑

2. Relaxation à l'acétylcholine :

Groupe / réponse	Ctrl	LPS	LPS+PCa
<b>Aorte</b>			
Relaxation à l'Ach (mN)	–	↓	↑ rejoint le Ctrl
RI + indo			↓
RI + L-NAME			↓↓
<b>Artères mésentériques</b>			
Dilatation au flux	–	↓	↑ rejoint le Ctrl
DLF + indo			↓
DLF + LNAME			↓↓

DLF + LNAME + indo			–
--------------------	--	--	---

### 3. Etude des voies de signalisation impliquées :

Groupes / protéines	Ctrl	LPS	LPS+PCa
eNOS	–	↓	↑
P-eNOS	–	↓	↑
AKt	–	↓	↑
P-AKt	–	↑	↑↑
NF-kB	–	↑	↓
P-IkB	–	↑	↓

### Discussion:

D'après nos résultats, la PCa possède un effet protecteur sur la dysfonction endothéliale induite par le LPS et potentialise la réponse contractile. L'amélioration de la dysfonction endothéliale par la PCa passe par la voie de signalisation AKt qui active l'eNOS et améliore la réponse dilatatrice des vaisseaux.

L'un des facteurs de relaxation le plus important est le NO produit via la voie de signalisation eNOS, le NO d'origine endothéliale régule le tonus musculaire, l'agrégation plaquettaire et le recrutement des leucocytes [160], l'expression de la eNOS est stimulée par de multiple facteur incluant les forces de cisaillement, VEGF, l'acétylcholine, l'œstrogène et la phosphorylation de la eNOS via la voie de signalisation AKt régulant l'activité enzymatique [161].

Chauhan et al [162] ont montré sur des artères de résistance et de conductance que le LPS provoque une dysfonction endothéliale. Celle-ci se traduit par une atteinte du relâchement des vaisseaux à l'Ach et au flux. La dysfonction endothéliale est associée à une réduction de la biodisponibilité du NO d'origine endothéliale, une altération de la production des prostanoides, et une atteinte de la voie EDH (endothélium-dépendent hyperpolarisation), tous ces mécanismes peuvent agir indépendamment ou en synergie. Une autre étude a rapporté une importante réduction de la phosphorylation de la eNOS dans des artères mésentériques de lapins en sepsis [163], une altération des récepteurs de surface endothéliaux et une modification de la voie de transduction du NO. Ces données de la littérature soutiennent nos résultats. Dans notre modèle de choc endotoxinique, une dysfonction endothéliale est observée, elle se répand par une altération de la relaxation des vaisseaux par diminution de la sensibilité des récepteurs endothéliaux à l'Ach et une baisse de la réponse vasodilatatrice aux forces de cisaillements. A l'échelle moléculaire cette atteinte fonctionnelle est exprimée par une baisse de l'activité de la NOS endothéliale en relation avec la faible expression de AKt.

Il est bien connu que les récepteurs de la PCa (EPCR et PAR-1) sont exprimés au niveau des cellules endothéliales. Cependant il a été rapporté récemment par Bretschneider [164] que les cellules musculaires lisses cultivées *in vitro* étaient aussi capables d'exprimer l'EPCR et de moduler la réponse de PAR-1 via la fixation de la PCa. Brueckmann [134] a montré aussi sur des HUVEC que la PCa induit une up régulation de l'expression de l'ARNm des COX-2 et de leurs enzymes avec une libération consécutive de prostacycline. D'après ces données on peut penser que la réponse vasodilatatrice induite par la PCa est due à son action directe sur les cellules musculaires lisses ou par une action indirecte via les métabolites libérés par l'endothélium. Dans notre étude, les métabolites COX étaient impliqués dans l'effet protecteur de la PCa sur la dysfonction endothéliale, la PCa stimule la libération des métabolites vasodilatateurs d'origine COX. Selon les résultats de Brueckmann [134] ce métabolite vasodilatateur pourrait être la prostacycline.

L'hyporéactivité vasculaire induite par le LPS est potentialisée par l'incubation des vaisseaux dans la PCa. Nos résultats sont soutenus par l'étude de Wiel et al [165] qui a montré une amélioration de la réponse contractile des vaisseaux sepsis isolés provenant de lapin traité à la PCa. Cet effet est maximal en présence d'endothélium.

L'expression génique à l'origine de l'activation du NF- $\kappa$ B aggrave l'état pathologique en altérant la paroi vasculaire et provoque une atteinte fonctionnelle. A l'inverse une inhibition de l'activité NF- $\kappa$ B prévient la dysfonction cardiovasculaire observée dans le choc septique. Nous avons rapporté que la PCa réduit l'activation du NF- $\kappa$ B au niveau de l'aorte, de ce fait elle peut réduire les dommages endothéliaux produits par le LPS parmi lesquels la dysfonction endothéliale et l'hyporéactivité vasculaire.

## **Conclusion :**

Au cours de cette étude nous avons montré que la PCa recombinante, en dehors de ses propriétés anticoagulantes améliore la dysfonction endothéliale et potentialise la réponse contractile d'un vaisseau septique. Ces résultats nous permettent de comprendre le mécanisme par lequel la PCa améliore la microcirculation et suggère l'utilisation de cette thérapeutique dans des maladies exprimant une dysfonction endothéliale (hypertension, obésité, ischémie...).

Nos études sur les mécanismes d'action de la PCa nous permettent de conclure que l'amélioration de la survie des patients septiques traités à la PCa est probablement en relation avec ses effets cytoprotecteurs et indépendamment de ses effets anticoagulants. Au niveau cardiaque et vasculaire la PCa améliore la réactivité vasculaire aux catécholamines. L'administration de PCa chez les patients septiques pourrait diminuer l'apport en catécholamines, de ce fait limiter les effets secondaires de ceux-ci.

Chez des patients avec un sepsis associé à des complications intravasculaires disséminées, l'administration d'anticoagulants pourrait réduire les risques de mortalité, dans ces conditions l'utilisation d'une double thérapeutique « un anticoagulant naturel et une PCa à faible effet anticoagulant » pourrait mieux contrôler les effets bénéfiques de ces deux traitements, de ce fait concevoir le traitement selon les besoins des patients.

## **VII. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES**



## VII. Conclusion générale et perspective :

L'objectif de ce travail était d'améliorer les connaissances dans l'utilisation de certaines thérapeutiques dans le traitement du choc septique. Au terme de la description de ces travaux expérimentaux, un certain nombre de conclusions et d'hypothèses peuvent être formulées sur les thérapeutiques testées.

Dans notre première étude, nous avons montrés qu'une administration précoce de faible concentration de vasopresseurs pourrait améliorer l'utilisation de cette thérapeutique. L'effet bénéfique est observé par une diminution de l'apport liquidien avec une conservation des effets bénéfiques des deux traitements (remplissage et vasopresseurs) sur le plan hémodynamique.

Dans notre seconde et troisième étude nous nous sommes intéressés au traitement à la PCa, un traitement qui possède des effets bénéfiques sur la circulation systémique et sur la microcirculation avec des risques d'hémorragie. Dans le but d'améliorer son utilisation en thérapeutique, nous avons exploré l'effet bénéfique de l'administration de la PCa dans un modèle *in vivo* et *in vitro* de choc septique. Grâce au modèle *in vivo* nous avons pu démontré qu'une administration d'une dose de PCa proche de la dose thérapeutique prévenait la dysfonction cardiovasculaire, et cela par amélioration des paramètres hémodynamiques et la vasoréactivité aux catécholamines, plusieurs mécanismes sont impliqués, au centre de cette prévention, l'inhibition de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B, de ce fait la PCa inhibe les enzymes et les métabolites produits par cette voie de signalisation. Le modèle de vasoréactivité *in vitro* (artères isolées), montre une amélioration de la dysfonction endothéliale par la potentialisation de la réponse relaxante à l'Ach et aux forces de cisaillement via la voie de l'eNOS, et par libération des métabolites vasodilatateurs d'origine COX.

Pour conclure, ce travail permet de confirmer expérimentalement deux impressions cliniques : les vasopresseurs doivent être utilisés précocement et l'effet de la PCa est principalement hémodynamique par l'intermédiaire de sa voie cytoprotectrice confirmant ainsi son indication préférentielle dans les états de choc.

Les deux thérapeutiques utilisés dans nos études ont montré des effets bénéfiques propre à chacune, la combinaison de ces traitements (expansion volémique et administration précoce de noradrénaline plus perfusion en continu de PCa) pourrait additionner leur effets bénéfiques et probablement avoir d'autres effets dû à leur association (effet en synergie).

Selon nos résultats, la PCa potentialise la contraction des vaisseaux issus de souris sepsis. L'étude de la fonction contractile en présence des inhibiteurs des COX et des NOS pourrait clarifier le mécanisme impliqué. Afin de déterminer l'action de la PCa sur les cellules musculaires lisses en absence d'interaction cellule endothéliale - cellule musculaire lisse, nous pouvons envisager d'étudier la vasoréactivité des vaisseaux sans endothélium préalablement incubés dans de la PCa. De plus, des avancées sont sûrement à attendre des études de protéomique et sur l'utilisation de souris knock-out pour démontrer les cibles génétiques de la PCa, ce qui ouvrirait le champ à une application en thérapeutique.

La recherche médicale clinique se base sur les résultats de la recherche fondamentale pour prouver l'efficacité des nouveaux traitements. Bien que nos tests sur les modèles animaux apportent des informations précieuses, seuls des tests sur êtres humains peuvent confirmer ces résultats obtenus.

**VIII. REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES**

## VIII. Références bibliographiques :

1. Schmidt H, Werdan K, Müller-Werdan U: **Autonomic dysfunction in the ICU patient.** *Curr Opin Crit Care* 2001 **7**(5):314-322.
2. Levy MM, *et al* **2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference.** *Critical Care Medicine* 2003, **31**(4):1250-1256.
3. Pottecher T: **Conférence de consensus.** *Réanimation* 2006, **15** 418-419.
4. Moine P, Asehnoune K, Edouard A, Payen D: **Immunomodulation and sepsis - Impact of the microorganisms.** *Réanimation* 2003, **12**(3):182-191.
5. López-Bojórquez LN, Dehesa AZ, Reyes-Terán G: **Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of septic shock.** *Archives of Medical Research* 2004, **35**(6):465-479.
6. Danner RL, Elin RJ, Hosseini JM, Wesley RA, Reilly JM, Parrillo JE: **Endotoxemia in human septic shock.** *Chest* 1991, **99**(1):169-175.
7. Suffredini AF, Fromm RE, Parker MM, Brenner M, Kovacs JA, Wesley RA, Parrillo JE: **The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin.** *N Engl J Med* 1989, **321**(5):280-287.
8. Andriantsitohaina R, Lagaud GJ, Andre A, Muller B, Stoclet JC: **Effects of cGMP on calcium handling in ATP-stimulated rat resistance arteries.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1995, **268**(3):H1223-1231.
9. Comstock KL, Krown KA, Page MT, Martin D, Ho P, Pedraza M, Castro EN, Nakajima N, Glembotski CC, Quintana PJ *et al*: **LPS-induced TNF-alpha release from and apoptosis in rat cardiomyocytes: obligatory role for CD14 in mediating the LPS response.** *J Mol Cell Cardiol* 1998, **30**(12):2761-2775.
10. Cowan DB, Noria S, Stamm C, Garcia LM, Poutias DN, del Nido PJ, McGowan FX, Jr.: **Lipopolysaccharide internalization activates endotoxin-dependent signal transduction in cardiomyocytes.** *Circ Res* 2001, **88**(5):491-498.
11. Starr RG, Lader AS, Phillips GC, Stroman CE, FL. A: **Direct action of endotoxin on cardiac muscle.** *Shock* 1995, **3**(5):180-384.
12. Liu SF, Malik AB: **NF- $\kappa$ B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006, **290**(4):L622-645.
13. Opal SM HC: **Bench-to-bedside review: Toll-like receptors and their role in septic shock.** *Crit Care* 2002, **2**(6):125-136.
14. Huet O, Choukroun G, Mira J.-P: **Toll like receptor, inflammatory response and sepsis.** *Réanimation* 2004, **13** (3 ):167-175.
15. Adib-Conquy M, Cavaillon J-M: **Stress molecules in sepsis and systemic inflammatory response syndrome.** *FEBS Letters* 2007, **581**(19):3723-3733.
16. Ghezzi P, Dinarello CA, Bianchi M, Rosandich ME, Repine JE, White CW: **Hypoxia increases production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human mononuclear cells.** *Cytokine* 1991, **3**(3):189-194.
17. Nansen A, Christensen JP, Marker O, Thomsen AR: **Sensitization to lipopolysaccharide in mice with asymptomatic viral infection: role of T cell-dependent production of interferon-gamma.** *J Infect Dis* 1997, **176**(1):151-157.
18. Gerlach H, Gerlach M, Clauss M: **Relevance of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1-alpha in the pathogenesis of hypoxia-related organ failure.** *Eur J Anaesthesiol* 1993, **10**(4):273-285.
19. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM: **CYCLOOXYGENASES: Structural, Cellular, and Molecular Biology.** *Annual Review of Biochemistry* 2000, **69**(1):145-182.
20. Moncada S, Palmer R M, Higgs E A: **Biosynthesis of nitric oxide from -arginine : A pathway for the regulation of cell function and communication.** *Biochemical Pharmacology* 1989, **38**(11):1709-1715.

21. Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA: **Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury.** *Free Radical Biology and Medicine* 2000, **28**(10):1456-1462.
22. Offord E vPG, Tyrrell R.: **Markers of oxidative damage and antioxidant protection: current status and relevance to disease.** *Free Radic Res* 2000, **33** Suppl(S):5-19.
23. Legrand-Poels S, Schoonbroodt S, Matroule J-Y, Piette J: **NF-[kappa]B: an important transcription factor in photobiology.** *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 1998, **45**(1):1-8.
24. Griendling KK, Sorescu D, Lassegue B, Ushio-Fukai M: **Modulation of Protein Kinase Activity and Gene Expression by Reactive Oxygen Species and Their Role in Vascular Physiology and Pathophysiology.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000, **20**(10):2175-2183.
25. Babior B: **Phagocytes and oxidative stress.** *Am J Med* 2000, **109**(1):33-44.
26. Moncada S, Palmer RM, EA. H: **The biological significance of nitric oxide formation from L-arginine.** *Biochem Soc Trans* 1989 **17**(4):642-644.
27. Cauwels A: **Nitric oxide in shock.** *Kidney Int* 2007, **72**(5):557-565.
28. Achike FI, Kwan CY: **Nitric oxide, human diseases and the herbal products that affect the nitric oxide signalling pathway.** *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003, **30**(9):605-615.
29. Dimmeler S, Zeiher AM: **Endothelial Cell Apoptosis in Angiogenesis and Vessel Regression.** *Circ Res* 2000, **87**(6):434-439.
30. Offord E vPG, Tyrrell R.: **Markers of oxidative damage and antioxidant protection: current status and relevance to disease.** *Free Radic Res* 2000 **33**(Suppl:S):5-19.
31. MacMicking JD, Nathan C, Hom G, Chartrain N, Fletcher DS, Trumbauer M, Stevens K, Xie QW, Sokol K, Hutchinson N *et al*: **Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase.** *Cell* 1995, **81** (4):641-650.
32. Pugin J, Ulevitch RJ, Tobias PS: **A critical role for monocytes and CD14 in endotoxin-induced endothelial cell activation.** *J Exp Med* 1993, **178**(6):2193-2200.
33. Grainger DJ, Witchell CM, Weissberg PL, Metcalfe JC: **Mitogens for adult rat aortic vascular smooth muscle cells in serum-free primary culture.** *Cardiovasc Res* 1994, **28**(8):1238-1242.
34. Vestweber D, Blanks JE: **Mechanisms That Regulate the Function of the Selectins and Their Ligands.** *Physiol Rev* 1999, **79**(1):181-213.
35. Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim Y-C, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone MA, 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. Lipman J RA, Kraus P.: **Vasoconstrictor effects of adrenaline in human septic shock.** *Anaesth Intensive Care* 1991, **19**(1):61-65.
37. Leier CV BP, Carpenter J, Randolph PH, Unverferth DV.: **Cardiovascular pharmacology of dopexamine in low output congestive heart failure.** *Am J Cardiol* 1988, **62**(1):94-99.
38. Dunser MW, Mayr AJ, Ulmer H, Knotzer H, Sumann G, Pajk W, Friesenecker B, Hasibeder WR: **Arginine Vasopressin in Advanced Vasodilatory Shock: A Prospective, Randomized, Controlled Study.** *Circulation* 2003, **107**(18):2313-2319.
39. Mohan P, Brutsaert DL, Paulus WJ, Sys SU: **Myocardial Contractile Response to Nitric Oxide and cGMP.** *Circulation* 1996, **93**(6):1223-1229.
40. Friedman G, Silva E, JL. V: **Has the mortality of septic shock changed with time.** *Crit Care Med* 1998, **26**(12):2078-2086.
41. Peters K, Unger RE, Brunner J, Kirkpatrick CJ: **Molecular basis of endothelial dysfunction in sepsis.** *Cardiovasc Res* 2003, **60**(1):49-57.

42. Curtis SE, Vallet B, Winn MJ, Caufield JB, King CE, Chapler CK, Cain SM: **Role of the vascular endothelium in O<sub>2</sub> extraction during progressive ischemia in canine skeletal muscle.** *J Appl Physiol* 1995, **79**(4):1351-1360.
43. B. Vallet BT: **Physiopathologie du choc septique.** *Consensus d'actualisation SFAR* 1999.
44. Charles TE: **The interactions between inflammation and coagulation.** *British Journal of Haematology* 2005, **131**(4):417-430.
45. Vallet B, B. T: **Physiopathologie du choc septique.** *Consensus d'actualisation SFAR* 1999.
46. Levi M, Van der Poll T: **Two-way interactions between inflammation and coagulation.** *Trends Cardiovasc Med* 2005, **15**(7):254-259.
47. Matsuda N, Hattori Y: **Vascular biology in sepsis: pathophysiological and therapeutic significance of vascular dysfunction.** *Jornal of Smooth Muscle Research* 2007, **43**(4):117-137.
48. Wanecek M, Weitzberg E, Rudehill A, Oldner A: **The endothelin system in septic and endotoxin shock.** *European Journal of Pharmacology* 2000, **407**(1-2):1-15.
49. Kloner RA, Hutter AM, Emmick JT, Mitchell MI, Denne J, Jackson G: **Time course of the interaction between tadalafil and nitrates.** *Journal of the American College of Cardiology* 2003, **42**(10):1855-1860.
50. Winn MJ, Vallet B, Asante NK, Curtis SE, Cain SM: **Effects of NG-substituted arginines on coronary vascular function after endotoxin.** *J Appl Physiol* 1993, **75**(1):424-431.
51. Landry DW, JA. O: **The ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel mediates hypotension in endotoxemia and hypoxic lactic acidosis in dog.** *J Clin Invest* 1992 **89**(6):207-204.
52. Hollenberg SM TJ, Piotrowski MJ, Easington C, Parrillo JE.: **Impaired microvascular vasoconstrictive responses to vasopressin in septic rats.** *Crit Care Med* 1997, **25**(5):869-873.
53. Tsuneyoshi I, Yamada H, Kakihana Y, Nakamura M, Nakano Y, Boyle WA, 3rd: **Hemodynamic and metabolic effects of low-dose vasopressin infusions in vasodilatory septic shock.** *Crit Care Med* 2001, **29**(3):487-493.
54. O'Brien A, Clapp L, Singer M: **Terlipressin for norepinephrine-resistant septic shock.** *The Lancet* 2002, **359**(9313):1209-1210.
55. Annane D: **Cortisol replacement for severe sepsis and septic shock: what should I do?** *Crit Care* 2002, **6**(3):190-191.
56. 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.
57. U. SHWKM-W: **Autonomic dysfunction in the ICU patient.** *Curr Opin Crit Care* 2001 **7**(5):314-322.
58. Munford RS, Pugin J: **Normal Responses to Injury Prevent Systemic Inflammation and Can Be Immunosuppressive.** *Am J Respir Crit Care Med* 2001, **163**(2):316-321.
59. Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, Tracey KJ: **Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin.** *Nature* 2000, **405**(6785):458-462.
60. Bernik TR, Friedman SG, Ochani M, DiRaimo R, Ulloa L, Yang H, Sudan S, Czura CJ, Ivanova SM, Tracey KJ: **Pharmacological Stimulation of the Cholinergic Antiinflammatory Pathway.** *J Exp Med* 2002, **195**(6):781-788.
61. Tracey KJ, Czura CJ, Ivanova S: **Mind over immunity.** *FASEB J* 2001, **15**(9):1575-1576.
62. Takakura K TT, Muramatsu I, Takeuchi K, Fukuda S.: **Modification of alpha1 -adrenoceptors by peroxyntirite as a possible mechanism of systemic hypotension in sepsis.** *Crit Care Med* 2002 **30**(4):894-899.

63. 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.
64. Daveu C, Servy C, Dendane M, Marin P, Ducrocq C: **Oxidation and nitration of catecholamines by nitrogen oxides derived from nitric oxide.** *Nitric Oxide* 1997, **1**(3):234-243.
65. Shintani F, Kinoshita T, Kanba S, Ishikawa T, Suzuki E, Sasakawa N, Kato R, Asai M, Nakaki T: **Bioactive 6-Nitronorepinephrine Identified in Mammalian Brain.** *J Biol Chem* 1996, **271**(23):13561-13565.
66. Szabo C, Mitchell JA, Thiemermann C, Vane JR: **Nitric oxide-mediated hyporeactivity to noradrenaline precedes the induction of nitric oxide synthase in endotoxin shock.** *Br J Pharmacol* 1993, **108**(3):786-792.
67. Theilmeier G, Booke M: **Norepinephrine in septic patients--friend or foe?** *Journal of Clinical Anesthesia* 2003, **15**(2):154-158.
68. Clutter WE, Cryer PE: **Plasma dose-response studies with noradrenaline and adrenaline in man.** *Prog Biochem Pharmacol* 1980, **17**:84-89.
69. Vallet B, Lund N, Curtis SE, Kelly D, Cain SM: **Gut and muscle tissue PO<sub>2</sub> in endotoxemic dogs during shock and resuscitation.** *J Appl Physiol* 1994, **76**(2):793-800.
70. Ince C, Sinaasappel M: **Microcirculatory oxygenation and shunting in sepsis and shock.** *Crit Care Med* 1999, **27**(7):1369-1377.
71. Dahn MS, Lange P, Lobdell K, Hans B, Jacobs LA, Mitchell RA: **Splanchnic and total body oxygen consumption differences in septic and injured patients.** *Surgery* 1987, **101**(1):69-80.
72. De Backer D, Creteur J, Noordally O, Smail N, Gulbis B, Vincent JL: **Does hepato-splanchnic VO<sub>2</sub>/DO<sub>2</sub> dependency exist in critically ill septic patients?** *Am J Respir Crit Care Med* 1998, **157**(4 Pt 1):1219-1225.
73. Gotloib L, Shostak A, Galdi P, Jaichenko J, Fudin R: **Loss of microvascular negative charges accompanied by interstitial edema in septic rats' heart.** *Circ Shock* 1992, **36**(1):45-56.
74. Solomon MA, Correa R, Alexander HR, Koev LA, Cobb JP, Kim DK, Roberts WC, Quezado ZM, Scholz TD, Cunnion RE *et al*: **Myocardial energy metabolism and morphology in a canine model of sepsis.** *Am J Physiol* 1994, **266**(2 Pt 2):H757-768.
75. Piper RD, Li FY, Myers ML, Sibbald WJ: **Structure-function relationships in the septic rat heart.** *Am J Respir Crit Care Med* 1997, **156**(5):1473-1482.
76. Granton JT, Goddard CM, Allard MF, van Eeden S, Walley KR: **Leukocytes and decreased left-ventricular contractility during endotoxemia in rabbits.** *Am J Respir Crit Care Med* 1997, **155**(6):1977-1983.
77. Hinshaw LB: **Sepsis/septic shock: participation of the microcirculation: an abbreviated review.** *Crit Care Med* 1996, **24**(6):1072-1078.
78. Rabuel C, Tavernier B, A. M: **Physiopathologie de la défaillance cardiaque** Springer 2005:51-71.
79. Rudiger A, Singer M: **Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction.** *Crit Care Med* 2007, **35**(6):1599-1608.
80. Jones SB, Kovarik MF, Romano FD: **Cardiac and splenic norepinephrine turnover during septic peritonitis.** *Am J Physiol* 1986, **250**(5 Pt 2):R892-897.
81. Wu LL, Tang C, Liu MS: **Hyper- and hypocardiodynamic states are associated with externalization and internalization, respectively, of alpha-adrenergic receptors in rat heart during sepsis.** *Shock* 1997, **7**(5):318-323.
82. Tang C, Liu MS: **Initial externalization followed by internalization of beta-adrenergic receptors in rat heart during sepsis.** *Am J Physiol* 1996, **270**(1 Pt 2):R254-263.

83. Abi-Gerges N, Tavernier B, Mebazaa A, Faivre V, Paqueron X, Payen D, Fischmeister R, Mery PF: **Sequential changes in autonomic regulation of cardiac myocytes after in vivo endotoxin injection in rat.** *Am J Respir Crit Care Med* 1999, **160**(4):1196-1204.
84. Tavernier B, Mebazaa A, Mateo P, Sys S, Ventura-Clapier R, Veksler V: **Phosphorylation-dependent alteration in myofilament  $Ca^{2+}$  sensitivity but normal mitochondrial function in septic heart.** *Am J Respir Crit Care Med* 2001, **163**(2):362-367.
85. Ferdinandy P, Danial H, Ambrus I, Rothery RA, Schulz R: **Peroxynitrite is a major contributor to cytokine-induced myocardial contractile failure.** *Circ Res* 2000, **87**(3):241-247.
86. Pugin J, Schurer-Maly CC, Leturcq D, Moriarty A, Ulevitch RJ, Tobias PS: **Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, **90**(7):2744-2748.
87. Jardin F, Bourdarias JP: **Cardiac dysfunction in sepsis.** *Intensive Care Med* 1998, **24**(9):990-992.
88. 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.
89. Duranteau J, C R: **Beneficial effects expected from vascular filling.** *réanimation* 2004, **13**:268-272.
90. 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.
91. Fleck A: **Computer models for metabolic studies on plasma proteins.** *Ann Clin Biochem* 1985, **22** ( Pt 1):33-49.
92. **American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis.** *Crit Care Med* 1992, **20**(6):864-874.
93. Dellinger RP: **Cardiovascular management of septic shock.** *Crit Care Med* 2003, **31**(3):946-955.
94. Teboul J.-L. elgdedlS: **Recommandations d'experts de la SRLF « Indicateurs du remplissage vasculaire au cours de l'insuffisance circulatoire » SRLF experts recommendations Indicators of volume resuscitation during circulatory failure.** *Réanimation* 2004, **13**:255-263.
95. 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.
96. Kopin IJ: **Catecholamine metabolism: basic aspects and clinical significance.** *Pharmacol Rev* 1985, **37**(4):333-364.
97. Breslow MJ, Tobin JR, Kubos KL, Raff H, Traystman RJ: **Effect of adrenal hypotension on elicited secretory activity in anesthetized dogs.** *Am J Physiol* 1991, **260**(1 Pt 2):H21-26.
98. 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.
99. Martin C, Papazian L, Perrin G, Saux P, Gouin F: **Norepinephrine or dopamine for the treatment of hyperdynamic septic shock?** *Chest* 1993, **103**(6):1826-1831.
100. De Backer D, Creteur J, Silva E, Vincent JL: **Effects of dopamine, norepinephrine, and epinephrine on the splanchnic circulation in septic shock: which is best?** *Crit Care Med* 2003, **31**(6):1659-1667.



101. Levy B, Dusang B, Annane D, Gibot S, Bollaert PE: **Cardiovascular response to dopamine and early prediction of outcome in septic shock: a prospective multiple-center study.** *Crit Care Med* 2005, **33**(10):2172-2177.
102. Marik PE, Mohedin M: **The contrasting effects of dopamine and norepinephrine on systemic and splanchnic oxygen utilization in hyperdynamic sepsis.** *Jama* 1994, **272**(17):1354-1357.
103. Ruokonen E, Takala J, Kari A, Saxen H, Mertsola J, Hansen EJ: **Regional blood flow and oxygen transport in septic shock.** *Crit Care Med* 1993, **21**(9):1296-1303.
104. Guerin JP, Levraut J, Samat-Long C, Leverve X, Grimaud D, Ichai C: **Effects of dopamine and norepinephrine on systemic and hepatosplanchnic hemodynamics, oxygen exchange, and energy balance in vasoplegic septic patients.** *Shock* 2005, **23**(1):18-24.
105. Schreuder WO, Schneider AJ, Groeneveld AB, Thijs LG: **Effect of dopamine vs norepinephrine on hemodynamics in septic shock. Emphasis on right ventricular performance.** *Chest* 1989, **95**(6):1282-1288.
106. Reinelt H, Radermacher P, Kiefer P, Fischer G, Wachter U, Vogt J, Georgieff M: **Impact of exogenous beta-adrenergic receptor stimulation on hepatosplanchnic oxygen kinetics and metabolic activity in septic shock.** *Crit Care Med* 1999, **27**(2):325-331.
107. Gregory JS, Bonfiglio MF, Dasta JF, Reilley TE, Townsend MC, Flancbaum L: **Experience with phenylephrine as a component of the pharmacologic support of septic shock.** *Crit Care Med* 1991, **19**(11):1395-1400.
108. Borgel D, J-L D: **Mécanismes de l'activation de la coagulation dans le sepsis: rôle du système de la protéin C.** *Hématologie* 2005, **11**(2):139-147.
109. Gandrille S, Saposnik B: **Le récepteur endothelial à la protéin C (EPCR): un récepteur à l'interface entre coagulation et système inflammatoire.** *Hématologie* 2001, **7**:418-428.
110. Levi M, de Jonge E, van der Poll T: **Rationale for restoration of physiological anticoagulant pathways in patients with sepsis and disseminated intravascular coagulation.** *Crit Care Med* 2001, **29**(7 Suppl):S90-94.
111. Yan SC, Razzano P, Chao YB, Walls JD, Berg DT, McClure DB, Grinnell BW: **Characterization and novel purification of recombinant human protein C from three mammalian cell lines.** *Biotechnology (NY)* 1990, **8**(7):655-661.
112. 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.
113. Bernard GR, Margolis BD, Shanies HM, Ely EW, Wheeler AP, Levy H, Wong K, Wright TJ: **Extended evaluation of recombinant human activated protein C United States Trial (ENHANCE US): a single-arm, phase 3B, multicenter study of drotrecogin alfa (activated) in severe sepsis.** *Chest* 2004, **125**(6):2206-2216.
114. Mosnier LO, Zlokovic BV, Griffin JH: **The cytoprotective protein C pathway.** *Blood* 2007, **109**(8):3161-3172.
115. Shimizu S, Gabazza EC, Taguchi O, Yasui H, Taguchi Y, Hayashi T, Ido M, Shimizu T, Nakagaki T, Kobayashi H *et al*: **Activated protein C inhibits the expression of platelet-derived growth factor in the lung.** *Am J Respir Crit Care Med* 2003, **167**(10):1416-1426.
116. Yasui H, Gabazza EC, Tamaki S, Kobayashi T, Hataji O, Yuda H, Shimizu S, Suzuki K, Adachi Y, Taguchi O: **Intratracheal administration of activated protein C inhibits bleomycin-induced lung fibrosis in the mouse.** *Am J Respir Crit Care Med* 2001, **163**(7):1660-1668.

117. Zlokovic BV, Zhang C, Liu D, Fernandez J, Griffin JH, Chopp M: **Functional recovery after embolic stroke in rodents by activated protein C.** *Ann Neurol* 2005, **58**(3):474-477.
118. Cheng T, Liu D, Griffin JH, Fernandez JA, Castellino F, Rosen ED, Fukudome K, Zlokovic BV: **Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective.** *Nat Med* 2003, **9**(3):338-342.
119. 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.
120. Hoffmann JN, Vollmar B, Laschke MW, Inthorn D, Fertmann J, Schildberg FW, Menger MD: **Microhemodynamic and cellular mechanisms of activated protein C action during endotoxemia.** *Crit Care Med* 2004, **32**(4):1011-1017.
121. Iba T, Kidokoro A, Fukunaga M, Nagakari K, Shirahama A, Ida Y: **Activated protein C improves the visceral microcirculation by attenuating the leukocyte-endothelial interaction in a rat lipopolysaccharide model.** *Crit Care Med* 2005, **33**(2):368-372.
122. Nick JA, Coldren CD, Geraci MW, Poch KR, Fouty BW, O'Brien J, Gruber M, Zarini S, Murphy RC, Kuhn K *et al*: **Recombinant human activated protein C reduces human endotoxin-induced pulmonary inflammation via inhibition of neutrophil chemotaxis.** *Blood* 2004, **104**(13):3878-3885.
123. Murakami K, Okajima K, Uchiba M, Johno M, Nakagaki T, Okabe H, Takatsuki K: **Activated protein C attenuates endotoxin-induced pulmonary vascular injury by inhibiting activated leukocytes in rats.** *Blood* 1996, **87**(2):642-647.
124. Schoots IG, Levi M, van Vliet AK, Maas AM, Roossink EH, van Gulik TM: **Inhibition of coagulation and inflammation by activated protein C or antithrombin reduces intestinal ischemia/reperfusion injury in rats.** *Crit Care Med* 2004, **32**(6):1375-1383.
125. Yamanel L, Mas MR, Comert B, Isik AT, Aydin S, Mas N, Deveci S, Ozyurt M, Tasci I, Unal T: **The effect of activated protein C on experimental acute necrotizing pancreatitis.** *Crit Care* 2005, **9**(3):R184-190.
126. Riewald M, Ruf W: **Protease-activated receptor-1 signaling by activated protein C in cytokine-perturbed endothelial cells is distinct from thrombin signaling.** *J Biol Chem* 2005, **280**(20):19808-19814.
127. Francini N, Bachli EB, Blau N, Leikauf MS, Schaffner A, Schoedon G: **Gene expression profiling of inflamed human endothelial cells and influence of activated protein C.** *Circulation* 2004, **110**(18):2903-2909.
128. Hooper WC, Phillips DJ, Renshaw MA, Evatt BL, Benson JM: **The up-regulation of IL-6 and IL-8 in human endothelial cells by activated protein C.** *J Immunol* 1998, **161**(5):2567-2573.
129. Brueckmann M, Marx A, Weiler HM, Liebe V, Lang S, Kaden JJ, Zieger W, Borggrefe M, Huhle G, Konstantin Haase K: **Stabilization of monocyte chemoattractant protein-1-mRNA by activated protein C.** *Thromb Haemost* 2003, **89**(1):149-160.
130. White B, Schmidt M, Murphy C, Livingstone W, O'Toole D, Lawler M, O'Neill L, Kelleher D, Schwarz HP, Smith OP: **Activated protein C inhibits lipopolysaccharide-induced nuclear translocation of nuclear factor kappaB (NF-kappaB) and tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) production in the THP-1 monocytic cell line.** *Br J Haematol* 2000, **110**(1):130-134.
131. Joyce DE, Gelbert L, Ciaccia A, DeHoff B, Grinnell BW: **Gene expression profile of antithrombotic protein c defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis.** *J Biol Chem* 2001, **276**(14):11199-11203.
132. Sturn DH, Kaneider NC, Feistritzer C, Djanani A, Fukudome K, Wiedermann CJ: **Expression and function of the endothelial protein C receptor in human neutrophils.** *Blood* 2003, **102**(4):1499-1505.

133. Hoffmann JN, Vollmar B, Romisch J, Inthorn D, Schildberg FW, Menger MD: **Antithrombin effects on endotoxin-induced microcirculatory disorders are mediated mainly by its interaction with microvascular endothelium.** *Crit Care Med* 2002, **30**(1):218-225.
134. Brueckmann M, Horn S, Lang S, Fukudome K, Schulze Nahrup A, Hoffmann U, Kaden JJ, Borggreffe M, Haase KK, Huhle G: **Recombinant human activated protein C upregulates cyclooxygenase-2 expression in endothelial cells via binding to endothelial cell protein C receptor and activation of protease-activated receptor-1.** *Thromb Haemost* 2005, **93**(4):743-750.
135. Brueckmann M, Nahrup AS, Lang S, Bertsch T, Fukudome K, Liebe V, Kaden JJ, Hoffmann U, Borggreffe M, Huhle G: **Recombinant human activated protein C upregulates the release of soluble fractalkine from human endothelial cells.** *Br J Haematol* 2006, **133**(5):550-557.
136. Finigan JH, Dudek SM, Singleton PA, Chiang ET, Jacobson JR, Camp SM, Ye SQ, Garcia JG: **Activated protein C mediates novel lung endothelial barrier enhancement: role of sphingosine 1-phosphate receptor transactivation.** *J Biol Chem* 2005, **280**(17):17286-17293.
137. Feistritzer C, Riewald M: **Endothelial barrier protection by activated protein C through PAR1-dependent sphingosine 1-phosphate receptor-1 crossactivation.** *Blood* 2005, **105**(8):3178-3184.
138. Riewald M, Petrovan RJ, Donner A, Mueller BM, Ruf W: **Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway.** *Science* 2002, **296**(5574):1880-1882.
139. Yamaji K, Wang Y, Liu Y, Abeyama K, Hashiguchi T, Uchimura T, Krishna Biswas K, Iwamoto H, Maruyama I: **Activated protein C, a natural anticoagulant protein, has antioxidant properties and inhibits lipid peroxidation and advanced glycation end products formation.** *Thromb Res* 2005, **115**(4):319-325.
140. Kalil AC, Coyle SM, Um JY, LaRosa SP, Turlo MA, Calvano SE, Sundin DP, Nelson DR, Lowry SF: **Effects of drotrecogin alfa (activated) in human endotoxemia.** *Shock* 2004, **21**(3):222-229.
141. 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.
142. Favory R, Lancel S, Marechal X, Tissier S, Neviere R: **Cardiovascular protective role for activated protein C during endotoxemia in rats.** *Intensive Care Med* 2006, **32**(6):899-905.
143. Mizutani A, Okajima K, Uchiba M, Noguchi T: **Activated protein C reduces ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats by inhibiting leukocyte activation.** *Blood* 2000, **95**(12):3781-3787.
144. Kerschen EJ, Fernandez JA, Cooley BC, Yang XV, Sood R, Mosnier LO, Castellino FJ, Mackman N, Griffin JH, Weiler H: **Endotoxemia and sepsis mortality reduction by non-anticoagulant activated protein C.** *J Exp Med* 2007, **204**(10):2439-2448.
145. Mosnier LO, Gale AJ, Yegneswaran S, Griffin JH: **Activated protein C variants with normal cytoprotective but reduced anticoagulant activity.** *Blood* 2004, **104**(6):1740-1744.
146. Preston RJ, Ajzner E, Razzari C, Karageorgi S, Dua S, Dahlback B, Lane DA: **Multifunctional specificity of the protein C/activated protein C Gla domain.** *J Biol Chem* 2006, **281**(39):28850-28857.
147. 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.

148. 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.** *Intensive Care Med* 2004, **30**(4):536-555.
149. Nourira S, Elatrous S, Dimassi S, Besbes L, Boukef R, Mohamed B, Abroug F: **Effects of norepinephrine on static and dynamic preload indicators in experimental hemorrhagic shock.** *Crit Care Med* 2005, **33**(10):2339-2343.
150. Rothe CF, Gaddis ML: **Autoregulation of cardiac output by passive elastic characteristics of the vascular capacitance system.** *Circulation* 1990, **81**(1):360-368.
151. Hirakawa S, Itoh H, Kotoo Y, Abe C, Endo T, Takada N, Fuseno H: **The role of alpha and beta adrenergic receptors in constriction and dilation of the systemic capacitance vessels: a study with measurements of the mean circulatory pressure in dogs.** *Jpn Circ J* 1984, **48**(7):620-632.
152. Michard F, Chemla D, Richard C, Wysocki M, Pinsky MR, Lecarpentier Y, Teboul JL: **Clinical use of respiratory changes in arterial pulse pressure to monitor the hemodynamic effects of PEEP.** *Am J Respir Crit Care Med* 1999, **159**(3):935-939.
153. Michard F, Boussat S, Chemla D, Anguel N, Mercat A, Lecarpentier Y, Richard C, Pinsky MR, Teboul JL: **Relation between respiratory changes in arterial pulse pressure and fluid responsiveness in septic patients with acute circulatory failure.** *Am J Respir Crit Care Med* 2000, **162**(1):134-138.
154. Bourgoin A, Leone M, Delmas A, Garnier F, Albanese J, Martin C: **Increasing mean arterial pressure in patients with septic shock: effects on oxygen variables and renal function.** *Crit Care Med* 2005, **33**(4):780-786.
155. Niinikoski J, Halkola L: **Skeletal muscle PO<sub>2</sub>: indicator of peripheral tissue perfusion in haemorrhagic shock.** *Adv Exp Med Biol* 1977, **94**:585-592.
156. Levy B, Gibot S, Franck P, Cravoisy A, Bollaert PE: **Relation between muscle Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPase activity and raised lactate concentrations in septic shock: a prospective study.** *Lancet* 2005, **365**(9462):871-875.
157. Cuenca J, Martin-Sanz P, Alvarez-Barrientos AM, Bosca L, Goren N: **Infiltration of inflammatory cells plays an important role in matrix metalloproteinase expression and activation in the heart during sepsis.** *Am J Pathol* 2006, **169**(5):1567-1576.
158. Landry DW, Oliver JA: **The pathogenesis of vasodilatory shock.** *N Engl J Med* 2001, **345**(8):588-595.
159. Lalu MM, Csont T, Schulz R: **Matrix metalloproteinase activities are altered in the heart and plasma during endotoxemia.** *Crit Care Med* 2004, **32**(6):1332-1337.
160. Moncada S, Higgs EA: **Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance.** *Eur J Clin Invest* 1991, **21**(4):361-374.
161. Dudzinski DM, Michel T: **Life history of eNOS: partners and pathways.** *Cardiovasc Res* 2007, **75**(2):247-260.
162. Chauhan SD, Seggara G, Vo PA, Macallister RJ, Hobbs AJ, Ahluwalia A: **Protection against lipopolysaccharide-induced endothelial dysfunction in resistance and conduit vasculature of iNOS knockout mice.** *Faseb J* 2003, **17**(6):773-775.
163. Matsuda N, Hayashi Y, Takahashi Y, Hattori Y: **Phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase is diminished in mesenteric arteries from septic rabbits depending on the altered phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway: reversal effect of fluvastatin therapy.** *J Pharmacol Exp Ther* 2006, **319**(3):1348-1354.
164. Bretschneider E, Uzonyi B, Weber AA, Fischer JW, Pape R, Lotzer K, Schror K: **Human vascular smooth muscle cells express functionally active endothelial cell protein C receptor.** *Circ Res* 2007, **100**(2):255-262.

165. Wiel E, Costecalde ME, Lebuffe G, Corseaux D, Jude B, Bordet R, Tavernier B, Vallet B: **Activated protein C increases sensitivity to vasoconstriction in rabbit Escherichia coli endotoxin-induced shock.** *Crit Care* 2006, **10**(2):R47.
166. Rodhin J: **Architecture of the vessel wall. Handbook of physiology. Section II: the Cardiovascular System II: Vascular Smooth Muscle.** Bohr DF, SOMLYO AP & SPARKS HV, *American Physiological Society, Bethesda* 1980, **1-32**.
167. Murray: **The physiological principle of minimum work. The vascular system and the cost of blood volume.** *Proc Natl Acad Sci* 1926, **12**:207-214.
168. Schretzenmayr: **Über kreislaufregulatorische Vorgänge an den grossen Arterien bei der Muskelarbeit.** *Plügers Arch* 1933, **232**:743-748.
169. Rodbard S: **Vascular caliber.** *Cardiology* 1975, **60**(1):4-49.
170. Rodbard S: **Negative feedback mechanisms in the architecture and function of the connective and cardiovascular tissues.** *Perspect Biol Med* 1970, **13**(4):507-527.
171. 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.
172. Davies PF: **Flow-mediated endothelial mechanotransduction.** *Physiol Rev* 1995, **75**(3):519-560.
173. Henrion D: **Moyen d'étude des artères de résistance** *Livre Biologie et pathologie du coeur et des vaisseaux* 2002, **37**(0):419-426.

## **IX. ANNEXES**

## **Annexe 1:**

### **Principe des mesures hémodynamiques:**

Les différents appareils de mesure ont été raccordés à un système d'acquisition des données (IOX, EMKA, Technologies, Paris, France), prise de mesure en continu.

#### **1. Mesure de pression :**

L'artère carotide gauche est canulée (PE50), la pression artérielle et la fréquence cardiaque sont suivies en continu grâce à une tête de pression et un moniteur.

Une sonde de pression (ou capteur de pression) est un dispositif destiné à convertir les variations de pression en variations de tension électrique. Lorsque la sonde est reliée à un système numérique, les variations analogiques sont d'abord converties en signaux numériques binaires par une interface avant d'être transmises à l'ordinateur de contrôle et de gestion.

#### **2. Mesure des débits aortiques et mésentériques :**

L'aorte abdominale et l'artère mésentérique sont également disséquées et une sonde périvasculaire placé au tour de chacune des deux artères. La sonde est connectée à un débitmètre ultrasonique (T206, Transonic Systems, Ithaca, NY, USA).

Mode de fonctionnement des débitmètres ; le vaisseau est placé à l'intérieur d'une sonde périvasculaire. Cette sonde comprend deux transducteurs et un réflecteur sur l'autre transducteur. Une analyse mathématique permet ensuite de transformer le temps nécessaire pour les ultrasons d'aller d'un transducteur à l'autre, en une vitesse d'écoulement du sang à l'intérieur du vaisseau sanguin. Les résultats ainsi obtenus sont indépendants du diamètre du vaisseau.

#### **3. Dosage des taux de lactate :**

0,4 ml de sang sont prélevé de l'artère carotide dans des tubes de types Clinitubes 85µl, La concentration en lactate a été déterminée avec un analyseur automatique des gaz du sang (ABL 735 ; Radiometer, Copenhagen, Danmark)

#### **4. Mesure de pression en oxygène :**

La pression partielle en oxygène est ajustée à la température et monitorée en utilisant une sonde Licox Sensor System (Integrat Neuroscience, Painsboro, NJ), inséré dans le muscle.

La survie des tissus et des organes est fonction de l'approvisionnement en oxygène aux cellules qui constituent les tissus. D'une manière générale, la mesure de la pression partielle en oxygène

des tissus (ptiO<sub>2</sub>) permet une mesure de disponibilité de l'oxygène au niveau cellulaire. L'appareil LICOX CMP est utilisé pour mesurer en continu la pression partielle d'oxygène (PO<sub>2</sub>) dans les tissus. Les capteurs utilisés sont des cathéters microélectrodes faiblement invasifs. La température tissulaire peut aussi être mesurée en continu à l'aide de l'appareil pour la compensation de la valeur de PO<sub>2</sub> en fonction de la température.

## 5. Mesure du flux sanguin :

Le flux sanguin est mesuré par le laser doppler (Periflux 4001 M Aster ; Perimed AB, Järfälla, Sweden). Après insertion de la sonde dans le muscle, un temps d'équilibration de 30min est respecté avant de prendre les résultats.

Le laser doppler émet un faisceau hélium-néon monochromatique d'une longueur d'onde de 632,8 nm, de faible puissance (2 mW), suivant un régime continu. Le principe de la méthode repose sur l'effet doppler. Le faisceau est dirigé sur le muscle par des fibres optiques tandis qu'un système de photodétecteur récupère la lumière rétro-diffusée. Le faisceau incident rencontrant une cellule sanguine en mouvement est réfléchi avec un décalage de fréquence proportionnel à la vitesse de la cellule heurtée. Les éléments immobiles du tissu modifient la direction du rayon mais non sa fréquence. La somme des décalages de fréquence induits par les globules rouges en mouvement représente le signal réfléchi. Son spectre est une courbe de Gauss, centrée par la fréquence incidente du faisceau et dont la largeur est proportionnelle à la vitesse moyenne des cellules sanguines.



## **Annexe 2 :**

### **Principe des mesures des paramètres biochimique :**

#### 1. Western Blotting :

Les vaisseaux et le cœur sont prélevés et congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$ , sont broyés dans l'azote liquide. La poudre ainsi obtenue est ensuite homogénéisée, à température ambiante, dans un tampon de lyse (SDS-PAGE). Après centrifugation à 15000 rotations par minute (rpm) pendant 15 minutes à  $15^{\circ}\text{C}$ , les protéines sont dosées selon la méthode Pierce (BCA protein assay kit). Les lysats obtenus sont déposés dans un gel de polyacrylamide. Les protéines sont ensuite transférées, toute la nuit à  $4^{\circ}\text{C}$ , sur une membrane de nitro-cellulose. Après saturation (2 heures) dans du TBS-T [Tris 100mM pH7,4, NaCl 150mM, Tween 0,1%] en présence de lait écrémé (5%) ou de BSA (Bovin Serum Albumin 2%), les membranes sont incubées avec les anticorps primaires dirigés contre les protéines à doser iNOS, PI-kB, nitrotyrosine, NF-kB p65, COX<sub>2</sub>, eNOS, P-eNOS, Akt, P-Akt.

Les membranes sont ensuite rincées (3 fois pendant 5 min) dans du TBS-T et incubées à température ambiante pendant 1 heure avec les anticorps secondaires couplés à la peroxydase. La peroxydase est révélée par chémiluminescence, après rinçage dans du TBS-T (3 fois pendant 5 min), grâce à un kit de détection (ECL-Plus Chemiluminescence kit, Amersham) et détectée à l'aide du système Fujifilm Las-1000. Les résultats obtenus sont normalisés par rapport à l'actine ou la tubuline et au rouge ponceau, permettant d'attester d'un dépôt régulier d'une même quantité de protéines.

#### 2. Elisa :

Avec cette méthode nous avons mesurés les concentrations de TNF- $\alpha$  (RnD Systems, Lille, France) et de MPO (CytoStore, Calgary, Canada).

La technique Elisa est une réaction immuno-enzymatique faisant intervenir un anticorps spécifique fixé sur un support, un prélèvement biologique contenant éventuellement l'antigène complémentaire, un deuxième anticorps spécifique marqué par une enzyme et enfin le substrat de cette enzyme dont la dégradation sera à l'origine par exemple d'un changement de couleur.

#### 3. Zymographie :

L'activité des MMP-9 est mesurée avec une spécificité vis à vis de la matrice métalloprotéinases Biotrak, (Amersham Biosciences, USA).

Cette méthode permet de détecter l'activité de certaines métalloprotéinases matricielle comme la MMP -9. L'activité protéasique des MMPs dans les extraits protéiques obtenus comme décrit précédemment et analysée dans un gel de polyacrylamide 12% copolymérisé avec 1 mg/ml de gélatine. Une électrophorèse est réalisée avec 5 µg de chacun des extraits mélangés avec un tampon Laemmli non réducteur. Après migration, les gels sont incubés 30 min à température ambiante dans une solution de renaturation (2.5% Triton X-100), rincés brièvement dans de l'eau distillée puis incubés pendant 24 h à 37°C dans un tampon Tris-HCl pH 7.5 contenant 5 mM de CaCl<sub>2</sub>. Les gels sont alors colorés pendant 30 min avec du bleu de Coomassie R-250 0.1% dans une solution contenant 20% d'isopropanol et 10% d'acide acétique puis sont décolorés dans cette même solution ne contenant pas de colorant afin de révéler l'activité gélatinolytique.

#### 4. La spectrophotométrie :

Dans note étude nous avons mesuré par cette méthode les protéines carbonyles (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA) et l'hydroperoxide lipidique (LPO) dans le plasma (Cayman Chemical Co).

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée en solution. Plus cette espèce est concentrée plus elle absorbe la lumière dans les limites de proportionnalités. La densité optique des solutions est déterminée par un spectrophotomètre préalablement étalonné sur la longueur d'onde d'absorption de l'espèce chimique à étudier.

#### 5. Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) :

La RPE est la méthode la plus spécifique de caractérisation des radicaux libres transitoires intervenant dans une multitude de réactions chimiques parmi lesquelles figure l'oxydation. Les méthodologies utilisées ont été basées principalement sur le piégeage de spin. Des ligands organiques ont été synthétisés, caractérisés puis appliqués à la complexation du fer (II) pour développer des piègeurs de spin spécifiques de NO et du O<sub>2</sub><sup>-</sup>.

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

## **Annexe 3 :**

### **1. Réactivité vasculaire:**

Les artères assurent la distribution du sang dans tout l'organisme, et ce, 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. La conduction sanguine suppose le maintien de l'intégrité de la paroi artérielle. La rigidité artérielle, avec une diminution de la distension des gros troncs artériels, est un important facteur de risque cardio-vasculaire remarquable, en particulier par l'augmentation de la pression pulsée [166].

- les artères de résistance ou musculaires, sont classiquement définies comme étant des artères de diamètre inférieur à 300µm. 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.

### **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.

## **1.1 Facteurs nerveux:**

### 1.1.1 Contrôle noradrénergique

La noradrénaline (NA) : est libérée par les terminaisons du système nerveux sympathique qui innervent de façon ubiquitaire les vaisseaux sanguins artériels et veineux. Elle agit préférentiellement sur les récepteurs de type  $\alpha_1$  au niveau de la plupart des vaisseaux. L'activation de ces récepteurs  $\alpha_1$  entraîne une vasoconstriction. Il existe en outre des récepteurs de type  $\beta_2$  dont l'activation entraîne une vasodilatation. La répartition des différents types de récepteurs adrénergiques est très variable selon le vaisseau considéré et le comportement du muscle lisse vasculaire dépend en partie de la proportion de chaque type de récepteur présent.

### 1.1.2 Contrôle cholinergique

L'acétylcholine (Ach) : La paroi des vaisseaux du système périphérique reçoit une innervation cholinergique parasympathique. Celle-ci induit une vasodilatation dépendante de l'endothélium et mettant en jeu la libération d'un facteur relaxant d'origine endothéliale le monoxyde d'azote (NO).

## **1.2 Facteurs humoraux et paracrines**

L'endothélium synthétise et sécrète de nombreuses substances vasoactives qui diffusent vers le muscle lisse et provoquent sa relaxation ou sa contraction. Une des substances la plus étudiée est représentée par le NO. Il est synthétisé à partir de la L-arginine, grâce à la NO-synthase dont l'activité est modulée par la concentration intracellulaire de calcium, elle-même sous la dépendance de substances vasoactives (Ach, bradykinine...etc). Le NO interagit avec la guanylate-cyclase, provoquant ainsi une augmentation de GMPc. Il en résulte une vasodilatation tonique.

L'adrénaline (Ad) est libérée par les cellules de la médullo-surrénale. Comme toute hormone, elle est véhiculée par la circulation et, en activant les récepteurs adrénergiques, induit les mêmes effets que la NA.

## **2. Régulation hémodynamique de la réactivité vasculaire:**

### **2.1 La dilatation flux dépendante :**

L'endothélium, surface interne du tissu vasculaire, constitue l'interface cellulaire entre la paroi artérielle et le sang circulant; et 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 cellules musculaires lisses vasculaires et permet de normaliser les contraintes de cisaillements.

Thoma [60] et Murray [167] sont les premiers à suggérer que le flux sanguin pouvait réguler le tonus vasculaire, mais c'est Schretzenmayr [168] qui, pour la première fois, a démontré expérimentalement la notion de vasomotricité en réponse à des variations de flux sanguin. Rodbard [169, 170] a ensuite suggéré que l'endothélium pouvait « sentir » la contrainte de cisaillement générée par le sang circulant. En 1980, Furchgott et Zawadski [171] 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 [172].

### **2.1.1 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, « endothelial-derived relaxing factors ») dont les principaux représentants sont le monoxyde d'azote (NO), la prostacycline (PGI<sub>2</sub>) et l'EDHF (endothelial derived hyperpolarizing factor); et à l'opposé une baisse de flux stimule la libération de facteurs vasoconstricteurs comme l'endothéline-1, le thromboxane.

## 2.2 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 est attribuée en 1902 à Bayliss, qui formula clairement l'influence de la pression intraluminale sur le tonus vasculaire. Outre quelques études qui tentaient de confirmer les observations de Bayliss, la majorité des chercheurs attribuaient à cette régulation vasculaire locale des mécanismes chimiques ou nerveux ; et ce jusqu'à ce que Folkow démontre en 1949 que des préparations dénervées développaient un tonus vasculaire dépendant de la pression, puis en 1952 que l'autorégulation du flux sanguin était en partie 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. Les travaux de Johnson sur des organes isolés suggèrent 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, Mellander et ses collaborateurs ont 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: 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.

### 2.2.1 Mécanismes impliqués :

Le tonus myogénique est une contraction active du muscle lisse vasculaire (figure 17). 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 était basée sur des enregistrements simultanés de tension et de potentiel membranaire, et sur la dépendance calcique du tonus myogénique dans des vaisseaux de résistance.

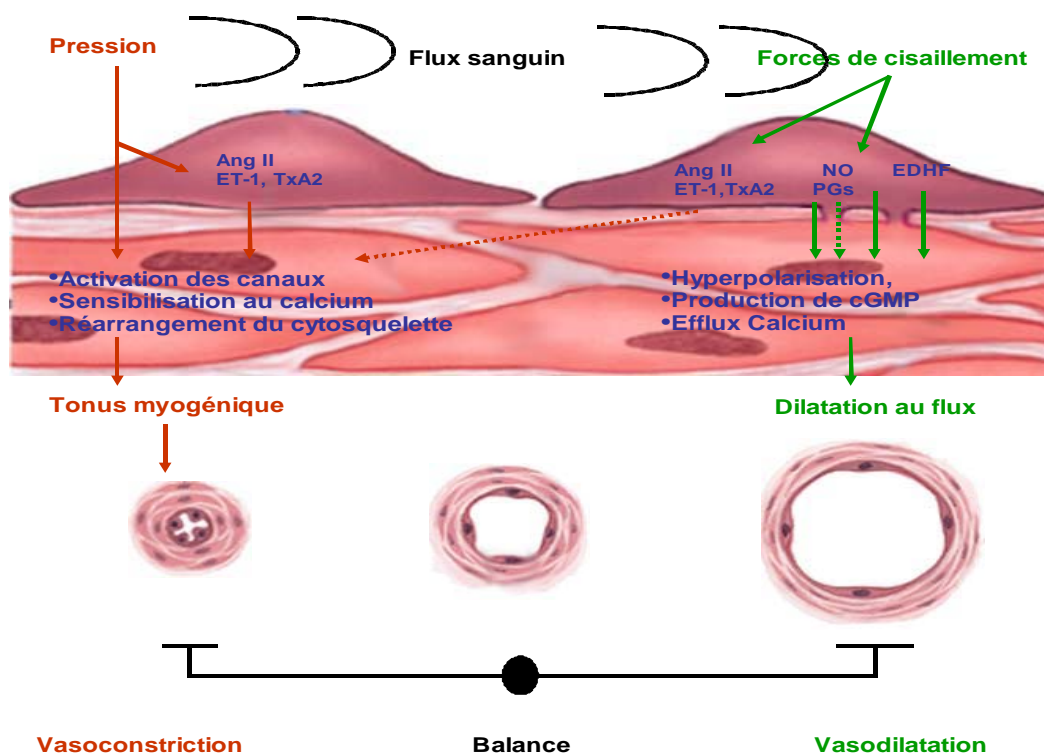


Figure 17: Contrôle du tonus vasculaire par la pression et le débit.

### Technique d'étude in vitro des vaisseaux:

#### 1. Myographe :

Après anesthésie des souris, les segments d'aorte thoracique (2mm) sont isolés et installés dans un myographe. Deux tiges métalliques sont insérées dans la lumière du vaisseau. L'une d'elles est reliée à un support dont la position peut être modifiée grâce à un micromètre. L'autre tige

métallique est reliée à un capteur de force (jauge de contrainte, mesure de force isométrique) relié à un amplificateur et à un système d'acquisition et de traitement des données. Chaque segment plonge dans une cuve de 10ml contenant une solution physiologique de composition suivante : 119mM NaCl, 14,9mM NaHCO<sub>3</sub>, 4,7mM KCl, 2,5mM CaCl<sub>2</sub>, 1,2mM MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 2,5mM CaCl<sub>2</sub>, 1,18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5,5 mM glucose. Le pH est de 7.4, la solution est bullée avec un mélange de 95% O<sub>2</sub> et 5% CO<sub>2</sub> et rincée toutes les 15 minutes.

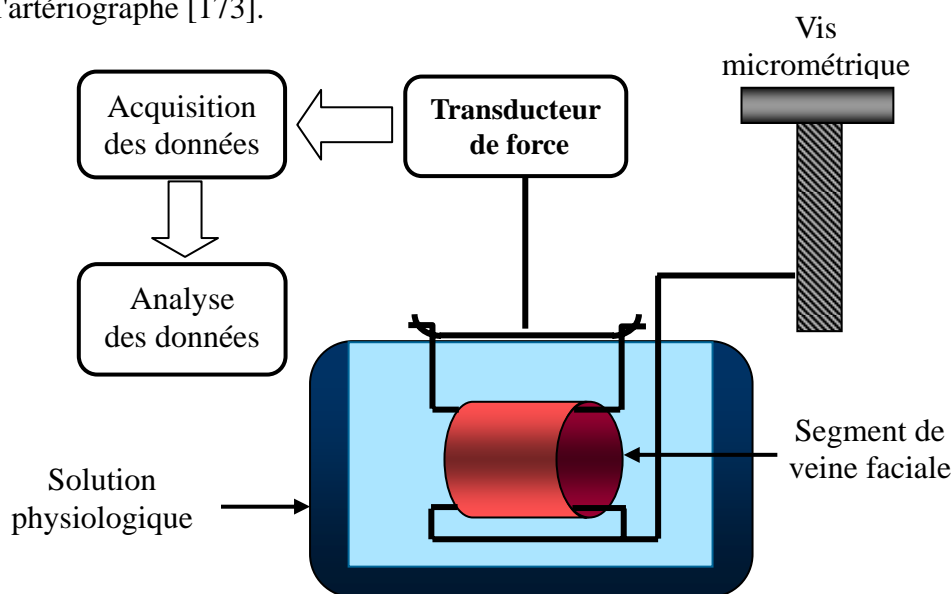
Les segments d'aorte thoracique sont étirés à une tension de 5mN, permettant le développement d'une tension suffisante pour qu'ils puissent à nouveau exercer leur activité vasomotrice.

Après une priode de stabilisation de 20min, la concentration maximale des vaisseaux est mesurée en deux étapes ; dépolarisation dans un bain de KCl (100mM), contraction au KCl (100mM) + phényléphrine (10μM)

La courbe « concentration-réponse » aux agonistes vasoconstricteurs (phényéphrine) (1nM à 100μM) nous a permis de déterminer la concentration de phényléphrine nécessaire pour un niveau de contraction identique dans les différents groupes.

La courbe « concentration-réponse » aux agonistes vasodilatateurs (acétylcholine) est étudiée suite à une vasonstriction stable à la phényléphrine (1μM).

Cette technique d'étude est parfaitement adaptée aux vaisseaux de souris, et permet de déterminer un profil pharmacologique fiable avec des artères de différentes tailles. Cette technique est également utilisée pour l'étude des vaisseaux humains. Cela dit elle ne permet pas d'étudier les vaisseaux dans des conditions physiologiques de pression et de débit et, a forteriori, ne permet pas l'étude des effets de ces deux forces sur la paroi vasculaire. De ce fait nous avons recours a l'artériographe [173].



**Figure 18:** Représentation schématique d'un myographe



## 2. Artériographe :

La réactivité vasculaire à la pression et au flux est étudiée à l'aide d'un artériographe. Les artères mésentériques sont disséquées et isolées sur glace, puis un segment est canulé *in vitro* dans un artériographe contenant la même solution physiologique que précédemment. Ce segment est visualisé sur un moniteur relié à un système d'analyse d'image qui permet de mesurer le diamètre interne du vaisseau. Le débit est contrôlé par une pompe située en amont du vaisseau. La pression est mesurée en amont et en aval du vaisseau. La pression moyenne entre entrée et sortie est contrôlée par un système de servo-contrôle. Ce système permet de faire varier indépendamment la pression et le débit intraluminaux (figure 19).

Après stabilisation à 75 mmHg pendant 40 minutes, les segments d'artères sont soumis à des paliers de flux de 0–100  $\mu\text{l}/\text{min}$  pour déterminer la dilatation au flux des artères, en absence et en présence de différents agents pharmacologiques : les inhibiteurs de NO et des COX. Ainsi il est possible de bloquer des voies de transduction intervenant dans la réactivité vasculaire [173].

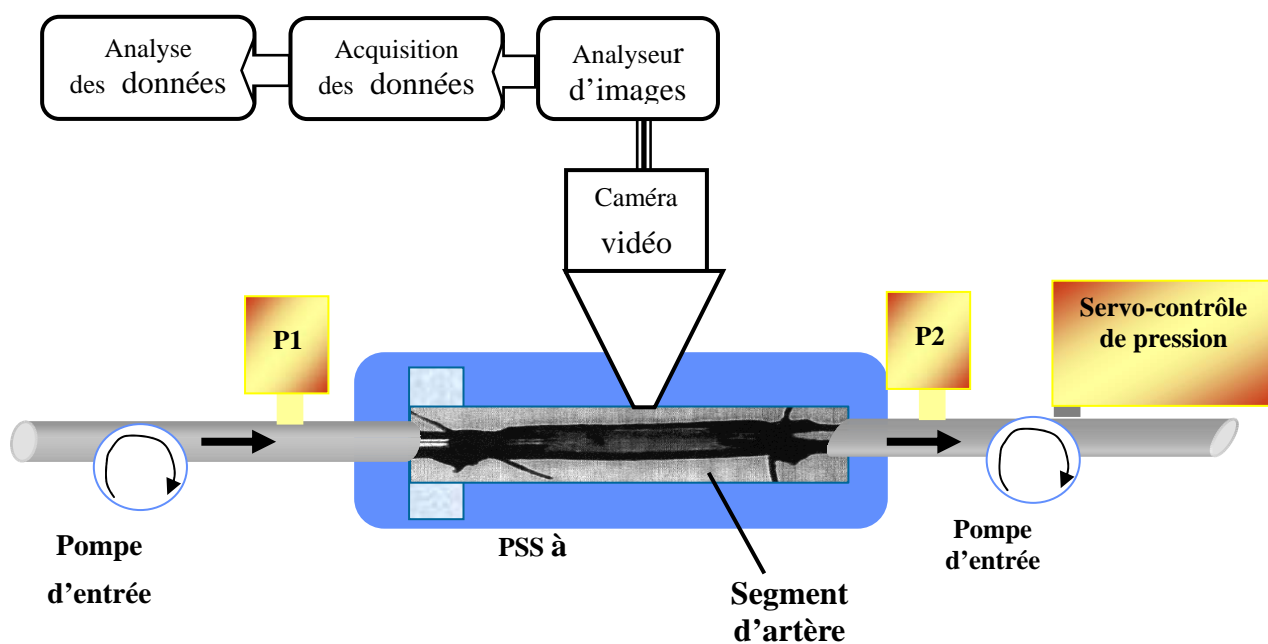


Figure 19 : Représentation schématique de l'artériographe

## **Annexe 4 :**

### **1. Publications originales**

#### **2. Publications non développées dans la thèse:**

- Gibot S, Alauzet C, Massin F, **Sennoun N**, Faure G, Béné MC, Lozniewski A, Bollaert PE, Lévy B. J Infect Disease. 2006; 1;194(7):975-83 «Modulation of the Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1 pathway during pneumonia in rats».
  
- **Sennoun N**, Desebbe O, Levy B. «Hemodynamic Effects of Activated Protein C in Septic Shock». In JL Vincent, ed, Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine 2007. Springer, Germany; pp 75–80
  
- Collin S, **Sennoun N**, Levy B. «Cardiovascular and metabolic responses to catecholamine and sepsis prognosis: a ubiquitous phenomenon?» Critical care. 2008, 17;12(2):118.

# **PUBLICATIONS ORIGINALES**

# Comparative effects of early versus delayed use of norepinephrine in resuscitated endotoxic shock\*

Nacira Sennoun; Chantal Montemont; Sebastien Gibot, MD, PhD; Patrick Lacolley, MD, PhD; Bruno Levy, MD, PhD

**Objective:** To assess hemodynamic, tissue oxygenation, and tissue perfusion changes by comparing traditional therapy (fluid resuscitation followed by vasopressor treatment) and alternative therapy (early vasopressor treatment) in a hyperkinetic and sedated model of endotoxic shock.

**Design:** Prospective controlled experimental study.

**Setting:** Animal research laboratory.

**Subjects:** Male Wistar rats.

**Interventions:** Rats were anesthetized, mechanically ventilated, paralyzed, and instrumented to measure mean arterial pressure, heart rate, pulse pressure variation, aortic and mesenteric blood flow, muscle and liver tissue oxygen pressure, blood gas, and lactate. Rats were randomly divided into five groups ( $n = 7$ ): endotoxin alone (Endo), endotoxin plus norepinephrine (Endo/NE), endotoxin plus fluid therapy alone (ENDO/FI), endotoxin plus fluid therapy plus late catecholamine (Endo/FI/Late NE), and endotoxin plus fluid therapy plus simultaneous norepinephrine administration (Endo/FI/Early NE).

**Measurements and Main Results:** Mean arterial pressure increased to baseline values only in the catecholamine-treated group ( $p < .05$ ). In ENDO/FI, Endo/FI/Late NE, and Endo/FI/Early NE, aortic blood flow was maintained. Mesenteric blood flow was

maintained at baseline values only in the catecholamine-treated groups. Mesenteric/aortic blood flow ratio was higher in the early catecholamine group ( $p < .05$ ). Endo and ENDO/FI were associated with a marked decrease in liver  $P_{O_2}$ , which was maintained in catecholamine-treated groups ( $p < .01$ ). Plasma lactate was lower in the Endo/FI/Early NE group. Volume resuscitation was higher in Endo and Endo/FI/Late NE groups with  $28 \pm 6$  and  $27 \pm 4$  mL, respectively, when compared with the Endo/FI/Early NE group ( $19 \pm 3$  mL) ( $p < .05$ ).

**Conclusions:** The use of norepinephrine was associated with improved mean arterial pressure, sustained aortic and mesenteric blood flow, and better tissue oxygenation when compared with fluid resuscitation alone, irrespective of time of administration. The early use of norepinephrine plus volume expansion was associated with a higher proportion of blood flow redistributed to the mesenteric area, lower lactate levels, and less infused volume. Thus, the early use of norepinephrine is safe and may decrease the need for volume resuscitation. (Crit Care Med 2007; 35:●●●—●●●)

**KEY WORDS:** septic shock; endotoxin; norepinephrine; lactate; pulse pressure variation

Despite recent advances in the pathophysiology, monitoring, and treatment of septic shock, mortality rates still remain elevated, with patients mostly succumbing to cardiovascular and/or multiple organ failure. Indeed, septic shock is characterized by ineffective tissue oxygen delivery and extraction involving a complex interaction between vasodilation, relative and absolute hypo-

volemia, myocardial dysfunction, and altered blood flow distribution.

One of the primary goals in the treatment of septic shock is to maintain systemic arterial pressure and restore adequate tissue perfusion. Clinical data provided by Rivers et al. (1) demonstrated that the early phase of septic shock is characterized by a low  $ScvO_2$  evoking a low cardiac output state in relation to hypovolemia. Moreover, the increase in oxygen transport, essentially attributable to volume expansion, was associated with better survival. Thus, early and intensive volume resuscitation is a crucial step in septic shock resuscitation. Nevertheless, one third of these patients were also treated with vasopressors to maintain mean arterial pressure (MAP). Current recommendations (2) associate initial volume resuscitation followed by vasopressor therapy with maintaining mean arterial pressure. Transient vasopressor

therapy may also be required to sustain life and maintain perfusion in the face of life-threatening hypotension, even in instances where fluid challenge is progress and hypovolemia has yet to be corrected.

Nonetheless, early use of vasopressors, such as norepinephrine, may be advocated since catecholamines, via their  $\alpha$ -mediated vasoconstrictive effects, not only can induce a shift of venous blood from unstressed to stressed compartments (3–5) but also may preserve organ perfusion by increasing MAP. Moreover, the use of ventilation and sedation may attenuate the sympathetic response to hypovolemia (6). In this regard, early exogenous administration of norepinephrine would appear to be a logical choice.

On the other hand, early exogenous administration of norepinephrine is not currently recommended in this hypovolemic situation since the risks vs. the

\*See also p. xx.

From Equipe Avenir Inserm, Inserm U684; Shock Research Group; Coordination Circulation UHP-Inserm; Faculté de Médecine; Université de Nancy 1.

The authors have not disclosed any potential conflicts of interest.

For information regarding this article, E-mail: b.levy@chu-nancy.fr

Copyright © 2007 by the Society of Critical Care Medicine and Lippincott Williams & Wilkins

DOI: 10.1097/01.CCM.0000269028.28521.08

Table 1. Baseline values of hemodynamic and oxygenation variables

	Endo	Endo/NE	Endo/F1	Endo/F1/ Early NE	Endo/F1/ Late NE
MAP, Mm Hg	120 ± 10	122 ± 9	118 ± 8	122 ± 9	117 ± 11
Aortic blood flow, mL/min	50 ± 12	51 ± 11	52 ± 9	53 ± 11	54 ± 13
Mesenteric blood flow, mL/min	15 ± 3	13 ± 4	17 ± 4	14 ± 4	15 ± 4
Muscle PO <sub>2</sub> , Mm Hg	35 ± 7	40 ± 7	37 ± 9	36 ± 5	37 ± 8
Liver PO <sub>2</sub> , Mm Hg	25 ± 9	29 ± 8	27 ± 8	26 ± 7	26 ± 9

Endo, endotoxin alone; Endo/NE, endotoxin plus norepinephrine; Endo/F1, endotoxin plus fluid therapy alone; Endo/F1/Early NE, endotoxin plus fluid therapy plus simultaneous norepinephrine administration; Endo/F1/Late NE, endotoxin plus fluid therapy plus late catecholamine; MAP, mean arterial pressure.

benefits of peripheral vasoconstriction induced by norepinephrine remain unclear. Arterial vasoconstriction induced by norepinephrine may preserve central circulation but at the expense of peripheral circulation, where vasoconstriction could decrease regional blood flow.

Hence, the aim of the present study was to assess hemodynamic, tissue oxygenation, and tissue perfusion changes by comparing traditional therapy (fluid resuscitation followed by vasopressor treatment) and alternative therapy (early vasopressor treatment) in a hyperkinetic and sedated model of endotoxic shock.

## MATERIALS AND METHODS

This study was approved by the Nancy institutional committee on animal care and use, and all animals were treated in compliance with the principles of laboratory animal care of the National Institutes of Health.

### Animal Preparation and Monitoring

Male Wistar rats (300–320 g) were anesthetized with thiopental sodium (30 mg/kg intraperitoneally). Additional doses were administered when necessary (indicated by presence of interdigital reflexes). Animals then underwent tracheotomy and were subsequently ventilated. Mechanical ventilation was maintained with a tidal volume of 1 mL/100 g and a frequency of 100 breaths/min. Rats received 0.1 mg of cisatracurium every 60 mins (Glaxo-SmithKline, Marly le Roy, France) to halt spontaneous ventilation.

Rectal temperature was continuously monitored and maintained at 37°C. Both the right jugular vein and carotid artery were cannulated. Abdominal aortic blood flow (a surrogate of cardiac output) and superior mesenteric flow were measured with appropriately sized perivascular probes connected to an

transonic flowmeter (T206, Transonic Systems, Ithaca, NY).

Muscle and liver tissue oxygen partial pressures adjusted for temperature were monitored using the Licox sensor system (Integra Neuroscience, Plainsboro, NJ), inserted into the quadriceps femoris muscle and into the liver. The sensors were calibrated according to the manufacturer's specifications before insertion. Adequate reactivity of the oxygen sensor element of the Licox probe was tested by briefly increasing F<sub>IO<sub>2</sub></sub> to 100% after insertion of the sensor and observing the ensuing characteristic increase in tissue oxygen tension.

After instrumentation, rats were allowed to equilibrate for 30 mins.

### Measurements

Arterial blood pressure was recorded from the carotid artery catheter. Pulse pressure (PP) was calculated as the difference between systolic and diastolic arterial pressure. Maximal PP (PPmax) and minimal PP (PPmin) values were determined over a single respiratory cycle. The percent change in PP during mechanical ventilation ( $\Delta$ PP) was then calculated to assess cardiac preload dependence (7, 8) as follows:

$$\Delta\text{PP}(\%) = \frac{(\text{PPmax} - \text{PPmin})}{[(\text{PPmax} + \text{PPmin})/2]} \times 100 \quad [1]$$

Aortic blood flow, mesenteric blood flow, and muscular and hepatic PtO<sub>2</sub> were continuously recorded using a computerized data acquisition system (IOX, transonic, EMKA).

The evolution of hemodynamic and oxygenation variables is shown as percent changes from baseline. Baseline values of each group are described in Table 1.

Arterial blood gases and arterial lactate were measured at T0 and T180 mins after endotoxin challenge. Equivalent volumes of isotonic saline were used to replace withdrawn blood. Equal amounts of fluid were infused in all rats (i.e., 6 mL/hr independent of fluid

challenge). Adrenergic drugs were diluted in 0.9% physiologic salt solution.

## Experimental Protocols

*Experiment 1: Validation of Pulse Pressure Variation ( $\Delta$ PP) as an Index of Preload Dependency.* The first segment of the study consisted of validating pulse pressure variation as an index of preload dependency in paralyzed, mechanically ventilated rats. In 15 endotoxic rats, pulse pressure variation and aortic blood flow changes were measured before and after a 3-mL/15-min volume expansion, after which a receiver operating characteristic curve was established to determine the optimal cutoff point.

*Experiment 2: Comparison of Early Vs. Delayed Fluid Resuscitation.* Endotoxic shock was induced upon administration of 15 mg/kg endotoxin (*Escherichia coli* O127:B8, Sigma, St Quentin Fallavier, France), infused intravenously from 0 to 60 mins.

Rats were randomly divided into five groups (n = 7): endotoxin alone (Endo), endotoxin plus norepinephrine (Endo/NE), endotoxin plus fluid therapy alone (Endo/F1), endotoxin plus fluid therapy plus late catecholamine (Endo/F1/Late NE), and endotoxin plus fluid therapy plus simultaneous norepinephrine administration (Endo/F1/Early NE).

Fluid challenge (Voluven, hydroxy ethyl amidon 130,000, 10 mL/kg/15 mins) was performed when MAP or arterial blood flow decreased to 80% of baseline values.  $\Delta$ PP was measured before and after fluid challenge. Fluid challenge was repeated when  $\Delta$ PP remained >13% with a persistent decrease in MAP or arterial blood flow. In the Endo/F1/Late NE group, norepinephrine was introduced when MAP remained low despite a normal  $\Delta$ PP (<13%).

Drug concentration was either progressively increased or decreased between 0.5 and 6  $\mu$ g/kg/min, as needed, to maintain MAP at  $\pm$ 10% of baseline values.

### Statistical Analysis

*Experiment 1.* The effects of volume expansion on hemodynamic variables were assessed using a nonparametric Wilcoxon's rank-sum test. Rats were divided into two groups according to the percent increase in aortic blood flow in response to volume expansion. It was assumed that a 15% change in confidence interval (CI) was needed for clinical significance. Therefore, rats with a VE-induced increase in CI  $\geq$ 15% and those with an increase in CI <15% were classified as responders and nonresponders, respectively. Receiver operating characteristic curves were generated for  $\Delta$ PP by varying the discriminating threshold.

*Experiment 2.* A repeated-measures one-way analysis of variance was used to evaluate within-group differences. The difference between groups was tested using a two-way

analysis of variance (repeated time measurements and treatment as independent variables). When the relevant F values were significant at the 5% level, further pairwise comparisons were made using Dunnett's test for the effect of time and the Bonferroni correction for the effects of treatment at specific times.

Results were expressed as mean  $\pm$  SD. A *p* value  $< .05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

### Experiment 1

The threshold  $\Delta$ PP value of 13% allowed the discrimination between responder and nonresponder rats with a sensitivity of 94% (82% to 99%, 95% CI) and a specificity of 100% (71% to 100%, 95% CI) (Fig. 1).

### Experiment 2

Fluid infusion and fluid infusion plus norepinephrine were administered  $25 \pm 7$  mins and  $23 \pm 4$  mins, respectively, after endotoxin challenge. In the Endo/FI/Late NE group, norepinephrine was administered after  $90 \pm 10$  mins. In the ENDO/NE group, norepinephrine was administered after  $24 \pm 5$  mins. The mean effective dose of NE was  $3.8 \pm 0.8$   $\mu$ g/kg/min in Endo/FI/Early NE,  $4.5 \pm 1.1$   $\mu$ g/kg/min in ENDO/NE, and  $4.1 \pm 1.0$   $\mu$ g/kg/min in Endo/FI/Late NE (not significant).

**Effects on MAP.** As previously described, endotoxin induced a marked and sustained decrease in MAP. Fluid infusion (ENDO/FI group) increased MAP but did not restore levels to baseline values ( $p < .05$ ). MAP increased to baseline values in the catecholamine-treated group compared with fluid infusion alone from T60 to T240 ( $p < .05$ ) (Figure 2) except in the ENDO/NE group.

**Effects on Heart Rate.** Heart rate did not change during the experimental period for all studied groups except in Endo and ENDO/NE groups, where it progressively decreased ( $p < .05$ ).

**Effects on Aortic Blood Flow.** Endotoxin treatment drastically decreased blood flow ( $p < .01$ ). In ENDO/FI, Endo/FI/Late NE, and Endo/FI/Early NE groups, aortic blood flow was maintained (Fig. 2). In the ENDO/NE group, aortic blood flow also decreased ( $p < .01$ ).

**Effects on Mesenteric Blood Flow.** Endo, Endo/NE, and Endo/FI were associated with a marked decrease in mesen-

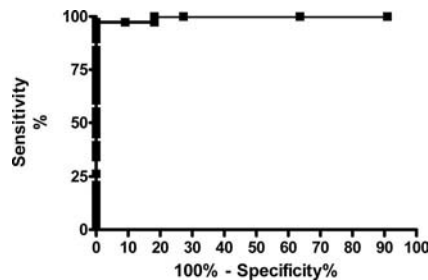


Figure 1. Receiver operating characteristic curve establishing in endotoxic rats the ability of pulse pressure variation ( $\Delta$ PP) to discriminate responder (confidence interval [CI] increase  $\geq 15\%$ ) and nonresponder to volume expansion. The threshold  $\Delta$ PP value of 13% allowed the discrimination between responder and nonresponder rats with a sensitivity of 94% (82% to 99%, 95% CI) and a specificity of 100% (71% to 100%, 95% CI).

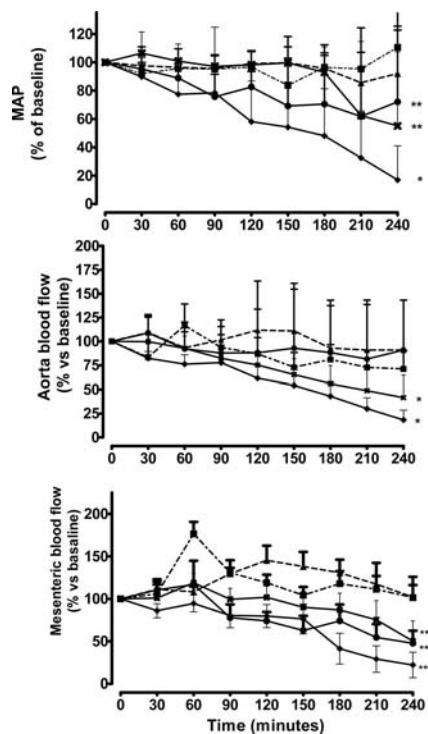


Figure 2. Evolution of mean arterial pressure (MAP), aortic blood flow, and mesenteric blood flow. *Lozenge*, endotoxin; *cross*, endotoxin plus norepinephrine; *circle*, endotoxin plus fluid; *triangle*, endotoxin plus fluid plus late catecholamine; *square*, endotoxin plus fluid plus norepinephrine.  $*p < .05$  vs. other groups;  $**p < .05$  vs. endotoxin plus fluid plus late catecholamine group and endotoxin plus fluid plus norepinephrine group.

teric blood flow ( $p < .05$ ). On the other hand, mesenteric blood flow was maintained at baseline values in Endo/FI/Early NE and Endo/FI/Late NE ( $p < .05$ ) (Fig. 2). The difference became significant at T90 mins.

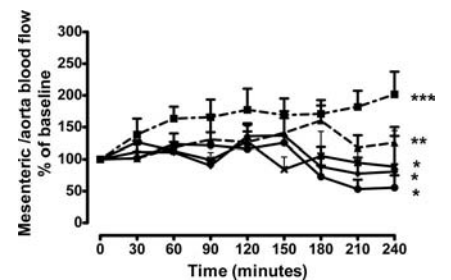


Figure 3. Evolution of mesenteric/aortic blood flow ratio. *Lozenge*, endotoxin; *cross*, endotoxin plus norepinephrine; *circle*, endotoxin plus fluid; *triangle*, endotoxin plus fluid plus late catecholamine; *square*, endotoxin plus fluid plus norepinephrine.  $*p < .05$  vs. other groups;  $**p < .05$  vs. endotoxin group and endotoxin plus fluid plus norepinephrine group;  $***p < .05$  vs. other groups.

The mesenteric/aortic blood flow ratio (Fig. 3) did not change in the Endo, Endo/NE, and Endo/FI groups but increased in the catecholamine-treated groups ( $p < .05$ ). Furthermore, mesenteric/aortic blood flow ratio was higher in the early catecholamine (Endo/FI/Early NE) group than in the late catecholamine (Endo/FI/Late NE) group ( $p < .05$ ) from T60 to T240 mins.

**Effects on Tissue  $P_{O_2}$ .** Endotoxic shock was associated with a marked and sustained decrease in muscular  $P_{O_2}$  for all treated experimental groups. Endo, ENDO/NE, and ENDO/FI were associated with a marked decrease in liver  $P_{O_2}$ , which was maintained in catecholamine-treated groups ( $p < .01$ ). The difference became significant at T180 mins (Fig. 4).

The evolution of pulse pressure variations is depicted in Figure 5. The early use of norepinephrine was associated with a decrease in pulse pressure variation ( $p < .05$ ).

Volume resuscitation was higher in the ENDO/FI and Endo/FI/Late NE groups with  $28 \pm 6$  and  $27 \pm 4$  mL, respectively, when compared with the Endo/FI/Early NE group ( $19 \pm 3$  mL) ( $p < .05$ ). There were no differences in arterial  $P_{O_2}$  and oxygen saturation at T180. Plasma lactate measured 180 mins after lipopolysaccharide administration was higher in Endo, ENDO/FI, Endo/FI/Late NE, and ENDO/NE groups with  $5.9 \pm 2.3$ ,  $4.7 \pm 4$ ,  $5.4 \pm 2.0$ , and  $7.2 \pm 2.8$  mmol/L, respectively, than in the Endo/FI/Early NE group ( $3.7 \pm 2.0$  mmol/L) ( $p < .05$ ).

Survival time was identical in ENDO/FI, Endo/FI/Late NE, and Endo/FI/Early NE groups when compared with Endo

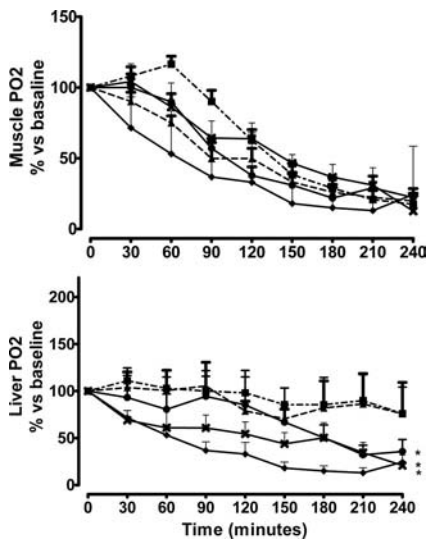


Figure 4. Evolution of muscle and liver  $P_{O_2}$ . *Lozenge*, endotoxin; *cross*, endotoxin plus norepinephrine; *circle*, endotoxin plus fluid; *triangle*, endotoxin plus fluid plus late catecholamine; *square*, endotoxin plus fluid plus norepinephrine. \* $p < .05$  vs. endotoxin plus fluid plus late catecholamine group and endotoxin plus fluid plus norepinephrine group.

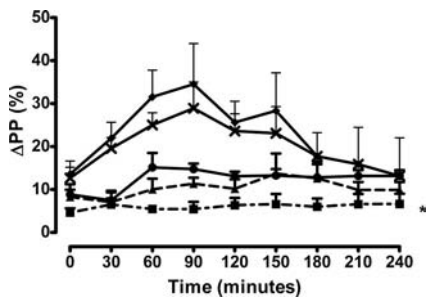


Figure 5. Evolution of pulse pressure variation ( $\Delta PP$ ). *Lozenge*, endotoxin; *cross*, endotoxin plus norepinephrine; *circle*, endotoxin plus fluid; *triangle*, endotoxin plus fluid plus late catecholamine; *square*, endotoxin plus fluid plus norepinephrine. \* $p < .05$  vs. other groups.

and ENDO/NE ( $p < .05$ ) ( $250 \pm 60$ ,  $270 \pm 40$ ,  $300 \pm 55$ ,  $325 \pm 54$ , and  $341 \pm 45$  mins for ENDO/NE, E, ENDO/FI, Endo/FI/Late NE, and Endo/FI/Early NE, respectively).

## DISCUSSION

The present study reveals that the early use of catecholamines in an endotoxic shock model with mechanical ventilation and sedation was associated with a lesser amount of delivered fluid without any adverse effects on either systemic or regional hemodynamics or tissue perfusion.

## Validation of Pulse Pressure Variations in Rats

The use of pulse pressure variation in mechanically ventilated rats is theoretically possible since heart rate/respiratory rate ratio is practically identical in mechanically ventilated rats (400/100) and humans (100/18). Rats were paralyzed to avoid spontaneous ventilation. Under these conditions and as observed in human septic shock, pulse pressure variations with a threshold of 13% in endotoxic rats were found to be a very good predictor of preload dependency with both high specificity and sensitivity.

## Effect of Treatments on Systemic Hemodynamics

Not surprisingly, volume resuscitation alone was not sufficient to restore MAP despite a normalization of aortic blood flow. This was likely due to the decrease in vascular tone induced by the septic state, hence justifying the use of vasopressor treatment. In our highly resuscitated model, in the group not treated with catecholamine (ENDO/FI), MAP was observed to decrease markedly after 90 mins despite a sustained aortic blood flow. MAP was maintained in catecholamine-treated rats (Endo/FI/Late NE and Endo/FI/Early NE) without any negative effects on aortic blood flow. In human septic shock, Bourgoin et al. (9) recently demonstrated that increasing MAP with norepinephrine in resuscitated septic shock induced an increase in cardiac output. Organ perfusion pressure is dependent on both MAP and blood flow. In the present study, increasing blood flow with volume expansion was not sufficient to increase blood flow at the mesenteric level. On the other hand, the combination of volume expansion and vasopressor blunted the effects of endotoxin on mesenteric blood flow. The increase in regional/systemic perfusion ratio is therefore evidence of blood flow redistribution. While the origin of this redistribution could not be specifically determined in the present study, it could be hypothesized that blood was redistributed from muscle to the splanchnic area or from unstressed to stressed compartments. Regardless, the early use of norepinephrine was associated with a higher redistribution of aortic blood flow toward the mesenteric axis.

## Effects of Treatments on Tissue Oxygenation

As previously demonstrated (10), blood flow to muscle dramatically decreased during shock state. This was associated herein to a profound decrease in muscular  $P_{O_2}$  that was not corrected by either volume expansion or vasopressor treatment, thus evoking redistribution away from muscles to more vital organs. Conversely, liver  $P_{O_2}$ , which is dependent on both arterial blood flow to the liver through the hepatic artery and mesenteric blood flow, markedly decreased in volume-treated rats concomitantly with the decrease in MAP while remaining stable in catecholamine-treated rats. The effects of norepinephrine on splanchnic blood flow and liver  $P_{O_2}$  are consistent with other reports that demonstrated an increase in organ function when perfusion pressure was augmented (11).

## Early or Delayed Use of Catecholamine?

Recently, Nouira et al. (12) demonstrated that the use of norepinephrine during experimental hemorrhagic shock may normalize  $\Delta PP$  and could significantly reduce the value of this dynamic variable and mask a true intravascular volume deficit, possibly by shifting blood from unstressed to stressed volumes. Our data confirm the decrease in  $\Delta PP$  in early catecholamine-treated rats despite a lesser extent in volume expansion. However, it was not associated with detrimental effects on hemodynamics or tissue perfusion although it was associated with a lower level of lactate (13). This indicates the absence of deleterious effects on systemic hemodynamics and splanchnic perfusion.

Moreover, the early use of catecholamines was associated with a decrease in the amount of delivered fluids. Nevertheless, in this acute and short-term model, we were unable to demonstrate a difference in  $P_{O_2}$  between groups. This could prove important in clinical practice since a clear relationship has previously been demonstrated between fluid overload and mortality (14).

Further studies will be needed, however, due to limitations of the present study. First, the acute and lethal model of endotoxic shock used herein is clearly not fully representative of human septic shock. Second, we did not measure renal blood flow or renal function indexes. Nevertheless, the

use of norepinephrine in septic conditions in the literature has consistently been associated with either unchanged or improved renal function (15). Moreover, there is no detrimental effect of the early use of norepinephrine on aortic blood flow. Nevertheless, in human studies, norepinephrine was not used in the same time frame, suggesting that these data should be tested in a randomized study before being routinely applied.

## CONCLUSIONS

The use of norepinephrine was associated with improved MAP, sustained aortic and mesenteric blood flow, and better tissue oxygenation when compared with fluid resuscitation alone, irrespective of time of administration. The early use of norepinephrine associated with volume expansion was associated with a higher proportion of blood flow redistributed to the mesenteric area, lower lactate levels, and less infused volume. Thus, the early use of norepinephrine is safe and may preserve organ function while decreasing the need for volume resuscitation.

## REFERENCES

1. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, et al: Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2001; 345:1368–1377
2. Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, et al: Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med* 2004; 30:536–555
3. Rothe CF, Gaddis ML: Autoregulation of cardiac output by passive elastic characteristics of the vascular capacitance system. *Circulation* 1990; 81:360–368
4. Appleton CP, Lee RW, Martin GV, et al: Alpha 1- and alpha 2-adrenoceptor stimulation: Changes in venous capacitance in intact dogs. *Am J Physiol* 1986; 250:H1071–H1078
5. Hirakawa S, Itoh H, Kotoo Y, et al: The role of alpha and beta adrenergic receptors in constriction and dilation of the systemic capacitance vessels: A study with measurements of the mean circulatory pressure in dogs. *Jpn Circ J* 1984; 48:620–632
6. Vatner SF, Braunwald E: Cardiovascular control mechanisms in the conscious state. *N Engl J Med* 1975; 293:970–976
7. Michard F, Chemla D, Richard C, et al: Clinical use of respiratory changes in arterial pulse pressure to monitor the hemodynamic effects of PEEP. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:935–939
8. Michard F, Boussat S, Chemla D, et al: Relation between respiratory changes in arterial pulse pressure and fluid responsiveness in septic patients with acute circulatory failure. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:134–138
9. Bourgoin A, Leone M, Delmas A, et al: Increasing mean arterial pressure in patients with septic shock: Effects on oxygen variables and renal function. *Crit Care Med* 2005; 33: 780–786
10. Niinikoski J, Halkola L: Skeletal muscle PO<sub>2</sub>: Indicator of peripheral tissue perfusion in haemorrhagic shock. *Adv Exp Med Biol* 1977; 94:585–592
11. Ruokonen E, Takala J, Kari A, et al: Regional blood flow and oxygen transport in septic shock. *Crit Care Med* 1993; 21:1296–1303
12. Nounira S, Elatrous S, Dimassi S, et al: Effects of norepinephrine on static and dynamic preload indicators in experimental hemorrhagic shock. *Crit Care Med* 2005; 33:2339–2343
13. Levy B, Gibot S, Franck P, et al: Relation between muscle Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPase activity and raised lactate concentrations in septic shock: A prospective study. *Lancet* 2005; 365:871–875
14. Sakka SG, Klein M, Reinhart K, et al: Prognostic value of extravascular lung water in critically ill patients. *Chest* 2002; 122:2080–2086
15. Matejovic M, Trager K, De Backer D: Noradrenaline and the kidney: Foe, friend, or both? *Intensive Care Med* 2005; 31:1476–1478



**Activated protein C improves LPS-induced cardiovascular dysfunction by decreasing tissular inflammation and oxidative stress.**

Sennoun Nacira<sup>1</sup>, Meziani Ferhat<sup>4,6</sup>; MD; Dessebe Olivier<sup>1</sup>, MD; Cattan Valérie<sup>2</sup>, PhD; Collin Solène<sup>1</sup>, Montemont Chantal<sup>1</sup>, Gibot Sebastien<sup>1</sup>, MD, PhD; Asfar Pierre<sup>5,6</sup>, MD, PhD, Ramaroson Andriantsitohaina<sup>4</sup>, PhD; Regnault Veronique<sup>3</sup>, PhD; Slama Michel<sup>7</sup>; Lecompte Thomas<sup>3</sup>; MD, PhD; Lacolley Patrick<sup>2</sup>; MD, PhD; Levy Bruno.<sup>1</sup> MD, PhD.

**From :**

1: Groupe CHOC, Equipe AVENIR Inserm ; Nancy Université ; Faculté de Médecine 54500 Vandoeuvre les Nancy ; France.

2 : Inserm U684 ; Nancy Université ; Faculté de Médecine 54500 Vandoeuvre les Nancy ; France.

3: Inserm U734 ; Nancy Université ; Faculté de Médecine 54500 Vandoeuvre les Nancy ; France.

4 : Inserm 771 ; CNRS UMR 6214 ; Faculté de Médecine ; Université d'Angers.

5 : Laboratoire HIFIH UPRES EA 3859 ; Université d'Angers

6 : Département de réanimation médicale et de médecine hyperbare, CHU Angers, France.

7 : Inserm, ERI 12 and University Hospital Amiens, Amiens, France

**Corresponding author :**

Professor B LEVY, Groupe CHOC, Contrat Avenir. Faculté de Médecine, 54100 Vandoeuvre-les-Nancy. France.

Phone : +33383154469; Fax : +33383154420;. E-mail : [b.levy@chu-nancy.fr](mailto:b.levy@chu-nancy.fr)

**Source of Funding**

This work was supported by Inserm (Contrat Avenir) .

## **Abstract**

*Background:* Recombinant human activated Protein C (APC) is used as an adjunctive therapeutic treatment in septic shock. APC seemingly acts on coagulation-inflammation interaction but also by decreasing proinflammatory gene activity, thus inhibiting subsequent production of proinflammatory cytokines, NO and NO-induced mediators, reactive oxygen species production and leukocyte-endothelium interaction. The hemodynamic effects of APC on arterial pressure and cardiac function are now well established in animal models. However, the specific effects of APC on heart and vessels have never been studied.

*Objectives:* To investigate the potential protective properties of therapeutic ranges of APC on a rat endotoxic shock model in terms of anti-inflammatory and cytoprotective pathways.

*Design:* Laboratory investigation

*Setting:* University medical center research laboratory

*Interventions:* Rats were exposed to lipopolysaccharide (LPS) (10mg/Kg *iv.*). Endotoxic shock was treated with infusion of saline with or without APC (33  $\mu$ g/kg/h) during 4 hours. Hemodynamic parameters were continuously assessed and measurements of muscle oxygen partial pressures, NO and superoxide anion ( $O_2^-$ ) by spin trapping, of NF- $\kappa$ B, metalloproteinase-9 (MMP-9) and inducible NO synthase (iNOS) by Western blotting, as well as leukocyte infiltration and MMP-9 activity were performed at both the heart and aorta level (tissue).

*Main results:* APC partially prevented the reduction of blood pressure induced by LPS and improved both vascular hyporeactivity and myocardial performance. This was associated with a decreased upregulation of NF- $\kappa$ B, iNOS and MMP-9. LPS-induced tissue increases in NO and  $O_2^-$  production were decreased by APC. Moreover, APC decreased tissue leukocyte

infiltration/activation as assessed by a decrease in myeloperoxidase and matrix metalloproteinase 9 activity.

*Conclusions:* These data suggest that APC improves cardiovascular function i) by modulating the endotoxin induced-proinflammatory/prooxydant state, ii) by decreasing endothelial/leukocyte interaction and iii) by favoring stabilization of the extracellular matrix.

Key words: shock, nitric oxide, catecholamines, antioxidants, activated protein C.

**Activated protein C improves LPS-induced cardiovascular dysfunction by decreasing tissular inflammation and oxidative stress.**

In addition to the vascular hyporeactivity to endogenous/exogenous vasoconstrictors leading to persistent hypotension (1), several hypotheses have been proposed to explain sepsis-induced cardiovascular failure including the presence of activated leucocytes and the effects of various pro-inflammatory cytokines (2). Indeed, the majority of these cytokine effects have been attributed to massive production of nitric oxide (NO)(3) . Recent evidence indicates that much of the cytotoxicity attributed to NO is rather due to peroxynitrite, produced from the reaction between NO and the superoxide anion (4). These cellular insults lead to myocardial structural damage with actin/myosin disruption (5) and to a decrease in vascular dysfunction (4) .

Recombinant human activated Protein C (APC) has been demonstrated to reduce the mortality rate of adult patients with severe sepsis (6). This effect was thought to be related to its anticoagulant and anti-inflammatory processes in severe 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 (7) demonstrating that APC, through reactions mediated by endothelial protein C receptor (EPCR) (8) and the effector receptor, protease activated receptor-1, acts directly on cells to exert multiple cytoprotective effects including: a) downregulation of pro-inflammatory gene expression (9, 10); b) anti-apoptotic activity (11); c) antioxidant properties (12) and d) protection of endothelial barrier function (13, 14). Recent animal (15-18) and human (19) data have suggested that APC may improve both vascular and

myocardial dysfunction and vascular reactivity to catecholamines during endotoxin and/or septic challenges. These effects appear to be related to an attenuation of endothelial cell-leukocyte activation. Interestingly, Cuenca et al (20) demonstrated a link between cardiac recruitment of monocytes/macrophages, increased matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) activity, a marker of extracellular matrix remodeling, and LPS-induced heart dysfunction. Of further interest, nitric oxide (NO), cyclooxygenase-2 (COX-2) and peroxynitrite have been shown to activate MMP-9 (21). However, much of our current knowledge concerning APC action is still based on data obtained from cell culture models using very high doses of APC.

The hemodynamic effects of APC on arterial pressure and cardiac function are now well established in animal models. Nevertheless, the underlying mechanisms are still not completely understood, including the specific effects of APC on heart and vessels which have never been studied. Therefore, the present study was undertaken to investigate the potential protective anti-inflammatory and anti-oxidant properties of APC infused at therapeutic ranges in an endotoxinic shock model. This was achieved using human APC which does not have anticoagulant effects in rats (17).

We confirm herein that APC improves both vascular and myocardial dysfunction induced by LPS and demonstrate that this improvement is associated to a marked reduction in inflammation and oxidative stress at both the vascular and cardiac level. Concomitant with this decrease, APC also reduces leukocyte infiltration and matrix metalloproteinase 9 activity in both the heart and the aorta.

## Materials and Methods

This study was approved by the Nancy Institutional Committee on Animal Care and Use, and all animals were treated in compliance with the principles of laboratory animal care of the NIH.

### *Animal preparation and monitoring.*

Male Wistar rats (300-320 g) were anesthetized with thiopental sodium (30 mg/kg i.p.). Animals then underwent tracheotomy and subsequently ventilated. Mechanical ventilation was maintained with a tidal volume of 1ml /100g at a rate of 100/min. Rats received 0.1 mg/h of cisatracurium (GlaxoSmithKline, Marly le Roy, France) to halt spontaneous ventilation.

Rectal temperature was continuously monitored and maintained at 37°C. Both the right jugular vein and carotid artery were cannulated. 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).

Muscle oxygen partial pressures adjusted for temperature were monitored using the Licox sensor system (Integra Neuroscience, Plainsboro, NJ), inserted into the quadriceps femori muscle. Muscle microvascular perfusion was assessed by the use of a laser Doppler flowmeter device (Periflux 4001 Master; Perimed AB, Järfälla, Sweden). After instrumentation, rats were allowed to equilibrate for 30min.

Endotoxic shock was induced by administration of 10 mg/kg of LPS (*Escherichia Coli* O127:B8, Sigma, St Quentin Fallavier, France), infused intravenously from 0 to 20 min.

APC (drotecogin alpha activated, Xigris®, Lilly, Indianapolis, USA)(APC) was diluted in saline and infused (LPS/APC group)(n=9) or not (LPS group)(n=9) at 33 µg/kg/h from the onset of LPS infusion to animal death in the APC group. Both the LPS group and the control (SHAM group) were perfused with saline. A control group (n=5) only treated by APC was

also investigated for hemodynamics and phenylephrine reactivity. This dose was determined with dose response curves using 3 doses of APC (24, 33 and 50  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ ) and we found that the best improvement in MAP was associated with 33  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$  and that 50  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$  did not add any further improvement (data not shown).

Equivalent volumes of isotonic saline were used to replace withdrawn blood. Equal amounts of fluid were infused in all rats, i.e. 6 ml/h. Adrenergic drugs were diluted in 0.9% sodium chloride. Arterial blood pressure was recorded from the carotid artery catheter. The percent change in pulse pressure during mechanical ventilation ( $\Delta\text{PP}$ ) was then calculated to assess cardiac preload dependence.

Data acquisition and analysis were recorded using a computerized data acquisition system (IOX, EMKA, France).

#### *Evaluation of vascular reactivity and myocardial function.*

For each animal, arterial pressure and aortic blood flow were recorded 2 hours after LPS infusion (T120). For each group (n=6), maximal mean arterial pressure and minimal aortic blood flow values obtained after each injection of phenylephrine were averaged, then plotted (y-axis) against log dose (x-axis).  $\text{ED}_{50}$  were determined and expressed as mean and 95% confidence interval of the mean by using the four-parameter logistic equation according to the Hill model:  $Y = \text{minimum} + (\text{Emax} - \text{minimum}) / (1 + 10^{(\text{dose} - \log\text{ED}_{50})})$ , where minimum equals return to T0 level analyses (PRISM 4, GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Transthoracic echocardiography was performed under isoflurane anesthesia (1 to 2%) before endotoxin infusion as well as at 2 hrs after. All measurements were performed using an s12 HP 5- to 12-mHz high-resolution small footprint transducer at an acquisition rate of 60 Hz (Hewlett-Packard Sonos 5500). The left ventricular diameter during systole, left ventricular diameter during diastole, and left ventricular ejection fraction (LVEF) were established.

Computational left ventricular volume during systole and diastole were established. Peak aortic blood flow velocity and heart rate were also recorded. Left ventricular stroke volume was calculated by the product of velocity time integral and the aortic cross-sectional area, and cardiac output was determined as stroke volume times heart rate. Three groups of five animals were used.

***Heart and aortic tissue measurements were performed at T240 min***

*Heart adenine nucleotide and lactate/pyruvate ratio measurements*

At 240 minutes of the procedure and prior to sacrifice, the heart was rapidly excised with stainless steel tongs pre-cooled in liquid nitrogen and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at – 80°C. Heart adenine nucleotide and lactate/pyruvate ratio measurements were measured as previously described<sup>22</sup>.

*Morphological analysis of heart leukocyte infiltration.*

The average number of leukocytes per ×400 field was then determined as a semiquantitative assessment of myocardial leukocyte content (Mocha Software, Jandel, San Rafael, California)  
(22)

*Heart myeloperoxidase activity (MPO).*

Heart samples were pestled in liquid nitrogen and homogenized in PBS buffer. MPO activity was determined in the homogenate using a myeloperoxidase assay kit (CytoStore, Calgary, Canada) according to the manufacturer's instructions. Enzyme activity was expressed as change in optical density units per milligram of tissue protein per minute.



*Heart and aorta MMP-9 activity determination*

MMP-9 activity was measured with a specific Matrix Metalloproteinase-9 Biotrak, Activity Assay System (Amersham Biosciences, USA).

*Electronic Paramagnetic Resonance (EPR) studies.*

NO and superoxide anion determination by electron paramagnetic resonance (EPR) were determined as previously published (23).

*Superoxide anion determination by ethidium bromide fluorescence* was performed as previously described (24).

*Western blotting*

Proteins from aorta and heart lysates were subjected to SDS-PAGE using 7% gels. After electrophoresis, proteins were transferred onto nitrocellulose membranes and probed with monoclonal murine anti-iNOS antibody (Transduction Laboratories, Montluçon, France), mouse monoclonal anti-nitrotyrosine (clone 1A6) (Upstate, NY, USA), polyclonal nuclear factor NF- $\kappa$ B p65 (Abcam, Cambridge, UK), phospho-I $\kappa$ B alpha (p-I $\kappa$ B $\alpha$ ) (US Biological, Swampscott, MA) rabbit polyclonal antibody to MMP-9 (rat 92 kDa type IV collagenase) (Millipore Corporation, Billerica, MA 01821 USA) and rabbit anti-COX-2 (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA). Bound antibodies were detected with a secondary peroxidase-conjugated antibody (Promega, Madison, WI). The bands were visualized using the enhanced chemiluminescence system (Amersham, Buckinghamshire, UK) and quantified by densitometry. The housekeeping protein alpha-tubulin (Sigma Aldrich) was also blotted and used as a control for protein loading.

***Plasma measurements at T120 min.***

Lactate concentrations were determined on an automated blood gas analyzer (ABL 735; Radiometer, Copenhagen, Denmark). Plasma concentrations of TNF- $\alpha$  were determined in triplicate by ELISA (RnD Systems, Lille, France).

***Coagulation parameters***

The prothrombin time (PT) was performed by incubating 100  $\mu$ L of plasma for 1 min at 37°C and then adding 200  $\mu$ L of anti-heparin calcium thromboplastin (Neoplastin CI Plus; Diagnostica Stago, France). The activated partial thromboplastin time (APTT) was performed by mixing 100  $\mu$ L of APTT reagent (Biomerieux, France) and 100  $\mu$ L of rat plasma followed by incubation for 3 min at 37°C and recalcification with 100  $\mu$ L of 40 mmol/L Ca Cl<sub>2</sub>. Rat clottable plasma fibrinogen was determined using bovine thrombin (100 NIH Units / mL; Fibriquick, Biomérieux) and the values compared to a human plasma fibrinogen standard (Unicalibrator, Diagnostica Stago). All assays were performed in an Amelung KC10 coagulation instrument.

Thrombin/antithrombin complex (TAT) was determined using a commercial enzyme immunoassay (Enzygnost\* TAT micro, Dade Behring, Germany).

Activated Protein C was evaluated by a chromogenic method.

***Protein carbonyls in plasma***

Total protein carbonyls in plasma were determined by using the Cayman assay kit according to the manufacturer's instructions (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA).

***Lipid Hydroperoxide (LPO)***

Lipid peroxidation was estimated by using the lipid hydroperoxide assay kit (Cayman Chemical Co.)

### **Statistical analysis**

The evolution of hemodynamic and oxygenation parameters are expressed as % changes from baseline. A software package was used for all statistical analyses (PRISM 4, GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

For repeated measurements, one-way analysis of variance was used to evaluate within-group differences. Difference between groups was tested using a two-way analysis of variance (repeated time measurements and treatment as independent variables). When the relevant F values were significant at the 5% level, further pairwise comparisons were made using Dunnett's test for the effect of time and with the Bonferroni correction for the effects of treatment at specific times. Results are expressed as mean  $\pm$  SD. Differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$ .

## **Results**

### *APC-treated rats are protected against endotoxic shock*

APC improved the LPS-induced decrease in MAP (Fig. 1, A) and aortic blood flow (Fig. 1, C), ( $p < 0.01$ ). After 2 hours of LPS perfusion, heart rate increased in APC-treated rats while it decreased in LPS-treated rats (data not shown) ( $p < 0.01$ ). The improvement in aortic blood flow in APC-treated rats was not due to a difference in volemia since pulse pressure variation, used as an index of preload dependency as previously demonstrated (25) was identical in LPS

and LPS-APC treated rats (fig 2). Mesenteric blood flow and mesenteric/aortic blood flow ratio were not different (data not shown). LPS markedly decreased muscular blood flow and oxygen pressure, whereas APC partially prevented this effect ( $p < 0.05$ ) (Fig. 1, E and F). In addition, the LPS-induced increase in lactate was significantly limited by APC ( $p < 0.01$ ) (Table 1).

Compared to the sham group, the hemodynamic responses to phenylephrine were significantly decreased in LPS-challenged rats ( $p < 0.01$ ). This vascular hyporeactivity to phenylephrine was completely restored by APC ( $p < 0.01$ ) (Fig. 1, B). Aortic blood flow was better maintained in APC-treated rats as assessed by a higher  $EC_{50}$  (LPS: 5.99; 5.13 to 6.99 and APC: 9.13; 8.20 to 10.18) ( $p < 0.0001$ ) (Fig. 1, D). LPS challenge was also associated with a decrease in myocardial ATP content and in myocardial energy charge, while APC restored these parameters to near baseline values (Table 1). These results were confirmed by echocardiographic measurements. APC partially blunted the decrease in left ventricular ejection fraction, stroke volume and cardiac output induced by LPS (Table 2).

Median survival was increased by APC relative to the LPS group only ( $p < 0.05$ ) (LPS : 150 min, LPS +APC : 300 min).

The same experiments were done in a control group only treated with APC and we did not find any differences when compared to the sham group in term of arterial pressure, blood flow, muscular  $PO_2$  and vascular or cardiac reactivity (data not shown).

*APC protects against LPS-induced NF- $\kappa$ B activation and increase in oxidative stress in the aorta and the heart*

Stimulation of LPS receptor, *Toll*-like receptor 4, induces *NF- $\kappa$ B* activation. *NF- $\kappa$ B* family members are heterodimers of p65/RelA and p50/ *NF- $\kappa$ B*, although only the p65 subunit has transactivation domains capable of initiating transcription on proinflammatory genes that code

for various cytokines and enzymes such as iNOS. The NF- $\kappa$ B heterodimer co-localizes in the cytoplasm with the inhibitory protein I $\kappa$ B. On cell stimulation, I $\kappa$ B is phosphorylated, removed, and degraded, allowing free NF- $\kappa$ B to induce transcription. The latter is responsible for the overproduction of circulating and tissue NO including the aorta and is involved both in vascular hyporeactivity to vasoconstrictor agonist and in myocardial failure after LPS treatment. We therefore assessed the effect of APC on LPS-induced *NF- $\kappa$ B* activation using a Western blot of the p65 and phosphorylated form of I $\kappa$ B subunit of NF- $\kappa$ B. No significant blot was shown in heart from the sham group (Fig 3, A and B). LPS induced a marked blotting of both the p65/RelA subunit of NF- $\kappa$ B ((Fig 3, A) and phospho-I $\kappa$ B ((Fig 3, B) whereas APC limited this effect.

Furthermore, LPS challenge was associated with a marked increase in plasma TNF alpha concentrations which was reduced by APC ( $p < 0.01$ ) (Table 1).

An increase in oxidative and nitrosative stress also plays a central role in sepsis upon LPS treatment. Hence, the level of oxidative stress was assessed using superoxyde anion determination by electron paramagnetic resonance (aorta and heart) and ethidium bromide fluorescence (aorta).

LPS was associated with an increase in O<sub>2</sub><sup>-</sup> levels in aorta and heart (Fig. 4, A) which was partially prevented by APC treatment ( $p < 0.05$ ). These results were confirmed by ethidium bromide fluorescence in the aorta ( $p < 0.05$ ) (Fig 4, B and fig 5). Moreover, in the heart, there was also a decrease in nitrotyrosine (ONOO<sup>-</sup>) expression measured by Western blot analysis (Fig 4, C). A marked elevation of lipid hydroperoxide and plasma carbonyls was featured in the LPS group, both of which were reduced by APC ( $P < 0.01$ ) (Table 3).

*APC treatment leads to a reduced efficacy of LPS in increasing tissular expression of iNOS and the associated overproduction of circulating and tissular NO*

We investigated the consequence of APC treatment both on tissue iNOS expression and on circulating and tissue NO production. Compared to the sham group, LPS induced a significant increase in NO production as detected by the EPR signal in the heart ( $P < 0.05$ ), aorta and blood ( $p < 0.05$ ) (Fig. 6 A). Conversely, APC treatment reduced the increase in LPS-induced NO production in both heart and aortic tissues ( $P < 0.05$ ). Western blot analysis confirmed the decrease in iNOS expression in the heart and aorta in APC-treated rats (Fig. 6, B-C).

*APC treatment reduces LPS-induced heart leukocyte infiltration as well as MMP activity/expression in heart and aorta*

The consequence of APC treatment was investigated both on heart leukocyte infiltration/activation and MMP-9 activity/expression.

Compared to SHAM, the number of leukocytes in the myocardium of LPS-challenged rats was greater at the end of the experiment ( $35 \pm 5$  vs.  $6 \pm 2$  leukocytes per field respectively;  $p < 0.01$ ) which was prevented by APC (APC:  $9 \pm 2$  leukocytes per field;  $p < 0.01$  versus LPS). APC also prevented the increase in heart MPO activity induced by LPS challenge ( $p < 0.01$ ) (Table 3).

MMP 9 enzyme activity in whole heart extracts was increased in LPS-challenged rats which was also decreased by APC ( $p < 0.05$ ) (Fig. 7). In whole aortic extracts, MMP 9 enzyme activity was nearly undetectable in the SHAM group, increased in LPS-challenged rats while markedly decreased by APC ( $p < 0.01$ ). Western Blot analysis demonstrated that APC significantly decreased the protein level of the active form of MMP-9 ( $p < 0.01$ ).

*The protective effect of APC is not linked to its anti-coagulant effects*

LPS was associated with a decrease in fibrinogen from  $2.4 \pm 0.04$  g/l to  $0.9 \pm 0.15$  g/l ( $p < 0.05$ ), an increase in TAT complex from  $10 \pm 2$   $\mu$ g/l to  $712 \pm 179$   $\mu$ g/ ( $p < 0.05$ ), an increase in APTT from  $19 \pm 2$  to  $25 \pm 2$  s ( $p < 0.05$ ) and an increase in PT from  $15.7 \pm 2$  to  $21.6 \pm 2$  s ( $p < 0.05$ ). APC, on the other hand, did not alter these parameters (fibrinogen:  $2.5 \pm 0.04$  g/l to  $0.7 \pm 0.15$  g/l, TAT:  $12 \pm 2$   $\mu$ g/l to  $831 \pm 148$   $\mu$ g/l, APTT:  $28 \pm 2$  s and PT:  $16.0$  s  $\pm 2$  to  $23.0$  s). Compared to both SHAM and LPS groups, APC blood levels were significantly increased ( $10 \pm 2$  versus  $6 \pm 0.6$  versus  $30 \pm 4.6$  ng/ml respectively;  $p < 0.05$ ).

## Discussion

In this study, we provide evidence for a protective role of APC on hemodynamic function during LPS-induced shock leading to an increase median survival time. APC notably improved LPS-induced vascular and myocardial dysfunction, heart myocardial energetics and tissue perfusion/oxygenation. These effects were associated with reduced heart leukocyte infiltration and MMP activity and expression in both the heart and the aorta. In addition, iNOS expression was down regulated while NO production in aorta, heart and blood was reduced. Moreover, APC reduced *in situ* activation of the transcriptional factor NF- $\kappa$ B, thus reducing oxidative and nitrosative stresses in aorta and heart.

Other studies have already suggested a beneficial role of APC in sepsis-induced organ dysfunction (26, 27). However, these putative effects were mainly demonstrated by *in vitro* or in *in vivo* studies using supra-pharmacological doses of APC (28). Moreover, the specific effects of APC on heart and vessels have never been studied. Thus, the exact mechanisms by which APC exerts its beneficial effects on cardiovascular/organ function are yet to be fully understood.

In the present study, we found that APC improved arterial pressure and vascular reactivity to vasoconstrictors. During sepsis, vascular hyporeactivity (i.e. decreased responsiveness to catecholamines) has been mainly related to NO overproduction (29, 30). Herein, APC induced a marked decrease in aortic iNOS expression with a concomitant decrease in NO content as well as a decrease in O<sub>2</sub><sup>-</sup> content. Although we did not evaluate peroxynitrite production in the vessel wall, it is well demonstrated that when both superoxide and NO are synthesized within a few cell diameters of each other, they will combine spontaneously to form peroxynitrite by a diffusion-limited reaction (31). Further evidence supports the concept that the final pathway of vascular dysfunction during shock may be due to the peroxynitrite-



mediated activation of PARP since vascular hyporeactivity occurring in experimental models of septic shock was improved by inhibitors of PARP or its genetic deletion (32).

Data concerning the effects of APC on heart function during human septic shock are scarce. Recently, John et al (33) found in a retrospective study of septic shock patients that in patients with severe sepsis who have elevated troponin, treatment with APC was associated to a better outcome. Using a modified Langendorff isolated heart preparation, Favory et al (15) demonstrated that the reduction in left ventricular systolic performance induced by endotoxin was prevented by APC. Herein, using direct and indirect assessment of ventricular performance, results also demonstrate improved myocardial function with APC. The pathophysiology of myocardial dysfunction during sepsis is complex and remains a matter of extensive discussion (34). Various mechanisms have been proposed in the development of septic myocardial depression; most of which are regulated by cytokines and NO (35). Indeed, although the inhibition of iNOS restores vascular tone, it does not restore the contractility of cardiomyocytes, papillary muscle or isolated hearts harvested from animal models challenged with LPS (36). NO produced in large amounts can interact with superoxide anion to produce peroxynitrite. The involvement of peroxynitrite in sepsis-induced cardiomyopathy was recently confirmed by the use of peroxynitrite neutralizers, which improved cardiac dysfunction in septic rats (22). Sepsis-induced cardiomyopathy may also be caused by mitochondrial respiratory changes (37). Indeed, NO can bind to complex IV of the respiratory chain, thereby competing with oxygen, resulting in the inhibition of this complex and increased ROS production. Peroxynitrite can also be very toxic to the respiratory chain, particularly by inhibiting complexes I, II, and III. (38) It has recently been shown that complex I is inhibited in skeletal muscle of septic patients, and that this inhibition is related to NO production by iNOS (39).

In our current model, APC improved myocardial function and clearly decreased NF- $\kappa$ B activation, heart NO and superoxide anion as well as myocardial nitrotyrosine content, a “footprint” of peroxynitrite generation, in conjunction with a decrease in heart leukocyte infiltration. In addition to these observations, myocardial energetics were also improved. Based on previous findings (3) showing that prevention of heart inflammation and leukocyte activation is critical for heart function in models of endotoxemia, these observations suggest that some of APC's efficiency is likely due to a decrease in NO and peroxynitrite generation. Animal studies are consistent with the hypothesis that APC inhibits leukocyte cytokine release, chemotaxis and migration in vivo (27, 40, 41). Heart infiltration by leucocytes has been associated with increased matrix metalloproteinase (MMP) production. Matrix metalloproteinase (MMP), a large family of zinc-dependent endopeptidases, are able to catabolize components of the extracellular matrix. Increased MMP activity has also been associated with heart failure, arteriosclerosis and tissue damage during inflammation (21, 42). Lalu et al (43) recently reported that MMP inhibition improved vascular hyporeactivity. Cuenca et al demonstrated that during LPS challenge, cardiomyocytes are able to express and activate MMP-9 *via* COX-2 metabolites and NO pathways (20). Herein, APC was found to decrease MMP-9 activity in the aorta and in the myocardium. We also observed a decrease in leukocyte infiltration and MPO activity at the myocardial level (44). Moreover, Poon et al (45) demonstrated that iNOS appears to be essential for the ability of emigrated neutrophils to cause myocyte injury. Thus, it may be hypothesized that APC, by decreasing leukocyte activation and leukocyte NO/COX<sub>2</sub> production through leukocyte EPCR in a PAR-1-independent pathway (46, 47), decreases leukocyte infiltration both in heart and vessels, thereby decreasing cytokine release and MMP-9 activity and, in turn, favoring the stabilization of the extracellular matrix.

As recently demonstrated by Gupta et al (17), we found that, at the relatively low dose used, human APC used in rats did not prevent the reduction in fibrinogen and the increase in TAT induced by LPS. Thus beneficial effects of APC appear to be driven by its cytoprotective properties rather than its anti-coagulant effects (48). Furthermore, extensive *in vivo* and *in vitro* studies have focused on the cytoprotective effects of APC and most authors agree that its anticoagulant and cytoprotective effects are mediated by distinct APC structural features. Positively charged residues in surface loops in the APC protease domain have been identified as participating in the anticoagulant activity but not in cellular effects. Hence, variants have been designed with greater anti-apoptotic activity and reduced anticoagulant activity relative to wild-type APC. Kerschen et al recently demonstrated that these variants with reduced anticoagulant but preserved signaling function did indeed prevent endotoxemia mortality (47). Several limitations of this study should be acknowledged. Firstly, the endotoxemia model is certainly not a true reflection of the actual clinical setting although endotoxemia is generally considered to adequately reproduce the full spectrum of inflammatory changes observed in patients with sepsis (49). Secondly, APC was used concomitantly with LPS and not as post treatment.. Thirdly, the present model is a hypokinetic model and represents only 20% of septic shock patients (50). Nevertheless, it features the unresuscitated, low cardiac output state associated with the early phase of septic shock as demonstrated by Rivers et al (51). Moreover, in conjunction with this hypovolemic state, our model is clearly associated with vascular and myocardial dysfunction and certainly appears to be suitable for mechanistic studies.

In summary, the present study suggests that APC may offer potential therapeutic perspectives for sepsis-induced cardiovascular failure. Moreover, these effects were found to be independent from its anticoagulant effects, clearly highlighting the interest for a variant version of APC exhibiting an improved cytoprotective to anticoagulant effects ratio profile.

Table 1. Lactate, TNF alpha and heart energetics parameters.

	SHAM	LPS	LPS-APC
Lactate T240 mmol/l	1.9±0.5	5.6±0.8*	2.9±0.4
TNF alpha pg/ml	30±8	400±120*	205±80
Heart ATP nmol/mg wet weight	4±1	2.9±0.4*	3.8±0.7
Heart energy charge %	0.82±0.02	0.70±0.03*	0.77±0.02

\* P < 0.05 vs. other group

Table 2. Echocardiographic variables measured 2 hours after endotoxin infusion

	Sham (n=5)	LPS (n=5)	LPS-APC (n=5)
Left ventricular ejection fraction, %	83±4	64±5 *	74±3
Heart rate, beats/min	350±20	399±23 *	370±15 *
Stroke volume, μl	325±20	165±15 *	243±17
Cardiac output, ml/min	110±20	66±17 *	90±17

Table 3. Plasma reactive oxygen species and heart myeloperoxidase activity (MPO)

	Sham	LPS	LPS-APC
Carbonyls nM/mg prot	0.46 ± 0.03	1.71 ± 0.42*	1.03 ± 0.25**
Lipid Hydroperoxide (μM)	10.83 ± 2.12	29.61 ± 1.97*	9.54 ± 1.93
Heart MPO activity (UI/mg tissue)	0.14 ± 0.01	0.26 ± 0.04*	0.19 ± 0.01

\* P < 0.05 vs. Sham and LPS-APC; \*\* p < 0.05 vs. Sham and LPS

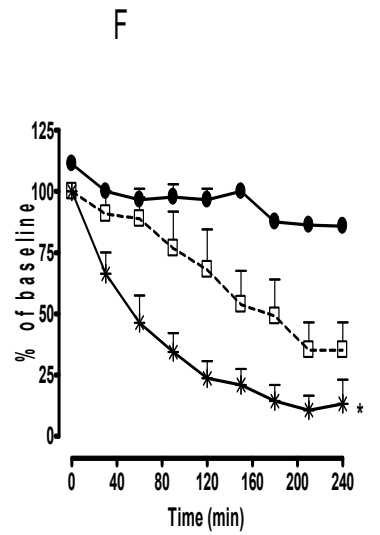
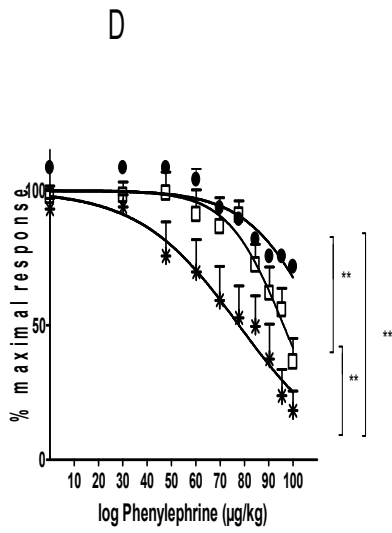
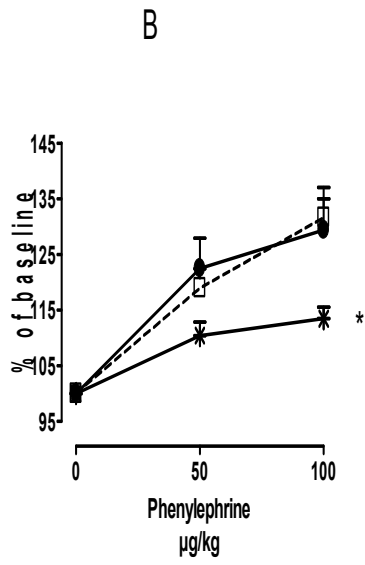
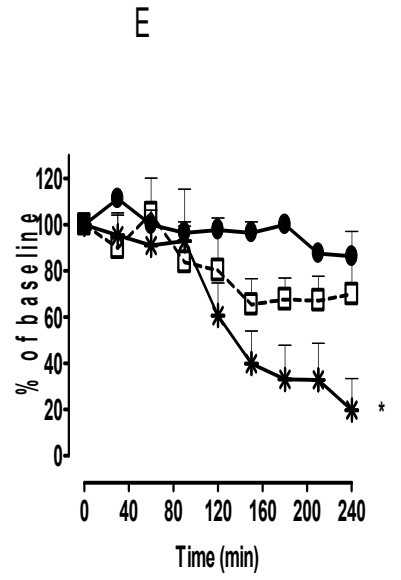
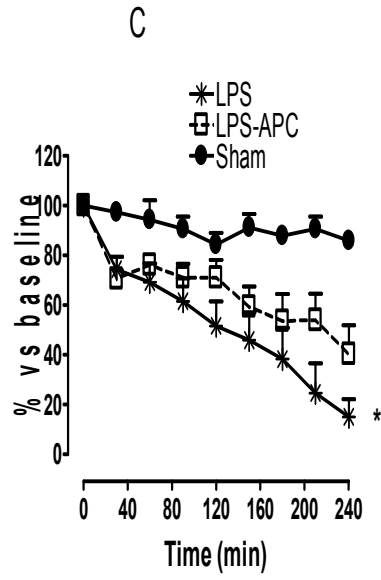
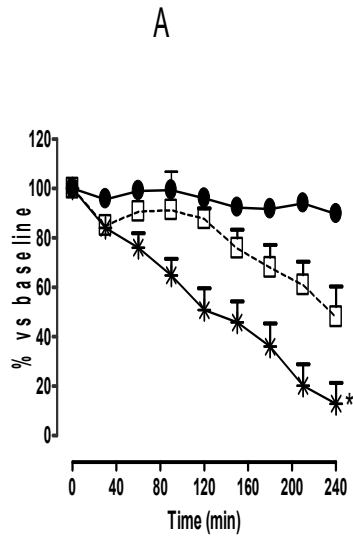
## Figure 1

Sham group: full circles; LPS group: asterisks and LPS-APC group: empty squares

Evolution of MAP (A) (n=9 in each group) and dose-response curves to increasing doses of the alpha-agonist phenylephrine (B) on MAP (n=7 in each group). \*P < 0.01 vs other groups.

Evolution of aortic blood flow (C) (n=9 in each group) and dose-response curves to incremental doses of phenylephrine (D) (n=7 in each group) on aortic blood flow. The dosage variable is plotted on the x-axis as logarithmic values. Thin lines were determined by using the four-parameter logistic equation (Hill model). \*P < 0.01 vs. other groups; \*\* P < 0.01 sham vs. LPS-APC and LPS-APC vs. LPS, \*\*\* P < 0.01 SHAM vs. LPS.

Evolution of muscular laser Doppler blood flow (E) and muscular PO<sub>2</sub> (F) (n=9 in each group). \* P < 0.05 vs. other groups.





**Figure 2**

Evolution of pulse pressure variation.

Sham group: full circles; LPS group: asterisks and LPS-APC group: empty squares

\*  $p < 0.05$  vs sham group

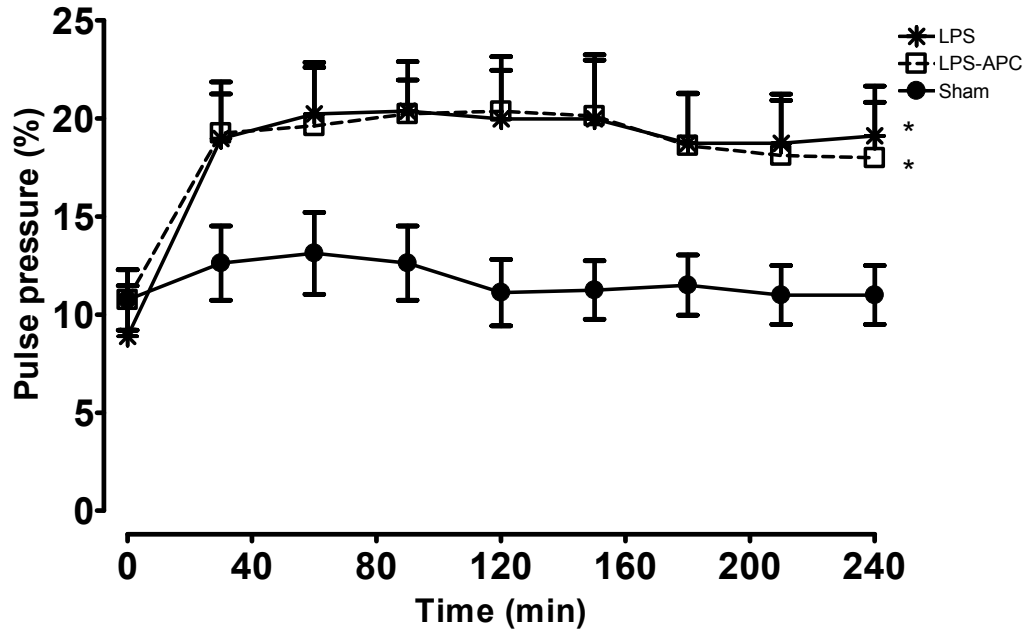
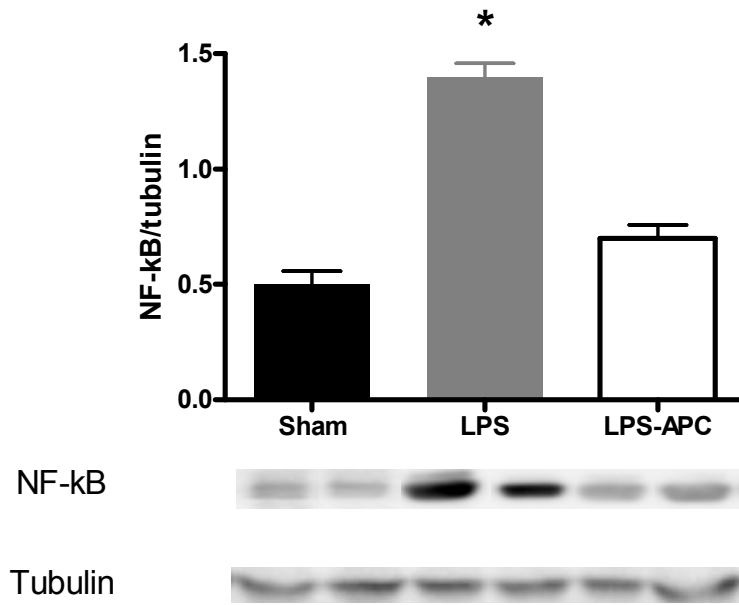
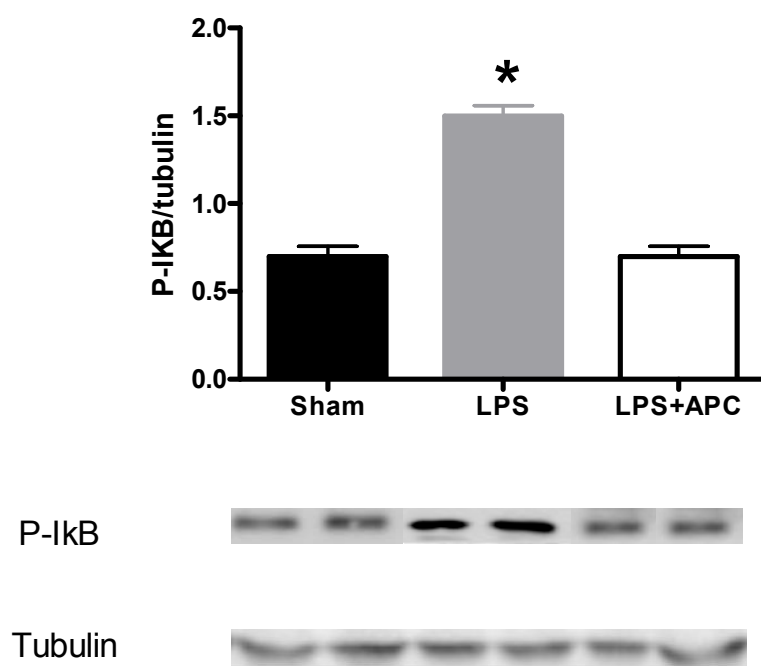


Figure 3.

Western blots revealing NF-kB p65 (A) and PI-KB (B) down expression in heart lysates in APC treated rats. Plots show the densitometric intensities for each condition, normalized against tubulin expression and presented in arbitrary units. (n= 6 in each group). (\* P < 0.05 vs. other groups) .

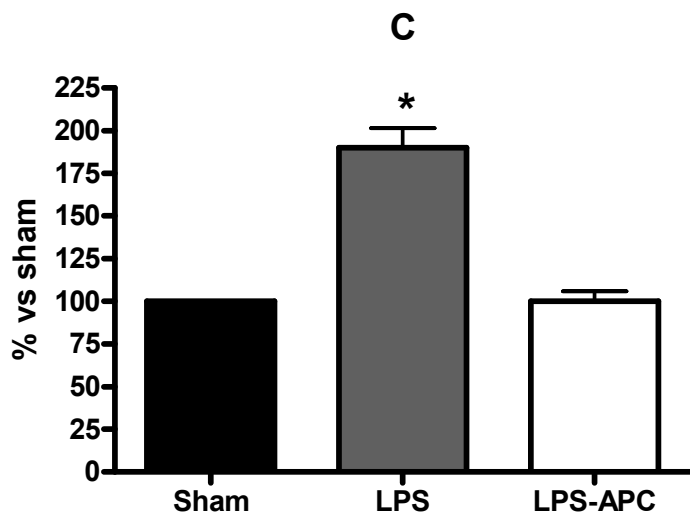
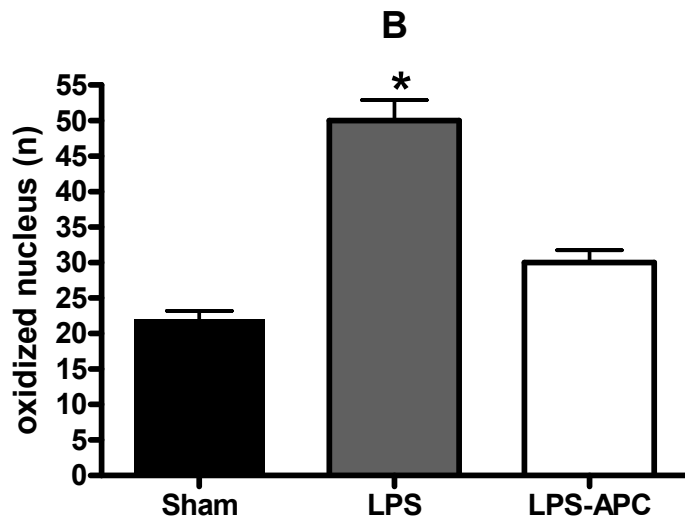
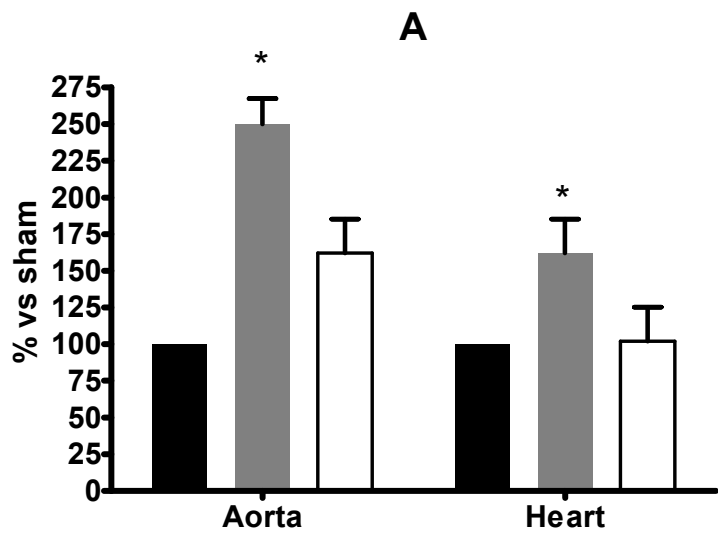
**A****B**

## Figure 4

A: Quantification of the amplitude of  $O_2^{\cdot-}$ CMH signal in aorta and heart by electron paramagnetic resonance.

B: Quantification of *In situ* detection of superoxide anion (middle panel) ( $P < 0.05$ ). Data represent the mean  $\pm$  SD of 8 experiments (\*  $P < 0.05$ ).

C: Quantification of nitrotyrosine (ONOO<sup>-</sup>) expression measured by Western blot analysis. Data represent the mean  $\pm$  SD of 6 experiments (\*  $P < 0.05$ ).

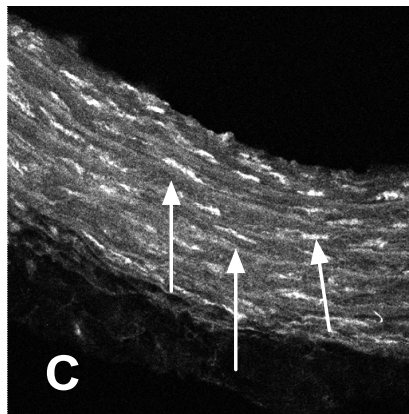
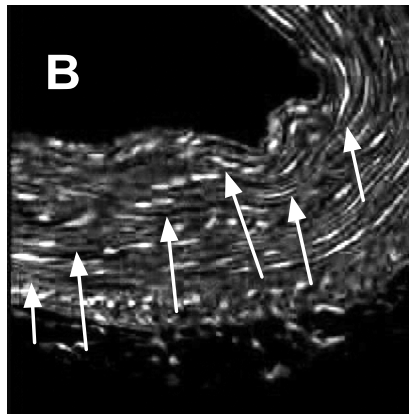
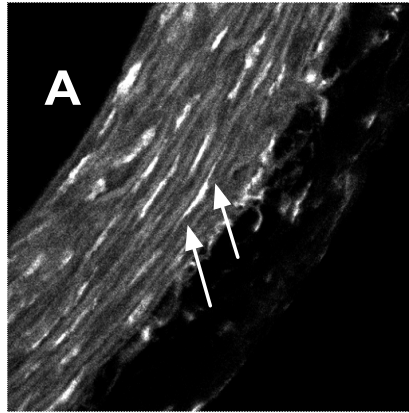


## Figure 5

DHE is permeable to cells and in the presence of superoxide is oxidized to fluorescent ethidium bromide which binds to DNA to produce red fluorescence. Arrows indicate oxidized nucleus in the aortic wall.

A : sham group; B : LPS group; C : LPS-APC group

Data represent the mean  $\pm$  SD of 8 experiments.





**Figure 6**

A: Quantification of the amplitude of NO-Fe(DETC)<sub>2</sub> in aorta, heart and blood by electron paramagnetic resonance (n= 6 in each group). \* P < 0.05.

B and C: Western blots revealing iNOS down expression in heart (B) and aorta (C) in APC treated rats. Plots show the densitometric intensities for each condition, normalized against tubulin expression and presented in arbitrary units. (n= 6 in each group).

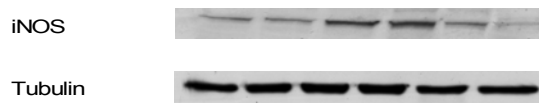
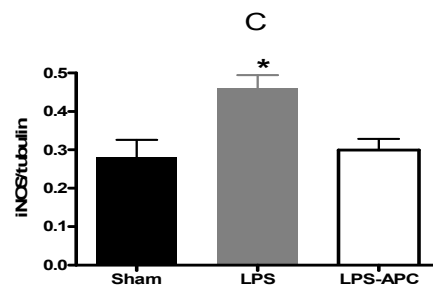
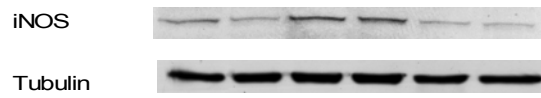
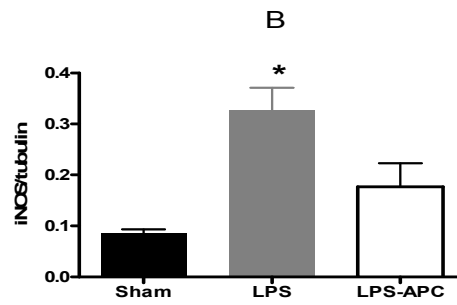
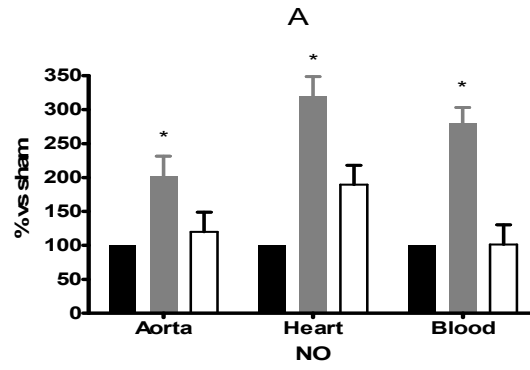
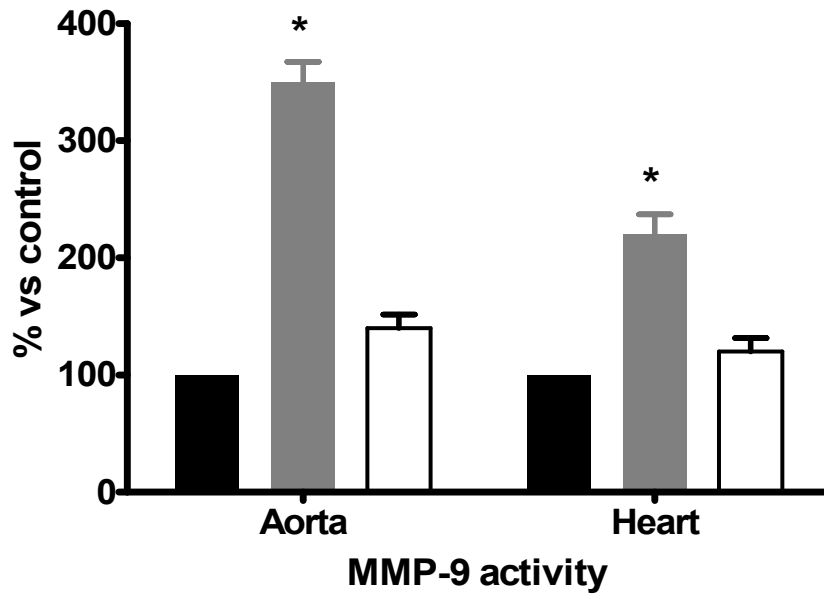
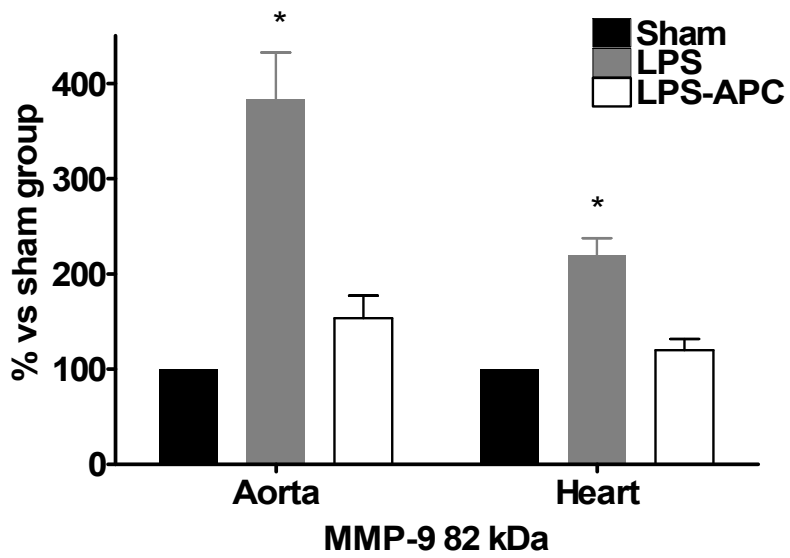


Figure 7

A: Evolution of MMP-9 activity in the heart and aorta. (\*  $P < 0.01$ ). Data represent the mean  $\pm$  SD of 6 experiments.

B: Western blots revealing MMP-9 82 kDa down expression in heart (A) and aorta (B) in the LPC-APC group comparatively to LPS alone. Data represent the mean  $\pm$  SD of 6 experiments.

**A****B**

## REFERENCES

1. Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM. Septic shock. *Lancet* 2005;365(9453):63-78.
2. Remick DG. Pathophysiology of sepsis. *Am J Pathol* 2007;170(5):1435-1444.
3. Rudiger A, Singer M. Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction. *Crit Care Med* 2007;35(6):1599-1608.
4. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007;87(1):315-424.
5. Rossi MA, Celes MR, Prado CM, et al. Myocardial structural changes in long-term human severe sepsis/septic shock may be responsible for cardiac dysfunction. *Shock* 2007;27(1):10-18.
6. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001;344(10):699-709.
7. Mosnier LO, Zlokovic BV, Griffin JH. The cytoprotective protein C pathway. *Blood* 2007;109(8):3161-3172.
8. Esmon CT. The endothelial protein C receptor. *Curr Opin Hematol* 2006;13(5):382-385.
9. Joyce DE, Gelbert L, Ciaccia A, et al. Gene expression profile of antithrombotic protein c defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. *J Biol Chem* 2001;276(14):11199-11203.
10. White B, Schmidt M, Murphy C, et al. Activated protein C inhibits lipopolysaccharide-induced nuclear translocation of nuclear factor kappaB (NF-kappaB) and tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) production in the THP-1 monocytic cell line. *Br J Haematol* 2000;110(1):130-134.
11. Bilbault P, Lavaux T, Launoy A, et al. Influence of drotrecogin alpha (activated) infusion on the variation of Bax/Bcl-2 and Bax/Bcl-xl ratios in circulating mononuclear cells: A cohort study in septic shock patients. *Crit Care Med* 2006.
12. Yamaji K, Wang Y, Liu Y, et al. Activated protein C, a natural anticoagulant protein, has antioxidant properties and inhibits lipid peroxidation and advanced glycation end products formation. *Thromb Res* 2005;115(4):319-325.
13. Looney MR, Matthay MA. Bench-to-bedside review: The role of activated protein C in maintaining endothelial tight junction function and its relationship to organ injury. *Crit Care* 2006;10(6):239.
14. Regnault V, Levy B. Recombinant activated protein C in sepsis: endothelium protection or endothelium therapy? *Crit Care* 2007;11(1):103.
15. Favory R, Lancel S, Marechal X, et al. Cardiovascular protective role for activated protein C during endotoxemia in rats. *Intensive Care Med* 2006;32(6):899-905.
16. Isobe H, Okajima K, Uchiba M, et al. Activated protein C prevents endotoxin-induced hypotension in rats by inhibiting excessive production of nitric oxide. *Circulation* 2001;104(10):1171-1175.
17. Gupta A, Berg DT, Gerlitz B, et al. Activated Protein C Suppresses Adrenomedullin and Ameliorates Lipopolysaccharide-Induced Hypotension. *Shock* 2007.
18. Wang Z, Su F, Rogiers P, et al. Beneficial effects of recombinant human activated protein C in a ewe model of septic shock\*. *Crit Care Med* 2007.
19. Monnet X, Lamia B, Anguel N, et al. Rapid and beneficial hemodynamic effects of activated protein C in septic shock patients. *Intensive Care Med* 2005;31(11):1573-1576.
20. Cuenca J, Martin-Sanz P, Alvarez-Barrientos AM, et al. Infiltration of inflammatory cells plays an important role in matrix metalloproteinase expression and activation in the heart during sepsis. *Am J Pathol* 2006;169(5):1567-1576.

21. Chow AK, Cena J, Schulz R. Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. *Br J Pharmacol* 2007.
22. Lancel S, Tissier S, Mordon S, et al. Peroxynitrite decomposition catalysts prevent myocardial dysfunction and inflammation in endotoxemic rats. *J Am Coll Cardiol* 2004;43(12):2348-2358.
23. Ralay Ranaivo H, Carusio N, Wangensteen R, et al. Protection against endotoxic shock as a consequence of reduced nitrosative stress in MLCK210-null mice. *Am J Pathol* 2007;170(2):439-446.
24. Miller FJ, Jr., Gutterman DD, Rios CD, et al. Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. *Circ Res* 1998;82(12):1298-1305.
25. Sennoun N, Montemont C, Gibot S, et al. Comparative effects of early versus delayed use of norepinephrine in resuscitated endotoxic shock. *Crit Care Med* 2007;35(7):1736-1740.
26. Mosnier LO, Zlokovic BV, Griffin JH. The cytoprotective protein C pathway. *Blood* 2007;109(8):3161-3172.
27. Gupta A, Rhodes GJ, Berg DT, et al. Activated Protein C ameliorates LPS-induced acute kidney injury and down-regulates renal iNOS and Angiotensin 2. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007.
28. Macias WL, Yan SB, Williams MD, et al. New insights into the protein C pathway: potential implications for the biological activities of drotrecogin alfa (activated). *Crit Care* 2005;9 Suppl 4:S38-45.
29. Landry DW, Oliver JA. The pathogenesis of vasodilatory shock. *N Engl J Med* 2001;345(8):588-595.
30. Szabo C, Mitchell JA, Thiemermann C, et al. Nitric oxide-mediated hyporeactivity to noradrenaline precedes the induction of nitric oxide synthase in endotoxin shock. *Br J Pharmacol* 1993;108(3):786-792.
31. Huie RE, Padmaja S. The reaction of NO with superoxide. *Free Radic Res Commun* 1993;18(4):195-199.
32. Soriano FG, Liaudet L, Szabo E, et al. Resistance to acute septic peritonitis in poly(ADP-ribose) polymerase-1-deficient mice. *Shock* 2002;17(4):286-292.
33. John J, Awab A, Norman D, et al. Activated protein C improves survival in severe sepsis patients with elevated troponin. *Intensive Care Med* 2007;33(12):2122-2128.
34. Merx MW, Weber C. Sepsis and the heart. *Circulation* 2007;116(7):793-802.
35. Rastaldo R, Pagliaro P, Cappello S, et al. Nitric oxide and cardiac function. *Life Sci* 2007;81(10):779-793.
36. Decking UK, Flesche CW, Godecke A, et al. Endotoxin-induced contractile dysfunction in guinea pig hearts is not mediated by nitric oxide. *Am J Physiol* 1995;268(6 Pt 2):H2460-2465.
37. Suliman HB, Welty-Wolf KE, Carraway M, et al. Lipopolysaccharide induces oxidative cardiac mitochondrial damage and biogenesis. *Cardiovasc Res* 2004;64(2):279-288.
38. Echtay KS, Roussel D, St-Pierre J, et al. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* 2002;415(6867):96-99.
39. Brealey D, Brand M, Hargreaves I, et al. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet* 2002;360(9328):219-223.
40. Mizutani A, Okajima K, Uchiba M, et al. Activated protein C reduces ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats by inhibiting leukocyte activation. *Blood* 2000;95(12):3781-3787.
41. Hoffmann JN, Vollmar B, Laschke MW, et al. Microhemodynamic and cellular mechanisms of activated protein C action during endotoxemia. *Crit Care Med* 2004;32(4):1011-1017.

42. Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 2002;90(3):251-262.
43. Lalu MM, Csont T, Schulz R. Matrix metalloproteinase activities are altered in the heart and plasma during endotoxemia. *Crit Care Med* 2004;32(6):1332-1337.
44. Chen J, Tung CH, Allport JR, et al. Near-infrared fluorescent imaging of matrix metalloproteinase activity after myocardial infarction. *Circulation* 2005;111(14):1800-1805.
45. Poon BY, Raharjo E, Patel KD, et al. Complexity of inducible nitric oxide synthase: cellular source determines benefit versus toxicity. *Circulation* 2003;108(9):1107-1112.
46. Sturn DH, Kaneider NC, Feistritzer C, et al. Expression and function of the endothelial protein C receptor in human neutrophils. *Blood* 2003;102(4):1499-1505.
47. Kerschen EJ, Fernandez JA, Cooley BC, et al. Endotoxemia and sepsis mortality reduction by non-anticoagulant activated protein C. *J Exp Med* 2007;204(10):2439-2448.
48. Griffin JH, Fernandez JA, Mosnier LO, et al. The promise of protein C. *Blood Cells Mol Dis* 2006;36(2):211-216.
49. Remick DG, Ward PA. Evaluation of endotoxin models for the study of sepsis. *Shock* 2005;24 Suppl 1:7-11.
50. Vieillard-Baron A, Prin S, Chergui K, et al. Hemodynamic instability in sepsis: bedside assessment by Doppler echocardiography. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168(11):1270-1276.
51. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, et al. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2001;345(19):1368-1377.

**Recombinant human activated protein C improves endotoxemia-induced endothelial dysfunction: A blood free model in isolated mice arteries**

**Short title:** Blood free activity of rhAPC in mice arteries

Nacira Sennoun<sup>1,2\*</sup>; Celine Baron-Menguy<sup>1\*</sup>; Mélanie Burban<sup>3</sup>; Thomas Lecompte<sup>4</sup>, Ramaroson Andriantsitohaina<sup>1</sup>; Daniel Henrion<sup>1</sup>; Alain Mercat<sup>3,5</sup>; Pierre Asfar<sup>3,5</sup>; Bruno Levy<sup>2</sup>; Ferhat Meziani<sup>1,5</sup>.

<sup>1</sup>INSERM UMR 771; CNRS UMR 6214; Université d'Angers. Angers, France.

<sup>2</sup>Groupe CHOC, Equipe AVENIR Inserm; Nancy Université; Faculté de Médecine 54500 Vandoeuvre les Nancy; France.

<sup>3</sup>Laboratoire HIFIH UPRES EA 3859 ; Université d'Angers. Angers, France.

<sup>4</sup>Inserm U734 ; Nancy Université ; Faculté de Médecine 54500 Vandoeuvre les Nancy ; France.

<sup>5</sup>Département de Réanimation médicale et de médecine hyperbare, Centre Hospitalo- Universitaire. Angers, France.

Address requests for reprints to:

Dr Ferhat Meziani. Département de réanimation médicale et médecine hyperbare. C.H.U. 4 rue Larrey. F-49933 Angers Cedex 9. France  
Phone: +33241353255; Fax: +33241354083  
E-Mail: [FeMeziani@chu-angers.fr](mailto:FeMeziani@chu-angers.fr)

\*The first 2 authors contributed equally to this work.

**Number of text pages: 13**

**Number of figures: 3**

**Total Word count: 4176**



**Abstract**

**Objective:** Recombinant human activated protein C (rhAPC) to improve vascular dysfunction is one of treatment panel for septic patients. We previously reported that rhAPC treatment in rat endotoxemia improved vascular reactivity. However the involved mechanisms are still debated. We hypothesized that rhAPC would improve arterial dysfunction through its non anticoagulant properties.

**Design, experimental:** Randomized investigational animal laboratory. LPS was injected to mice (50mg/kg, *ip*). After 10h aorta and mesenteric arteries were isolated and incubated with or without rhAPC during 12 h. Then aortic rings were mounted in a myograph. Arterial contractility and endothelium-dependent relaxation in the presence or absence of NO-synthase or cyclooxygenases inhibitors were measured. Flow (shear stress)-mediated dilation with or without the same inhibitors was measured in mesenteric resistance arteries. Protein expression was assessed using Western Blotting.

**Results:** LPS reduced aortic contractility to KCl and phenylephrine and dilation to Acetylcholine. LPS also reduced flow-mediated dilation in mesenteric arteries. In rhAPC-treated aorta and mesenteric arteries, contractility and endothelial responsiveness to vasodilator drug and shear stress were improved. We showed that rhAPC improved endotoxemia- induced endothelial dysfunction by increasing eNOS activation *via* Akt / PI<sub>3</sub>K and NO-dependent dilation as well as cyclooxygenase vasodilatory pathways. We noted that rhAPC also had an anti-inflammatory effect in the vascular wall by decreasing NF-kB activation.

**Conclusion:** *Ex-vivo* rhAPC application improved arterial contractility and endothelial dysfunction resulting from endotoxemia in mice. This result highlights important insights, regarding the mechanism underlying rhAPC-induced improvements on arterial dysfunction during septic shock.

Key words: Endotoxemia, endothelial dysfunction, eNOS; Akt; rhAPC.

## Introduction

Septic shock is associated to hypotension and frequently to disseminated intravascular coagulation contributing to multiple organ failure and high mortality rate [1,2]. Endothelial dysfunction with impaired release of endothelial nitric oxide (NO) and prostacyclin, reduction of vascular reactivity to vasoconstrictors associated with leukocytes and platelet aggregation are the hallmark of the pathophysiology of this syndrome [3]. The Protein C pathway has been implicated with a pivotal role in these disturbances [4].

Furthermore, a release of reactive oxygen and nitrogen species by different pathways contributes to the organ failures such as the lung, heart, brain, and liver [5]. Data collected from clinical studies and different models of endotoxemia suggest that this phenomenon is related to the activation of the NF- $\kappa$ B pathway, enabling the expression of several specific genes involved in the pathogenesis of septic shock leading to the production of cytokines, adhesion molecules, cyclooxygenase-2 (COX-2), and inducible nitric oxide synthase (iNOS) [6,7]. The induction of iNOS with an overproduction of NO, play a major role in endotoxemia-induced vascular hyporeactivity in different experimental models [8, 9] as well as in the small vessels of patients with septic shock [10].

Activated protein C (APC), an endogenous vitamin K dependent serine protease with multiple biological activities is an important modulator of the host systemic response to severe infection [11]. In a previous experimental study [12], we reported that Recombinant human Activated Protein C (rhAPC) improved cardiovascular function i) by modulating endotoxin induced-proinflammatory/prooxydant state, ii) by decreasing cell adhesion and iii) by favoring stabilization of the extracellular matrix. These results might be related to APC-anticoagulant and/or non anticoagulant activities in the field of experimental endotoxemia [13, 14]. rhAPC might act directly on endothelial dysfunction, via endothelial protein C receptor (EPCR)/protease activated receptor-1 (PAR-1), by direct modulation of leukocyte migration and cell adhesion expression, blocking cytokine signaling and decreasing vascular permeability and cell apoptosis [15]. Moreover, rhAPC

has been shown to have multiple biological activities as evidenced *in vivo* in several animal studies and *in vitro* on endothelial, smooth muscle and immune cells. Thus, the ability of APC to suppress pro-inflammatory processes and to enhance cellular survival suggests that APC might play a role in the adaptive vascular response [11].

This study examined *ex-vivo* the potential protective, blood free, non anticoagulant properties of rhAPC on vascular dysfunction induced by bacterial lipopolysaccharide (LPS) in isolated mice arteries. Because the differences in blood pressure and tissue specificity induce a specialization of vascular cells [16], we performed the study on conductance (the aorta) and small mesenteric resistance arteries.

## Methods

### Animals and protocols:

All animal experimentations were performed in accordance with institutional guidelines and protocols approved by the French Animal Care Committee in line with European regulations. These experiments were conducted in compliance with statutory requirements by accredited research scientist. The procedure followed in the care and euthanasia of the study animals was in accordance with the European Community Standards on the Care and Use of Laboratory Animals (Ministère de l'Agriculture, France, authorization No. 6422).

As we previously described [17], male Swiss mice (35-40 g) were injected LPS (50 mg/kg *i.p.*, LPS from *Escherichia coli* 055:B5; Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Control mice received an equivalent volume of vehicle (0.9% NaCl solution) (control group).

After 10 hours, mice were anaesthetized with isoflurane gas and sacrificed by decapitation to harvest aortic rings and small mesenteric arteries (SMA). Mouse rings (2-3mm) of aorta and second SMA were emptied of blood and randomly incubated, during 12 hours in a medium RPMI/M199 1:1 (blood free) supplemented with 10% of bovine fetal serum with (LPS+rhAPC group) or without (LPS group) rhAPC (drotecogin alpha activated, Xigris<sup>®</sup>, Lilly, Indianapolis, USA) (50 ng/ml) corresponding to human plasma therapeutic concentration ranges, and to the concentration used in our previous study [12].

## **Vascular reactivity**

### *Aortic rings:*

Vascular reactivity of aortic rings was studied on a wire myograph (Danish Myo Technology, Aarhus, Denmark) as previously described [17]. The experiments were performed at 37°C in a physiological salt solution (PSS) with the following composition in mM: NaCl 119; KCl 4.7; NaHCO<sub>3</sub> 14.9; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.2; CaCl<sub>2</sub> 2.5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.18; glucose 5.5, continuously bubbled with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>.

After an equilibration period (at least 20 min) under the optimal passive tension, two successive contractions in response to the combination of KCl depolarization (100 mM) and phenylephrine (PE) (10 μM) (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) were used in order to test the maximal contractile capacity of the vessels. After a 20 minutes washout period, concentration-response curves to PE were elicited by cumulative administration of this vasoconstrictor agonist (1nM to 100μM) in order to determine the same concentration producing the equal level of contraction in the different groups. To study the endothelium-dependent relaxation, aorta rings with functional endothelium were precontracted with PE (1μM) (control group:  $0.9 \pm 0.2$ , LPS group:  $0.7 \pm 0.1$ , LPS+rhAPC group:  $0.8 \pm 0.1$  mN/mm) and then exposed to incremental increased concentrations of acetylcholine (ACh) (1nM to 100 μM; Sigma, St Louis, MO, USA).

### *Isolated Small Mesenteric Arteries:*

We assessed flow-mediated dilation (FMD) in SMA ( $\approx$  200-230 μm diameter). Mesenteric arteries were cannulated at both ends in a video-monitored perfusion system (Living Systems Instrumentation, USA) as previously described [17]. Arteries were bathed in PSS (pH 7.4, PO<sub>2</sub> 160 mm Hg, PCO<sub>2</sub> 37 mmHg). Pressure was controlled by a servoperfusion system, and flow was generated by a peristaltic pump. The presence of a functional endothelium was assessed by applying ACh (10μM) in arteries pre-contracted with PE (10μM). To determine FMD at 75 mmHg of pressure, arteries were contracted with PE (50% reduction in diameter) and submitted stepwise

increases in intraluminal flow (0–100  $\mu\text{l}/\text{min}$ ). Diameter measurements were continuously collected for analysis (Biopac MP 100).

To investigate the mechanisms involved in the endothelial effect of rhAPC, regarding the role of NO and COXs-induced prostanoids, all of these vascular experiments were consecutively conducted in presence or absence of NO-synthase inhibitor, N<sup>G</sup>-L-nitroarginine-methyl-ester (L-NAME 100  $\mu\text{M}$ , Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Cyclooxygenases (COXs) inhibitor (indomethacin 10  $\mu\text{M}$ ; Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). The inhibitor was added in the bath 30 min prior to the addition of ACh. The first curve from ACh was thus taken as control and the effect of the inhibitor was tested on the second curve.

### **Western Blot Analysis:**

Proteins of lysates from aorta were subjected to SDS-PAGE using 9% gels. After electrophoresis, proteins were transferred to nitrocellulose membranes and were probed with the following antibodies: monoclonal murine anti-eNOS, monoclonal anti-eNOS phosphorylated (eNOS Ser<sup>1177</sup>), monoclonal anti Akt and anti-Akt phosphorylated (Akt Ser<sup>473</sup>) (BD Biosciences, San Jose, CA), polyclonal anti nuclear factor NF- $\kappa$ B p65 (Abcam, Cambridge, UK), monoclonal anti-I- $\kappa$ B  $\alpha$ -phosphorylated (US Biological, Swampscott, MA). The membranes were then washed at least three times in Tris-buffer solution containing 0.05% Tween and incubated for 1 h at room temperature with the appropriate horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (Amersham, Piscataway, NJ). The protein-antibody complexes were detected by ECL enhanced chemiluminescence's system (Amersham, Buckingham, UK) and quantified by densitometry according to the protocol of the manufacturer.

**Data analysis**

Data obtained during measurements of vascular reactivity were compared using a Two-way ANOVA for repeated measurements (Data were tested for homogeneity of variance by Levene's statistics) and non parametric Kruskal Wallis test was used for comparison of western blotting measurements between groups. When a significant difference was found between groups, subsequent post hoc tests were performed. All values are presented as mean  $\pm$  SEM for n experiments. n represents the number of animals.

All these tests were performed with the Statview (version 5.0 software (SAS Institute, Cary, NC).

P<0.05 was considered statistically significant.

## Results

### **rhAPC improves contractile capacity and endothelial dysfunction induced by LPS.**

LPS blunts KCl-PE stimulated contraction in aortic rings. rhAPC significantly restored the maximal contractile capacity of aortic rings from LPS mice ( $3.1 \pm 0.5$  vs  $1.5 \pm 0.3$  mN/mm) to control level ( $3.8 \pm 0.6$  mN/mm) ( $P < 0.01$ ) (Fig 1A). ACh produced a concentration-dependent relaxation of isolated aortic rings (Fig 1B). Compared to the control group, the vascular responses to ACh were significantly decreased in aorta from LPS-treated mice ( $60 \pm 7$  % vs  $27 \pm 3$  %) ( $P < 0.05$ ). rhAPC ameliorates the endothelial dysfunction induced by LPS ( $58 \pm 7$  % vs  $27 \pm 3$  %;  $P < 0.05$ ) (Fig 1B).

Stepwise increases in flow induced a progressive vasodilation in SMA. FMD was lower in SMA from LPS-treated mice than in the control group ( $13 \pm 4.1$  vs  $29 \pm 2$   $\mu$ m respectively for flow rate 100 $\mu$ L/min,  $P < 0.05$ ). Incubation of SMA with rhAPC significantly increased FMD ( $28 \pm 2.1$   $\mu$ m for flow rate 100 $\mu$ L/min). ( $P < 0.05$ ) (Fig 1C).

After a pretreatment with rhAPC, L-NAME abolished ACh-induced vasodilatation in the aorta ( $P < 0.05$ ) and FMD in SMA ( $P < 0.01$ ), whereas indomethacin affected by half this response (fig 2A, 2B) and the combination of L-NAME plus indomethacin did not change FMD in SMA (Fig 2B).

### **rhAPC restored endothelial NO-synthase activation and reduced LPS-induced upregulation of NF- $\kappa$ B.**

To investigate the mechanisms involved in the beneficial effect of rhAPC- on endothelial-dependent dilation, the role of eNOS, NO- Akt / PI<sub>3</sub>K pathway was assessed. The decrease in activity of this pathway could be accounted for by altered eNOS phosphorylation. In the aorta, endotoxemia lowered eNOS, P-eNOS (eNOS Ser<sup>1177</sup> phosphorylation) expression levels and P-eNOS/eNOS ratio, consistent with a lower enzyme activity ( $P < 0.05$ ) (Fig 3A & 3D). Akt, P-Akt (Akt ser<sup>473</sup> phosphorylation) expression levels and P-Akt/Akt ratio also decreased in the aorta of endotoxemic mice (Fig 3B & E). The aorta exposed to rhAPC exhibited an enhanced activation of Akt which can P-eNOS (Fig3 B, E). The difference in the ratio was 2 fold higher in rhAPC-treated aortas in P-



eNOS/eNOS and 2.5 fold higher in P-Akt/Akt ratio (not shown).

The NF- $\kappa$ B heterodimer is co-localized in the cytoplasm with the inhibitory protein I $\kappa$ B. Upon cell stimulation, I $\kappa$ B is phosphorylated, removed and degraded, allowing NF- $\kappa$ B to induce transcription.

Western blotting of the p65 subunit of NF- $\kappa$ B and phosphorylated- I $\kappa$ B were used as an index of activation of NF- $\kappa$ B (Fig 3D & E). No significant expression could be found in aortas from the control group. LPS induced marked blotting of the p65/RelA subunit of NF- $\kappa$ B and phosphorylated-I $\kappa$ B in the aorta. This blotting was almost decreased in aortic rhAPC-treated rings (Fig 3F).

## Discussion

The present study suggests a non anticoagulant protective role of rhAPC on endothelial dysfunction during LPS-induced shock and a potential action on arterial contractility. This effect was associated with an increase in eNOS *in situ* activation and a reduced activation of the transcriptional factor NF- $\kappa$ B.

Prompt restoration of organ perfusion is an early goal in the treatment of patients with septic shock. rhAPC has been associated with a faster reduction of cardiovascular failure [4]. This effect was thought to be related to its anticoagulant and anti-inflammatory effects in severe sepsis and then associated with multiple cytoprotective effects including: a) downregulation of pro-inflammatory gene expression [18,19]; b) anti-apoptotic activity [20]; c) antioxidant properties [21] and d) protection of the endothelial barrier function [22,23], mediated by EPCR and the effector's receptor PAR-1 [24].

Recent animal [12,25,26] and human [27] studies have suggested that rhAPC may improve hemodynamics and vascular reactivity to catecholamine during septic states. However, much of our current knowledge concerning rhAPC vascular activity is still debated, especially with respect to its non-anticoagulant properties. For this reason we designed an *ex-vivo*, blood free model application of rhAPC, on isolated vessels from endotoxemic mice.

A major finding of our study was that rhAPC improved vascular dysfunction with a beneficial effect on endothelial dysfunction and arterial contractility. To our knowledge, this is the first *ex-vivo* study reporting new vascular insight on the beneficial non-anticoagulant effect of rhAPC on endothelial dysfunction induced by LPS, which involves some of the following related cellular mechanism. As previously reported, this property of rhAPC probably contributes to limit the process of refractory vasoplegia in patients with septic shock [28] and in endotoxic rats (12).

Our results are supported by Wiel *et al* [28], who have reported that the contractile response to PE was improved, by rhAPC administered *in vivo* in a rabbit model of endotoxin-induced shock, and that this effect was maximal in presence of a functional endothelium. Indeed, EPCR and PAR-1 are

expressed in arterial endothelial cells. However, recently, Bretschneider *et al* [29] have reported *in vitro*, that vascular smooth muscle cells also express EPCR and suggest that this receptor-bound APC might modulate PAR-1 mediated responses of SMC via a raise of intracellular calcium.

One of the major endothelial relaxant factors is NO produced by endothelial NO-synthase (eNOS) allowing the endothelium to regulate smooth muscle tone and proliferation, leukocyte recruitment, and platelet aggregation [30]. The expression of eNOS is increased several fold by multiple factors including shear stress, vascular endothelial growth factor, ACh and estrogens. Phosphorylated eNOS via the Akt / PI<sub>3</sub>K pathway is known to regulate enzyme activity [31].

It is well documented in both resistance and conductance arteries that LPS impairs endothelium-dependant relaxation to ACh or flow leading to endothelial dysfunction. Endothelial dysfunction has been associated with number of pathophysiological processes. Among these processes, inflammation and oxidative stress seem to be common pathways underlying cells disturbances. However, depending on the pathology, the vascular bed studied, the mechanisms underlying the endothelial dysfunction can be markedly different. A reduced bioavailability of endothelial NO, an alteration in the production of prostanoids, an impairment of endothelium-dependent hyperpolarization can individually or in association lead to endothelial dysfunction [5,32]. Furthermore, a previous study reported that sepsis causes a progressive and profound reduction in phosphorylation of eNOS in rabbit mesenteric arteries [33]. Alteration in endothelial cell surface receptors and modified signal transduction pathways such as receptor-eNOS uncoupling resulted in a loss of the protective role of NO. Our results support this hypothesis since LPS decreased *in situ* P-eNOS and P-Akt expression in vascular wall.

Therefore, one could advance that LPS-induced endothelial dysfunction is due to decreased eNOS activity, which is most likely supported by decrease in Akt phosphorylation. Interestingly rhAPC overcomes the deleterious endothelial effect of LPS. Indeed, the beneficial effect of rhAPC on both ACh-induced relaxation in the aorta and FMD in SMA might be explained *via* eNOS activation and COXs vasorelaxant metabolites.

In our model, inhibition of COXs pathway was implicated in rhAPC effect confirming the data of Brueckmann *et al* [34], who demonstrated that rhAPC up regulates endothelial COX-2-mRNA expression and synthesis of COX-2 enzyme in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) with subsequent release of vasodilator prostacyclin (PGI<sub>2</sub>). We report that rhAPC reduces NF- $\kappa$ B activation in the aorta, which in turn may decrease such as endothelial dysfunction and vascular hypocontractility induced by LPS. Indeed, the mechanism whereby LPS induces endothelial dysfunction is linked to its ability to activate the NF- $\kappa$ B/Rel transcription family. NF- $\kappa$ B dependent gene expression may be upregulated in pathological situation and impair vascular cell function [35]. Conversely, inhibition of NF- $\kappa$ B activation improves cardiovascular functional abnormalities reported in septic shock [36]. *In vitro* studies have shown that incubation of cultured endothelial cells with APC leads to a number of potentially anti-inflammatory cellular changes, including down regulation of the expression of adhesion molecules, improvement of barrier function in cell monolayers, and decreased susceptibility to apoptosis [24].

## **Conclusion**

The use of rhAPC has been shown to play a key role in endotoxemia-induced vascular dysfunction. We report that rhAPC is associated with improved endothelial cell function by increasing eNOS activation with anti-inflammatory but not anti-coagulant properties.

## **Acknowledgements**

We thank Mr J Roux and P Legras for animals care.

## Figure legends

### Fig. 1: rhAPC improves arterial contractility and dilation to ACh and FMD.

A. Both KCl- and PE-induced contraction in aorta (A, n=8 per group). Concentration-response curves to ACh in aortic rings (B, n=8 per group) and flow-mediated dilation in mesenteric resistance arteries (C, n=8 per group). Blood vessels were harvested from control mice (●) or endotoxic mice incubated with (▲) or without rhAPC (○). \*P<0.05, rhAPC *versus* LPS group.

### Fig. 2: Evaluation of ACh relaxation in aortas (A) and FMD in mesenteric arteries (B) treated with rhAPC with and without inhibitors.

Effect of the inhibition of NO synthesis with L-NAME (100μM) (■) and indomethacin (10μM) (◆) in aorta (A, n=8 per group) and SMA (B, n=6 per group) and both inhibitors in SMA (◇) (B, n=6 per group). \*P<0.05 \*\*P<0.01, LPS+rhAPC (▲) *versus* LPS+rhAPC with inhibitor.

### Fig. 3: Evaluation of arterial wall enzyme expressed and activated.

Western blot analysis of eNOS (A), Akt (B), NF-κB (C) P-eNOS, (D), P-Akt (E), and P-IκB (F) in aortic rings isolated from control mice or endotoxic mice incubated or not with rhAPC. Values are expressed as mean ± SEM (n=6 per group). \*P<0.05, compared to no treated aortas from LPS group.

## References

1. Landry DW, Oliver JA: The pathogenesis of vasodilatory shock. *N Engl J Med* 2001, 345:588-595
2. Russell JA: Management of sepsis, *N Engl J Med*. 2006; 355:1699-1713
3. Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth*. 2004; 93(1):105-13.
4. Mosnier LO, Zlokovic BV, Griffin JH. The cytoprotective protein C pathway. *Blood*. 2007; 109(8):3161-72.
5. Clapp BR, Hingorani AD, Kharbanda RK, Mohamed-Ali V, Stephens JW, Vallance P, MacAllister RJ. Inflammation-induced endothelial dysfunction involves reduced nitric oxide bioavailability and increased oxidant stress, *Cardiovasc Res*. 2004; 64:172-178
6. Peters K, Unger RE, Brunner J, Kirkpatrick CJ. Molecular basis of endothelial dysfunction in sepsis. *Cardiovasc Res*. 2003; 60:49-57
7. Orfanos SE, Mavrommati I, Korovesi I, Roussos C: Pulmonary endothelium in acute lung injury: from basic science to the critically ill. *Intensive Care Med*. 2004; 30:1702-1714
8. Stoclet JC, Muller B, Andriantsitohaina R, Kleschyov A. Overproduction of nitric oxide in pathophysiology of blood vessels. *Biochemistry (Mosc)*. 1998; 63:826-832
9. O'Brien, A.J. Wilson, R. Sibbald, M. Singer & L.H. Clapp; Temporal variation in endotoxin-induced vascular hyporeactivity in a rat mesenteric artery organ culture model. *British Journal of Pharmacology*. 2001; 133, 351 - 360
10. Stoclet JC, Martinez MC, Ohlmann P, Chasserot S, Schott C, Kleschyov AL, Schneider F, Andriantsitohaina R. Induction of nitric oxide synthase and dual effects of nitric oxide and cyclooxygenase products in regulation of arterial contraction in human septic shock. *Circulation*. 1999; 100:107-112
11. O'Brien LA, Gupta A, Grinnell BW. Activated protein C and sepsis. *Front Biosci*. 2006;11: 676-98
12. Sennoun N; Meziani F; Dessebe O; Cattani V; Collin S, Montemont Cl, Gibot S; Asfar P; Andriantsitohaina R; Regnault V; Slama M; Lecompte T; Lacolley P; Levy B. Activated protein C improves LPS-induced cardiovascular dysfunction by decreasing tissular inflammation and oxidative stress. *Crit Care Med*. 2008; *In press*.
13. Gupta A, Berg DT, Gerlitz B, Richardson MA, Galbreath E, Syed S, Sharma AC, Lowry SF, Grinnell BW. Activated protein C suppresses adrenomedullin and ameliorates lipopolysaccharide-induced hypotension. *Shock*. 2007; 28(4):468-76.
14. Kerschen EJ, Fernandez JA, Cooley BC, et al. Endotoxemia and sepsis mortality reduction by non-anticoagulant activated protein C. *J Exp Med*. 2007; 204(10):2439-2448.
15. Joyce, David E; Nelson, David R; Grinnell, Brian W: Leukocyte and endothelial cell interactions in sepsis: Relevance of the protein C pathway. *Crit care med*. 2004; 32(5): S280-86
16. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res*. 2007; 100(2):174-90.
17. Meziani F, Kremer H, Tesse A, Baron-Menguy C, Mathien C, Mostefai HA, Carusio N, Schneider F, Asfar P, Andriantsitohaina R.. Human serum albumin improves arterial dysfunction during early resuscitation in mouse endotoxic model via reduced oxidative and nitrosative stresses. *Am. J. Pathol*. 2007; 171(6):1753-61.

18. Joyce DE, Gelbert L, Ciaccia A, et al. Gene expression profile of antithrombotic protein c defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. *J Biol Chem.* 2001; 276(14):11199-11203.
19. White B, Schmidt M, Murphy C, et al. Activated protein C inhibits lipopolysaccharide-induced nuclear translocation of nuclear factor kappaB (NF-kappaB) and tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) production in the THP-1 monocytic cell line. *Br J Haematol.* 2000; 110(1):130-134.
20. Billbault P, Lavaux T, Launoy A, et al. Influence of drotrecogin alpha (activated) infusion on the variation of Bax/Bcl-2 and Bax/Bcl-xl ratios in circulating mononuclear cells: A cohort study in septic shock patients. *Crit Care Med.* 2007; 35(1):69-75.
21. Yamaji K, Wang Y, Liu Y, et al. Activated protein C, a natural anticoagulant protein has antioxidant properties and inhibits lipid peroxidation and advanced glycation end products formation. *Thromb Res* 2005; 115(4):319-325.
22. Looney MR, Matthay MA. Bench-to-bedside review: The role of activated protein C in maintaining endothelial tight junction function and its relationship to organ injury. *Crit Care.* 2006; 10(6):239.
23. Regnault V, Levy B. Recombinant activated protein C in sepsis: endothelium protection or endothelium therapy? *Crit Care.* 2007; 11(1):103.
24. Esmon CT. The endothelial protein C receptor. *Curr Opin Hematol.* 2006; 13(5):382-385.
25. Favory R, Lancel S, Maréchal X, Tissier S, Neviere R. Cardiovascular protective role for activated protein C during endotoxemia in rats. *Intensive Care Med.* 2006; 32(6):899-905.
26. Wang Z, Su F, Rogiers P, Vincent JL. Beneficial effects of recombinant human activated protein C in a ewe model of septic shock. *Crit Care Med.* 2007; 35(11):2594-600.
27. Monnet X, Lamia B, Anguel N, et al. Rapid and beneficial hemodynamic effects of activated protein C in septic shock patients. *Intensive Care Med.* 2005; 31(11):1573-1576.
28. Wiel E, Costecalde ME, Lebuffe G, Corseaux D, Jude B, Bordet R, Tavernier B, Vallet B. Activated protein C increases sensitivity to vasoconstriction in rabbit *Escherichia coli* endotoxin-induced shock. *Crit Care.* 2006; 10(2):R47.
29. Bretschneider E, Uzonyi B, Weber AA, Fischer JW, Pape R, Lötzer K, Schrör K. Human vascular smooth muscle cells express functionally active endothelial cell protein C receptor. *Circ Res.* 2007; 100(2):255-62.
30. Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest.* 1991; 21(4):361-74.
31. Dudzinski DM, Michel T. Life history of eNOS: partners and pathways. *Cardiovasc Res.* 2007; 75(2):247-60.
32. Chauhan SD, Seggara G, Vo PA, Macallister RJ, Hobbs AJ, Ahluwalia. A Protection against lipopolysaccharide-induced endothelial dysfunction in resistance and conduit vasculature of iNOS knockout mice. *FASEB J.* 2003; 17(6):773-5.
33. Matsuda N, Hayashi Y, Takahashi Y, Hattori Y Phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase is diminished in mesenteric arteries from septic rabbits depending on the altered phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway: reversal effect of fluvastatin therapy. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006; 319(3):1348-54.

34. Brueckmann M, Horn S, Lang S, Fukudome K, Schulze Nahrup A, Hoffmann U, Kaden JJ, Borggreffe M, Haase KK, Huhle G. Recombinant human activated protein C upregulates cyclooxygenase-2 expression in endothelial cells via binding to endothelial cell protein C receptor and activation of protease-activated receptor-1. *Thromb Haemost.* 2005; 93(4):743-50.
35. De Martin R, Hoeth M, Hofer-Warbinek R, Schmid JA. The transcription factor NF-kappa B and the regulation of vascular cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20(11):E83-8.
36. Abraham E. Nuclear factor-kappaB and its role in sepsis-associated organ failure. *J Infect Dis.* 2003; 187 Suppl 2:S364-9.



Figure 1

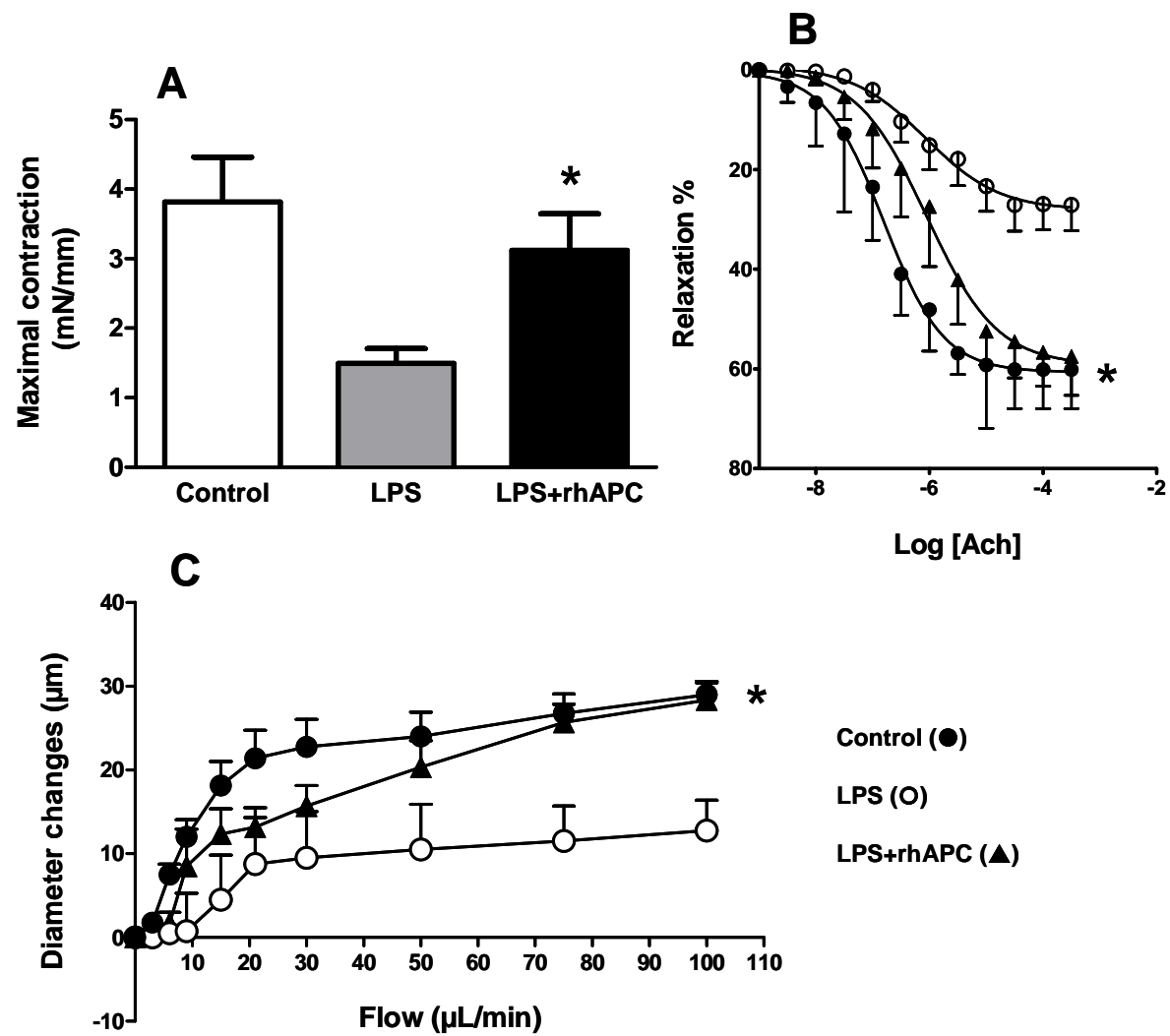


Figure 2

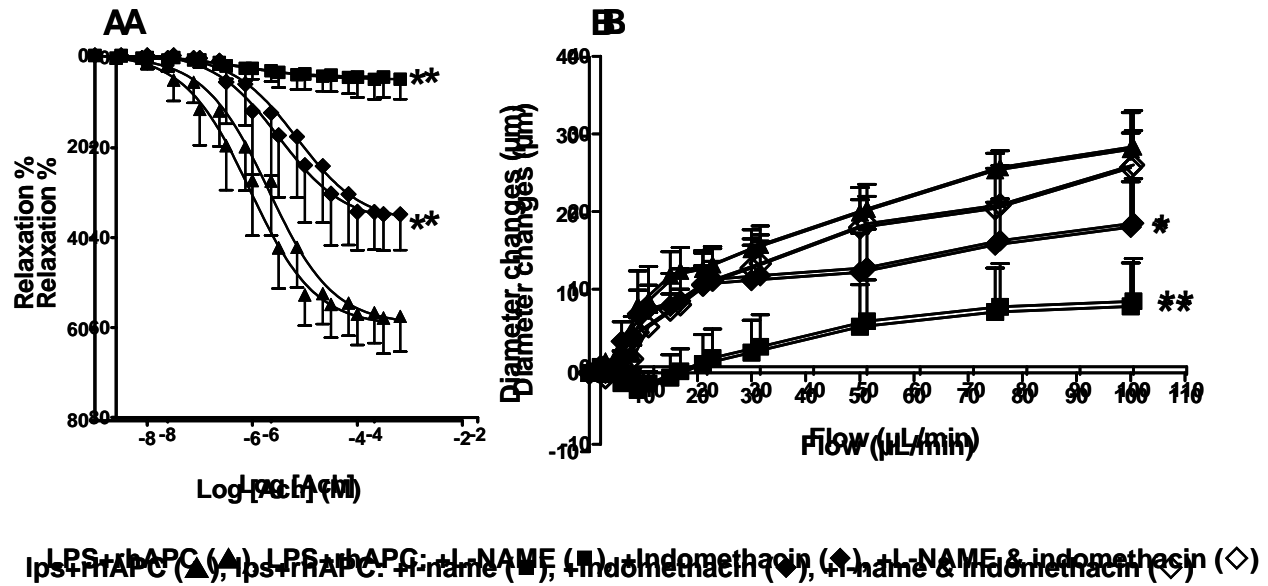
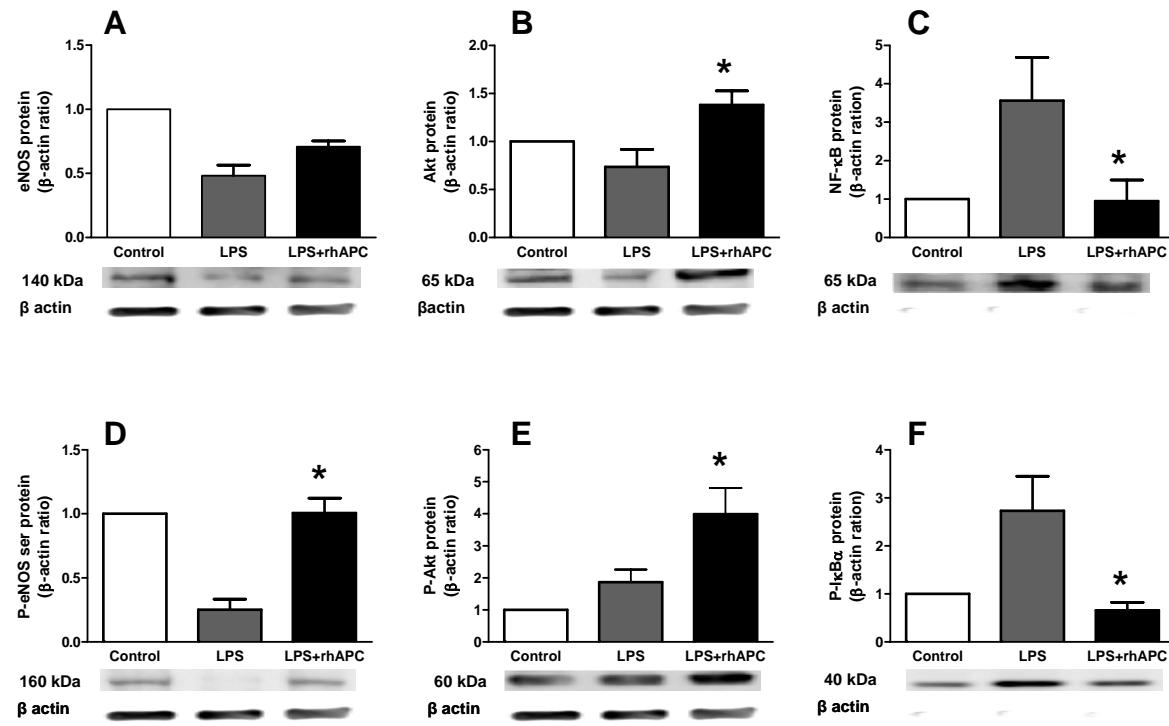


Figure 3



## Commentary

# Cardiovascular and metabolic responses to catecholamine and sepsis prognosis: a ubiquitous phenomenon?

Solène Collin, Nacira Sennoun and Bruno Levy

Equipe Avenir Inserm, Shock Research Group (Groupe Choc), Nancy Université, Faculté de Médecine, 54500 Vandoeuvre les Nancy, France

Corresponding author: Bruno Levy, [b.levy@chu-nancy.fr](mailto:b.levy@chu-nancy.fr)

Published: 17 March 2008

This article is online at <http://ccforum.com/content/12/2/118>

© 2008 BioMed Central Ltd

*Critical Care* 2008, **12**:118 (doi:10.1186/cc6816)

See related research by Kumar *et al.*, <http://ccforum.com/content/12/2/R35>

## Abstract

Many parameters have been associated with sepsis prognosis. In the present issue of *Critical Care*, Kumar and colleagues demonstrate that a preserved cardiac answer to dobutamine evaluated by radionucleotide measurements was associated with a better prognosis during septic shock. In this context, it is interesting to note that not only is the cardiac response to catecholamine stimulation associated with prognosis, but also the vascular and metabolic responses are associated. The ability of exogenous catecholamine to increase the arterial pressure (dopamine test) or to increase the lactate level is also related to prognosis. According to the ubiquitous character of catecholamine sensitivity, therefore, we should think in terms of cellular ability to respond to catecholamines in defining the concept of physiological reserve.

In the present issue of *Critical Care*, Kumar and colleagues [1] elegantly demonstrate using graded dobutamine challenge in septic shock patients combined with radionucleotide measurement of cardiac function that only the survivors were able to maintain cardiac responsiveness to dobutamine stimulation. In fact, the prognosis value of a positive response to dobutamine challenge has been already demonstrated in several studies, in which the answer to dobutamine was evaluated using different indices: the oxygen delivery/oxygen consumption relationship in Vallet and colleagues' study [2], or an increase in the cardiac index in the studies of Rhodes and colleagues [3] and of Jellema and colleagues [4].

It is interesting to note that not only is the cardiac response to catecholamine stimulation associated with the prognosis, but also the vascular and metabolic responses are associated. For example, it is well demonstrated that hemodynamic severity of septic shock is linked to the acuteness of vasoplegia. In animal models and human studies, vasoplegia is clearly related to hyporeactivity to exogenous and endogenous vasopressors (norepinephrine and vasopressin, for instance) [5]. Experimental and clinical data have demonstrated that, between the many factors involved, an

overproduction of nitric oxide and peroxynitrite leading to the stimulation of vascular potassium channels is responsible for vascular hyporeactivity [6].

Despite this complicated pathophysiological network, it is possible to simply assess vascular reactivity and thus the septic shock prognosis using a dopamine test. We have previously demonstrated that dopamine-sensitive patients – for example, patients who were able to increase their mean arterial pressure with a maximal dose of 20 µg/kg/min dopamine – had a better prognosis (survival 78%) when compared with dopamine-resistant patients (survival 16%) [7].

At the least, the metabolic response can be evaluated by the ability to produce lactate. During septic shock, lactate production may be related not only to a hypoxic mechanism but also to an increased metabolic demand. Experimental data have demonstrated that lactate production in the muscle is linked to epinephrine stimulation of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase pump. In human septic shock, we also demonstrated that muscle was a net producer of lactate, and that this production could be totally inhibited by ouabain, thus confirming a Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase-dependent mechanism while clearly independent of tissue hypoxia [8]. Muscle tissue, which represents approximately 40% of the total body cell mass, is particularly implicated in this mechanism, notwithstanding that >99% of muscle adrenergic receptors are β<sub>2</sub> receptors.

We recently demonstrated in low-flow (hemorrhagic) and normal-to-high-flow models of shock (endotoxin and peritonitis) that lactate production during shock states is related, at least in part, to increased Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity under β<sub>2</sub> stimulation [9]. Levraut and colleagues, using an infusion of exogenous lactate to estimate lactate production and clearance, found in stable normolactatemic septic shock patients that survivors produced more lactate than

nonsurvivors [10]. Similarly, the survivors were also better able to clear this overproduction of lactate.

The response to catecholamine can therefore be studied at the heart level using  $\beta_1$  stimulation, at the vessel level using  $\alpha$  stimulation, and at the metabolic level using  $\beta_2$  stimulation. It remains unknown, however, whether this disturbed answer to catecholamine response is due to a signaling problem at the receptor or postreceptor levels or due to the tissue's inability to produce the physiological answer, or both.

To conclude, according to the ubiquitous character of catecholamine sensitivity, we should think in terms of cellular ability to respond to catecholamines in defining the concept of physiological reserve rather than in terms of preload or cardiac reserve.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### References

1. Kumar A, Schupp E, Bubbel E, Ali A, Milcarek B, Parillo JE: **Cardiovascular response to dobutamine predicts outcome in severe sepsis and septic shock.** *Crit Care* 2008, **12**:R35.
2. Vallet B, Chopin C, Curtis SE, Dupuis BA, Fourrier F, Mehdaoui H, LeRoy B, Rime A, Santre C, Herbecq P, *et al.*: **Prognostic value of the dobutamine test in patients with sepsis syndrome and normal lactate values: a prospective, multicenter study.** *Crit Care Med* 1993, **21**:1868-1875.
3. Rhodes A, Lamb FJ, Malagon I, Newman PJ, Grounds RM, Bennett ED: **A prospective study of the use of a dobutamine stress test to identify outcome in patients with sepsis, severe sepsis, or septic shock.** *Crit Care Med* 1999, **27**:2361-2366.
4. Jellema WT, Groeneveld AB, Wesseling KH, Thijs LG, Westerhof N, van Lieshout JJ: **Heterogeneity and prediction of hemodynamic responses to dobutamine in patients with septic shock.** *Crit Care Med* 2006, **34**:2392-2398.
5. Landry DW, Oliver JA: **The pathogenesis of vasodilatory shock.** *N Engl J Med* 2001, **345**:588-595.
6. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L: **Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease.** *Physiol Rev* 2007, **87**:315-424.
7. Levy B, Dusang B, Annane D, Gibot S, Bollaert PE: **Cardiovascular response to dopamine and early prediction of outcome in septic shock: a prospective multiple-center study.** *Crit Care Med* 2005, **33**:2172-2177.
8. Levy B, Gibot S, Franck P, Cravoisy A, Bollaert PE: **Relation between muscle Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase activity and raised lactate concentrations in septic shock: a prospective study.** *Lancet* 2005, **365**:871-875.
9. Levy B, Desebbe O, Montemont C, Gibot S: **Increased aerobic glycolysis through beta-2 stimulation is a common mechanism involved in lactate formation during shock states.** *Shock* 2008 [Epub ahead of print].
10. Levraut J, Ichai C, Petit I, Ciebiera JP, Perus O, Grimaud D: **Low exogenous lactate clearance as an early predictor of mortality in normolactatemic critically ill septic patients.** *Crit Care Med* 2003, **31**:705-710.

## **Hemodynamic effects of activated protein C in septic shock**

**Authors : Sennoun N, Desebbe O, Levy B**

**From : Groupe choc. Projet AVENIR 2006. Coordination Circulation UHP-INSERM. Faculté de Médecine. 54500. Vandoeuvre les Nancy France**

**Correspondance to**

**Professor B Levy, Service de Réanimation Médicale, Hôpital de Brabois .**

**54500. Vandoeuvre les Nancy France**

**E-mail : [b.levy@chu-nancy.fr](mailto:b.levy@chu-nancy.fr)**

**Fax : 0033383153204**

## **Hemodynamic effects of activated protein C in septic shock**

Recombinant human activated protein C (rhAPC) has been demonstrated to reduce the mortality rate of adult patients with severe sepsis (1). This effect is thought to be related to a reduction in coagulation and, to a lesser extent, to a reduction in inflammatory response to sepsis. Data from the PROWESS study demonstrated that the use of rhAPC was associated with a quicker reduction in cardiovascular failure.

The present chapter addresses whether rhAPC has specific cardiovascular properties leading to hemodynamic improvement. The putative mechanisms involved in this action are also discussed.

### **1. Human data**

#### **1.1 Septic shock patients**

In a retrospective study of septic shock in humans, Monnet et al (2) compared 22 patients treated with rhAPC with 22 non-treated patients matched for age, SAPS II, MAP and norepinephrine doses at  $H_0$ . Blood lactate level, number of organ failures, number of patients treated with corticosteroids and renal replacement were also similar between the two groups. Therapeutic strategy involved maintaining MAP at 75 mmHg by decreasing or increasing catecholamine levels. MAP remained stable and was similar in the two groups ( $86 \pm 16$  vs.  $89 \pm 9$  mmHg at  $H_{24}$ ). From  $H_0$  to  $H_{24}$ , the required dose of norepinephrine increased in the control group (+38%, from -41 to +38%) but decreased in the treated group (-33%, from -74 to +11%;  $p < 0.05$ ) (Figure 1). There was no difference in dobutamine dose or in the amount of fluid administered during the 24-h follow-up in both groups. Lactate levels tended to decrease

in rhAPC patients while it tended to increase in the control group, although the difference in time course between both groups did not reach statistical significance.

## 1.2 Endotoxemia in healthy volunteers

The effects of APC were also studied by Kalil et al (3) in a classical model of endotoxemia. All subjects received a bolus of 2 ng/kg LPS 2 h after initiation of rhAPC or placebo. Physiological measurements were performed 5 min prior to endotoxin (ET) infusion and halted 6 hours after onset of ET. At a single time point (3 h after LPS administration), mean arterial blood pressure was significantly higher in volunteers receiving rhAPC compared to those receiving placebo (rhAPC 75 mm Hg vs. placebo 65 mm Hg,  $p \leq 0.04$ ). However, no differences in hemodynamics were observed at other time points. There were no effects of rhAPC on markers of thrombin generation ( $F_{1+2}$ , TATc), D-dimer levels or circulating concentrations of PAI-1. There were also no differences in TNF- $\alpha$  or IL-6 levels between the rhAPC and placebo groups.

Derhaschnig et al (4), in a similar model, did not find any differences in MAP evolution. Likewise, rhAPC had no significant effects on LPS-induced changes in hemodynamics, including hypotension or tachycardia, circulating cytokine levels, markers of platelet and endothelial cell activation, or leukocyte counts.

Hence, there is no definite proven effect of APC on hemodynamics from the above human endotoxemia studies

## 2. Animal data

### 2.1 APC properties on vascular reactivity are linked to NOS and TNF-alpha



In rats (5), endotoxin-induced hypotension as well as increases in plasma levels of NO<sub>2</sub>-/NO<sub>3</sub>- were significantly prevented by intravenous administration of APC (100 µg/kg, IV). This hypotension was also inhibited when APC was administered 30 min after endotoxin administration. APC inhibited the increase in lung iNOS activity levels by inhibiting expression of iNOS mRNA in endotoxin-treated animals. In order to distinguish the effects of APC due to the direct antithrombin properties of APC versus anti-inflammatory effects, the authors also investigated the effects of a direct inhibitor of thrombin generation and demonstrated that this inhibitor had no effect on MAP. In a further series of experiments designed to demonstrate the link between APC efficiency and TNF production, the effects of an anti TNF agent, of leucopenia and of the selective inhibition of NOS by aminoguanidine were equally assessed, all resulting in the same observed effects on MAP as that noted with APC. Furthermore, APC inhibited the increase in lung iNOS and TNF-alpha activity levels by inhibiting iNOS mRNA expression. Thus, APC is able to reduce ET-induced hypotension in rats by inhibiting TNF-alpha production. Furthermore, the above study suggests that APC inhibits the endotoxin-induced increase in NOS activity and TNF-alpha levels by inhibiting their transcription in vivo.

## 2.2 High doses of APC improve both vascular and cardiac function in endotoxic shock

Using elevated doses of murine APC (240 µg/kg/h), Favory et al (6) recently tested whether APC treatment improves cardiovascular function in rats infused with *Escherichia coli* endotoxin. More specifically, they tested the hypothesis that APC (a) prevents arterial hypotension, microvascular perfusion deficit, and depressed ventricular systolic performance and (b) attenuates inflammatory response in terms of leukocyte activation and plasma TNF- $\alpha$ , macrophage migration inhibitory factor (MIF), and nitrite/nitrate levels. Using a non-sedated

continuously infused model of endotoxemia, the study revealed that endotoxin was associated with a drop in arterial pressure that was attenuated by APC. Of further interest, the authors also investigated the effects of APC on myocardial performance evaluated on a modified Langendorff isolated heart preparation. LPS induced a reduction in LV systolic performance in the absence of changes in coronary perfusion pressure. Reduction in LV systolic performance was also prevented in APC-treated LPS rats. To explain their results, Favory et al. demonstrated that APC was associated with a decrease in nitrate/nitrite, TNF-alpha and MIF. Moreover, the endotoxin-induced increase in cardiac MPO activity, an index of leukocyte tissue sequestration, was prevented by APC treatment. Lastly, using intravital microscopy, APC was found to be associated with improved microvascular perfusion and reduced leukocyte rolling and adhesion.

### 2.3 Low doses of APC also improve both vascular and cardiac function in endotoxic shock

Based on these previous results, we elected to investigate the effects of rhAPC on global and regional hemodynamics as well as on tissue perfusion (7). Using a classical model of ventilated sedated rats, endotoxemia was induced by administration of 10 mg/kg of *E. Coli* LPS. Monitoring included continuous measurement of MAP, abdominal and mesenteric aortic blood flow, muscle laser Doppler and muscle PO<sub>2</sub>, and muscle lactate by microdialysis. Vascular reactivity was assessed by dose-effect curves using incremental doses of norepinephrine. Cardiac function was assessed by measuring the evolution of cardiac output under incremental doses of norepinephrine. Measurements also included blood lactate, nitrite and nitrate, and TNF levels. Rats were continuously resuscitated with 18 ml/Kg/h saline leading to a hypokinetic model. Two groups were investigated; one group being treated by continuous infusion of 33 µg/kg/h rhAPC and the other with saline.

Endotoxin was associated with a marked and sustained decrease in MAP. Continuous infusion of APC was associated with a significantly improvement in MAP. More surprisingly, associated with the increase in MAP was a better maintenance of cardiac output in the continuously infused rhAPC group. This effect appeared to be delayed comparatively to the effects on MAP. No differences were observed in mesenteric blood flow evolution. However, associated with this improvement in macrocirculation were signs of better tissue perfusion following rhAPC treatment as assessed by 1) greater muscle blood flow estimated by laser Doppler, 2) greater muscle PO<sub>2</sub> and finally 3) a decrease in blood lactate in the APC group. We further hypothesized that the effects of rhAPC on MAP were likely due to an improvement in catecholamine vasoreactivity. Using dose response curves with a pure alpha agonist, rhAPC was indeed found to be associated with an improvement in vasoreactivity. Cardiac effects of rhAPC were confirmed using dose-response curves with epinephrine but not with phenylephrine. In the experimental groups, the decrease in CO due to the increase in myocardial afterload was attenuated by rhAPC suggesting that APC improves the response to beta 1 stimulation as also suggested by a higher heart rate

#### 2.4 Limitations of animal studies

Clearly, endotoxin is not representative of human sepsis. Endotoxin, when compared to human septic shock, leads to an hyperinflammatory state as assessed by the very elevated levels of TNF. More important is the timing of intervention. In all models used, APC was given either simultaneously or immediately following septic challenge. As recently highlighted, it is also important to discuss the species specificity of APC nonanticoagulant activities. For example, in both the Isobe (5) and Favory (6) studies, the dosages used were far more elevated than the 24µg/kg/h used in humans.

### 3. Mechanisms behind APC-improved hemodynamics.

#### 3.1 The anti-inflammatory effects of APC

Clearly and at least in experimental models, APC decreases NOS activity and TNF production. Nevertheless, in the PROWESS trial (1), the investigators were unable to demonstrate a significant effect on any of the five cytokines examined: TNF, IL-1, IL-6, IL-8, and IL-10. In nearly all of the nonclinical studies, APC concentrations were higher than in the PROWESS trial.

In the two placebo-controlled blinded studies (3-4) conducted with rhAPC in human endotoxemia, activated drotrecogin alfa did not significantly decrease the levels of multiple cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, and IL-10) nor that of leukocyte cell-surface adhesion molecules when compared with the placebo group.. In addition, in a placebo-controlled human pulmonary endotoxin model, activated drotrecogin alfa was administered intravenously at 24  $\mu$ g/kg per hour for 16 hours, starting 2 hours prior to the endotoxin challenge (8,9). rhAPC treatment did not have any significant effect on inflammatory cytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, and monocyte chemoattractant protein-1 levels in the bronchoalveolar lavage fluid compared to the placebo group.

#### 3.2 The effect of APC on leukocyte–endothelial cell interactions

##### 3.2.1 Cellular effects

Recent studies suggest that the anti-inflammatory properties of the protein C pathway may not involve the lowering of inflammatory cytokine levels, but rather involve a lowering of the

leukocyte chemotactic response and a modulation of the interaction of leukocytes with the activated endothelium. Intriguingly, the effect of APC on leukocytes appears to be limited to chemotaxis since other leukocytic functions, such as phagocytic and oxidative burst remain unaffected (10-13).

### 3.2.2 Animal studies

Using intravital microscopy of the dorsal (14) skin fold of a hamster endotoxemia model, Hoffmann et al demonstrated that intravenous administration of rhAPC at 24 µg/kg per hour significantly reduced endotoxin-induced leukocyte rolling and adhesion in both arterioles and venules .

More recently, Favory et al (6), also using intravital microscopy on the distal ileum, demonstrated that APC partially prevented microvascular perfusion deficit in LPS rats, Likewise, mean red blood cell velocity and wall shear rates, which were lower in LPS rats than in controls, were partially restored in the APC-treated LPS group. Leukocyte rolling and adhesion on the mesenteric venule endothelial surface were increased after LPS injection whereas APC treatment reduced leukocyte rolling and adhesion in LPS rats. The authors also observed a decrease in heart leukocyte infiltration.

Thus, the improvement in cardiovascular failure observed in endotoxemic rats may perhaps be related to the properties of APC on leukocyte behaviour (15,16).

## 4. Conclusion

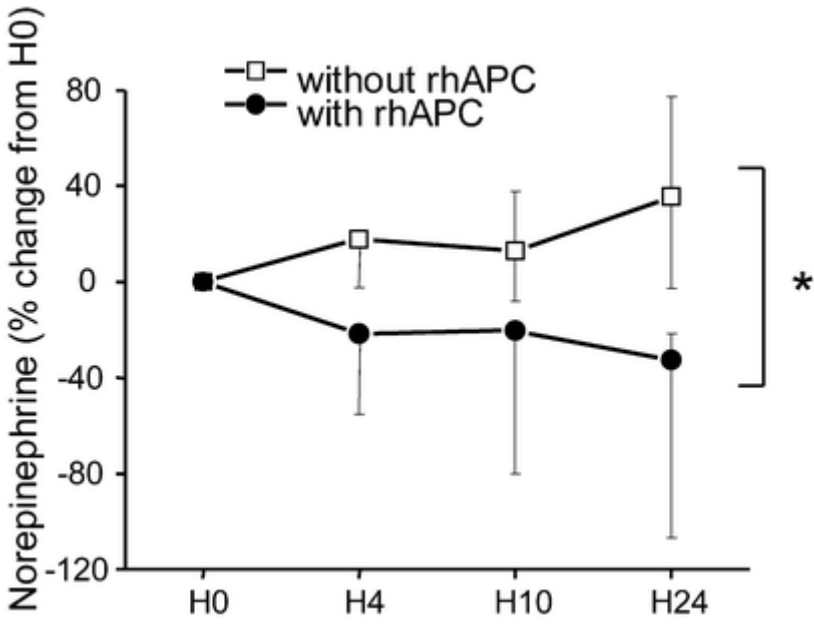
Clearly, animal data strongly suggest that rhAPC improves cardiovascular failure in animals models of sepsis. It is not clear whether this effect is of significant importance in the observed

improvement in patient mortality in the PROWESS study. The mechanisms involved are likely multifactorial. The improvement in vascular reactivity to catecholamine should and could be easily be evaluated in clinical practice using doses-responses curves.

## REFERENCES

1. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, et al.: Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001;344:699-709.
2. 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.
3. Kalil AC, Coyle SM, Um JY, et al.: Effects of drotrecogin alfa (activated) in human endotoxemia. *Shock* 2004;21:222-9.
4. Derhaschnig U, Reiter R, Knobl P, Baumgartner M, Keen P, Jilma B: Recombinant human activated protein C (rhAPC; drotrecogin alfa [activated]) has minimal effect on markers of coagulation, fibrinolysis, and inflammation in acute human endotoxemia. *Blood* 2003;102:2093-8.
5. Isobe H, Okajima K, Uchiba M, et al.: Activated protein C prevents endotoxin-induced hypotension in rats by inhibiting excessive production of nitric oxide. *Circulation* 2001;104:1171-5.
6. Favory R, Lancel S, Marechal X, Tissier S, Neviere R: Cardiovascular protective role for activated protein C during endotoxemia in rats. *Intensive Care Med* 2006;32:899-905.
7. Sennoun S DO, Barraud D, Gibot S, Levy B: Hemodynamic effects of activated protein C. *Intensive Care Medicine* 2006;32:S74.
8. Nick JA, Coldren CD, Geraci MW, et al.: Recombinant human activated protein C reduces human endotoxin-induced pulmonary inflammation via inhibition of neutrophil chemotaxis. *Blood* 2004;104:3878-85.
9. Abraham E: Effects of recombinant human activated protein C in human models of endotoxin administration. *Proc Am Thorac Soc* 2005;2:243-7.
10. Dahlback B, Villoutreix BO: Regulation of blood coagulation by the protein C anticoagulant pathway: novel insights into structure-function relationships and molecular recognition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1311-20.
11. Macias WL, Yan SB, Williams MD, et al.: New insights into the protein C pathway: potential implications for the biological activities of drotrecogin alfa (activated). *Crit Care* 2005;9 Suppl 4:S38-45.
12. Dahlback B, Villoutreix BO: The anticoagulant protein C pathway. *FEBS Lett* 2005;579:3310-6.
13. Mizutani A, Okajima K, Uchiba M, Noguchi T: Activated protein C reduces ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats by inhibiting leukocyte activation. *Blood* 2000;95:3781-7.
14. Hoffmann JN, Vollmar B, Laschke MW, et al.: Microhemodynamic and cellular mechanisms of activated protein C action during endotoxemia. *Crit Care Med* 2004;32:1011-7.
15. Uchiba M, Okajima K, Oike Y, et al.: Activated protein C induces endothelial cell proliferation by mitogen-activated protein kinase activation in vitro and angiogenesis in vivo. *Circ Res* 2004;95:34-41.
16. Isobe H, Okajima K, Harada N, Liu W, Okabe H: Activated protein C reduces stress-induced gastric mucosal injury in rats by inhibiting the endothelial cell injury. *J Thromb Haemost* 2004;2:313-20.

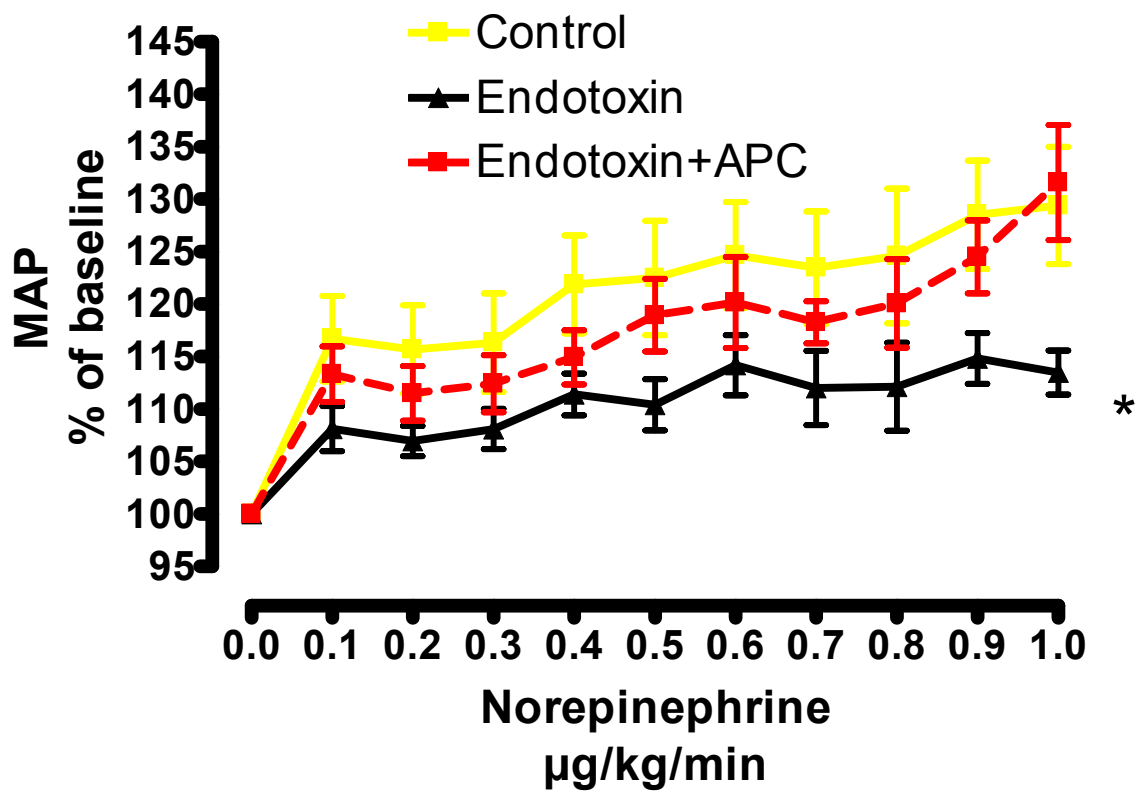
Figure 1





## Legend of figure 1

Time course of the norepinephrine dose (proportional change from the value at  $H_0$ ; mean and interquartile range) in patients receiving rhAPC and in matched control patients. The norepinephrine dose was measured at the start of rhAPC administration (treated patients) or at the time of its theoretical administration (control patients) ( $H_0$ ) and 4, 10, and 24 h later ( $H_4$ ,  $H_{10}$ , and  $H_{24}$ , respectively) (From 4 with permission)



## Legend of Figure 2

Using dose response curves with norepinephrine, APC was indeed found to be associated with an improvement in vasoreactivity when compared to endotoxin treated rats

\*  $p < 0.05$  vs control and endotoxin+APC group.(7)

# Modulation of the Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells–1 Pathway during Pneumonia in Rats

Sébastien Gibot,<sup>1,2</sup> Corentine Alauzet,<sup>3</sup> Frédéric Massin,<sup>4</sup> Nassira Sennoune,<sup>2</sup> Gilbert C. Faure,<sup>4</sup> Marie-Christine Béné,<sup>4</sup> Alain Lozniewski,<sup>3</sup> Pierre-Edouard Bollaert,<sup>1,2</sup> and Bruno Lévy<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Service de Réanimation Médicale, Hôpital Central, and <sup>2</sup>Laboratoire de Physiologie Expérimentale (Groupe Choc), <sup>3</sup>Laboratoire de Bactériologie, UMR CNRS 7565, and <sup>4</sup>Laboratoire d'Immunologie, Faculté de Médecine, Nancy Université, Nancy, France

**Background.** Triggering receptor expressed on myeloid cells–1 (TREM-1) is a cell-surface molecule that has been identified on both human and murine polymorphonuclear neutrophils and mature monocytes. The activation of TREM-1 in the presence of microbial components amplifies the inflammatory response and may be responsible for the hyperresponsiveness observed during the initial stage of sepsis. The aim of the present study was to investigate the effect of the modulation of the TREM-1 pathway during experimental pneumonia in rats.

**Methods.** Adult male Wistar rats were intratracheally inoculated with *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1 strain) and randomly treated or not treated with an analogue synthetic peptide derived from the extracellular moiety of TREM-1 (LP17).

**Results.** *P. aeruginosa* induced a severe pneumonia associated with signs of severe sepsis within the first 24 h. In septic rats, LP17 improved hemodynamic status, attenuated the development of lactic acidosis and hypoxemia, modulated lung and systemic inflammatory responses and coagulation activation, reduced lung histological damage, and improved survival.

**Conclusions.** The modulation of the TREM-1 pathway by the use of such synthetic peptides as LP17 appears beneficial during *P. aeruginosa* pneumonia in rats in attenuating lung and systemic inflammatory responses.

Sepsis constitutes a significant public health burden and remains an ever-present challenge in intensive care units. Its pathogenesis is now becoming better understood, and a greater comprehension of the complex network of immune, inflammatory, and hematological mediators involved in this disorder now allows for the development of rational and novel therapies.

Stimulatory immunoreceptors play a central role in the recognition of foreign antigens or pathogens by the immune system [1]. Several immunoglobulin-like activating receptors have been characterized, including paired immunoglobulin receptors [2], NKp44 [3], and

the Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate 1 family [4]. Recently, the triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM) family, a new family of receptors that is distantly related to NKp44, has been described [5, 6]. All TREMs associate the adaptor DAP12 for signaling. Among the TREM family, TREM-1 has been identified both on human and murine polymorphonuclear cells and on mature monocytes [5]. Its expression by these effector cells is dramatically increased in skin, biological fluids, and tissues infected by gram-positive or gram-negative bacteria or fungi [7, 8]. By contrast, TREM-1 is not up-regulated in samples from patients with noninfectious inflammatory disorders such as psoriasis, ulcerative colitis, or vasculitis caused by immune complexes [7]. In mice, the engagement of TREM-1 with agonist monoclonal antibodies (MAbs) stimulates the production of several proinflammatory cytokines and chemokines [5, 9], along with rapid neutrophil degranulation and oxidative burst [10]. The activation of TREM-1 in the presence of Toll-like receptor (TLR)–2 or TLR-4 ligands amplifies the production of proin-

Received 13 March 2006; accepted 9 May 2006; electronically published 29 August 2006.

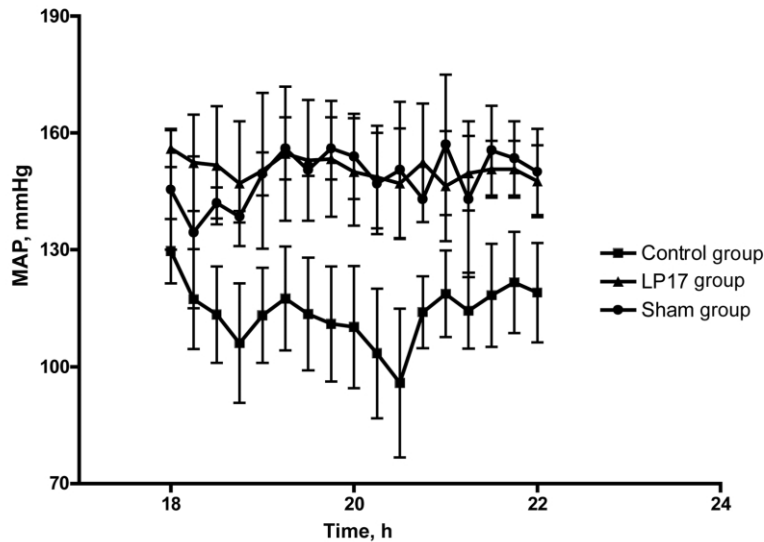
Potential conflicts of interest: none reported.

Financial support: Fondation Recherche Médicale; Association des Chefs de Service du Centre Hospitalier Universitaire de Nancy, France.

Reprints or correspondence: Dr. Sébastien Gibot, Service de Réanimation Médicale, 29 bld. du Maréchal de Lattre de Tassigny, Hôpital Central, 54035 Nancy, France (s.gibot@chu-nancy.fr).

The Journal of Infectious Diseases 2006;194:975–83

© 2006 by the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved.  
0022-1899/2006/19407-0015\$15.00



**Figure 1.** LP17-associated protection from hemodynamic deterioration. Mean arterial pressure (MAP) from LP17-treated rats (the LP17 group;  $n = 8$ ) was constantly higher than that of the control group ( $n = 12$ ) ( $P < .0001$ ). Time 0 corresponds to the time of *Pseudomonas aeruginosa* instillation.

flammatory cytokines (tumor necrosis factor [TNF]- $\alpha$ , interleukin [IL]- $1\beta$ , and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), together with the inhibition of IL-10 release [9]. Moreover, the activation of these TLRs up-regulates TREM-1 expression [5, 11]. Thus, TREM-1 and TLRs appear to cooperate in producing an inflammatory response. The role that TREM-1 plays as an amplifier of the inflammatory response has been confirmed in a mouse model of septic shock in which blocking signaling through TREM-1 partially protected mice from death [7, 12]. Both in vitro and in vivo, a synthetic peptide mimicking short, highly interspecies-conserved domains of TREM-1 attenuated the cytokine production of human mono-

cytes and protected septic mice from hyperresponsiveness and death [12]. This peptide was efficient not only in preventing but also in down-modulating the deleterious effects of proinflammatory cytokines [12].

Considering the involvement of TREM-1 during pneumonia [13–15] and that nosocomial pneumonia is a major cause of sepsis in intensive care units, we sought to investigate the effect of such a peptide in a rat model of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. Our hypothesis was that TREM-1 pathway modulation blunts the inflammatory response associated with pneumonia and provides protection from lung damage and death.

**Table 1. Systemic and selected biochemical parameters during *Pseudomonas aeruginosa*-induced pneumonia.**

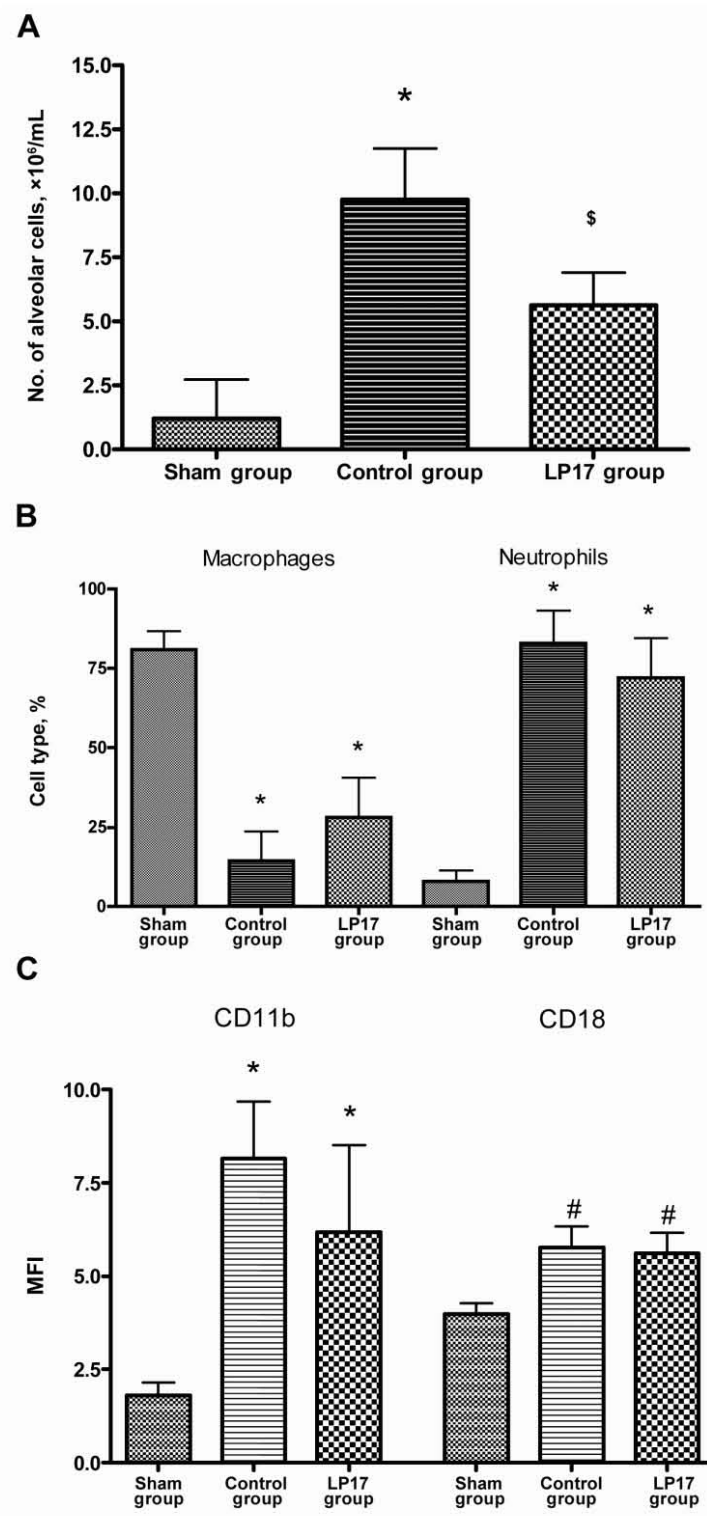
Study group, time after instillation	Heart rate, beats/min	Rectal temperature, °C	PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub>	pH	PaCO <sub>2</sub> , mm Hg	Lactate concentration, mmol/L
<b>Sham</b>						
18 h	430 ± 15 <sup>a,b</sup>	37.0 ± 0.15 <sup>a</sup>	396 ± 12 <sup>a,b</sup>	7.43 ± 0.01 <sup>a</sup>	32 ± 3	2.2 ± 0.2 <sup>a,b</sup>
24 h	430 ± 20 <sup>a,b</sup>	37.0 ± 0.15 <sup>a,b</sup>	429 ± 21 <sup>a,b</sup>	7.43 ± 0.04 <sup>a,b</sup>	31 ± 4	2.0 ± 0.3 <sup>a,b</sup>
<b>Control</b>						
18 h	480 ± 20 <sup>a</sup>	37.9 ± 1.3 <sup>a,c</sup>	194 ± 43 <sup>a,c</sup>	7.36 ± 0.05 <sup>a,c</sup>	33 ± 2	5.7 ± 0.6 <sup>a,c</sup>
24 h	520 ± 41 <sup>a</sup>	38.4 ± 2.2 <sup>a,c</sup>	186 ± 78 <sup>a,c</sup>	7.30 ± 0.03 <sup>a,c</sup>	34 ± 5	5.4 ± 0.7 <sup>a,c</sup>
<b>LP17</b>						
18 h	475 ± 17 <sup>b</sup>	37.2 ± 1.0 <sup>c</sup>	267 ± 14 <sup>b,c</sup>	7.42 ± 0.07 <sup>c</sup>	33 ± 4	3.6 ± 0.47 <sup>b,c</sup>
24 h	518 ± 20 <sup>b</sup>	38.0 ± 0.5 <sup>a,c</sup>	307 ± 60 <sup>b,c</sup>	7.38 ± 0.08 <sup>b,c</sup>	32 ± 4	3.3 ± 0.3 <sup>b,c</sup>

**NOTE.** The data are expressed as mean ± SD. FiO<sub>2</sub>, fraction of inspired oxygen; PaCO<sub>2</sub>, partial pressure of carbon dioxide in arterial blood; PaO<sub>2</sub>, partial pressure of oxygen in arterial blood.

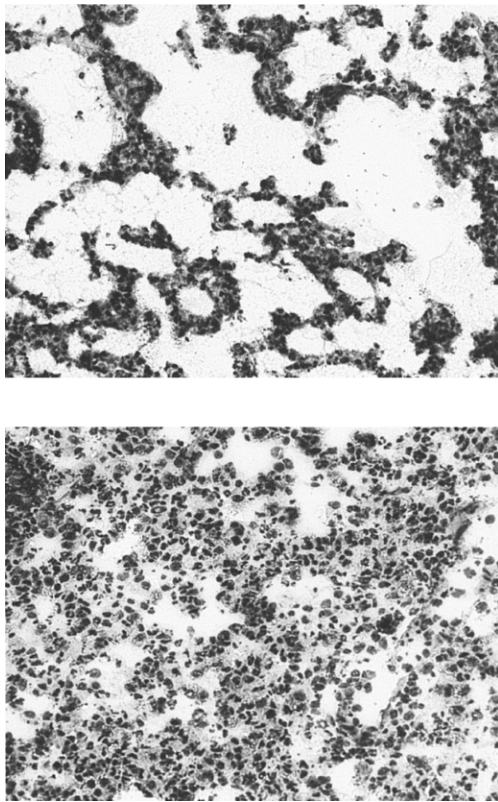
<sup>a</sup>  $P < .05$ , sham group vs. control group.

<sup>b</sup>  $P < .05$ , sham group vs. LP17 group.

<sup>c</sup>  $P < .05$ , LP17 group vs. control group.



**Figure 2.** LP17-associated decreases in cellular infiltration, without influencing cell type or CR3 expression. *A*, Reduced no. of alveolar cell in the LP17-treated rats (the LP group;  $n = 8$ ), compared with the control group ( $n = 12$ ). *B*, No alteration in type of recruited cells by LP17 treatment. *C*, No impairment of CR3 expression in alveolar cells by LP17 treatment. Measurements were performed 24 h after *Pseudomonas aeruginosa* instillation. MFI, mean fluorescence intensity. \* $P < .02$ , vs. sham group ( $n = 6$ );  $^{\#}P = .03$ , vs. sham group;  $^{\S}P = .01$ , LP17 group vs. control group.



**Figure 3.** Histopathological examination of the lungs 24 h after *Pseudomonas aeruginosa* instillation. Intraalveolar hemorrhage, protein precipitation, and leukocyte infiltration into the alveoli and edematous thickening of perivascular space were attenuated in the LP17-treated rats. A typical illustration (original magnification,  $\times 200$ ) is shown here. *Top panel*, LP17-treated rat; *bottom panel*, control rat.

## MATERIALS AND METHODS

**Rats.** Adult male Wistar rats (350–380 g) were purchased from Centre d'élevage Depre. The experiments were performed in compliance with the National Institutes of Health Guidelines on the Use of Laboratory Animals and approved by our Institutional Animal Care and Use Committee.

***P. aeruginosa* inoculum preparation and bacterial analyses.** A nonmucoid *P. aeruginosa* strain (serotype PAO1, ATCC BAA-47) was used for all studies. These bacteria were maintained in peptone broth containing 25% glycerol at  $-70^{\circ}\text{C}$ . Before each experiment, the strain was propagated in tryptone soy agar plates for 24 h at  $37^{\circ}\text{C}$ . One colony was then transferred to tryptone soy broth for another 24 h at  $37^{\circ}\text{C}$ . On the day of the experiment, the bacteria were centrifuged at 3000 g for 15 min, and the pellet of bacteria was washed twice with PBS. *P. aeruginosa* solution was then resuspended in saline at a concentration of  $7 \times 10^8$ – $8 \times 10^8$  cfu/mL, and a 0.5 mL/kg concentration of this solution was used for intratracheal inoculation as described below. Samples of bronchoalveolar lavage (BAL) fluid and lung homogenate were obtained aseptically for

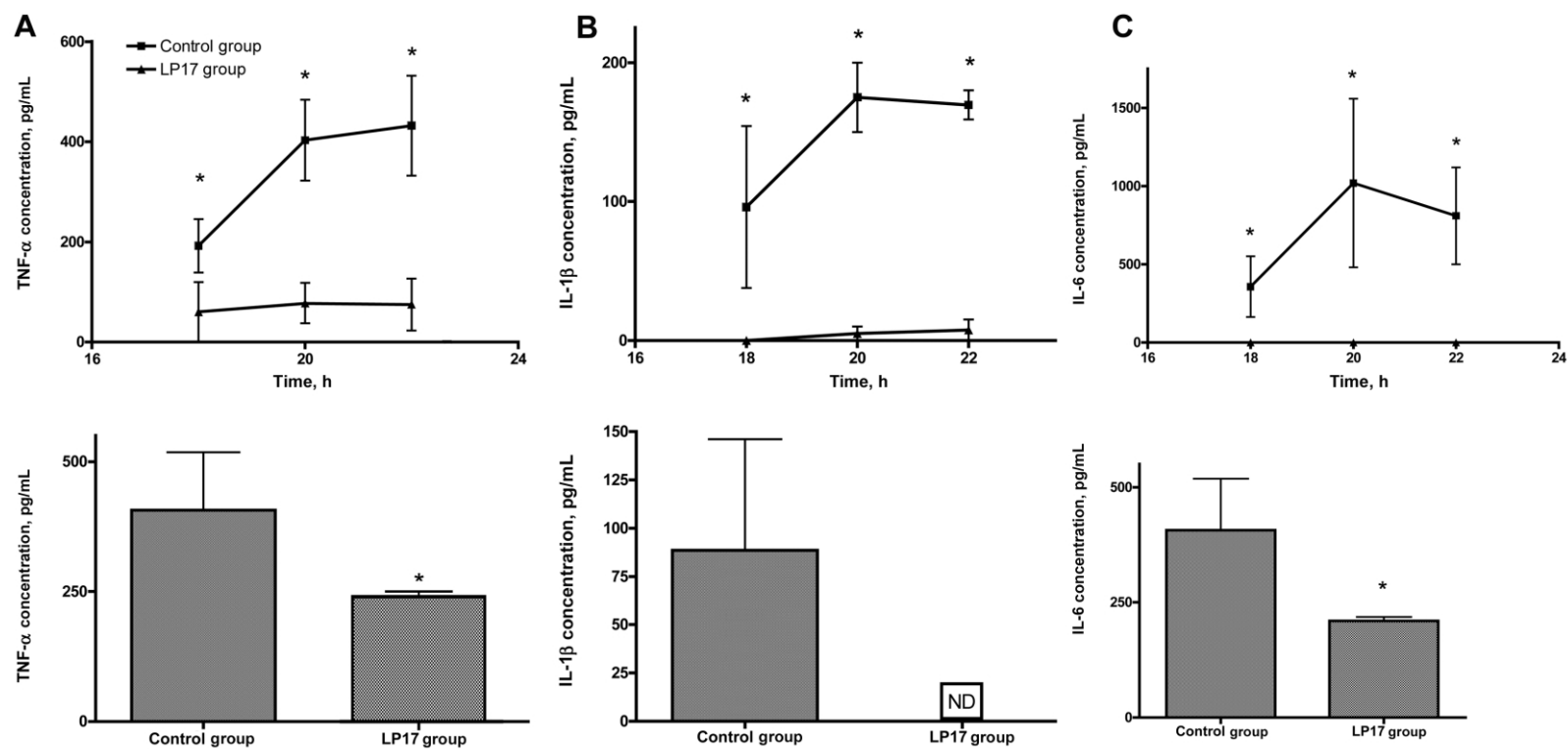
culture in rats with pneumonia 24 h after the bacterial instillation. The concentration of bacteria was then quantified by placing successive 10-fold dilutions of the bacterial suspension in tryptone soy agar plates and scoring visible colonies after 24 h incubation at  $37^{\circ}\text{C}$ .

**Bacterial pneumonia and LP17 treatment.** LP17, spanning the complementary determining region loop 3 of TREM-1, was chemically synthesized (Pepscan Systems) as described elsewhere [12]. The correct peptide (LQVTDSGLYRCVIYHPP) was obtained in  $>99\%$  yield; was homogeneous after preparative purification, as confirmed by mass spectrometry and analytic reversed phase high performance liquid chromatography; and was endotoxin free.

Rats were anesthetized with ether for a brief period. A median incision was made in the anterior neck to expose the trachea, and 2 successive intratracheal instillations, using 25-gauge needles, were performed. Rats were allocated randomly to receive 0.1 mL of either saline or LP17 (1 mg in 0.1 mL of saline) solution (see below for details) and, 5 min later, a 0.5 mL/kg concentration of either saline or bacterial solution (*P. aeruginosa*). We therefore studied rats with pneumonia (the control group), rats with pneumonia treated with LP17 (the LP17 group), and normal rats (the sham group).

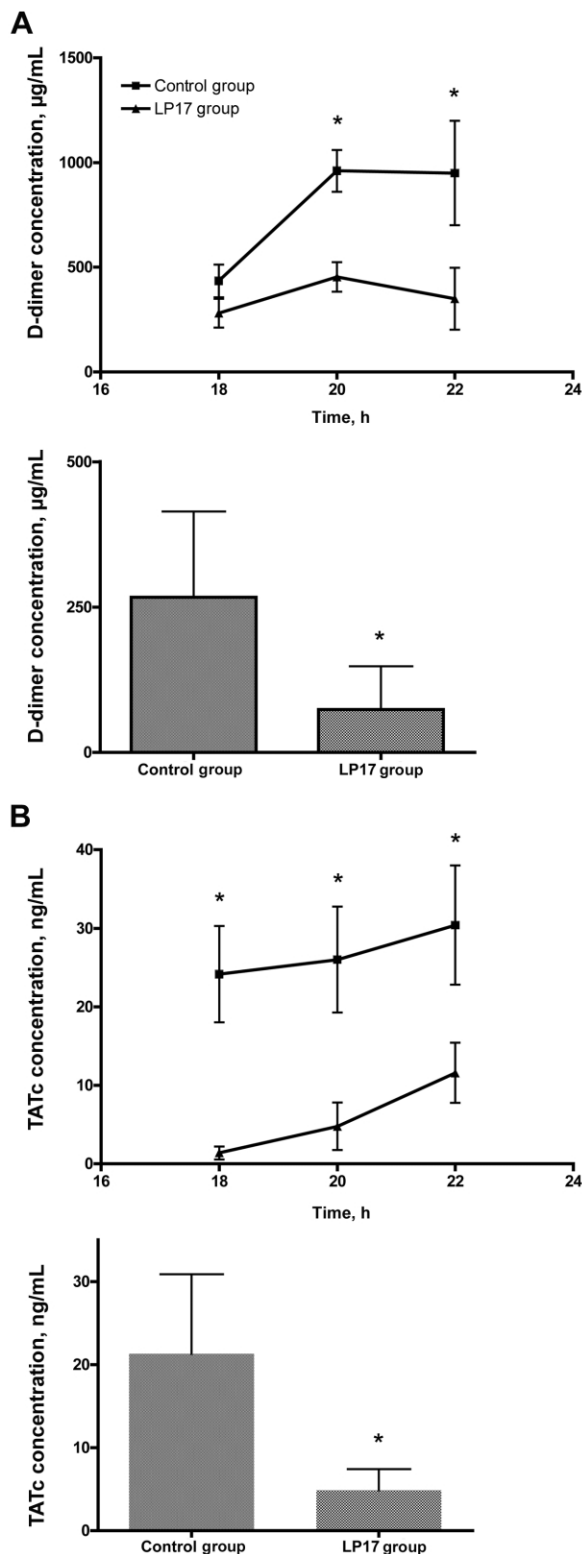
Preliminary studies established that a maximum severity of our model occurred between 18 and 24 h. We thus chose to start the mechanical ventilation 18 h after the intratracheal instillations, following a procedure described elsewhere [16]. The rats were anesthetized (intraperitoneally; 50 mg/kg pentobarbital sodium) and ventilated supine through an endotracheal tube (tidal volume, 7–8 mL/kg) (rodent ventilator no. 683; Harvard Apparatus) with a fraction of inspired oxygen of 1.0 and a respiratory rate of 60 breaths/min. Arterial pressure was continuously monitored through a carotid arterial line. In addition to the biological and histological analyses described below, a different set of rats was used to assess survival.

**BAL, differential cell count, and histological examination.** BAL was performed 24 h after bacterial inoculation by flushing the lungs 9 times with 2.5 mL of  $37^{\circ}\text{C}$  sterile pyrogen-free physiological saline via the tracheal cannula. The first fraction was removed. The 8 other fractions of 2.5 mL were recovered and pooled. The total number of lung cells was counted using a standard hemocytometer, and cytospin preparations were made. The cells were air-dried and stained with May-Grünwald Giemsa. Differential cell counts on 200 cells were made using standard morphological criteria. To examine the CR3 expression (CD11b/CD18) on the surface of alveolar cells, flow-cytometric analysis (FACScalibur; Becton Dickinson) was performed after staining the cells with CD11b/CD18 MAbs (RnD Systems) or isotypic control antibodies [16]. Histopathological examinations were performed in a blinded fashion as described elsewhere [17].



**Figure 4.** Plasma and bronchoalveolar cytokine concentrations. Plasma (*top*) and bronchoalveolar lavage fluid (*bottom*) concentrations of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  (A), interleukin (IL)-1 $\beta$  (B), and IL-6 (C) were more elevated in the control group ( $n = 12$ ) than in LP17-treated rats (the LP17 group;  $n = 8$ ). Measurements were performed 24 h after *Pseudomonas aeruginosa* instillation. ND, not detected. \* $P < .001$ .





**Figure 5.** Plasma and bronchoalveolar D-dimer and thrombin-anti-thrombin complex (TATc) concentrations. Plasma and bronchoalveolar lavage fluid concentrations of D-dimer (A) and TATc (B) were more elevated in the control group ( $n = 12$ ) than in LP17-treated rats (the LP17 group;  $n = 8$ ). Measurements were performed 24 h after *Pseudomonas aeruginosa* instillation. \* $P < .001$ .

**Biological measurements.** Arterial blood gases and lactate concentrations were determined hourly 30 min after the initiation of mechanical ventilation on an automatic blood gas analyzer (ABL 735; Radiometer). Concentrations of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 in the plasma and the BAL fluid were determined by ELISA (Biosource), as were plasma and BAL fluid D-dimer (Asserachrome D-Di; Stago Diagnostica) and thrombin-anti-thrombin complex (TATc) concentrations (Enzygnost TAT micro; Dade Behring). All rats were administered a volume of saline corresponding to the volume of blood drawn after sampling.

**Statistical analysis.** Comparisons between 2 groups were made using Student's  $t$  test. Comparisons between  $>2$  groups were made using a 1-way analysis of variance. Survival curves were compared using the log-rank test. A 2-tailed value of  $P < .05$  was considered significant. The data are expressed as mean  $\pm$  SD. All analyses were performed with GraphPad Prism software (version 2.01; GraphPad).

## RESULTS

### *LP17-associated protection from hemodynamic deterioration, prevention of lactic acidosis, and improvement in oxygenation.*

Pneumonia induced a progressive mean arterial pressure (MAP) decrease in the control rats, from  $129 \pm 8$  to  $102 \pm 4$  mmHg between 18 and 22 h after *P. aeruginosa* instillation. The LP17 group showed a stable and constantly higher MAP than the control group ( $P < .0001$ ) and no difference from that of the sham group (figure 1). The changes in heart rate, rectal temperature, lactic acidosis, and oxygenation are summarized in table 1. A protective effect of LP17 on the development of the lactic acidosis and the deterioration of oxygenation was observed.

**No effect of LP17 on bacterial clearance.** We hypothesized that the improvement of hemodynamics and oxygenation observed with LP17 could be due to better bacterial clearance. To address this question, we measured bacterial load both in BAL fluid and lung homogenate 24 h after *P. aeruginosa* instillation. We were unable to show any effect that LP17 has on bacterial load, suggesting that LP17 has no effect on bacterial clearance. No *P. aeruginosa* could be found in the sham group.

### *LP17-associated reductions in cellular infiltration and histological lung damage.*

We next investigated whether LP17 affects local cell recruitment. Pneumonia induced a massive cellular efflux as shown in figure 2A. LP17 reduced the alveolar cell number, compared with the control group ( $P = .01$ ). The type of cells present in the BAL fluid was not affected by LP17, with 20%–25% macrophages and 70%–75% neutrophils (figure 2B) recruited, nor was the recruited neutrophils' activation affected, as assessed by their CR3 (CD11b/CD18) expression (figure 2C). Histological study found severe lung injury; that is, intraalveolar hemorrhage, protein precipitation, leukocyte infiltration into the alveoli, and edematous thickening of per-

ivascular space in the *P. aeruginosa*-instilled lungs (figure 3). These alterations were attenuated in the LP17 group. Therefore, LP17 prevents the massive cellular infiltration and histological damage induced by pneumonia.

**LP17-associated attenuation of local and systemic inflammatory response.** We next determined whether LP17 could alter the inflammatory cytokine response induced by pneumonia. We measured TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6, both in the BAL fluid 24 h after *P. aeruginosa* instillation and in the plasma 18, 20, and 22 h after instillation (figure 4). The concentrations of these 3 cytokines were elevated in the plasma 18 h after instillation and further increased during mechanical ventilation (i.e., 20 and 22 h after instillation). By contrast, they were barely detectable in the plasma from the LP17 group ( $P < .001$  for each cytokine, compared with the control group). A similar increase was found in the BAL fluid, and once again the cytokine concentrations were decreased in the LP17 group, compared with the control group (figure 4). These data suggest that LP17 attenuates the pneumonia-induced inflammatory response both locally and systemically.

**LP17-associated decreases in local and systemic coagulation activation.** Sepsis and pneumonia are associated with fibrin deposition in the pulmonary compartment and disturbances in hemostatic balance [18, 19]. We, therefore, investigated the effects that LP17 has on local and systemic coagulation activation. Both D-dimer and TATc concentrations were markedly elevated in plasma and BAL fluid during pneumonia (figure 5). LP17 treatment was associated with lower concentrations of these markers at all time points, except for plasma D-dimer 18 h after *P. aeruginosa* instillation. Thus, LP17 prevents pneumonia-induced coagulation activation.

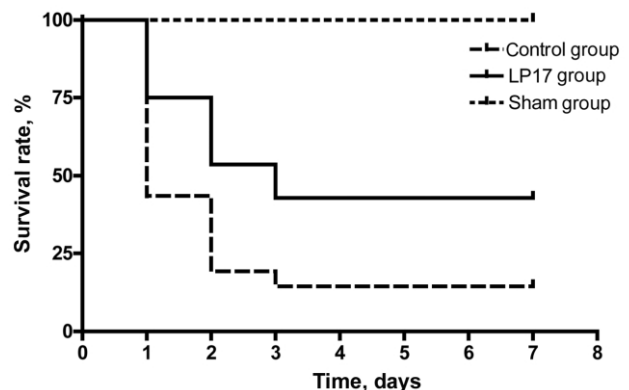
**LP17-associated improvements in survival rate.** We investigated whether the clinical and biological effects of LP17 could confer a survival advantage in this experimental model of sepsis. Pneumonia was associated with a high death rate, with only 43% of the control rats surviving the first 24 h, and at day 3 the survival rate was only 14% (figure 6). By contrast, LP17 improved survival to 75% at day 1 and 43% at day 3 ( $P = .03$ , log-rank test). There were no late deaths (after day 3), indicating that LP17 did not merely delay the onset of lethality but conferred lasting protection. No deaths occurred in the sham group.

## DISCUSSION

In the present study, we report that the modulation of the TREM-1 pathway by means of treatment with LP17, a synthetic peptide, attenuates pulmonary and systemic inflammation and promotes survival during experimental bacterial pneumonia in rats. Overactivation of the DAP12/TREM-1 pathway appears to be deleterious, in that it promotes an excessive inflammatory response. Using a model of hepatic inflammation induced by

Zymosan A (Nacaraitesque), Nochi et al. demonstrated an increase in granuloma formation in DAP12-overexpressing mice [20]. This was inhibited by hepatic transgenic expression of a soluble form of the extracellular domain of TREM-1, as an antagonist of DAP12 signaling. In a lipopolysaccharide-induced septic shock mouse model, administration of an agonist anti-TREM-1 MAb doubled the mortality rate from 50% to 100% [12]. By contrast, treatment with a TREM-1 fusion protein protected mice against shock induced by endotoxin or cecal ligation and puncture [7]. Monocytes and macrophages produce a soluble form of TREM-1 (sTREM-1), and the administration of LP17, a peptide mimicking this soluble receptor, reduced inflammatory hyperresponsiveness and lowered mortality in septic mice [12].

Studies using DAP12 knockout (DAP12<sup>-/-</sup>) mice also provide indirect evidence of a role that the DAP12-associated receptor TREM-1 plays in the development of inflammation. Turnbull et al. recently observed that septic DAP12<sup>-/-</sup> mice had reduced plasma cytokine concentrations, a decreased acute-phase response, and a lower mortality rate [21]. In cells isolated after sepsis and stimulated ex vivo, DAP12 signaling augmented lipopolysaccharide-mediated cytokine production. These data demonstrate that DAP12 signaling enhances the response to microbial products during sepsis, amplifying inflammation and contributing to mortality. Conflicting with these results, Hammerman et al. recently found that DAP12-deficient macrophages produced higher concentrations of inflammatory cytokines in response to TLR-2, TLR-4, and TLR-9 stimuli and that DAP12-deficient mice were more susceptible to endotoxic shock [22]. These findings suggest that 1 or more DAP12-pairing receptors negatively regulate signaling through TLRs. One of these could be a specific receptor for sTREM-1 (and



**Figure 6.** LP17-associated protection of rats from death. Rats ( $n = 17$  in each group) were monitored during 1 week after *Pseudomonas aeruginosa* instillation. The survival rate was 14% in the control group, compared with 43% in LP17-treated rats (the LP17 group) ( $P = .03$ , log-rank test). No deaths were observed in the sham group.

then could recognize the TREM-1 peptide LP17); many DAP12-paired receptors have a related inhibitory receptor [22].

In the present study, we extend previous observations of a beneficial effect of LP17 [12] in another physiologically relevant model of infection. Our *P. aeruginosa* pneumonia model was severe enough to induce the development of a severe sepsis, as demonstrated by hemodynamic deterioration, the occurrence of a lactic acidosis, and hypoxemia. All these disorders were attenuated by LP17, and, importantly, survival was improved by this treatment.

The mechanisms by which LP17 is beneficial during pneumonia could involve phagocytic cell recruitment or their killing capacity. In agreement with the results of Hamerman et al., we found no effect of LP17 in terms of bacterial colony count, in either BAL fluid or lung homogenate [22]. By contrast, Carpenter et al. recently reported that intrapulmonary delivery of an adenovirus vector expressing KARAP/DAP12 enhanced fungal clearance during experimental invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic mice [23]. Nevertheless, this model is considerably different from ours, and this could largely explain the discrepancy.

As expected, pneumonia induced massive cell recruitment within the lung and led to histological damage. LP17 prevented these alterations. Importantly, although the number of infiltrating cells was reduced, LP17 did not alter their nature (majority of polymorphonuclear neutrophils) or the level of expression of CR3, which is crucial to their phagocytic activity [24].

*P. aeruginosa* infection was also responsible for the development of an inflammatory response, both locally, as assessed by the BAL fluid cytokine concentrations, and systemically. LP17 blunted production of this cytokine within the lung but without completely inhibiting it. By contrast, the systemic inflammatory response was almost completely abolished and could explain the hemodynamic improvement. These findings are in agreement with those of previous studies investigating TREM-1 pathway modulation during other circumstances [7, 12].

Acute lung injury and pneumonia are associated with pulmonary activation of coagulation and impairment of fibrinolysis, resulting in fibrin deposition in the lung [18, 19]. We used D-dimer and TATc concentrations as markers for coagulation activation. We found that pneumonia elicited increases in the local and systemic concentrations of both markers and that these increases were markedly reduced by LP17 treatment. Because TREM-1 has no known action on coagulation, these data suggest that LP17 has an indirect effect on coagulation activation, probably by reducing the inflammatory response [25].

Although the effect of LP17 appears to be robust, some limitations deserve consideration. To obtain a severe model of sepsis, we chose to not administer antibiotics to the rats, and, therefore, mortality was high. Obviously, the relevance of this choice from a clinical point of view is questionable, because

most of the patients who have pneumonia receive early and adequate antibiotherapy. Another limitation is that we administered LP17 at the time of *P. aeruginosa* instillation and did not investigate its effect when given as a delayed treatment. This was done to avoid repeated anesthesia that might have been difficult and deleterious in rats with already-developed pneumonia.

In conclusion, the modulation of the TREM-1 pathway by the use of synthetic peptide, such as LP17, is beneficial during *P. aeruginosa* pneumonia in rats in attenuating lung and systemic inflammatory responses.

## Acknowledgments

We thank Chantal Montemont, Eliane Vautier, and Anne-Marie Carpenter for their valuable technical assistance.

## References

1. Diefenbach A, Raulet DH. Innate immune recognition by stimulatory immunoreceptors. *Curr Opin Immunol* **2003**; 15:37–44.
2. Kubagawa H, Burrows PD, Cooper MD. A novel pair of immunoglobulin-like receptors expressed by B cells and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **1997**; 94:5261–6.
3. Cantoni C, Bottino C, Vitale M, et al. NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily. *J Exp Med* **1999**; 189:787–96.
4. Dietrich J, Cella M, Seiffert M, Buhning HJ, Colonna M. Cutting edge: signal-regulatory protein  $\beta 1$  is a DAP12-associated activating receptor expressed on myeloid cells. *J Immunol* **2000**; 164:9–12.
5. Bouchon A, Dietrich J, Colonna M. Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *J Immunol* **2000**; 164:4991–5.
6. Daws MR, Lanier LL, Seaman WE, Ryan JC. Cloning and characterization of a novel mouse myeloid DAP12-associated receptor family. *Eur J Immunol* **2001**; 31:743–91.
7. Bouchon A, Facchetti F, Weigand MA, Colonna M. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature* **2001**; 410:1103–7.
8. Colonna M, Facchetti F. TREM-1 (triggering receptor expressed on myeloid cells): a new player in acute inflammatory responses. *J Infect Dis* **2003**; 187(Suppl 2):S397–401.
9. Bleharski JR, Kiessler V, Buonsanti C, et al. A role for triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in host defense during the early-induced and adaptive phases of the immune response. *J Immunol* **2003**; 170: 3812–8.
10. Radsak MP, Salih HR, Rammensee HG, Schild H. Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in neutrophil inflammatory responses: differential regulation of activation and survival. *J Immunol* **2004**; 172: 4956–63.
11. Knapp S, Gibot S, de Vos A, Versteeg HH, Colonna M, van der Poll T. Cutting edge: expression patterns of surface and soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in human endotoxemia. *J Immunol* **2004**; 173:7131–4.
12. Gibot S, Kolopp-Sarda MN, Bene MC, et al. A soluble form of the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 modulates the inflammatory response in murine sepsis. *J Exp Med* **2004**; 200:1419–26.
13. Gibot S, Cravoisy A, Levy B, Bene MC, Faure GC, Bollaert PE. Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells and the diagnosis of pneumonia. *New Engl J Med* **2004**; 350:451–8.
14. Determann RM, Millo JL, Gibot S, et al. Serial changes in soluble

- triggering receptor expressed on myeloid cells in the lung during development of ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med* **2005**; 31:1495–500.
15. Richeldi L, Mariani M, Losi M, et al. Triggering receptor expressed on myeloid cells: role in the diagnosis of lung infections. *Eur Respir J* **2004**; 24:247–50.
  16. Schagat TL, Wofford JA, Greene KE, Wright JR. Surfactant protein A differentially regulates peripheral and inflammatory neutrophil chemotaxis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2003**; 284:L140–7.
  17. Boyer S, Faure K, Ader F, et al. Chronic pneumonia with *Pseudomonas aeruginosa* and impaired alveolar fluid clearance. *Respir Res* **2005**; 6:17.
  18. Gunther A, Mosavi P, Heinemann S, et al. Alveolar fibrin formation caused by enhanced procoagulant and depressed fibrinolytic capacities in severe pneumonia: comparison with the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* **2000**; 161:454–62.
  19. Levi M, Schultz MJ, Rijneveld AW, van der Poll T. Bronchoalveolar coagulation and fibrinolysis in endotoxemia and pneumonia. *Crit Care Med* **2003**; 31:S238–42.
  20. Nochi H, Aoki N, Oikawa K, et al. Modulation of hepatic granulomatous responses by transgene expression of DAP12 or TREM-1-Ig molecules. *Am J Pathol* **2003**; 162:1191–201.
  21. Turnbull IR, McDunn JE, Takai T, Townsend RR, Cobb JP, Colonna M. DAP12 (KARAP) amplifies inflammation and increases mortality from endotoxemia and septic peritonitis. *J Exp Med* **2005**; 202:363–9.
  22. Hamerman JA, Tchao NK, Lowell CA, Lanier LL. Enhanced Toll-like receptor responses in the absence of signaling adaptor DAP12. *Nat Immunol* **2005**; 6:579–86.
  23. Carpenter KJ, Buckland KE, Xing Z, Hogaboam CM. Intrapulmonary, adenovirus-mediated overexpression of KARAP/DAP12 enhances fungal clearance during invasive aspergillosis. *Infect Immun* **2005**; 73:8402–6.
  24. Pishko EJ, Kirimanjeswara GS, Pilione MR, Gopinathan L, Kennett MJ, Harvill ET. Antibody-mediated bacterial clearance from the lower respiratory tract of mice requires complement component C3. *Eur J Immunol* **2004**; 34:184–93.
  25. Levi MM, van der Poll T. Two-way interactions between inflammation and coagulation. *Trends Cardiovasc Med* **2005**; 15:254–9.

